

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.23.009

半乳糖凝集素-3 结合蛋白作为正向调节因子 参与 IFN- γ 介导的抗 HBV 作用*

孟诗敏[#] 陈忠伟[#] 李涵沅 魏艳红 胡康洪^Δ

(湖北工业大学生物工程与食品学院中德生物医学中心 工业微生物湖北省重点实验室

国家外专局 / 教育部细胞调控与分子药物 "111" 引智基地 湖北 武汉 430068)

摘要 目的: 研究半乳糖凝集素-3 结合蛋白(LGALS3BP)在 IFN- γ 介导的抗 HBV 中的作用。**方法:** 采用 qRT-PCR 及 Western Blot 分别检测 HepG2 细胞瞬转过表达质粒及干扰质粒后 LGALS3BP 转录水平和翻译水平的变化及检测 IFN- γ 对 HepG2 细胞内源性 LGALS3BP 转录水平和翻译水平的影响; 采用 CCK-8 评价 LGALS3BP 表达量的变化对 HepG2 细胞增殖的影响及确定 IFN- γ 处理 HepG2 和 HepG2.215 的最适浓度; 采用 ELISA 检测当 LGALS3BP 表达量发生变化时, IFN- γ 刺激后对细胞外分泌的 HBsAg 和 HBeAg 的影响; 采用 q-PCR 和 RT-PCR 分别检测细胞内 HBV 核衣壳中 DNA 和细胞内 HBV RNA 水平。**结果:** 40 ng/mL 的 IFN- γ 处理 HepG2 细胞 48 小时, LGALS3BP mRNA 表达量与对照组相比提高 2.87 倍, 但 LGALS3BP 表达量的变化对细胞增殖无显著作用; 当过表达 LGALS3BP 时, 在 IFN- γ 介导的抗 HBV 过程中, 与对照组相比, HepG2.215 细胞分泌的 HBsAg、HBeAg 以及细胞内 HBV DNA 和 RNA 的相对下降幅度分别为 46%、67%、59%、49%; 与对照组相比, 转染 pCH9-3091 的 HepG2 细胞分泌的 HBsAg、HBeAg 以及细胞内 HBV DNA 和 RNA 的相对下降幅度分别为 67%、53%、60%、29%; 而当干扰 LGALS3BP 时, 在 IFN- γ 介导的抗 HBV 过程中, 与对照组相比, HepG2.215 细胞分泌的 HBsAg、HBeAg 以及细胞内 HBV DNA 和 RNA 的相对上升幅度分别为 46%、67%、59%、49%; 与对照组相比, 转染 pCH9-3091 的 HepG2 细胞分泌的 HBsAg、HBeAg 以及细胞内 HBV DNA 和 RNA 的相对上升幅度分别为 67%、77%、67%、45%。**结论:** LGALS3BP 作为正向调节因子参与 IFN- γ 介导的抗 HBV 过程。

关键词: 乙型肝炎病毒; 干扰素 γ ; 半乳糖凝集素-3 结合蛋白; 增殖**中图分类号:** R-33; R373.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)23-4441-09

LGALS3BP Acts as a Positive Regulator and is Involved in IFN- γ Mediated Anti-HBV Process*

MENG Shi-min[#], CHEN Zhong-wei[#], LI Han-luo, WEI Yan-hong, HU Kang-hong^Δ

(School of Bioengineering and Food Science, Hubei Provincial Key Laboratory of Industrial Microbiology,

Sino-German Biomedical Center, National '111' Center for Cellular Regulation and Molecular Pharmaceutics,

Hubei University of Technology, Wuhan, Hubei, 430068, China)

ABSTRACT Objective: This study was to investigate the role of LGALS3BP in the IFN- γ mediated anti-HBV process in human hepatocytes in vitro. **Methods:** HepG2 and HepG2.215 cell lines were transiently transfected with LGALS3BP overexpression plasmid and its interfering plasmid, and levels of LGALS3BP transcription and translation were detected by means of qRT-PCR and Western Blot. CCK-8 was used to determine the optimal concentration of IFN- γ treatment for HepG2 and HepG2.215 cells, and evaluate the cell proliferation. The effects of IFN- γ treatment on transcription and translation of endogenous LGALS3BP in HepG2 cells were investigated using qRT-PCR and Western Blot. When changing LGALS3BP expression, the effect of IFN- γ stimulation on the exocrine HBsAg and HBeAg were examined using ELISA, and levels of DNA in HBV nucleocapsid and intracellular RNA were evaluated using q-PCR and RT-PCR, respectively. **Results:** After treated with 40 ng/ml IFN- γ for 48 hours, the level of LGALS3BP mRNA in HepG2 cells was 2.87 folds higher than that in the control group, whereas the change of LGALS3BP expression had no significant effect on the cell proliferation. In case that LGALS3BP was overexpressed in HepG2.215 cells during the IFN- γ mediated anti-HBV process, compared with the control group, it was found the relative decrease rates of extracellular HBsAg, HBeAg as well as of the relative decrease rates of intracellular HBV DNA- and RNA levels were 46%, 67%, 59% and 49%, respectively; For HepG2 cells that were transiently transfected with pCH9-3091, compared with the control group, the relative decrease rates of extracellular HBsAg, HBeAg as well as the intracellular viral DNA and RNA were 67%, 53%, 60% and 29%, respectively. In contrast, in case that LGALS3BP was down-regulated by siRNA

* 基金项目: 湖北工业大学高层次人才启动基金项目(337203)

[#] 为共同第一作者

作者简介: 孟诗敏, 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 分子病毒学, 电话: 15623786292, E-mail: mengshimints@126.com;

陈忠伟, 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 分子病毒学, 电话: 18722705141, E-mail: 18722705141@163.com

^Δ 通讯作者: 胡康洪, 男, 博士生导师, 教授, 主要研究方向: 分子病毒学, E-mail: hukh@hbut.edu.cn

(收稿日期: 2021-03-15 接受日期: 2021-04-13)

interfering-plasmid SHLG, in the process of IFN- γ mediated anti HBV for HepG2.215, compared with the control group, the relative increase rates of secreted HBsAg, HBeAg as well as of intracellular viral DNA- and RNA levels were 46%, 67%, 59% and 49%, respectively; For HepG2 that transiently transfected with pCH9-3091, the relative increase rates of HBsAg, HBeAg as well as of intracellular viral DNA and RNA levels were 67%, 77%, 67% and 45%, respectively. **Conclusion:** LGALS3BP is a positive regulator and participates in the IFN- γ mediated anti-HBV process.

Key words: Hepatitis B virus (HBV); Interferon gamma (IFN- γ); Galactose lectin-3 binding protein (LGALS3BP); Proliferation

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R373.21 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2021)23-4441-09

前言

由乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus) 感染引起的慢性乙肝 (chronic hepatitis B, CHB) 一直是全球最为关切的公共健康问题之一。尽管实施乙肝疫苗接种已近 30 余年,在曾有 HBV 感染史的 20 亿人口中, 仍有 2.4 亿人在不同的转归后发展为慢性肝炎^[1]。长期的慢性乙肝感染可以导致肝脏发生不同程度的肝纤维化、肝硬化,甚至发展为肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC), 其中 HBV 感染占全球肝癌病例的 50%~80%^[2]。由此可见,对慢性肝炎恶性发展的防治是必要的,但目前并没有有效的根除治疗^[3]。抗 HBV 治疗的最主要标志是通过抑制机体内 HBV 复制从而实现 HBsAg/HBeAg 的血清学转阴,目前临床上的药物主要从调动机体免疫调节机制和直接地抑制病毒复制两个方面来达到抗病毒的目的,主要的治疗药物包括干扰素和核苷/核苷酸类似物两大类。干扰素 (Interferon, IFN) 具有免疫调节能力和抗病毒能力,且治疗周期短、不会产生耐药性。虽然目前干扰素如干扰素- α 和聚乙二醇干扰素- α 已被批准用于治疗慢性乙肝^[4-6],但存在包括流感样症状、甲状腺功能障碍、胃肠道症状、中性粒细胞减少等不良反应^[7-9]。与 IFN- α 相比,IFN- γ 不仅具有抗病毒功能,还有较好的抗纤维化作用,能更好地预防肝细胞的恶性发展^[10-12]。这预示着 IFN- γ 可能比 IFN- α 更具有治疗慢性乙肝患者的优势,但 IFN- γ 的抗 HBV 机制尚未十分明确。

