

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00026

· 论 著 ·

## 乙肝病毒 X 基因诱导肝细胞脂肪变性作用机制的研究

张 琴<sup>1</sup>, 彭 俊<sup>2</sup>, 沈 薇<sup>1\*</sup>

1. 重庆医科大学附属第二医院消化内科, 重庆 400010
2. 凉山州第一人民医院妇产科, 西昌 615000

**[摘要]** **目的** 探讨沉默肝 X 受体  $\alpha$  (liver X receptor  $\alpha$ , LXR $\alpha$ ) 基因对 HepG2. 2. 15 细胞脂质代谢相关基因表达的影响。**方法** 设立空白对照组(不转染任何质粒)、阴性对照组(转染阴性 HK 质粒)和 shLXR $\alpha$  转染组(转染 shLXR $\alpha$  质粒)。构建针对 LXR $\alpha$  基因的 shLXR $\alpha$  质粒并转染 HepG2. 2. 15 细胞, 用荧光显微镜及蛋白质印迹法检测转染质粒 24~96 h 绿色荧光蛋白和 LXR $\alpha$  蛋白的表达以确定质粒的最佳干扰时间, 根据结果给予激动剂 T0901317 刺激细胞, 用三酰甘油(TG)含量检测肝细胞脂肪变性程度, RT-PCR 检测固醇调节元件结合蛋白 1c(sterol regulatory element binding protein-1c, SREBP-1c) mRNA 的表达, 蛋白质印迹法检测乙肝病毒 X(hepatitis B virus X, HBx)蛋白及脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)蛋白的表达。**结果** 成功构建 shLXR $\alpha$  质粒并转染 HepG2. 2. 15 细胞。与空白对照组和阴性对照组比较, shLXR $\alpha$  转染组 LXR $\alpha$  蛋白表达下降, 于转染后 48~72 h 表达最低, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 随着激动剂 T0901317 处理时间延长, 各组 HBx 和 FAS 蛋白表达、TG 含量、SREBP-1c mRNA 水平均逐渐增加, 同一时间点 HBx 蛋白在各组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 而 FAS 蛋白、TG 含量、SREBP-1c mRNA 水平, 在 shLXR $\alpha$  转染组中的表达较空白对照组和阴性对照组低, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** HBx 对脂代谢的调控可能部分通过 LXR $\alpha$ /SREBP-1c/FAS 途径实现。

**[关键词]** 肝 X 受体  $\alpha$ ; 乙肝病毒 X 基因; 脂代谢障碍; RNA 干扰

**[中图分类号]** R 575.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)01-0026-06

### Mechanism on hepatitis B virus X gene-induced hepatic steatosis

ZHANG Qin<sup>1</sup>, PENG Jun<sup>2</sup>, SHEN Wei<sup>1\*</sup>

1. Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China
2. Department of Gynaecology and Obstetrics, First People's Hospital of Liangshan Prefecture, Xichang 615000, Sichuan, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of liver X receptor  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ) gene silencing on lipid metabolism-related genes in HepG2. 2. 15 cells. **Methods** HepG2. 2. 15 cells were divided into blank control group (without transfection), negative control group (transfected with HK plasmid), and shLXR $\alpha$  group (transfected with shLXR $\alpha$  plasmid). The shLXR $\alpha$  plasmids carrying LXR $\alpha$  gene were constructed and were used to transfect HepG2. 2. 15 cells using PolyJet<sup>TM</sup> reagent. Green fluorescent protein and LXR $\alpha$  protein expression were examined by fluorescence microscope and Western blotting analysis 24-96 h after transfection, so as to identify the best interference time. Then cells were treated with agonist T0901317 for 24 h or 48 h; and the content of triglyceride (TG) was observed to detect the degree of steatosis by biochemical assay. The expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) mRNA was detected by RT-PCR and the expression of hepatitis B virus X (HBx) protein and fatty acid synthase (FAS) protein was tested by Western blotting analysis. **Results** The shLXR $\alpha$  plasmid was constructed and transfected into HepG2. 2. 15 cells successfully. Compared with blank and negative control groups, LXR $\alpha$  protein was markedly decreased in the shLXR $\alpha$  group, with the lowest level found at 48-72 h after transfection ( $P < 0.01$ ). After cells were stimulated with T0901317, HBx and FAS protein expression, the content of TG, and SREBP-1c mRNA expression gradually increased with the prolongation of stimulation period, and there was no significant difference in HBx expression at the same time point between different groups. FAS protein, TG contents, and SREBP-1c mRNA in shLXR $\alpha$  group were significantly lower than those in the other two groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** HBx can regulate lipid metabolism

