

## Sab 蛋白的研究进展

姜剑伟, 王蕊, 李燕\*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 创新药物非临床药物代谢及 PK/PD 研究北京市重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** Sab (SH3 domain-binding protein that preferentially associates with Btk) 蛋白, 又称 SH3BP5 (SH3 domain-binding protein 5) 蛋白, 是具有调控线粒体生理功能的线粒体外膜支架蛋白, 可与酪氨酸激酶 Btk (Bruton's tyrosine kinase)、丝氨酸-苏氨酸激酶 JNKs (c-Jun amino-terminal kinases) 及 p38 $\gamma$  结合, 从而调控 B 细胞抗原受体和线粒体 JNK、p38 $\gamma$  信号通路, 参与 B 细胞生长发育和线粒体信号转录等重要生理过程。调节 Sab 蛋白的表达可改善 Btk、JNKs 及 p38 $\gamma$  异常引起的相关疾病, 如神经系统疾病和肝损伤等, 因而 Sab 蛋白有望成为药物研发的潜在靶点。本文简述了 Sab 蛋白的结构、功能及与弥漫大 B 细胞淋巴瘤、神经系统疾病和急性肝损伤的关系, 旨在为药物研发提供新的思路 and 理论依据。

**关键词:** Sab 蛋白; 结构; 功能; 靶点; JNK

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 04-0495-05

## Research advances in study of Sab protein

JIANG Jian-wei, WANG Rui, LI Yan\*

(Beijing Key Laboratory of Non-Clinical Drug Metabolism and PK/PD Study, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Sab (SH3 domain-binding protein that preferentially associates with Btk) that is also called SH3BP5 (SH3 domain-binding protein 5), is a scaffold protein on mitochondrial outer membrane in the modulation of mitochondrial function. Sab not only combines with the tyrosine kinase Btk (Bruton's tyrosine kinase), but also binds to the serine threonine kinase JNKs (c-Jun amino-terminal kinases) and p38 $\gamma$ . Thus Sab can regulate B cell antigen receptor, mitochondrial JNK and p38 $\gamma$  signaling pathway, which is associated with the critical physiological function, such as B-cell development and differentiation and regulation of mitochondrial signaling transcription. Inhibition or induction on the expression of Sab can ameliorate the diseases arising from the abnormal level of Btk, JNKs and p38 $\gamma$ , such as nervous system diseases and liver injury. Therefore, Sab could be expected as a new target for drug development. In this article, we provide an overview of the structure and functions of Sab and its relationship to diseases of diffuse large B-cell lymphoma, nervous system diseases and liver injury, aiming to provide new ideas and theoretical basis for the development of new drugs.

**Key words:** Sab; structure; function; target; JNK

上世纪末, Matsushita 等<sup>[1]</sup>发现并鉴定了可与

Bruton 酪氨酸激酶 (Bruton's tyrosine kinase, Btk) SH3 (Src homology 3) 结构域相结合的一种蛋白, 命名为 Sab (SH3 domain-binding protein that preferentially associates with Btk) 蛋白。由于该蛋白是由基因 SH3BP5 编码, 故又称为 SH3BP5 (SH3 domain-binding protein 5) 蛋白。2002 年 Wiltshire 等<sup>[2]</sup>发现 Sab 蛋白

收稿日期: 2017-10-25; 修回日期: 2017-11-14.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助 (2017-I2M-1-010).

\*通讯作者 Tel: 86-10-63165172, E-mail: yanli@imm.ac.cn

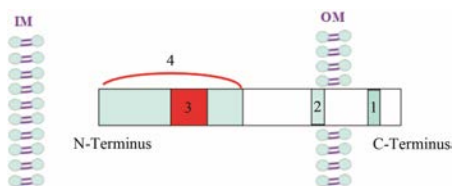
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-1054

可作为底物与 JNK (c-Jun N-terminal kinase) 结合并激活。随后 Court 等<sup>[3]</sup>发现 Sab 蛋白可被 p38 $\gamma$  (也称为 SAPK3, stress-activated protein kinase 3) 磷酸化而激活。与 Sab 蛋白结合的 Btk、JNK 和 p38 $\gamma$  是体内的关键激酶, 分别参与 B 细胞的生长发育和调控线粒体信号转录等重要生理过程。因此, Sab 蛋白在多种信号通路中起关键作用, 有望成为一个药物开发的潜在靶点。本文主要对 Sab 蛋白的结构、功能及与弥漫大 B 细胞淋巴瘤、神经系统疾病、肝损伤等的关系进行综述, 为与 Sab 靶点相关新药的研发提供参考。