研究表明 IFN- γ 能引起细胞中内源性半乳糖凝集素-3 结合蛋白 (Galectin-3-binding protein, LGALS3BP) 表达量的增高^[13-15]。LGALS3BP 是 SRCR (Scavenger receptor cysteine-rich) 结构域蛋白超家族中普遍存在的多功能分泌型糖蛋白,当人体受到细菌或病毒感染时,患者血清中能检测到较高浓度的 LGALS3BP^[16-18]。多篇研究证明 LGALS3BP 在细胞被病毒和细菌感染时具有先天免疫功能^[19-21]。Artini 等^[22]研究发现在 HBV 和 HCV 患者血清中, LGALS3BP 存在高水平表达,且 LGALS3BP 的表达水平与肝损伤的严重程度相关。Brakebusch 等^[23]研究表示 IFN- γ 可能是通过提高 LGALS3BP 启动子活性,进而诱导 LGALS3BP 的表达和分泌。此外, Xu 等^[21]研究发现 LGALS3BP 还能与 TRAF6 相结合,增加后者的泛素化,进而激活抗病毒天然免疫反应,而 IFN- γ 与 LGALS3BP 一样,也能增加 TRAF6 的泛素化^[23,24]。Wang 等^[25]研究发现 IFN- α 诱导的 LGALS3BP 表达对于 IFN 抑制 HIV-1 复制是必需的。因此,本研究系统研究 LGALS3BP 在 IFN- γ 介导的抗 HBV 过程中的作用。

1 材料与方

1.1 材料

HepG2 购自中国典型培养物保藏中心 (CCTCC); HepG2.215 细胞和 1.05xHBV (pCH9-3091) 质粒由德国弗莱堡大学 Michael Nassal 教授惠赠;载体 pcDNA3.1 (+) 和载体 pSUPER 由本实验室保存;DMEM 培养基,胎牛血清 FBS, 1% 青霉素和链霉素 (penicillin and streptomycin) 均购于 Gibco 公司; CCK8 试剂购于南京诺唯赞公司;反转录试剂盒 4xHifair® III super Mix plus 和 SYBR Green 实时荧光定量检测试剂盒购于上海翊圣公司; Lipofectamine 2000 试剂和 TRIzol reagent 试剂购于美国 Invitrogen 公司; HBsAg ELISA 试剂盒和 HBeAg ELISA 试剂盒购于上海科华生物工程公司; LGALS3BP 单克隆抗体 (兔抗) 和 β -actin 单克隆抗体 (兔抗) 购于英国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 过表达质粒与干扰质粒的构建 载体 pcDNA3.1 (+) 经 *Hind* III 和 *Not* I 双酶切后,与预先经 PCR 扩增的目的基因 LGALS3BP (NM_005567.4) 连接,构建成重组质粒 pcDNA3.1-LGALS3BP (pcDNA3.1-LG) 用于 LGALS3BP 在细胞中的过表达。

根据干扰基因序列的设计原则设计两对干扰序列,以及一对无关序列,具体序列见表 1。所设计的一对寡核苷酸链,每条均为 60 nt, 5' 端和 3' 端分别含 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切位点,便于与 pSuper 载体连接。5' 端 19 nt 的编码序列与靶基因同源,是干扰正义序列;另一段 19 nt 的序列与其反向互补,是干扰反向序列,正义序列和反向序列在表 1 中以下划线标示,其间有 9 nt 的 TTCAAGAGA 间隔序列形成环状结构,末端加有转录终止信号 TTTTT。具有上述结构特征的二条互补的寡核苷酸链经退火、磷酸化后形成双链 DNA,然后与预先经 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切的含 H1 启动子的线性化 pSuper 载体连接,构建成 pSUPER-shLGALS3BP (pSUPER-shLG),该质粒在细胞内经转录后形成 RNA 自身发卡环,经 Dicer 酶切为 siRNA 发挥干扰作用,无关干扰序列构建的质粒为 pSUPER-Sn (pSUPER-scramble),作为干扰的阴性对照组。

1.2.2 细胞培养和 IFN- γ 处理 HepG2 细胞在含 10% FBS、1% PS 的 DMEM 培养基中培养, HepG2.215 细胞在含 10% FBS、1% PS、200 μ g/mL G418 的 DMEM 培养基中培养,放于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的细胞培养箱。

将待处理的细胞弃去废液,用 PBS 洗两遍,在含有 2% FBS 的培养基中加入 0 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL 的 IFN- γ 处理 HepG2 细胞 72 h,每两天更换一次含有干扰素的培养基。以浓度为 40 ng/mL 的 IFN- γ 分别处理 HepG2 细胞 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h,将细胞放入 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

表 1 引物序列表

Table 1 Primer sequence table

Primer name	Sequence (5'→3')
pcDNA3.1-LG -F	ATG ACC CCT CCG AGG CTC T
pcDNA3.1-LG -R	CTA GTC CAC ACC TGA GGA GTT GG
pSUPER-shLG(1)-F	GATCCCCGGTCAAATATTCTTCTGATTTCAGAGAATCAGAAGAATATTTGACCTTTTTA
pSUPER-shLG(1)-R	AGCTTAAAAAGGTCAAATATTCTTCTGATTCTCTTGAAATCAGAAGAATATTTGACCGGG
pSUPER-shLG(2)-F	GATCCCCCTGTCCATCAGCGTGAATTTCAAGAGAATTCACGCTGATGGACAGGTTTTTA
pSUPER-shLG(2)-R	AGCTTAAAAACCTGTCCATCAGCGTGAATTTCTCTTGAAATTCACGCTGATGGACAGGGGG
pSUPER-shN-F	GATCCCCTTCTCCGAACGTGT- CACGTTTTCAGAGAAACGTGACACGTTTCGGAGAATTTTTA
pSUPER-shN-R	AGCTTAAAAAACGTGACACGTTTCGGA- GAATCTCTTGAATTCTCCGAACGTGTCACGTTGGG

以 0 ng/mL 的 IFN- γ 设置为对照组,其 qRT-PCR 定量结果设置为 1,进行三组独立重复实验。

1.2.3 细胞转染 将 HepG2 和 HepG2.215 细胞按 1.5×10^5 个/cm² 的密度接种于 12 孔细胞培养板中,待细胞汇合度至 60~80 %时,按 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书转染质粒。在 HepG2.215 细胞中每孔转染 1.6 μ g 构建的质粒或 1.6 μ g 其对应的载体质粒;在 HepG2 细胞中,将构建的质粒(0.8 μ g)或其对应的载体质粒(0.8 μ g)与 HBV 质粒(0.8 μ g)一起共同转染细胞。

1.2.4 细胞毒性 将 HepG2.215 和 HepG2 细胞以 10^4 个/孔的量接种于 96 孔板中,培养 12h 后,加入 IFN- γ 浓度依次为 0 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL、160 ng/mL,处理时间为 2 d、4 d、6 d,进行三组独立重复实验。检测时,除去上清后用 PBS 洗 3 次,再配制含 10 % CCK-8 的新鲜不含血清的培养基,将其与细胞孵育 2 h,即可在酶标仪测定各孔 OD_{450nm} 吸光值。将未加药空白对照组 OD₄₅₀ 值设置为相对值 1,其它各孔吸光值与之比较,得到各自细胞生长速率的相对值。

1.2.5 ELISA 检测细胞外 HBsAg 和 HBeAg 分泌 使用乙型

肝炎病毒表面抗原(HBsAg)诊断试剂盒和乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)诊断试剂盒,检测细胞外分泌的病毒抗原水平。细胞实验结束后,收集包括对照组在内的各孔细胞培养液上清。检测前,将待测上清置于 37 °C 培养箱中孵育 30 min,随后按照试剂盒内操作说明书通过 ELX800 酶标仪用 OD_{450nm} 测定各样品中 HBsAg 和 HBeAg 水平;每个样品设 3 个复孔,以对照组的吸光值作为相对值 1,其它各孔吸光值与之比较,得到各自 HBsAg 和 HBeAg 水平的相对值。

1.2.6 qRT-PCR 和 qPCR 参照 TRIzol reagent 说明书提取细胞内总 RNA 抽提细胞内的 RNA,随后按照反转录试剂盒 4xHifair® III super Mix plus 说明书进行反转录。将反转录得到的 cDNA 和提取的病毒 DNA 稀释到合适浓度,配制 PCR 反应体系,使用 SYBR Green Master Mix 试剂盒,在 Roche 的 Light Cycler 96 Real-Time PCR 扩增仪上进行扩增。反应条件为:95 °C 预变性 5 min,45 个循环的扩增反应(包括 95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 10 s 和 72 °C 延伸 10 s),扩增完成后连接一个溶解曲线检测,以确定扩增效果。q-PCR 反应所用引物见表 2。

