论著

文章编号:1000-5404(2011)23-2466-05

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

张 琴[1],彭 俊[2],沈 薇[1] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院消化内科[1];615000 四川 西昌,凉山州第一人民医院妇产科[2])

[摘要] **目的** 探讨沉默HBx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(HepG2.2.15细胞)、阴性对照组(HepG2.2.15细胞转染阴性HK质粒)、shHBx转染组(HepG2.2.15细胞转染shHBx质粒)和HepG2组(HepG2细胞)。构建针对HBx基因的shHBx质粒,转染HepG2.2.15细胞,荧光显微镜及Western blot检测转染质粒24~96 h绿色荧光蛋白和HBx蛋白的表达以确定质粒的最佳干扰时间,根据结果予油酸钠刺激细胞,甘油三酯(TG)检测细胞脂肪变程度,RT-PCR检测固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding protein-1c,SREBP-1c)mRNA的表达,Western blot检测肝X受体α(liver x receptor alpha,LXRα)及脂肪酸合成酶(fatty acid synthase,FAS)蛋白的表达。**结果** 成功构建shHBx质粒并转染HepG2.2.15细胞;与空白对照组和阴性对照组比较,shHBx转染组HBx蛋白表达明显下降,于转染后48~72 h表达最低[(0.337±0.042) *vs* (0.577±0.032),(0.333±0.032) *vs* (0.654±0.049),$P<0.01$],差异有统计学意义;随着油酸钠处理时间延长,各组TG含量、SREBP-1c mRNA水平、LXRα和FAS蛋白表达均逐渐增加,与空白对照组和阴性对照组比较,同一时间点,shHBx转染组和HepG2组中表达较低[TG:(26.51±1.98)μg/mg *vs*(37.16±6.32)μg/mg;SREBP-1c:0.418±0.051 *vs* 0.516±0.037;LXRα:0.463±0.047 *vs* 0.630±0.026;FAS:0.463±0.047 *vs* 0.630±0.017,$P<0.01$],差异有统计学意义,而shHBx转染组与HepG2组相比水平近似,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** HBx在HepG2.2.15细胞脂变中具有重要作用,可能通过调节LXRα、FAS、SREBP-1c表达影响肝细胞脂代谢。

[关键词] 乙肝病毒X基因;肝细胞脂肪变性;质粒;RNA干扰

[中图法分类号] R575.02; R394-33; R394.3 [文献标志码] A

Preliminary study of the effect and mechanism of hepatitis B virus X gene in hepatic steatosis

Zhang Qin[1], Peng Jun[2], Shen Wei[1] ([1]Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Department of Obstetrics and Gynecology, First People's Hospital of Liangshan Prefecture, Xichang, Sichuan Province, 615000, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of hepatitis B virus X (HBx) gene silencing on expression of lipid metabolism related genes in HepG2.2.15 cells. **Methods** Cells were divided into a blank control group (HepG2.2.15 cells), a negative control group (HepG2.2.15 cells transfected with negative HK plasmids), a shHBx group (HepG2.2.15 cells transfected with shHBx plasmids) and a HepG2 group (HepG2 cells). shHBx plasmid was constructed and transfected into HepG2.2.15 cells using PolyJet™ reagent. Expressions of green fluorescent protein and HBx protein were examined under fluorescence microscope and by Western blotting after 24 h-96 h transfection to identify a best interference time. Then cells were treated with sodium oleate for 24 h and 48 h, respectively. Degree of hepatic steatosis was determined by triglyceride (TG) test. mRNA expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and protein expressions of liver X receptor alpha (LXRα) and fatty acid synthase (FAS) were detected by Western blotting. **Results** shHBx plasmid was successfully constructed and transfected into HepG2.2.15 cells. Compared with the blank control group and negative control group, HBx protein level decreased significantly in the shHBx group. The lowest level was detected at 48 h-

[基金项目] 国家自然科学基金(30871160);重庆市自然科学基金(CSTC2008BB5404);重庆市医学科技计划项目(2008-2-401)