## 1 Sab 蛋白的结构特征

人编码 Sab 蛋白的基因 (*SH3BP5*) 位于 1 号染色体 1q43 上, 其开放阅读框架有 1 275 个核苷酸, 由 425 个氨基酸残基组成, 相对分子质量为 70 kDa<sup>[1, 4]</sup>。该基因可在多种组织中表达, 如脑、淋巴结、胸腺、骨髓、肝脏、脾、结肠、小肠和前列腺等, 尤其在生殖器官如睾丸和卵巢中高表达<sup>[1]</sup>。

Sab 蛋白分布于线粒体外膜, 如图 1 所示。N 端在线粒体外膜内侧, 是一个延伸的肌球蛋白样卷曲螺旋, 其中包含一个能与 SH3 结合的结构域; 线粒体外膜外侧的 C 端约占整体长度的 1/5, 具有 2 个丝裂原激活蛋白激酶相互作用配基 (kinase interaction motifs, KIMs) 和 4 个存在于 C 端 1/2 处的丝氨酸-脯氨酸 JNK 磷酸化位点<sup>[2, 5]</sup>。Sab 蛋白的结构与 SH3 结合蛋白有所不同, 即 Sab 蛋白的 SH3 结合区域无脯氨酸富含序列, Matsushita 等<sup>[1]</sup>猜测 Sab 的 SH3 结合区域尽管无脯氨酸富含序列, 但也能形成左旋多聚脯氨酸 II 型螺旋结构。



**Figure 1** Structural features of the Sab protein. 1: KIM2; 2: KIM1; 3: SH3 binding domain; 4: Myosin-like coiled coil; OM: Mitochondrial outer membrane; IM: Mitochondrial inner membrane

## 2 Sab 蛋白的功能

### 2.1 调节 B 细胞抗原受体信号通路

Btk 作为胞质酪氨酸激酶中 Btk/Tec 家族成员, 是 B 细胞抗原受体 (B-cell antigen receptor, BCR) 信号通路的关键激酶, 该蛋白结构从 N 端到 C 端分别为 PH (pleckstrin homology)、TH (tec homology)、

SH3、SH2 和激酶结构域<sup>[6]</sup>。Sab 可优先结合 Btk, 而不是其他胞质酪氨酸激酶, 提示 Sab 对 Btk 信号通路的影响具有一定的专一性<sup>[1]</sup>。Sab 蛋白与 Btk 的 SH3 结构域结合, 而且不依赖 Btk 的激活或磷酸化<sup>[7]</sup>。Sab 高表达的 B 细胞在 BCR 诱导下, Btk 的自我磷酸化及转磷酸化显著降低, 进而降低 Btk 的活性, 而且 Btk 相关的钙动员、肌糖 1,4,5-三磷酸的产生及细胞凋亡等都显著减少。因而, Sab 蛋白可以作为 Btk 的反式调节蛋白, 在 B 细胞抗原受体信号通路中起负调节作用<sup>[7]</sup>。

### 2.2 调节线粒体 MAPK 信号通路

**2.2.1 调节线粒体 JNK 信号通路** Wiltshire 等<sup>[2, 5]</sup>应用酵母双杂交系统研究发现, Sab 体外能与 JNK 发生相互作用。Sab 的 KIMs 与 JNK 下游靶标分子 c-Jun 的 JNK 对接域的 KIMs 具有相似性, Sab 与 JNK 结合是通过 KIM1 进行相互作用。而 Takeshita 等<sup>[8]</sup>认为, Sab 可通过 SH3 结合结构域 (SH3-binding domain, SH3BD)、KIM1 和 KIM2 与 JNK 结合, 且 KIM1、KIM2 与 JNK 的结合互不影响。共聚免疫细胞化学和细胞分离研究发现, Sab 能够使 JNK 靶向到线粒体, 与 JNK 的一部分结合并共同定位于线粒体, 进而启动下游程序<sup>[2]</sup>。

