

【综述】

通信作者:杨道坤(1970-),男,河南商丘人,硕士,教授,硕士研究生导师,研究方向:病毒性肝炎、肝纤维化基础与临床;E-mail: dk13949620669@163.com。

用研究进展进行综述,并着重对 TLR3 在 HBV 中的免疫调节作用以及其抑制 HBV 相关肝细胞癌的作用进行阐述,以期为临床研究更有效的抗 HBV 方案提供依据。

1 TLRs 在 HBV 感染中的作用研究概况

在已发现的人类 TLRs 中,非实质肝细胞(如单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、星状细胞)表达 TLRs 整个模式识别受体,而肝细胞主要表达 TLR2、TLR3、TLR4 和视黄酸(维甲酸)诱导基因蛋白 I (retinoic acid-inducible gene I, RIG-I) 等模式识别受体,而 TLR7、TLR8、TLR9 和 TLR10 表达水平非常低;但有研究发现,HBV 转基因小鼠接受 1 次静脉注射 TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7 和 TLR9 特异性配体后,除 TLR2 外,其余配体均以 IFN- α 、IFN- β 依赖方式抑制肝脏 HBV 复制^[10]。BROERING 等^[11] 研究发现,与乙型肝炎 E 抗原(hepatitis B e antigen, HBeAg)阴性患者相比,HBeAg 阳性患者新鲜肝脏活检组织肝细胞和库普弗细胞中 TLR2 表达降低。以上这些研究结果均说明 TLRs 家族成员参与了机体非特异性免疫。

2015 年临床前研究结果显示,TLR7、TLR8 和 TLR9 的小分子激动剂在 I 期和 II 期的临床试验中安全性较高^[12-13],其中以 TLR9 配体作为辅助剂所生产的乙肝病毒疫苗疗效优于常规乙肝病毒疫苗,而且已获批准用于临床^[14]。随后研究证明,TLRs 配体有较强的抗病毒能力,而且 TLR7 激动剂正在进行慢性 HBV 感染治疗的临床试验,如 2020 年有研究指出,在 HBV 感染小鼠模型中,TLR7 配体可打破小鼠的免疫耐受性,持续诱导乙型肝炎抗原(hepatitis B antigen, HBAg)特异性抗体和 T 细胞反应,有助于清除 HBV 病毒^[15];BERTOLETTI 等^[16] 研究也证明,微调 TLR7 激动剂有助于 CHB 的功能性治愈。HU 等^[17] 于 2021 年发现一种新型的选择性 TLR7 激动剂 TQ-A3334,其在人体内能够被快速吸收,且研究过程中未发生严重的不良事件,未来可以用于治疗 CHB。

2 TLR3 在 HBV 中的免疫调节作用

TLR3 基因在人体主要表达于原代肝细胞、Kupffer 细胞、肝树突状细胞、肝星状细胞^[18]。TLR3 可通过激活 Kupffer 细胞和肝窦内皮细胞抑制 HBV 基因组复制;TLR3 配体 polyI:C 能激活肝星状细胞,诱导干扰素调节因子(interferon regulatory factor, IRF) 3、IRF7 的表达与磷酸化,从而使 IFN- β 、IFN- λ 表达增加,进而显著抑制人肝癌 HepG2 细胞

中 HBV 复制^[19-20],这也证明了肝星状细胞不仅仅参与肝损伤的修复,也参与 HBV 感染者的天然免疫。KAYESH 等^[21] 研究发现,HBV 感染者体内 TLR3 及其信号分子表达水平明显低于健康人群,认为 TLR3 表达受损可能是导致免疫应答异常的原因,上调 TLR3 及其信号分子的表达并应用 TLR3 激动剂可能是重新激活 CHB 患者的免疫应答和清除 HBV 的关键途径。有研究发现,将小鼠 TLR3 基因敲除后,其体内不再表达 IL-8、其他激活抗 HBV 免疫反应所必需的免疫分子,并认为上调 TLR3 及其信号分子的表达是重新激活机体先天免疫反应和清除乙肝病毒的关键^[22]。机体免疫激活的自然杀伤细胞也可介导 IFN- λ 的表达,进而抑制 HepG2 细胞中 HBV 的复制^[23]。TLR3 还可以识别细胞内的病毒双链 RNA(double-strand RNA, dsRNA),通过 β 干扰素 TIR 结构域衔接蛋白(TIR-domain-containing adaptor inducing interferon- β , TRIF)途径激活核因子- κ B、RIF3 和(或) RIF7;除了病毒 dsRNA,TLR3 还可以识别内源性 dsRNA、内源性 mRNA 及外源性 mRNA,进而通过 HBV RNA 与 dsRNA 结合蛋白结合,诱导机体免疫应答,从而有助于清除病毒;Riboxol 是已发现的激活 TLR3 合成的双链 dsRNA,在体外培养的原代人肝细胞中具有持久性的抗病毒作用,可抑制 HBV 复制并降低 cccDNA 水平^[24-25]。