[通信作者] 沈 薇,E-mail:shenwei315@126.com

72 h after transfection (0.337 ± 0.042 *vs* 0.577 ± 0.032, 0.333 ± 0.032 *vs* 0.654 ± 0.049, $P < 0.01$). After cells were stimulated with sodium oleate, the TG content, SREBP-1c mRNA level and LXRα and FAS protein levels increased as the time extended, and they decreased significantly in the shHBx group and HepG2 group as compared with the blank control group and negative control group (TG: 26.51 ± 1.98 μg/mg *vs* 37.16 ± 6.32 μg/mg; SREBP-1c: 0.418 ± 0.051 *vs* 0.516 ± 0.037; LXRα: 0.463 ± 0.047 *vs* 0.630 ± 0.026; FAS: 0.463 ± 0.047 *vs* 0.630 ± 0.017, $P < 0.01$). There was no significant difference between the shHBx group and the HepG2 group ($P > 0.05$). **Conclusion** HBx plays an important role in HepG2.2.15 cell steatosis. It may affect the lipid metabolism through regulation of LXRα, FAS and SREBP-1c.

[**Key words**] hepatitis B virus X gene; hepatic steatosis; plasmid; RNA interference

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30871160), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2008BB5404) and the Project of Medical Science and Technology of Chongqing (2008-2-401). Corresponding author: Shen Wei, E-mail: shenwei315@126.com

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)与病毒性肝炎的关系近年来引起学者们广泛关注。研究显示乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)感染常合并不同程度的肝脂肪变性,比例高达27%~51%[1]。HBx蛋白是乙肝病毒X基因编码的一种多功能蛋白,有学者认为HBx蛋白在肝细胞脂肪变性中具有重要作用[2-4],但其确切的分子机制尚不明了。我们前期实验发现慢性乙型病毒性肝炎(CHB)患者肝组织HBsAg、HBcAg阳性率及表达水平均与脂肪肝无明显相关性,而HBx与LXRα、FAS表达呈正相关,初步显示在人体HBx可能通过诱导LXRα及FAS高表达参与脂肪肝的发生[5]。HepG2.2.15细胞是由包含了二拷贝HBV基因组的质粒转染到人肝癌细胞株HepG2细胞所得到的稳定克隆,能合成HBsAg、HBeAg和Dane颗粒等。为进一步验证HBx与肝细胞脂肪变性的关系,本研究通过RNA干扰技术,观察HBx基因沉默前后HepG2.2.15细胞和HepG2细胞脂质代谢相关基因表达的差异,探讨HBx在乙肝相关性脂肪肝发生机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

HepG2.2.15细胞和HepG2细胞由本实验室保存,载体pGenesil-1.4(含hH1启动子、Kan/Neo抗性、EGFP荧光)、大肠杆菌DH5α及通用阴性对照HK质粒(武汉晶赛公司),T_4 DNA连接酶、限制性内切酶*Eco*31Ⅰ和*Sac*Ⅰ(TaKaRa公司),质粒抽提试剂盒(Bio-Rad公司),RNA抽取试剂盒、PCR试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)小鼠抗人HBx单克隆抗体(chemicon公司),兔抗人FAS多克隆抗体(Santa Cruz公司),鼠抗人LXRα单克隆抗体(Abcam公司),转染试剂PolyJet™(SignaGen公司),甘油三酯(TG)试剂盒(长春汇力公司),油红O(Sigma公司),胎牛血清(杭州四季青公司),核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒(南京凯基生物)。

1.2 实验方法

1.2.1 靶序列的选择 针对HepG2.2.15细胞X基因区(GI:2182117)选择作用靶点,为避免只选择1个序列可能出现无效或低效的情况,我们选择前期实验被证实有效的序列AGGAGGCTGTAGGCATAAA为靶点(1 775 bp)。同时以通用阴性对照HK质粒作为与HBx无关的内对照作用位点。

