

# 慢性丙型肝炎合并脂肪肝患者Sirt1和固醇调节元件结合蛋白表达及意义

董金玲 谢志宏 何杰 张颖

**【摘要】目的** 探讨丙型肝炎病毒(HCV)感染合并不同程度的肝脏脂肪变患者Sirt1和SREBP表达及其临床意义。**方法** 收集2015年7月至2017年6月于湖州市第一人民医院肝病科就诊患者共140例,其中80例丙型肝炎患者(包括20例无脂肪肝的单纯丙型肝炎患者,20例丙型肝炎合并轻度脂肪肝患者,20例丙型肝炎合并中度脂肪肝患者及20例丙型肝炎合并重度脂肪肝患者);60例单纯脂肪肝患者(包括20例单纯轻度脂肪肝患者,20例单纯中度脂肪肝患者,20例单纯重度脂肪肝患者)。选择20例健康查体者为正常对照组。分别检测入组患者性别、年龄及HCV RNA水平(入组丙型肝炎患者抗体均为阳性),收集患者外周血样本,通过real-time PCR及Western blot检测Sirt1和SREBP表达水平。**结果** 与单纯丙型肝炎患者相比,丙型肝炎合并轻度脂肪肝患者Sirt1水平差异无统计学意义( $t = 0.344$ ,  $P = 0.732$ ),丙型肝炎合并中度、重度脂肪肝患者Sirt1水平下降:mRNA水平分别下调0.724倍( $t = 4.265$ ,  $P < 0.001$ )和0.540倍( $t = 2.489$ ,  $P = 0.013$ );蛋白水平分别下调0.69倍( $t = 4.857$ ,  $P < 0.001$ )和0.51倍( $t = 10.523$ ,  $P = 0.002$ ),差异均有统计学意义。与单纯丙型肝炎患者相比,丙型肝炎合并轻度、中度、重度脂肪肝患者SREBP-1c水平上升:mRNA水平分别上调1.132倍( $t = -3.924$ ,  $P < 0.001$ )、1.424倍( $t = -4.300$ ,  $P < 0.001$ )和1.663倍( $t = -3.758$ ,  $P = 0.001$ );蛋白水平分别上调1.49倍( $t = -9.323$ ,  $P < 0.001$ )、1.65倍( $t = -14.992$ ,  $P < 0.001$ )和1.79倍( $t = -15.847$ ,  $P < 0.001$ ),差异均有统计学意义。单纯丙型肝炎患者、丙型肝炎合并轻度、中度、重度脂肪肝患者间SREBP-2表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与单纯轻度脂肪肝患者比较,丙型肝炎合并轻度脂肪肝患者Sirt1表达水平差异无统计学意义( $t = 0.344$ ,  $P = 0.732$ )。与单纯中、重度脂肪肝患者相比,丙型肝炎合并中、重度脂肪肝患者Sirt1表达水平显著下降:mRNA水平分别下调0.682倍( $t = 2.987$ ,  $P = 0.010$ )和0.521倍( $t = 5.366$ ,  $P < 0.001$ );蛋白水平分别下调0.800倍( $t = 2.801$ ,  $P = 0.016$ )和0.635倍( $t = 7.891$ ,  $P < 0.001$ ),差异均有统计学意义。与单纯轻度、中度、重度脂肪肝患者相比,丙型肝炎合并轻度、中度、重度脂肪肝患者SREBP-1c表达水平显著升高:mRNA水平分别上调1.428倍( $t = -15.943$ ,  $P < 0.001$ )、1.592倍( $t = -9.135$ ,  $P = 0.004$ )和1.521倍( $t = -9.138$ ,  $P < 0.001$ );蛋白水平分别上调1.622倍( $t = -7.960$ ,  $P = 0.010$ )、1.749倍( $t = -2.196$ ,  $P = 0.012$ )和1.803倍( $t = -8.942$ ,  $P = 0.045$ ),差异均有统计学意义。**结论** 丙型肝炎病毒感染可通过抑制Sirt1及上调SREBP-1c表达而影响肝脏脂肪变。

**【关键词】** 丙型肝炎, 慢性; 脂肪肝; Sirt1; 固醇调节元件结合蛋白

**Expression and clinical significance of Sirt1 and sterol-regulatory element binding proteins in hepatitis C virus infected patients with fatty liver** Dong Jinling, Xie Zhihong, He Jie, Zhang Ying. Department of Infectious Diseases, The First People's Hospital Affiliated to Huzhou Normal Collage, Huzhou 313000, China  
Corresponding author: Zhang Ying, Email: zhang\_ying.dr@163.com

**【Abstract】Objective** To investigate the expression and clinical significance of Sirt1 and sterol-

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2018.06.011

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (No. 2015KYB382)

作者单位: 313000 湖州市, 浙江省湖州市第一人民医院感染科

通信作者: 张颖, Email: zhang\_ying.dr@163.com

regulatory element binding proteins (SREBP) in hepatitis C patients with different degrees of fatty liver.

