肝炎病毒学研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001349

# 过氧化物酶体增殖物激活受体α（PPARα）调控 HBV 微染色体重塑与病毒复制

谢冰珏[1]，郭进军[1]，张　燕[1]，李青岭[2]
（重庆医科大学 1. 附属第二医院消化内科；2. 生命科学院，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：研究过氧化物酶体增殖物激活受体α（peroxisome proliferator-activated receptor alpha，PPARα）是否参与调控乙型肝炎病毒（hepatitis B virus，HBV）微染色体重塑与病毒复制。**方法**：HepG2 细胞单独转染、共转染线性 HBV 单体与 PPARα 表达或 PPARα 沉默载体；Southern blot 检测转染细胞质内 HBV 核心颗粒 DNA；实时定量 PCR 定量检测细胞质 HBV 核心颗粒DNA 及细胞核内 HBV 共价闭合环状 DNA（covalently closed circular DNA，cccDNA）水平；酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）检测转染细胞上清中乙型肝炎表面抗原（hepatitis B surface antigen，HBsAg）和 e 抗原（hepatitis B e antigen，HBeAg）；染色质免疫共沉淀技术（chromatin immunoprecipitation，ChIP）检测与 cccDNA 结合的 PPARα、组蛋白和染色质修饰酶。**结果**：与单独转染线性 HBV 单体相比，共转染 PPARα 增加了 PPARα 与 HBV cccDNA 的结合，增加了 HBV 开环 DNA（open circular DNA，OC DNA）及 HBsAg 和 HBeAg 水平，同时也增加了 cccDNA 微染色质中组蛋白 H3 和 H4 的乙酰化水平及乙酰转移酶 p300 的水平；共转染 PPARα 沉默载体则有相反的结果。**结论**：PPARα 能直接与 cccDNA 结合并有助于乙酰转移酶 p300 募集到 cccDNA 上，从而调控 HBV 微染色质的表观遗传学和 HBV 复制。这一发现对 HBV 与宿主转录因子间相互作用的相关分子机制提供了新的机制。

【关键词】乙型肝炎病毒（HBV）；共价闭合环状 DNA（cccDNA）；过氧化物酶体增殖物激活受体α（PPARα）；病毒微染色体重塑
【中图分类号】R512.6+2　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2017-02-24

# Peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates HBV minichromosome remodeling and viral replication

*Xie Bingjue*[1]，*Guo Jinjun*[1]，*Zhang Yan*[1]，*Li Qingling*[2]
（*1. Department of Gastroenterology and Hepatology，the Second Affiliated Hospital；*
*2. Institute of Life Sciences，Chongqing Medical University*）

【Abstract】***Objective***：To determine whether peroxisome proliferator-activated receptor alpha（PPARα）is involved in the regulation of hepatitis B virus（HBV）minichromosome remodeling and viral replication. ***Methods***：Linear HBV DNA monomers or co-transfected PPARα over-expression or silencing vectors were transfected into HepG2 cells. HBV DNA from core particles was detected in Southern blot and nuclear HBV covalently closed circular DNA（cccDNA）was isolated from HBV-transfected cells，quantified by real-time PCR using the specific primers and probe. Heptitis B surface antigen（HBsAg）and Heptitis B e antigen（HBeAg）in HepG2 culture supernatants were measured by enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）. And chromatin immunoprecipitation（ChIP）was utilized to detect the recruitment of PPARα，histones and chromatinmodifying enzymes onto cccDNA in transfected HepG2 cells. ***Results***：The PPARα over-expression enhanced the recruitment of PPARα onto cccDNA，increased the levels of HBV open circular DNA（OC DNA）and the secreted viral productions in the culture supernatant，e.g. HBsAg and HBeAg，and also contributed to the recruitment of acetylated H3 and H4 and acetyltransferase p300 onto HBV cccDNA compared with those levels in cells transfected with linear HBV DNA alone. Meanwhile，those levels in cells with co-transfection of PPARα shRNA were opposite. ***Conclusion***：PPARα directly bound to cccDNA and contributed to the recruitement of acetyltransferase p300 onto HBV cccDNA. The modulation of PPARα on HBV cccDNA epigenetics and the regulation on HBV replication. This findings provide new insights into the molecular mechanisms associated with HBV-host transcription factors interactions.

【Key words】hepatitis B virus（HBV）；covalently closed circular DNA（cccDNA）；peroxisome proliferator-activated receptor alpha（PPARα）；viral minichromosome remodeling

**作者介绍**：谢冰珏，Email：bingjue0817@foxmail.com，
研究方向：乙型病毒性肝炎。
**通信作者**：李青岭，Email：liqingling1974@163.com。
**基金项目**：国家自然科学基金面上资助项目（编号：81071338）。
**优先出版**：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170626.1147.020.html
（2017-06-26）

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)是嗜肝病毒家族的原型,其基因组为 3.2 kb 的部分双链 DNA[1]。在感染细胞核内 HBV 开环 DNA(open circular DNA,OC DNA)转变成闭合环状 DNA(covalently closed circular DNA,cccDNA),充当所有病毒 mRNAs 转录的模板[2]。HBV cccDNA 与组蛋白及非组蛋白相互结合构成了一个染色质样结构,称为病毒微染色体[3]。Pollicino 等[4]已证明 cccDNA 结合的组蛋白 H3、H4 乙酰化水平能调节 HBV 的复制。

肝富集转录因子包括肝细胞核因子 4(hepatocyte nuclear factor 4,HNF4)、维甲类 X 受体 α(retinoid X receptor alpha,RXRα)、小鸡卵清蛋白上游启动子转录因子 1(chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 1,COUP-TF1)和过氧化物酶体增殖物激活受体 α(peroxisome proliferator-activated receptor alpha,PPARα)等成分,它们已被证明在HBV的转录和调控中起重要作用[5-8]。HBV 基因组含有 3 个核受体反应元件(nuclear receptor response elements,NRREs),分别位于 pre-C 的启动子、增强子Ⅰ和增强子Ⅱ区。不同的核受体与相应的 NRREs 结合可以调控 HBV 启动子活性,从而调控 HBV 复制与转录[9-12]。研究表明 PPARα 能直接与 Pre-C 区内的 NRREs 结合增强 HBV 的复制转录[10,13-14]。