有研究报道,CHB 患者肝内基因表达谱显示抗病毒效应子、干扰素刺激基因、TLRs 和病原体识别受体途径均被显著下调,但与 HBV 复制没有直接关系^[26]。THOMPSON 等^[27] 和 MANESIS 等^[28] 研究发现,宿主先天性免疫反应的损害与 HBeAg(+)患者中常见的血清或肝内 HBV DNA 水平升高无关,而较高水平的乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)通过下调 I/III 型 IFN 信号转导和炎症反应,抑制 TLR3 表达,进而抑制免疫反应,因此,HBsAg 水平较低的患者体内固有免疫基因有较高表达。REAL 等^[29] 反向证明了在缺乏 HBsAg 的情况下,HBV 复制能触发依赖 TLR3 的 IFN 反应,而 TLR3 高表达可进一步抑制肝脏中病毒复制。因此,降低 HBsAg 水平可部分恢复患者的肝内先天性免疫,恢复机体对病毒的免疫应答。同时 ASADI-ASADABAD 等^[23] 研究报道,TLR3 配体可显著抑制 HBSAg 和 HBeAg 表达。这些研究结果均支持 TLR3 免疫调节剂可以作为 CHB 功能性治愈的策略。

3 TLR3 抑制 HBV 相关肝细胞癌发展

TLR3 与 HBV 相关的肝细胞癌息息相关,研究报道,与癌旁组织相比,肝细胞癌(hepatocellular car-

cinoma,HCC)组织中 TLR3 表达显著降低,证明了 TLR3 可促进肝癌细胞凋亡,抑制基质金属蛋白酶-2 的表达及内皮祖细胞和血管的生成^[30]。有研究报道,TLR3 激动剂双链 RNA(BM-06)可激活 TLR3 通路调节机体的先天免疫反应,进而抑制肝癌细胞增殖^[31]。有研究发现,TLR3 激动剂聚丙烯酸和索拉非尼联合治疗可以抑制小鼠体内蛋白激酶 B、丝裂原活化蛋白激酶和细胞信号调节激酶的磷酸化,增强局部自然杀伤细胞、T 细胞、巨噬细胞和树突状细胞的活化,进而增加肿瘤细胞凋亡和肿瘤微环境中的宿主免疫反应,达到对 HCC 控制的目的^[32]。BONNIN 等^[33] 研究报道,TLR3 在人类和小鼠肝癌细胞中的表达均明显下降,TLR3 低表达是肝癌细胞凋亡的逃避机制。在一项关于 HCC 患者 TLR3 基因的研究中发现,TLR3 基因多态性可能是 HBV 相关 HCC 的危险因素,TLR3 和 TLR4 基因多态性是检测 HBV 感染相关癌症的标志物^[34]。最近有研究报道,TLR3 缺乏会减少肝细胞凋亡,加速 HCC 的发生,且 HCC 患者 TLR3 表达与预后相关,TLR3 可成为 HCC 的治疗靶点^[33]。但目前尚无 TLR3 激动剂类药物进入临床。总之,TLR3 在 HBV 感染及 HBV 相关肝细胞癌中均发挥着重要作用,TLR3 的免疫调节作用在 HCC 诊疗中有很大的研究前景。

4 结语与展望

HBV 感染人群先天性免疫受抑制,先天性免疫相关受体表达受损,适应性免疫细胞功能下降,特别是 HBV 特异性 T 细胞功能衰竭,这些仍是 CHB 治愈面临的严峻挑战。目前核苷(酸)类似物和 IFN- α 虽可以有效地抑制 HBV 复制,但不能清除肝内 cccDNA。近年来免疫疗法是肝脏疾病的研究热点,适应性免疫应答在 HBV 清除中发挥主要作用,HBV 感染与肝脏天然免疫之间的相互作用在疾病发展中起着至关重要的作用,未来 CHB 的治疗可能更侧重于免疫治疗。TLRs 在 CHB 的发展和抗病毒免疫治疗中发挥着重要作用,特别是 TLR3 为病毒感染的关键传感器,参与病毒介导的非特异性免疫反应,TLR3 有可能成为 CHB 及 HBV 相关肝细胞癌治疗的潜在靶点。

参考文献:

[1] 中华医学会感染病学分会,华医学会肝病学会. 慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版)[J]. 实用肝脏病杂志,2020,23(1): S9-S32.
CHINESE SOCIETY OF INFECTIOUS DISEASES, CHINESE MEDICAL ASSOCIATION, CHINESE SOCIETY OF HEPATOLOGY, CHINESE MEDICAL ASSOCIATION. The guidelines of pre-

vention and treatment for chronic hepatitis B (2019 version) [J]. *Chin J Hepatol*, 2020, 23(1): S9-S32.
[2] QI W Q, ZHANG Q, XU Y, et al. Peg-interferon and nucleos(t)ide analogue combination at inception of antiviral therapy improves both anti-HBV efficacy and long-term survival among HBV DNA-positive hepatocellular carcinoma patients after hepatectomy/ablation[J]. *J Viral Hepat*, 2020, 27(4): 387-396.
[3] FRIEDRICH S K, LANG P A, FRIEBUS-KARDASH J, et al. Mechanisms of lymphatic system-specific viral replication and its potential role in autoimmune disease[J]. *Clin Exp Immunol*, 2019, 195(1): 64-73.
[4] GUIDOTTI L G, ISOGAWA M, CHISARI F V. Host-virus interactions in hepatitis B virus infection[J]. *Curr Opin Immunol*, 2015, 36: 61-66.
[5] MILLING S. Sophisticated specificity in the innate immune response[J]. *Immunology*, 2019, 158(2): 61-62.
[6] MENG Z, CHEN Y, LU M. Advances in targeting the innate and adaptive immune systems to cure chronic hepatitis B virus infection [J]. *Front Immunol*, 2020, 10: 3127.
[7] ZENG Y, WU W, FU Y, et al. Toll-like receptors, long non-coding RNA NEAT1, and RIG-I expression are associated with HBeAg-positive chronic hepatitis B patients in the active phase[J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 33(5): e22886.
[8] YE S, ZHANG X, ZHANG YB, et al. Association of TLR3 (rs3775291) and IL-10 (rs1800871) gene polymorphisms with susceptibility to hepatitis B infection: a meta-analysis[J]. *Epidemiol Infect*, 2020, 148: e228.
[9] TEIXEIRA H S, ZHAO J, KAZMIERSKI E, et al. TLR3-dependent activation of TLR2 endogenous ligands via the MyD88 signaling pathway augments the innate immune response [J]. *Cells*, 2020, 9(8): 1910.
[10] ISOGAWA M, ROBEK M D, FURUICHI Y, et al. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication *in vivo* [J]. *J Virol*, 2005, 79(11): 7269-7272.
[11] BROERING R, LU M, SCHLAACK J F. Role of toll-like receptors in liver health and disease[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2011, 121(10): 415-426.
[12] PAULSEN D, WEBER O, RUEBSAMEN-SCHAEFF H, et al. AIC649 induces a bi-phasic treatment response in the woodchuck model of chronic hepatitis B [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): 144383.
[13] GANE E J, LIM Y S, GORDAN S C, et al. The oral toll-like receptor-7 agonist GS-9620 in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *J Hepatol*, 2015, 63(2): 320-328.
[14] DU K, LIU J, BROERING R, et al. Recent advances in the discovery and development of TLR ligands as novel therapeutics for chronic HBV and HIV infections[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2018, 13(7): 661-670.
[15] HU Y, TANG L, ZHU Z, et al. A novel TLR7 agonist as adjuvant to stimulate high quality HBsAg-specific immune responses in an HBV mouse model[J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 112.
[16] BERTOLETTI A, LE BERT N. Fine-tuning TLR-7-based therapy for functional HBV cure [J]. *Hepatol Commun*, 2019, 3(10): 1289-1292.
[17] HU Y, ZHANG H, WU M, et al. Safety, pharmacokinetics and

pharmacodynamics of TQ-A3334, an oral toll-like receptor 7 agonist in healthy individuals[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2021, 30(3):263-269.

[18] MOSSAD Y M, METWALLY S S, FARAG R E, *et al.* Association between toll-like receptor 3 (TLR3) rs3775290, TLR7 rs179008, TLR9 rs352140 and chronic HCV[J]. *Immunol Invest*, 2019, 48(3):321-332.

[19] DOYLE S E, SCHRECKHISE H, KHUU-DUONG K, *et al.* Interleukin-29 uses a type I interferon-like program to promote antiviral responses in human hepatocytes[J]. *Hepatology*, 2006, 44(4):896-906.

[20] MIELCARSKA M B, BOSSOWSKA-NOWICKA M, GREGORCZYK-ZBOROCH K P, *et al.* Syk and Hrs regulate TLR3-mediated antiviral response in murine astrocytes[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:6927380.