**Methods** From July 2015 to June 2017, a total of 140 patients with hepatitis C were enrolled in the Department of Hepatology, the First People's Hospital of Huzhou City, including 80 patients with hepatitis C (20 patients with simple hepatitis C without fatty liver, 20 patients with HCV infected and mild fatty liver, 20 patients with HCV infected and moderate fatty liver and 20 patients with HCV infected and severe fatty liver). There were 60 cases of fatty liver without HCV infection (20 cases of mild fatty liver, 20 cases of moderate fatty liver and 20 cases of severe fatty liver). While 20 healthy people were selected as the normal control group. The sex, age and HCV RNA load (All the patients with hepatitis C were with positive anti-HCV) of the patients were detected, respectively. The peripheral blood samples were collected and the expression of Sirt1 and SREBP were detected by real-time PCR and Western blot. **Results** The levels of Sirt1 in patients with moderate and severe fatty liver were significantly lower than those in patients with hepatitis C: the levels of mRNA decreased by 0.724 times ( $t = 4.265$ ,  $P < 0.001$ ) and 0.540 times ( $t = 2.489$ ,  $P = 0.013$ ), respectively. The protein levels decreased by 0.69 times ( $t = 4.857$ ,  $P < 0.001$ ) and 0.51 times ( $t = 10.523$ ,  $P = 0.002$ ), respectively. There was no significant differences of Sirt1 expression between patients with mild fatty liver and HCV infected patients without mild fatty liver ( $t = 0.344$ ,  $P = 0.732$ ). The levels of SREBP-1c in HCV infected patients with mild, moderate and severe liver steatosis were higher than those in HCV infected patients without liver steatosis: the level of mRNA increased by 1.132 times ( $t = -3.924$ ,  $P < 0.001$ ), 1.424 times ( $t = -4.300$ ,  $P < 0.001$ ), and 1.663 times ( $t = -3.758$ ,  $P = 0.001$ ), respectively. Protein levels increased by 1.49 times ( $t = -9.323$ ,  $P < 0.001$ ) and 1.65 times ( $t = -14.992$ ,  $P < 0.001$ ) and 1.79 times ( $t = -15.847$ ,  $P < 0.001$ ), respectively, with significant differences. There was no significant difference in SREBP-2 expression among HCV infected patients with mild, moderate and severe liver steatosis and HCV infected patients without liver steatosis (all  $P > 0.05$ ). In moderate and severe liver steatosis patients, compared with those without HCV infection, the expression of Sirt1 in patients with HCV infection decreased significantly: the level of mRNA decreased by 0.682 times ( $t = 2.987$ ,  $P = 0.010$ ) and 0.521 times ( $t = 5.366$ ,  $P < 0.001$ ), respectively. The protein levels decreased by 0.800 times ( $t = 2.801$ ,  $P = 0.016$ ) and 0.635 times ( $t = 7.891$ ,  $P < 0.001$ ), respectively, with significant differences. There was no significant difference of Sirt1 expression between mild fatty liver patients with HCV infection and those without HCV infection ( $t = 0.344$ ,  $P = 0.732$ ). In patients with mild, moderate and severe fatty liver, the expression of SREBP-1c in patients with HCV infection was significantly higher than that in patients without HCV infection. The level of mRNA increased by 1.428 times ( $t = -15.943$ ,  $P < 0.001$ ), 1.592 times ( $t = -9.135$ ,  $P = 0.004$ ) and 1.521 times ( $t = -9.138$ ,  $P < 0.001$ ), respectively. Protein levels increased by 1.622 times ( $t = -7.960$ ,  $P = 0.010$ ), 1.749 times ( $t = -2.196$ ,  $P = 0.012$ ) and 1.803 times ( $t = -8.942$ ,  $P = 0.045$ ), respectively, all with significant differences. **Conclusion** Hepatitis C virus infection could affect fatty liver by inhibiting Sirt1 expression and upregulating SREBP-1c expression.

