·其他肝病·

DOI：10.12449/JCH260116

DEAD-box解旋酶3X-连锁（DDX3X）在免疫介导性肝损伤小鼠模型和HBV相关肝损伤患者中的表达分析

潘桢桢，徐 玲，朱先茹，范子豪，曹亚玲，莫胤康，闫 赛，任 锋

首都医科大学附属北京佑安医院北京肝病研究所，北京 100069

通信作者：任锋，renfeng7512@ccmu.edu.cn（ORCID：0000-0001-7736-8637）

摘要：目的 探讨DEAD-box解旋酶3X-连锁（DDX3X）在免疫介导性肝损伤（ILI）中的作用，并阐明其通过调控内质网应激（ERS）依赖性凋亡通路的作用机制及其与乙型肝炎临床进展的相关性。**方法** 采用刀豆蛋白A（ConA）尾静脉注射建立小鼠ILI模型；对肝细胞特异性DDX3X敲除小鼠（DDX3X$^{\Delta Hep}$）和DDX3X-flox小鼠（DDX3X$^{fl/fl}$）分别尾静脉注射PBS（对照组）和不同浓度的ConA，通过Log-rank生存分析、血清天冬氨酸氨基转移酶（AST）及丙氨酸氨基转移酶（ALT）检测、肝组织苏木精-伊红（HE）染色评估肝损伤严重程度；采用实时荧光定量PCR（qRT-PCR）和蛋白质印迹法（Western Blot）检测肝组织中葡萄糖调节蛋白78（GRP78）、CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白（CHOP）及DDX3X的表达；通过腹腔注射4-苯基丁酸（4-PBA，100 mg/kg）抑制ERS；收集北京佑安医院2019—2023年健康对照、慢性乙型肝炎及HBV相关肝衰竭（HBV-LF）患者血清样本各30例，肝组织样本各6例，通过酶联免疫吸附分析检测血清DDX3X水平，qRT-PCR/Western Blot分析肝组织靶标表达。计量资料多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较使用LSD-t检验。采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线。**结果** 相较于正常对照组，ConA诱导肝损伤后小鼠肝脏DDX3X表达显著升高（P<0.05）。在致死剂量ConA处理后，DDX3X$^{\Delta Hep}$小鼠72 h生存率为55%，显著高于DDX3X$^{fl/fl}$对照组的20%（P<0.05），血清ALT和AST的水平亦同步显著降低（P值均<0.000 1），ERS标志物GRP78与CHOP表达同步下调（P<0.05）。在ConA诱导的小鼠肝损伤中，与PBS预处理组相比，4-PBA预处理抑制ERS不仅减轻了ConA诱导的肝损伤（ALT和AST降低，P值均<0.001），亦使肝脏DDX3X的mRNA与蛋白表达降低（P值均<0.01）。临床样本分析结果中，慢性乙型肝炎及HBV-LF患者肝组织DDX3X的mRNA和蛋白表达均高于健康对照（P值均<0.01），HBV-LF患者血清DDX3X水平显著升高（P<0.000 1）。**结论** DDX3X通过调控ERS依赖性凋亡通路（GRP78/CHOP）加重ILI，其表达与乙型肝炎疾病进展相关，可作为潜在治疗靶点。

关键词： 内质网应激；刀豆蛋白A；免疫介导性肝损伤

基金项目： 国家自然科学基金（81770611，82002243）；北京自然科学基金和北京市教委联合资助重点项目（KZ202010025035）；首都卫生发展科研专项重点攻关项目（首发2020-1-1151）；北京市科技计划“首都临床诊疗技术研究及示范应用”专项课题（Z191100006619096，Z191100006619097）；北京市医院管理中心“青苗”计划专项（QML20201702）；北京市医管局“登峰”人才计划（DFL20221503）；高层次公共卫生技术人才建设项目（学科带头人-02-13）

Role of endoplasmic reticulum stress-mediated DEAD-box helicase 3 X-linked in a mouse model of concanavalin A-induced immune-mediated liver injury

PAN Zhenzhen，*XU Ling*，*ZHU Xianru*，*FAN Zihao*，*CAO Yaling*，*MO Yinkang*，*YAN Sai*，*REN Feng*

Institute of Hepatology，*Beijing YouAn Hospital*，*Capital Medical University*，*Beijing 100069*，*China*

Corresponding author：*REN Feng*，*renfeng7512@ccmu.edu.cn*（*ORCID*：*0000-0001-7736-8637*）

Abstract：**Objective** To investigate the role of DEAD-box helicase 3 X-linked（DDX3X）in immune-mediated liver injury（ILI），and to clarify its mechanism by regulating endoplasmic reticulum stress（ERS）-dependent apoptotic pathway and its association with the clinical progression of hepatitis B. **Methods** Mice were given injection of concanavalin A（ConA）via the

caudal vein to establish a model of ILI, PBS (control group) and different concentrations of ConA were injected into the tail vein of hepatocyte-specific DDX3X-knockout mice ($DDX3X^{\Delta Hep}$ and DDX3X-flox mice ($DDX3X^{fl/fl}$), respectively.. The log-rank survival analysis, measurement of the serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), and HE staining of liver tissue were performed to assess liver injury, and qRT-PCR and Western Blot were used to measure the mRNA and protein expression levels of glucose-regulated protein 78 (GRP78), CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP), and DDX3X in liver tissue. Intraperitoneal injection of 4-phenylbutyric acid (4-PBA, 100 mg/kg) was performed to inhibit ERS. Serum samples (n=30) and liver tissue samples (n=6) were collected from healthy controls, chronic hepatitis B (CHB) patients, and hepatitis B virus-associated liver failure (HBV-LF) patients; ELISA was used to measure the serum level of DDX3X, and qRT-PCR/Western Blot was used to analyze the expression of targets in liver tissue. A one-way analysis of variance was used for comparison of continuous data between multiple groups, and the least significant difference t-test was used for further comparison between two groups. **Results** Compared with the control group of mice, the expression of DDX3X in the liver of mice induced by ConA was significantly increased after liver injury (P<0.05), and hepatocyte-specific DDX3X knockout increased the 72-hour survival rate of mice by 55% (compared with 20% in the $DDX3X^{fl/fl}$ group), with significant reductions in the serum levels of ALT and AST (P<0.000 1) and the expression levels of the ERS markers GRP78 and CHOP (P<0.05). After ERS was inhibited by 4-PBA, there was alleviation of liver injury (with reductions in ALT and AST, P <0.001) and a reduction in DDX3X expression (P<0.01). The analysis of clinical samples showed that the mRNA and protein expression levels of liver DDX3X in CHB patients and HBV-LF patients were significantly higher than those in healthy controls (all P<0.01), and there was a significant increase in the serum level of DDX3X in HBV-LF patients (P<0.000 1). **Conclusion** DDX3X exacerbates ILI by regulating the ERS-dependent apoptotic pathway (GRP78/CHOP), and its expression is associated with the progression of hepatitis B. Therefore, it can be used as a potential therapeutic target.

