

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.07.004

· 论 著 ·

乙型肝炎病毒 X 蛋白在促进肝细胞衰老中的作用

熊莹晖, 傅永明, 周鹏程, 王晓芳, 黄泽炳, 全俊, 胡兴旺, 范学工

(中南大学湘雅医院 病毒性肝炎湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 探讨乙型肝炎病毒通过乙型肝炎病毒 X 蛋白(HBx)对肝细胞衰老的影响。方法 对 HepG2.2.15 细胞、HBx 沉默 HepG2.2.15 细胞(HepG2.2.15-HBx-si)及 HBx 过表达 HepG2 细胞(HepG2-HBx)进行 β -半乳糖苷酶染色,采用 Western Blot 对肝细胞衰老相关蛋白进行检测;对比分析 HBx 对肝细胞衰老的影响。结果 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞比例:HepG2.2.15 组为(0.480 ± 0.096),HepG2 组为(0.016 ± 0.005),两组比较差异有统计学意义($P < 0.001$);HepG2.2.15-HBx-si 组为(0.278 ± 0.065),对照组 HepG2.2.15-HBx-nc 组为(0.329 ± 0.044),两组比较差异无统计学意义($P = 0.092$);HepG2-HBx 组为(0.319 ± 0.033),对照组 HepG2-HBx-con 组为(0.064 ± 0.012),两组比较差异有统计学意义($P < 0.001$)。Western Blot 检测肝细胞衰老蛋白:HepG2.2.15 组和 HepG2-HBx 组肝细胞衰老相关蛋白 p53 及 p21 表达量均高于其对照组,HepG2.2.15-HBx-si 组肝细胞衰老相关蛋白 p53 及 p21 表达量低于 HepG2.2.15-HBx-nc 组。结论 乙型肝炎病毒可通过 HBx 促进肝细胞衰老。

[关键词] 乙型肝炎病毒;乙型肝炎病毒 X 蛋白;肝细胞衰老

[中图分类号] R512.6⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2018)07-0571-06

Effect of hepatitis B virus X protein on promoting hepatocellular senescence

XIONG Ying-hui, FU Yong-ming, ZHOU Peng-cheng, WANG Xiao-fang, HUANG Ze-bing, QUAN Jun, HU Xing-wang, FAN Xue-gong (Hunan Key Laboratory of Viral Hepatitis, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate effect of hepatitis B virus (HBV) on hepatocyte senescence through HBV X protein (HBx). **Methods** HepG2.2.15 cells, HepG2.2.15 cells treated by HBx si-RNA (HepG2.2.15-HBx-si), and HepG2 cells with over-expressed HBx (HepG2-HBx) were performed β -galactosidase staining, hepatocyte senescence-associated protein was detected by Western Blot; effect of HBx on hepatocyte senescence was compared. **Results** The proportions of positive cells for β -galactosidase staining in each group were as follows: (0.480 ± 0.096) in HepG2.2.15 group, (0.016 ± 0.005) in HepG2 group, difference between two groups was statistically significant ($P < 0.001$); (0.278 ± 0.065) in HepG2.2.15-HBx-si group, (0.329 ± 0.044) in its' control group (HepG2.2.15-HBx-nc group), difference between two groups was not statistically significant ($P = 0.092$); (0.319 ± 0.033) in HepG2-HBx group, (0.064 ± 0.012) in it's control group (HepG2-HBx-con group), difference between two groups was statistically significant ($P < 0.001$). Western Blot showed that the expression of hepatocyte senescence-associated protein p53 and p21 in HepG2.2.15 group and HepG2-HBx group were significantly higher than those of control group, while p53 and p21 in HepG2.2.15-HBx-si group were significantly lower than that of HepG2.2.15-HBx-nc group. **Conclusion** HBV can promote hepatocellular senescence through HBx protein.