**[收稿日期]** 2011-11-04 **[接受日期]** 2011-11-29

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30871160). Supported by National Natural Science Foundation of China(30871160).

**[作者简介]** 张 琴, 博士生. E-mail: zhang.qin222@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-63693345, E-mail: shenwei315@126.com

through LXR $\alpha$ /SREBP-1c/FAS pathway.

[Key words] liver X receptor  $\alpha$ ; hepatitis B virus X gene; lipid metabolism disorders; RNA interference

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1): 31-36]

病毒性肝炎常合并不同程度的肝细胞脂肪变性, 研究显示慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 相关性脂肪肝发病率高达 27%~51%<sup>[1]</sup>。我国是乙肝大国, HBsAg 阳性者占全国人口的 7.18%<sup>[2]</sup>。CHB 常发生肝纤维化、肝硬化, 甚至演变为肝癌而危及生命<sup>[3]</sup>。然而 CHB 发生肝细胞脂肪变性与乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的关系目前知之甚少。肝 X 受体 (liver X receptor, LXR) 包括 LXR $\alpha$  和 LXR $\beta$  两种亚型, 广泛参与机体脂肪代谢、胆固醇代谢、糖代谢和炎症等生理活动的调节<sup>[4-5]</sup>, 其中 LXR $\alpha$  主要表达于肝脏、脂肪组织等, 是脂代谢的关键调控点, 可以激活多种参与脂肪酸和三酰甘油 (TG) 的酶如脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, FAS) 等的转录, 最终导致肝细胞脂肪变性。乙肝病毒 X (HBx) 基因编码的 HBx 蛋白是一种多功能蛋白质, 在病毒复制中起重要作用, 被认为是 HBV 感染合并肝细胞变性的主要决定因子<sup>[6]</sup>。我们前期的研究结果提示乙肝合并肝细胞脂肪变性患者中, HBx 是主要的病毒因素, 细胞实验亦证实 HBx 在肝脂肪变性中起主要作用, 且可能上调 LXR $\alpha$  和 FAS 的表达而导致肝细胞脂肪变性<sup>[7]</sup>。为进一步探讨 HBx 对脂代谢的影响是否通过 LXR $\alpha$ -FAS 途径实现, 本研究拟以 HepG2. 2. 15 细胞为研究对象, 通过 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术构建 LXR $\alpha$  特异的 shRNA 质粒, 观察沉默 LXR $\alpha$  基因前后脂代谢相关因子的表达, 探讨 HBx 基因在 HBV 感染合并肝脂肪变性中的作用机制。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂 HepG2. 2. 15 细胞由重庆医科大学附属第二医院消化内科实验室保存; 质粒载体 pGenesil-1. 1、通用阴性对照 HK 质粒 (武汉晶赛生物工程技术有限公司); 小鼠抗人 HBx 单克隆抗体 (Chemicon 公司, MAB8419); 兔抗人 FAS 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司, sc-20140); 鼠抗人 LXR $\alpha$  单克隆抗体 (Abcam 公司, ab41902); 质粒小抽提试剂盒 (BioRad 公司, Endo-free Plasmid Mini Kit 1, D6948); RNA 抽取试剂盒、PCR 试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司); TG 试剂盒 (长春汇力生物技术有限公司); 转染试剂 PolyJet<sup>TM</sup> (SignaGen 公司,

MD21754); LXR $\alpha$  特异性激动剂 T0901317 (Cayman 公司); 胎牛血清 (杭州四季青生物工程有限公司); 全蛋白、核蛋白和胞质蛋白提取试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司)。