Key words: Endoplasmic Reticulum Stress; Concanavalin A; Immune-Mediated Liver Injury

Research funding: National Natural Science Foundation of China (81770611, 82002243); Key Projects of the Beijing Municipal Education Commission's Science and Technology Plan (KZ202010025035); Special Key Research Project of Capital Health Development Scientific Research (SF2020-1-1151); The Demonstrating Application and Research of Clinical Diagnosis and Treatment Technology in Beijing (Z191100006619096, Z191100006619097); Beijing Hospitals Authority Youth Programme (QML20201702); Talent Cultivation plan of "Climbing the Peak" of Beijing Municipal Hospital Administration (DFL20221503); High-level Public Health Technical Personnel Construction Project (Subject leaders-02-13)

免疫介导性肝损伤(immune-mediated liver injury, ILI)是由病毒、酒精、药物、化学物质及免疫失调等多种因素引发的一类慢性进行性炎症性肝脏疾病[1-2]。该疾病早期多表现为急性肝炎，随着病程进展可发展为肝硬化、肝细胞癌或肝衰竭，最终导致患者死亡[3]。其病理机制主要涉及免疫细胞异常活化及促炎因子级联释放，进而诱发肝组织损伤[4]。然而，肝脏免疫应答异常激活的具体分子机制尚未完全阐明，亟待进一步深入研究。

刀豆蛋白A(concanavalin A, ConA)作为植物凝集素，可通过交联肝细胞表面糖蛋白激活T细胞，并诱导细胞因子风暴，引发单核细胞来源的巨噬细胞向肝脏浸润，最终导致ILI[5]。Tiegs等[6]于1992年建立的ConA诱导的急性肝损伤小鼠模型表现出血清天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)和丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)水平急剧升高、肝组织大面积坏死等典型病理特征。由于该模型能够高度模拟人类免疫介导的急性肝损伤或自身免疫性肝炎的免疫病理过程，已成为研究ILI机制的重要实验工具[7]。

内质网是真核细胞中蛋白质折叠、Ca^{2+}稳态调控及脂质合成的核心细胞器，当因遗传或环境因素造成细胞损伤时，内质网中分泌蛋白和跨膜蛋白无法正确折叠或进行翻译后修饰，导致错误折叠的蛋白质在内质网中积聚，进而触发内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)[8]。为应对ERS，细胞通过未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)启动适应性修复或促凋亡程序[9]。研究表明，ERS与脂肪性肝病、病毒性肝炎、药物性肝损伤及肝癌等多种肝脏疾病密切相关[10-14]。值得注意的是，ConA诱导的ILI可触发ERS并激活UPR[15]，但其在肝损伤进程中的调控机制仍有待进一步阐明。

DEAD-box解旋酶3X-连锁(DEAD-box helicase 3 X-linked,DDX3X)作为RNA解旋酶家族成员之一,可以将腺苷三磷酸水解为腺苷二磷酸,从而破坏结合RNA的二级结构,参与转录、前体RNA剪接及RNA输出和翻译等RNA代谢的多个过程[16-18]。近年研究发现,DDX3X不仅参与调控病毒复制与先天免疫应答[19-21],同时也是应激颗粒组装及炎症小体活化的关键调控因子,在细胞应激反应中发挥调控细胞生存或死亡的分子开关作用[22]。已有研究证实,肝细胞中DDX3X可通过调控应激颗粒形成和氧化应激,预防药物诱导的急性肝损伤[23]。然而,DDX3X是否参与ILI的发生发展尚缺乏相关研究报道。本研究旨在探讨DDX3X在ILI中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂 ConA(货号C2010)购自美国Sigma-Aldrich公司;4-苯基丁酸(4-phenylbutyric acid,4-PBA)(货号HY-A0281)购自美国MedChemExpress公司;β-肌动蛋白(β-actin)抗体(货号4970)、葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78,GRP78)抗体(货号3177)、CCAAT增强子结合蛋白同源蛋白(C/EBP homologous protein,CHOP)抗体(货号2895)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的山羊抗兔IgG(货号7074)及HRP标记的山羊抗小鼠IgG(货号7076)均购自美国Cell Signaling Technology公司;DDX3X单克隆抗体(货号ab196032)、DDX3X多克隆抗体(货号ab271002)及含4′,6-二脒基-2-苯基吲哚(4′,6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)的荧光封片剂(货号ab104139)购自英国Abcam公司;高效RIPA裂解液(货号R0010)购自北京索莱宝科技有限公司;脱脂奶粉(货号PA201)购自北京博迈德科技有限公司;化学发光底物试剂盒(货号32209)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;DDX3X ELISA检测试剂盒(货号KT-62021)购自日本Kamiya Biomedical公司;RNA快速提取试剂盒(货号RC112-01)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;PrimeScriptTM cDNA合成试剂盒(货号6210A)、定量PCR试剂盒TB Green® Premix Ex Taq™(货号RR420A)均购自TaKaRa公司。

1.2 实验动物 无特定病原体(specific pathogen free,SPF)级C57BL/6J雄性小鼠(6~8周龄)购自北京维通利华实验动物技术有限公司[生产许可证号:SCXK(京)2021-0006];SPF级C57BL/6J Alb-Cre小鼠(8~12周龄)及通过CRISPR/Cas9技术构建的DDX3X-flox(DDX3X$^{fl/fl}$)小鼠、肝细胞特异性DDX3X敲除(DDX3X$^{\Delta Hep}$)小鼠均购自北京唯尚立德生物科技有限公司[生产许可证号:SCXK(京)2023-0004][24]。所有小鼠饲养于SPF级屏障环境[使用许可证编号为SYXK(京)2025-0025],环境温度为(22±2)℃、相对湿度为60%±10%,自由摄食灭菌饲料及饮水,保持垫料干燥。

1.3 实时荧光定量PCR(real time fluorogenic quantitative PCR,qRT-PCR) 使用RNA快速提取试剂盒提取肝脏总RNA;使用PrimeScript™ cDNA合成试剂盒进行逆转录;使用定量PCR试剂盒TB Green® Premix Ex Taq™进行qRT-PCR。以次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(hypoxanthine phosphoribosyltransferase,HPRT)为内参,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因mRNA的相对表达量。所有靶标引物均由上海生工生物技术有限公司合成(表1)。

1.4 蛋白质印迹 使用含1%蛋白酶和磷酸酶抑制剂的高效放射免疫沉淀分析缓冲液从肝组织中提取总蛋白。将裂解物于4 ℃条件下以12 000×g的速度离心15 min,收集上清用于后续蛋白质定量。使用二喹啉甲酸检测试剂盒(货号23227,赛默飞世尔科技有限公司)测定蛋白质浓度。取等量蛋白经12% 十二烷基硫酸钠-

