

## · 基础论著 ·

HCV 核心蛋白通过 LXR $\alpha$  核受体介导

## HepG2 细胞甘油三酯合成增加

王晶晶 刘顺爱 张锦前 全敏 冯胜虎 王琦 赵龙凤 成军

**【摘要】目的** 观察丙型肝炎病毒(HCV)的核心蛋白(core)对肝细胞甘油三酯(TG)合成的影响。**方法** 将HCV 1b基因型core表达载体pcDNA3.1-myc/his(-)-core1b和HCV 3a基因型core表达载体pcDNA3.1-myc/his(-)-core3a分别转染至HepG2细胞,利用定量测定法检测细胞内TG含量,用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应法(real time qPCR)、蛋白免疫印迹(Western blot)方法观察脂质合成相关基因肝X受体 $\alpha$ (LXR $\alpha$ )、甾醇调节元件结合蛋白1c(SREBP1c)和脂肪酸合酶(FASN)的mRNA和蛋白的表达变化,并进行比较分析。**结果** HepG2细胞转染两个基因型HCV core表达载体之后均能显著增加细胞内的TG含量( $P < 0.05$ ),尤以基因型core3a组为差异更显著( $P < 0.001$ )。Real-time PCR结果显示,两个基因型core均上调LXR $\alpha$ 的mRNA水平( $P < 0.05$ ),基因型core3a组差异更为显著( $P < 0.01$ );FASN的mRNA水平只在基因型core3a组上调( $P < 0.05$ ),而基因型core1b组差异无统计学意义。Western blot结果显示,HCV core表达可以明显上调表达可以显著上调SREBP1c的蛋白水平,尤其基因型core3a组更为显著。对FASN蛋白水平,基因型core3a上调其表达,但基因型core1b组无明显变化。**结论** HCV可能通过LXR $\alpha$ 介导肝细胞内的脂质合成诱导肝脂肪变,有待进一步研究。

**【关键词】** 肝炎病毒, 丙型; 核心蛋白; 肝X受体 $\alpha$ ; 脂肪变

## HCV core protein increased the synthesis of triglyceride in HepG2 cells by liver X receptor alpha

WANG Jingjing\*, LIU Shunai, ZHANG Jinqian, QUAN Min, FENG Shenghu, WANG Qi, ZHAO Longfeng, CHENG Jun. \*Department of Infectious Diseases, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding authors: ZHAO Longfeng, Email: zhaolf006@163.com; CHENG Jun, Email: jun.cheng.ditan@gmail.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of HCV core protein on the intracellular triglyceride accumulation in HepG2 cells. **Methods** HCV core genes were cloned and expressed. Intracellular triglyceride was assessed by quantification with adipogenesis assay kit. The influence of HCV core protein on the liver X receptor (LXR $\alpha$ ), sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP1c) and fatty acid synthase (FASN) mRNA expression were analyzed in vitro by real-time PCR. Increased protein expression of SREBP1c and FASN were observed by Western blot. **Results** There were significant accumulation of triglycerides in both core1b and core3a-expressing HepG2 cells ( $P < 0.05$ ), while core3a protein expression induced significant TG accumulation ( $P < 0.001$ ). LXR $\alpha$  mRNA expression were upregulated in both cells expressing of HCV core1b ( $P < 0.05$ ) and core3a ( $P < 0.01$ ). FASN mRNA level was increased in core3a-expreession HepG2 cells ( $P < 0.05$ ), however, SREBP1c mRNA level was elevated, but with no significant difference. This was accompanied by an increase in protein levels of SREBP1 and FASN. **Conclusion** LXR alpha-mediated regulation of triglyceride significant by HCV core protein in HepG2 cells.