**【Key words】** Chronic hepatitis C; Fatty liver; Sirt1; Sterol-regulatory element binding proteins

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染在全球总发病率约为3%<sup>[1]</sup>。HCV感染者有80%为慢性丙型肝炎 (chronic hepatitis C, CHC) 患者, 其中20%~30%在10~20年进展为肝硬化<sup>[2]</sup>, 部分患者甚至会发生肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)<sup>[3]</sup>。肝脏脂肪变是慢性HCV感染常见的病理学表现, 已有研究提示HCV感染与脂质代谢异常存在非常强的相关性, HCV感染中

的脂代谢异常是丙型肝炎致病机制之一<sup>[4-5]</sup>。Sirt1是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD<sup>+</sup>) 依赖性Sirtuin去乙酰化家族中的一员<sup>[6]</sup>。研究发现Sirt1参与脂肪合成过程的调节<sup>[7]</sup>。而PPAR $\gamma$ , 这一调节脂肪合成的关键因子, 是Sirt1重要的作用底物<sup>[8]</sup>。研究表明, Sirt1能够抑制脂肪合成, 加速脂肪分解<sup>[9]</sup>。固醇调节元件结合蛋白 (Sterol-regulatory element binding proteins, SREBP) 在脂质合成和胆固醇代

谢调节中发挥非常重要的作用。SREBP-1c主要调控脂肪酸合成相关的基因,而SREBP-2特异性调控胆固醇合成相关基因,肝组织中以表达这两种亚型SREBP为主。诸多研究表明,Sirt1和SREBP在HCV相关肝脏脂肪变中发挥重要作用。本研究通过检测丙型肝炎合并肝脏脂肪变患者外周血Sirt1、SREBP-1c和SREBP-2的表达水平,探讨在不同程度肝脏脂肪变中Sirt1和SREBP的表达及其临床意义,报道如下。

## 资料与方法

### 一、研究对象

选取湖州市第一人民医院2016年至2017年收治的80例丙型肝炎患者为丙型肝炎组(包括20例无脂肪肝的单纯丙型肝炎患者,丙型肝炎合并轻度、中度和重度脂肪肝患者各20例)。另入组60例无HCV感染的脂肪肝患者为脂肪肝组(单纯轻度、中度和重度脂肪肝患者各20例)。20例体检健康者(无脂肪肝)作为正常对照组,入组患者均未经过抗病毒治疗,各组患者间性别和年龄差异无统计学意义( $P$ 均 $> 0.05$ ),具有可比性。

本研究征得所有研究对象知情同意,并取得本院伦理委员会的批准。

### 二、纳入标准与排除标准

1. 脂肪肝患者的诊断主要依据超声、肝组织活检结果并结合临床资料;临床诊断采用中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组颁布的《非酒精性脂肪性肝病诊疗指南》<sup>[10]</sup>相关诊断标准。对患者及正常健康体检者进行计算机断层扫描(CT)检查与复核。

2. 排除标准:排除甲型、乙型、丁型及戊型肝炎病毒感染,肝硬化、肝细胞癌患者,嗜酒以及应用免疫调节药物等患者;排除因饮食因素及过度肥胖所致脂肪肝;排除胆囊炎、糖尿病、代谢性疾病等可能影响脂代谢的疾病;排除药物性肝病、全胃肠外营养、肝豆状核变性等可导致脂肪肝的特定疾病。

3. 脂肪肝程度分级标准:①轻度肝脏脂肪变:肝组织活检镜下视野内30%~50%肝细胞发生脂肪变。超声表现为近场回声增强,远场回声衰减不明显,肝内管状结构仍可见。自觉症状不明显,

肝功能基本正常。②中度肝脏脂肪变:肝组织活检镜下视野内50%~75%肝细胞发生脂肪变。超声表现为前场回声增强,后场回声衰减,肝内管状结构模糊。自觉肝区不适,食欲不振,肝功能轻度异常。③重度肝脏脂肪变:肝组织活检镜下视野内75%以上肝细胞发生脂肪变。超声表现为近场回声显著增强,远场回声明显衰减,肝内管状结构无法辨认。自觉肝区疼痛,腹胀闷满,或见黄疸,蜘蛛痣。肝功能检查中度或重度异常。

### 三、主要材料及试剂

实时荧光定量PCR试剂Power SYBR GREEN PCR Master Mix购自Life Technologies公司,小鼠抗人SREBP-1(2A4)单克隆抗体:ab3259, Abcam公司产品;兔抗人Sirt1(H-300)多克隆抗体:sc-15404, Santa公司产品;小鼠抗人SREBP-2多克隆抗体:ab30682, Abcam公司产品;兔抗人HMGCR多克隆抗体:AP6577c, Abgent公司产品;小鼠抗人 $\beta$ -actin(C4)单克隆抗体:sc-47778, Santa公司产品。

### 四、qRT-PCR

Sirt1、SREBP-1c、SREBP-2和 $\beta$ -actin引物由上海生工生物技术有限公司合成,具体序列见表1。应用TaKaRa的GeneBall Genome Preparation Kit提取外周血基因组DNA,qRT-PCR反应体系25  $\mu$ l,设置对照和内参,于ABI 7500荧光定量PCR扩增仪进行反应,扩增条件为95  $^{\circ}$ C、10 min,95  $^{\circ}$ C、15 s,60  $^{\circ}$ C、1min,40个循环。

