

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.12.1302

· 论 著 ·

## 肝癌细胞乙酰胆碱酯酶表达水平与丙型肝炎病毒感染之间的相互影响

罗正汉, 刘 燕, 刘 阳, 唐海琳, 徐铮昊, 戚中田, 赵 平\*

海军军医大学(第二军医大学)海军医学系生物医学防护教研室, 上海市医学生物防护重点实验室, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 探讨丙型肝炎病毒(HCV)感染对乙酰胆碱酯酶(AchE)表达水平的影响以及细胞内 AchE 活性的变化对 HCV 感染的影响。**方法** 以细胞培养来源的 HCV(HCVcc)感染人肝癌细胞系 Huh7 细胞,用蛋白质印迹法以及实时荧光定量 PCR(qPCR)进一步验证 HCV 感染对 AchE 表达水平的影响, AchE 活性检测试剂盒检测细胞内 AchE 活性的变化。以 AchE 抑制剂多奈哌齐和伊托必利处理 Huh7 细胞,同时用 HCVcc 感染,通过蛋白质印迹法以及免疫荧光法检测 Huh7 细胞的 HCV 感染情况。用针对 *AchE* 基因的小干扰 RNA(siRNA)转染 Huh7 细胞,随后用 HCVcc 感染 Huh7 细胞,通过蛋白质印迹法和免疫荧光法检测 AchE 的表达以及 HCV 感染情况。**结果** HCVcc 感染 Huh7 细胞 60 h 后, AchE 蛋白表达水平升高,同时酶活性也增强( $P$ 均 $<0.01$ )。AchE 抑制剂呈浓度依赖性抑制 HCV 对 Huh7 细胞的感染( $P<0.01$ )。用 siRNA 敲低 AchE 的表达后, HCV 对 Huh7 细胞的感染降低( $P<0.01$ )。**结论** HCV 感染 Huh7 细胞能上调 AchE 的表达并增强 AchE 活性, AchE 表达增加和活性增强都能促进 HCV 的感染,表明 AchE 在 HCV 感染 Huh7 细胞的过程中起着正反馈增强感染的作用。

**[关键词]** 丙型肝炎病毒; 黄病毒感染; 乙酰胆碱酯酶; 胆碱酯酶抑制剂; AchE 活性**[中图分类号]** R 512.63**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2018)12-1302-07

### Interaction between expression level of acetylcholinesterase and infection of hepatitis C virus in hepatoma carcinoma cells

LUO Zheng-han, LIU Yan, LIU Yang, TANG Hai-lin, XU Zheng-hao, QI Zhong-tian, ZHAO Ping\*

Department of Biodefense, Shanghai Key Laboratory of Medical Biodefense, Faculty of Naval Medicine, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect of hepatitis C virus (HCV) infection on acetylcholinesterase (AchE) expression level and the effect of AchE activity on the infection of HCV. **Methods** Human hepatoma cell line Huh7 cells were infected with cell culture-derived HCV (HCVcc). AchE expression level was analyzed using Western blotting and real-time quantitative PCR (qPCR). AchE enzyme activity was assayed using AchE activity detection kit. Huh7 cells were treated with AchE inhibitor, donepezil or itopride, together with HCVcc infection, and then the HCV infection level of Huh7 cells was detected by Western blotting and immunofluorescence. Huh7 cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) targeting to *AchE* gene, followed by infecting with HCVcc, and then the expression levels of AchE and HCV infection were analyzed by Western blotting and immunofluorescence. **Results** After 60 h of HCVcc infection, the expression level of AchE protein in Huh7 cells and the AchE activity were significantly increased (both  $P<0.01$ ). AchE inhibitors significantly inhibited HCV infection of Huh7 cells in a concentration-dependent manner ( $P<0.01$ ). After knocking down AchE with siRNA, HCV infection was significantly inhibited ( $P<0.01$ ). **Conclusion** HCV infection of Huh7 cells can up-regulate the expression level of AchE and enhance the activity of AchE. The increase of AchE expression and activity can promote HCV infection, indicating that AchE plays a positive feedback enhancement effect on HCV infection of Huh7 cells.

**[Key words]** hepatitis C virus; flavivirus infections; acetylcholinesterase; cholinesterase inhibitors; AchE activity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(12): 1302-1308]

**[收稿日期]** 2018-08-18 **[接受日期]** 2018-10-09**[基金项目]** 国家自然科学基金(31570170), 国家科技重大专项(2017ZX10304403-6/7). Supported by National Natural Science Foundation of China (31570170) and National Science and Technology Major Project (2017ZX10304403-6/7).**[作者简介]** 罗正汉, 硕士生. E-mail: irvinghan@126.com

\*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81870998, E-mail: pnzha@163.com

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 是一种全球流行的嗜肝 RNA 病毒, 全世界约有 1.3 亿人感染 HCV。HCV 的慢性感染率高达 75%~80%, 而慢性 HCV 感染是导致肝硬化、肝癌的重要原因之一<sup>[1-2]</sup>。针对 HCV 蛋白酶和 RNA 聚合酶的新一代直接抗病毒药物 (direct acting antivirals, DAAs) 可彻底清除病毒, 达到治愈丙型肝炎的目的, 但其价格昂贵, 且存在病毒耐药突变<sup>[3-4]</sup>、在乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) / HCV 共感染者中增强 HBV 复制<sup>[5-7]</sup>等潜在问题。

