

本文引文格式:侯冰,高玉雪,杨鹏翔,等.脱氧胆酸对HBV复制及肝癌细胞自噬影响的研究[J].右江民族医学院学报,2023,45(4):545-551.

【论著与临床报道】

脱氧胆酸对HBV复制及肝癌细胞自噬影响的研究

侯冰^{1,2},高玉雪²,杨鹏翔²,关媛月²,刘芃祥²,杨静¹,陈德喜²

1. 包头医学院基础医学与法医学院,内蒙古 包头 014040;
2. 首都医科大学附属北京佑安医院北京肝病研究所,北京 100069)

摘要:目的 观察脱氧胆酸(deoxycholic acid,DCA)对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)复制的影响,及其对肝癌细胞自噬的影响程度,探讨其可能的作用机制。方法 观察不同浓度DCA对HepG2及HepG2.215细胞活性的影响,进而测定不同浓度DCA对HepG2.215细胞HBV DNA的载量及HBsAg、HBeAg和HBcAg表达水平的影响,蛋白免疫印迹检测自噬水平;将HepG2.215细胞转染乙型肝炎病毒X(HBX)蛋白突变表达质粒后,观察HBX对DCA处理的HepG2及HepG2.215细胞的HBV DNA载量以及HBsAg、HBeAg和HBcAg表达水平的影响,蛋白免疫印迹检测细胞自噬水平。**结果** ①CCK-8实验结果显示随着DCA浓度的升高,细胞活力均呈现梯度下降趋势($P < 0.01$);②HepG2.215细胞的HBV DNA载量以及HBsAg、HBeAg、HBcAg水平均随着DCA浓度的提高而上升($P < 0.01$);③HepG2与HepG2.215细胞的LC3-II/LC3-I比值升高($P < 0.01$),HepG2细胞的p62蛋白水平随着DCA浓度的升高而下降($P < 0.01$),HepG2.215细胞的p62蛋白水平随着DCA浓度的升高而上升($P < 0.01$);④未经DCA处理的对照组、经100 $\mu\text{mol/L}$ DCA处理的对照组、未经DCA处理的HBX突变表达质粒转染组、经100 $\mu\text{mol/L}$ DCA处理的HBX突变表达质粒转染组的HBV DNA载量、HBsAg、HBeAg、HBcAg水平、HBX蛋白水平以及LC3-II/LC3-I比值均呈现依次上升趋势($P < 0.01$),p62蛋白水平呈现依次下降趋势($P < 0.01$)。**结论** ①DCA处理可以降低肝癌细胞的活力;②DCA可以促进HBV的复制;③DCA可以促进HepG2细胞的自噬,在HepG2.215细胞中促进不完全自噬;④DCA可以通过促进HBX蛋白的合成来加强HBV的复制,进而促进不完全自噬。

关键词:脱氧胆酸;乙型肝炎病毒;自噬;肝肿瘤

中图分类号:R373.21

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2023)04-0545-07

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.04.001

Study on the effects of deoxycholic acid on HBV replication and autophagy in hepatocellular carcinoma cells

Hou Bing^{1,2}, Gao Yuxue², Yang Pengxiang², Guan Yuanyue²,
Liu Pengxiang², Yang Jing¹, Chen Dexi²

1. School of Basic Medicine and Forensic Medicine, Baotou Medical College, Baotou 014040, Inner Mongolia, China;
2. Beijing Institute of Hepatology, Beijing You An Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of deoxycholic acid (DCA) on the hepatitis B virus (HBV) replication and the extent of autophagy in hepatocellular carcinoma cells, and explore the possible underlying

基金项目:国家自然科学基金项目(82073676);北京市自然科学基金—北京市教委联合资助项目(KZ202010025037);包头医学院研究生科研创新项目(bycx2021001)

第一作者简介:侯冰(1997—),男,硕士,临床医学初级检验师,研究方向:生物学,E-mail:786256766@qq.com

通讯作者简介:杨静(1982—),女,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:生物学,E-mail:yangjing2569@qq.com