[收稿日期] 2018-01-04

[基金项目] 科技部国际合作与交流专项基金资助项目(2015DFA31490);湖南省自然科学基金资助项目(2017JJ3496,2017JJ3481,2016JJ3164);北京卫生健康公益基金医学科学研究项目(YWJKJHHKYJJ-1317459)

[作者简介] 熊莹晖(1992-),女(汉族),湖南省岳阳市人,硕士研究生,主要从事 HBx 在慢性肝病进展中的作用研究。

[通信作者] 胡兴旺 E-mail:lebithu@csu.edu.cn; 范学工 E-mail:xgfan@hotmail.com

[Key words] hepatitis B virus; hepatitis B virus X protein; hepatocellular senescence

[Chin J Infect Control, 2018, 17(7): 571-576]

慢性肝炎持续较长时间可逐渐发展为肝纤维化、肝硬化及肝癌。慢性肝炎患者的基本病理特征为持续性肝细胞损伤,且肝细胞损伤在疾病的发展过程中发挥重要作用。损伤的肝细胞可以根据受损程度的不同而分别进入衰老、凋亡或坏死状态^[1-2]。衰老肝细胞表现为细胞形态改变、细胞周期阻滞(分子水平表现为细胞周期阻滞相关蛋白 p53/p21、p16/p-Rb 等表达量升高)、 β -半乳糖苷酶(可以区分衰老细胞、衰老前细胞和分化细胞)表达、衰老相关异染色体灶及 DNA 损伤灶在核内聚集等^[3]。衰老肝细胞可分泌大量的细胞因子(衰老相关分泌表型)^[4-7],细胞因子可促进炎症发生,从而清除衰老、坏死细胞及恶变细胞,发挥修复机体损伤的作用^[8-9]。肝细胞长期受损将导致衰老细胞积聚,衰老细胞在组织器官内可持续存活数年,从而引起组织器官微环境改变及稳态失衡^[10-12]。有研究^[13]表明,氧化应激、DNA 损伤及癌基因的活化等可诱导细胞衰老,导致细胞周期阻滞、抗凋亡、表观遗传改变及衰老相关分泌表型等的发生。丙型肝炎病毒感染持续时间是导致肝纤维化进展的一个主要危险因素,病史越长肝纤维化进展的可能性越大^[14-16]。乙型肝炎、丙型肝炎、酒精性脂肪肝及非酒精性脂肪肝患者进行肝组织活检时发现肝细胞衰老与肝纤维化程度呈正相关^[17-20]。肝脏存在铁沉积的遗传性血色沉着症患者及肝硬化患者的肝组织标本研究显示存在肝细胞衰老,且研究者认为衰老肝细胞参与了肝纤维化及肝硬化发展^[21-22]。

在我国,乙型肝炎病毒(HBV)感染是引起慢性肝病的首要病因,约有 90% 的肝细胞癌是由慢性肝病发展而来^[23]。因此,研究慢性乙型肝炎疾病发展的诱因和机制具有重要的临床指导意义。有研究^[17]发现 HBV 慢性感染可诱发肝细胞衰老,但 HBV 诱发肝细胞衰老的机制尚不清楚。有研究^[24]表明 HBV 编码的 X 蛋白(HBx)可促进外泌体分泌,并可通过外泌体或肝星状细胞上调纤维化重要标志物 α -平滑肌肌动蛋白的表达。另外,在过表达 HBx 的 HepG2 细胞皮下成瘤的动物中发现,肿瘤组织中胶原纤维 I 和 IV 的含量上升,因此,研究者认为 HBx 参与了肝纤维化的发展^[25]。HBx 已经被确认属于癌基因,癌基因的激活可诱导肝细胞衰老^[13]。基于以上研究,我们推测 HBx 可能参与 HBV 诱导肝