Win 等<sup>[9]</sup>在研究急性肝损伤模型时发现 JNK 与 Sab 结合后, 导致线粒体外膜内侧 Sab 的非受体型 6 蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 6, SHP1 or PTPN6) 释放, SHP1 被 p-Src 磷酸化生成 p-SHP1, 并转移到线粒体内膜, 在内膜平台蛋白 [对接蛋白 4 (docking protein 4, DOK4)] 的作用下, 使 p-Src (活化形式) 去磷酸化而失活。p-Src 能够维持电子传递, 而 Src 可破坏电子传递, 而且在线粒体呼吸链复合物酶 I 的作用下产生大量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS)<sup>[10]</sup>, 进而激活上游 MAPK 导致 JNK 的持续激活 (图 2)。

Win 等<sup>[11]</sup>研究发现, 由衣霉素和 brefeldin A 诱导的内质网应激可引起 JNK 的磷酸化及内质网钙离子的释放, JNK 可与 Sab 结合进而降低呼吸功能引发 ROS 增加; 同时钙离子进入线粒体, 使 ROS 产生增强, 进而诱发 JNK 的持续激活, 引起细胞凋亡。

已知 JNK 的持续激活可激活凋亡信号通路。抗凋亡蛋白 (Bcl-2 和 Bcl-X<sub>L</sub>) 及凋亡蛋白 (Bim 和 Bmf) 都可作为 JNK 的底物, 引起 Bcl 家族凋亡蛋白活性的增加和 Bcl 家族抗凋亡蛋白活性的降低, 导致线粒体外膜的渗透性增加, 促进细胞色素 c 和其他蛋白的释放, 激活 caspase 而引发凋亡<sup>[5]</sup>。同时, JNK 和 Sab 结

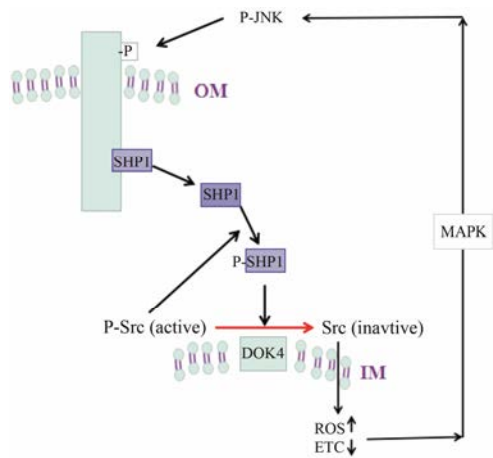


Figure 2 Mitochondrial JNK signaling pathway

合产生的 ROS 也能激活线粒体凋亡信号通路, 诱导损伤线粒体的渗透性转位 (mitochondrial permeability transition, MPT), 从而增加线粒体内膜的渗透性, 引起线粒体肿胀, 导致组织坏死<sup>[12]</sup>。

Chambers 等<sup>[13]</sup>发现, 小干扰 RNA (small interfering RNAs, siRNAs) 和能够与 Sab 蛋白 KIM1 结构域结合的细胞渗透肽 Tat-Sab<sub>KIM1</sub> 都能选择性地阻止 Bcl-2 的磷酸化、线粒体膜电位的下降、超氧化物的产生及细胞死亡, 但不影响 c-Jun 的磷酸化和 AP-1 的转录。然而, JNK 抑制剂 TI-JIP1 在阻止细胞凋亡的情况下也能影响 c-Jun 的磷酸化和 AP-1 的转录, 不具有选择性。因此, Sab 抑制剂的研究可能成为线粒体 JNK 信号通路相关疾病的新思路, 而不影响 JNK 的核转录功能, 也可能降低 JNK 抑制剂的相关不良反应。

**2.2.2 调节线粒体 p38 信号通路** p38 $\gamma$  是存在于线粒体的 p38 MAPK 亚家族成员。Court 等<sup>[3]</sup>通过对 KIM1 和 KIM2 进行选择性突变确定了 p38 $\gamma$  也是依赖 KIM1 而使 Sab 磷酸化。p38 $\gamma$  对 Sab 蛋白的磷酸位点主要发生在 321 位的丝氨酸, 而 JNK 主要使 321 位的丝氨酸磷酸化, 这与 JNK 使 Sab 磷酸化的位点一致 (主要磷酸化位点), 提示 p38 $\gamma$  和 JNK 可能拥有共同的线粒体靶点 Sab。然而, p38 $\gamma$  也能使 Ser391 少量磷酸化, 而 JNK 却不能使 Ser391 磷酸化, 这也为 p38 $\gamma$  的底物识别提供一些新思路。