从 1989 年 HCV 被发现以后, HCV 疫苗的研发在美、欧发达国家备受关注, 有多种类型的疫苗进入了临床试验, 但迟迟没有 HCV 疫苗上市<sup>[8-10]</sup>。HCV 感染与致病的任何阶段都涉及病毒与宿主因子的相互作用, 正是大量宿主因子的参与才使得 HCV 能够完成其完整的复制周期和引起肝组织的疾病。因此, 寻找、鉴定与 HCV 互相作用的宿主因子, 对于认识 HCV 感染与致病机制以及寻找可能用于 HCV 防治的干预靶点仍然具有重要意义。

前期我们通过转录组测序筛选出在 HCV 感染的人肝癌细胞系 Huh7 细胞中表达水平上调的乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AchE; 未发表资料)。本研究拟进一步验证 HCV 感染对 Huh7 细胞 AchE 表达的影响, 并探讨 AchE 表达水平对 HCV 感染的影响, 为认识 HCV 建立持续感染的机制以及发现新的针对于宿主因子的抗 HCV 靶点提供依据, 同时为认识其他病毒, 尤其是黄病毒科其他成员的感染、免疫与致病机制提供新线索。

## 1 材料和方法

**1.1 细胞、质粒与试剂** 人肝癌细胞系 Huh7 细胞的衍生细胞系 Huh7.5.1 细胞由中国科学院上海巴斯德研究所钟劲研究员馈赠, 用于制备细胞培养产生的 HCV (HCVcc); 人肝癌细胞系 Huh7 细胞由本实验室保存, 用于研究 HCVcc 感染与 AchE 表达二者之间的相关性。J6/JFH-1 嵌合全长 HCV 基因组转录质粒由洛克菲勒大学 Charles Rice 教授馈赠。

AchE 抑制剂盐酸多奈哌齐 (donepezil hydrochloride, Done) 和盐酸伊托必利 (itopride hydrochloride, Ito) 购自美国 Selleck 公司; AchE

活性检测试剂盒 (Cat# MAK119) 购自美国 Sigma 公司; 转染试剂 Lipofectamine 3000、辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔或羊抗小鼠 IgG、Alexa Fluor<sup>®</sup>488 标记的羊抗人 IgG 购自美国 Invitrogen 公司; CCK-8 细胞增殖检测试剂盒购自日本 Dojindo 公司; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳配胶试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 由广州锐博生物技术公司合成; SYBR Premix *Ex Taq* 试剂购自日本 TaKaRa 公司; AchE 抗体 (ab31276) 和 HCV core 抗体 (ab2740) 购自美国 Abcam 公司, 内参 GAPDH 兔单克隆抗体购自美国 CST 公司。

**1.2 HCVcc 制备** 将 Huh7.5.1 细胞消化并用无血清培养液 Opti-MEM 重悬, 调细胞密度为  $2 \times 10^6$ /mL; 将 10  $\mu$ g J6/JFH-1 HCV RNA 与 10 mL Huh7.5.1 细胞悬液混合, 置于电穿杯进行电穿转染, 条件为 270 V、950  $\mu$ F、100  $\Omega$ 。随后加入 2 mL 新鲜 DMEM 培养液, 转移至 6 cm 培养皿中继续培养细胞。在 48 h、72 h 收集细胞培养上清 (HCVcc), 以 5 000 $\times$ g 离心 5 min 除去杂质和细胞碎片, 再将上清分装, 于 -80  $^{\circ}$ C 冻存备用。

**1.3 AchE 活性检测** 将 Huh7 细胞接种到 6 孔板, HCVcc 感染 Huh7 细胞 12、36、60 h 后分别用 5 mL 离心管收集细胞进行超声破碎 ( $2 \times 10^6$  Hz, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次), 然后以 12 000 $\times$ g 离心 5 min, 取上清利用 BCA 法进行蛋白定量, 最终蛋白浓度为 100  $\mu$ g/mL, 然后按照 AchE 活性检测试剂盒实验方法对其进行检测。根据公式计算 AchE 活性: AchE 活性 (U/L) =  $(D_{412B} - D_{412A}) / (D_{412C} - D_{412M}) \times 200N$ , 其中  $D_{412B}$  是上清孵育 10 min 后 412 nm 波长处光密度值,  $D_{412A}$  是上清孵育 2 min 后 412 nm 波长处光密度值,  $D_{412C}$  是校准液 10 min 后 412 nm 波长处光密度值,  $D_{412M}$  是 10 min 后对照组上清 412 nm 波长处光密度值,  $N$  是上清稀释倍数。

**1.4 AchE 抑制剂处理细胞** 用二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解 2 种 AchE 抑制剂 Done 和 Ito, 制备浓度分别为 10 mmol/L 和 50 mmol/L 的储存液。首先检测 AchE 抑制剂 Ito 和 Done 的细胞毒性。将 Huh7 细胞接种到 96 孔板中, 当细胞融合度达到 70% 时将抑制剂分别稀释