表 2 qPCR 引物扩增序列

Table 2 qPCR primer sequence table

Primer name	Sequence (5'→3')
β -actin-F	CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC
β -actin-R	CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT
LGALS3BP-F	GTG AAC GAT GGT GAC ATG CG
LGALS3BP-R	GCA CAT TCA CGC TGA TGG AC
HBV-F	ACC AAT CGC CAG TCA GGA AG
HBV-F	CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT

1.2.7 细胞内核衣壳中 HBV DNA 的提取和 qPCR 将待处理的 HepG2.215 和转染 pCH9-3019 的 HepG2 细胞用预冷的 PBS 洗两遍,每孔加 200 μ L 裂解液,充分裂解后离心弃去细胞残渣取上清,提取 HBV DNA。q-PCR 实验中,表 2 中所运用的 HBV-F 及 HBV-R 这对引物的序列,分别对应 HBV 基因组 3105~3125 及 57~77 的位置^[30](Gen Bank 编号 J02203,全长

3182 bp,将 core 基因翻译起始位点定义为 1)。

1.2.8 Western blotting 细胞充分裂解后获取总蛋白质并测定浓度,采用 10 %分离胶和 5 %浓缩胶的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,用湿转法将蛋白质样品转移至聚二氟乙烯膜上,使用的一抗为 1:5000 倍稀释的山羊抗兔 LGALS3BP 多抗(Abcam,英国)4 °C 过夜孵育。随后二抗为 1:5000 倍稀释的山

羊抗兔多抗(Abcam,英国)继续室温孵育2 h,最后用ECL免疫印迹试剂盒(Biorad,美国)成像曝光,用条带密度分析软件Image J对信号进行半定量分析。管家基因 β -actin作为内部对照用于数据校正。

1.2.9 统计学分析 采用统计学软件SPSS 24.0(Statistical Product and Service Solutions),统计性分析所有结果至少进行三次独立实验,且在柱状图中已反映出实验结果的标准偏差(standard deviation, SD)。显著性差异比较使用的是不成对的双尾t值检验方法(unpaired two-tailed Student's t-tests),图中 $*P<0.05$, $**P<0.01$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 LGALS3BP 过表达和干扰质粒的构建

转染LGALS3BP的过表达质粒pcDNA3.1-LG瞬时转入HepG2细胞24 h、48 h和72 h后,细胞内LGALS3BP mRNA的表达水平变化如图1A,以未转入质粒的细胞空白对照组,将对照组的qRT-PCR值检测值设为1,将其他实验组和Ctrl组相比得出相对值。从实验结果可知,转染pcDNA3.1-LG质粒24 h、48 h和72 h后,过表达组mRNA水平与细胞对照组比分别上调73倍、11倍和7倍。该结果说明,瞬时转染pcDNA3.1-LG后,细胞内LGALS3BP转录水平72 h内均明显上调,且瞬时转染24 h后LGALS3BP mRNA表达量最为显著。后续运用IFN- γ 刺激细胞时,采用瞬转24 h后的细胞。

将LGALS3BP的干扰质粒pSUPER-shLG(1)、pSUPER-shLG(2),无关干扰质粒pSUPER-shN和空载质粒组pSUPER瞬时转入HepG2细胞中。qRT-PCR检测转染质粒24 h、48 h和72 h后细胞内LGALS3BP转录水平,实验结果如图1B,以空载质粒组(Psuper)为对照组,其qRT-PCR检测值设为1。从结果中可以看出,转染pSUPER-shLG(1)质粒24 h、48 h和72 h后,其mRNA表达水平与细胞对照组比分别下调0.56倍、0.61倍和0.46倍,而pSUPER-shLG(2)质粒最多下调0.77倍,空载体pSUPER组和无关干扰pSUPER-shN组LGALS3BP mRNA表达量与细胞空白对照组相比在三个时间段无显著变化。由此可见,pSUPER-shLG(1)质粒的干扰效果更为明显,故后续实验选择用pSUPER-shLG(1)进行。Western Blot检测不同质粒瞬时转染48 h后HepG2细胞内的LGALS3BP蛋白表达水平,结果见图1C。通过Image J软件分析各条带的灰度值,以加入等量脂质体转染试剂但未转染任何质粒的HepG2为空白对照组(Ctrl),空白对照组的灰度值设置为100。Ctrl组,pcDNA3.1组和pcDNA3.1-LG的比值为100:109:224,pSUPER组、pSUPER-shN和pSUPER-shLG(1)比值为106:111:71。结果证明通过转染pcDNA3.1-LG质粒和pSUPER-shLG(1)分别上调和下调了细胞内LGALS3BP表达水平。

2.2 IFN- γ 对 HepG2 和 HepG2.215 细胞毒性分析

细胞毒性结果由图2显示,与对照相比,IFN- γ 在检测浓度40 ng/mL以内,药物处理2 d和4 d时,HepG2和HepG2.215细胞相对生存率超过95%,说明细胞生长不受影响。本实验后续实验中,采用IFN- γ 最高工作浓度为40 ng/mL。

2.3 IFN- γ 对 HepG2 细胞内源性 LGALS3BP 的影响

qRT-PCR结果表明细胞内LGALS3BP mRNA水平随着

IFN- γ 浓度的递增而递增,如图3A所示,当IFN- γ 浓度大于40 ng/mL时,IFN- γ 对LGALS3BP的mRNA的影响趋向稳定;当40 ng/mL的IFN- γ 作用72 h时,其表达水平约是对照组的2.9倍。

从图3B可看出,当用40 ng/mL的IFN- γ 处理HepG2细胞时,细胞内LGALS3BP mRNA水平随着作用时间的增加而增加。当作用时间大于48 h后,LGALS3BP mRNA表达量基本趋于稳定;当IFN- γ 处理时间为48 h时,其表达水平约是对照组的2.87倍。

将0 ng/mL、20 ng/mL和40 ng/mL IFN- γ 处理HepG2细胞72 h后裂解细胞,WB检测结果显示,细胞内源LGALS3BP的蛋白表达量与IFN- γ 存在剂量依赖,其结果与qRT-PCR的结果一致。通过Image J软件分析各条带的灰度值,将未经IFN- γ 处理的对照组灰度设置为100,各组比值如图3C所示。

2.4 LGALS3BP 表达水平的增加能增强 IFN- γ 对 HBV 的抑制作用

以HepG2.215细胞和瞬时转染HBV质粒pCH9-3091的HepG2细胞为细胞模型,将过表达质粒pcDNA3.1-LG瞬时转染细胞,转染24 h后加入含40 ng/mL的IFN- γ 的无血清培养基分别处理细胞2 d、4 d和6 d,收集细胞上清检测HBsAg和HBeAg,并从细胞中提取HBV RNA和HBV核衣壳中的DNA,采用qRT-PCR检测细胞内HBV RNA水平的变化和q-PCR检测HBV DNA水平的变化。将转入空载质粒pcDNA3.1且不添加IFN- γ 的实验组设置为对照组,其检测的DNA和RNA结果设置为1,计算其他实验组相对比值,独立实验重复三次。

如图4A、4B所示,在转染HBV质粒的HepG2细胞中,无论是单独加IFN- γ 还是过表达LGALS3BP,HBV的HBeAg并没有明显差别,但当两者都存在的情况下,随着时间的增加,对HBeAg和HBsAg的抑制作用愈发明显,到6 d时,与单独使用IFN- γ 处理的细胞相比,对细胞外分泌的HBeAg而言,Elisa所检测到OD450nm值从0.38下降到0.2(图4A pcDNA-IFN- γ vs pcDNA-LG-IFN- γ),相对下降幅度为53%;对HBsAg,Elisa所检测到OD450nm值从0.45下降到0.3(图4B pcDNA-IFN- γ vs pcDNA-LG-IFN- γ),相对下降幅度为67%(0.3/0.45)。图4E、4F表明,在转染HBV质粒的HepG2细胞中,经IFN- γ 刺激后,pcDNA-LG组与空载质粒组之间无论是HBV DNA水平还是HBV RNA水平的差距变大。图4E中的DNA,由0.60(pcDNA)下降至0.36(pcDNA-LG),相对下降幅度为60%(0.36/0.6);图4F中的RNA由0.42(pcDNA)下降至0.12(pcDNA-LG),相对下降幅度为29%(0.12/0.42)。