**【Key words】** Hepatitis C virus; Core; Liver X receptor (LXR $\alpha$ ); Steatosis

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.01.002

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(No. 20121107110012); 北京市教委科技计划面上项目(No. 11320016)

作者单位: 030001 太原市, 山西医科大学第一医院感染病科(王晶晶、赵龙凤); 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所(刘顺爱、张锦前、全敏、冯胜虎、王琦、成军); 新发突发传染病研究北京市重点实验室(刘顺爱、张锦前、全敏、冯胜虎、王琦、成军)

通讯作者: 赵龙凤, Email: zhaolf006@163.com; 成军, Email: jun.cheng.ditan@gmail.com

目前全球丙型肝炎病毒(HCV)感染者已超过1.7亿,其可以引起慢性丙型肝炎(CHC)、脂肪肝变和肝细胞癌等多种肝脏疾病,并与糖尿病、脂类等多种代谢紊乱的发生密切相关,临床表现具有多样性<sup>[1]</sup>。其中肝脏脂肪变是CHC突出的病理学表现,从临床病例资料统计发现慢性丙型肝炎合并脂肪肝的发生率达82.39%,其中中、重度占70.53%<sup>[2]</sup>。国内外研究证实丙型肝炎病毒感染与代谢综合征密切相关,脂肪变性可能是丙型肝炎病毒致代谢综合征的中心环节之一<sup>[3]</sup>。

肝X受体 $\alpha$ (liver X receptor, LXR $\alpha$ )主要调控胆固醇、胆汁酸和脂肪酸等几种重要的脂质代谢<sup>[4]</sup>,有研究显示,在细胞实验和动物实验中均发现LXR可以介导脂质合成,导致血清血脂水平升高<sup>[5]</sup>。但目前多数研究都集中在对临床资料的回顾性分析,对于HCV导致脂肪变的分子生物学机制方面研究较少,为阐述HCV诱导脂肪肝的相关分子机制,本研究采用HCV core体外细胞模型研究LXR $\alpha$ 、SREBP1c和FASN的变化及其相互关系,为HCV肝脂肪变发病机理提供有力的依据,报道如下。

## 材料与方法

### 一、主要材料及试剂

肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞、HCV core表达载体pcDNA3.1/myc-his(-)-core1b和pcDNA3.1/myc-his(-)-core3a为首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所保存。jet PRIME DNA&siRNA转染试剂购自法国Polyplus公司,real time-PCR试剂Power SYBR GREEN PCR Master Mix购自Life Technologies公司,甘油三酯测定试剂盒购自美国Sigma-Aldrich公司,抗-SREBP1c、抗- $\beta$ -actin购自美国Santa Cruz公司,抗-HCV core、抗-FASN购自美国Abcam公司,抗-GAPDH购自美国Cell Signaling Technology公司,羊抗兔和羊抗鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术公司,各种工具酶、生化试剂和细胞培养试剂主要购自GIBCO、Promega、Invitrogen、Sigma、TaKaRa及威格拉斯等生物公司。

### 二、方法

1. 细胞培养和转染: HepG2细胞培养采用含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基,于

37℃, 5% CO<sub>2</sub>的培养箱培养。HepG2细胞接种在细胞培养板中,24 h后细胞处于60%~80%融合度时,按照jet PRIME转染试剂说明书分别转染pcDNA3.1myc/his(-)-core1b和pcDNA3.1myc/his(-)-core3a,同时设pcDNA3.1myc/his(-)空载体对照。转染48 h后收集细胞进行以下实验。

2. 细胞内总甘油三酯测定: HepG2细胞接种在细胞接种于12孔细胞培养板中,按以上方法转染HCV core表达载体48 h后,弃上清,收集 $3 \times 10^5$ 个细胞,加入100  $\mu$ l的裂解液充分混匀裂解细胞,将细胞裂解液移至1.5 ml离心管中,95℃孵育30 min,得到待测样本。按照试剂盒说明书配置成标准蛋白浓度梯度。在96孔酶标板中加入50  $\mu$ l梯度标准品和待测样品10~30  $\mu$ l,加入脂肪酶和主要反应体系后,用酶标仪测定570 nm波长的吸光度,根据标准曲线计算出样品中的甘油三酯的浓度,用单位蛋白量( $\mu$ g)来标化。

3. 细胞总RNA提取和逆转录: HepG2细胞接种在细胞接种于12孔细胞培养板中,按以上方法转染HCV core表达载体48 h后,弃上清,用Promega RNA提取试剂盒提取细胞总RNA。采用TaKaRa Prime Script RT reagent Kit(perfect real time)将所提取RNA逆转录为cDNA,逆转录条件为37℃ 15 min, 85℃ 5 s。