成 60、125、250、500  $\mu\text{mol/L}$  4 个浓度梯度处理细胞, 60 h 后用 CCK-8 检测细胞增殖水平。

接下来将 Huh7 细胞接种到 24 孔板中, 当细胞融合度达到 70% 时, 用 DMEM 完全培养液将储存液稀释, 加入细胞培养上清中, 终浓度分别为 60、125、250  $\mu\text{mol/L}$ , 对照组加入等体积的 DMEM 培养液。60 h 后用 AchE 活性检测试剂盒检测 AchE 活性。

**1.5 siRNA 转染** 将 siRNA 干粉溶于 RNase-free 水中, 浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$ , 分装,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。将 Huh7 细胞以较低密度接种于 24 孔板, 细胞生长融合度达到 40%~50% 时, 用 Lipofectamine 3000 转染 siRNA (包括针对 *AchE* 基因的 siRNA 和对照 siRNA), 每孔 siRNA 用量为 40 pmol, 具体步骤参照试剂使用说明。针对 *AchE* 基因的 siRNA 共 3 条, siAchE1 序列为 5'-GCT CGT ATT TTC TGG TTT A-3', siAchE2 序列为 5'-CGA CAT CAG TGA CGC TGT T-3', siAchE3 序列为 5'-GCT ACG AGA TCG AGT TCA T-3'。

**1.6 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 检测 *AchE* 和 *HCV* mRNA** 用 RNAiso Plus 试剂提取细胞总 RNA, RNA 沉淀溶解于 DEPC 处理水, 多功能酶标仪测定 RNA 浓度和纯度。然后用 PrimeScript<sup>TM</sup> RT Master Mix 试剂反转录获得 cDNA, 随后用 SYBR Primer *Ex Taq* 试剂进行 qPCR 以检测 *AchE* 和 *HCV* mRNA 水平。qPCR 操作参考试剂盒说明书。引物序列如下: *AchE* 上游 5'-CTT CGT GCC TGT GGT AGA T-3', 下游 5'-GCT GAT GAG AGA CTC GTT GTC-3'; JFH-1 型 *HCV* 上游 5'-TCT GCG GAA CCG GTG AGT A-3', 下游 5'-TCA GGC AGT ACC ACA AGG C-3'; 内参照基因 *GAPDH* 上游 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3', 下游 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'。

**1.7 蛋白质印迹法与免疫荧光法检测 AchE 及 HCV 蛋白的表达** 用 HCVcc 感染 Huh7 细胞, 以加入与 HCVcc 等体积的 Huh7.5.1 细胞培养上清的 Huh7 细胞作为对照组。分别在培养 12 h、36 h、60 h 后用 RIPA 蛋白裂解液 (强) 裂解细胞, 制备总蛋白样品。利用 BCA 法进行蛋白定量, 最终每孔用 20  $\mu\text{g}$  蛋白量进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 随后将凝胶中的蛋白样品电转至硝

酸纤维素膜, 以 GAPDH 作为内参, 用蛋白质印迹法检测细胞裂解液中的 AchE 和 HCV core 蛋白表达量。

将 Huh7 细胞接种到 96 孔板, 过夜培养, 以 HCVcc 感染, 同时加入浓度为 60、125、250  $\mu\text{mol/L}$  的 AchE 抑制剂, 混合均匀继续培养 60 h 后, 用免疫荧光法检测细胞中的 HCV 蛋白, 一抗为 HCV 抗体阳性的丙型肝炎患者血清 [由海军军医大学 (第二军医大学) 长海医院实验诊断科提供], 二抗为 Alexa Fluor<sup>®</sup>488 标记的羊抗人 IgG, 用 DAPI 复染细胞核。用 Bioteck 细胞荧光成像系统计数荧光阳性细胞。

**1.8 统计学处理** 应用 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据处理和统计学分析。呈正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用两独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

**2.1 HCV 感染上调 Huh7 细胞 AchE 的表达** 图 1A、1B 结果显示, 在 HCVcc 感染 Huh7 细胞 36 h 和 60 h 后, 与对照组相比 AchE 蛋白表达均上调 ( $P$  均  $< 0.01$ )。用 qPCR 检测细胞内 *AchE* mRNA 的变化, 图 1C、1D 结果显示 HCVcc 感染 Huh7 细胞 36 h 和 60 h 后, 与对照组相比细胞内 *AchE* mRNA 含量均增加 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 与前期转录组深度测序结果相符合。表明 HCV 感染可以明显上调 Huh7 细胞内 AchE 的表达。

**2.2 HCV 感染上调 Huh7 细胞内 AchE 活性** 图 2 结果显示, AchE 活性随着 HCVcc 感染 Huh7 细胞的时间延长而增强, 在 HCVcc 感染细胞 36 h 和 60 h 时 AchE 活性与对照组相比差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.01$ )。

**2.3 AchE 抑制剂可抑制 HCV 感染** 图 3A 结果显示, 与 DMSO 处理的细胞比较, 当抑制剂 Ito 浓度达到 500  $\mu\text{mol/L}$  时对细胞产生毒性作用 ( $P < 0.05$ )。图 4A 结果显示, 当抑制剂 Done 浓度达到 500  $\mu\text{mol/L}$  时对细胞产生毒性作用 ( $P < 0.01$ )。2 种抑制剂以 3 个较低浓度处理细胞均未见明显细胞毒性。图 3B、4B 结果都显示, 2 种抑制剂的浓度越高对 AchE 活性的抑制作用越明显, 其中当抑制剂浓度达到 250  $\mu\text{mol/L}$  时对