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	正向(5′-3′)	反向(5′-3′)
HPRT(小鼠)	AGTCCCAGCGTCGTGATTAG	GCCTCCCATCTCCTTCATGA
DDX3X(小鼠)	GGCCGTGGAGATAGAAGTGG	TGCACTGCCAATTCTCTCGT
GRP78(小鼠)	CTTTGATCAGCGGGTCATGG	AGCTCTTCAAATTTGGCCCG
CHOP(小鼠)	TCACTACTCTTGACCCTGCG	ACTGACCACTCTGTTTCCGT
HPRT(人)	TTCCTCCTCCTGAGCAGTCA	ATCCAACACTTCGTGGGGTC
DDX3X(人)	GGGTGTCAAACTTCAACCGC	TCCAGTCACCGGCATAGAGA
GRP78(人)	TAGCGTATGGTGCTGCTGTC	TTTGTCAGGGGTCTTTCACC
CHOP(人)	TGGAAGCCTGGTATGAGGAC	TGTGACCTCTGCTGGTTCTG

注:HPRT,次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶;DDX3X,DEAD-box解旋酶3X-连锁;GRP78,葡萄糖调节蛋白78;CHOP,CCAAT增强子结合蛋白同源蛋白。

聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后，通过湿转法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜。随后，使用5%脱脂牛奶室温封闭1 h后与靶标一抗（1∶1 000稀释）在4 ℃条件下孵育过夜。使用含聚氧乙烯（20）失水山梨醇单月桂酸酯的三羟甲基氨基甲烷缓冲液洗涤3次后，用HRP标记山羊抗兔免疫球蛋白G或山羊抗小鼠免疫球蛋白G（1∶2 000稀释）室温孵育1 h。最后，使用化学发光印记底物进行反应，通过化学发光可视系统（Gel Doc XR+Gel Documentation System，伯乐生命医学产品有限公司）对结果可视化，使用ImageJ软件测定目的蛋白条带的灰度值。

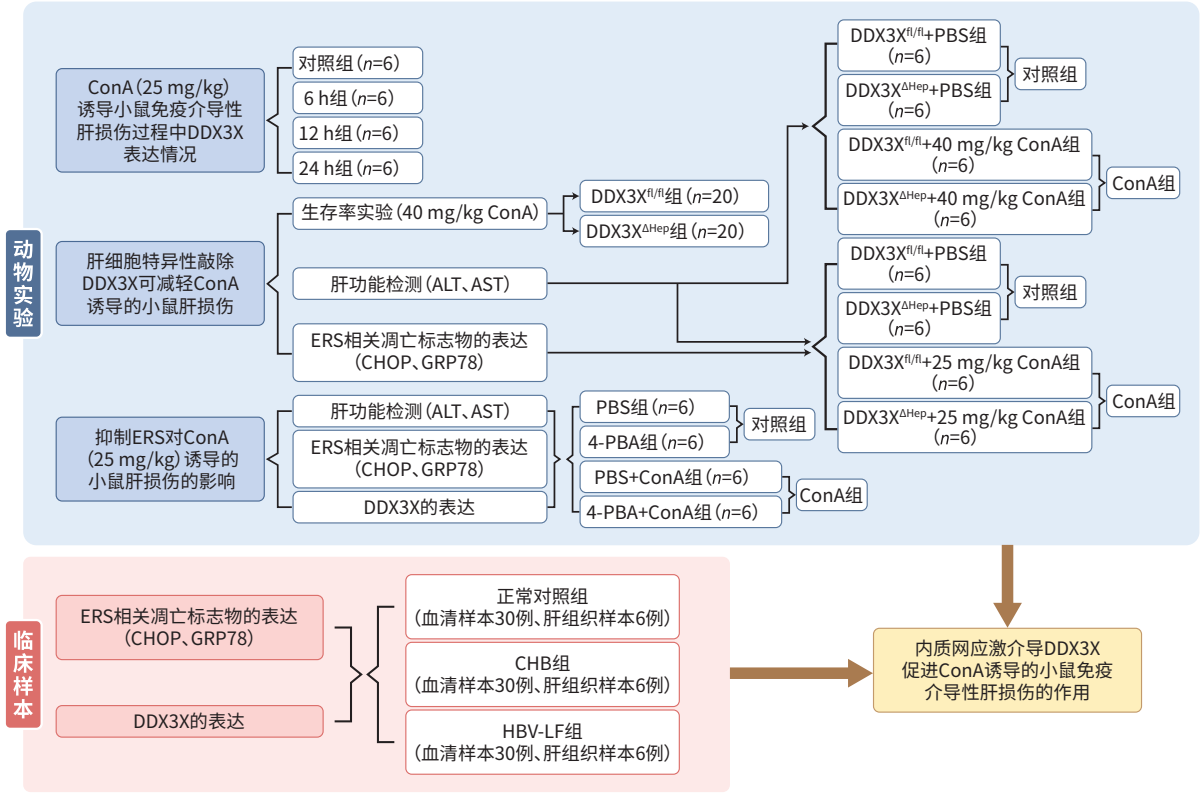
1.5　生存实验　为评估DDX3X对ConA诱导的小鼠肝损伤的影响，取$DDX3X^{fl/fl}$及$DDX3X^{\Delta Hep}$小鼠各20只（雄性，8周龄），经尾静脉注射致死剂量ConA（40 mg/kg）。注射后72 h内，每6 h观察并记录小鼠存活情况。

1.6　肝功能生化指标检测　通过检测血清中ALT与AST的水平以反映肝脏的损伤情况。使用眼眶取血法采集小鼠静脉血，3 000×*g*条件下离心10 min，取上清进行后续检测。使用全自动生化分析仪（货号7600，日立分析仪器有限公司）测定血清ALT、AST水平，检测前将待测样本进行5～20倍稀释后按照说明书上机检测，最终结果按照稀释倍数进行校正。

1.7　肝组织病理染色　取经福尔马林固定的小鼠肝组织，常规石蜡包埋并制备切片，按照标准的苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色方法进行染色，在显微镜下观察并评估肝组织病理损伤情况。

1.8　临床样本　为探究DDX3X在乙型肝炎病毒相关肝衰竭（hepatitis B virus-liver failure，HBV-LF）发生和发展中的表达情况，本研究收集北京佑安医院2019—2023年慢性乙型肝炎（chronic hepatitis B，CHB）患者、HBV-LF患者和健康对照者的血清样本各30例；同时，收集肝移植供体肝脏（正常对照组）、接受肝穿刺活检的CHB患者（CHB组）、HBV-LF患者（HBV-LF组）的肝组织样本各6例。整体研究方案如图1所示。

1.9　统计学方法　采用GraphPad Prism 10.0软件进行数据统计分析，符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-*t*检验。采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线。$P<0.05$为差异有统计学意义。