细胞衰老的过程,并通过相关实验证实 HBx 参与 HBV 诱导肝细胞衰老,具体结果阐述如下。

1 材料与方法

1.1 研究细胞和试剂

HepG2. 2. 15 细胞购于中南大学湘雅医学院细胞库, HepG2 细胞和 293T 细胞购于上海细胞库; 抗体 p21(2947s) 和 p16(14256) 购于 Cell Signaling Technology 公司; 抗体 p53(sc-53395) 购于 Santa Cruz Biotechnology 公司; Senescence β -Galactosidase Staining Kit(货号: C0602) 购于碧云天公司; DharmaFECT 1 Transfection Reagent (T-2001-03) 购于 Dharmacon 公司; pLV-EF1 α -MCS-IRES-Bsd(cDNA-pLV03) 购于 Biosettia 公司; HBx si-RNA(正义链 5' - UCACCUCUGCACGUAGCAUTT - 3', 反义链 5' - AUGCUACGUGCAGAGGUGATT - 3') 购于上海吉玛制药技术公司, BCA Protein Assay Kit(1859078) 以及 ECL(34095) 购于 Thermo Scientific Pierce Protein Biology 公司。

1.2 研究方法

1.2.1 构建 HBx 过表达慢病毒

将 293T 细胞接种于 6 孔细胞培养板中,在细胞融合度达到 90% 左右时,将 PLVX-HBx 过表达质粒和慢病毒包装质粒(pMDLg/pRRE, pRSV-REV, pCMV-VSV-G)混合于 500 μ L 无血清 DMEM 中(混合比例为 pLVX-sh : pMDLg/pRRE : pRSV-REV : pCMV-VSV-G = 1.5 : 1 : 0.75 : 0.3 : 0.45); 另外,取 7.5 μ L lipofectamine 2000 加入 500 μ L 无血清 DMEM 后混匀,静置 5 min; 然后将两种 DMEM 混合物合并混匀,静置 15 min。将混合后的 DMEM 加入无抗生素完全培养基培养的 293T 细胞中,转染 12 h 后换液,然后继续培养 48 h 后收集培养液上清,在 1 300 rpm 下离心 5 min 去除细胞碎片,获得含慢病毒的培养液上清。对照组为未进行 HBx 过表达慢病毒,采用相同的操作方法获对照组未进行 HBx 过表达慢病毒上清培养液。

1.2.2 构建稳定表达 HBx 的 HepG2 细胞系

(HepG2-HBx)及其对照组细胞系(HepG2-HBx-con)

将 HepG2 细胞接种于 6 孔细胞培养板中,在细胞融合度为 20%~30% 左右时,吸去培养基,加入 2 mL 含有 200 μ L HBx 过表达慢病毒液和 4 μ g/mL 的

polybrane 无抗生素完全培养基,然后加入慢病毒液感染 HepG2 细胞,在 1 000 g 下离心 1 h。HepG2 细胞感染 24 h 后换新鲜完全培养基,培养 72 h 后用含杀稻瘟菌素(6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)的 DMEM 完全培养基进行筛选,筛选一个月左右得到稳定过表达 HBx 的 HepG2 细胞系(HepG2-HBx)。同时用未进行 HBx 过表达慢病毒采用相同的操作方法获得对照组细胞系(HepG2-HBx-con)。

1.2.3 构建瞬时沉默 HBx 蛋白的 HepG2.2.15 细胞(HepG2.2.15-HBx-si)及其对照组细胞(HepG2.2.15-HBx-nc) 将 HepG2.2.15 细胞接种于 6 孔细胞培养板中,在细胞融合度达到 40%左右时,将 5 μmol HBx si-RNA 或 5 μmol HBx nc si-RNA 混于 500 μL 无血清 DMEM 中;另外,取 5 μL DharmaFECT 1 Transfection Reagent 与 500 μL 无血清 DMEM 进行混匀,静置 5 min;然后将两种 DMEM 混合物合并混匀,静置 15 min;取 DMEM 混合物加入无抗生素完全培养基的 HepG2.2.15 细胞中,构建 HepG2.2.15-HBx-si 和 HepG2.2.15-HBx-nc。72 h 后可提取细胞蛋白。