如图4C、4D所示,在HepG2.215细胞中,无论是加IFN- γ 还是过表达LGALS3BP,细胞上清液的HBeAg并没有明显变化。但当两者都存在的情况下,随着时间的增加,对HBeAg和HBsAg的抑制作用愈发明显。到6 d时,与单独使用IFN- γ 处理的细胞相比,胞外分泌的HBeAg的OD450 nm值从0.48下降到0.32(图4C pcDNA-IFN- γ vs pcDNA-LG-IFN- γ),相对下降幅度为67%(0.32/0.48);而HBsAg的OD_{450nm}值从0.28下降到0.21(图4D pcDNA-IFN- γ vs pcDNA-LG-IFN- γ),相对下降幅度为75%(0.21/0.28)。图4G、4H表明,HepG2.215细胞中,与未加IFN- γ 组相比较,pcDNA-LG组与空载质粒组之间无论是HBV DNA水平还是RNA水平的差距变大。图4G中

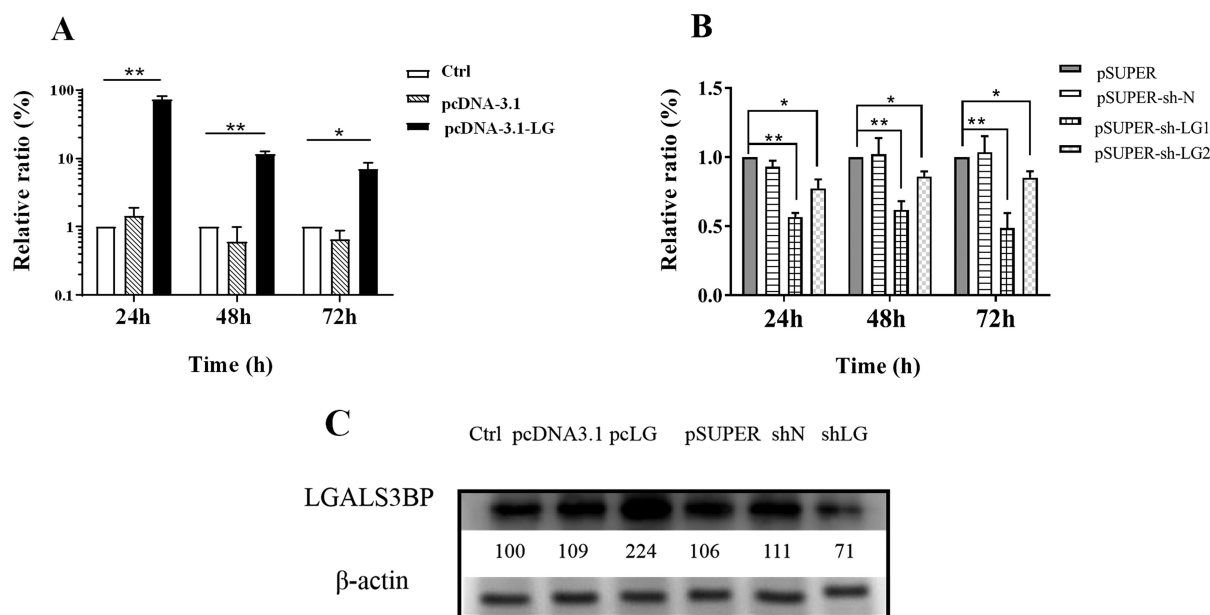


图1 瞬时转染不同质粒后 HepG2 内 LGALS3BP mRNA 相对转录水平和蛋白表达量

Fig. 1 Relative transcription level and protein expression of LGALS3BP mRNA in HepG2 after transient transfection of different plasmids

注: A: qRT-PCR 分析和比较瞬时转染 pcDNA3.1-LG 不同时间后 HepG2 内 LGALS3BP mRNA 相对转录水平。加入等量脂质体转染试剂但未转染任何质粒的 HepG2 为对照组, 其 mRNA 定量数据设置为 1, 转染空载体 pcDNA3.1 的处理组为零对照组。B: qRT-PCR 分析和比较瞬时转染 pSUPER-shLG 不同时间后 HepG2 内 LGALS3BP mRNA 相对转录水平。转染空载体 pSuper 的处理组为对照组, 其 mRNA 定量数据设置为 1; Sn 为无干扰的阴性对照组。C: Western Blot 分析瞬时转染不同质粒 72 h 后 HepG2 细胞内 LGALS3BP 蛋白的表达水平, 对照组加入等量脂质体转染试剂但未转染任何质粒的 HepG2 为空白对照组设置为 100, 所列数字为对应条带强度的量化值, 分别以 β -actin 作为内部参比进行了校正。

Note: A: qRT-PCR was used to analyze and compare the relative transcription level of LGALS3BP mRNA in HepG2 after transient transfection of pcDNA3.1-LG at different times. The HepG2 with the same amount of liposome transfection reagent but not transfected with any plasmid was used as the control group, and the quantitative data of mRNA was set to 1, and the treatment group transfected with empty vector pcDNA3.1 was zero control group.

B: qRT-PCR was used to analyze and compare the relative transcription level of LGALS3BP mRNA in HepG2 after transient transfection of pSUPER-shLG at different times. The treatment group transfected with empty vector pSuper was the control group, and the quantitative data of mRNA was set as the negative control group which had nothing to do with interference. C: the expression level of LGALS3BP protein in HepG2 cells was analyzed by Western Blot after transient transfection of different plasmids for 72 hours. The HepG2 of the control group with the same amount of liposome transfection reagent but not transfected with any plasmid was set to 100 as the blank control group, and the listed number was the quantified value of the corresponding band intensity, which was corrected with β -actin as the internal reference.

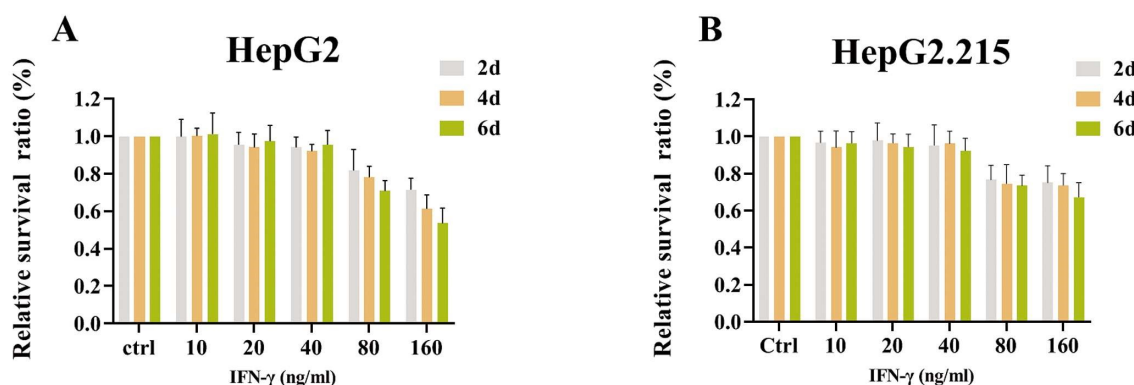


图2 IFN- γ 对 HepG2 和 HepG2.215 细胞的细胞毒性测试

Fig. 2 Cytotoxicity test of IFN- γ to HepG2 and HepG2.215 cells

注: A: CCK-8 方法分析比较在不同浓度 IFN- γ 连续处理 2d/4d/6d 对瞬时转染 pCH9-3091 的 HepG2 细胞的毒性, 将未加 IFN- γ 的对照组 (Ctrl 组) OD_{450} 值设置为 1, 其他实验组的数值与 control 组比较, 得到相对值。B: CCK-8 方法分析比较在不同浓度 IFN- γ 连续处理 2d/4d/6d 对 HepG2.215 细胞的细胞毒性, 将未加 IFN- γ 的对照组 OD_{450} 设置为 1。

Note: A: CCK-8 method was used to analyze and compare the toxicity of continuous treatment of 2 d/4 d/6 d with different concentrations of IFN- γ on HepG2 cells transiently transfected with pCH9-3091. The OD_{450} value of the control group (Ctrl group) without IFN- γ was set to 1, and the values of other experimental groups were compared with those of control group. B: the cytotoxicity of 2 d, 4 d, 6 d continuously treated with IFN- γ at different concentrations on HepG2.215 cells was analyzed and compared by CCK-8 method. The OD_{450} of the control group without IFN- γ was set to 1.