新近研究表明 HBV X 蛋白(HBV X protein,HBx)可以通过招募染色质修饰酶至 cccDNA,从而影响 HBV 微染色体重塑[15-16]。真核细胞内转录因子对靶基因的调控通常伴有局部染色质重塑事件的发生[17-18]。本课题组推测,与 HBx 相似,PPARα 与 HBV 基因组 NRREs 的结合可能会诱发 cccDNA 表观遗传学修饰从而影响 HBV 复制与转录。

本研究构建了 HBV 瞬时感染细胞模型,通过 cccDNA 染色质免疫共沉淀技术(cccDNA-ChIP)证实 PPARα 招募组蛋白乙酰转移酶 p300 至 HBV cccDNA,PPARα 募集 p300 的动态变化与 HBV 微染色质组蛋白乙酰化及病毒复制水平的动态变化一致。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

肝癌细胞系 HepG2 细胞为本实验室保存;MEM 培养基购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清及胰酶购自美国 Gibco 公司;X-treme GENE HP DNA 转染试剂购自德国 Roche 公司;*DNase* Ⅰ购自美国 Promega 公司,蛋白酶 K、DIG High Prime DNA Labeling 和 Detection Starter Kit Ⅱ购自瑞士巴塞尔 Roche 公司;H4 抗体、AcH4 抗体、AcH3 抗体、非特异性免疫球蛋白(normal rabbit IgG)购自德国 Millipore 公司;p300 抗体、PPARα 抗体、PPARαshRNA 质粒购自 Santa Cruz Biotechnology 公司;ELISA 试剂盒购自上海科华公司。Plasmid-safe ATP-Dependent DNase 购自美国 Epicentre Biotechnologies 公司;探针及引物由上海 invitrogen 公司完成;LightCycler 480 RT-PCR 仪来自瑞士巴塞尔 Roche 公司,EZ-ChIP Chromatin Immunoprecipitation Kit 来自德国 Millipore 公司;pUC19-HBV1.0 质粒为本实验室保存,PPARα 表达载体(pCMV PPARα-G)由唐红教授(四川大学华西医学院)提供。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养与细胞瞬时转染 HepG2 细胞采用含有 10%胎牛血清的 MEM 培养基培养,转染前一天在 10 cm 培养皿中接种 $1\times10^6$ 个 HepG2 细胞。X-treme GENE HP DNA 转染试剂转染线性 HBV 单体、PPARα 质粒、PPARαshRNA 质粒,转染步骤按照说明书进行。HepG2 细胞单独转染线性 HBV 单体为 HBV 组,共转染线性 HBV 单体与 PPARα 表达或 PPARα shRNA 沉默载体分别为 HBV+PPARα 组、HBV+PPARα shRNA 组。全长线性 HBV DNA 单体来源于经过 *Sap* Ⅰ酶切的 pUC19-HBV 1.0 质粒，有研究表明含有 *Sap* Ⅰ黏性末端的线性 HBV 单体不包含除 HBV DNA 和酶切位点以外的其他碱基序列,由此可见 *Sap* Ⅰ限制性内切酶具有唯一性,这一特性确保了 pUC19-HBV1.0 整合质粒经 *Sap* Ⅰ酶切后获得全长线性 HBV DNA,所以转染细胞后能更好地模拟 HBV 微染色体形成,同时也避免了质粒微染色体结构的干扰[15-16]。PPARα 表达载体含有 E282G 突变,增加了过氧化物酶体增殖物(如氯贝酸)依赖的过氧化物酶体增殖物反应元件(peroxisome proliferator response element,PPRE)活性,故在实验中使用 1 mmol/L 氯贝酸激活核受体 PPARα。

1.2.2 Western blotting 检测 PPARα 表达 HepG2 细胞转染 PPARα 表达或 PPARα shRNA 沉默载体,在转染后 24、48、72 h 提取细胞裂解液。10% SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 2 h,加入 PPARα 抗体于 4 ℃过夜孵育,再加入山羊抗小鼠二抗室温孵育 1 h,加入底物发光剂ECL 进行显色。

1.2.3 Southern blot 检测 HBV 核心颗粒 DNA 转染 HepG2 细胞 48 h 后提取胞质 HBV 核心颗粒 DNA,步骤如下:用裂解液(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,1 mmol/L EDTA,1% NP40 和 2%蔗糖) 于 37 ℃裂解细胞 15 min,15 000 g/min 离心 1 min 沉淀细胞核,在上清中加入含 35%聚乙二醇 8000 的 1.5 mol/L NaCl,冰上孵育 1 h;离心后在沉淀中加入 10 mmol/L $MgCl_2$ 和 40 U/mL *DNase* Ⅰ,37 ℃处理 3 h;上述混合液中加入 0.5% SDS 和 1 mg/mL 蛋白酶 K,50 ℃过夜消化,酚/氯仿(1:1)抽提后乙醇沉淀 HBV DNA。提取的病毒 DNA 进行 Southern blot,步骤如下:0.9%的琼脂糖凝胶分离 DNA,转移至带正电荷的尼龙膜,固定后与 DIG 标记的全长 HBV 片段杂交[4,16]。探针由 DIG High Prime DNA Labeling 和 Detection Starter Kit Ⅱ生成。

1.2.4 实时定量 PCR 定量检测胞质内 HBV 核心颗粒 DNA 用实时定量 PCR 对胞质内 HBV 核心颗粒 DNA 进行定量分析，使用特定的引物及探针：正向引物 5'-AGAAACAACA-CATAGCGCCTCAT-3'，反向引物 5'-TGCCCCATGCTGTAG-ATCTTG-3'，Taqman 探针 5'-FAMTGTGGGTCACCATATT-CTTGGG- TAMER-3'[4]。扩增条件为：95 ℃ 30 s，95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，45 个循环。连续稀释的线性 pUC19-HBV 1.0 DNA 作为量化参照物和定量标准。