1.2.2 shRNA-HBx质粒的构建 构建质粒载体pGenesil-1.4-shRNA-HBx引物结构为:TCCC + Sense + Loop + Antisense + 终止信号 + *Sac*Ⅰ,插入的DNA模板序列为:5′-TCCCAGGAGGCTGTAGGCATAAATTCAAGACGTTTATGCCTACAGCCTCCTTTTTTTG-3′(正义链),5′-AGCTCAAAAAAAGGAGGCTGTAGGCATAAACGTCTTGAATTTATGCCTACAGCCTCCT-3′(反义链)。pGenesil-1.4质粒载体带有*Sac*Ⅰ酶切位点,而DNA模板序列设计有该酶切位点便于与载体连接。两片段经退火后产物与线性化载体连接,重组质粒的转化,单克隆扩增等步骤构建HBx的特异性质粒shRNA-HBx。

1.2.3 重组质粒的鉴定 采用质粒纯化试剂盒抽提质粒,用*Sac*Ⅰ做酶切鉴定,选择酶切鉴定重组成功的质粒进行DNA测序。

1.2.4 细胞培养 HepG2.2.15细胞和HepG2细胞培养于含10%胎牛血清的MEM培养基;二者均置于37 ℃、5%二氧化碳饱和湿度的孵箱培养,每3~4天用25%胰酶消化传代。

1.2.5 实验分组 设立空白对照组(HepG2.2.15),阴性对照组(HepG2.2.15转染阴性对照HK质粒),shRNA-HBx转染组(HepG2.2.15转染重组质粒shRNA-HBx)和HepG2组。根据前期实验结果,油酸钠浓度超过40 μg/ml时光密度值下降明显,对细胞增殖影响较大,最佳作用时间为24、48、72 h。故本实验选取40 μg/ml作为油酸钠最佳诱导浓度,处理各组细胞24、48 h。

1.2.6 PolyJet™瞬时转染建立干扰HBx表达的细胞模型 待细胞长至70%~80%融合时,阴性对照组按转染试剂说明书以PolyJet™ 4 μl∶1.5 μg HK质粒转染细胞;shRNA-HBx转染组以PolyJet™ 4 μl∶1.5 μg shRNA-HBx质粒转染细胞,空白对照组和HepG2组不转染任何质粒。HK质粒和pGenesil-1.4-HBx质粒均带有绿色荧光蛋白EGPF,荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白检测细胞转染效果。

1.2.7 Western blot检测转染质粒后HBx蛋白表达 细胞转染质粒后24、48、72、96 h用25%胰酶消化,4 ℃离心,1 000×*g*,5 min收集细胞,预冷PBS洗3次,提取细胞总蛋白BCA法测

定蛋白浓度后 -70 ℃保存。上样到 15% SDS-PAGE 中,每泳道按 80 μg 上样,聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,加入 HBx 抗体,4 ℃孵育过夜,PBST 洗膜后加入二抗室温孵育 2 h,ECL 显色。用目的蛋白与 β-actin 的积分光密度比值表示该蛋白的相对表达量,Quantity one 软件比较进行半定量分析。我们在转染后 24 h 加入油酸钠刺激,选择加入油酸钠 24 h 和 48 h(即转染后 48 h 和 72 h)2 个时间点进行后续实验。

1.2.8　TG 试剂盒检测各组细胞内 TG 含量　油酸钠处理 24、48 h 后收集细胞,按试剂盒步骤进行操作,并行蛋白定量,计算每毫克蛋白所对应的 TG 含量。

1.2.9　RT-PCR 检测 SREBP-1c mRNA 表达　油酸钠刺激细胞后,按 RNA 抽提试剂盒说明提取各组细胞总 RNA,逆转录成 cDNA。SREBP-1c 上游引物:5′-CCCAGAAACTCAAGCAGGAGAAC-3′,下游引物:5′-CTTTGCTGTCCTCAAAGACTGG-3′,产物长度 274 bp;β-actin 上游引物:5′-GACCCAGATCATGTTTGAGACC-3′,下游引物:5′-ATCTCCTTCTGCATCCTGTCG-3′,产物长度 625 bp。PCR 反应条件均为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s, 53 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s,共 35 个循环,72 ℃终延伸 10 min。取 SREBP-1c、β-actin 产物各 6 μl 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像后,Quantity one 图像分析软件分析图像,计算每个样本与 β-actin 积分光密度比值,代表各组 SREBP-1c 相对表达量。