AchE 活性抑制效果最明显 ( $P < 0.01$ )。图 3C、4C 结果显示, 2 种抑制剂均剂量依赖性降低 HCV core 蛋白的表达, 与对照组相比, 当抑制剂浓度为  $60 \mu\text{mol/L}$  时 HCV core 蛋白的表达下调比较明显 ( $P < 0.05$ ), 而当抑制剂浓度达到  $125 \mu\text{mol/L}$  和  $250 \mu\text{mol/L}$  时, HCV core 蛋白的表达下调非常

明显 ( $P < 0.01$ )。图 3D、3E 和图 4D、4E 中的免疫荧光检测结果类似, 当抑制剂浓度为  $60 \mu\text{mol/L}$  时 HCV 对 Huh7 细胞阳性感染率的降低比较明显 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 而当抑制剂浓度达到  $125 \mu\text{mol/L}$  和  $250 \mu\text{mol/L}$  时 HCV 对 Huh7 细胞阳性感染率的降低非常明显 ( $P < 0.01$ )。

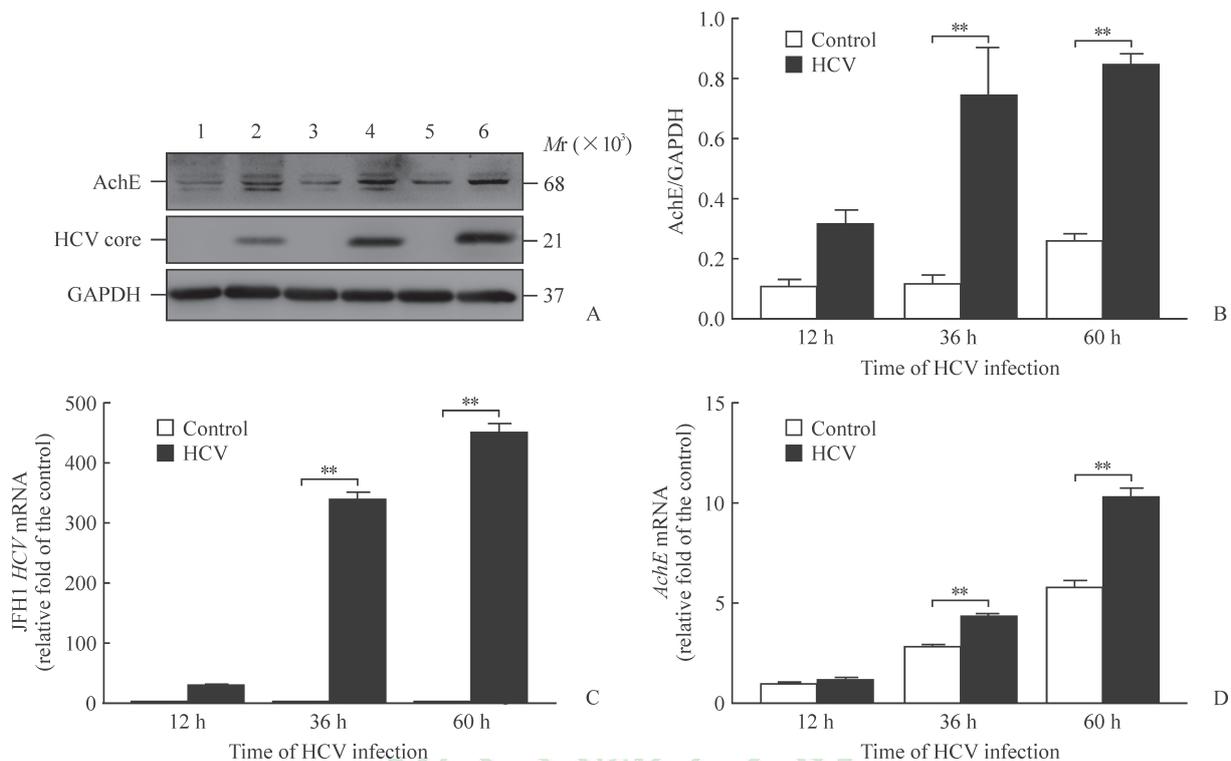


图 1 HCV 感染 Huh7 细胞上调 AchE 表达

Fig 1 HCV infection up-regulating AchE expression in Huh7 cells

A: Western blotting of AchE expression levels after HCV infection. 1, 2: 12 h after HCV infection; 3, 4: 36 h after HCV infection; 5, 6: 60 h after HCV infection. 1, 3, 5: Control group; 2, 4, 6: HCV group. B: Grayscale analysis of AchE expression level relative to GAPDH. C, D: qPCR of JFH1 HCV and AchE mRNA relative fold change after HCV infection, respectively. HCV: Hepatitis C virus; AchE: Acetylcholinesterase; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; qPCR: Real-time quantitative PCR; JFH1: Japanese fulminant hepatitis 1.  $**P < 0.01$ .  $n = 3, \bar{x} \pm s$