1.2 细胞培养 HepG2. 2. 15 细胞培养于含 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液 (双抗: 青霉素 0.062 5 g/L, 链霉素 0.1 g/L), 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的孵箱中培养, 每 3~4 d 用 0.25% 胰酶 (含 0.02% EDTA) 消化传代。

1.3 细胞分组 设立空白对照组 (不转染任何质粒)、阴性对照组 (转染阴性对照 HK 质粒) 和 shLXR $\alpha$  转染组 (转染 shLXR $\alpha$  质粒); 各组均给予 10 mmol/L 激动剂 T0901317 处理, 根据刺激时间长短每组设立 24 h 和 48 h 两个时间段。

1.4 靶序列的选择 本实验选择前期实验证明有效的序列 GCA ACT CAA TGA TGC CGA GTT 为靶序列<sup>[8]</sup>, 以通用阴性对照 HK 质粒作为与 LXR $\alpha$  无关的内对照作用位点。

1.5 LXR $\alpha$  质粒的构建 shLXR $\alpha$  质粒插入的 DNA 模板序列正义链: 5'-CAC CGC AAC TCA ATG ATG CCG AGT TTT CAA GAC GAA CTC GGC ATC ATT GAG TTG CTT TTT TG-3'; 反义链: 5'-AGC TCA AAA AAG CAA CTC AAT GAT GCC GAG TTC GTC TTG AAA ACT CGG CAT CAT TGA GTT GC-3'。pGenesil-1. 1 质粒载体带有 Sac I 酶切位点, 插入的模板序列设计有该酶切位点便于连接载体。两片段经退火后产物与线性化载体连接, 经过重组质粒的转化、单克隆扩增等步骤构建 LXR $\alpha$  的特性质粒 shLXR $\alpha$ 。

1.6 质粒鉴定 用质粒小抽提试剂盒抽提质粒后行酶切鉴定; 单克隆菌落扩增后送上海生工生物工程技术有限公司测序鉴定。

1.7 沉默 LXR $\alpha$  基因细胞模型的建立 待细胞长至 70%~80% 融合时开始瞬时转染。空白对照组不转染任何质粒, 阴性对照组和 shLXR $\alpha$  转染组各取 4.5  $\mu$ g 阴性质粒 HK 及重组质粒 shLXR $\alpha$  和 12  $\mu$ l PolyJet<sup>TM</sup> 转染试剂分别装于 100  $\mu$ l 不含血清的 DMEM 培养液中, 室温静置 5 min, 再将含 4.5  $\mu$ g 质粒的无血清 DMEM 培养液混入含 12  $\mu$ l PolyJet<sup>TM</sup> 的无血清培养液, 室温静置 15~20 min, 将

混合液加入细胞中。HK 质粒作为阴性对照质粒,不编码针对任何基因的 siRNA。转染后在荧光显微镜下观察荧光蛋白的表达。

1.8 蛋白质印迹法检测 LXR $\alpha$ 、HBx 及 FAS 蛋白的表达 LXR $\alpha$  蛋白检测: 分别于 shLXR $\alpha$  质粒转染 24、48、72 和 96 h 后,用 0.25% 胰酶消化,1 000 $\times$ g,4 $^{\circ}$ C 离心,收集细胞,预冷 PBS 洗 3 次,因 LXR $\alpha$  蛋白主要表达于细胞核,故按核蛋白提取试剂盒说明书提取细胞核蛋白。BCA 法测定蛋白浓度后-70 $^{\circ}$ C 保存备用。LXR $\alpha$  蛋白按每泳道 80  $\mu$ g 上样到 12% SDS-PAGE 中,电泳后转膜至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,加入 LXR $\alpha$  抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBST 洗膜后加入二抗室温孵育 2 h,ECL 显色。

HBx 及 FAS 蛋白检测: 据上述结果确定最佳干扰时间,并在最佳干扰时间内用 T0901317 刺激细胞后按上述方法操作,一抗分别加入 HBx 和 FAS 抗体,孵育过夜,次日加入二抗,ECL 显色。