1.2.10　Western blot 检测 LXRα 及 FAS 蛋白的表达　油酸钠刺激后收集细胞,一抗分别用 LXRα、FAS 抗体,按 1.2.7 操作。最后用目的蛋白与 β-actin 的积分光密度比值表示该蛋白的相对表达量,Quantity one 软件比较进行半定量分析。

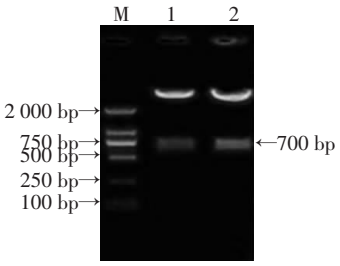
1.3　统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两样本比较用 t 检验,多样本均数比较用方差分析。

2　结果

2.1　重组质粒酶切及测序鉴定

用 *Sac* Ⅰ酶切出一条约 700 bp 的 DNA 小带。经酶切鉴定,shRNS-HBx 符合设计要求;测序结果显示插入片段的碱基序列亦符合设计要求(图 1)。



M:标准;1、2:HBx

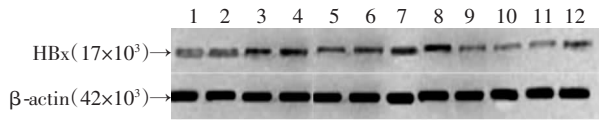
图 1　重组质粒 shRNA-HBx 酶切鉴定结果

2.2　沉默 HBx 表达的细胞模型

阴性对照质粒和 shRNA-HBx 质粒均带有绿色荧光蛋白 EGPF,若转染成功,在荧光显微镜下即可见绿色荧光蛋白表达。结果显示阴性对照组和 shRNA-HBx 转染组转染后 12 h 即有绿色荧光蛋白表达,随着时间延长荧光逐渐增多,转染后 48 ~ 72 h 荧光表达最强,之后开始减弱,空白对照组未见荧光(图 2)。

2.3　干扰 HBx 基因最佳时间

与空白对照组(HepG2. 2. 15)、阴性对照组(HepG2. 2. 15 转染 HK 质粒)比较,同一时间点 shRNA-HBx 转染组 HBx 蛋白水平明显降低($P < 0.01$),而 HepG2 组中无 HBx 蛋白表达;转染后 24 ~ 72 h,随着转染时间延长,shRNA-HBx 转染组内 HBx 蛋白表达越少,差异有统计学意义($P < 0.01$),但转染后 96 h,HBx 蛋白表达又增加,见图 3,表 1。



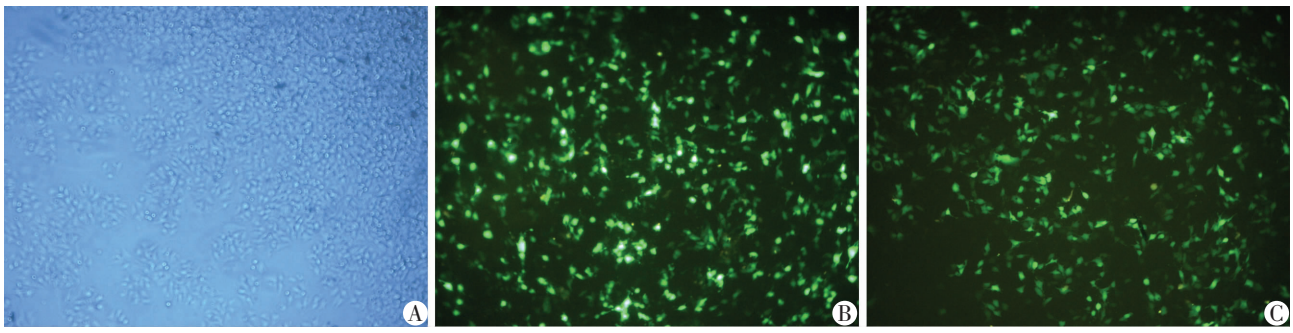
1 ~ 4:空白对照组转染后 24、48、72、96 h;5 ~ 8:阴性对照组转染后 24、48、72、96 h;9 ~ 12:shHBx 转染组转染后 24、48、72、96 h