1.2.5 HBV cccDNA 提取及定量分析 细胞转染线性 HBV DNA 后在指定时间点提取 cccDNA[20]，步骤如下：用裂解液（50 mmol/L Tris-HCl pH8.0，1 mmol/L EDTA，0.2% NP-40，150 mmol/L NaCl）在 37 ℃裂解细胞 15 min 后，14 000 g/min 4 ℃离心 10 min；沉淀中加入核裂解液（6% SDS，100 mmol/L NaOH），37 ℃孵育 30 min，加入醋酸钾（pH 4.8）中和，14 000 g/min 4 ℃离心 20 min；上清用酚/氯仿抽提后乙醇沉淀 HBV cccDNA，溶解于 25 μL 的 10 mmol/L Tris-HCl（pH 7.5）和 1 mmol/L EDTA 中。上述抽提获得的 DNA 用 Plasmid-safe ATP-Dependent DNase 37 ℃处理 30 min，消除 HBV OC DNA 的污染。纯化后的 HBV cccDNA 使用文献报道的特殊引物，通过 LightCycler 480 RT-PCR 进行定量分析[4,15]，引物和探针如下：正向引物 5'-CTCCCCGTCTGTGCCTTCT-3'，反向引物 5'-GCCCCAAAGCCACCCAAG-3'，探针 5'-GTTCACGGTG-GTCTCCATGCAACGTFL-3'和 5'-R640-AGGTGAAGCGAA-GTGCACACGGACC-3'，β-Globin 用于标准化 HBV cccDNA 的结果。上述引物及探针被证实能区分 HBV cccDNA 和 HBV OC NDA[4,15]。

1.2.6 染色质免疫共沉淀技术 HepG2 转染细胞在指定时间点加入 1%甲醛交联与固定，细胞收集后加入 SDS 裂解液，超声裂解染色质至 300~600 bp 片段，加入 H4 抗体、AcH4 抗体、AcH3 抗体、p300 抗体和 PPARα 抗体，4 ℃过夜孵育进行染色质免疫共沉淀。非特异性的免疫球蛋白和 anti-RNA Ploy Ⅱ用作阴性和阳性对照。免疫共沉淀获得的染色质用 Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase 37 ℃处理 30 min，纯化后使用实时定量 PCR 检测 HBV cccDNA，最终结果使用 input 对照百分比（%input）表示。

1.2.7 ELISA 检测 HBsAg 和 HBeAg HepG2 转染细胞在不同时间点采用酶联免疫吸附试验（ELISA）检测上清液 HBsAg 和 HBeAg。通过分光光度计检测 450 nm 波长处的吸光度（absorbance，A）值。

1.3 统计学分析

采用 PraphPad Prism 5 软件进行统计学分析。实验数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，HBV+PPARα 组、HBV+PPARα shRNA 组和 HBV 组之间的比较采用单因素方差分析，检验水准 α=0.05。

## 2 结 果

2.1 PPARα 在 HepG2 细胞中的过表达和沉默

HepG2 细胞转染 PPARα 表达或 PPARαshRNA 沉默载体后，在 24、48、72 h 进行 Western blot，检测 PPARα 的表达水平。结果表明 PPARα 载体转染 HepG2 细胞后其蛋白水平的增高呈时间依赖性；PPARα shRNA 干扰 PPARα 蛋白表达的变化亦呈时间依赖性（图 1）。

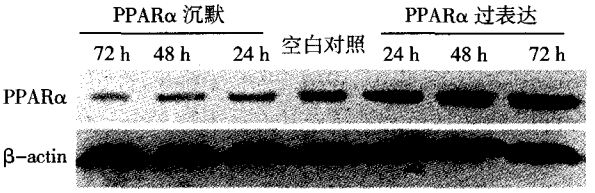



图 1 Western blot 检测 PPARα 表达

Fig.1 The expression of PPARα was detected by western blot

2.2 HepG2 感染细胞模型中 PPARα 与 HBV cccDNA 结合并且调控病毒复制

已有的研究表明核受体 PPARα 通过与 HBV 启动子相互作用激活 HBV 基因表达[6-7,9]。为进一步研究 PPARα 与 HBV 复制调控的相互作用，将线性 HBV DNA 单体与PPARα 表达或 shRNA 载体共转染 HepG2 细胞，使用 PPARα 抗体进行 ChIP 分析，纯化的 ChIP DNA 使用实时定量和半定量 PCR进行定量检测。结果表明，转染线性 HBV DNA 12 h 后在 PPARα 抗体共沉淀的染色质中检测到了 HBV cccDNA，并在 48 h 达到高峰，说明 PPARα 可以与 HBV cccDNA 结合，且有时间依赖性；与单独转染线性 HBV DNA 相比，共转染 PPARα 表达载体增加了 PPARα 与 cccDNA 的结合水平，在 12、24、48 h 分别为前者的 1.84、2.79、2.11 倍（均 $P<0.001$）；相反，共转染 PPARα shRNA 抑制了 PPARα 与 ccc DNA 的结合水平，在12、24、48 h 较前者分别减少 36%、58%、66%（$P$值分别为<0.05、<0.01、<0.001）（图 2A、B，表 1）。

表 1 PPARα 与 HBV cccDNA 结合水平的动态变化及其分析比较（$\bar{x} \pm s$，$n$=3）

Tab.1 The dynamic change of PPARα binds HBV cccDNA（$\bar{x} \pm s$，$n$=3）

| 组别 | 12 h | 24 h | 48 h |
|---|---|---|---|
| HBV+PPARα | 5.303 ± 0.676[a] | 13.970 ± 0.807[a] | 21.430 ± 0.913[a] |
| HBV | 2.878 ± 0.050 | 5.012 ± 0.605 | 10.170 ± 0.528 |
| HBV+shPPARα | 1.839 ± 0.050[b] | 2.083 ± 0.307[b] | 3.495 ± 0.290[b] |
| $F$值 | 61.500 | 578.600 | 617.400 |
| $P$值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

