

• 生物技术与方法 •

高尔基体跨膜糖蛋白 73 高表达诱发脂肪肝的脂类特性分析

丰江岳, 钟辉

军事科学院军事医学研究院 生物工程研究所, 北京 100071

丰江岳, 钟辉. 高尔基体跨膜糖蛋白 73 高表达诱发脂肪肝的脂类特性分析. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2322-2331.

FENG JY, ZHONG H. Lipid characteristics of fatty liver induced by high expression of Golgi protein 73. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2322-2331.

摘要: 脂肪性肝病是最常见的慢性肝脏疾病, 脂质代谢异常是脂肪性肝病发生的重要原因。为研究高尔基体糖蛋白 (Golgi protein 73, GP73) 对肝脏脂质代谢的影响, 选用八周龄 C57BL/6J 小鼠通过尾静脉注射搭载 GP73 的腺相关病毒 (AAV-GP73), 构建肝脏特异性高表达 GP73 的小鼠, 通过对肝脏进行脂质代谢组学分析发现小鼠肝脏中的脂质尤其是甘油三酯明显增加。京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析显示, GP73 通过引起脂代谢产物的改变导致诸多与细胞代谢活动相关的信号通路出现紊乱, 特别是与人类密切相关的疾病如 II 型糖尿病、非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 和癌细胞胆碱代谢更可能发生失调。研究表明, GP73 可能通过参与调控脂类代谢并促进肝脏内脂质积累诱发脂肪肝。

关键词: 脂肪性肝病; GP73; 脂质代谢组; KEGG

Lipid characteristics of fatty liver induced by high expression of Golgi protein 73

FENG Jiangyue, ZHONG Hui

Beijing Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: Fatty liver disease is a common chronic liver disease which is mainly induced by abnormal

Received: October 28, 2021; **Accepted:** February 8, 2022; **Published online:** February 10, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (82070595, 81773205)

Corresponding author: ZHONG Hui. E-mail: towall@yahoo.com

基金项目: 国家自然科学基金 (82070595, 81773205)

lipid metabolism. To find out the effect of GP73 on lipid metabolism in the liver, we constructed a high GP73 expression liver model through a tail vein injection of AAV-GP73 into eight-week-old C57BL/6J mice. Liver lipid metabolomics analysis showed that lipids in the liver of mice, especially the triglycerides, were significantly increased. In addition, kyoto encyclopedia of genes and genomes enrichment analysis showed that GP73 altered lipid metabolites profile that may further disturb many signaling pathways related to cellular metabolism. The diseases linked to type II diabetes, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and choline metabolism in cancer cells were more likely to be dysregulated. Thus, GP73 may induce fatty liver by regulating lipid metabolism and promoting lipid accumulation in the liver.

Keywords: fatty liver disease; GP73; lipid metabolomics; KEGG

高尔基体跨膜糖蛋白 73 (Golgi protein 73, GP73) 又称高尔基体膜蛋白 1 (Golgi membrane protein 1, GOLM1) 或高尔基体磷蛋白 2 (Golgi phosphoprotein, GOLPH2), 是一种定位在高尔基体上的膜蛋白^[1-2]。GP73 结构主要分为 5 个部分: N 端的 1-12 位氨基酸为胞质结构域; 12-35 位氨基酸是跨膜结构域; 36-205 位氨基酸是卷曲螺旋结构域, 负责与其他蛋白相互作用; 206-348 位氨基酸是无定形结构域; 349-401 位氨基酸是酸性片段区, 具有亲水性, 除无定形结构域是非保守区, 其他几个结构域都有极高的保守性^[3], GP73 的第 55 位氨基酸附近有一个前蛋白转化酶的切割位点, 全长 GP73 被前蛋白转化酶切割后从高尔基体释放, 分泌进入血清^[4]。GP73 在正常肝组织中几乎不表达, 但在肝脏疾病中, 几乎所有肝细胞中均有表达, 特别是结缔组织周边和肝硬化结节部位表达尤为显著^[5]。在绝大多数的肝癌病人中, GP73 蛋白在血清以及肝组织中的表达水平显著升高^[6]。有研究显示细胞内 GP73 异常高表达通过激活多种信号通路促进肿瘤的生长和转移。已经有多篇文章报道了 GP73 在肝癌组织和血清中呈现高表达^[7-11], 但是对于 GP73 的生物学功能尚不完全清楚。虽然脂肪肝的发生与众多的能量代谢紊乱有关, 但是脂