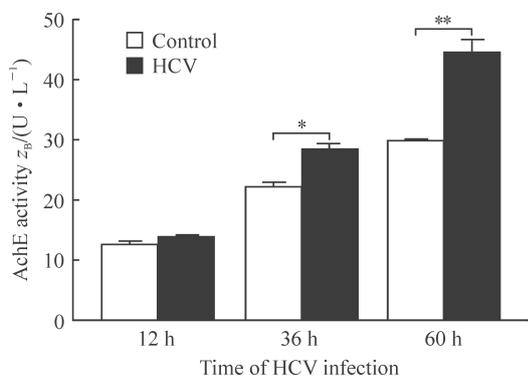


图 2 HCV 感染上调 Huh7 细胞内 AchE 活性

Fig 2 HCV infection up-regulating AchE activity in Huh7 cells

HCV: Hepatitis C virus; AchE: Acetylcholinesterase.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ .  $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.4 下调 AchE 表达能降低 HCV 对 Huh7 细胞的感染 图 5A 及 5B 分别显示, AchE siRNA1 和 AchE siRNA2 均可下调 Huh7 细胞中 AchE 的 mRNA 以及蛋白表达水平 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 而 AchE siRNA3 不能下调 Huh7 细胞中 AchE 的表达水平。图 5C 的蛋白质印迹结果显示, 下调 AchE 的表达后 Huh7 细胞中 HCV core 蛋白的表达水平降低, 与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。图 5D、5E 免疫荧光检测结果也显示, 当 Huh7 细胞中 AchE 表达被下调后 HCV 的阳性感染率降低, 设计的 3 条 AchE siRNA 所致结果与对照组相比差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

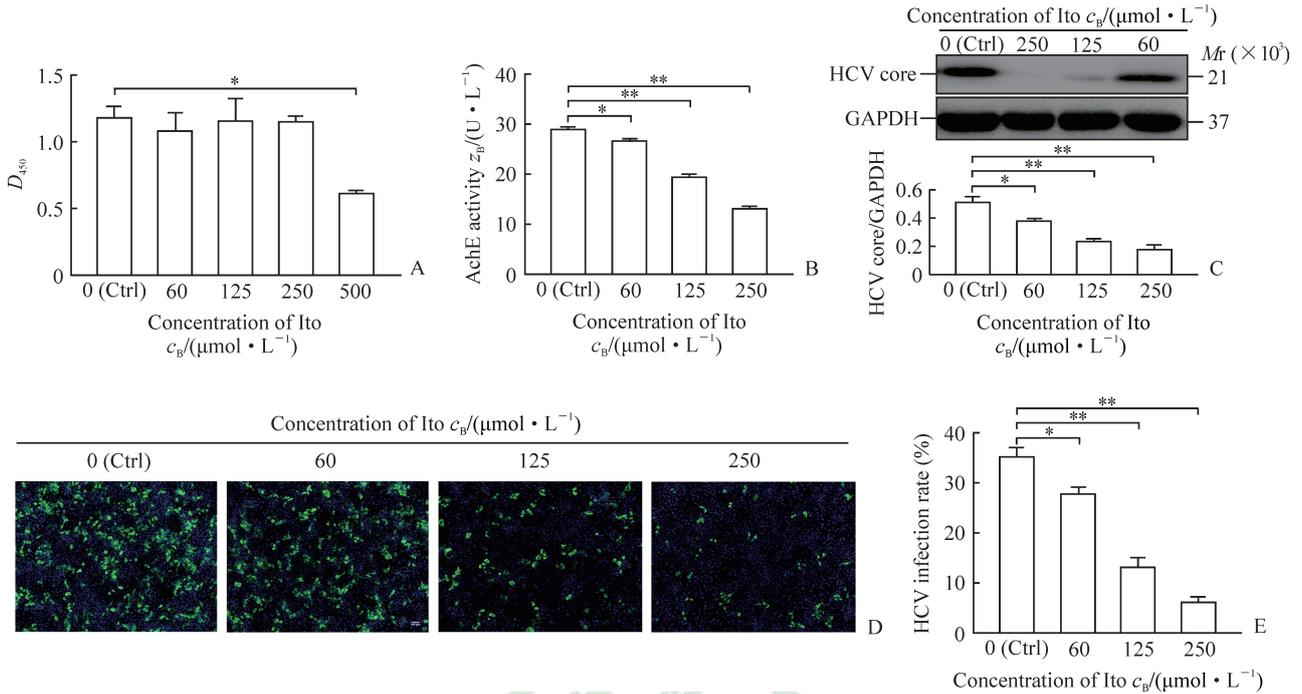


图3 AchE抑制剂Ito抑制AchE活性并降低HCV感染

Fig 3 AchE inhibitor Ito inhibiting AchE activity and reducing HCV infection

A: CCK-8 detection of Ito cytotoxicity on Huh7 cells; B: The effect of Ito on AchE activity; C: Western blotting of Ito inhibiting HCV core protein expression and relative grayscale analysis; D: Immunofluorescence of Ito inhibition of HCV infection; E: HCV positive infection rate according to the immunofluorescence. Ctrl: Dimethyl sulfoxide as control; AchE: Acetylcholinesterase; Ito: Itopride hydrochloride; HCV: Hepatitis C virus; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Original magnification:  $\times 100$  (D). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