4. LXR $\alpha$ 、SREBP1c和FASN的mRNA水平测定: 取以上cDNA,用real time-PCR方法进行脂肪代谢相关基因LXR $\alpha$ 、SREBP1c和FASN的mRNA水平测定,使用ABI 7500荧光定量PCR仪,引物由上海生工生物技术有限公司合成,引物序列见表1。real time-PCR反应体系为25  $\mu$ l,反应条件为95℃ 10 min, 95℃ 15 s、60℃ 1 min, 40个循环, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s, 60℃ 15 s。同时设置 $\beta$ -actin内参对照。

5. SREBP1c和FASN蛋白水平测定: HepG2细胞接种在6孔细胞培养板中,按以上方法转染HCV core表达载体48 h后,弃上清,用蛋白裂解液提取细胞总蛋白,采用Western blot分析观察SREBP1c和FASN的蛋白水平变化。按本实验室常规方法进行操作,一抗4℃孵育过夜、HRP标记二抗室温孵育1 h后,用法国VILBER SOLO4化学发光成像系统照相。

表1 用于RT-qPCR扩增的特异性引物序列

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
LXR $\alpha$	GCCGAGTTTGCTTGCTCA	TCCGAGGCTCACCAGTTTC
SREBP1c	GGAGGGGTAGGGCCAACGGCCT	CATGTCTTCGAAAGTGCAATCC
FASN	AGCTGCCAGAGTCGGAGAAC	TGTAGCCACGAGTGTCTCG
$\beta$ -actin	CATCCGCAAAGACCTGTACGC	AGTACTTGCCTCAGGAGGAG

### 三、统计学处理

采用SPSS 13.0软件包对资料进行统计学分析,数据表示 $\bar{x} \pm s$ , 实验组与对照组之间采用配对样本 $t$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、HCV core 蛋白在 HepG2 细胞中的成功表达

将测序正确的表达质粒pcDNA3.1myc/his(-)、pcDNA3.1myc/his(-)-core1b/3a转染至HepG2细胞,Western blot结果显示转染pcDNA3.1myc/his(-)空载体组无HCV core的表达,而转染pcDNA3.1myc/his(-)-core表达质粒组可见HCV core大量表达,见图1。提示HCV core质粒成功表达。

### 二、过表达 HCV core 蛋白 HepG2 细胞内甘油三酯的含量

为观察HCV core蛋白对肝内脂质的影响,以HepG2细胞内TG含量的变化来衡量。实验结果显示,与pcDNA3.1myc/his(-)空载体组相比,转染pcDNA3.1myc/his(-)-core1b和pcDNA3.1myc/his(-)-core3a组均能增加细胞内的TG含量,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),尤以core3a组差异更为显著( $P < 0.001$ ),如图2A所示,以上结果表明,HCV core蛋白能增加HepG2细胞内TG的积累。

### 三、HCV core 蛋白上调 LXR $\alpha$ 、SREBP1c、FASN 的 mRNA 表达水平

为观察HCV core蛋白对脂质合成相关基因转录水平的影响,本研究进行了qRT-PCR。结果显示,与pcDNA3.1myc/his(-)空载体组相比,转染pcDNA3.1myc/his(-)-core1b和pcDNA3.1myc/his(-)-core3a均使LXR $\alpha$ 的mRNA水平上调,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),尤以core3a组差异更为显著( $P < 0.01$ ),见图2B。而转染

pcDNA3.1myc/his(-)-core1b和pcDNA3.1myc/his(-)-core3a组的SREBP1c的mRNA水平虽有增加的趋势,但差异无统计学意义,见图2C。与空载体组相比,pcDNA3.1myc/his(-)-core3a组使FASN的mRNA水平上调,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图2D。以上结果表明,HCV core蛋白可以上调与脂质合成相关基因的转录水平。