肪肝形成的确切分子机制还没有完全揭示。

脂肪性肝病是临床最常见的慢性肝脏疾病, 成为仅次于病毒性肝炎的第二大肝病, 近年来其患病率不断上升, 且发病年龄日趋年轻化^[12]。脂肪肝疾病的演变过程主要表现为 4 个阶段, 分别为单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、不同程度的脂肪肝纤维化及最终发展到末期的脂肪性肝硬化^[13]。脂质在肝细胞内的过度累积是脂肪性肝病的标志。脂肪肝的形成由多种因素造成, 常见的脂肪肝主要与以下的几个原因有关, 包括药物的不合理使用、长期饮酒、过分节食、病原微生物感染和机体遗传性代谢的紊乱如肥胖病、糖尿病等。目前对脂肪肝治疗仍无有效的方法, 因而寻找新的防治手段是目前需要尽快解决的问题^[14]。肝脏是脂质代谢的重要场所, 食物中的脂肪在小肠内通过脂解作用分解, 分解产生的甘油和游离脂肪酸最终被肝细胞吸收, 在肝脏细胞内游离脂肪酸经过酯化作用重新合成甘油三酯和脂肪, 然后通过载脂蛋白运出肝脏送达皮下进行储存或者以极低密度脂蛋白的形式释放到血清中^[15]。在脂肪肝中, 脂代谢的正常稳态平衡已经被破坏, 肝组织吸收和体内合成脂肪酸的相对速率大于脂肪酸氧化的速率。正常人肝组织中含有少量的脂肪, 如甘油三酯、磷脂、糖脂和胆固醇等, 其

重量约为肝重量的 3%–5%，如果肝内脂肪蓄积太多，超过肝重量的 5%或在组织学上肝细胞 50%以上有脂肪变性时，这一现象的出现被认为是脂肪肝发生的开始^[16]。

脂肪肝脂类的堆积如果是惰性脂类比如甘油三酯是不能诱发糖代谢紊乱且不具备脂毒性，但是如果是具有脂毒性的神经酰胺、甘油二酯、游离脂肪酸等脂类，会造成活性氧、炎症等多个代谢通路紊乱，如生成的甘油二酯和蛋白激酶 G 影响空腹血糖进而影响胰岛素敏感性。前期我们发现 GP73 在肝脏中高表达能够诱发脂类代谢紊乱，所以脂类的特征分析对于揭示 GP73 诱发的脂肪肝严重程度以及对糖代谢的影响至关重要。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠，购于北京斯贝福实验动物技术有限公司，生产许可证号：SCXK(京) 2019-0010。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 试剂

TriQuick Reagent 总 RNA 提取试剂 (Solarbio, R1100); EasyScript[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (TransGen Biotech, AE311-03); PerfectStart[®] Green qPCR SuperMix (TransGen Biotech, AQ601-04); Mouse IL-1 β Precoated ELISA kit (Dajewe, 1210122); Anti-GOLM1 Antibody (Boster, A02975-2); Alpha Tubulin Polyclonal antibody (Proteintech, 11224-1-AP); 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (中杉金桥, ZB-2301)。

1.2.2 仪器

NanoDrop Lite 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific); QuantStudio 3 Real-Time PCR System

(Thermo Fisher Scientific, A28137); 琼脂糖凝胶电泳仪; SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳仪; 生物样品均质仪 (Allsheng, Bioprep-6)。

1.3 实验方法

1.3.1 肝脏特异性高表达 GP73 小鼠模型构建

选用 20 只 8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠，分为 2 组。一组通过尾静脉注射由汉恒生物公司包装制备的 3×10^{11} vg/mL AAV-GP73，构建 GP73 肝脏特异性高表达小鼠；另一组作为对照注射同等剂量的 AAV-V。本研究动物实验经军事医学研究院实验动物管理与使用委员会批准 (批准号为 IACUC-DWZX-2020-035)。

1.3.2 血清生化指标分析

建模 5 个月后，小鼠过夜饥饿，尾静脉采集 300 μ L 小鼠血液。离心获得血清，测定血清中的丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、胆固醇 (CHO) 和甘油三酯 (TG) 等指标。

1.3.3 糖耐量试验

AAV 和 AAV-GP73 注射 5 个月后，对两组小鼠禁食过夜后腹腔注射葡萄糖 (1.5 mg/g)，于注射前即 0 min，给药后 15、30、60、90、120 min 通过尾静脉采血方式分别检测血糖。

1.3.4 IL-1 β 水平测定

AAV 和 AAV-GP73 组小鼠建模 5 个月后尾静脉取血，按照 Mouse IL-1 β Precoated ELISA kit 的说明书测定 IL-1 β 水平。具体步骤如下，每孔 100 μ L 稀释后的样本，加入 50 μ L Biotinylated mouse IL-1 β antibody 工作液，混匀后盖上封板膜，37 $^{\circ}$ C 温育 90 min。扣去孔内液体，加入 300 μ L Washing buffer 工作液，停留 1 min 后弃去孔内液体，重复 4 次。加入 100 μ L Streptavidin-HRP 工作液，37 $^{\circ}$ C 温育 30 min。洗板后，加入 100 μ L TMB，37 $^{\circ}$ C 避光温育 10 min，加入 100 μ L Stop solution 终止