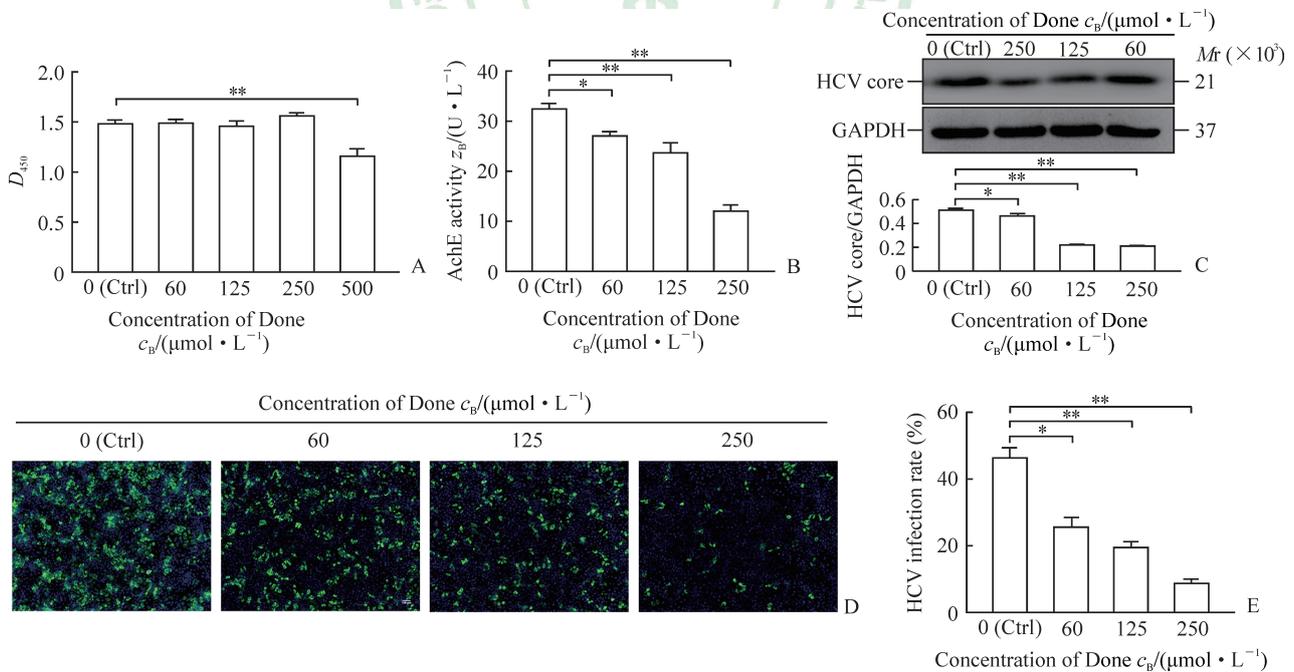


图4 AchE抑制剂Done抑制AchE活性并降低HCV感染

Fig 4 AchE inhibitor Done inhibiting AchE activity and reducing HCV infection

A: CCK-8 detection of Done cytotoxicity on Huh7 cell; B: The effect of Done on AchE activity; C: Western blotting of Done inhibiting HCV core protein expression and relative grayscale analysis; D: Immunofluorescence of Done inhibition on HCV infection; E: HCV positive infection rate according to the immunofluorescence. Ctrl: Dimethyl sulfoxide as control; AchE: Acetylcholinesterase; Done: Donepezil hydrochloride; HCV: Hepatitis C virus; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Original magnification:  $\times 100$  (D). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