以目的蛋白与内参  $\beta$ -actin 的灰度比值表示目的蛋白的相对表达量,并用 Quantity One 软件进行半定量分析。

1.9 各组细胞内 TG 含量检测 用激动剂 T0901317 处理 24 和 48 h 后收集细胞,提取细胞总蛋白,并行蛋白定量分析,按 TG 试剂盒说明书进行操作,计算每毫克蛋白所对应的 TG 含量。

1.10 RT-PCR 检测固醇调节元件结合蛋白 1c (SREBP-1c) mRNA 表达 用激动剂 T0901317 刺激细胞后,按 RNA 抽提试剂盒操作步骤提取各组细胞总 RNA,反转录成 cDNA。SREBP-1c 上游引物: 5'-CCC AGA AAC TCA AGC AGG AGA AC-3', 下游引物: 5'-CTT TGC TGT CCT CAA AGA CTG G-3',产物长度 274 bp; $\beta$ -actin 上游引物: 5'-GAC CCA GAT CAT GTT TGA GAC C-3',下游引物: 5'-ATC TCC TTC TGC ATC CTG TCG-3',产物长度 625 bp。PCR 反应条件均为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。各取 6  $\mu$ l SREBP-1c、 $\beta$ -actin 产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像后,用 Quantity One 软件进行分析。每个样本与  $\beta$ -actin 积分光密度比值代表各组 SREBP-1c mRNA 的相对表达量。

1.11 统计学处理 采用 SPSS 13.00 统计软件进行分析,实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。两样本比较用  $t$  检验,

多样本均数比较用方差分析,检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 重组质粒酶切及测序鉴定 经 Sac I 酶切鉴定,重组质粒 shLXR $\alpha$  符合设计要求(图 1),测序结果显示插入片段碱基序列亦符合设计要求。

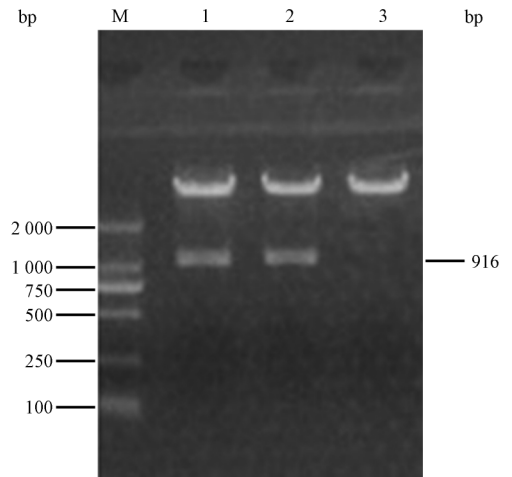


图 1 重组质粒 shLXR $\alpha$  酶切鉴定图

Fig 1 Restriction enzyme identification of recombinant plasmid shLXR $\alpha$

M: DL2000 marker; 1,2: LXR $\alpha$ +Sac I; 3: LXR $\alpha$

2.2 沉默 LXR $\alpha$  基因的细胞模型 HepG2. 2.15 细胞转染质粒后阴性对照组和 shLXR $\alpha$  转染组于转染后 12 h 即可见绿色荧光蛋白,转染后 48~72 h 表达最强,之后荧光减弱;空白对照组未见荧光(图 2)。

### 2.3 蛋白印迹检测结果

2.3.1 各组 LXR $\alpha$  蛋白表达水平 与空白对照组和阴性对照组比较,shLXR $\alpha$  转染组 LXR $\alpha$  蛋白的表达在各时间点下降,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); shLXR $\alpha$  转染组中,随着转染时间延长,LXR $\alpha$  蛋白表达越低,但转染后 96 h LXR $\alpha$  蛋白表达又有所回升(图 3、表 1)。因此于转染后 24 h 加入激动剂,选择加入激动剂 24 h(转染后 48 h)和 48 h(转染后 72 h)两个时间点进行后续实验。

2.3.2 各组细胞 HBx、FAS 蛋白表达水平 各组细胞 HBx 和 FAS 蛋白表达均随着激动剂刺激时间延长而逐渐增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );其中各组 HBx 蛋白表达在同一时间点差异无统计学意义(图 4A,表 2),而 FAS 蛋白,在同一时间点 shLXR $\alpha$  转染组表达较空白对照组和阴性对照组少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,图 4B,表 2)。