注：ConA，刀豆蛋白A；DDX3X，DEAD-box解旋酶3X-连锁；ALT，丙氨酸氨基转移酶；AST，天冬氨酸氨基转移酶；ERS，内质网应激；PBS，磷酸盐缓冲溶液；4-PBA，4-苯基丁酸；CHOP，CCAAT增强子结合蛋白同源蛋白；GRP78，葡萄糖调节蛋白78；CHB，慢性乙型肝炎；HBV-LF，乙型肝炎病毒相关肝衰竭。

图1　ERS介导DDX3X促进ConA诱导的小鼠ILI的作用研究流程图

Figure 1　Study flowchart of the role of ERS in mediating DDX3X-promoted immune-mediated liver injury induced by ConA in mice

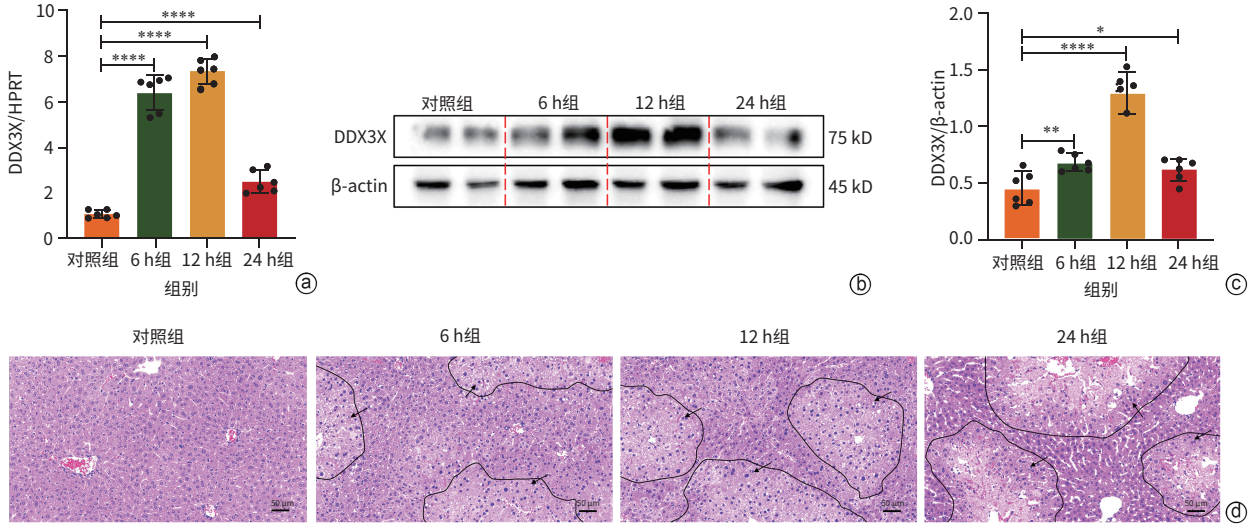
2　结果

2.1　DDX3X在ConA诱导的肝损伤小鼠模型中的表达　通过尾静脉注射ConA（25 mg/kg）建立肝损伤时间梯度模型。如图2a所示，与对照组相比，ConA处理组小鼠肝脏DDX3X mRNA水平在6 h即出现显著升高，于12 h达到峰值，至24 h有所降低（P值均<0.000 1）；Western Blot结果显示，其蛋白表达趋势与mRNA基本一致（P值均<0.05）（图2b～c）。HE染色结果显示，与对照组相比，ConA处理6 h时，可观察到细胞边界模糊及部分炎性细胞浸润；随着处理时间的延长，肝损伤进一步加重，至处理24 h时，肝脏出现大面积坏死（图2d）。

2.2　肝细胞特异性敲除DDX3X对ConA诱导的小鼠肝损伤的作用　为进一步明确DDX3X在ConA诱导的小鼠肝损伤中的作用，并通过血清AST和ALT水平评估小鼠肝损伤情况。对$DDX3X^{fl/fl}$和$DDX3X^{\Delta Hep}$小鼠注射致死剂量ConA（40 mg/kg）。生存分析结果显示，$DDX3X^{fl/fl}$组小鼠ConA处理72 h后存活率为20%，$DDX3X^{\Delta Hep}$组小鼠ConA处理72 h后存活率为55%，$DDX3X^{\Delta Hep}$组小鼠存活率显著高于$DDX3X^{fl/fl}$组小鼠（P<0.05）（图3a）。分别用25 mg/kg和40 mg/kg ConA处理8 h后，与对照组相比，$DDX3X^{fl/fl}$组小鼠血清ALT及AST水平均显著升高（P值均<0.000 1），经ConA处理后，$DDX3X^{\Delta Hep}$组小鼠血清ALT及AST水平均显著低于$DDX3X^{fl/fl}$组小鼠（P值均<0.000 1）（图3b、c）。肝组织HE染色结果显示，$DDX3X^{\Delta Hep}$组小鼠肝损伤程度显著低于$DDX3X^{fl/fl}$组小鼠（图3d）。以上结果表明，肝细胞特异性敲除DDX3X可有效缓解ConA诱导的小鼠ILI。

2.3　肝细胞特异性敲除DDX3X对ConA诱导肝损伤中ERS相关凋亡标志物表达的影响　既往研究表明，ConA诱导的肝损伤可触发ERS并激活UPR[15]。因此，为探究肝细胞特异性敲除DDX3X是否通过调控ERS在ConA诱导的小鼠肝损伤中发挥作用，本研究检测了ERS相关细胞凋亡标志物的表达水平。与对照组相比，ConA组小鼠肝组织中ERS相关的细胞凋亡标志物GRP78和CHOP的mRNA表达显著上升（P值均<0.000 1），GRP78和CHOP的蛋白表达也显著上升（P值均<0.01）（图4a～c）。在ConA处理后，与$DDX3X^{fl/fl}$小鼠相比，$DDX3X^{\Delta hep}$小鼠GRP78和CHOP的mRNA表达均显著降低（P值均<0.000 1），GRP78和CHOP的蛋白表达也表现相同的趋势（P值均<0.05）（图4a～c），提示DDX3X可能通过调控ERS凋亡通路加剧肝损伤。