共同通讯作者简介:陈德喜(1961—),男,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:肝病研究工作,E-mail:dexichen@ccmu.edu.cn

mechanisms. **Methods** The study assessed the effects of different DCA concentrations on the viability of HepG2 and HepG2.215 cells. Additionally, the impact of different DCA concentrations on the HBV DNA load and expression levels of HBsAg, HBeAg, and HBcAg were evaluated in HepG2.215 cells. Western Blot analysis was performed to assess the levels of autophagy. Moreover, after HepG2.215 cells were transfected with a plasmid of mutant expression in hepatitis B virus X (HBX) protein, the effects of HBX on HBV DNA load and expression levels of HBsAg, HBeAg, and HBcAg were observed in both HepG2 and HepG2.215 cells treated with DCA. Western Blot was used to test cellular autophagy levels. **Results** ① The results of the CCK-8 experiment showed a gradient decrease in cell viability with increasing concentrations of DCA ($P < 0.01$). ② The HBV DNA load and the levels of HBsAg, HBeAg and HBcAg were elevated with increasing concentrations of DCA in HepG2.215 cells ($P < 0.01$). ③ The ratio of LC3-II/LC3-I was increased in both HepG2 and HepG2.215 cells ($P < 0.01$). The protein levels of p62 were decreased with increased DCA concentrations in HepG2 cells ($P < 0.01$), while it was increased in HepG2.215 cells ($P < 0.01$). ④ The HBV DNA load, HBsAg, HBeAg, HBcAg levels, HBX protein levels, and the ratio of LC3-II/LC3-I showed graded increase (an increasing trend in turn) ($P < 0.01$), and the protein level of p62 showed a sequential decrease ($P < 0.01$) in the control group without DCA treatment, the control group treated with $100 \mu\text{mol/L}$ DCA, the group transfected with the HBX mutant plasmid without DCA treatment and the group transfected with the HBX mutant plasmid treated with $100 \mu\text{mol/L}$ DCA. **Conclusion** ① DCA treatment can reduce the viability of hepatocellular carcinoma cells; ② DCA can promote HBV replication; ③ DCA can promote autophagy in HepG2 cells and facilitate incomplete autophagy in HepG2.215 cells; ④ DCA can enhance HBV replication by promoting the synthesis of HBX protein, which accelerates incomplete autophagy.

Key words: deoxycholic acid; hepatitis B virus; autophagy; liver tumor

人体中的胆汁酸是由肝脏合成并储存在胆囊中,同时肝脏也是人体内唯一具有胆汁酸合成所需的所有酶的器官^[1]。胆汁酸根据其来源可分为两大类:初级胆汁酸与次级胆汁酸。初级胆汁酸是由肝脏初步合成,包括胆酸与鹅脱氧胆酸,并且与甘氨酸或牛磺酸结合后成为初级结合胆汁酸存储于胆囊中;初级胆汁酸释放进入肠道后,在肠道菌群的作用下转化为次级游离胆汁酸,包括脱氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)与石胆酸。当胆汁酸经胆囊释放通过肠道时,约 95% 的胆汁酸会参加胆汁酸的肝肠循环,在此过程中胆汁酸在末端回肠的刷状边界膜中被重吸收,由门静脉入血,流向肝脏并被肝细胞吸收,而最终剩余约 5% 的胆汁酸会随着粪便排出。胆汁酸对于人体的脂类代谢来说十分重要,胆汁酸的肠肝循环则保证了人体内胆汁酸池的稳定^[2]。

自噬是一个将自身的细胞质蛋白或细胞器包被进入囊泡,并与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解其所包裹的内容物的过程,细胞通过自噬可以实现其本身的新陈代谢^[3]。目前已经发现许多可以促进自噬发生发展的信号分子以及信号通路,常见的信号通路包括 PI3K-AKT-mTOR 信号通路、AMPK 信号通路以及 MAPK 信号通路,而这些通路中 Beclin-1、Bcl-2、LC3-I、LC3-II、p62 等蛋白产物是最常见的检测分子^[4-8]。

由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染导致的慢性乙型肝炎是我国常见的慢性传染病,在我国因 HBV 感染而导致的肝硬化占比达到 60%,而肝癌占比达到 80%^[9]。LI J H 等^[10]发现,HBV 可诱导肝细胞的自噬,同时 HBV 的复制也需要自噬相关蛋白的参与,如 HBV 的包膜延长需要自噬过程中的重要分子 LC3-II 的参与,而 LC3-II 又是自噬溶酶体的必要组成分子,因此 HBV 的复制抑制了自噬溶酶体的形成与降解,导致不完全自噬的发生^[11-12]。在这种自噬过程中 LC3-II 被 HBV 捕获并用于自身包膜的延长,促进了 HBV 的复制,同时因自噬溶酶体的形成与降解受阻,导致被自噬溶酶体包裹并降解的 HBV 数量减少,这是 HBV 产生免疫逃逸的一种机制。因此肝细胞的不完全自噬促进了 HBV 的复制,进一步加重了 HBV 的感染。

胆汁酸对于自噬的影响具有双面性,既可以促进自噬的发生发展,又可以抑制自噬的发展进程,其中膜受体 TGR5 与核受体 FXR 在这里起到重要作用^[13-14]。ROESLY H B 等^[15-17]表明,DCA 可以通过 G 蛋白偶联受体-5(TGR5)与 Beclin-1 途径促进自噬的发生,进而促进了食管腺癌的发生。而在胆汁酸的肝肠循环中,经过肝细胞的 DCA 占比可达到至少 10%,在肝硬化、肝癌、胆汁淤积等情况下,又增加了