### 五、Western blot

提取外周血总蛋白,测浓度后加入电泳上样缓冲液,取80  $\mu$ g电泳。分离胶12%,浓缩胶5%,胶厚1.5 mm。电泳条件:在浓缩胶中以90 V电压电泳,分离胶中以120 V电压电泳。湿转,32 W、15 min。牛奶封闭后加入二抗,4  $^{\circ}$ C封闭过夜,洗膜,孵育二抗,显影。

### 六、统计学处理

采用SPSS 17.0软件统计分析,患者年龄及基因表达量为计量资料且呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,患者性别为计数资料以率(%)表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验。研究中所涉及相关基因表达水平为计量资料且呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用配对资料 $t$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、患者一般资料

各组患者性别、年龄分布及身体质量指数 (body mass index, BMI) 差异均无统计学意义 ( $P$ 均  $> 0.05$ ), 具有可比性。丙型肝炎患者抗-HCV均为阳性, HCV RNA水平为  $3.69 \times 10^3 \sim 8.74 \times 10^6$  拷贝/ml, 各组间HCV RNA水平差异无统计学意义 ( $P$ 均  $> 0.05$ ), 具有可比性 (表2)。

### 二、Sirt1与SREBP在丙型肝炎合并不同程度脂肪肝患者中表达水平

为明确丙型肝炎患者体内Sirt1与SREBP是否参与肝脏脂肪代谢过程, 选择健康体检者作为空白对照, 与单纯丙型肝炎患者, 丙型肝炎合并轻、中、重度脂肪肝患者Sirt1、SREBP-1c和SREBP-2水平进行比较, 分别通过实时荧光定量PCR和Western blot进行分析。结果显示, 健康体检者Sirt1水平较单纯丙型肝炎患者升高 (mRNA水平上调1.21倍,

蛋白水平上调1.30倍), 丙型肝炎合并轻度、中度、重度脂肪肝组患者Sirt1水平较单纯丙型肝炎患者下降 (mRNA水平分别下调0.989倍、0.724倍和0.540倍, 蛋白水平分别下调0.75倍、0.69倍和0.51倍 (图1A)); 健康体检者SREBP-1c水平较单纯丙型肝炎患者下降 (mRNA水平下调0.797倍, 蛋白水平下调0.39倍), 丙型肝炎合并轻度、中度、重度脂肪肝组患者SREBP-1c水平较单纯丙型肝炎患者上升, 且随着脂肪肝程度加重, SREBP-1c表达逐渐增多 (mRNA水平分别上调1.132倍、1.424倍和1.663倍, 蛋白水平分别上调1.49倍、1.65倍及1.79倍) (图1B)。与单纯丙型肝炎组相比, 各组SREBP-2 mRNA水平差异无统计学意义, 且各组患者间SREBP-2蛋白表达量无显著变化 ( $P > 0.05$ ) (图1C); 与RT-PCR结果一致, 见表3~4。

### 三、Sirt1及SREBP-1c在单纯脂肪肝及丙型肝炎合并脂肪肝患者中表达水平

为研究丙型肝炎患者肝脏脂肪变过程中Sirt1及

表1 qRT-PCR 引物序列

检测基因	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
Sirt1	GCCAGAGTCCAAGTTTAGAAGA	CCATCAGTCCCAAATCCAG
SREBP-2	CCCTTCAGTGCAACGGTCATTAC	TGCCATTGGCCGTTTGTGTC
SREBP-1c	GGAGGGGTAGGGCCAACGGCCT	CATGTCTTCGAAAGTGCAATCC
$\beta$ -actin	CAGGGCGTGATGGTGGGCA	CAAACATCATCTGGGTCTCTCTC

