论著

文章编号:1000-5404(2012)03-0196-05

乙肝病毒X蛋白对油酸钠诱导HepG2细胞脂质沉积的影响

陈 娟,沈 薇 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院消化内科)

[摘要] **目的** 探讨乙肝病毒X蛋白(hepatitis B virus X protein,HBx)是否增加油酸钠诱导HepG2细胞的脂质沉积。**方法** 将质粒pIRES2-eGFP-HBx瞬时转染入HepG2细胞中,建立表达HBx的细胞模型(HepG2-HBx);以转染空载体pIRES2-eGFP(HepG2-pIRES2)和HepG2细胞(HepG2)作对照。观察转染后绿色荧光蛋白(GFP)的表达;转染后16 h开始用油酸钠处理各组细胞24、48 h(分别命名为HBx/OA组、空/OA组、G2/OA组),细胞内甘油三酯(TG)含量测定及油红O染色了解细胞内脂质沉积情况;在油酸钠处理细胞24 h,RT-PCR法检测SREBP-1和LXRα的mRNA表达水平,Western blot检测HBx、LXRα及FAS蛋白表达水平。**结果** 转染后16 h HepG2-HBx细胞和HepG2- pIRES2细胞中开始有GFP的表达,提示转染成功;仅在HepG2-HBx细胞内有HBx表达,表明HepG2-HBx细胞模型构建成功。在相同油酸钠处理的条件下,HBx/OA组细胞内脂质含量和TG含量与对照组相比均明显增加($P<0.01$)。在油酸钠处理细胞24 h,HBx/OA组细胞内LXRα、SREBP-1的mRNA表达量和LXRα、FAS蛋白表达量较对照组均明显增加($P<0.01/0.05$)。**结论** HBx通过上调HBx-LXRα-SREBP1/FAS通路脂质合成相关基因表达,可能增加HepG2-HBx细胞对外界脂代谢紊乱因素的易感性,从而增加油酸钠诱导HepG2细胞脂质沉积。

[关键词] 乙型肝炎病毒X蛋白;肝细胞脂肪变性;转染;油酸钠;HepG2
[中图法分类号] R392.25;R512.6;R575.2 [文献标志码] A

Effect of hepatitis B virus X protein on sodium oleate-induced lipid accumulation in HepG2 cells

Chen Juan, Shen Wei (Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate whether hepatitis B virus X protein (HBx) increases sodium oleate-induced lipid accumulation in HepG2 cells. **Methods** HBX gene eukaryotic expression vector pIRES2-EGFP-HBx was transiently transfected into HepG2 cells to establish HepG2-HBx cell model for HBx expression. HepG2 cells transfected with empty vector pIRES2-EGFP (HepG2-pIRES2) and untransfected HepG2 cells (HepG2) were used as controls. Expression of green fluorescent protein (GFP) was observed by fluorescence microscope after transfection. At 16 h after transfection, each group of cells was treated with sodium oleate for 24 and 48 h (HBx/OA group, empty/OA group and G2/OA group, respectively). Lipid accumulation in each group of cells was observed by triglyceride (TG) content detection and oil red O staining. At 24 h after sodium oleate treatment, RT-PCR and Western blot were applied to measure mRNA levels of sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) and liver X receptor alpha (LXRα) and protein levels of HBx, LXRα and fatty acid synthase (FAS), respectively. **Results** At 16 h after transfection, GFP expression was detected in HepG2-HBx and HepG2-pIRES2 cells, while HBx expression was only detected in HepG2-HBx cells. These suggested that HepG2-HBx cell model for HBx expression was successfully obtained. Compared with those of the control groups, TG and lipid contents were significantly increased in HBx/OA group ($P<0.01$) after the cells treated with sodium oleate. At 24 h after sodium oleate treatment, mRNA levels of LXRα and SREBP-1 as well as protein levels of LXRα and FAS in the HBx/OA group were significantly higher than those in the control groups ($P<0.01/0.05$). **Conclusion** HBx increases the susceptibility of HepG2-HBx cells to factors causing lipid metabolism disorder through up-regulating expressions of lipid synthesis-related

[基金项目] 国家自然科学基金(30871160)
[通信作者] 沈 薇,电话:(023)63693353,E-mail:shenwei315@126.com

genes of HBx-LXRα-SREBP-1/FAS pathway, thereby increasing sodium oleate-induced lipid accumulation in HepG2 cells.