DCA 与细胞接触及相互作用的时间,而 DCA 在慢性乙型肝炎中对 HBV 复制以及肝细胞生物学效应的影响还缺乏相应的研究,为此,本文将重点观察 DCA 对 HBV 复制的影响及自噬在其中的作用,并探讨可能的机制,为研究更精准、有效地治疗 HBV 感染导致的慢性乙型肝炎的手段提供理论依据。

1 实验材料与方法

1.1 主要实验材料 HepG2 与 HepG2.215 肝癌细胞系(中国科学院上海生命科学院细胞库)、标准纯度的 DCA(美国 Sigma 公司)、Elisa 检测试剂盒(上海科华生物工程股份有限公司)、HBV 核酸定量检测试剂盒(长沙圣湘生物科技股份有限公司)、LC3-I/II 抗体(美国 cell signaling technology 公司,4108S)、p62 抗体(美国 cell signaling technology 公司,5114S)、HBX 抗体(美国 abcam 公司,ab39716)、HBcAg 抗体(美国 abcam 公司,ab8637)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠/兔二抗(美国 cell signaling technology 公司,7076S,7074S)、AF488 荧光标记的二抗(美国 Thermo Fisher 公司,A-11008)、HBX 突变表达质粒(北京博迈德基因技术有限公司, BM4015)、X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 质粒助转剂(瑞士 Roche 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 CCK-8 检测细胞毒性 将生长状态良好的 HepG2 与 HepG2.215 细胞接种于 96 孔板中,每孔 1×10^4 个细胞,孵育 12 h 后更换为含有 0 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、150 $\mu\text{mol/L}$ DCA 的培养基,孵育 48 h 后每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后读取吸光度。

1.2.2 HBsAg、HBeAg 以及 HBV DNA 载量测定 将细胞铺于 6 孔板中,每孔 6×10^5 个细胞,孵育 12 h 后更换为含有 0 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ DCA 浓度的培养基,二氧化碳培养箱孵育 72 h 后收集培养基上清用于 ELISA 与 HBV DNA 载量测定实验。按照 ELISA 检测试剂盒与核酸定量试剂盒说明书中的操作步骤进行实验。

1.2.3 量化成像流式仪测定 HBcAg 水平 同 1.2.2 中将细胞铺板并更换培养基孵育后,收集细胞,使用 4% 的多聚甲醛固定,再加入冰冷的 100% 甲醇,用 PBS 稀释甲醇至终浓度 90% 以透化细胞,25 min 后加入 HBcAg 抗体,30 min 后加入荧光二抗,染色 30 min 后上机检测。

1.2.4 Western Blot 检测蛋白 同 1.2.2 中将细胞铺板并更换培养基孵育后,收集细胞,使用 RIPA 裂解

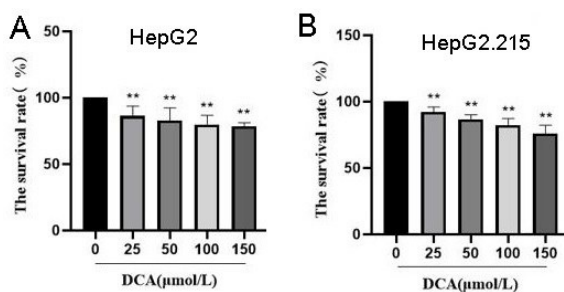
液收集细胞总蛋白,使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,煮沸蛋白后进行传统 WB 的实验步骤:制胶—上样—电泳—转膜,PVDF 膜使用对应的一抗孵育并洗膜后再使用对应的种属二抗孵育,洗膜后进行曝光检测。

1.2.5 HBX 突变表达质粒转染 将生长状态良好的 Hep2.215 细胞接种于 6 孔板,待生长融合度达到 90% 后进行质粒转染实验,取出对应孔数的 1.5 mL 无菌 EP 管,每管加入 200 μL 培养基,4 μL HBX 突变表达质粒,12 μL 助转剂,混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,在添加进相应的孔板中,转染 6 h 后换液。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。多组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析(One Way ANOVA)。进一步进行组间两两比较时,若方差齐时,采用 SNK 检验(Student-Newman-Keuls 法);若方差不齐时,采用 Games-Howell 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 DCA 对肝癌细胞系活力的影响 经过实验发现,DCA 对肝癌细胞均具有毒性作用,且随着浓度的升高,细胞活力呈现出逐渐降低趋势,具有浓度依赖性($P < 0.01$)。见图 1。