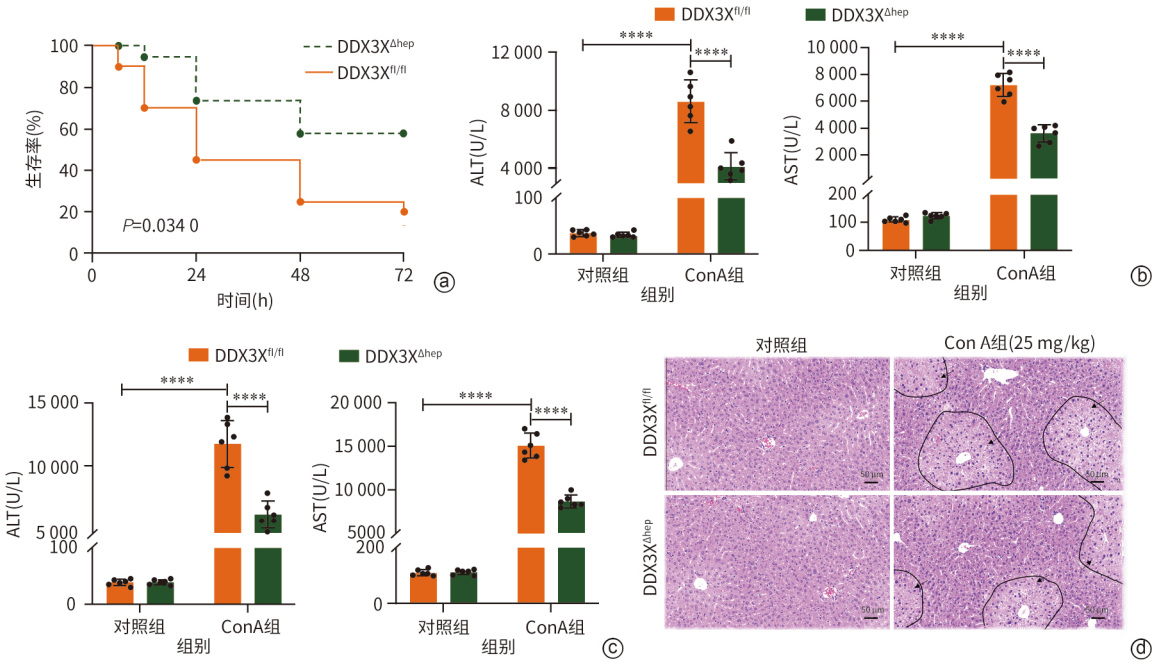
2.4　抑制ERS对ConA诱导的肝损伤中DDX3X表达的影响　为探究DDX3X在ConA诱导的小鼠肝损伤中与ERS相关细胞凋亡的关联，C57BL/6J小鼠在ConA（25 mg/kg）处理8 h前1 h注射4-PBA（100 mg/kg）。结果显示，与对照组相比，ConA组小鼠血清ALT和AST水平显著升高（P值均<0.000 1）（图5a），肝组织HE染色显示ConA组呈现明显肝损伤（图5b），肝组织中GRP78、CHOP和DDX3X的mRNA表达均显著上升（P值均<0.000 1）



注：a，qRT-PCR检测DDX3X的mRNA水平；b，通过ImageJ测定Western Blot图像灰度值，并进行定量；c，Western Blot检测DDX3X的蛋白表达水平；d，肝组织病理学结果（HE染色，×10），黑色箭头处为损伤区域。*P<0.05，**P<0.01，****P<0.000 1。DDX3X，DEAD-box解旋酶3X-连锁；HPRT，次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶；ConA，刀豆蛋白A；β-actin，β-肌动蛋白。

图2　DDX3X在ConA诱导的肝损伤期间的表达情况

Figure 2　Expression of DDX3X in the liver during liver injury induced by ConA



注：a，DDX3X$^{fl/fl}$和DDX3X$^{\Delta Hep}$小鼠用ConA（40 mg/kg）处理72 h生存曲线；b，DDX3X$^{fl/fl}$和DDX3X$^{\Delta Hep}$小鼠用ConA（25 mg/kg）处理8 h后ALT、AST水平；c，DDX3X$^{fl/fl}$和DDX3X$^{\Delta Hep}$小鼠用ConA（40 mg/kg）处理8 h后ALT、AST水平；d，肝组织病理学结果（HE染色，×10），黑色箭头处为损伤区域。****P<0.000 1。ALT，丙氨酸氨基转移酶；AST，天冬氨酸氨基转移酶；DDX3X，DEAD-box解旋酶3X-连锁；DDX3X$^{fl/fl}$，DDX3X基因的野生型等位基因型小鼠；DDX3X$^{\Delta Hep}$，肝细胞特异性DDX3X敲除小鼠；ConA，刀豆蛋白A。

图3　肝细胞特异性敲除DDX3X可改善ConA诱导的小鼠肝损伤

Figure 3　Hepatocellular specific knockout of DDX3X can improve liver injury induced by ConA in mice

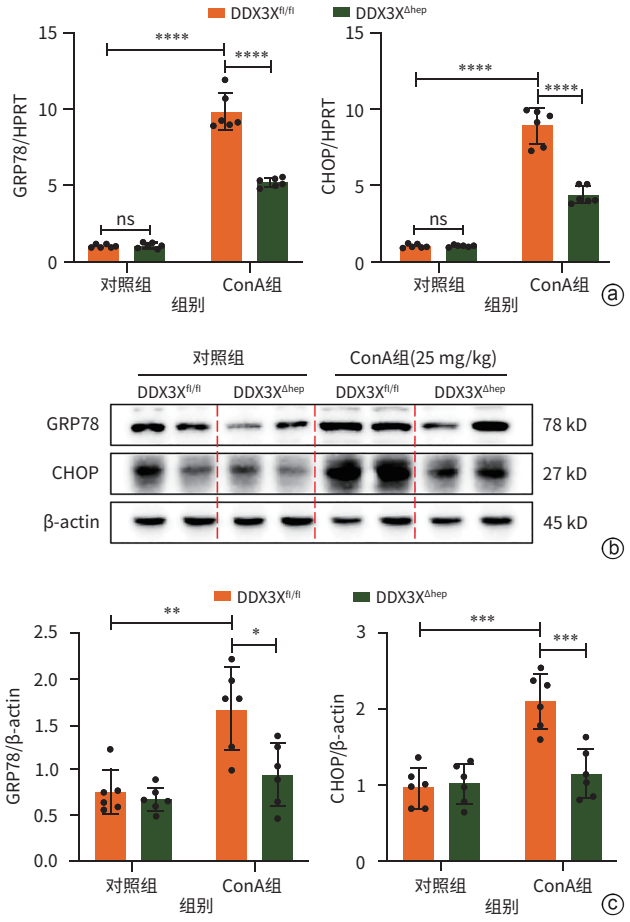
（图5c），肝组织中GRP78、CHOP和DDX3X的蛋白表达均显著上升（P值均<0.01）（图5d、e）。在ConA刺激后，与PBS预处理组相比，4-PBA预处理组小鼠血清ALT和AST水平显著降低（P值均<0.001）（图5a）。肝组织HE染色结果显示，4-PBA预处理可显著缓解ConA诱导的小鼠肝损伤（图5b）。同时，在ConA诱导的小鼠肝损伤中，抑制ERS不仅可降低GRP78和CHOP的mRNA与蛋白表达，还可显著降低肝脏DDX3X的表达（P值均<0.05）（图5c～e）。以上结果表明，在ConA诱导的小鼠ILI中，ERS的激活对DDX3X的表达具有正向调控作用。