[**Key words**] hepatitis B virus X protein; hepatocyte fatty degeneration; transfection; sodium oleate; HepG2

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30871160). Corresponding author: Shen Wei, Tel: 86-23-63693353, E-mail: shenwei315@126.com

脂肪肝是由各种原因引起的肝细胞内脂质沉积过多的病变。脂肪肝的病因很复杂,往往是遗传、环境、饮食、不良生活方式及病毒感染等多种因素综合作用的结果。随着人民生活水平的不断提高,国民生活习惯和膳食结构发生了很大变化,膳食中高脂饮食所占比例呈上升趋势,同时脂肪肝的发生率也逐年上升。HBV感染及其导致的各类疾病是我国面临的严重公共卫生问题之一[1]。在慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B,CHB)患者中,肝脂肪变比普通人更常见[2]。所以,研究HBV、高脂环境与肝脂肪变性的关系具有重要意义。我们前期研究发现,瞬时表达乙肝病毒x蛋白(hepatitis B virus x protein,HBx)的HepG2-HBx细胞模型中HBx表达可上调脂质代谢相关基因的转录和表达,但没有引起细胞内TG合成的显著增加。文献[3]报道油酸钠可模拟高脂环境引起肝细胞内脂质的沉积。因此,本实验在HepG2-HBx细胞模型基础上给予油酸钠处理,观察HepG2-HBx细胞与HepG2细胞之间脂质沉积是否存在差异,从而探讨HBx是否增加油酸钠诱导HepG2细胞的脂质沉积。

1 材料与方法

1.1 材料

pIRES2-eGFP-HBx质粒和pIRES2-eGFP空载体由重庆医科大学管理学院冯涛教授惠赠,HepG2细胞(重庆医科大学附属第二医院消化实验室保存)。胎牛血清(杭州四季青公司),高糖DMEM培养基(hyclone公司),转染试剂PolyJet™(signaGen, SL100688),TG检测试剂盒(长春汇力生物技术有限公司),BCA法蛋白定量试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司),全蛋白试剂提取试剂盒(南京凯基生物),总RNA提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司),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LXRα单克隆抗体(Abcam公司,ab41902),β-actin1,SREBP-1引物(大连宝生物工程有限公司合成),LXRα,β-actin2引物(上海生工生物有限公司合成)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2细胞和转染后的HepG2细胞均用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养,置入37 ℃含5% CO_2饱和湿度的培养箱培养,细胞贴壁85% ~90%融合时,用0.25%胰蛋白酶消化传代。实验选用对数生长期的细胞。

1.2.2 实验分组 实验设立HepG2-HBx组(转染pIRES2-eGFP-HBx质粒的HepG2细胞);HepG2-pIRES2组(转染空载体pIRES2-eGFP的HepG2细胞);HepG2组(未转染的HepG2细胞)。以上各组均给予相同浓度(40 μg/ml)油酸钠处理,分别命名为HBx/OA组、空/OA组、G2/OA组。空/OA组、G2/OA组为对照组。

1.2.3 质粒转染HepG2细胞 用转染试剂PolyJetT™分别将pIRES2-eGFP-HBx和pIRES2-eGFP质粒转染入HepG2细胞中,具体操作如下:在转染前18 ~24 h内,取对数生长期的HepG2细胞,按5×10^5/ml的浓度接种于6孔板中,待单层细胞融合率达到80%左右进行转染,在转染前30 ~60 min换含血清和抗生素的完全培养液1 ml/孔。按每个孔,3 μl PolyJet试剂和1 μg质粒分别溶于50 μl无血清无抗生素的高糖DMEM培养基中稀释,然后将稀释的PolyJet™试剂加入稀释的质粒中,将二者混匀,置室温下15 min后,加二者混合液于每孔细胞培养液中,混匀后放入培养箱,12 ~18 h后更换含血清和抗生素的培养基1 ~2 ml,之后继续常规培养细胞。

1.2.4 油酸钠处理各组细胞 在转染后16 h各组均更换含油酸钠终浓度为40 μg/ml的培养基2 ml/孔[4],之后按此方法每24小时更换1次培养基。我们前期研究发现,在转染后24、48、72 h,HepG2细胞内HBx表达随时间的延长而逐渐增加,因此,我们选择油酸钠处理时间点为24、48 h(即转染后40、64 h),观察各组细胞内脂质沉积情况。