1.2.4 衰老细胞 β -半乳糖苷酶染色 衰老细胞内表达 β -半乳糖苷酶在 pH6.0 时具有高酶活性,在经 Senescence β -Galactosidase Staining Kit 处理的衰老细胞中,该酶可催化试剂底物产生一种深蓝色物质,使细胞在光学显微镜下呈现深蓝色。首先接种 1.0×10^5 /孔的细胞于 12 孔细胞培养板,经过 24 h 培养后细胞贴壁,吸去细胞培养液,用 1 mL PBS 洗 1 次,加入 0.5 mL β -半乳糖苷酶染色固定,室温静置 15 min;吸去固定液后用 1 mL PBS 洗 3 次,每次洗 3 min;吸去 PBS 后每孔加入 0.5 mL 染色工作液(染色工作液配方:A 液 5 μL 、B 液 5 μL 、C 液 465 μL),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;采用 PBS 洗 1 次后于显微镜下观察染色状态,并进行拍照;每组实验重复 3 次。

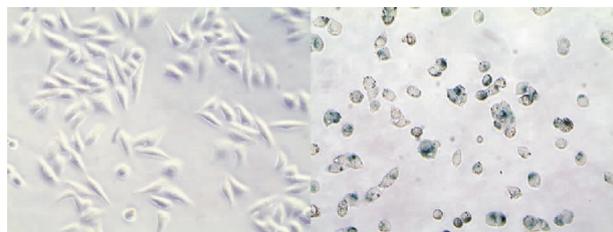
1.2.5 Western Blot 检测衰老相关蛋白 应用 Western Blot 检测细胞衰老相关分子 p21、p16 等的表达量。首先提取经过处理的细胞总蛋白,用 BCA Protein Assay Kit 测量蛋白浓度后,采用 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后湿法转印至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭 1 h 后用 TBST 缓冲液洗 3 次,每次 5 min;随后加一抗(1 : 1 000 TBST 稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 缓冲液洗 3 遍,每次 5 min。加入对应二抗(1 : 2 000 TBST 稀释)室温孵育 1 h, TBST 缓冲液洗 3 遍,每次 10 min,加 ECL 发光液后观察结果,每组实验重复 3 次。

1.3 统计分析 所有研究数据应用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,连续变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;分类变量以百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HepG2.2.15 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色

HepG2.2.15(含有 HBV 全基因组的转基因细胞系)中的 β -半乳糖苷酶着色较 HepG2 细胞明显增强,见图 1。每个组选取多个不重复独立视野,进行染色阳性细胞计数,结果显示 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞所占比例 HepG2.2.15 组(0.480 ± 0.096)高于 HepG2 组(0.016 ± 0.005),且两组间差异有统计学意义($P < 0.001$),见图 2。



HepG2

HepG2.2.15

图 1 HepG2 衰老细胞($n=3$)和 HepG2.2.15 衰老细胞($n=3$) β -半乳糖苷酶染色图

Figure 1 Senescence β -galactosidase staining of HepG2 ($n=3$) and HepG2.2.15 ($n=3$)

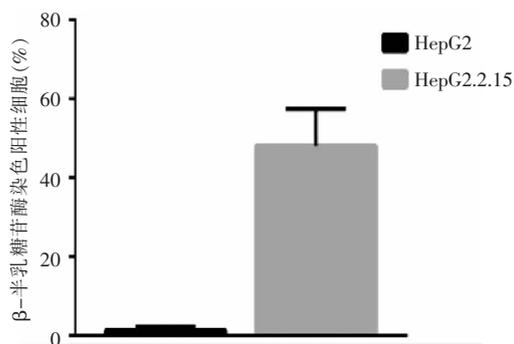


图 2 HepG2 衰老细胞($n=3$)和 HepG2.2.15 衰老细胞($n=3$) β -半乳糖苷酶染色比较

Figure 2 Comparison of senescence β -galactosidase staining between HepG2 ($n=3$) and HepG2.2.15 ($n=3$)