表2 入组健康体检者和肝病患者的一般资料

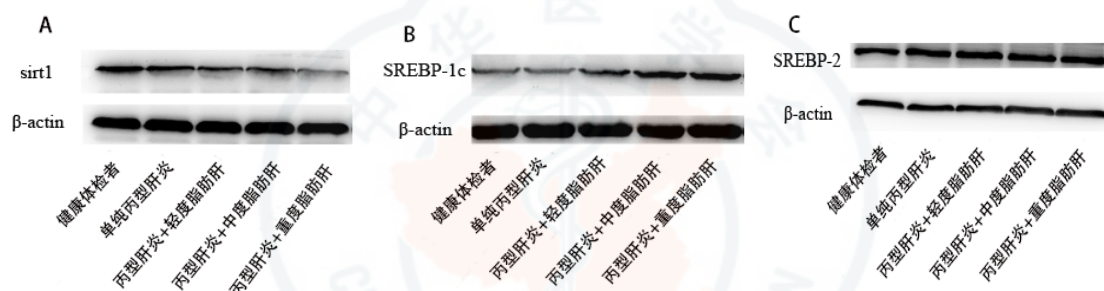
组别	男/女 (例)	年龄 ( $\bar{x} \pm s$ , 岁)	BMI ( $\bar{x} \pm s$ )	HCV RNA ( $\bar{x} \pm s$ , $\times 10^5$ 拷贝/ml)
健康体检者	8/12	41.56 $\pm$ 8.52	21.85 $\pm$ 1.70	—
丙型肝炎组				
单纯丙型肝炎组	9/11	49.22 $\pm$ 8.36	22.02 $\pm$ 2.07	11.75 $\pm$ 25.17
丙型肝炎 + 轻度脂肪肝组	8/12	43.59 $\pm$ 7.64	22.19 $\pm$ 2.21	8.63 $\pm$ 21.27
丙型肝炎 + 中度脂肪肝组	11/9	45.46 $\pm$ 8.79	22.95 $\pm$ 2.87	8.77 $\pm$ 15.10
丙型肝炎 + 重度脂肪肝组	8/12	48.52 $\pm$ 7.34	23.01 $\pm$ 3.18	9.13 $\pm$ 14.63
单纯脂肪肝组				
单纯轻度脂肪肝组	9/11	41.52 $\pm$ 6.64	22.38 $\pm$ 3.96	—
单纯中度脂肪肝组	11/9	43.86 $\pm$ 7.88	21.87 $\pm$ 2.53	—
单纯重度脂肪肝组	9/11	45.59 $\pm$ 8.64	22.95 $\pm$ 3.68	—
统计量	$\chi^2 = 0.109$	$F = 0.124$	$F = 0.115$	$F = 0.114$
P值	0.890	0.935	0.991	0.952

注: “—”: 无相关数据



SREBP-1c表达水平变化是否与HCV感染相关,即HCV是否能够影响Sirt1及SREBP-1c表达,进而影响脂肪肝的进展。将不同程度单纯肝脏脂肪肝患者作为对照组,丙型肝炎合并不同程度肝脏脂肪肝患者作为试验组,通过实时荧光定量PCR和Western blot检测Sirt1及SREBP-1c表达差异。结果表明,与单纯轻度脂肪肝患者相比,丙型肝炎合并轻度脂肪肝患者Sirt1表达下降,但差异无统计学意义[mRNA水平下调0.856倍( $t = 1.005$ 、 $P = 0.076$ )],蛋白水平下调0.890倍( $t = 0.879$ 、 $P = 0.093$ )。与单纯中、重度脂肪肝患者相比,丙型肝炎合并中、

重度脂肪肝患者 Sirt1表达水平显著下降,差异有统计学意义[mRNA水平分别下调0.682倍( $t = 2.987$ 、 $P = 0.010$ )和0.521倍( $t = 5.366$ 、 $P < 0.001$ )],蛋白水平分别下调0.800倍( $t = 2.801$ 、 $P = 0.016$ )和0.635倍( $t = 7.891$ 、 $P < 0.001$ )。与单纯轻度、中度、重度脂肪肝患者分别比较,丙型肝炎合并轻、中、重度脂肪肝患者的SREBP-1c表达水平均显著升高,差异有统计学意义(mRNA水平分别上调1.428倍、1.592倍和1.521倍,蛋白水平分别上调1.622倍、1.749和1.803倍, $P$ 均 $< 0.05$ ),见表5~6和图2。



注: A: sirt1在各组表达; B: SREBP-1c在各组表达; C: SREBP-2在各组表达

图1 丙型肝炎合并不同程度脂肪肝患者与单纯丙型肝炎患者Sirt1、SREBP-1c及SREBP-2蛋白表达

表3 健康体检者、单纯丙型肝炎、丙型肝炎合并不同程度脂肪肝患者 Sirt1 和 SREBP mRNA 水平

组别	Sirt1	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	SREBP-1c	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	SREBP-2	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
健康体检者	1.21	-3.214	0.003	0.797	2.751	0.013	1.013	1.239	0.059
单纯丙型肝炎	1	—	—	1	—	—	1	—	—
丙型肝炎 + 轻度脂肪肝	0.989	0.344	0.732	1.132	-3.924	< 0.001	1.098	-0.985	0.146
丙型肝炎 + 中度脂肪肝	0.724	4.265	< 0.001	1.424	-4.300	< 0.001	1.050	-0.578	0.502
丙型肝炎 + 重度脂肪肝	0.540	2.489	0.013	1.663	-3.758	0.001	1.114	-1.016	0.073