1.2.5 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)的表达 在转染后分别观察HepG2-HBx组、HepG2-pIRES2组、HepG2组细胞内GFP的表达。

1.2.6 细胞内TG含量测定 HepG2细胞以5×10^5/ml的浓度接种于6孔培养板,按实验分组及时间段,每4孔为1个样本,以步骤1.2.3进行转染,转染后16 h用油酸钠处理,分别于油酸钠处理24、48 h收集各组细胞,按试剂盒说明进行操作,并用BCA蛋白定量法进行蛋白定量,计算每毫克蛋白所对应的TG含量。

1.2.7 细胞内脂滴含量的检测 预先将18 mm×18 mm大小的盖玻片放置于6孔培养板内,再将HepG2细胞以5×10^5/ml的浓度接种,按实验分组及时间段,每4孔为1个样本,以步骤1.2.3进行转染,转染后16 h用油酸钠处理,分别于油酸钠处理24、48 h收集各组细胞,用PBS漂洗,4%多聚甲醛固定,油红O染色,60%异丙醇脱底色,苏木精细胞核复染,水封片,细胞内中性脂肪可被染成红色或橘红色。显微镜下观察各组细胞内脂滴情况并采集图片。油红O染色图片采用ImagePro plus 6.0图像分析软件分析,每组随机选取4个具有代表性的高倍视野,计算脂滴表达的红色IOD(积分光密度值)值,并进行比较。

1.2.8 半定量RT-PCR法检测LXRα及SREBP1的mRNA表达 用试剂盒于转染后油酸钠处理24 h后提取HBx/OA组、空/OA组、G2/OA组细胞内总RNA,RT-PCR法逆转录为

cDNA。取2 μl的cDNA,用特异的基因引物作PCR扩增。SREBP-1上游引物:5′-CCAGAAACTCAAGCAGGAG AC-3′,下游引物:5′-CTTGCTGTCCTCAAAGACTGG-3′,扩增长度:274 bp;β-actin1上游引物:5′-GACCCAGATCATGTTTGAGACC-3′,下游引物:5′-ATCTCCTTCTGCATCCTGTCG-3′,扩增长度:625 bp。SREBP-1和β-actin1的PCR反应条件为:94 ℃预变性2 min,94 ℃变性30 s,53 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,共35个循环,72℃延伸2 min。LXRα上游引物:5′-GGAACAACT-GGGCAT ATCG-3′,下游引物:5′-ATAGCAATGAGCAAGG AAACT-3′,扩增长度:472 bp;β-actin2上游引物:5′-AGC-CTCGCCTTTGCCGA-3′,下游引物:5′-CTGG GCCTGGGCG-3′,扩增长度:175 bp。LXRα与β-actin2的PCR反应条件为:94 ℃预变性2 min,94 ℃变性30 s,57 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,共35个循环,72 ℃延伸2 min。取各PCR产物5 μl在1.5%琼脂糖凝胶中电泳,电泳后于凝胶成像系统中成像,Quntity one软件分析图像,以各基因条带积分光密度与内参基因条带的积分光密度值相比的值作为各基因mRNA的相对表达量,比较各组间的差别。

1.2.9 Western blot检测HBx、LXRα及FAS蛋白表达 在转染后油酸钠处理24 h后,用蛋白提取试剂盒分别提取HBx/OA组、空/OA组、G2/OA组细胞内蛋白,BCA蛋白定量法测定蛋白浓度,-70 ℃保存。使用前SDS-PAGE蛋白上样Buffer(5×)与蛋白体积按4∶1混匀,100 ℃加热5 min使蛋白变性,取等量蛋白上样,HBx、LXRα、FAS蛋白分别用15%、12%、6%的SDS-PAGE电泳胶进行电泳分离,蛋白分离后转膜,5%脱脂奶粉封闭液室温封闭约70 min,再各自加入HBX一抗(1∶1 000)、LXRα一抗(1∶1 000)、FAS一抗(1∶4 000),4 ℃缓摇孵育过夜,次日洗膜后加入相应二抗室温缓摇1.5~2.0 h,洗膜后用ECL化学发光法于冷却型CCD成像系统中显色成像,Quntity one软件进行图像分析,以各蛋白积分光密度与内参蛋白的积分光密度值相比的值作为各蛋白的相对表达量,比较各组间的差别。