2.2 HepG2.2.15 细胞衰老相关蛋白 p53 与 p21 表达情况 采用细胞蛋白 tubulin 作为内参进行比较, HepG2.2.15 细胞内调控细胞周期阻滞的蛋白 p53 和

p21 的表达水平高于 HepG2 组, HepG2. 2. 15 细胞衰老相关蛋白 p53 与 p21 表达量较 HepG2 显著上调, HBx 在 HepG2. 2. 15 细胞内表达, 而在 HepG2 内无表达。见图 3。

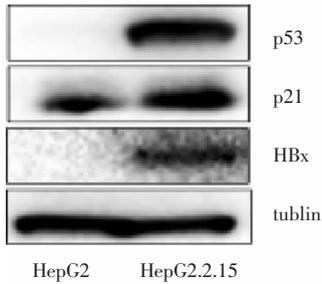


图 3 HepG2. 2. 15 细胞衰老相关蛋白表达 ($n = 3$)

Figure 3 Expression level of senescence-associated protein in HepG2. 2. 15 ($n = 3$)

2.3 HBx 沉默的 HepG2. 2. 15 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色 HepG 2. 2. 15-HBx-si 组 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞比例较其对照组 (HepG2. 2. 15-HBx-nc) 有所下降。HBx 沉默后 HepG2. 2. 15 行 β -半乳糖苷酶染色后发现 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞 HepG 2. 2. 15-HBx-si 比例为 (0.278 ± 0.065), 对照组 HepG 2. 2. 15-HBx-nc 为 (0.329 ± 0.044), 两组间比较差异无统计学意义 ($P = 0.092$)。见图 4、图 5。

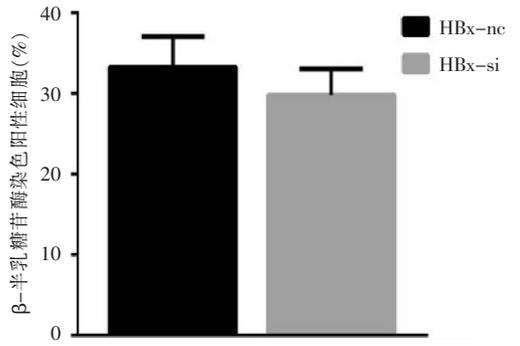
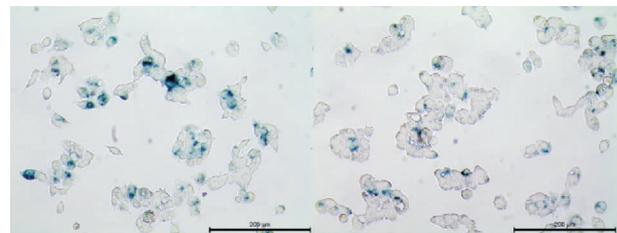


图 5 HBx 沉默 ($n = 3$) 与 HBx 未沉默 ($n = 3$) 的 HepG2. 2. 15 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色比较

Figure 5 Comparison of senescence β -galactosidase staining between HepG2. 2. 15-HBx-si ($n = 3$) and HepG 2. 2. 15-HBx-nc ($n = 3$)



HepG2. 2. 15-HBx-nc HepG2. 2. 15-HBx-si

图 4 HBx 沉默 ($n = 3$) 和 HBx 未沉默 ($n = 3$) HepG2. 2. 15 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色图

Figure 4 Senescence β -galactosidase staining in HepG 2. 2. 15-HBx-si ($n = 3$) and HepG2. 2. 15-HBx-nc ($n = 3$)