2.4 各组细胞 TG 含量 各组细胞内 TG 含量随

激动剂刺激时间延长而逐渐增多, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 与空白对照组和阴性对照组比较, 同

一时间点 shLXR $\alpha$  转染组细胞内 TG 含量较低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见表 2。

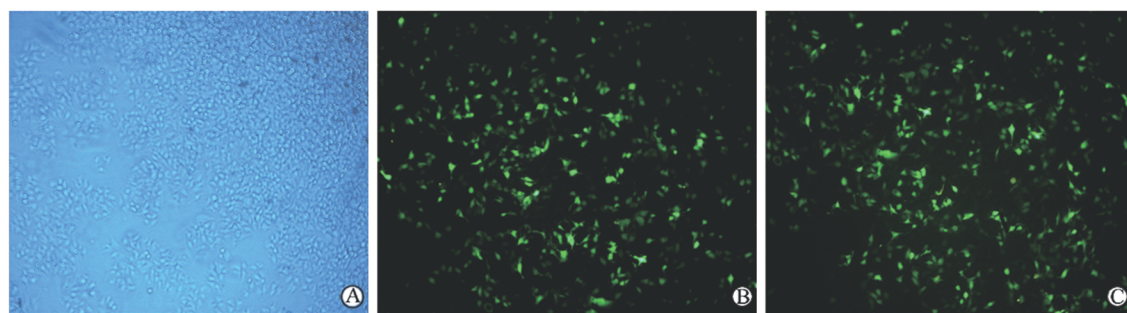


图 2 质粒转染 72 h 后各组细胞荧光蛋白表达

Fig 2 Expression of fluorescent protein 72 h after plasmid transfection in each group

A: Blank control group; B: Negative control group; C: shLXR $\alpha$  transfected group. Original magnification:  $\times 100$

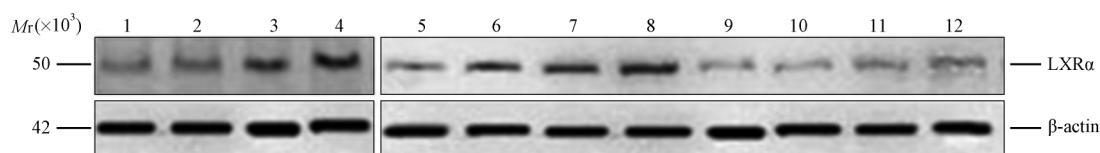


图 3 各组细胞转染质粒不同时间点 LXR $\alpha$  蛋白的表达

Fig 3 Expression of LXR $\alpha$  protein at different time points after plasmid transfection in each group

1-4: 24 h, 48 h, 72 h and 96 h after plasmid transfection in blank control group; 5-8: 24 h, 48 h, 72 h and 96 h after plasmid transfection in negative control group; 9-12: 24 h, 48 h, 72 h and 96 h after plasmid transfection in shLXR $\alpha$  transfected group

表 1 各组转染后不同时间点 LXR $\alpha$  蛋白的相对表达量

Tab 1 Expression of LXR $\alpha$  protein at different time points after plasmid transfection in each group

$n = 3, \bar{x} \pm s$

Group	Time after plasmid transfection $t/h$			
	24	48	72	96
Blank control	0.557 $\pm$ 0.031	0.610 $\pm$ 0.026 $\triangle\triangle$	0.693 $\pm$ 0.021 $\blacktriangle\blacktriangle$	0.763 $\pm$ 0.037 $\diamond\diamond$
Negative control	0.547 $\pm$ 0.021	0.630 $\pm$ 0.020 $\triangle\triangle$	0.707 $\pm$ 0.021 $\blacktriangle\blacktriangle$	0.760 $\pm$ 0.052 $\diamond\diamond$
shLXR $\alpha$ transfected	0.507 $\pm$ 0.031 $**$	0.427 $\pm$ 0.032 $**\triangle\triangle$	0.330 $\pm$ 0.026 $**\blacktriangle\blacktriangle$	0.607 $\pm$ 0.042 $**\diamond\diamond$