1.3 统计学处理

采用SSPS 12.0软件进行分析,多个样本均数的比较采用方差分析,多个样本均数间的两两比较采用q检验,结果用$\bar{x} \pm s$表示。

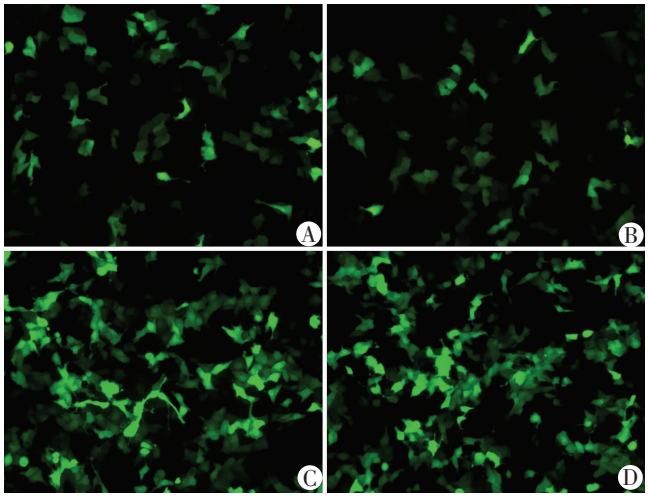
2 结果

2.1 HepG2-HBx细胞模型的建立

在转染后16 h已经观察到HepG2-HBx组和HepG2-pIRES2组细胞内有绿色荧光,在转染后40 h这两组细胞内的绿色荧光更多更强,而HepG2组细胞内始终未见绿色荧光(图1)。Western blot结果显示:在转染后40 h,HepG2-HBx组细胞内有HBx表达,而HepG2- pIRES2组、HepG2组细胞内无HBx表达(图2)。

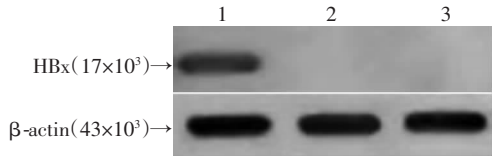
2.2 各组细胞内TG含量的测定

相同浓度油酸钠处理各组细胞24、48 h,同一时间点,HBx/OA组细胞内TG的含量与空/OA组和G2/OA组相比均明显增加,差异有统计学意义($F_{24}=11.59$, $P_{24}=0.003\ 2$, $F_{48}=13.87$, $P_{48}=0.001\ 8$,表1)。



A、C:HepG2-HBx组转染后16、40 h;B、D:HepG2-pIRES2组转染后16、40 h

图1 转染后绿色荧光蛋白在细胞中的表达 (荧光显微镜×200)



1-3:HepG2-HBx组、HepG2-pIRES2组、HepG2组转染后40 h

图2 Western blot检测各组细胞HBx的表达

表1 各组细胞内TG含量的比较(μg/mg,$n=4$, $\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h
HBx/OA组	31.95±2.35[a]	52.36±2.17[a]
空/OA组	25.38±2.13	45.53±2.36
G2/OA组	25.13±2.33	44.24±2.49

a:$P<0.01$,与空/OA组及G2/OA组比较

2.3 油红O染色观察各组细胞内脂滴含量

相同浓度油酸钠处理各组细胞24、48 h,空/OA组和G2/OA组细胞中可见少量且较小的橘红色脂滴,HBx/OA组细胞内可见大量脂滴,部分融合成较大的脂滴(图3)。同一时间点,与G2/OA组、空/OA组相比,HBx/OA组细胞内脂滴含量明显增多,差异有统计学意义($F_{24}=27.11$, $P_{24}=0.000\ 2$, $F_{48}=15.89$, $P_{48}=0.001\ 1$)(表2)。