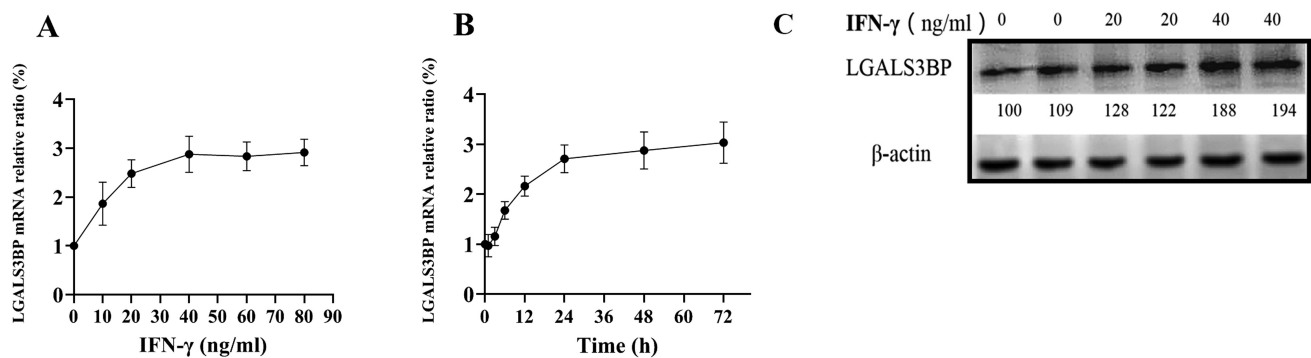


图3 IFN-γ 对 HepG2 细胞内源性 LGALS3BP 的影响

Fig. 3 Effect of IFN-γ on endogenous LGALS3BP in HepG2 cells

注:A:qRT-PCR 分析和比较用不同浓度的 IFN-γ 处理细胞 72 h,细胞内 LGALS3BP mRNA 水平的变化,将不加 IFN-γ 的实验组设置为 1。B:qRT-PCR 分析和比较用浓度为 40 ng/mL 的 IFN-γ 分别处理 HepG2 细胞不同时间后细胞内 LGALS3BP mRNA 水平的变化,将加 IFN-γ 后 0 h 的实验组设置为 1。A 和 B 的结果均以 β-actin 作为内部参比进行了校正,结果是三次独立实验的平均值(* $P<0.05$; ** $P<0.01$)。C:Western Blot 分析和比较分别用 0 ng/mL、20 ng/mL 和 40 ng/mL IFN-γ 处理 HepG2 细胞 72 h 后,细胞内 LGALS3BP 蛋白水平的变化。条带下面所列数字为对应 Western Blot 条带强度的量化值,分别以 β-actin 作为内部参比进行了校正。

Note: A: qRT-PCR analysis the changes of intracellular LGALS3BP mRNA level treated with different concentrations of IFN-γ for 72 hours and compared by without IFN-γ group was set to 1. B: qRT-PCR was used to analyze and compare the changes of intracellular LGALS3BP mRNA level in HepG2 cells treated with IFN-γ at the concentration of 40 ng/mL for different times. The experimental group 0 h after IFN-γ was set to 1. The results of A and B were corrected with β-actin as internal reference, and the results were the average of three independent experiments (* $P<0.05$).

C: Western Blot was used to analyze and compare the changes of intracellular LGALS3BP protein level in HepG2 cells treated with 0 ng/mL, 20 ng/mL and 40ng/mL IFN-γ for 72 hours. The numbers listed below the band are the quantized values of the corresponding Western Blot band strength, which are corrected with β-actin as the internal reference respectively.

的 DNA 由 0.62(pcDNA)下降至 0.4(pcDNA-LG),相对下降幅度为 65%(0.4/0.62);图 4H 中的 RNA 由 0.6(pcDNA)下降至 0.2(pcDNA-LG),相对下降幅度为 33%(0.2/0.6)。

2.5 LGALS3BP 表达水平的降低能削弱 IFN-γ 对 HBV 的抑制作用

将干扰质粒 pSUPER-shLG 转入两种细胞模型,转染 24h 后加入含 40 ng/mL 的 IFN-γ 的无血清培养基分别处理细胞 2 d,4 d 和 6 d,收集细胞上清检测 HBsAg 和 HBeAg,并从细胞中提取 HBV RNA 和 HBV 核衣壳中的 DNA,采用 qRT-PCR 检测细胞内 HBV RNA 水平的变化和 q-PCR 检测病毒 DNA 水平的变化。将转入无关干扰质粒 pSUPER-shN 且不添加 IFN-γ 的实验组设置为对照组,其检测结果设置为 1,计算其他实验组相对比值,独立实验重复三次。

由图 5A、5B 可知,在转入 HBV 质粒的 HepG2 细胞中, LGALS3BP 表达量的降低对 HBeAg 和 HBsAg 无显著影响。而当加入 40 ng/mL 的 IFN-γ 时,HBeAg 的 OD_{450nm} 值由 0.36 上升到 0.47 (图 5A SN+IFN-γ vs shLG+IFN-γ),相对上升幅度为 77%;HBsAg 的 OD_{450nm} 值由 0.30 上升到 0.45(图 5B SN+IFN-γ vs SHLG+IFN-γ),相对上升幅度为 67%。图 5E 显示,加入 40 ng/mL 的 IFN-γ 的 HepG2 细胞中的 DNA 水平从 0.6(SN)上升至 0.9(SHLG),相对上升幅度为 67%;图 5F 中的 RNA 水平从 0.4(SN)上升至 0.88(SHLG),相对上升幅度为 45%。

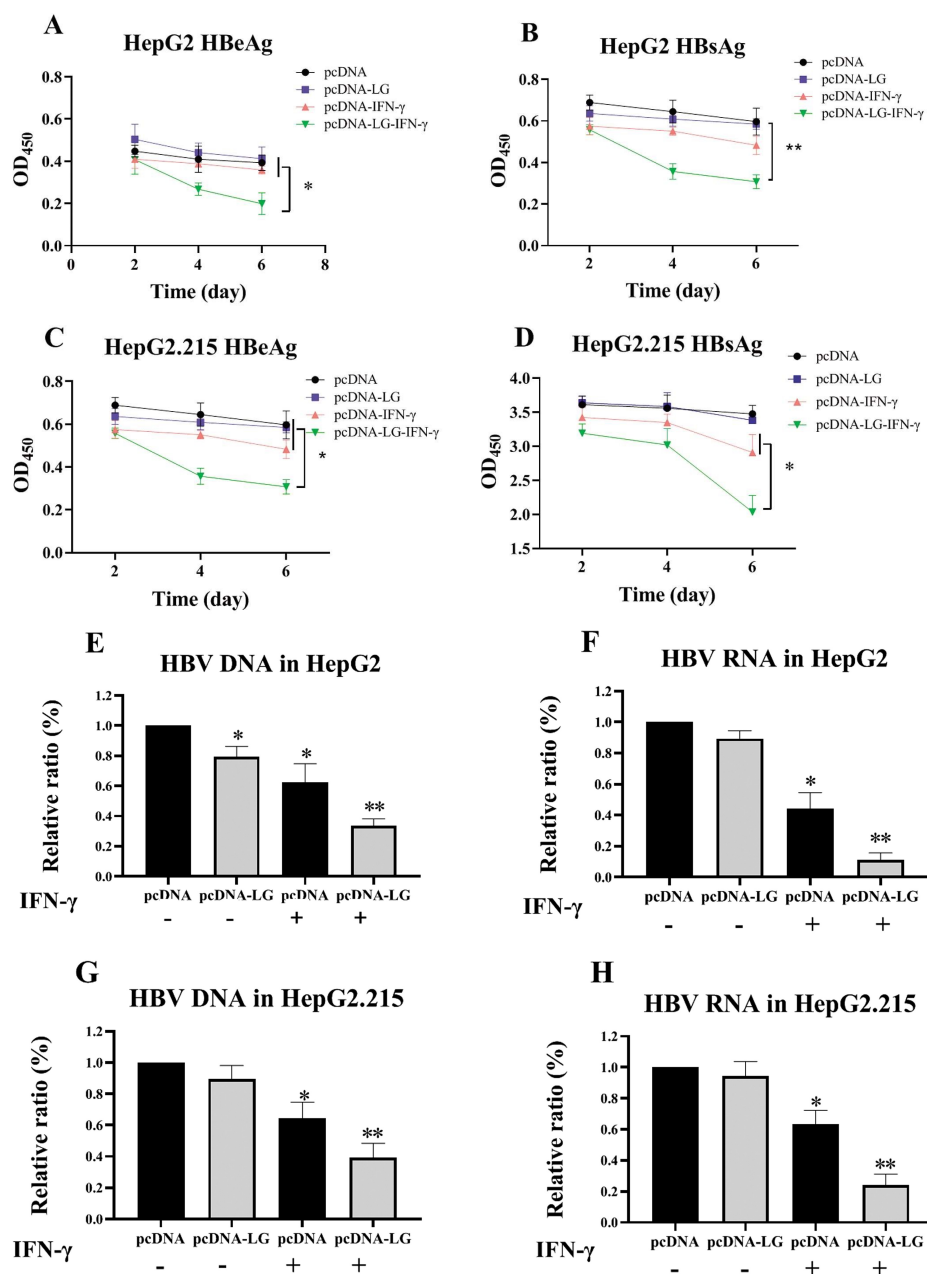
由图 5C、5D 可知,在 HepG2.215 细胞中, LGALS3BP 表达量的降低对 HBeAg 和 HBsAg 无显著影响。当加入 40 ng/mL 的 IFN-γ 时,HBeAg 的 OD_{450nm} 值由 1.67 上升到 2.50 (图 5C SN+IFN-γ vs shLG+IFN-γ),相对上升幅度为 67%;HBsAg 的 OD_{450nm} 值由 1.16 上升到 2.50 (图 5D SN+IFN-γ vs SHLG+