2.5　DDX3X在ILI患者的肝组织中的表达　为进一步研究DDX3X的临床相关性，本研究分析了健康对照者、CHB患者和HBV-LF患者的DDX3X的表达情况。结果显示，在mRNA水平，CHB患者肝脏中GRP78的表达显著高于对照组（P<0.001），HBV-LF患者肝脏CHOP的表达显著高于对照组（P<0.000 1）（图6a）；在蛋白表达水平，CHB患者肝脏的GRP78和CHOP的表达均显著高于对照组（P值均<0.01），HBV-LF患者肝脏的GRP78和CHOP的表达表现出同样的趋势（P值均<0.01）（图6b～c），提示ILI患者肝组织中ERS相关的细胞凋亡水平显著上调。进一步检测分析结果显示，CHB患者和HBV-LF患者中DDX3X的mRNA和蛋白的表达均显著上调，且HBV-LF患者的DDX3X表达显著高于CHB患者（P值均<0.05）（图6a～c）。此外，HBV-LF组患者血清DDX3X水平显著高于健康对照组和CHB组（P值均<0.000 1）（图6d）。以上结果表明，DDX3X肝脏的表达水平可能与CHB疾病进展相关。

3　讨论

研究表明，DDX3X是应激细胞决定细胞命运的关键分子[25]，但其在ILI中的作用尚不明确。本研究结果表明，在ConA诱导的小鼠ILI中，DDX3X的表达水平显著上调，肝细胞特异性敲除DDX3X可以显著改善ConA诱导的小鼠肝损伤，提示其可能成为干预ILI的新靶点。

ERS诱导的肝细胞凋亡在多种ILI中均有研究。在HBV慢性感染中，病毒逃逸宿主免疫监视，促使ERS持续激活，进而导致肝损伤[26]。在自身免疫性肝病中，调节型T细胞中人内源性逆转录病毒包膜蛋白表达增加，



注：a，GRP78和CHOP的mRNA水平；b，Western Blot检测结果；c，GRP78和CHOP的蛋白表达水平。*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001，****P<0.000 1。GRP78，葡萄糖调节蛋白78；HPRT，次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶；DDX3X，DEAD-box解旋酶3X-连锁；CHOP，CCAAT增强子结合蛋白同源蛋白；β-actin，β-肌动蛋白；ConA，刀豆蛋白；DDX3X$^{fl/fl}$，DDX3X基因的野生型等位基因型小鼠；DDX3X$^{\Delta Hep}$，肝细胞特异性DDX3X敲除小鼠。

图4　肝细胞特异性敲除DDX3X减少ERS相关凋亡标志物的表达

Figure 4　Hepatocellular specific knockout of DDX3X reduces the expression of ERS-related apoptotic markers

触发ERS级联反应[27]。长期的ERS通过UPR信号传导启动细胞凋亡途径，转录因子CHOP是已知的响应ERS启动细胞凋亡的重要分子[28]。本研究发现，ConA刺激可激活ERS标志物CHOP及GRP78的表达，而在DDX3X$^{\Delta Hep}$小鼠中该通路显著受抑，提示DDX3X可能通过调控ERS相关的细胞凋亡参与肝损伤进程。既往研究表明，其作用机制为DDX3X通过与eIF4F复合物结合促进ATF4翻译，进而激活其下游靶基因CHOP的表达，最终促进细胞凋亡[29-30]。此外，抑制ERS（4-PBA）可下调DDX3X的表达并减轻肝损伤，证实了DDX3X可与ERS形成正反馈，共同加重肝损伤。这一发现可为理解ILI的分子机制提供新视角。

本研究结果显示，4-PBA预处理不仅可以降低血清ALT和AST的表达水平，还可使肝脏DDX3X表达下调，这一发现从机制层面揭示了打破DDX3X-ERS通路对疾病进程的可逆调控作用。此外，DDX3X$^{\Delta Hep}$小鼠生存率显著高于对照组，进一步证实了DDX3X作为治疗靶点的潜在价值。

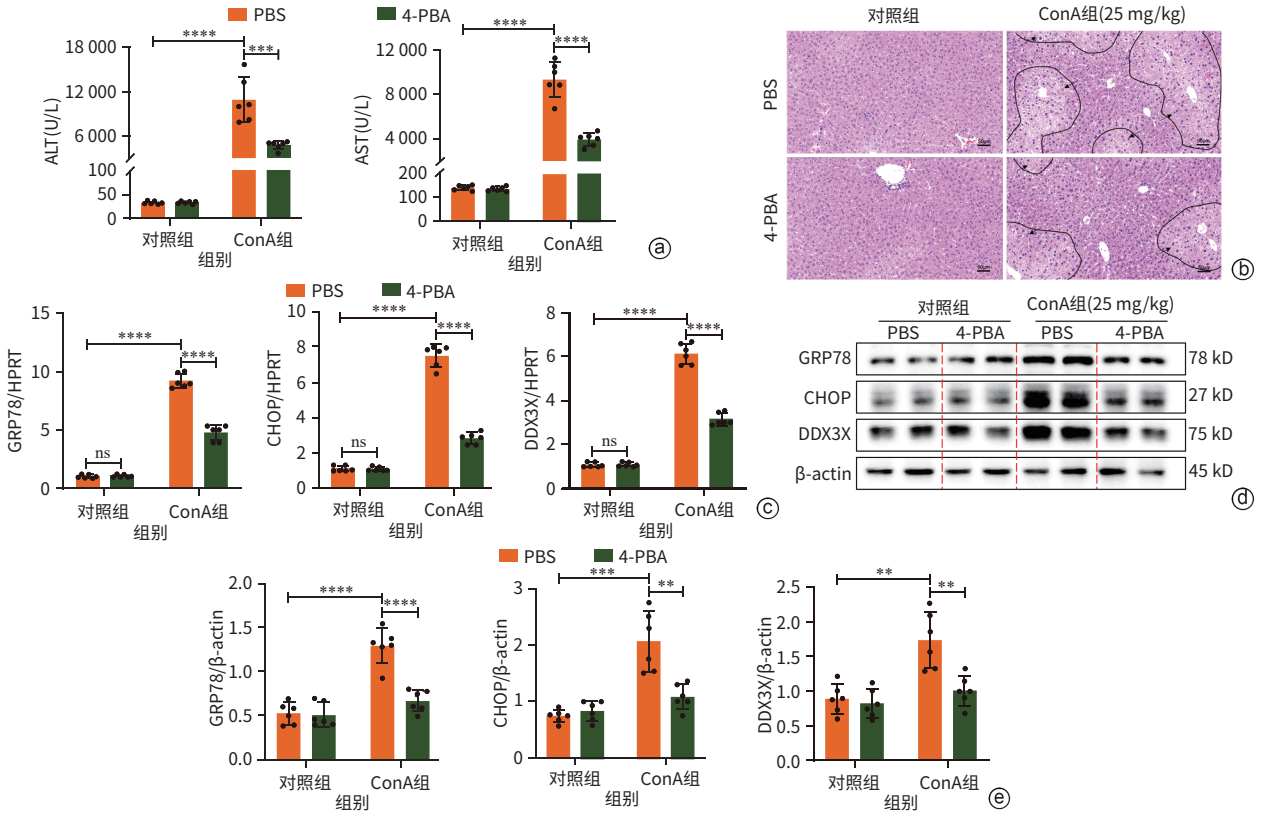
本研究结果显示，在HBV-LF患者血清中DDX3X表达水平显著高于健康对照和CHB患者，提示血清DDX3X作为无创诊断HBV-LF的潜在生物标志物，尤其适用于无法活检的重症患者，但其诊断特异性仍需通过多中心队列研究进一步验证。此外，HBV-LF患者的DDX3X表达显著高于CHB患者，提示其表达水平可能与疾病进展阶段相关，表明肝脏DDX3X水平有望作为乙型肝炎组织学进展的定量标志。