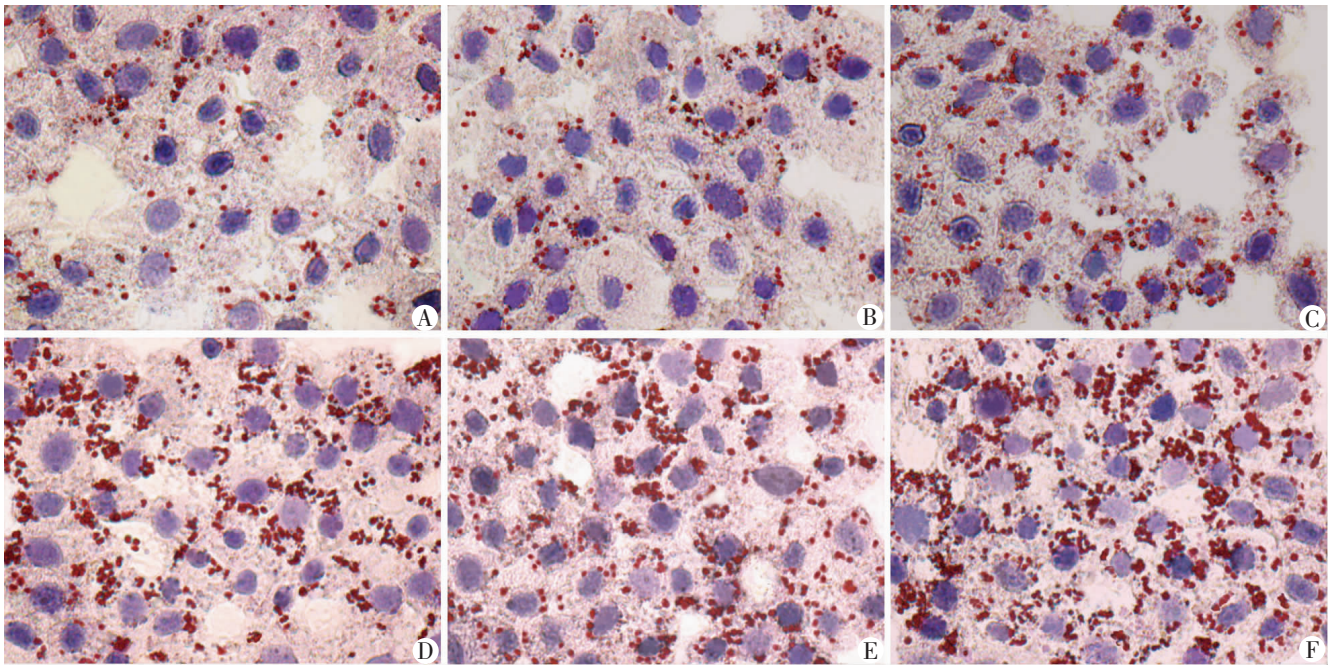
表2 各组细胞内脂滴的表达[IOD(×10⁵),$n=4$, $\bar{x} \pm s$]

组别	24 h	48 h
HBx/OA组	8.833±0.634[a]	34.513±1.345[a]
空/OA组	5.509±0.898	24.383±3.178
G2/OA组	5.594±0.617	25.527±3.368

a:$P<0.01$,与空/OA组及G2/OA组比较

2.4 各组细胞内LXRα和SREBP-1 mRNA的表达

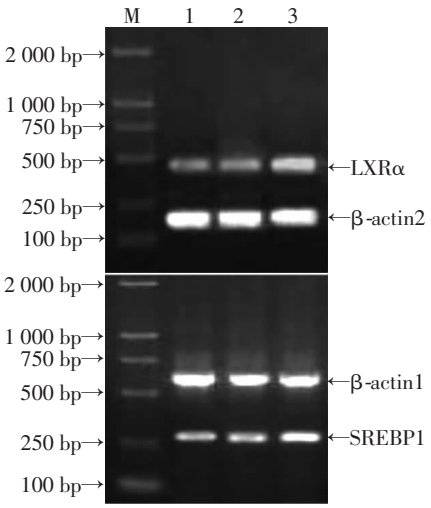
RT-PCR结果显示,在相同浓度油酸钠处理各组细胞24 h(即转染后40 h),G2/OA组、空/OA组和HBx/OA组细胞内LXRα的mRNA表达量分别为(0.349±0.044)、(0.312±0.051)、(0.509±0.054);SREBP-1的mRNA表达量分别为(0.471±0.076)、(0.451±0.057)、(0.639±0.053),HBx/OA