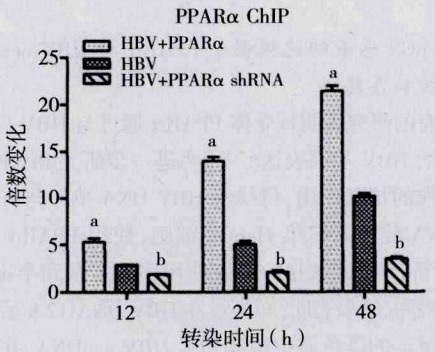
注：a，HBV+PPARα 组与 HBV 组比较，$P<0.05$；b：HBV+shPPARα 组与 HBV 组比较，$P<0.05$

线性 HBV DNA 单体转染 HepG2 细胞后通过实时定量 PCR 和 Southern blot 检测胞质 HBV OC DNA 和胞核 HBV cccDNA 水平。与单独转染线性 HBV DNA 相比，共转染 PPARα 表达载体后 HBV OC DNA 水平在 12、24、48、72 h 分别增加约 2.88、2.22、1.83、2.64 倍（均 $P<0.001$）。相反，共转染 PPARα shRNA 质粒后 HBV OC DNA 水平在 12、24、48、72 h 分别减少约 29%、34%、26%、22%（$P$ 值分别为<0.01、<0.05、

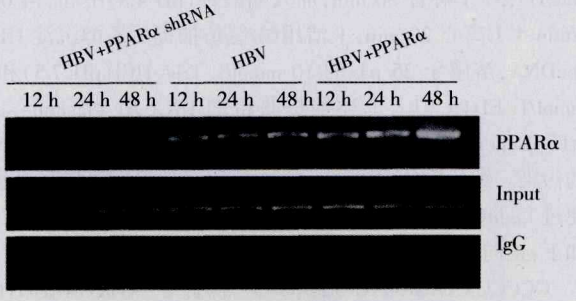
<0.05、<0.05)(图 2C,表 2)。HepG2 转染细胞 48 h 的 Southern blot 结果验证了上述结果(图 2D)。与单独转染线性 HBV DNA 相比,共转染 PPARα 表达载体明显增加了 HBV cccDNA 水平,在 12、24、48、72 h 分别增加 1.73、1.59、1.74、2.71 倍(均 $P<0.001$);相反,共转染 PPARα shRNA 质粒降低了 HBV cccDNA 水平,在 12、24、48、72 h 分别降低 20%、21%、44%、36%($P$ 值分别为<0.05、<0.05、<0.01、<0.01)(图 2E,表 3)。

线性 HBV DNA 单体转染 HepG2 细胞 48 h 后在细胞上清中检测到分泌型病毒产物 HBsAg 和 HBeAg,并在 72 h 达到峰值。与单独转染线性 HBV DNA 相比,共转染 PPARα 表达质粒后 HBsAg 水平在 12、24、48、72 h 分别提高 1.15、3.27、1.41、1.14 倍($P$ 值分别<0.01、0.000、0.000、0.000);相反,共转染 PPARα shRNA 质粒后 HBsAg 水平在 12、24、48、72 h 分别降低 4%、17%、33%、32%($P$ 值分别>0.05、>0.05、0.000、0.000)(图 2F,表 4)。与单独转染线性 HBV DNA 相比,PPARα 过表达下 HBeAg 水平在 12、24、48、72 h 分别增加了 1.05、1.92、2.53、1.19 倍($P$ 值分别>0.05、0.000、0.000、0.000);相反,PPARα 沉默后 HBeAg 水平在 12、24、48、72 h 分别减少了 11%、30%、35%、36%($P$ 值分别>0.05、0.000、0.000、0.000)(图 2G,表 5)。

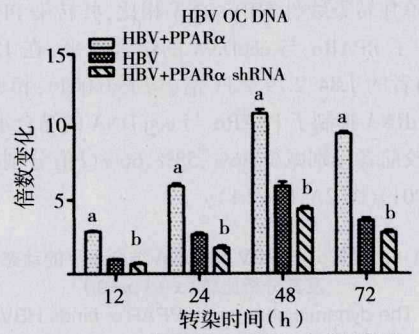
以上结果表明在 HBV 瞬时感染细胞模型中,PPARα 能直接与 HBV cccDNA 结合并能调控 HBV 的复制转录。