注: 单纯丙型肝炎患者 mRNA 水平设为 1, 各组数据均与单纯丙型肝炎患者比较; “—”: 无相关数据

表4 健康体检者、单纯丙型肝炎、丙型肝炎合并不同程度脂肪肝患者 Sirt1 和 SREBP 表达

分组	Sirt1	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	SREBP-1c	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	SREBP-2	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
健康体检者	1.30	-22.206	< 0.001	0.39	8.107	< 0.001	0.975	1.001	0.062
单纯丙型肝炎	1	—	—	1	—	—	1	—	—
丙型肝炎 + 轻度脂肪肝	0.75	0.124	0.213	1.49	-9.323	< 0.001	1.156	-0.099	0.268
丙型肝炎 + 中度脂肪肝	0.69	4.857	< 0.001	1.65	-14.992	< 0.001	1.013	-0.003	0.499
丙型肝炎 + 重度脂肪肝	0.51	10.523	0.002	1.79	-15.847	< 0.001	1.324	-0.675	0.101

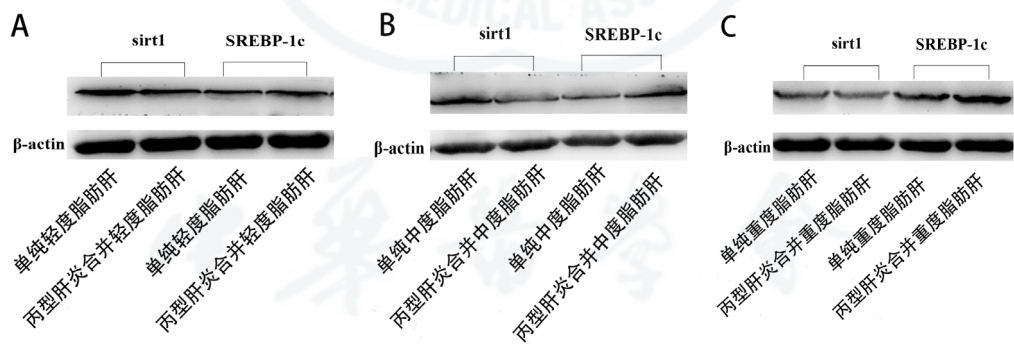
注: 单纯丙型肝炎患者蛋白水平设为 1, 各组数据均与单纯丙型肝炎患者比较; “—”: 无相关数据

表 5 Sirt1 及 SREBP-1c 在单纯脂肪肝及丙型肝炎合并脂肪肝患者中 mRNA 水平

组别	Sirt1	t值	P值	SREBP-1c	t值	P值
轻度脂肪肝		1.005	0.076		-15.943	< 0.001
单纯轻度脂肪肝	1			1		
丙型肝炎 + 轻度脂肪肝	0.856			1.428		
中度脂肪肝		2.987	0.010		-9.135	0.004
单纯中度脂肪肝	1			1		
丙型肝炎 + 中度脂肪肝	0.682			1.592		
重度脂肪肝		5.366	< 0.001		-9.138	< 0.001
单纯重度脂肪肝	1			1		
丙型肝炎 + 重度脂肪肝	0.521			1.521		

表 6 Sirt1 及 SREBP-1c 在单纯脂肪肝及丙型肝炎合并脂肪肝患者中蛋白表达

组别	Sirt1	t值	P值	SREBP-1c	t值	P值
轻度脂肪肝		0.879	0.093		-7.960	0.010
单纯轻度脂肪肝	1			1		
丙型肝炎 + 轻度脂肪肝	0.890			1.622		
中度脂肪肝		2.801	0.016		-2.196	0.012
单纯中度脂肪肝	1			1		
丙型肝炎 + 中度脂肪肝	0.800			1.749		
重度脂肪肝		7.891	< 0.001		-8.942	0.045
单纯重度脂肪肝	1			1		
丙型肝炎 + 重度脂肪肝	0.635			1.803		



注：A：轻度脂肪肝；B：中度脂肪肝；C：重度脂肪肝

图2 Sirt1及SREBP-1c在单纯脂肪肝及丙型肝炎合并脂肪肝患者中蛋白表达水平

讨 论

HCV感染在全球总发病率约为3%，肝脏脂肪变是慢性HCV感染常见的病理学表现<sup>[11]</sup>，流行病学研究显示，慢性丙型肝炎患者脂肪肝发病率为40%~80%（平均为50%）。越来越多的证据显示HCV感染本身为发生脂肪肝的独立预测因子。慢性丙型肝炎患者的血清脂谱大多出现异常，易出现