A～C:G2/OA 组、空/OA 组、HBx/OA 组油酸钠处理 24 h; D～F:G2/OA 组、空/OA 组、HBx/OA 组油酸钠处理 48 h

图 3 油红 O 染色观察各组细胞内脂滴表达 (×400)

组细胞内 LXRα 和 SREBP-1 的 mRNA 表达量均明显高于 G2/OA 组及空/OA 组($F_{LXR\alpha}$ = 17.65, $P_{LXR\alpha}$ = 0.0008, $F_{SREBP-1}$ = 10.81, $P_{SREBP-1}$ = 0.0040),差异有统计学意义(图 4)。

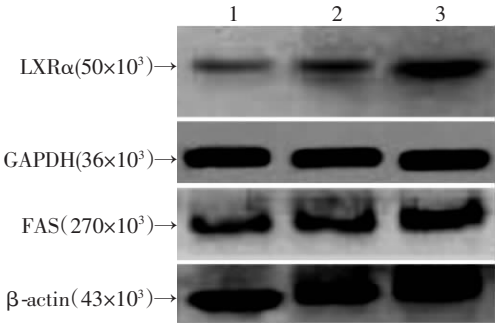


M:标准;1:G2/OA 组;2:空/OA 组;3:HBx/OA 组

图 4 RT-PCR 检测各组细胞内 LXRα 和 SREBP-1 的 mRNA 表达

2.5 各组细胞内 LXRα 及 FAS 蛋白的表达

Western blot 结果(图 5)显示,在相同浓度油酸钠处理各组细胞 24 h,G2/OA 组、空/OA 组和 HBx/OA 组细胞内 LXRα 蛋白表达量分别为(0.260 ± 0.052)、(0.293 ± 0.086)、(0.428 ± 0.064),FAS 蛋白表达量分别为(0.327 ± 0.078)、(0.366 ± 0.081)、(0.506 ± 0.057),HBx/OA 组细胞内 LXRα 和 FAS 蛋白表达量均高于空/OA 组和 G2/OA 组($F'_{LXR\alpha}$ = 6.70, $P'_{LXR\alpha}$ = 0.016 5, F_{FAS} = 6.69, P_{FAS} = 0.016 6),差异有统计学意义。



1:G2/OA 组;2:空/OA 组;3:HBx/OA 组

图 5 Western blot 检测各组细胞内 LXRα 及 FAS 蛋白表达

3 讨论

肝细胞脂肪变性是脂质(主要是 TG)在肝细胞内的异常堆积。HBV 基因组是一个 3.2 kb 环状的,部分双链的 DNA 分子,有 4 个重叠开放阅读框(ORFs):PC-C,PS-S,P 和 X-ORFs,其中乙肝病毒 X 基因(HBVX 基因)表现为自身调节,编码的 X 蛋白(HBx) 是 HBV 编码的病毒蛋白中最小的,由 154 个氨基酸组成,分子量约为 17.5×10^3;是一个多功能的反式调控因子,反式作用于多种细胞和病毒的基因,具有多种生物学功能[5]。SREBP-1 属于核转录因子,可上调脂肪酸合成酶基因 FAS 等的表达[6]。LXR 属于核受体超家族,LXR 的激活后与 RXR(retinoid X receptor)形成异二聚体,结合于 LXR 靶基因 SREBP-1、FAS 等启动子区的肝 X 受体反应元件(LXRE)上,上调其靶基因的转