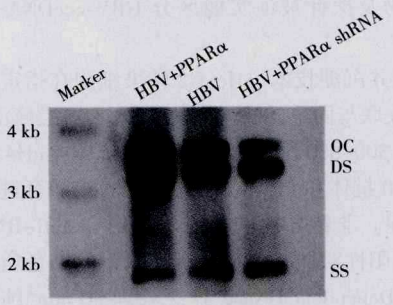

A. PPARα 与 HBV cccDNA 结合水平的动态变化(qRT-PCR)



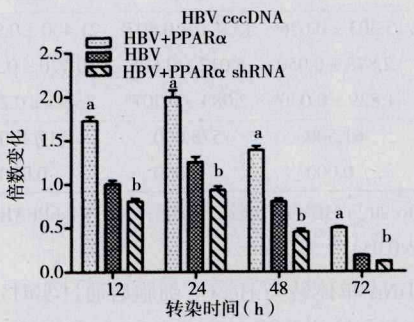

B. PPARα 与 HBV cccDNA 结合水平的动态变化(半定量 PCR)



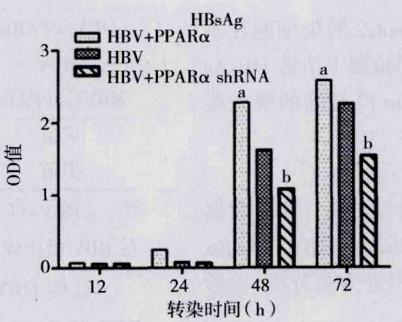

C. PPARα 对 HBV OC DNA 水平的影响(qRT-PCR)



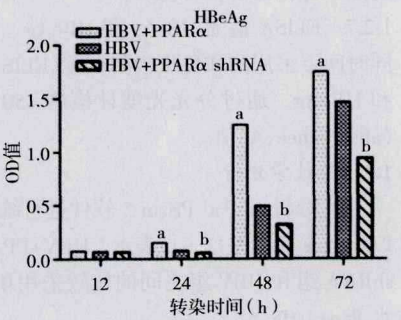

D. PPARα 对 HBV 复制中间体水平的影响(Southern blotting)




E. PPARα 对 HBV cccDNA 水平的影响(qRT-PCR)




F. PPARα 对 HBsAg 水平的影响(ELISA)




G. PPARα 对 HBeAg 水平的影响(ELISA)

a:HBV + PPARα 组与 HBV 组比较,$P<0.05$;b:HBV + shPPARα 组与 HBV 组比较,$P<0.05$

OC:HBV 开环双链 DNA;DS:双链 HBV DNA复制中间体;SS:单链 HBV DNA 复制中间体

**图 2　PPARα 与 HBV cccDNA 结合并调控 HBV 的复制**

Fig.2　PPARα binds to HBV cccDNA and regulates HBV replication

2.3 PPARα 介导 HBV cccDNA 的表观遗传学修饰

HBV cccDNA 通过与组蛋白和非组蛋白相互作用组装成病毒微染色体。为研究 PPARα 在 HBV cccDNA 表观遗传学中的调控作用，HepG2 细胞共转染线性 HBV DNA 和 PPARα 表达或 shRNA 载体，HBV cccDNA 与组蛋白的结合水平及乙酰化水平进行了动态检测。结果表明，组蛋白 H4 在转染后 12 h 被招募至 HBV cccDNA，并在 48 h 达到高峰；HBV 微染色体中 H3 和 H4 的乙酰化在转染后 12 h 发生，并在 24 h 或 48 h 达到最高水平。PPARα 过表达或沉默没有显著影响组蛋白 H4 与 HBV cccDNA 的结合，但明显上调或下调了组蛋白 H3 和 H4 乙酰化水平。与单独转染线性 HBV DNA 比较，共转染 PPARα 表达载体后，HBV cccDNA 结合的 H3 和 H4 乙酰化水平在 12、24、48 h 分别增加了约 1.44 倍（$P<0.01$）和 1.59 倍（$P<0.01$）、1.83 倍（$P<0.001$）和 1.94 倍（$P<0.001$）、2.02 倍（$P<0.001$）和 1.97 倍（$P<0.001$）；相反，PPARα shRNA 分别在 12、24、48 h 减少了 cccDNA 结合的 H3 和 H4 乙酰化水平约 58%（$P<0.001$）和 43%（$P<0.05$）、45%（$P<0.001$）和 42%（$P<0.001$）、41%（$P<0.05$）和 47%（$P<0.001$）（图 3A-D，表 6~表 8）。PPARα 影响 HBV cccDNA 结合 H3和 H4 乙酰化的动态变化与 PPARα 结合 HBV cccDNA 及影响 HBV 复制的动态变化趋势相同，表明 PPARα 参与了 HBV微染色体重塑和 HBV 复制的调控。

表 2 PPARα 对 HBV OC DNA 水平的影响及其分析比较（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

Tab.2 The effects of PPARα to HBV OC DNA level（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

| 组别 | 12 h | 24 h | 48 h | 72 h |
|---|---|---|---|---|
| HBV+PPARα | 2.879 ± 0.070[a] | 5.967 ± 0.310[a] | 10.900 ± 0.491[a] | 9.517 ± 0.264[a] |
| HBV | 1.001 ± 0.042 | 2.682 ± 0.186 | 5.959 ± 0.495 | 3.602 ± 0.262 |
| HBV+shPPARα | 0.706 ± 0.111[b] | 1.757 ± 0.271[b] | 4.403 ± 0.274[b] | 2.797 ± 0.233[b] |
| *F* 值 | 659.400 | 215.900 | 184.900 | 629.900 |
| *P* 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注：a，HBV+PPARα 组与 HBV 组比较 $P<0.05$；b：HBV+shPPARα 组与 HBV 组比较 $P<0.05$

表 3 PPARα 对 HBV cccDNA 水平的影响及其分析比较（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

Tab.3 The effects of PPARα to HBV cccDNA level（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

| 组别 | 12 h | 24 h | 48 h | 72 h |
|---|---|---|---|---|
| HBV+PPARα | 1.731 ± 0.0780[a] | 1.998 ± 0.138[a] | 1.392 ± 0.077[a] | 0.499 ± 0.021[a] |
| HBV | 1.003 ± 0.073 | 1.257 ± 0.104 | 0.800 ± 0.055 | 0.184 ± 0.008 |
| HBV+shPPARα | 0.801 ± 0.052[b] | 0.932 ± 0.067[b] | 0.450 ± 0.055[b] | 0.117 ± 0.008[b] |
| *F* 值 | 152.800 | 77.430 | 168.900 | 673.700 |
| *P* 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注：a，HBV+PPARα 组与 HBV 组比较，$P<0.05$；b：HBV+shPPARα 组与 HBV 组比较，$P<0.05$

表 4 PPARα 对 HBsAg 水平的影响及其分析比较（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

Tab.4 The effects of PPARα to HBsAg level（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

| 组别 | 12 h | 24 h | 48 h | 72 h |
|---|---|---|---|---|
| HBV+PPARα | 0.067 ± 0.000[a] | 0.246 ± 0.018[a] | 2.277 ± 0.058[a] | 2.579 ± 0.020[a] |
| HBV | 0.059 ± 0.004 | 0.075 ± 0.001 | 1.619 ± 0.0135 | 2.260 ± 0.010 |
| HBV+shPPARα | 0.056 ± 0.002 | 0.063 ± 0.001 | 1.077 ± 0.029[b] | 1.538 ± 0.032[b] |
| *F* 值 | 18.770 | 305.200 | 746.300 | 1 717.000 |
| *P* 值 | 0.003 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注：a，HBV+PPARα 组与 HBV 组比较，$P<0.05$；b：HBV+shPPARα 组与 HBV 组比较，$P<0.05$

表 5 PPARα 对 HBeAg 水平的影响及其分析比较（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