2.4 HepG2. 2. 15 细胞衰老相关蛋白表达情况 采用细胞蛋白 tubulin 作为内参进行比较, HBx 沉默处理后的 HepG2. 2. 15 细胞内 HBx 蛋白水平较其对照组 HepG2. 2. 15-HBx-nc 下降, HBx 沉默的 HepG2. 2. 15 细胞衰老相关蛋白 p53 与 p21 表达量较 HepG2. 2. 15 下调。见图 6。

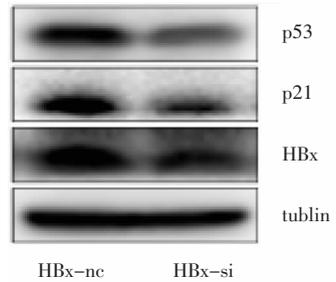
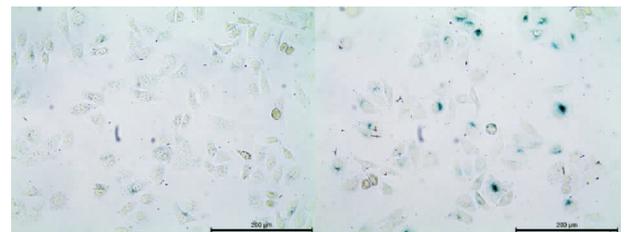


图 6 HepG2. 2. 15 细胞衰老相关蛋白表达量 ($n = 3$)

Figure 6 Expression level of senescence-associated protein in HepG2. 2. 15 ($n = 3$)

2.5 HBx 过表达的 HepG2 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞比例 HepG2-HBx 组为 (0.319 ± 0.033), 对照组 HepG2-HBx-con 为 (0.064 ± 0.012), 两组之间比较差异有统计学意义 ($P < 0.001$); HepG2-HBx β -半乳糖苷酶染色阳性细胞比例高于对照组。见图 7、图 8。



HepG2-HBx-con HepG2-HBx

图 7 HBx 过表达对照组和 HBx 过表达组 HepG2 衰老细胞 β -半乳糖苷酶染色图

Figure 7 Senescence β -galactosidase staining of HepG2-HBx-con and HepG2-HBx

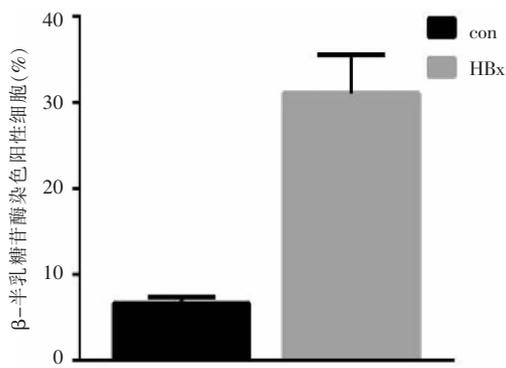


图 8 HBx 过表达对照组 ($n = 3$) 和 HBx 过表达组 ($n = 3$) HepG2 衰老细胞 β-半乳糖苷酶染色比较

Figure 8 Comparison of senescence β-galactosidase staining between HepG2-HBx-con and HepG2-HBx

2.6 HBx 过表达 HepG2 细胞衰老相关蛋白分子表达情况 采用细胞蛋白 tublin 作为内参进行比较, HBx 在 HepG2-HBx 细胞中表达, 而 HepG2-HBx-con 内无表达; HBx 过表达 HepG2-HBx 细胞内周期阻滞相关蛋白 p53 和 p21 的表达量高于不表达 HBx 的 HepG2-HBx-con 细胞。见图 9。

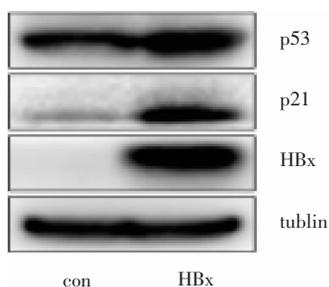


图 9 HBx 过表达 HepG2 衰老细胞相关蛋白分子表达量 ($n = 3$)