低胆固醇血症或血清载脂蛋白水平异常<sup>[12-14]</sup>。慢性丙型肝炎患者存在血清载脂蛋白B（apolipoprotein B，Apo B）水平降低<sup>[15-17]</sup>，而经抗病毒治疗获得持续性病毒性应答的患者其血清Apo B水平又恢复正常，伴有脂肪肝的慢性丙型肝炎患者进展为肝纤维化的速度更快<sup>[18]</sup>，这些均提示HCV感染与脂质代谢异常存在非常显著的相关性，HCV感染中的脂代谢异常是丙型肝炎致病机制之一<sup>[19]</sup>。

固醇调节元件结合蛋白(SREBP)在脂质合成和胆固醇代谢的调节中起着非常重要的作用。SREBPs属于碱性螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链转录因子家族,是脂肪酸合成最主要的调控因子。SREBP-1c主要调控脂肪酸合成途径相关的基因,而SREBP-2特异性地调控胆固醇合成相关的基因,肝组织中以表达这两种亚型的SREBP为主。非酒精性脂肪性肝病患者肝组织SREBP-1c的表达量显著升高,为对照组的5倍<sup>[20]</sup>。Horton等<sup>[21]</sup>证明SREBP-1c在细胞核内可以激活所有脂质生成相关的基因,转基因小鼠肝脏过表达SREBP-1c可以增加脂质合成而导致脂肪肝的发生。Sandip等<sup>[22]</sup>研究发现,Hu7.5细胞系HCV核心蛋白能够上调SREBP-1c及其下游基因FASN的表达。另外有研究表明,HCV核心蛋白可能通过调控SREBP-2进而影响HMGCR表达<sup>[23]</sup>。Sirt1是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD<sup>+</sup>)依赖性Sirtuin去乙酰化家族中的一员。研究发现Sirt1参与脂肪合成过程的调节<sup>[24]</sup>。禁食条件下,脂肪组织中Sirt1表达升高<sup>[25]</sup>,其通过与核受体共抑制因子和维甲酸/甲状腺素沉默调节子相互作用,抑制PPAR $\gamma$ 表达,进而下调脂肪酸结合蛋白的表达,这表明Sirt1能够抑制脂肪生成,加速脂肪分解。近年有研究发现HCV核心蛋白可能通过HOTAIR-sirt1信号通路影响肝内糖脂代谢<sup>[26]</sup>。既往研究表明SREBP与Sirt1参与肝脏脂肪代谢过程,但在HCV感染所致脂肪肝患者体内表达变化研究仍较少,因此本课题重点探讨在丙型肝炎合并不同程度脂肪肝患者体内SREBP及Sirt1表达有无差异及其临床意义。

本研究收集健康体检者、单纯丙型肝炎患者、单纯脂肪肝患者、丙型肝炎合并轻度、中度及重度脂肪肝患者的外周血,提取总RNA和总蛋白,通过real-time PCR及Western blot研究Sirt1、SREBP-1c和SREBP-2的表达水平,结果表明丙型肝炎患者Sirt1表达水平较健康人降低,而SREBP-1c水平较健康人增高。而随着丙型肝炎患者脂肪肝程度增加,Sirt1表达水平逐渐下降,SREBP-1c表达水平逐渐升高。提示Sirt1与SREBP-1c参与丙型肝炎患者肝脏脂肪代谢,进一步研究显示,与相应单纯脂肪肝(轻度、中度及重度)患者比较,丙型肝炎合并脂肪肝患者的Sirt1表达水平下降,SREBP-1c表达水平显著升高,综合分析表明,在

丙型肝炎患者病情进展过程中,HCV诱导肝脏脂肪变也逐渐加重,在此过程中,Sirt1表达水平逐渐下降,SREBP-1c表达水平显著升高这表明HCV能够下调Sirt1表达,同时上调SREBP-1c的表达,进而影响脂肪肝进展。如可阻断HCV对Sirt1及SREBP-1c的调控,可以有效阻止HCV感染致肝脏脂肪变的进程。

HCV相关性肝脏脂肪变过程中,HCV蛋白与宿主基因相互作用的分子机制尚未明确,深入明确脂质合成相关基因与HCV的相互作用,阐明HCV与脂质/胆固醇代谢途径的关系,可以为HCV相关性肝脏脂肪变的研究提供分子基础,有助于发现潜在的治疗靶点,研发新的治疗药物,减少脂肪肝的发生。