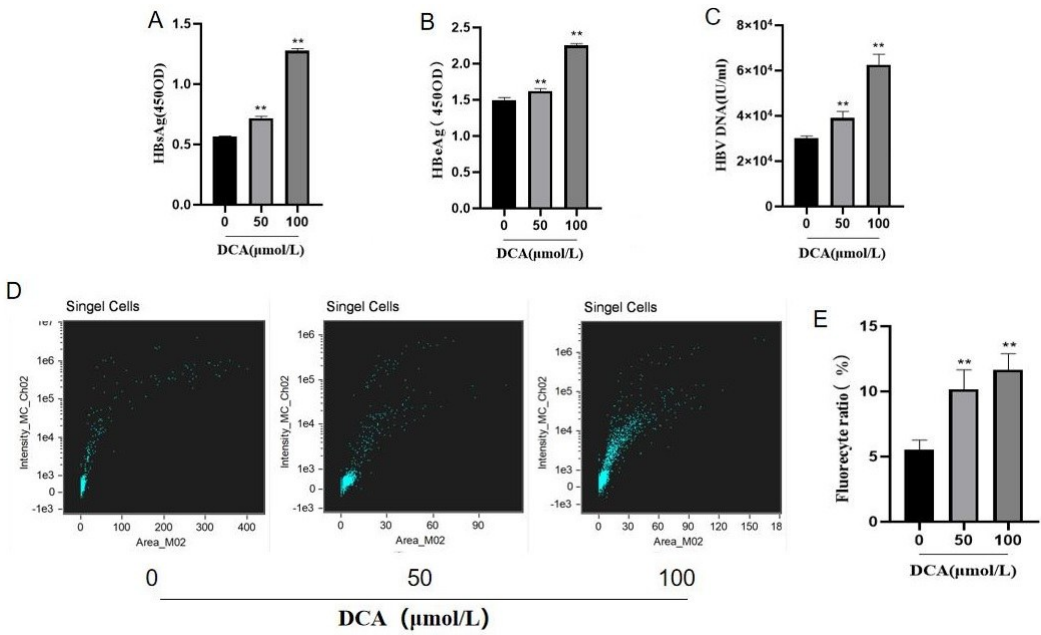


注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ DCA 的对照组相比,** $P < 0.01$ 。

图 1 DCA 对 HepG2 与 HepG2.215 细胞活力的影响

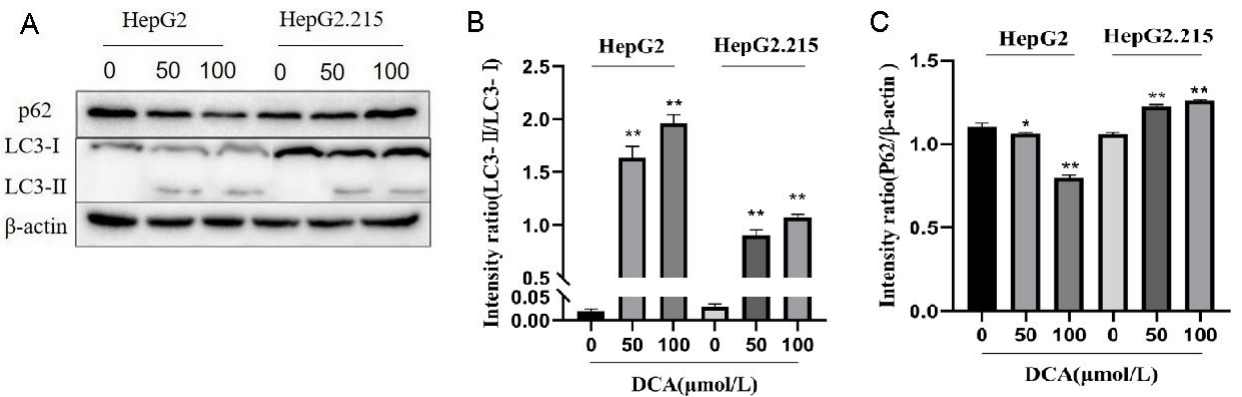
2.2 DCA 对 HBV 复制的影响 HBsAg、HBeAg 水平和 HBcAg 的荧光强度与荧光细胞占比以及 HBV DNA 载量均随着浓度的升高而升高,且具有梯度上升趋势($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 DCA 对肝癌细胞自噬的影响 在 HepG2 细胞中,LC3-II/LC3-I 比值随着 DCA 浓度的升高而升高,p62 蛋白水平随着 DCA 浓度的升高而下降,结果提示 DCA 促进了其自噬进程,促进了肝癌细胞的自噬($P < 0.01$);而在 HepG2.215 细胞中,LC3-II/LC3-I 比值与 p62 蛋白水平均随着 DCA 浓度的升高而升高($P < 0.01$)。见图 3。