Figure 9 Expression level of senescence-associated protein in HepG2-HBx ($n = 3$)

3 讨论

HBV 感染是一个世界性公共卫生问题, 全世界范围内约有 3.5 亿慢性感染患者^[26]。我国 HBV 感染的情况更为严重, 2006 年全国乙型肝炎流行病学调查表明, 乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 携带率为 7.18%, 每年因 HBV 所致的肝硬化、肝癌死亡病例约有 30 万^[27]。因此, 乙型肝炎发病机制研究具有重要意义。

慢性乙型肝炎患者肝脏活检研究显示, HBV 感

染患者肝细胞存在衰老现象, 衰老细胞将出现细胞周期阻滞^[17, 28]。本研究结果显示稳转 HBV 全基因组的 HepG2. 2. 15 细胞中的衰老细胞 β-半乳糖苷酶染色阳性细胞的比例高于对照组 HepG2 细胞, 且在衰老细胞周期阻滞中起重要调控作用的 p53 蛋白及其下游分子 p21 表达量也较 HepG2 细胞高, 说明 HepG2. 2. 15 细胞中衰老相关蛋白激活, HBV 诱发了肝细胞衰老。

查阅相关文献进一步探讨 HBV 通过何种方式促使肝细胞衰老, 发现 HBx 在慢性乙型肝炎的疾病发展中发挥重要作用^[24-25], 但是, 具体机制尚不清楚。因此, 我们猜想 HBV 可以通过其编码的 HBx 诱导肝细胞衰老。本研究通过在 HepG2. 2. 15 细胞内沉默 HBx 后行 β-半乳糖苷酶染色, 发现虽然衰老细胞比例的差异不具有统计学意义, 但整体而言在沉默 HBx 后衰老细胞减少, 且周期阻滞蛋白 p53 和 p21 的表达水平下降, 说明细胞周期阻滞减弱, 提示 HBx 在 HBV 诱导肝细胞衰老中起到调控作用, 可促进肝细胞衰老。本研究在 HepG2 细胞内过表达 HBx, 发现衰老细胞染色明显增强, p53 和 p21 蛋白表达量亦上调, 表明在 HepG2 内过表达 HBx 可激活细胞内衰老相关蛋白。以上研究验证了 HBV 可通过 HBx 促进肝细胞衰老。

衰老细胞可分泌大量细胞因子, 如 IL-1、IL-6、IL-8 等, 这些炎症因子可激活肝星状细胞, 促进肝脏的损伤修复^[6, 29]。但是, 长期持续性损伤可导致衰老细胞长期存在, 不断释放细胞因子引起肝纤维化, 甚至可进展为肝硬化。在我国慢性肝病患者中, HBV 感染引起肝持续性损伤的慢性肝炎最为常见。慢性乙型肝炎可以进展为肝纤维化、肝硬化, 最后或可发展为肝癌。HBV 通过 HBx 诱导的肝细胞衰老可能在整个疾病的发展过程中发挥了重要作用, 为我们认识乙型肝炎相关性肝疾病的发生发展机制提供了新的思路, 或可为将来慢性肝病的治疗提供新的方向。

[参 考 文 献]

- [1] Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, et al. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? [J]. EMBO Rep, 2014, 15(11): 1139-1153.
- [2] Campisi J, d'Adda di Fagnana F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(9): 729-740.
- [3] Aravinthan AD, Alexander GJM. Senescence in chronic liver