### 四、HCV core 蛋白上调 SREBP1c、FASN 的蛋白表达水平

HCV core蛋白不仅对SREBP1c和FASN转录水平具有调控作用,也同样对蛋白水平有调控作用。Western blot结果显示,与转染pcDNA3.1myc/his(-)空载体相比,转染pcDNA3.1myc/his(-)-core1b和转染pcDNA3.1myc/his(-)-core3a组均对SREBP1c具有显著上调作用,尤其pcDNA3.1myc/his(-)-core3a对其蛋白表达更显著(图3A)。而与空载体组相比,pcDNA3.1myc/his(-)-core3a轻微上调FASN的蛋白水平,但core1b无显著影响,见图3B。

## 讨 论

国内外有大量研究证实HCV与脂肪肝有极大的相关性。早在2002年,本课题组建立了表达HCV结构基因的转基因小鼠模型,发现HCV结构基因的转基因小鼠肝脏有典型的脂肪变病理改变<sup>[6]</sup>。本课题组不仅从动物水平证实HCV与肝脏脂肪变的关系,且从临床病理学角度也得出同样的结论,对159例慢性丙型肝炎患者的肝组织活检分析,有131例患者合并肝脏脂肪变,占82.39%(131/159),中重度患者占70.53%<sup>[2]</sup>。在发病机制研究方面,本课题组利用酵母双杂交技术和免疫共沉淀等方法,从分子生物学角度证实HCV核心蛋白可以与载脂蛋白A I相结合<sup>[7-8]</sup>。而且从临床病例中也发现,慢性丙型肝炎合并脂肪肝患者的血清TG水平显著高于不合并脂肪肝患者<sup>[9]</sup>。这些结果均提示HCV感染与肝脏脂肪变之间关系密切,且HCV感染可以诱导肝脏脂肪变。但是目前对HCV感染导致脂肪变的分子机制仍研究甚少,只有对其发生机制有更深入地了解和研究,才能更好地针对性治疗。

肝X受体(LXRs)是配体激活转录因子,属于核激素受体超家族的成员<sup>[10]</sup>,包括LXR $\alpha$ (NR1H3)和LXR $\beta$ (NR1H2)两种单体。