总之, Sab 蛋白既能与 Btk, 也能与 JNK、p38 $\gamma$  结合, 对 Btk、JNK 和 p38 $\gamma$  的信号转导通路的相互关联具有一定的作用。鉴于 Btk、JNK 和 p38 $\gamma$  是机体生命过程 (如调控 B 细胞生长发育、调控线粒体信号转录等) 中发挥重要作用的分子, 且 Btk、JNK 异常与多种疾病 (如神经系统疾病、肝损伤等) 相关, 因而 Sab 有望作为一些疾病治疗的潜在靶点。

### 3 Sab 蛋白与弥漫大 B 细胞淋巴瘤

Kobayashi 等<sup>[14]</sup>在研究 187 例非特殊型弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 患者时发现, 60% 患者的瘤细胞中 Sab 抗原表达为阳性, 而且在 CD5<sup>+</sup> DLBCL 和活化 B 细胞样 (activated B-cell-Like, ABC) DLBCL 中阳性率更高。与 Sab 阴性组相比, Sab 阳性组与老年 (>60 岁) 和肿瘤晚期 (III/IV 期) 相关, 存活率也更低。上述结果提示, Sab 蛋白的表达与 DLBCL 的临床特征具有一定相关性, 因此有必要深入研究 DLBCL 细胞中 Sab 的功能, 如 Sab 与 Btk 和 JNK 的关系, 可能将有助于阐明 DLBCL 发生的分子机制。

### 4 Sab 蛋白与神经系统疾病

Sodero 等<sup>[15]</sup>最新研究发现, Sab 在成年小鼠脑内广泛表达, 尤其在海马、中脑腹侧和小脑具有高表达。在纯化的突触体、海马神经元、星形胶质细胞中也可发现 Sab, 而且 Sab 的分布与其结合分子 JNK 的分布具有相似性。使用 Sab 抑制剂细胞渗透肽 Tat-Sab<sub>KIM1</sub> 能够显著降低海马神经元的放电频率和振幅, 表明 Sab 蛋白介导的信号通路能够影响神经元的活性。神经元中 Sab 介导信号通路的具体作用仍不清楚, 推测轴突线粒体上的 Sab 对于高能量需求的树突和轴突末端区的线粒体快速转运和去极化线粒体的再生是必需的; 而且线粒体向突触的转运是依赖 Sab 蛋白和 JNK 共同完成。因此, 基于 Sab 在脑内的表达和分布, 可见脑内特殊的 Sab 介导的信号通路通过激酶的相互作用调控线粒体生理功能, 进而对神经元活性发挥重要功能。

6-羟基多巴胺诱导的神经毒性是由 JNK 定位于线粒体引起的, 而 Sab 抑制剂细胞渗透肽 Tat-Sab<sub>KIM1</sub> 能够显著降低 6-羟基多巴胺诱导的 SHSY5Y 细胞毒性。Tat-Sab<sub>KIM1</sub> 能够降低活性氧的产生、蛋白羧基化及脂质过氧化反应, 增加线粒体膜电位和氧消耗速率, 阻止大鼠 JNK 转位, 增加 TH<sup>+</sup>神经元数量, 提示 Tat-Sab<sub>KIM1</sub> 可通过阻止 JNK 转位到线粒体而降低 6-羟基多巴胺诱导的神经毒性, 进而发挥抗帕金森疾病的作用<sup>[16]</sup>。Takeshita 等<sup>[8]</sup>研究发现, Sab 是分泌生物活性肽 humanin 发挥神经保护作用的下游关键效应分子, humanin 可促进 Sab 蛋白和基因的表达, 而 Sab 能够直接抑制 JNK, 降低 p-JNK, 进而发挥对阿尔茨海默症相关神经元的保护作用。因此推测, Sab/JNK 复合物中 Sab 与 JNK 的摩尔比低于某一阈值时, Sab 仅作为一个载体使 JNK 靶向线粒体; 而当 Sab 与 JNK 的摩尔比高于某一阈值时, Sab 产生 JNK