录和表达,从而增加脂肪酸(FA)和TG的合成[7]。近来,有研究显示HBx与肝脂肪变密切相关[8-11]。

本实验用化学转染法,构建表达HBx的HepG2-HBx细胞模型,并在此基础上给予油酸钠处理,观察细胞内脂质沉积情况和脂质代谢相关基因的表达,研究在油酸钠模拟的高脂环境下,HepG2-HBx细胞是否更容易发生脂质沉积。转染后16 h已经观察到HepG2-HBx和HepG2-pIRES2细胞内有GFP的表达,在转染后40 h GFP表达更多更强,Western blot结果显示,在转染后40 h,只有HepG2-HBx细胞内有HBx表达;以上结果表明表达HBx的HepG2-HBx细胞模型构建成功并且质粒在转染后16 h已进入细胞开始表达,所以,我们考虑在转染后16 h开始给予油酸钠处理。油酸钠处理后,各组细胞内均出现脂滴,这与文献[4]报道具有一致性,表明油酸钠可引起细胞内脂质的沉积;在相同浓度油酸钠处理的同一时间点,与对照组相比,HBx/OA组细胞内脂滴及TG的含量均明显增加,表明HBx/OA组细胞在同样的油酸钠环境下更容易发生细胞内脂质沉积。相同浓度油酸钠处理24 h时,与对照组相比,HBx/OA组细胞内脂质沉积已明显增加,故选择此时间点观察各组细胞内脂代谢基因LXRα、SREBP-1和FAS的表达情况。结果显示,HBx/OA组与对照组相比,细胞内LXRα和SREBP-1的mRNA表达量及LXRα和FAS蛋白表达量均明显增加。发生以上变化的原因可能是HBx引起脂代谢相关基因LXRα、SREBP-1及FAS表达的上调,从而增加FA和TG的合成,影响细胞内脂质代谢的平衡,可能使细胞对外界脂代谢紊乱因素的易感性增加,更容易引起细胞内脂质代谢的进一步紊乱,最终脂代谢失衡,导致细胞内脂质(主要是TG)沉积明显增加。同时,我们的结果与以下研究具有一致性,Fu等[12]用高脂饮食喂养各组小鼠,与野生型小鼠相比,HBV转基因小鼠(HBs-Tg mice)肝细胞内堆积了更多的脂肪;在张琴等[13]的研究中,通过转染HBx的干扰质粒,使HepG2.215细胞内HBx蛋白表达减少(干扰组),用相同浓度油酸钠处理后,干扰组细胞内TG含量、SREBP-1 mRNA、LXRα及FAS蛋白表达量较对照组均减少。

综上,HBx通过HBx-LXRα-SREBP1/FAS通路上调脂代谢相关基因的转录和表达,进而影响细胞内脂质代谢的平衡,增加HepG2-HBx细胞对油酸钠诱导细胞脂质沉积的易感性,从而增加HepG2-HBx细胞脂质沉积。由此,我们推测在同等的高脂环境影响下,HBV感染者比普通人群可能更容易发生肝细胞脂肪变性。因此,对于感染HBV的人群,健康的生活方式或许更为重要。

参考文献:

[1] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 第12版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 326.

[2] Peng D, Han Y, Ding H, *et al*. Hepatic steatosis in chronic hepatitis B patients is associated with metabolic factors more than viral factors [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23(7 Pt 1): 1082-1088.

[3] Ricchi M, Odoardi M R, Carulli L, *et al*. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(5): 830-840.

[4] 郑黎黎, 沈薇. HBx与肝细胞脂肪变性关系及可能机制的细胞学研究[J]. 生物技术通报, 2010, (7): 185-190.

[5] Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, *et al*. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene[J]. Pathol Biol (Paris), 2010, 58(4): 267-272.

[6] Horton J D, Goldstein J L, Brown M S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver [J]. J Clin Invest, 2002, 109(9): 1125-1131.

[7] 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(1): 743-751.

[8] Kim K H, Shin H J, Kim K, *et al*. Hepatitis B virus X protein induces hepatic steatosis via transcriptional activation of SREBP1 and PPARgamma[J]. Gastroenterology, 2007, 132(5): 1955-1967.

[9] Kim K, Kim K H, Kim H H, *et al*. Hepatitis B virus X protein induces lipogenic transcription factor SREBP1 and fatty acid synthase through the activation of nuclear receptor LXRalpha[J]. Biochem J, 2008, 416(2): 219-230.

[10] Na T Y, Shin Y K, Roh K 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(4): 1122-1131.

[11] Shieh Y S, Chang Y S, Hong J R, *et al*. Increase of hepatic fat accumulation by liver specific expression of Hepatitis B virus X protein in zebrafish[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1801(7): 721-730.

[12] Fu M M, Sun R, Tian Z G, *et al*. Increased susceptibility to experimental steatohepatitis induced by methionine-choline deficiency in HBs-Tg mice[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2010, 9(5): 513-519.

[13] 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]. 第三军医大学报, 2011, 33(23): 2466-2470.

(**收稿**:2011-09-25;**修回**:2011-11-07)

(编辑 王 红)