注:A. HBsAg 测定结果,B. HBeAg 测定结果,C. HBV DNA 载量测定结果,D、E. HBcAg 水平测定结果。
与 0 μmol/L DCA 的对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 2 DCA 对 HepG2.215 细胞 HBsAg、HBeAg、HBcAg 水平与 HBV DNA 载量结果



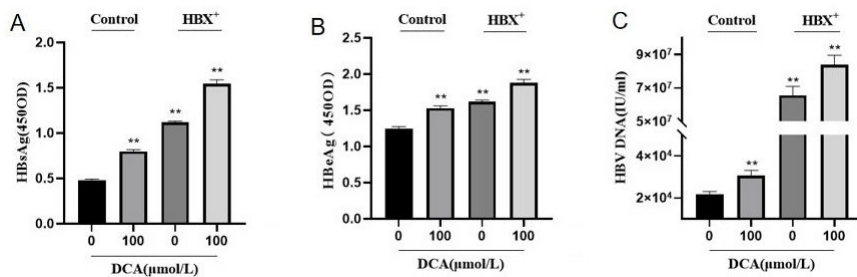
注:A. 自噬蛋白水平检测,B. LC3-II/LC3-I 比值测定,C. p62/β-actin 比值测定。
两组细胞各自与组内 0 μmol/L DCA 对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

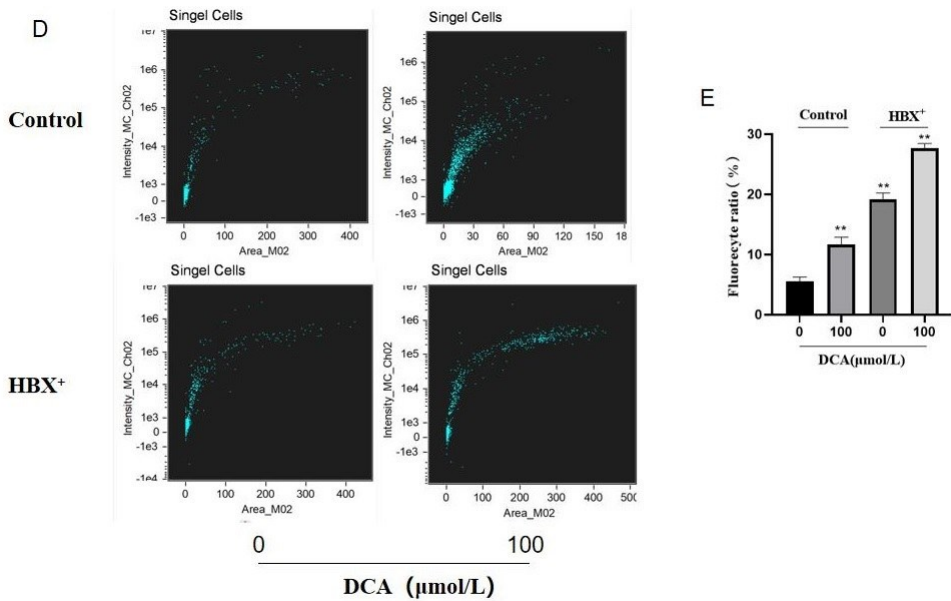
图 3 DCA 对 HepG2 与 HepG2.215 细胞自噬的影响

2.4 DCA 通过作用于 HBX 蛋白对 HBV 复制的影响 0 μmol/L 对照组、100 μmol/L 对照组、0 μmol/L 质粒转染组、100 μmol/L 质粒转染组的各项 HBV 复制指标均呈现依次上升结果 ($P < 0.01$)。见图 4。

0 μmol/L 对照组、100 μmol/L 对照组、0 μmol/L 质粒转染组、100 μmol/L 质粒转染组的 HBX、p62 蛋白水平以及 LC3-II/LC3-I 比值均呈现依次上升结果 ($P < 0.01$)。见图 5。