$** P < 0.01$  vs blank and negative control groups,  $\triangle\triangle P < 0.01$  vs 24 h of the same group,  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$  vs 48 h of the same group,  $\diamond\diamond P < 0.01$  vs 72 h of the same group

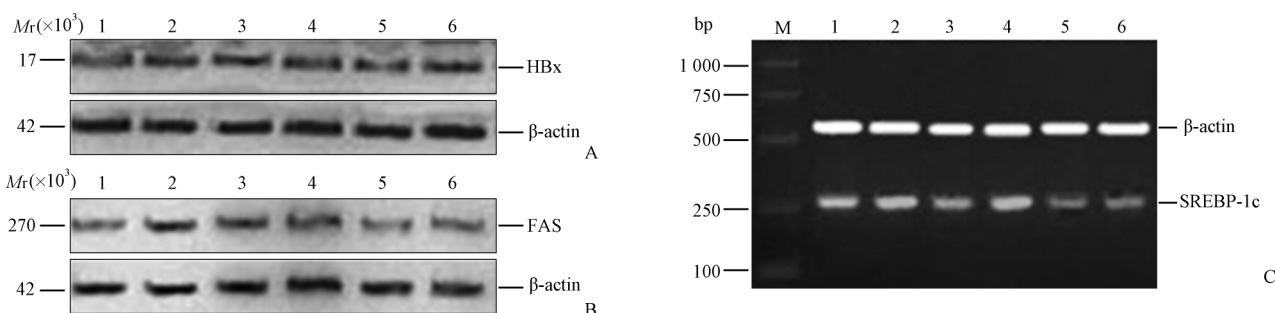


图 4 各组细胞 HBx(A)、FAS(B) 蛋白及 SREBP-1c mRNA(C) 的表达

Fig 4 Expression of HBx(A), FAS protein(B), and SREBP-1c mRNA(C) in each group

1, 2: 24 h and 48 h after adding agonist in blank control group; 3, 4: 24 h and 48 h after adding agonist in negative control group; 5, 6: 24 h and 48 h after adding agonist in shLXR $\alpha$  transfected group

表 2 各组细胞 HBx 和 FAS 蛋白、TG 含量及 SREBP-1c mRNA 的相对表达量

Tab 2 Expression of HBx, FAS protein, TG content and SREBP-1c mRNA in each group

$n=3, \bar{x} \pm s$

Group		T0901317	
		24 h	48 h
HBx protein	Blank control	0.603±0.032	0.683±0.038 $\Delta\Delta$
	Negative control	0.617±0.032	0.673±0.015 $\Delta\Delta$
	shLXR $\alpha$ transfected	0.603±0.006	0.656±0.015 $\Delta\Delta$
FAS protein	Blank control	0.633±0.029	0.690±0.026 $\Delta\Delta$
	Negative control	0.637±0.025	0.720±0.026 $\Delta\Delta$
	shLXR $\alpha$ transfected	0.483±0.031**	0.550±0.030** $\Delta\Delta$
TG content ( $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ )	Blank control	32.610±5.095	50.598±5.481 $\Delta\Delta$
	Negative control	31.583±3.224	51.145±3.501 $\Delta\Delta$
	shLXR $\alpha$ transfected	21.210±3.389**	44.565±1.604** $\Delta\Delta$
SREBP-1c mRNA	Blank control	0.473±0.033	0.580±0.018 $\Delta\Delta$
	Negative control	0.465±0.012	0.580±0.026 $\Delta\Delta$
	shLXR $\alpha$ transfected	0.368±0.014**	0.393±0.032** $\Delta\Delta$

\*\*  $P<0.01$  vs blank and negative control group,  $\Delta\Delta$   $P<0.01$  vs 24 h in the same group

2.5 各组细胞 SREBP-1c mRNA 表达水平 随着激动剂刺激时间延长, SREBP-1c mRNA 表达水平逐渐升高, 差异有统计学意义( $P<0.01$ ); 与空白对照组和阴性对照组比较, 同一时间点 shLXR $\alpha$  转染组中 SREBP-1c mRNA 表达减少, 差异有统计学意义( $P<0.01$ ), 见图 4C、表 2。