图 3　各组细胞转染质粒不同时间 HBx 蛋白的表达

表 1　转染质粒后不同时间 HBx 蛋白的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照组	0.527 ±0.404	0.577 ±0.032[b]	0.654 ±0.049[c]	0.683 ±0.031
阴性对照组	0.520 ±0.030	0.573 ±0.060[b]	0.650 ±0.036[c]	0.690 ±0.050
shRNA-HBx 转染组	0.457 ±0.023[a]	0.337 ±0.042[ab]	0.333 ±0.032[a]	0.407 ±0.035[ad]

a:$P < 0.01$,与空白对照组和阴性对照组比较;b:$P < 0.01$,与 24 h 比较;c:$P < 0.01$,与 48 h 比较;d:$P < 0.01$,与 72 h 比较



A:空白对照组;B:阴性对照组;C:shRNA-HBx 转染组

图 2　荧光显微镜观察各组细胞转染 72 h 后荧光蛋白表达　(×100)

2.4 各组细胞甘油三酯水平

细胞内 TG 含量随油酸钠刺激时间延长逐渐增多，与空白对照组和阴性对照组比较，同一时间点 shRNA-HBx 转染组及 HepG2 组细胞内 TG 含量较低，差异有统计学意义（$P<0.01$），而 shRNA-HBx 转染组和 HepG2 组相比无明显差异（$P>0.05$），见表 2。

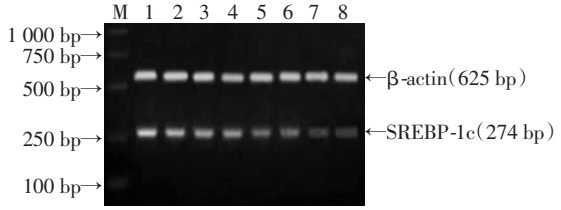
表 2 各组细胞加油酸钠不同时间 TG 含量比较（μg/mg，$\bar{x}\pm s$）

组别	24 h	48 h
空白对照组	37.16 ± 6.32	58.42 ± 1.95[b]
阴性对照组	37.08 ± 4.02	57.82 ± 2.12[b]
shRNA-HBx 转染组	26.51 ± 1.98[a]	47.36 ± 3.39[ab]
HepG2 组	27.43 ± 2.36[a]	46.92 ± 2.29[ab]

a：$P<0.01$，与空白和阴性对照组比较；b：$P<0.01$，与 24 h 比较

2.5 各组细胞 SREBP-1c mRNA 表达

随着油酸钠刺激时间延长，SREBP-1c mRNA 水平逐渐升高，与空白对照组和阴性对照组比较，同一时间点 shRNA-HBx 转染组及 HepG2 组中 SREBP-1c 表达减少，差异有统计学意义（$P<0.05$），而 shRNA-HBx 转染组及 HepG2 组中 SREBP-1c 表达近似（$P>0.05$），见图 4，表 3。



M：标准；1、2：空白对照组加油酸钠 24、48 h；3、4：阴性对照组加油酸钠 24、48 h；5、6：HBx 转染组加油酸钠 24、48 h；7、8：HepG2 组加油酸钠 24、48 h

图 4 各组细胞油酸钠处理不同时间 SREBP-1c mRNA 表达

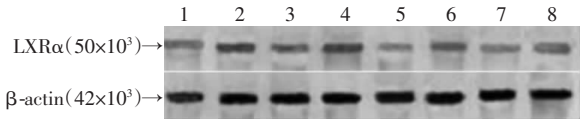
表 3 各组细胞油酸钠处理不同时间 SREBP-1c mRNA 相对表达量（$\bar{x}\pm s$）