IFN-γ),相对上升幅度为 46%。图 5G 显示,加入 40 ng/mL 的 IFN-γ 的 HepG2.215 细胞中的 DNA 水平,从 0.56(SN)上升至 0.95(shLG),相对上升幅度为 59%;图 5H 中的 RNA 水平,从 0.4(SN)上升至 0.82(shLG),相对上升幅度为 49%。

3 讨论

纵使乙肝疫苗的诞生有效地阻断了 HBV 对未感人群的侵袭,但如何有效治疗 HBV 介导的慢性乙肝依旧存在很大挑战。及时的抗病毒治疗对缓解肝实质的病变和进一步的恶性发展至关重要。IFN-γ 作为细胞免疫的中枢效应器,可以通过多种途径发挥抗病毒功能。它可以通过抗原提呈细胞放大抗原提呈,通过同源 T 细胞相互作用增强抗原识别,增加活性氧和活性氮中间体的产生,从而诱导显著的抗病毒反应^[26]。IFN-γ 被认为可以通过多种途径抑制 HBV, Suri 等^[27]研究发现, IFN-γ 既能通过调节机体免疫反应来抑制 HBV 的转录和复制,还能通过非细胞溶解/损伤机制来直接抑制肝细胞内 HBV 的复制。Heise 等^[28]通过 HBV 转基因小鼠发现, IFN-γ 还可以抑制 HBV 核衣壳的形成,进而影响病毒 RNA 的稳定性且还能将其降解,这主要是因为肝细胞内 P45、P39、P26 这 3 种 HBV DNA 结合蛋白的含量和活性受到了影响,进而影响了 HBV DNA 的转录及 RNA 翻译。此外, IFN-γ 能阻碍含有 HBVpgRNA 的核衣壳蛋白的组装^[29,30],也造成细胞核中 HBV RNA 不稳定,从而促进宿主 RNA 酶对 HBV RNA 的破坏^[31,32];还可有效下调 HBV DNA 的复制中间体^[33,34]。

本研究以 HepG2 和 HepG2.2.15 二种细胞为模型,发现 IFN-γ 上调 LGALS3BP 内源性的表达,并验证了 IFN-γ 的抗 HBV 作用。IFN-γ 刺激细胞后,对细胞外分泌的 HBsAg 有抑制

图4 LGALS3BP 表达水平的增加能增强 IFN- γ 对 HBV 的抑制作用Fig. 4 The increase of LGALS3BP expression level can enhance the inhibitory effect of IFN- γ on HBV

注:A、B: ELISA 分析比较在 HepG2.215 细胞中 LGALS3BP 表达量的增加时, IFN- γ 处理 2、4、6 天后检测细胞上清中 HBeAg 和 HBsAg 表达水平变化; E、F: qRT-PCR 和 q-PCR 法检测在 HepG2.215 细胞中 LGALS3BP 表达量增加时, IFN- γ 处理 6 天后细胞内病毒核衣壳中 DNA 水平的变化和细胞内 HBV RNA 水平的变化。C、D: ELISA 分析比较在瞬转 pCH9-30911 后的 HepG2 细胞中 LGALS3BP 表达量增加时, IFN- γ 处理 2、4、6 天后细胞上清中 HBeAg 和 HBsAg 水平变化; G、H: 用 qRT-PCR 和 q-PCR 法检测在转染 HBV 质粒的 HepG2 细胞中 LGALS3BP 表达量的增加时, IFN- γ 处理后细胞内病毒 DNA 水平的变化和 HBV RNA 水平的变化。将转入空载质粒 pcDNA3.1 且没有加入 IFN- γ 的实验组设置为对照组, 对照组设置成 1。将其他实验组和对照组相比得出相对值, 独立实验重复三次, (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。

Note: A, B: ELISA analysis was used to compare the changes of HBeAg and HBsAg expression in the supernatant of HepG2.215 cells treated with IFN- γ for 2, 4 and 6 days, and qRT-PCR and q-PCR methods were used to detect the changes of DNA level and HBV RNA level in the nucleocapsid of HepG2.215 cells treated with IFN- γ for 6 days when the expression of IFN- γ increased. A, B: when the expression of IFN- γ increased in HepG2.215 cells, the expression of HBeAg and HBsAg in the supernatant was detected 2, 4 and 6 days after treatment, and the changes of DNA level and intracellular HBV RNA level were detected by qRT-PCR and q-PCR methods. C, D: ELISA analysis was used to compare the changes of HBeAg and HBsAg levels in the supernatant of HepG2 cells treated with IFN- γ for 2, 4 and 6 days when the expression of LGALS3BP increased after transient pCH9-30911. G, H: when the expression of LGALS3BP increased in HepG2 cells transfected with HBV plasmid, the changes of viral DNA and HBV RNA levels were detected by qRT-PCR and q-PCR methods. The experimental group which was transferred into the unloaded plasmid pcDNA3.1 and did not add IFN- γ was set as the control group, and the control group was set as 1. The relative values of other experimental groups were compared with those of the control group, and the independent experiments were repeated three times (* $P < 0.05$, $P < 0.01$).