[21] KAYESH M E H, KOHARA M, TSUKIYAMA-KOHARA K. Toll-like receptor response to hepatitis B virus infection and potential of TLR agonists as immunomodulators for treating chronic hepatitis B; an overview[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19):10462.

[22] CHIAPPINELLI K B, STRISSEL P L, DESRICHARD A, *et al.* Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses[J]. *Cells*, 2015, 162(5):974-986.

[23] ASADI-ASADABAD S, SARVNAZ H, AMIRI M M, *et al.* Influence of pattern recognition receptor ligands on induction of innate immunity and control of hepatitis B virus infection[J]. *Viral Immunol*, 2021, 34(8):531-541.

[24] SEYA T, TAKEDA Y, MATSUMOTO M. Atoll-like receptor 3 (TLR3) agonist ARNAX for therapeutic immunotherapy[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 147:37-43.

[25] JIN M, KOMINE M, TSUDA H, *et al.* dsRNA induces IL-33 promoter activity through TLR3-EGFR-IRF3 pathway in normal human epidermal keratinocytes[J]. *J Dermatol Sci*, 2019, 96(3):178-180.

[26] LEBOSSÉ F, TESTONI B, FRESQUET J, *et al.* Intrahepatic innate immune response pathways are downregulated in untreated chronic hepatitis B[J]. *J Hepatol*, 2017, 66(5):897-909.

[27] THOMPSON A J, NGUYEN T, ISER D, *et al.* Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers; disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers[J]. *Hepatology*, 2010, 51(6):1933-1944.

[28] MANESIS E K, PAPATHEODORIDIS G V, TINIAKOSD G, *et al.* Hepatitis B surface antigen: relation to hepatitis B replication parameters in HBeAg-negative chronic hepatitis B[J]. *J Hepatol*, 2011, 55(1):61-68.

[29] REAL C I, LU M, LIU J, *et al.* Hepatitis B virus genome replication triggers toll-like receptor 3-dependent interferon responses in the absence of hepatitis B surface antigen[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:24865.

[30] YUAN M M, XU Y Y, CHEN L, *et al.* TLR3 expression correlates with apoptosis, proliferation and angiogenesis in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15:245.

[31] GENG P L, SONG L X, AN H, *et al.* Toll-like receptor 3 is associated with the risk of HCV infection and HBV-related diseases[J]. *Medicine(Baltimore)*, 2016, 95(21):e2302.

[32] HO V, LIM T S, LEE J, *et al.* TLR3 agonist and Sorafenib combination therapy promotes immune activation and controls hepatocellular carcinoma progression [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29):27252-27266.

[33] BONNIN M, FARES N, TESTONI B, *et al.* Toll-like receptor 3 downregulation is an escape mechanism from apoptosis during hepatocarcinogenesis[J]. *J Hepatol*, 2019, 71(4):763-772.

[34] SGHAIER I, ZIDI S, MOUELHI L, *et al.* TLR3 and TLR4 SNP variants in the liver disease resulting from hepatitis B virus and hepatitis C virus infection[J]. *Br J Biomed Sci*, 2019, 76(1):35-41.

(本文编辑:周二强)

发表学术论文“五不准”

中国科协、教育部、科技部、卫生计生委、中科院、工程院、自然科学基金会联合印发《发表学术论文“五不准”》(科协发组字[2015]98号,2015年11月23日)

1. 不准由“第三方”代写论文。科技工作者应自己完成论文撰写,坚决抵制“第三方”提供论文代写服务。
2. 不准由“第三方”代投论文。科技工作者应学习、掌握学术期刊投稿程序,亲自完成提交论文、回应评审意见的全过程,坚决抵制“第三方”提供论文代投服务。
3. 不准由“第三方”对论文内容进行修改。论文作者委托“第三方”进行论文语言润色,应基于作者完成的论文原稿,且仅限于对语言表达方式的完善,坚决抵制以语言润色的名义修改论文的实质内容。
4. 不准提供虚假同行评审人信息。科技工作者在学术期刊发表论文如需推荐同行评审人,应确保所提供的评审人姓名、联系方式等信息真实可靠,坚决抵制同行评审环节的任何弄虚作假行为。
5. 不准违反论文署名规范。所有论文署名作者应事先审阅并同意署名发表论文,并对论文内容负有知情同意的责任;论文起草人必须事先征求署名作者对论文全文的意见并征得其署名同意。论文署名的每一位作者都必须对论文有实质性学术贡献,坚决抵制无实质性学术贡献者在论文上署名。

本“五不准”中所述“第三方”指除作者和期刊以外的任何机构和个人;“论文代写”指论文署名作者未亲自完成论文撰写而由他人代理的行为;“论文代投”指论文署名作者未亲自完成提交论文、回应评审意见等全过程而由他人代理的行为。