组别	24 h	48 h
空白对照组	0.516 ± 0.037	0.580 ± 0.022[b]
阴性对照组	0.520 ± 0.019	0.575 ± 0.013[b]
shRNA-HBx 转染组	0.418 ± 0.051[a]	0.500 ± 0.018[a]
HepG2 组	0.425 ± 0.021[a]	0.493 ± 0.017[a]

a：$P<0.01$，与空白和阴性对照组比较；b：$P<0.01$，与 24 h 比较

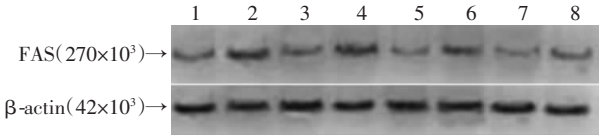
2.6 各组细胞 LXRα 和 FAS 蛋白表达水平

随着油酸钠刺激时间延长，各组 LXRα 和 FAS 蛋白表达水平均呈增加趋势，但是同一时间点空白对照组，阴性对照组蛋白表达水平明显高于 shRNA-HBx 转染组及 HepG2 组，差异有统计学意义（$P<0.01$），而 shRNA-HBx 转染组、HepG2 组之间 LXRα 和 FAS 蛋白表达水平近似，差异无统计学意义（$P>0.05$），见图 5、6，表 4。



1、2：空白对照组加油酸钠 24、48 h；3、4：阴性对照组加油酸钠 24、48 h；5、6：HBx 转染组加油酸钠 24、48 h；7、8：HepG2 组加油酸钠 24、48 h

图 5 各组细胞油酸钠处理不同时间 LXRα 蛋白的表达



1、2：空白对照组加油酸钠 24、48 h；3、4：阴性对照组加油酸钠 24、48 h；5、6：HBx 转染组加油酸钠 24、48 h；7、8：HepG2 组加油酸钠 24、48 h

图 6 各组细胞油酸钠处理不同时间 FAS 蛋白的表达

表 4 各组细胞加油酸钠不同时间 LXRα 和 FAS 蛋白的相对表达量（$\bar{x}\pm s$）

目的蛋白	组别	24 h	48 h
LXRα	空白对照组	0.630 ± 0.026	0.693 ± 0.025[b]
	阴性对照组	0.627 ± 0.032	0.697 ± 0.051[b]
	shRNA-HBx 转染组	0.463 ± 0.047[a]	0.560 ± 0.026[ab]
	HepG2 组	0.460 ± 0.017[a]	0.567 ± 0.047[ab]
FAS	空白对照组	0.630 ± 0.017	0.700 ± 0.036[b]
	阴性对照组	0.627 ± 0.032	0.703 ± 0.040[b]
	shRNA-HBx 转染组	0.463 ± 0.047[a]	0.573 ± 0.025[ab]
	HepG2 组	0.460 ± 0.017[a]	0.569 ± 0.042[ab]

a：$P<0.01$，与空白对照组和阴性对照组比较；b：$P<0.01$，与 24 h 比较

3 讨论

随着人们生活水平不断提高，NAFLD 发病率逐年增加，脂肪肝和慢性乙型病毒性肝炎（CHB）、慢性丙型病毒性肝炎（CHC）共同存在于同一个体的病例亦逐渐增加[6]。CHC 与肝脂肪变的关系较为肯定，研究认为丙型肝炎病毒（HCV）通过调节脂肪代谢关键基因肝 X 受体 α（LXRα）、SREBP-1c 的表达从而调控宿主肝细胞脂代谢，最终引起肝细胞脂肪变[7-9]。而有关 CHB 合并脂肪肝的关系尚存在诸多未知问题亟待解答，HBV 相关性肝脂肪变的发生是否与 CHC 类似，国内外研究尚少。

肝 X 受体（LXRs）是一种氧化型固醇激活的核受体，可调节机体多种生理活动，包括脂肪代谢、胆固醇代谢和糖代谢等过程[10]。LXRs 分为 LXRα 和 LXRβ 两种亚型，前者主要表达于肝脏及其他与脂代谢密切相关的组织（如脂肪组织、巨噬细胞等）。SREBP-1c 是参与脂肪合成的主要转录调节因子，LXRα 可上调 SREBP-1c 的表达，随之激活多种参与脂肪酸合成的酶的转录，包括 FAS，此外，LXRα 也可直接激活 FAS 的转录，从而使宿主细胞发生脂质代谢异常[11-12]。