### 3 讨论

LXR 属于核受体超家族成员, 是脂质代谢中的关键核受体, 被认为是全身脂质代谢感受器之一。LXR 包括 LXR $\alpha$  和 LXR $\beta$  两种同源亚型, 前者主要分布在肝脏、脂肪组织和小肠等; 后者广泛分布于全身各组织。LXR 主要包括以下几个结构域: 核心 DNA 结合结构域; N 末端的配体非依赖性转录激活作用区; 保持受体蛋白稳定性的铰链区; C 末端区域较大, 包括配体结合域、配体依赖性催化激活功能区和二聚化接触界面区<sup>[9]</sup>。在肝脏 LXR $\alpha$  与视黄醇 X 受体结合形成异二聚体与靶基因中 LXR 反应元件 (LXRE) 的特异核苷酸序列结合调节靶基因 SREBP-1c、FAS、ACC、SCD-1 等的转录, 从而调节脂肪酸代谢<sup>[10]</sup>。HBx 是 HBV X 基因编码的一种多功能蛋白, 可以反式作用于 HBV, 影响病毒转录和复制, 还可以通过与核转录因子和基本转录元件相互作用而参与宿主细胞基因表达的调控<sup>[11-12]</sup>。近年来研究表明, HBx 可以通过与 LXR 相互作用调控脂代谢相关基因如 FAS、ACC、PPAR $\gamma$  等转录,

从而实现对肝脏脂代谢的调节作用<sup>[13-14]</sup>。FAS 是肝细胞脂质合成的关键基因, 也是 LXR 的靶基因, FAS 的转录激活是 LXR 依赖性的。我们前期实验证实 HBx 参与了肝脂肪变性的发生, 是 HBV 中的主要致病因素, 且可能通过上调脂代谢因子 LXR $\alpha$  和 FAS 的表达而影响脂代谢<sup>[7]</sup>。FAS 的转录调节是 LXR $\alpha$  依赖性的, 而 HBx 与肝脂肪变的关系、HBx 对 FAS 的调节是否是通过 LXR $\alpha$ -FAS 途径实现还有待进一步研究。

HepG2. 2. 15 细胞是将 HBV DNA 整合入 HepG2 细胞的肝癌细胞系, 可持续表达 HBx 蛋白。RNA 干扰是近几年发展起来的一种研究基因功能的技术, 目前已广泛用于功能基因组学、抗病毒及疾病的基因治疗中<sup>[15]</sup>。本实验构建靶向 LXR $\alpha$  基因的 RNA 干扰质粒, 通过将此干扰质粒转染入 HepG2. 2. 15 细胞, 再用 LXR $\alpha$  特异激动剂 T0901317 刺激细胞脂肪变性, 观察 LXR $\alpha$  沉默前后脂肪变性程度的差别和脂代谢相关因子的变化, 以期明确 HBx 参与肝脂肪变性及对脂代谢基因 FAS 蛋白表达的调控是否是 LXR 依赖性的。结果显示, 转染质粒后 48~72 h 荧光蛋白表达最强, 到转染后 96 h 荧光蛋白减少; 蛋白印迹法检测也提示转染后 48~72 h LXR $\alpha$  蛋白表达最低, 转染后 96 h 蛋白表达又有所回升, 说明本实验构建的 shRNA 质粒能部分沉默 LXR $\alpha$  的表达, 且在转染后 48 h 和 72 h 沉默效率最高, 故本实验选择这两个时间点加入激动

剂。

蛋白印迹法检测结果显示随着激动剂刺激时间的延长,各组 HBx 和 FAS 蛋白及 SREBP-1c mRNA 的表达增加,但同一时间点的 HBx 蛋白表达各组之间差异无统计学意义,而同一时间点 FAS、SREBP-1c mRNA 的表达 shLXR $\alpha$  转染组较空白对照组和阴性对照组低。TG 含量检测结果亦显示同一时间点 shLXR $\alpha$  转染组脂肪变性程度较空白对照组和阴性对照组低,这与蛋白印迹法检测的结果一致。我们推断由于沉默了 LXR $\alpha$  基因后,使细胞中 LXR $\alpha$  表达减少,FAS 和 SREBP-1c mRNA 的表达亦相应减少,导致沉默 LXR $\alpha$  基因后细胞脂肪变性程度减轻。这与 Kim 等<sup>[16-18]</sup>的报道基本一致。