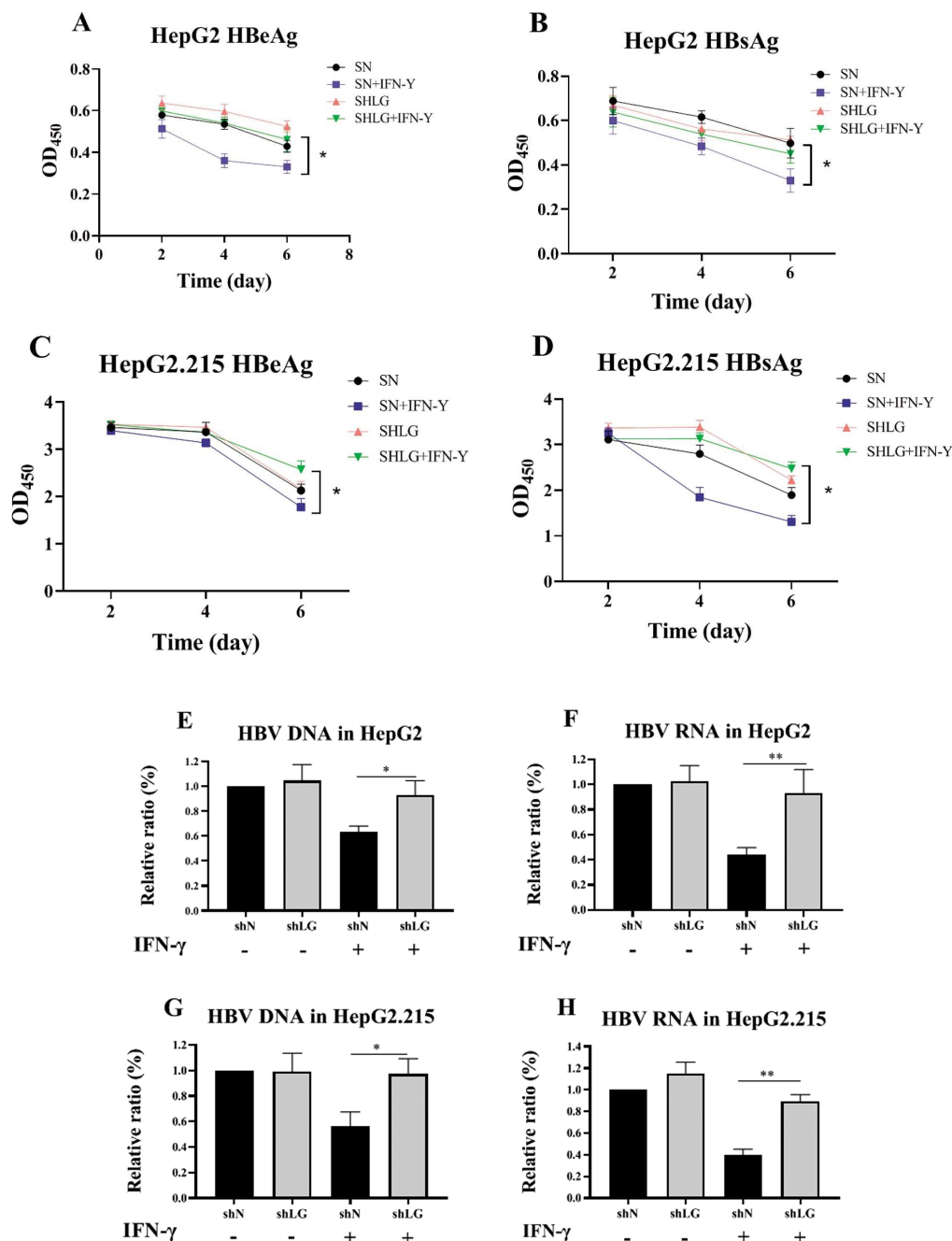


图 5 LGALS3BP 表达水平的降低能削弱 IFN- γ 对 HBV 的抑制作用

Fig. 5 The decrease of LGALS3BP expression level can weaken the inhibitory effect of IFN- γ on HBV

注: A、B: ELISA 分析比较 HepG2.215 细胞中 LGALS3BP 表达量的减少时, IFN- γ 处理后检测细胞上清中 HBeAg 和 HBsAg 表达水平变化; E、F: qRT-PCR 和 q-PCR 法检测在 HepG2.215 细胞中 LGALS3BP 表达量的减少时, IFN- γ 处理后细胞内病毒 DNA 水平的变化和 HBV RNA 水平的变化。C、D: ELISA 分析比较在转染 HBV 质粒的 HepG2 细胞中 LGALS3BP 表达量的减少时, IFN- γ 处理后检测细胞上清中 HBeAg 和 HBsAg 表达水平变化; G、H: qRT-PCR 和 q-PCR 法检测在转染 HBV 质粒的 HepG2 细胞中 LGALS3BP 表达量的减少时, IFN- γ 处理后细胞内病毒 DNA 水平的变化和 HBV RNA 水平的变化。将转入空载质粒 pcDNA3.1 且没有加入 IFN- γ 的实验组设置为对照组, 对照组设置成 1。

将其他实验组和对照组相比得出相对值, 独立实验重复三次, (* P <0.05; ** P <0.01)。

Note: A, B: ELISA analysis was used to compare the changes of HBeAg and HBsAg expression in the supernatant of HepG2.215 cells treated with IFN- γ , while qRT-PCR and q-PCR methods were used to detect the changes of viral DNA level and HBV RNA level after IFN- γ treatment in HepG2.215 cells when the expression of LGALS3BP decreased in HepG2.215 cells. C, D: when the expression of LGALS3BP in HepG2 cells transfected with HBV plasmid decreased, the expression of HBeAg and HBsAg in the supernatant was detected after IFN- γ treatment, and the changes of LGALS3BP expression and HBV RNA level in HepG2 cells transfected with HBV plasmid were detected by qRT-PCR and q-PCR methods. The changes of DNA level and HBV RNA level were detected after IFN- γ treatment. The experimental group which was transferred into the unloaded plasmid pcDNA3.1 and did not add IFN- γ was set as the control group, and the control group was set as 1. The relative values of other experimental groups were compared with those of the control group, and the independent experiments were repeated three times (* P <0.05, P <0.01).

作用,但对 HBeAg 无抑制作用,且不同的细胞模型对 IFN- γ 的敏感度不同,在瞬时转染 HBV 质粒的 HepG2 细胞系中效果更加明显。IFN- γ 还能下调细胞内 HBV DNA 的复制和转录水平,但对 HBV 的转录水平的抑制作用更显著。这与其他研究组得到的 IFN- γ 抑制 HBV 复制,但 HBV 抗原表达基本不受影响的结论相呼应^[35,36]。Wieland 等^[37]研究显示 IFN- γ 能够抑制含有 pgRNA 的核衣壳的组装。Xu 等^[38]在小鼠永生化 AML12 细胞系中研究发现,IFN- γ 具有抗 HBV 作用,有效地减少胞内 HBV 核衣壳数量,并且以蛋白酶体依赖的方式有选择地促进具有复制能力的核衣壳衰变。

本研究在改变 LGALSBP 表达水平的基础上探究 IFN- γ 的抗 HBV 作用。实验结果表明,在过表达 LGALS3BP 的情况下,IFN- γ 对 HBV 的抑制作用提高。反之,当 LGALS3BP 的表达量降低时,IFN- γ 对 HBV 的抑制作用被削弱。因此,我们得到结论 LGALS3BP 作为正向调节因子参与 IFN- γ 介导的抗 HBV 作用。

此外,在本研究中也发现,在 HepG2 中转染 HBV 质粒时, LGALS3BP 过表达也会具有抗 HBV 的作用,这与文献报道的结果一致,但 LGALS3BP 对 HBV 的抑制效果不如文献报道的显著,这可能是由于所采用的细胞模型不同所造成的差别。本研究只是初步在两种细胞模型中证明了 IFN- γ 能诱导 LGALS3BP 的表达, LGALS3BP 和 IFN- γ 一起发挥的抗病毒作用效果更加显著,但是在组织标本或动物模型中是否有一致的结论还有待研究。

总之,IFN- γ 在临床上治疗 HBV 患者上有巨大潜能,但由于机制不明和副作用使其广泛使用受限。本研究发现 LGALS3BP 能和 IFN- γ 一起协同抗病毒作用,为深入研究 IFN- γ 抗 HBV 机制及 CHB 的临床治疗提供了新思路。

参考文献(References)

- [1] Fanning GC, Zoulim F, Hou J, et al. Therapeutic strategies for hepatitis B virus infection: towards a cure [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18 (11): 827-844
- [2] Venook AP, Papandreou C, Furuse J, et al. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective[J]. *Oncologist*, 2010, 15(Suppl 4): 5-13
- [3] De Andrea M, Ravera R, Gioia D, et al. The interferon system: an overview[J]. *Eur J Paediatr Neurol*, 2002, 6 Suppl A: A41-6; discussion A55-8
- [4] Lee S, Baldridge MT. Interferon-Lambda: A Potent Regulator of Intestinal Viral Infections[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 749
- [5] Tan G, Song H, Xu F, et al. When Hepatitis B Virus Meets Interferons [J]. *Front Microbiol*, 2018, 18(9): 1611
- [6] Liang TJ, Block TM, McMahon BJ, et al. Present and future therapies of hepatitis B: From discovery to cure [J]. *Hepatology*, 2015, 62(6): 1893-908
- [7] Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009 [J]. *Hepatology*, 2009, 50(3): 661-2
- [8] Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, et al. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial [J]. *Lancet*, 2005, 365(9454): 123-9
- [9] Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX, et al. Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(26): 2682-95
- [10] Weng HL, Wang BE, Jia JD, et al. Effect of interferon-gamma on hepatic fibrosis in chronic hepatitis B virus infection: a randomized controlled study[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2005, 3(8): 819-28
- [11] 翁红雷, 蔡卫民, 王宝恩, 等. 重组干扰素 γ 治疗慢性乙型肝炎肝纤维化临床研究[J]. *中华医学杂志*, 2003, 83: 943-947
- [12] Lin FC, Young HA. Interferons: Success in anti-viral immunotherapy [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014, 25: 369-376
- [13] Brakebusch C, Jallat B, Fusco O, et al. Expression of the 90K immunostimulator gene is controlled by a promoter with unique features[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 3674-3682
- [14] Zeimet AG, Stadlmann S, Natoli C, Anticancer Res, et al. Peritoneal mesothelial cells as a significant source of ascitic immunostimulatory protein 90K[J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(6): 4507-11
- [15] Zeimet AG, Marth C, Fuchs D, et al. Immunostimulating protein 90K in ovarian carcinoma [J]. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch*, 1996, 36 (1): 44-5
- [16] Hepojoki J, Strandin T, Hetzel U, et al. Acute hantavirus infection induces galectin-3-binding protein [J]. *Gen Virol*, 2014, 95: 2356-2364
- [17] Liu KT, Liu YH, Chen YH, et al. Serum galectin-9 and galectin-3-binding protein in acute dengue virus infection [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): 832
- [18] Rasmussen NS, Nielsen CT, Houen G, et al. Humoral markers of active Epstein-Barr virus infection associate with anti-extractable nuclear antigen autoantibodies and plasma galectin-3 binding protein in systemic lupus erythematosus[J]. *Lupus*, 2016, 25: 1567-1576
- [19] Kalayci O, Birben E, Tinari N, et al. Role of 90K protein in asthma and TH2-type cytokine expression[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2004, 93(5): 485-92
- [20] Itindag ZZ, Marth C, Werner-Felmayer G, et al. Tumor-associated antigen 90K activates myelomonocytic cell line THP-1 [J]. *Cancer Lett*, 1996, 107(1): 143-148
- [21] Xu G, Xia Z, Deng F, et al. Inducible LGALS3BP/90K activates antiviral innate immune responses by targeting TRAF6 and TRAF3 complex[J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15(8): e1008002
- [22] Artini M, Natoli C, Tinari N, et al. Elevated serum levels of 90K/MAC-2 BP predict unresponsiveness to alpha-interferon therapy in chronic HCV hepatitis patients[J]. *J Hepatol*, 1996, 25(2): 212-217
- [23] Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- γ [J]. *Nature*, 2000, 408(6812): 600-605
- [24] Jang HD, Hwang HZ, Kim HS, et al. C-Cbl negatively regulates TRAF6-mediated NF- κ B activation by promoting K48-linked polyubiquitination of TRAF6[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2019, 24: 29
- [25] Wang Q, Zhang X, Han Y, et al. M2BP inhibits HIV-1 virion production in a vimentin filaments-dependent manner [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32736
- [26] Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions [J]. *J Leukoc Biol*, 2004, 75(2): 163-89
- [27] Suri H, Ren W, Ma W, et al. Interleukin-21 responses in patients with chronic hepatitis B [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2014, 35 (2): 134-142