综上所述，DDX3X在ILI中表达显著升高，抑制DDX3X在肝细胞中的表达水平可以显著改善ConA诱导的小鼠ILI，其作用机制为DDX3X通过激活ERS-CHOP通路介导了ILI；临床数据进一步提示肝脏DDX3X表达水平与HBV相关肝病进展呈正相关。这些结果表明DDX3X在维持肝脏免疫稳态中发挥了重要作用，尽管其作为诊断标志物的临床价值仍需大样本验证，但靶向抑制DDX3X表达可能为ILI的诊断和治疗提供了新的思路与方向。

伦理学声明：本研究动物实验方案于2024年3月经由首都医科大学实验动物伦理委员会审批，批号：AEEI-2024-166，符合实验室动物管理与使用准则。本研究临床试验方案于2019年经由北京佑安医院伦理委员会审批，批号：京佑伦审[2019]第989号，所纳入患者均签署知情同意书，研究方案严格遵循《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》及《赫尔辛基宣言》（2013年修订版）伦理准则。

利益冲突声明：本文不存在任何利益冲突。

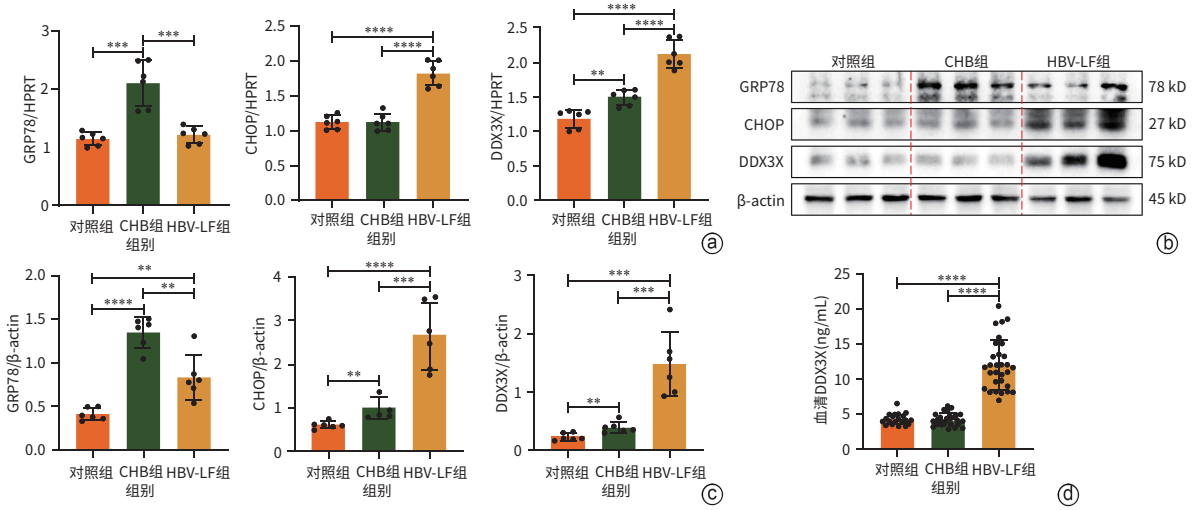
作者贡献声明：潘桢桢负责设计实验，分析、解释数据，起草文章，统计分析；徐玲负责实施研究，审阅文章，统计分析；朱先茹负责实施研究，分析、解释数据，统计分析；范子豪负责设计实验，统计分析；曹亚玲负责审阅文章；莫胤康负责分析、解释数据；闫赛负责统计分析；任锋负责审阅文章，获取研究经费，技术及材料支持。



注：a，血清ALT和AST水平；b，肝组织病理学结果(HE染色，×10)，黑色箭头处为损伤区域；c，GRP78、CHOP、DDX3X的mRNA水平；d，Western Blot检测结果；e，GRP78、CHOP、DDX3X的蛋白表达水平。**P<0.01，***P<0.001，****P<0.000 1。ALT，丙氨酸氨基转移酶；AST，天冬氨酸氨基转移酶；4-PBA，4-苯基丁酸；PBS，磷酸盐缓冲溶液；ConA，刀豆蛋白A；GRP78，葡萄糖调节蛋白78；HPRT，次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶；CHOP，CCAAT增强子结合蛋白同源蛋白；DDX3X，DEAD-box解旋酶3X-连锁；β-actin，β-肌动蛋白。

图5　抑制ERS可下调ConA诱导的小鼠肝损伤中DDX3X的表达

Figure 5　Inhibition of ERS significantly reduced the expression of DDX3X in ConA-induced liver injury in mice



注：a，GRP78、CHOP和DDX3X的mRNA水平；b，Western Blot检测结果；c，GRP78、CHOP和DDX3X的蛋白表达水平；d，血清DDX3X水平。**P<0.01，***P<0.001，****P<0.000 1。GRP78，葡萄糖调节蛋白78；CHOP，CCAAT增强子结合蛋白同源蛋白；DDX3X，DEAD-box解旋酶3X-连锁。

图6　DDX3X在ILI患者中的表达情况

Figure 6　Expression of DDX3X in patients with immune-mediated liver injury

参考文献：

[1] ROBINSON MW, HARMON C, O'FARRELLY C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis[J]. Cell Mol Immunol, 2016, 13(3): 267-276. DOI: 10.1038/cmi.2016.3.

[2] HOOFNAGLE JH, BJÖRNSSON ES. Drug-induced liver injury-types and phenotypes[J]. N Engl J Med, 2019, 381(3): 264-273. DOI: 10.1056/NEJMra1816149.

[3] LONGHI MS, MA Y, MIELI-VERGANI G, et al. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis[J]. J Autoimmun, 2010, 34(1): 7-14. DOI: 10.1016/j.jaut.2009.08.010.

[4] ADAMS DH, JU C, RAMAIAH SK, et al. Mechanisms of immune-mediated liver injury[J]. Toxicol Sci, 2010, 115(2): 307-321. DOI: 10.1093/toxsci/kfq009.