Tab.5 The effects of PPARα to HBeAg level（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

| 组别 | 12 h | 24 h | 48 h | 72 h |
|---|---|---|---|---|
| HBV+PPARα | 0.076 ± 0.001 | 0.153 ± 0.006[a] | 1.250 ± 0.026[a] | 1.748 ± 0.012[a] |
| HBV | 0.072 ± 0.004 | 0.080 ± 0.001 | 0.495 ± 0.001 | 1.464 ± 0.059 |
| HBV+shPPARα | 0.064 ± 0.005 | 0.056 ± 0.005[b] | 0.321 ± 0.009[b] | 0.941 ± 0.040[b] |
| *F* 值 | 7.580 | 452.600 | 2 896.000 | 272.500 |
| *P* 值 | 0.023 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注：a，HBV+PPARα 组与 HBV 组比较，$P<0.05$；b：HBV+shPPARα 组与 HBV 组比较，$P<0.05$

表 6 PPARα 对 HBV 微染色体中 H4 水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）
Tab.6 The effects of PPARα to H4 level（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

| 组别 | 12 h | 24 h | 48 h |
|---|---|---|---|
| HBV+PPARα | 4.515 ± 0.181 | 12.390 ± 1.192 | 10.230 ± 1.065 |
| HBV | 3.717 ± 0.634 | 11.040 ± 0.324 | 8.737 ± 0.849 |
| HBV+shPPARα | 4.054 ± 0.289 | 9.773 ± 0.591 | 9.257 ± 0.369 |
| $F$ 值 | 2.790 | 8.240 | 2.610 |
| $P$ 值 | 0.139 | 0.019 | 0.153 |

注：转染 HepG2 细胞 12、24、48 h 后，HBV + PPARα 组与 HBV 组比较，均 $P$>0.05；HBV+shPPARα 组与 HBV 组比较，均 $P$>0.05

表 7 PPARα 对 HBV 微染色体中 AcH3 水平的影响及其分析比较（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）
Tab.7 The effects of PPARα to AcH3 level（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

| 组别 | 12 h | 24 h | 48 h |
|---|---|---|---|
| HBV+PPARα | 8.032 ± 0.722[a] | 20.800 ± 0.349[a] | 15.390 ± 1.243[a] |
| HBV | 5.595 ± 0.426 | 11.340 ± 1.036 | 7.627 ± 0.712 |
| HBV+shPPARα | 2.345 ± 0.410[b] | 6.195 ± 0.949[b] | 4.509 ± 0.565[b] |
| $F$ 值 | 84.140 | 236.500 | 119.300 |
| $P$ 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注：a，HBV+PPARα 组与 HBV 组比较，$P$<0.05；b：HBV+shPPARα 组与 HBV 组比较，$P$<0.05

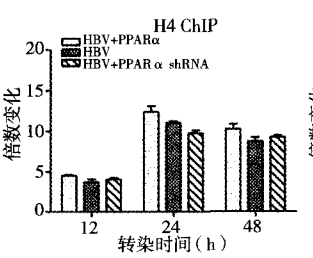
表 8 PPARα 对 HBV 微染色体中 AcH4 水平的影响及其分析比较（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）
Tab.8 The effects of PPARα to AcH4 level（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

| 组别 | 12 h | 24 h | 48 h |
|---|---|---|---|
| HBV+PPARα | 4.527 ± 0.500[a] | 19.340 ± 1.065[a] | 24.500 ± 0.442[a] |
| HBV | 2.842 ± 0.362 | 9.961 ± 0.186 | 12.430 ± 0.474 |
| HBV+shPPARα | 1.606 ± 0.362[b] | 5.807 ± 0.314[b] | 6.645 ± 0.526[b] |
| $F$ 值 | 37.760 | 341.500 | 1 072.000 |
| $P$ 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

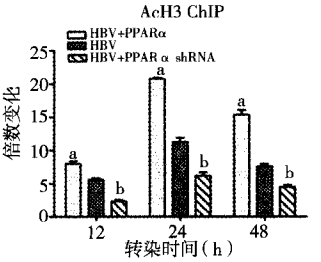
注：a，HBV+PPARα 组与 HBV 组比较，$P$<0.05；b：HBV+shPPARα 组与 HBV 组比较，$P$<0.05

### 2.4 PPARα 调控组蛋白乙酰转移酶招募至 HBV cccDNA

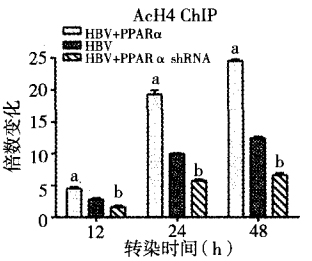
已有研究证明在 HBV 复制期间组蛋白乙酰转移酶（如 p300 或 CBP）被募集到 cccDNA 上[4,15]。另有研究表面 p300 能直接与 PPARα 相互作用[28,33]。为研究 PPARα 是否有助于 p300 招募至 HBV cccDNA，我们用 p300 抗体对共转染线性 HBV DNA、PPARα 表达或 shRNA 载体的 HepG2 细胞进行染色质免疫共沉淀，使用实时定量或半定量 PCR 检测免疫沉淀的 cccDNA。结果表明，转染线性 HBV DNA 后 12 h 观察到 p300 与 HBV cccDNA 结合，并在 24 h 达到峰值。与单独转染线性 HBV DNA 相比较，共转染 PPARα 表达载体后，在 12、24、48、72 h 分别增加了 p300 与 HBV cccDNA 的结合水平约 1.52 倍（$P$>0.05）、3.33 倍（$P$<0.001）、2.67 倍（$P$<0.001）和 1.58 倍（$P$<0.05）；相反，共转染 PPARαshRNA 载体在 12、24、48、72 h 分别减少了 p300 与 cccDNA 的结合水平约 26%（$P$>0.05）、62%（$P$<0.01）、56%（$P$<0.001）和 27%（$P$>0.05）（图4A、B，表 9）。PPARα 对 HBV cccDNA 的 p300 招募、组蛋白乙酰化等的动态学改变和 PPARα 对 HBV 复制水平的动态学改变趋势基本一致，表明在 HBV 复制期间 PPARα 参与p300 招募至 HBV cccDNA。