## 参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Hepatitis C global surveillance update[J]. Wkly Epidemiol Rec,2000,75(1):17-28.
- [2] Friedman SL. Liver fibrosis-from bench to bedside[J]. J Hepatol,2003,38(Suppl 1):S38-S53.
- [3] Hwang SJ. Hepatitis C virus infection: an overview[J]. J Microbiol Immunol Infect,2001,34(4):227-234.
- [4] Hiramitsu M, Shimada Y, Kuroyanagi J, et al. Eriocitrin ameliorates diet-induced hepatic steatosis with activation of mitochondrial biogenesis[J]. Sci Rep,2014,4:3708.
- [5] Khan M, Jahan S, Khaliq S, et al. Interaction of the hepatitis C virus (HCV) core with cellular genes in the development of HCV-induced steatosis[J]. Arch Virol,2010,155(11):1735-1753.
- [6] Higashida K, Kim SH, Jung SR, et al. Effects of resveratrol and SIRT1 on PGC-1 $\alpha$  activity and mitochondrial biogenesis: a reevaluation[J]. PLoS Biol,2013,11(1):e1001603.
- [7] Rickenbacher A, Jang JH, Limani P, et al. Fasting protects liver from ischemic injury through Sirt1-mediated downregulation of circulating HMGB1 in mice[J]. J Hepatol,2014,61(2):301-308.
- [8] Picand F, Kurtev M, Chung N, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR $\gamma$ [J]. Nature,2004,429(6993):771-776.
- [9] Kerstten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease[J]. Nature,2000,405(6785):421-424.
- [10] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[J]. 中华内科杂志,2010,49(3):275-278.
- [11] Scheuer PJ, Ashrafzadeh P, Sherlock S, et al. The pathology of hepatitis C[J]. Hepatology,2010,15(4):567-571.
- [12] Moriya K, Shintani Y, Fujie H, et al. Serum lipid profile of patients with genotype 1b hepatitis C viral infection in Japan[J]. Hepatol Res,2003,25(4):369-374.
- [13] Naeem M, Bacon BR, Mistry B, et al. Changes in serum lipoprotein profile during interferon therapy in chronic hepatitis C[J]. Am J Gastroenterol,2001,96(8):2468-2472.

- [14] Wang L, Jia XJ, Jiang HJ, et al. MicroRNAs 185, 96, and 223 repress selective highdensity lipoprotein cholesterol uptake through posttranscriptional inhibition[J]. *Mol Cell Biol*,2013,33(10):19561964.
- [15] Yang M, Liu W, Pellicane C, et al. Identification of miR185 as a regulator of de novo cholesterol biosynthesis and low density lipoprotein uptake[J]. *Lipid Res*,2014,55(2):226-238.
- [16] 中华中医药学会脾胃病分会. 非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. *临床肝胆病杂志*,2017,33(12):2270-2274.
- [17] Woodhouse SD, Narayan R, Latham S, et al. Transcriptome sequencing, microarray, and proteomic analyses reveal cellular and metabolic impact of hepatitis C virus infection in vitro[J]. *Hepatology*,2010,52(2):443453.
- [18] Lonardo A, Adinoli LE, Loria P, et al. Steatosis and hepatitis C virus: mechanisms and significance for hepatic and extrahepatic disease[J]. *Gastroenterology*,2004,126(1):586-597.
- [19] Fujino T, Nakamuta M, Yada R, et al. Expression of lipid metabolism-associated genes in hepatitis C virus-infected human liver[J]. *Hepatol Res*,2010,40(3):923929.
- [20] Kohjima M, Higuchi N, Kato M, et al. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Int J Mol Med*,2008,21(4):507-511.
- [21] Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver[J]. *J Clin Invest*,2002,109:1125-1131.
- [22] Sandip KB, Hangeun K, Keith M, et al. Forkhead box transcription factor regulation and lipid accumulation by hepatitis C virus[J]. *J Virol*,2014,88(8):4195-4203.
- [23] Li M, Wang Q, Liu SA, et al. MicroRNA-185-5p mediates regulation of SREBP2 expression by hepatitis C virus core protein[J]. *World J Gastroenterol*,2015,21(15):4517-4525.
- [24] Moore KJ, Rayner KJ, Suárez Y, et al. microRNAs and cholesterol metabolism[J]. *Trends Endocrinol Metab*,2010,21(12):699-706.
- [25] Kerstten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease[J]. *Nature*,2000,405(6785):421-424.
- [26] Li ZQ, Gu XY, Hu JX, et al. Hepatitis C virus core protein impairs metabolic disorder of liver cell via HOTAIR-Sirt1 signaling[J]. *Biosci Rep*,2016,36(3):e00336.

(收稿日期: 2018-04-01)

(本文编辑: 孙荣华)

董金玲, 谢志宏, 何杰, 等. 慢性丙型肝炎合并脂肪肝患者Sirt1和固醇调节元件结合蛋白表达及意义[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2018,12(6):577-584.