- 医结合医师分会心血管病学专家委员会. 慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(2): 133-141
- [7] Fiorenzato E, Weis L, Falup-Pecurariu C, et al. Montreal Cognitive Assessment (MoCA) and Mini-Mental State Examination (MMSE) performance in progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy[J]. J Neural Transm, 2016, 123(12): 1-8
- [8] Yap J, Lim FY, Gao F, et al. Correlation of the New York Heart Association classification and the 6 minute walk distance: a systematic review[J]. Clin Cardiol, 2015, 38(10): 621-628
- [9] 邱伯雍. 慢性心力衰竭流行病学及防治研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2017, 31(6): 619-621
- [10] 王宙, 周琳, 刘洋, 等. 慢性心力衰竭的流行病学研究现状及其防治研究进展[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, 11(8): 1022-1024
- [11] De Santo NG, Cirillo M, Perna A, et al. Heart failure [J]. Semin Nephrol, 2018, 25(6): 404-407
- [12] Danzi S, Klein I. Thyroid abnormalities in heart failure[J]. Heart Fail Clin, 2020, 16(1): 1-9
- [13] Benseor IM, Lotufo PA. Subclinical thyroid diseases as a non-classical risk factor for cardiovascular diseases [J]. Sao Paulo Med J, 2020, 138(2): 95-97
- [14] Oudemans EA, Greving JP, Hooghiemstra AM, et al. Nonfocal transient neurological attacks are related to cognitive impairment in patients with heart failure[J]. J Neurol, 2019, 266(8): 2035-2042
- [15] Anna F, Roxane S, Homola GA, et al. Cognitive deficits and related brain lesions in patients with chronic heart failure [J]. Jacc-heart Fail, 2018, 6(7): 583-592
- [16] Li X, Jia S, Zhou Z, et al. The role of the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) and its memory tasks for detecting mild cognitive impairment[J]. Neurol Sci, 2018, 39(6): 1029-1034
- [17] 吕思奇, 谭慧琼, 刘少帅, 等. 认知功能减低与心力衰竭患者预后关系的分析[J]. 中华心血管病杂志, 2020, 48(2): 136-141
- [18] 王芳梅, 程新春. 老年慢性心力衰竭患者血浆 CTGF、iPTH、甲状腺激素水平与心功能的相关性[J]. 武警医学, 2019, 30(4): 299-302
- [19] Aam A, Tam B, Hm C, et al. Subclinical thyroid dysfunction and cardiovascular consequences: An alarming wake-up call?[J]. Trends cardiovas med, 2020, 30(2): 57-69
- [20] 刘哲, 王晶. 老年心力衰竭患者 BNP、甲状腺激素检测对心功能、预后判断的价值[J]. 中国心血管病研究, 2018, 16(2): 160-162
- [21] 陶锐, 侯青, 刘杨. 血浆甲状腺激素水平对老年慢性心力衰竭病人病情严重程度及预后的评估价值[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(20): 3024-3027
- [22] 包秋红, 杜海燕, 贾海玉, 等. 血清 B 型脑钠肽、糖类抗原 125 及甲状腺激素水平与慢性心力衰竭患者心功能的相关性研究[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(7): 1313-1316
- [23] 王芳芳, 吴新华, 陈章荣, 等. 云南地区慢性心力衰竭患者甲状腺激素水平变化特点的调查分析 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2018, 26(12): 80-83
- [24] Kevin R, Yuen AD, Lin D, et al. The impact of hypothyroidism and heart failure on hospitalization risk [J]. Thyroid, 2018, 28 (9): 1094-1100
- [25] Tohidi M, Derakhshan A, Akbarpour S, et al. Thyroid dysfunction states and incident cardiovascular events: The tehran thyroid study[J]. Horm Metab Res, 2018, 50(1): 37-43
- [26] Nambiar L, Li A, Howard A, et al. Left ventricular end-diastolic volume predicts exercise capacity in patients with a normal ejection fraction[J]. Clin cardiol, 2018, 41(5): 628-633
- [27] Nelson MD, Wei J, Merz CNB. Coronary microvascular dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction as female-pattern cardiovascular disease: the chicken or the egg?[J]. Eur Heart J, 2018, 39(10): 850-852
- [28] Hafe MV, Neves JS, Vale C, et al. The impact of thyroid hormone dysfunction on ischemic heart disease[J]. Endocr Connect, 2019, 8(5): R76-R90
- [29] Razvi S, Jabbar A, Pingitore A, et al. Thyroid hormones and cardiovascular function and diseases [J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 71 (16): 1781-1796
- [30] Mele D, Nardoza M, Ferrari R. Left ventricular ejection fraction and heart failure: an indissoluble marriage?[J]. Eur J Heart Fail, 2018, 20 (3): 427-430

(上接第 4449 页)

- [28] Heise T, Guidotti LG, Cavanaugh VJ, et al. Hepatitis B virus RNA-binding proteins associated with cytokine-induced clearance of viral RNA from the liver of transgenic mice[J]. J Virol, 1999, 73(1): 474-81
- [29] Wieland SF, Guidotti LG, Chisari FV. Intrahepatic induction of a/b interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice[J]. J Virol, 2000, 74: 4165-4173
- [30] Robek MD, Wieland SF, Chisari FV. Inhibition of hepatitis B virus replication by interferon requires proteasome activity [J]. J Virol, 2002, 76(7): 3570-4
- [31] Tsui LV, Guidotti LG, Ishikawa T, et al. Posttranscriptional clearance of hepatitis B virus RNA by cytotoxic T lymphocyte-activated hepatocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 12398-12402
- [32] Horke S, Reumann K, Rang A, et al. Molecular characterization of the human La protein/hepatitis B virus RNA.B interaction in vitro[J]. J Biol Chem, 2002, 277: 34949-34958
- [33] Guidotti LG, Rochford R, Chung J, et al. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection [J]. Science, 1999, 284: 825-829
- [34] Guidotti LG, McClary H, Loudis JM, et al. Nitric oxide inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice [J]. J Exp Med, 2000, 191: 1247-1252
- [35] Hayashi Y, Koike K. Interferon inhibits hepatitis B virus replication in a stable expression system of transfected viral DNA [J]. J Virol, 1989, 63(7): 2936-40
- [36] Pasquetto V, Wieland SF, Uprichard SL, et al. Cytokine-sensitive replication of hepatitis B virus in immortalized mouse hepatocyte cultures[J]. J Virol, 2002, 76(11): 5646-53
- [37] Wieland SF, Eustaquio A, Whitten-Bauer C, et al. Interferon prevents formation of replication-competent hepatitis B virus RNA-containing nucleocapsids[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(28): 9913-7
- [38] Xu C, Guo H, Pan XB, et al. Interferons accelerate decay of replication-competent nucleocapsids of hepatitis B virus [J]. J Virol, 2010, 84(18): 9332-40