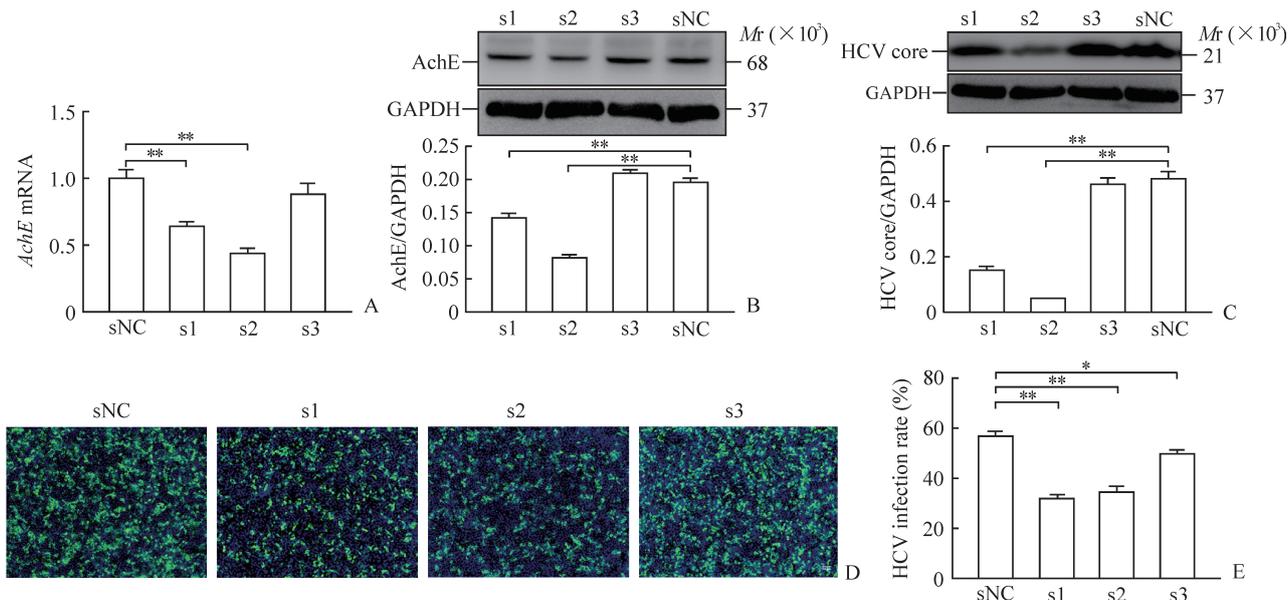


图 5 下调 AchE 的表达降低 HCV 对 Huh7 细胞的感染

Fig 5 Down-regulation of AchE expression reducing HCV infection of Huh7 cells

A: qPCR of *AchE* knockdown effect; B: Western blotting of *AchE* knockdown effect; C: Western blotting of *AchE* knockdown affecting HCV core protein expression; D: Immunofluorescence of *AchE* knockdown affecting HCV infection; E: The HCV positive infection rate according to the immunofluorescence. sNC: Negative control of the siRNA; s1: The first siRNA of *AchE*; s2: The second siRNA of *AchE*; s3: The third siRNA of *AchE*; AchE: Acetylcholinesterase; HCV: Hepatitis C virus; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; qPCR: Real-time quantitative PCR; siRNA: Small interfering RNA. Original magnification:  $\times 100$  (D). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

前期我们通过转录组测序发现 HCVcc 感染能明显上调 Huh7 细胞内 AchE 的表达, HCV 感染 12 h、36 h、60 h 后 *AchE* mRNA 相比未感染 HCVcc 的细胞分别升高 1.44、4.93、13.15 倍 (未发表资料)。越来越多的研究发现, AchE 不仅存在于神经细胞中, 在成纤维细胞、红细胞、血管内皮细胞、肝细胞等细胞中也广泛存在<sup>[11-13]</sup>, 而且参与细胞增殖、凋亡以及分化, 并与细胞氧化应激和炎症反应有关<sup>[14-17]</sup>。有报道在 240 例原发性肝癌患者中, 69.2% 患者的肝癌细胞中 AchE 表达下降, AchE 低表达可以促进肝癌细胞体外增殖以及在裸鼠体内的致瘤性, 同时还可降低肝癌细胞的化疗敏感性<sup>[18]</sup>。然而目前尚未见 AchE 影响 HCV 感染的相关报道, 本研究发现当 AchE 活性被抑制及其蛋白表达被下调后, HCV 对肝癌细胞的感染也随之下降, 表明 AchE 也可以有效地影响肝癌细胞 HCV 的感染。

AchE 能够将神经递质乙酰胆碱降解为胆碱, 胆碱对脂肪有亲和力, 可促进脂肪以磷脂形式由肝脏通过血液输送出去或改善脂肪酸本身在肝脏中

的利用, 并防止脂肪在肝脏内的异常积聚。胆碱本身对肝细胞也具有保护作用, 临床上常用于辅助治疗肝硬化、肝炎, 效果良好。肝细胞通过胞苷二磷酸胆碱代谢途径 (CDP-choline pathway) 利用胆碱参与各种磷脂的合成以及促进脂肪酸的合理分配, 从而调控肝脏脂肪代谢。研究发现, 肝癌细胞对放射性标记胆碱的摄入量高于其周围的细胞, 故推荐将甲基化的胆碱作为一种代谢标记结合正电子发射型计算机断层显像 (positron emission computed tomography, PET) 用于肝癌细胞中脂质合成的成像研究<sup>[19]</sup>。

HCV 的细胞侵入、复制以及病毒体的组装与释放的每个过程均与肝细胞的脂质代谢密切相关<sup>[20-22]</sup>。在细胞侵入阶段, HCV 需要与定位于细胞膜脂筏中的受体分子结合; 在复制阶段, 由 HCV 非结构蛋白完成的基因组复制发生于细胞内的膜网结构; HCV 核衣壳的组装起始于细胞内的脂滴结构; HCV 的释放则依赖于细胞的低密度脂蛋白分泌途径。因此, 我们推测 AchE 可能通过参与肝细胞的脂质代谢影响 HCV 感染。另外 HCV 感染肝细胞长时间不引起细胞病变, 从而造成无症状感染, 这是否与 HCV 上调 AchE 促进胆碱的产

生有关? 下一步我们将针对胆碱在脂代谢中的作用以及其对肝细胞的保护作用两个方面探讨 AchE 影响 HCV 感染的机制, 明确该机制可能为研发新的丙型肝炎治疗药物提供思路。