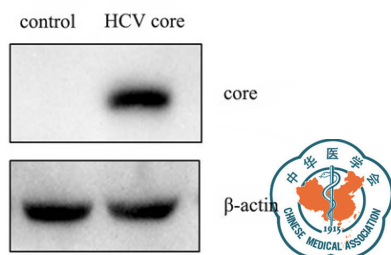


图1 HCV core 在蛋白水平的过表达



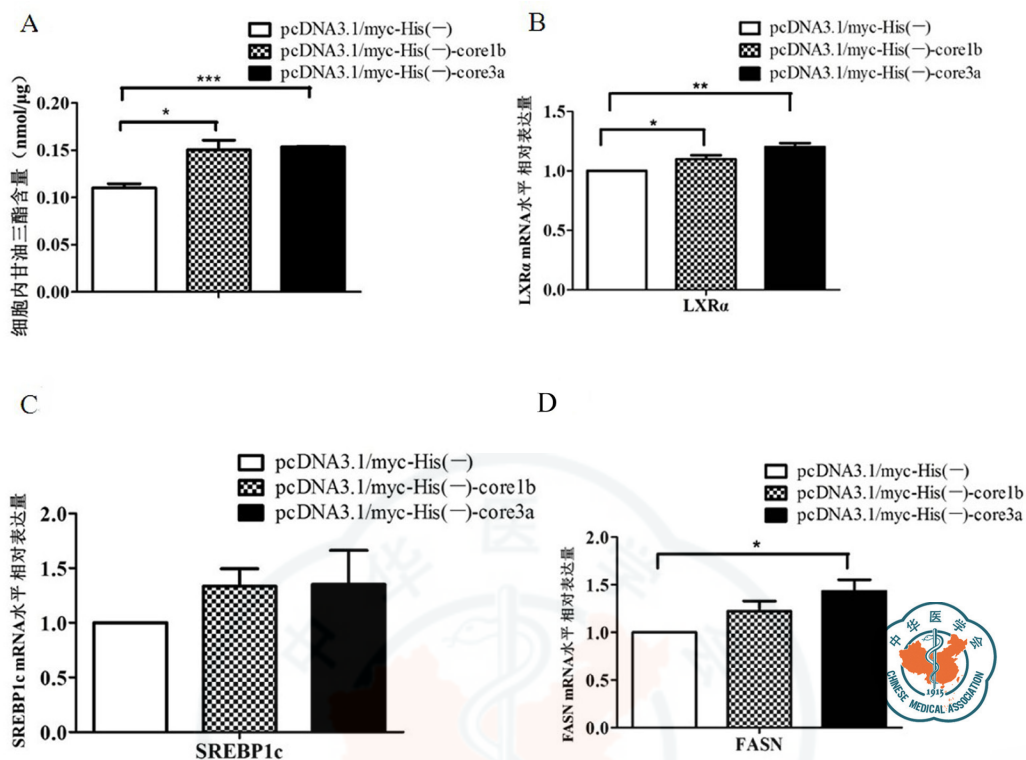
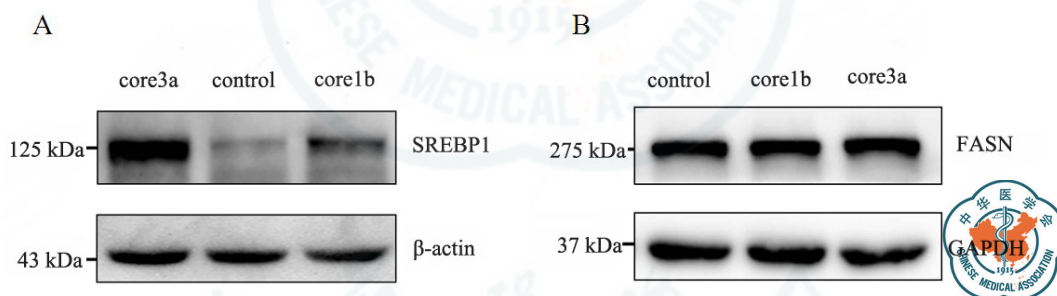


图2 HCV core 蛋白对甘油三酯和脂质代谢相关基因转录水平表达的影响



注: 转染 48 h 后, SREBP1 和 FASN 的 Western blot 分析结果可见: A: HCV core 可显著上调 SREBP1 的表达, 尤以 core3a 更明显; B: HCV core3a 可以上调 FASN 的表达, core1b 无显著性差异

图3 HCV core 蛋白对脂质代谢相关基因蛋白水平表达的影响

LXRα 大量表达在肝脏、肠、肾脏、脾脏和动物脂肪组织, 而 LXRβ 在这些器官则表达较低<sup>[11]</sup>。SREBPs, 全称为固醇调节元件结合蛋白, 属核转录因子家族, 在维持机体脂代谢稳态过程中发挥重要作用。SREBPs 有 3 种异构体 SREBP-1a、SREBP-1c 和 SREBP-2<sup>[12]</sup>, 在脂质代谢中具有重要的作用, 主要通过调控脂肪酸、甘油三酯和胆固醇的合成<sup>[13]</sup>。SREBP-1c 上游受 LXRα 的调控, SREBP-1c 启动子中含有 LXR 元件, LXRα 与之结合后激活 SREBP-1c 的转录。有研究发现 LXRα 的激动剂可以显著增加肝的 SREBP1c 的表达<sup>[14]</sup>。

SREBP-1c 下游靶基因包括脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, FASN), 低密度脂蛋白受体 (LDL receptor, LDLR), 乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC) 等<sup>[15-16]</sup>, 而 FASN 激活直接引起脂肪酸合成增加。

本研究发现, HCV core 可以不同程度增加 LXRα、SREBP1c 和 FASN 的 mRNA 水平或蛋白水平, 尤以 3a 基因型组更为显著。有文献汇总分析 1997 至 2004 年慢性丙型肝炎相关性脂肪肝的文献, 结果显示, 慢性丙型肝炎合并肝脂变的发生率达 55%, 其中 3a 型慢性丙型肝炎肝脂变的发生