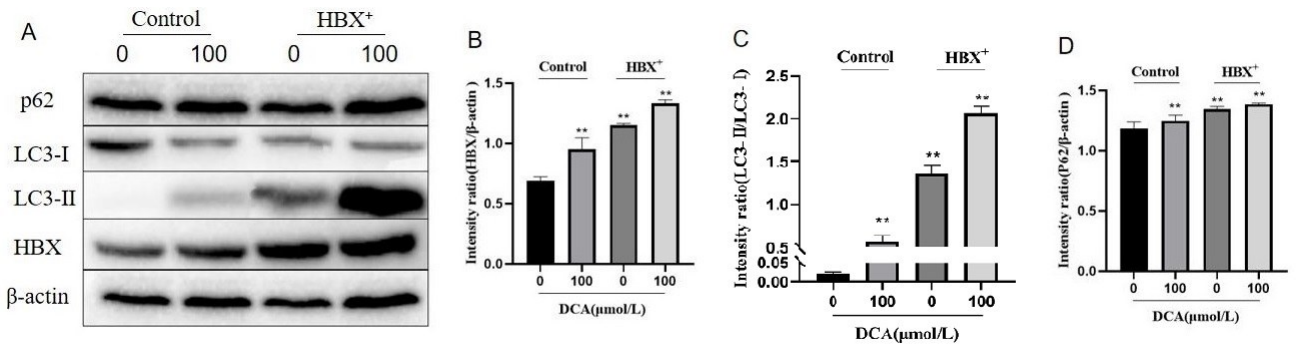
2.5 DCA 通过作用于 HBX 蛋白对自噬水平的影响





注:A. HBsAg 测定结果,B. HBeAg 测定结果,C. HBV DNA 载量测定结果,D、E. HBcAg 测定结果。
与 0 μmol/L 对照组相比, * P < 0.01。

图 4 DCA 对 HepG2.215 细胞对照组以及质粒转染组的 HBV 复制影响



注:A. 各项蛋白检测结果,B. HBX/β-actin 比值结果,C. LC3-II/LC3-I 比值结果,
D. p62/β-actin 比值结果。与 0 μmol/L 对照组相比, ** P < 0.01。

图 5 DCA 对 HepG2.215 细胞对照组以及质粒转染组的 HBX 蛋白及自噬水平的影响

3 讨论

DCA 主要由肠道菌群的厌氧菌群对结合胆汁酸的 7α 脱羟基作用生成,目前 DCA 多注重于结肠癌的诱导促进以及肠道菌群的调节等研究,BERNSTEIN C 等^[18]、KAWANO A 等^[19]、PAI R 等^[20] 分别通过动物实验、流行病学统计、细胞实验表明脱氧胆酸可以诱导结肠癌的发生,并且 DCA 可以激活多种信号通路,比如 NF-κB、Wnt 与 MAPK 通路,进而对结肠癌产生促进作用^[21-22]。另一方面,DCA 本身具有抗炎灭菌作用,在正常生理状态下可在肠道中可以抑制菌群的过度生长,并在肠道炎症中发挥着消炎效应,同时在胆汁酸的肠肝循环中调节胆汁酸池的含量,进而调节胆汁酸的合成^[23]。DCA 被重吸收进入肝脏时通常以结合的形式存在,从而增加其亲水性以降低细胞毒性作用,但是在高脂饮食、肝硬化、肝炎以及胆管炎等一系列疾

病中,胆汁酸的代谢受到阻碍,从而增加了 DCA 的产生,并且降低了其与氨基酸结合的形式,导致了 DCA 含量增加且毒性作用扩散,进而对肝胆等器官产生影响^[24]。

自噬在正常生理状况下对机体起着清除有害物质、防止疾病发生的作用。在肝癌中,人体的自噬功能受损,导致肝癌的各种因素抑制自噬(如癌基因 *Akt* 的激活或肿瘤抑制基因 *Pten* 或 *Tsc1* 的缺失)、肝脏自噬不足(非酒精性脂肪性肝病)、肝脏自噬通路不完全(病毒性肝炎)^[25]。前言中提到的目前慢性乙型肝炎中自噬与 HBV 起着相互促进的作用与本次实验结果结论一致。目前研究发现 DCA 同样可以促进与抑制自噬的发生发展,当细胞急性暴露在 DCA 环境中时,DCA 可以通过促进 Beclin-1 途径来促进自噬,但在慢性 DCA 环境中细胞自噬进程则会明显降低,本次研究结