[5] NABEKURA T, MATSUO S, SHIBUYA A. Concanavalin-A-induced acute liver injury in mice[J]. Curr Protoc, 2024, 4(8): e1117. DOI: 10.1002/cpz1.1117.

[6] TIEGS G, HENTSCHEL J, WENDEL A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A[J]. J Clin Invest, 1992, 90(1): 196-203. DOI: 10.1172/JCI115836.

[7] CUI Y, QIAO FJ, QIU JH, et al. Effect of ganoderic acid A on a mouse model of concanavalin A-induced acute immune liver injury and its mechanism[J]. J Clin Hepatol, 2024, 40(12): 2415-2423. DOI: 10.12449/JCH241211.
崔怡, 乔凤杰, 邱嘉昊, 等. 灵芝酸A对刀豆球蛋白A诱导的急性免疫性肝损伤小鼠模型的影响及其作用机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(12): 2415-2423. DOI: 10.12449/JCH241211.

[8] HETZ C. The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(2): 89-102. DOI: 10.1038/nrm3270.

[9] OAKES SA, PAPA FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology[J]. Annu Rev Pathol, 2015, 10: 173-194. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012513-104649.

[10] LEBEAUPIN C, VALLÉE D, HAZARI Y, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Hepatol, 2018, 69(4): 927-947. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.06.008.

[11] YAN CY, HU WT, TU JQ, et al. Pathogenic mechanisms and regulatory factors involved in alcoholic liver disease[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 300. DOI: 10.1186/s12967-023-04166-8.

[12] HU TY, WANG JY, LI WX, et al. Endoplasmic reticulum stress in hepatitis B virus and hepatitis C virus infection[J]. Viruses, 2022, 14(12): 2630. DOI: 10.3390/v14122630.

[13] PU SS, PAN YY, ZHANG Q, et al. Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial stress in drug-induced liver injury[J]. Molecules, 2023, 28(7): 3160. DOI: 10.3390/molecules28073160.

[14] MALHI H, KAUFMAN RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease[J]. J Hepatol, 2011, 54(4): 795-809. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.11.005.

[15] JIANG JL, ZHOU YY, ZHONG WW, et al. Uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 prevents the progression of liver injury[J]. World J Gastroenterol, 2024, 30(9): 1189-1212. DOI: 10.3748/wjg.v30.i9.1189.

[16] de BISSCHOP G, AMEUR M, ULRYCK N, et al. HIV-1 gRNA, a biological substrate, uncovers the potency of DDX3X biochemical activity[J]. Biochimie, 2019, 164: 83-94. DOI: 10.1016/j.biochi.2019.03.008.

[17] AJAMIAN L, ABEL K, RAO S, et al. HIV-1 recruits UPF1 but excludes UPF2 to promote nucleocytoplasmic export of the genomic RNA[J]. Biomolecules, 2015, 5(4): 2808-2839. DOI: 10.3390/biom5042808.

[18] SAIKRUANG W, ANG YAN PING L, ABE H, et al. The RNA helicase DDX3 promotes IFNB transcription via enhancing IRF-3/p300 holo complex binding to the IFNB promoter[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 3967. DOI: 10.1038/s41598-022-07876-z.

[19] LI QS, PÈNE V, KRISHNAMURTHY S, et al. Hepatitis C virus infection activates an innate pathway involving IKK-α in lipogenesis and viral assembly[J]. Nat Med, 2013, 19(6): 722-729. DOI: 10.1038/nm.3190.

[20] RYAN CS, SCHRÖDER M. The human DEAD-box helicase DDX3X as a regulator of mRNA translation[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 1033684. DOI: 10.3389/fcell.2022.1033684.

[21] HEATON SM, GORRY PR, BORG NA. DExD/H-box helicases in HIV-1 replication and their inhibition[J]. Trends Microbiol, 2023, 31(4): 393-404. DOI: 10.1016/j.tim.2022.11.001.

[22] FOX D, MAN SM. DDX3X: Stressing the NLRP3 inflammasome[J]. Cell Res, 2019, 29(12): 969-970. DOI: 10.1038/s41422-019-0250-8.

[23] LUO TT, YANG SZ, ZHAO TM, et al. Hepatocyte DDX3X protects against drug-induced acute liver injury via controlling stress granule formation and oxidative stress[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(7): 400. DOI: 10.1038/s41419-023-05913-x.

[24] PAN ZZ, XU L, ZHANG XY, et al. Construction and identification of Ddx3x conditional liver knockout mouse model based on CRISPR/Cas9 combined with Cre-LoxP method[J]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2024, 33(10): 1275-1280. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5709.2024.10.002.
潘桢桢, 徐玲, 张向颖, 等. 基于CRISPR/Cas9联合Cre-LoxP方法的Ddx3x肝脏条件性敲除小鼠模型的构建与鉴定[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2024, 33(10): 1275-1280. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5709.2024.10.002.

[25] SAMIR P, KESAVARDHANA S, PATMORE DM, et al. DDX3X acts as a live-or-die checkpoint in stressed cells by regulating NLRP3 inflammasome[J]. Nature, 2019, 573(7775): 590-594. DOI: 10.1038/s41586-019-1551-2.

[26] KIM SY, KYAW YY, CHEONG J. Functional interaction of endoplasmic reticulum stress and hepatitis B virus in the pathogenesis of liver diseases[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(43): 7657-7665. DOI: 10.3748/wjg.v23.i43.7657.

[27] SUBRAMANIAN K, PAUL S, LIBBY A, et al. HERV1-env induces unfolded protein response activation in autoimmune liver disease: A potential mechanism for regulatory T cell dysfunction[J]. J Immunol, 2023, 210(6): 732-744. DOI: 10.4049/jimmunol.2100186.

[28] OYADOMARI S, MORI M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress[J]. Cell Death Differ, 2004, 11(4): 381-389. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401373.

[29] ADJIBADE P, GRENIER ST-SAUVEUR V, BERGEMAN J, et al. DDX3 regulates endoplasmic reticulum stress-induced ATF4 expression[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13832. DOI: 10.1038/s41598-017-14262-7.

[30] HAN J, BACK SH, HUR J, et al. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death[J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(5): 481-490. DOI: 10.1038/ncb2738.

收稿日期：2025-06-22；**录用日期：**2025-09-18

本文编辑：王亚南

引证本文：PAN ZZ, XU L, ZHU XR, et al. Role of endoplasmic reticulum stress-mediated DEAD-box helicase 3 X-linked in a mouse model of concanavalin A-induced immune-mediated liver injury[J]. J Clin Hepatol, 2026, 42(1): 134-142.
潘桢桢, 徐玲, 朱先茹, 等. DEAD-box解旋酶3X-连锁(DDX3X)在免疫介导性肝损伤小鼠模型和HBV相关肝损伤患者中的表达分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2026, 42(1): 134-142.