A. PPARα 对 HBV 微染色体中 H4 水平的影响（qRT-PCR）

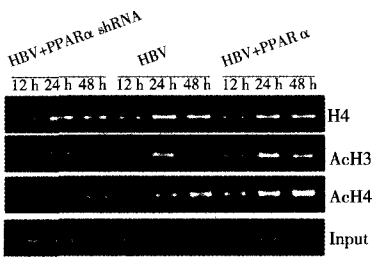



B. PPARα 对 HBV 微染色体中 AcH3 水平的影响（qRT-PCR）




a：HBV + PPARα 组与 HBV 组比较，$P$<0.05；
b：HBV + shPPARα 组与 HBV 组比较，$P$<0.05

C. PPARα 对 HBV 微染色体中 AcH4 水平的影响（qRT-PCR）



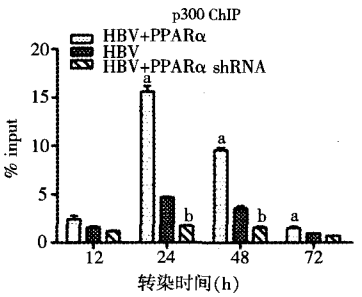

D. PPARα 对 HBV 微染色体中 H4、AcH3、AcH4 水平的影响（qRT-PCR）

图 3 PPARα 对 HBV 微染色体重塑的调控
Fig.3 PPARα regulates HBV minichromosome remodeling

表 9 PPARα 对 p300 结合 HBV cccDNA 水平的影响及其分析比较（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）
Tab.9 The effects of PPARα on the recruitment of p300 onto HBV cccDNA（$\bar{x}\pm s$，$n$=3）

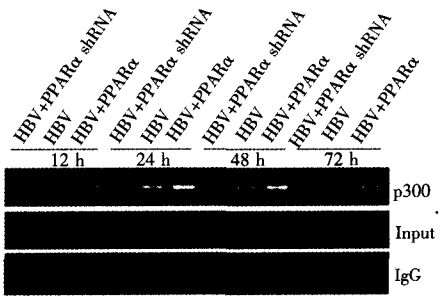
| 组别 | 12 h | 24 h | 48 h | 72 h |
|---|---|---|---|---|
| HBV+PPARα | 2.440 ± 0.620 | 15.580 ± 0.967[a] | 9.556 ± 0.433[a] | 1.506 ± 0.296[a] |
| HBV | 1.605 ± 0.177 | 4.686 ± 0.130 | 3.583 ± 0.368 | 0.952 ± 0.030 |
| HBV+shPPARα | 1.189 ± 0.131 | 1.761 ± 0.086[b] | 1.581 ± 0.191[b] | 0.696 ± 0.022[b] |
| $F$ 值 | 8.420 | 497.800 | 431.200 | 17.300 |
| $P$ 值 | 0.018 | 0.000 | 0.000 | 0.003 |

注：a，HBV+PPARα 组与 HBV 组比较，$P$<0.05；b：HBV+shPPARα 组与 HBV 组比较，$P$<0.05




a:HBV+PPARα 组与 HBV 组比较，$P<0.05$；
b:HBV+shPPARα 组与 HBV 组比较，$P<0.05$

A. PPARα 对 p300 结合 HBV cccDNA 水平的影响(实时定量 PCR)




B. PPARα 对 p300 结合 HBV cccDNA 水平的影响(半定量 PCR)

**图 4　PPARα 对 p300 募集到 HBV cccDNA 的调控**

Fig.4　The regulations of PPARα on the recruitment of p300 onto HBV cccDNA

## 3　讨　论

PPARs是核受体超家族的成员并且调控各种生物进程，特别是在能量代谢方面[11,24]。PPARα 是在肝脏表达的主要核受体之一[13]。近年研究表明 PPARα 影响 HBV 的转录和复制[13-14]。PPARα 与其伴侣 RXRα 形成一个二聚体复合物[25]。PPARα-RXRα 异二聚体能直接结合 HBV 基因组 pre-C 和增强子 I 区内的 NRREs 并能反式激活核心抗原和表面抗原的启动子[7,9,26]。研究表明 PPARα-RXRα 异二聚体支持更高水平的前基因组 RNA 转录并且允许 HBV 在非肝细胞中复制(这种行为由于病毒嗜性的原因通常是不可能的)[11,26]。配体结合是 PPARα 启动复杂转录过程所必需的。当配体结合 PPARα、PPARα-RXRα 异二聚体通过招募共激活蛋白激活转录[27]。对 PPARα 而言，组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferases，HATs)已被证实是作为其重要的共激活因子[27-30]。已有研究表明 p300 能通过它 N 端第39-117 位氨基酸以配体增强的方式与 PPARα 相互作用[28,33]。HATs 能重塑染色质结构并促进靶基因基础转录装置的装配[18]。

在本研究中，证明 PPARα 能被招募至HBV cccDNA。PPARα 招募至 HBV cccDNA 的时相与 HBV 复制、HBV cccDNA 微染色体中组蛋白招募及乙酰化的时相是相似的。同时也发现 p300 招募至 HBV cccDNA 与 PPARα 的过表达或沉默有关，它们分别显著增加或降低 p300 的募集。结果表明，PPARα 对 HBV 的复制调控可能通过直接与 HBV cccDNA 结合并通过对组蛋白乙酰基转移酶的招募诱导病毒微染色体重塑而实现。尽管本研究的结果证明了 PPARα、p300 和 HBV cccDNA 之间的相互作用和影响，但 PPARα 在 HBV cccDNA 表观遗传学上的潜在调节机制仍不清楚，需要进一步研究来阐明。

本研究中使用已被充分证明科学有效的方法来检测 HBV 复制和 HBV 微染色质重塑[4-5,16]。研究中使用的线性 HBV DNA 单体转染细胞避免了除 HBV DNA 以外的其他任何碱基序列的干扰[15-16]。此外，研究中使用的 HBV cccDNA-ChIP 技术包含了消除非特异性 ChIP DNA 的核酸酶，尤其应用了 cccDNA 特异性的引物和探针，这些引物能够有效区分核内 cccDNA 和胞质 HBV 复制中间体 DNA，最大可能地减低了实验误差。

慢性 HBV 感染是一个全球性的健康问题，HBV DNA 复制水平已被认为是肝硬化或肝癌的重要危险因子[1]。肝细胞核内稳定的 cccDNA 池为 HBV 的复制和转录提供了持续的模板[2,31]，目前使用的抗病毒药物对于 HBV cccDNA 的清除均相对不敏感[1,32]，所以探索针对 HBV cccDNA 的新型抗病毒药物将成为重要的选择，PPARα 对 HBV cccDNA 染色质调控的研究结果可能对发展新型抗病毒药物有一定的提示价值。

## 参　考　文　献

[1]　Asselah T, Marcellin P. An update in the management of chronic hepatitis B[J]. Clin Liver Dis, 2013, 17(3): ix-x.