综上所述,HBx 蛋白参与了 CHB 合并的肝细胞脂肪变性,HBx 参与肝脂肪变性和对脂代谢的调控可能部分通过 LXR $\alpha$ /SREBP-1c/FAS 途径实现。因此,LXR $\alpha$  有可能成为 CHB 相关性脂肪肝病治疗的新靶点。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Fan J G,Chitturi S. Hepatitis B and fatty liver: causal or coincidental? [J]. Gastroenterol Hepatol,2008,23:679-681.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 全国人群乙肝血清流行病学调查结果 [R]. 北京:中华人民共和国卫生部,2008.
- [3] Vild zola Gonzales H,Salinas J L. Natural history of chronic hepatitis B virus infection [J]. Rev Gastroenterol Peru,2009,29:147-157.
- [4] Geyeregger R,Zeyda M,Stulnig T M. Liver X receptors in cardiovascular and metabolic disease[J]. Cell Mol Life Sci,2006,63:524-539.
- [5] Lee J H,Zhou J,Xie W. PXR and LXR in hepatic steatosis: a new dog and an old dog with new tricks[J]. Mol Pharm,2008,5:60-66.
- [6] Brown A J. Viral hepatitis and fatty liver disease: how an un-

welcome guest makes pâté of the host[J]. Biochem J,2008,416:e15-e17.

- [7] 张琴,彭俊,沈薇. 乙肝病毒 X 基因参与肝细胞脂肪变性的作用及机制的初步研究[J]. 第三军医大学学报,2011,33:2466-2470.
- [8] 张琴,彭俊,沈薇. LXR $\alpha$ -shRNA 真核表达质粒的构建及抑制 LXR $\alpha$  表达的有效序列筛选[J]. 中国老年学杂志(已接受).
- [9] Valledor A F,Ricote M. Nuclear receptor signaling in macrophages[J]. Biochem Pharmacol,2004,67:201-212.
- [10] Na T Y,Shin Y K,Roh K J,Kang S A,Hong I,Oh S J,et al. Liver X receptor mediates hepatitis B virus X protein-induced lipogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology,2009,49:1122-1131.
- [11] Benhenda S,Cougot D,Buendia M A,Neuveut C. Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis[J]. Adv Cancer Res,2009,103:75-109.
- [12] Tang H,Oishi N,Kaneko S,Murakami S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein[J]. Cancer Sci,2006,97:977-983.
- [13] Cha J Y,Repa J J. The liver X receptor(LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR[J]. J Biol Chem,2007,282:743-751.
- [14] Higuchi N,Kato M,Shundo Y,Tajiri H,Tanaka M,Yamashita N,et al. Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatol Res,2008,38:1122-1129.
- [15] Grimm D. Small silencing RNAs: state-of-the-art[J]. Adv Drug Deliv Rev,2009,61:672-703.
- [16] Kim K, Kim K H, Kim H H, Cheong J. Hepatitis B virus X protein induces lipogenic transcription factor SREBP1 and fatty acid synthase through the activation of nuclear receptor LXR [J]. Biochem,2008,416:219-230.
- [17] Kim J Y, Song E H, Lee H J, Oh Y K, Choi K H, Yu D Y, et al. HBx-Induced hepatic steatosis and apoptosis are regulated by TNFR1- and NF-kappaB dependent pathways[J]. J Mol Biol, 2010,397:917-931.
- [18] Kim K H, Shin H J, Kim K, Choi H M, Rhee S H, Moon H B, et al. Hepatitis B virus X protein induces hepatic steatosis via transcriptional activation of SREBP1 and PPARgamma [J]. Gastroenterology,2007,132:1955-1967.

[本文编辑] 尹茶