### [参 考 文 献]

- [1] MESSINA J P, HUMPHREYS I, FLAXMAN A, BROWN A, COOKE G S, PYBUS O G, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes[J]. *Hepatology*, 2015, 61: 77-87.
- [2] GOLDBERG D, DITAH I C, SAEIAN K, LALEHZARI M, ARONSOHN A, GOROSPE E C, et al. Changes in the prevalence of hepatitis C virus infection, nonalcoholic steatohepatitis, and alcoholic liver disease among patients with cirrhosis or liver failure on the waitlist for liver transplantation[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152: 1090-1099.
- [3] SARRAZIN C. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice[J]. *J Hepatol*, 2016, 64: 486-504.
- [4] PAWLOTSKY J M. Hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral drugs in interferon-free regimens[J]. *Gastroenterology*, 2016, 151: 70-86.
- [5] KAWAGISHI N, SUDA G, ONOZAWA M, KIMURA M, MAEHARA O, OHARA M, et al. Comparing the risk of hepatitis B virus reactivation between direct-acting antiviral therapies and interferon-based therapies for hepatitis C[J]. *J Viral Hepat*, 2017, 24: 1098-1106.
- [6] CHEN G, WANG C, CHEN J, JI D, WANG Y, WU V, et al. Hepatitis B reactivation in hepatitis B and C coinfecting patients treated with antiviral agents: a systematic review and meta-analysis[J]. *Hepatology*, 2017, 66: 13-26.
- [7] WANG C, JI D, CHEN J, SHAO Q, LI B, LIU J, et al. Hepatitis due to reactivation of hepatitis B virus in endemic areas among patients with hepatitis C treated with direct-acting antiviral agents[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2017, 15: 132-136.
- [8] PIERCE B G, BOUCHER E N, PIEPENBRINK K H, EJEMEL M, RAPP C A, THOMAS W D Jr, et al. Structure-based design of hepatitis C virus vaccines that elicit neutralizing antibody responses to a conserved epitope[J/OL]. *J Virol*, 2017, 91: e01032-17. doi: 10.1128/JVI.01032-17.
- [9] OYARZUN P, KOBE B. Recombinant and epitope-based vaccines on the road to the market and implications for vaccine design and production[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2016, 12: 763-767.
- [10] KAZI A, CHUAH C, LEOW C Y, LIM B H, MAJEED A B A, LEOW C H. Current progress of immunoinformatics approach harnessed for cellular- and antibody-dependent vaccine design[J]. *Pathog Glob Health*, 2018, 112: 123-131.
- [11] MONTENEGRO M F, RUIZ-ESPEJO F, CAMPOY F J, MUÑOZ-DELGADO E, DE LA CADENA M P, RODRÍGUEZ-BERROCAL F J, et al. Cholinesterases are down-expressed in human colorectal carcinoma[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63: 2175-2182.
- [12] GUPTA S, BELLE V S, KUMBARAKERI RAJASHEKHAR R, JOGI S, PRABHU R K. Correlation of red blood cell acetylcholinesterase enzyme activity with various rbc indices[J]. *Indian J Clin Biochem*, 2018, 33: 445-449.
- [13] WEIST R, FLÖRKEMEIER T, ROGER Y, FRANKE A, SCHWANKE K, ZWEIGERDT R, et al. Differential expression of cholinergic system components in human induced pluripotent stem cells, bone marrow-derived multipotent stromal cells, and induced pluripotent stem cell-derived multipotent stromal cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27: 166-183.
- [14] YE W, GONG X, XIE J, WU J, ZHANG X, OUYANG Q, et al. AChE deficiency or inhibition decreases apoptosis and p53 expression and protects renal function after ischemia/reperfusion[J]. *Apoptosis*, 2010, 15: 474-487.
- [15] ZHANG X J, YANG L, ZHAO Q, CAEN J P, HE H Y, JIN Q H, et al. Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types[J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9: 790-800.
- [16] LAYER P G. Cholinesterases during development of the avian nervous system[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 1991, 11: 7-33.
- [17] BEN AZIZ-ALOYA R, STERNFELD M, SOREQ H. Promoter elements and alternative splicing in the human *ACHE* gene[J]. *Prog Brain Res*, 1993, 98: 147-153.
- [18] ZHAO Y, WANG X, WANG T, HU X, HUI X, YAN M, et al. Acetylcholinesterase, a key prognostic predictor for hepatocellular carcinoma, suppresses cell growth and induces chemosensitization[J]. *Hepatology*, 2011, 53: 493-503.
- [19] KUANG Y, SALEM N, TIAN H, KOLTHAMMER J A, CORN D J, WU C, et al. Imaging lipid synthesis in hepatocellular carcinoma with [methyl-<sup>11</sup>C]choline: correlation with *in vivo* metabolic studies[J]. *J Nucl Med*, 2011, 52: 98-106.
- [20] STOECK I K, LEE J, TABATA K, ROMERO-BREY I, PAUL D, SCHULT P, et al. Hepatitis C virus replication depends on endosomal cholesterol homeostasis[J/OL]. *J Virol*, 2018, 92: e01196-17. doi: 10.1128/JVI.01196-17.
- [21] KIM J Y, WANG L, LEE J, OU J J. Hepatitis C virus induces the localization of lipid rafts to autophagosomes for its RNA replication[J/OL]. *J Virol*, 2017, 91: e00541-17. doi: 10.1128/JVI.00541-17.
- [22] KOLETZKO L, MAHLI A, HELLERBRAND C. Development of an *in vitro* model to study hepatitis C virus effects on hepatocellular lipotoxicity and lipid metabolism[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214: 1700-1706.

[本文编辑] 尹 茶