果则证明 DCA 促进了肝癌细胞的自噬。

HBX 蛋白是由 HBV 的 X 区基因所编码生成的蛋白质,这是一种跨调节蛋白,通过与其他蛋白质结合来影响病毒和宿主基因的表达^[26]。HBX 蛋白已被证实是一种多效性反式激活剂,可以调节病毒复制和许多细胞功能,包括细胞增殖、分化、转化、耐药性、DNA 修复以及细胞自噬和凋亡^[27]。WANG P 等^[28]表明 HBX 蛋白可以通过 PIK3CA-AKT-MTOR 途径以及在体外增强 LC3-II 的水平,导致内源性 Beclin-1 水平升高,从而促进自噬的发生发展,此外 HBX 蛋白还可以通过诱导线粒体外膜(OMM)上 PINK1 的表达触发 Pink1/Parkin 依赖性线粒体自噬诱导,这导致被 HBV 感染的细胞逃避一般细胞凋亡,从而促进选择性降解和预防凋亡细胞死亡,以进一步增强被感染细胞的存活和病毒持久性^[29]。HUANG J L 等^[30]表明,HBX 蛋白可以显著激活肝癌细胞中的 MAPK 信号传导途径,进而导致 HBX 诱导的 Bcl-2 磷酸化和 beclin-1 与 Bcl-2 的解离,从而增强自噬体的形成;PARK Y H 等^[31]指出,HBX 蛋白诱导自噬并激活 JNK 信号传导过程,ROS-JNK 信号传导的激活对于 HBV 诱导的不完全自噬很重要,而 HBX 蛋白在这些过程中起主要作用;ZHONG L M 等^[32]的研究证明抑制 ROS-JNK 信号传导可显著抑制 HBV 诱导的自噬体形成,这更加确立了 HBX 蛋白通过 ROS-JNK 信号途径促进自噬发生发展的立场。除此之外 HBX 蛋白还通过许多其他途径以影响自噬^[33-36]。

本次实验结果表明,HBX 蛋白是 HBV 复制的核心蛋白,对于 HBV 的复制具有显著促进作用,同时也证实了 HBX 蛋白促进了肝癌细胞不完全自噬的进程这一结论,同时提示了 DCA 在慢性乙型肝炎中或许作用于 HBX 蛋白从而导致 HBV 复制以及细胞自噬活动的加强。

高浓度的 DCA 具有一定的细胞毒性,同时也可以促进 HBV 复制以及肝癌细胞自噬。DCA 可能通过促进 HBX 蛋白的合成来加强 HBV 的复制进而促进了不完全自噬的发生发展。现如今针对 HBV 治疗的手段主要是抗病毒治疗,即干扰素以及核苷(酸)类似物,但是干扰素的使用具有不同程度的不良反应,而核苷(酸)类似物无法清除 HBV 的闭合环状 DNA,停药复发的情况屡见不鲜;本研究为 DCA 在 HBV 感染中所起的作用进行了一定程度的探索,同时提示或许可以通过增加 DCA 在肝胆中的转化从而减弱对 HBV 复制的影响,为 HBV 感染的治疗提供了一定的科学依据。

参考文献:

- [1] BING H, LI Y L. The role of bile acid metabolism in the occurrence and development of NAFLD[J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9:1089359.
- [2] CHIANG JYL, FERRELL J M. Bile acid metabolism in liver pathobiology[J]. *Gene Expr*, 2018, 18(2):71-87.
- [3] MAJEED S T, MAJEED R, ANDRABI K I. Expanding the view of the molecular mechanisms of autophagy pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(8):3257-3277.
- [4] RUSSELL R C, GUAN K L. The multifaceted role of autophagy in cancer[J]. *EMBO J*, 2022, 41(13):e110031.
- [5] PEÑA-MARTINEZ C, RICKMAN A D, HECKMANN B L. Beyond autophagy: LC3-associated phagocytosis and endocytosis[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(43):eabn1702.
- [6] PRERNA K, DUBEY V K. Beclin1-mediated interplay between autophagy and apoptosis: new understanding[J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 204:258-273.
- [7] VARGAS JNS, HAMASAKI M, KAWABATA T, et al. The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(3):167-185.
- [8] GE Y C, ZHOU M, CHEN C, et al. Role of AMPK mediated pathways in autophagy and aging[J]. *Biochimie*, 2022, 195:100-113.
- [9] WANG F S, FAN J G, ZHANG Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. *Hepatology*, 2014, 60(6):2099-2108.
- [10] LI J H, LIU Y H, WANG Z K, et al. Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment[J]. *J Virol*, 2011, 85(13):6319-6333.
- [11] ZHANG H T, CHEN G G, ZHANG Z Y, et al. Induction of autophagy in hepatocellular carcinoma cells by SB203580 requires activation of AMPK and DAPK but not p38 MAPK[J]. *Apoptosis*, 2012, 17(4):325-334.
- [12] ZALCKVAR E, BERISSI H, MIZRACHY L, et al. DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy[J]. *EMBO Rep*, 2009, 10(3):285-292.
- [13] KIM D H, PARK J S, CHOI H I, et al. The critical role of FXR is associated with the regulation of autophagy and apoptosis in the progression of AKI to CKD[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4):320.
- [14] HU J P, ZHANG Y T, YI S L, et al. Lithocholic acid inhibits dendritic cell activation by reducing intracellular glutathione via TGR5 signaling[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(11):4545-4559.
- [15] ROESLY H B, KHAN M R, CHEN H D R, et al. The decreased expression of Beclin-1 correlates with progres-