生率更是高达 73%<sup>[17]</sup>, 与本研究结果一致。以上的文献回顾中证实, LXR $\alpha$  介导 SREBP1c 的转录, 而 SREBP1c 的激活促进 FASN 的生物学活性, 从而增加脂质合成。由此, 结合本研究结果, 可以推测感染 HCV 后 LXR $\alpha$  可介导 HCV 对 SREBP1c 和 FASN 的调控, 从而促进脂质的生成, 这种推测需要用基因敲除等手段进一步验证, 即是本课题组下一步的研究方向。

本研究主要阐述了 HCV core 通过 LXR $\alpha$  核受体介导脂质合成诱导肝细胞脂肪变的致病机理。开发改变 LXR $\alpha$  核受体活性的药物<sup>[18]</sup>, 有可能对控制 HCV 相关疾病进程具有重要的意义, LXR $\alpha$  核受体是潜在的重要的慢性丙型肝炎药物靶点, 需要进一步的深入研究。除此之外, 总结肝细胞内导致脂质积累有以下几个原因: ①脂质生成增加; ②脂质降解减少; ③脂蛋白分泌受损。本研究着重研究 HCV 诱导脂质生成增加的分子生物学机理, 可以对其他两个方面进行更深入的探讨, 完善 HCV 感染诱导脂肪变的分子机制。

#### 参考文献

- 1 成军. 丙型肝炎病毒感染临床表现的多样性[J]. 中华肝病杂志, 2004, 12(2): 103.
- 2 李莉, 成军, 李梵, 等. 慢性丙型肝炎病毒脂肪变的临床与病理学特点[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(9): 1009-1013.
- 3 张锦前, 范小玲. 慢性丙型肝炎与代谢综合征[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(36): 3482-3486.
- 4 Cha JY, Repa JJ. 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(1): 743-751.
- 5 Schultz JR, Tu H, Luk A, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis[J]. Genes Dev, 2000, 14(22): 2831-2838.
- 6 成军, 任进余, 李莉, 等. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(9): 1022-1026.
- 7 王琳, 李克, 成军, 等. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白A1结合的研究[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(9): 1018-1021.
- 8 沈静, 成军, 李朝品, 等. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白A I 相互作用的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2009, 29(8): 697-700.
- 9 凌伟, 温少芳, 高萍, 等. 慢性丙型肝炎合并脂肪肝患者血清网膜素水平与其病毒及代谢因素的相关分析[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2011, 5(16): 4632-4635.
- 10 Beltowski J. Liver X receptors (LXR) as therapeutic targets in dyslipidemia[J]. Cardiovasc Ther, 2008, 26(4): 297-316.
- 11 Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000, 16(0): 459-481.
- 12 Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acids synthesis in the liver[J]. J Clin Invest, 2002, 109(9): 1125-1131.
- 13 Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols[J]. Cell, 2006, 124(1): 35-46.
- 14 Wu J, Wang C, Li S, et al. Thyroid hormone-responsive SPOT 14 homolog promotes hepatic lipogenesis, and its expression is regulated by liver X receptor alpha through a sterol regulatory element-binding protein 1c-dependent mechanism in mice[J]. Hepatology, 2013, 58(2): 617-628.
- 15 Shimano H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes[J]. Prog Lipid Res, 2001, 40(6): 439-452.
- 16 Espenshade PJ. SREBPs: sterol-regulated transcription factors[J]. J Cell Sci, 2006, 119(Pt 6): 973-976.
- 17 Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, et al. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter[J]. Gut, 2006, 55(1): 123-130.
- 18 Pearce KH, Iannone MA, Simmons CA, et al. Discovery of novel nuclear receptor modulating ligands: an integral role for peptide interaction profiling[J]. Drug Discov Today, 2004, 9(17): 741-751.

(收稿日期: 2013-12-27)

(本文编辑: 孙荣华)

王晶晶, 刘顺爱, 张锦前, 等. HCV 核心蛋白通过 LXR  $\alpha$  核受体介导 HepG2 细胞甘油三酯合成增加 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8 (1): 7-11.