HBx 蛋白是 HBV 基因组中由 X 基因编码的多功能蛋白，在病毒转录和复制中起重要作用，还可以与宿主细胞转录因子相互作用调节基因转录。我们前期实验[5]证实 HBV 患者肝组织 HBsAg、HBcAg 阳性率及表达水平均与脂肪肝无关，而 HBx 与 LXRα、FAS 表达呈正相关；细胞实验发现转染了 HBx 表达载体的 HepG2 细胞脂肪变程度明显升高，我们推测 HBx 蛋白在这个过程中起了决定性作用。HepG2.2.15 细胞是

由包含了二拷贝 HBV 基因组的质粒转染到人肝癌细胞株 HepG2 细胞所得到的稳定克隆，能持续表达 HBx，因此，HepG2.2.15 细胞是比较理想的研究 HBx 的体外培养细胞模型。为进一步验证上述结论，本研究以 HepG2.2.15 细胞和 HepG2 细胞为研究对象，构建 shHBx 质粒，观察 HBx 基因沉默后脂代谢相关基因的变化。结果显示转染 shHBx 质粒后 48、72 h HBx 蛋白表达最少，到转染后 96 h HBx 蛋白表达回升，因 RNA 干扰并不是完全沉默目的基因[13]，故 shHBx 质粒转染后仍有部分 HBx 蛋白的表达，但是同一时间均比空白对照组和阴性对照组表达明显减少，因此我们认为 HBx 干扰是有效的。我们选择在干扰最佳时间内，用油酸钠处理细胞，研究显示 shRNA-HBx 转染组 LXRα 和 FAS 蛋白，SREBP-1c mRNA 表达水平明显低于空白对照组和阴性对照组，细胞内 TG 合成量也较空白对照组和阴性对照组低，而与 HepG2 组结果近似。我们的研究与 Na 等[2]和 Shieh 等[14]报道的结果基本一致，由此推测 HBx 可能直接参与了脂代谢相关基因的调控，通过上调 LXRα、SREBP-1c、FAS 的表达导致宿主细胞脂质沉积，为 HBV 与肝细胞脂肪沉积的关系提供了实验研究的基础。

参考文献：

[1] Cindoruk M, Karakan T, Unal S. Hepatic steatosis has no impact on the outcome of treatment in patients with chronic hepatitis B infection [J]. J Clin Gastroenterol, 2007, 41(5): 513 - 517.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 郑黎黎，沈薇，熊玲. 乙型肝炎病毒 X 蛋白表达与肝细胞脂肪变性的关系及其机制 [J]. 中国生物制品学杂志，2010，23(9)：918 - 921.

[6] McPherson S, Jonsson J R, Barrie H D, *et al*. Investigation of the role of SREBP-1c in the pathogenesis of HCV-related steatosis [J]. J Hepatol, 2008, 49(6): 1046 - 1054.

[7] Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, *et al*. Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(5): 1661 - 1666.

[8] Bondini S, Younossi Z M. Non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C infection [J]. Minerva Gastroenterol Dietol, 2006, 52(2): 135 - 143.

[9] Brown A J. Viral hepatitis and fatty liver disease: how an unwelcome guest makes pate of the host [J]. Biochem J, 2008, 416(2): e15 - e17.

[10] Geyeregger R, Zeyda M, Stulnig T M. Liver X receptors in cardiovascular and metabolic disease [J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(5): 524 - 539.

[11] Eberle D, Hegarty B, Bossard P, *et al*. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis [J]. Biochimie, 2004, 86(11): 839 - 848.

[12] Higuchi N, Kato M, Shundo Y, *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(11): 1122 - 1129.

[13] 郭启帅，黄曦，张俊，等. 靶向 Peroxiredoxin Ⅰ基因的 shRNA 真核表达载体的构建及生物学功能鉴定 [J]. 第三军医大学学报，2011，33(2)：132 - 136.

[14] 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.

（**收稿**：2011-07-18；**修回**：2011-09-19）

（编辑　王　红）

参考文献类型及标识

根据 GB 3469 规定，以单字母方式标识以下各种参考文献类型：

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献，其文献类型标识建议采用单字母“A”；对于其他未说明的文献类型，建议采用单字母“Z”。

对于数据库（database）、计算机程序（computer program）及电子公告（electronic bulletin board）等电子文献类型的参考文献，建议以下列双字母作为标识：

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部