[2]　Levrero M, Pollicino T, Petersen J, et al. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2009, 51(3): 581-592.

[3]　Bock CT, Schwinn S, Locarnini S, et al. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome[J]. J Mol Biol, 2001, 307(1): 183-

196.

[4] Pollicino T, Belloni L, Raffa G, et al. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones[J]. Gastroenterology, 2006, 130(3): 823-837.

[5] Garcia AD, Ostapchuk P, Hearing P. Functional interaction of nuclear factors EF-C, HNF-4, and RXR alpha with hepatitis B virus enhancer I[J]. J Virol, 1993, 67(7): 3940-3950.

[6] Huan B, Kosovsky MJ, Siddiqui A. Retinoid X receptor alpha transactivates thehepatitis B virus enhancer 1 element by forming a heterodimeric complex with the peroxisomeproliferator-activated receptor [J]. J Virol, 1995, 69(1): 547-551.

[7] Raney AK, Johnson JL, Palmer CN, et al. Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter[J]. J Virol, 1997, 71(2): 1058-1071.

[8] Reese V, Ondracek C, Rushing C, et al. Multiple nuclear receptors may regulate hepatitis B virus biosynthesis during development[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(2): 230-237.

[9] Yu X, Mertz JE. Critical roles of nuclear receptor response elements in replication of hepatitis B virus[J]. J Virol, 2001, 75(23): 11354-11364.

[10] Yu X, Mertz JE. Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoters ofhuman hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily[J]. J Virol, 1997, 71(12): 9366-9374.

[11] Tang H, McLachlan A. Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclearhormone receptors is a critical determinant of viral tropism[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(4): 1841-1846.

[12] Moolla N, Kew M, Arbuthnot P. Regulatory elements of hepatitis B virus transcription[J]. J Viral Hepat, 2002, 9(5): 323-331.

[13] Dubuquoy L, Louvet A, Hollebecque A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors in HBV-related infection[J]. PPAR Res, 2009, 2009: 145124.

[14] Reese VC, Oropeza CE, McLachlan A. Independent activation of hepatitis B virusbiosynthesis by retinoids, peroxisome proliferators, and bile acids[J]. J Virol, 2013, 87(2): 991-997.

[15] Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(47): 19975-19979.

[16] Gong Q, Chen S, Guo J, et al. Chromosome remodeling related to hepatitis B virus replication in HepG2 cells[J]. DNA Cell Biol, 2011, 30(6): 347-354.

[17] Mellor J. The dynamics of chromatin remodeling at promoters[J]. Mol Cell, 2005, 19(2): 147-157.

[18] Müller C, Leutz A. Chromatin remodeling in development and differentiation[J]. Curr Opin Genet Dev, 2001, 11(2): 167-174.

[19] Muerhoff AS, Griffin KJ, Johnson EF. The peroxisome proliferator-activated receptormediates the induction of CYP4A6, a cytochrome P450 fatty acid omega-hydroxylase, by clofibric acid[J]. J Biol Chem, 1992, 267(27): 19051-19053.

[20] Wieland SF, Spangenberg HC, Thimme R, et al. Expansion and contraction of the hepatitis B virus transcriptional template in infected chimpanzees[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(7): 2129-2134.

[21] Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, et al. Hepatitis B virus maintains itspro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection [J]. Gastroenterology, 2004, 126(1): 102-110.

[22] Costanzo A, Merlo P, Pediconi N, et al. DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes[J]. Mol Cell, 2002, 9(1): 175-186.

[23] Pediconi N, Ianari A, Costanzo A, et al. Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage[J]. Nat Cell Biol, 2003, 5(6): 552-558.

[24] Contreras AV, Torres N, Tovar AR. PPAR-alpha as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation[J]. Adv Nutr, 2013, 4(4): 439-452.

[25] Feige JN, Gelman L, Tudor C, et al. Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand [J]. J Biol Chem, 2005, 280(18): 17880-17890.

[26] Tang H, Raney AK, McLachlan A. Replication of the wild type and a natural hepatitis B virus nucleocapsid promoter variant is differentially regulated by nuclear hormone receptors in cell culture[J]. J Virol, 2001, 75(19): 8937-8948.

[27] Mukherjee R, Sun S, Santomenna L, et al. Ligand and coactivator recruitment preferences of peroxisome proliferator activated receptor alpha[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2002, 81(3): 217-225.

[28] Dowell P, Ishmael JE, Avram D, et al. p300 functions as a coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha[J]. J Biol Chem, 1997, 272(52): 33435-33443.

[29] Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors[J]. Genes Dev, 2000, 14(2): 121-141.

[30] Qi C, Zhu Y, Reddy JK. Peroxisome proliferator-activated receptors, coactivators, and downstream targets[J]. Cell Biochem Biophys, 2000, 32(1): 187-204.

[31] Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells[J]. Cell, 1986, 47(3): 451-460.

[32] Tujios SR, Lee WM. Update in the management of chronic hepatitis B[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2013, 29(3): 250-256.

[33] Zhang ZN, Gong L, Lü S, et al. SIK2 regulates fasting-induced PPARα activity and ketogenesis through p300[J]. Sci Rep, 2016, 6: 23317.

（责任编辑：张辉洁）