- sion to esophageal adenocarcinoma: the role of deoxycholic acid[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(8):G864-G872.
- [16] GAO X B, RUAN Y D, ZHU X, et al. Deoxycholic acid promotes pyroptosis in free fatty acid-induced steatotic hepatocytes by inhibiting PINK₁-mediated mitophagy[J]. *Inflammation*, 2022, 45(2):639-650.
- [17] MANLEY S, DING W X. Role of farnesoid X receptor and bile acids in alcoholic liver disease[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(2):158-167.
- [18] BERNSTEIN C, HOLUBEC H, BHATTACHARYYA A K, et al. Carcinogenicity of deoxycholate, a secondary bile acid[J]. *Arch Toxicol*, 2011, 85(8):863-871.
- [19] KAWANO A, ISHIKAWA H, KAMANO T, et al. Significance of fecal deoxycholic acid concentration for colorectal tumor enlargement[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2010, 11(6):1541-1546.
- [20] PAI R, TARNAWSKI A S, TRAN T. Deoxycholic acid activates beta-catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness[J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(5):2156-2163.
- [21] SHAH S A, VOLKOV Y, ARFIN Q, et al. Ursodeoxycholic acid inhibits interleukin 1 beta [corrected] and deoxycholic acid-induced activation of NF-kappa B and AP-1 in human colon cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(3):532-539.
- [22] NAGATHIHALLI NS, BEESETTY Y, LEE W, et al. Novel mechanistic insights into ectodomain shedding of EGFR Ligands Amphiregulin and TGF- α : impact on gastrointestinal cancers driven by secondary bile acids[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(7):2062-2072.
- [23] FENG L X, ZHANG W L, SHEN Q, et al. Bile acid metabolism dysregulation associates with cancer cachexia: roles of liver and gut microbiome[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2021, 12(6):1553-1569.
- [24] STALEY C, WEINGARDEN AR, KHORUTS A, et al. Interaction of gut microbiota with bile acid metabolism and its influence on disease states[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(1):47-64.
- [25] QIAN H, CHAO X J, WILLIAMS J, et al. Autophagy in liver diseases: a review[J]. *Mol Aspects Med*, 2021, 82:100973.
- [26] BENHENDA S, COUGOT D, BUENDIA M A, et al. Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis[J]. *Adv Cancer Res*, 2009, 103:75-109.
- [27] SLAGLE B L, BOUCHARD M J. Role of HBx in hepatitis B virus persistence and its therapeutic implications[J]. *Curr Opin Virol*, 2018, 30:32-38.
- [28] WANG P, GUO Q S, WANG Z W, et al. HBx induces HepG-2 cells autophagy through PI3K/Akt-mTOR pathway[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 372(1-2):161-168.
- [29] HUANG X Y, LI D, CHEN Z X, et al. Hepatitis B Virus X protein elevates Parkin-mediated mitophagy through Lon Peptidase in starvation[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 368(1):75-83.
- [30] HUANG J L, REN T Y, CAO S W, et al. HBx-related long non-coding RNA DBH-AS1 promotes cell proliferation and survival by activating MAPK signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(32):33791-33804.
- [31] PARK Y H, SHIN H J, KIM S U, et al. iNOS promotes HBx-induced hepatocellular carcinoma via upregulation of JNK activation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 435(2):244-249.
- [32] ZHONG L M, SHU W Q, DAI W B, et al. Reactive oxygen species-mediated c-Jun NH₂-terminal kinase activation contributes to hepatitis B virus X protein-induced autophagy via regulation of the beclin-1/Bcl-2 interaction[J]. *J Virol*, 2017, 91(15):e00001-e00017.
- [33] LEI Y M, XU X, LIU H L, et al. HBx induces hepatocellular carcinogenesis through ARRB1-mediated autophagy to drive the G₁/S cycle[J]. *Autophagy*, 2021, 17(12):4423-4441.
- [34] CHEN H, JIANG L S, CHEN S, et al. HBx inhibits DNA sensing signaling pathway via ubiquitination and autophagy of cGAS[J]. *Virol J*, 2022, 19(1):55.
- [35] SON J, KIM M J, LEE J S, et al. Hepatitis B virus X protein promotes liver cancer progression through autophagy induction in response to TLR4 stimulation[J]. *Immune Netw*, 2021, 21(5):e37.
- [36] LIN Y, ZHAO Z Y, HUANG A L, et al. Interplay between cellular autophagy and hepatitis B virus replication: a systematic review[J]. *Cells*, 2020, 9(9):2101.

收稿日期:2023-02-30;修回日期:2023-04-03