- disease: Is the future in aging? [J]. *J Hepatol*, 2016, 65(4): 825 - 834.
- [4] Coppé JP, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor[J]. *PLoS Biol*, 2008, 6(12): 2853 - 2868.
- [5] Kuilman T, Peeper DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(2): 81 - 94.
- [6] Davalos AR, Coppe JP, Campisi J, et al. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, 29(2): 273 - 283.
- [7] Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, et al. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression[J]. *Annu Rev Pathol*, 2010, 5: 99 - 118.
- [8] Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging[J]. *Cell*, 2007, 130(2): 223 - 233.
- [9] Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis[J]. *Cell*, 2008, 134(4): 657 - 667.
- [10] Jeyapalan JC, Ferreira M, Sedivy JM, et al. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates[J]. *Mech Ageing Dev*, 2007, 128(1): 36 - 44.
- [11] Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors [J]. *Cell*, 2005, 120(4): 513 - 522.
- [12] Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, et al. BRAF^{V600E}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi[J]. *Nature*, 2005, 436(7051): 720 - 724.
- [13] Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups [J]. *Lancet*, 1997, 349(9055): 825 - 832.
- [14] Hoare M, Das T, Alexander G. Ageing, telomeres, senescence, and liver injury[J]. *J Hepatol*, 2010, 53(5): 950 - 961.
- [15] Wong V, Caronia S, Wight D, et al. Importance of age in chronic hepatitis C infection[J]. *J Viral Hepat*, 1997, 4(4): 255 - 264.
- [16] Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, et al. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C[J]. *J Hepatol*, 2001, 34(5): 730 - 739.
- [17] Tachtatzis PM, Marshall A, Arvinthan A, et al. Chronic hepatitis B virus infection; the relation between hepatitis B antigen expression, telomere length, senescence, inflammation and fibrosis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0127511.
- [18] Marshall A, Rushbrook S, Davies SE, et al. Relation between hepatocyte G1 arrest, impaired hepatic regeneration, and fibrosis in chronic hepatitis C virus infection[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(1): 33 - 42.
- [19] Aravinthan A, Pietrosi G, Hoare M, et al. Hepatocyte expression of the senescence marker p21 is linked to fibrosis and an adverse liver-related outcome in alcohol-related liver disease [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e72904.
- [20] Aravinthan A, Scarpini C, Tachtatzis P, et al. Hepatocyte senescence predicts progression in non-alcohol-related fatty liver disease[J]. *J Hepatol*, 2013, 58(3): 549 - 556.
- [21] Wood MJ, Gadd VL, Powell LW, et al. Ductular reaction in hereditary hemochromatosis: the link between hepatocyte senescence and fibrosis progression[J]. *Hepatology*, 2014, 59(3): 848 - 857.
- [22] Wiemann SU, Satyanarayana A, Tshuridu M, et al. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis[J]. *FASEB J*, 2002, 16(9): 935 - 942.
- [23] Ringelhan M, Heikenwalder M, Protzer U. Direct effects of hepatitis B virus-encoded proteins and chronic infection in liver cancer development[J]. *Dig Dis*, 2013, 31(1): 138 - 151.
- [24] Kapoor NR, Chadha R, Kumar S, et al. The HBx gene of hepatitis B virus can influence hepatic microenvironment via exosomes by transferring its mRNA and protein[J]. *Virus Res*, 2017, 240: 166 - 174.
- [25] Feng GX, Li J, Yang Z, et al. Hepatitis B virus X protein promotes the development of liver fibrosis and hepatoma through downregulation of miR-30e targeting P4HA2 mRNA [J]. *Oncogene*, 2017, 36(50): 6895 - 6905.
- [26] 斯崇文. 慢性乙型肝炎的现状和问题[J]. *临床药物治疗杂志*, 2006, 4(4): 1 - 2.
- [27] 庄辉. 乙型肝炎流行病学进展[C]//中华医学会第十二次全国病毒性肝炎及肝病学术会议论文汇编. 北京, 2005.
- [28] Campisi J. Replicative senescence: an old lives' tale? [J]. *Cell*, 1996, 84(4): 497 - 500.
- [29] 林羨屏, 王小众. 肝纤维化相关因子及其作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2006, 14(11): 1037 - 1043.

(本文编辑:孟秀娟、陈玉华)