抑制作用。Nijboer 等<sup>[17]</sup>通过对出生 7 天的幼年大鼠进行单侧颈动脉结扎和组织缺氧诱导的低氧缺血 (hypoxic-ischemic, HI) 脑损伤模型研究发现, HI 诱导的脑损伤仅引起线粒体 p-JNK 的增多, 对胞质或细胞核中 p-JNK 无明显影响。因此, 支持线粒体 JNK 激活对 HI 脑损伤至关重要的假说。此外, 他们还发现腹腔注射小肽 D-JNKi (JNK 的 AMP 激酶抑制剂) 和 Sab 抑制剂细胞渗透肽 Sab<sub>KIMI</sub> 都能保护 HI 脑损伤, 其保护机制均为抑制线粒体 JNK 的激活, 进而保护线粒体的完整性, 达到神经保护作用。因此, Sab<sub>KIMI</sub> 能够特异性地靶向抑制线粒体 JNK 的激活, 有效减轻 HI 脑损伤, 避免或降低 JNK 抑制剂可能引起的不良反应, 有望用于治疗因脑缺血导致的新生儿脑病。

在多种神经系统疾病中, 由于 JNK 定位于线粒体, 可引起氧化应激、线粒体功能紊乱及细胞死亡。Sab 作为线粒体 JNK 的结合靶标, 抑制或促进 Sab 蛋白的表达能够改善神经系统疾病如帕金森症、阿尔茨海默症、新生儿低氧缺血脑病等, 因此 Sab 蛋白有望作为神经保护作用的新靶点。

## 5 Sab 蛋白与肝损伤

Win 等<sup>[9, 12]</sup>研究发现, 在对乙酰氨基酚和肿瘤坏死因子/半乳糖胺分别引起的急性肝损伤模型中, 应用腺病毒 shRNA 沉默肝脏 Sab 蛋白的表达后可抑制 JNK 的持续激活、JNK 线粒体的靶向性及 MKK4 的活性, 对小鼠肝损伤及体外肝细胞损伤具有保护作用。因此, 可确定对乙酰氨基酚和 GalN/TNF- $\alpha$  引起的肝损伤与线粒体 Sab 蛋白表达相关, 即 Sab 能够增加 JNK 的靶向性及 MKK4 的活性, 进而引起线粒体内 p-JNK 的增多, 最终导致 JNK 的持续激活。因此, 应激激活的 JNK 与 Sab 的相互作用对于 JNK 的持续激活及急性肝损伤至关重要。

Win 等<sup>[18]</sup>研究发现, 高浓度软脂酸可诱导原代小鼠肝细胞死亡, 敲除 Sab 或使用 Sab 抑制剂能够抑制 JNK 与线粒体的结合, 抑制线粒体损伤, 改善呼吸链功能, 降低活性氧水平, 阻止肝细胞死亡, 表明软脂酸诱导的肝细胞脂毒性是由依赖 Sab 蛋白的 JNK 激活而引发的。

## 6 小结与展望

Sab 蛋白作为线粒体外膜支架蛋白, 可与胞质酪氨酸激酶 Btk、丝氨酸-苏氨酸激酶 (JNK、p38 $\gamma$ ) 结合, 进而调控 B 细胞的生长发育和线粒体的信号转导, 尤其是与 JNK 结合而调控线粒体的生理功能, 已成为研发热点。线粒体 JNK 的磷酸化和 JNK 的持续激

活可引发阿尔茨海默症、帕金森症、新生儿脑缺血性损伤的神经炎症和凋亡及肝损伤等疾病, Sab 蛋白作为线粒体 JNK 直接作用的下游靶标分子, 通过 Sab 蛋白抑制 JNK 的激活对相关疾病具有保护作用<sup>[8, 9, 16, 17]</sup>。因此, Sab 蛋白有望成为神经系统疾病及肝损伤的新治疗靶点。同时针对 Sab 蛋白开发的特异性 JNK 抑制剂可能会避免依赖 JNK 的核转录抑制而引起的毒性反应。因此, 有必要对 Sab 蛋白的功能及其介导的信号通路进行深入研究, 阐明 Sab 蛋白在疾病中的作用, 开发疗效好且毒副作用小的 Sab 蛋白抑制剂或诱导剂以治疗相关疾病。

## References

- [1] Matsushita M, Yamadori T, Kato S, et al. Identification and characterization of a novel SH3-domain binding protein, Sab, which preferentially associates with Bruton's tyrosine kinase (Btk) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 245: 337–343.
- [2] Wiltshire C, Matsushita M, Tsukada S, et al. A new c-Jun N-terminal kinase (JNK)-interacting protein, Sab (SH3BP5), associates with mitochondria [J]. *Biochem J*, 2002, 367: 577–585.
- [3] Court NW, Kuo I, Quigley O, et al. Phosphorylation of the mitochondrial protein Sab by stress-activated protein kinase 3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 319: 130–137.
- [4] Baba Y, Matsushita M, Matsuda Y, et al. Assignment of SH3BP5/Sh3bp5 encoding Sab, an SH3 domain-binding protein which preferentially associates with Bruton's tyrosine kinase, to human chromosome 1q43 and mouse chromosome 14B by *in situ* hybridization [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1999, 87: 221–222.
- [5] Wiltshire C, Gillespie DAF, May GHW. Sab (SH3BP5), a novel mitochondria-localized JNK-interacting protein [J]. *Biochem Soc Trans*, 2004, 32: 1075–1077.
- [6] Akinleye A, Chen Y, Mukhi N, et al. Ibrutinib and novel BTK inhibitors in clinical development [J]. *J Hematol Oncol*, 2013, 6: 59.
- [7] Yamadori T, Baba Y, Matsushita M, et al. Bruton's tyrosine kinase activity is negatively regulated by Sab, the Btk-SH3 domain-binding protein [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 6341–6346.
- [8] Takeshita Y, Hashimoto Y, Nawa M, et al. SH3-binding protein 5 mediates the neuroprotective effect of the secreted bioactive peptide humanin by inhibiting c-Jun NH2-terminal kinase [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288: 24691–24704.

- [9] Win S, Than TA, Min RWM, et al. JNK mediates mouse liver injury through a novel Sab (SH3BP5) dependent pathway leading to inactivation of intramitochondrial Src [J]. *Hepatology*, 2016, 63: 1987–2003.
- [10] Chambers JW, LoGrasso PV. Mitochondrial c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling initiates physiological changes resulting in amplification of reactive oxygen species generation [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 16052–16062.
- [11] Win S, Than TA, Fernandezcheca JC, et al. JNK interaction with Sab mediates ER stress induced inhibition of mitochondrial respiration and cell death [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e989.
- [12] Win S, Than TA, Han D, et al. c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent acute liver injury from acetaminophen or tumor necrosis factor (TNF) requires mitochondrial Sab protein expression in mice [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 35071–35078.
- [13] Chambers JW, Cherry L, Laughlin JD, et al. Selective inhibition of mitochondrial JNK signaling achieved using peptide mimicry of the Sab kinase interacting motif-1 (KIM1) [J]. *ACS Chem Biol*, 2011, 6: 808–818.
- [14] Kobayashi K, Yamaguchi M, Miyazaki K, et al. Expressions of SH3BP5, LMO3, and SNAP25 in diffuse large B-cell lymphoma cells and their association with clinical features [J]. *Cancer Med*, 2016, 5: 1802–1809.
- [15] Sodero AO, Rodriguezsilva M, Salio C, et al. Sab is differentially expressed in the brain and affects neuronal activity [J]. *Brain Res*, 2017, 1670: 76–85.
- [16] Chambers JW, Howard S, LoGrasso PV. Blocking c-Jun N-terminal kinase (JNK) translocation to the mitochondria prevents 6-hydroxydopamine-induced toxicity *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288: 1079–1087.
- [17] Nijboer CH, Bonestroo HJC, Zijlstra J, et al. Mitochondrial JNK phosphorylation as a novel therapeutic target to inhibit neuroinflammation and apoptosis after neonatal ischemic brain damage [J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 54: 432–444.
- [18] Win S, Than TA, Le BHA, et al. Sab (Sh3bp5) dependence of JNK mediated inhibition of mitochondrial respiration in palmitic acid induced hepatocyte lipotoxicity [J]. *J Hepatol*, 2015, 62: 1367–1374.