反应, 酶标仪 450 nm 波长处读值。

1.3.5 qRT-PCR

AVV-GP73 注射 5 个月取小鼠各个脏器 50 mg, 根据 Trizol 法提取各个组织的 RNA, 并利用全式金试剂盒将其反转录成 cDNA, 通过 qRT-PCR 分析各个组织中 GP73 的转录水平。用于 qRT-PCR 分析的引物如下: mGP73-F: 5'-GAGAAGCTCATTCGAGACCTG-3'; mGP73-R: 5'-ATCTGGCTGATACTGGTTC-3'。

1.3.6 油红染色

AAV-V 和 AAV-GP73 组建模 5 个月的小鼠死后将肝脏制成组织切片, PBS 洗涤切片 3 次, 每次 5–10 min, 将切片在 60% 异丙醇中洗涤 5 min, 将切片放入油红染色液中避光染色 15 min 后转移到 60% 异丙醇中浸润 1 min。三蒸水洗涤后放入苏木素染液中染色 5 min, 三蒸水洗涤, 1% 盐酸酒精迅速分化 1–2 s, 流水缓慢冲洗 1–3 h, 周围水分吸干后, 封片。

1.3.7 肝脏脂质提取

肝脏特异性高表达小鼠和对照小鼠建模 5 个月每组分别选取 4 只小鼠脱颈处死, 解剖出肝脏, 称量 50 mg 加入到对应的已编号的 2 mL 离心管中, 剩余样品冷冻保存。记录每个样本的称量重量。加入 1 mL 脂质提取液, 并放入钢珠, 摇匀, 用研磨机匀浆, 取出钢珠, 涡旋 2 min, 超声 5 min 加入 50 μ L 水。涡旋 1 min, 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上层清液 500 μ L 到编号的 1.5 mL 离心管中, 浓缩, 用 100 μ L 流动相 B 复溶, 用于 LC-MS/MS 分析。

1.3.8 蛋白质免疫印迹

称取 50 mg 肝脏组织到 2 mL 研磨管中, 加入 500 μ L NP40 裂解液, 并放入钢珠。用研磨机匀浆后置于冰上 15 min, 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 4 min, 加入含 DTT 的 5 \times 蛋白

质上样缓冲液, 上清转移至 1.5 mL EP 管中, 沸水煮样 10 min。进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 牛奶封闭 1 h, 一抗室温孵育 1 h (1 : 1 000), TBST 洗涤 3 次; 孵育二抗 (1 : 2 000), TBST 洗涤 3 次, 显影, 定影。

1.3.9 色谱质谱采集

数据采集仪器系统主要包括超高效液相色谱和串联质谱。

液相条件主要包括: (1) 色谱柱: Thermo C30 柱, i.d. 2.1 mm \times 100 mm, 2.6 μ m; (2) 流动相: A 相乙腈/水 (60/40, 含 0.04% 乙酸, 5 mmol/L 甲酸铵); B 相乙腈/异丙醇 (10/90, 含 0.04% 乙酸, 5 mmol/L 甲酸铵); (3) 0 min A/B (80 : 20, V/V), 3 min 为 50 : 50 (V/V), 5 min 为 35 : 65 (V/V), 9 min 为 25 : 75 (V/V), 15.5 min 为 10 : 90 (V/V); (4) 流速 0.35 mL/min; 柱温 45 $^{\circ}$ C; 进样量 2 μ L。

质谱条件主要包括: 电喷雾离子源温度 550 $^{\circ}$ C, 质谱电压 5 500 V, 帘气 241 kPa, 碰撞诱导电离参数设置为“中”。在三重四极杆中, 每个离子对是根据优化的去簇电压和碰撞能进行扫描检测。

1.3.10 代谢物定性与定量

基于自建靶向标品数据库, 根据检测物质的保留时间、子母离子对信息及二级谱数据进行定性分析。代谢物定量是利用三重四极杆质谱的多反应监测模式分析完成。标品数据库模式中, 第一重四极杆首先筛选目标物质的前体离子 (母离子), 排除掉其他物质对应的前体离子以初步排除干扰; 前体离子在第二重四极杆中经碰撞诱导电离后被打碎, 并依据物质自身的结构特征断裂形成一系列该物质特有的碎片离子, 碎片离子再通过第三重四极杆过滤选择一个典型的特征碎片离子, 排除非目标离子的干扰, 使定量更为精确, 重复性更好。在获

得不同样本的液质下机数据后,对所有代谢物的提取离子色谱峰分别进行峰下面积积分,并对其中同一代谢物在不同标本中的色谱峰进行积分校正。

1.3.11 数据结果评估与分析

从代谢物定性定量、样本质控、主成分、聚类和重复相关性 5 个方面进行评估,数据结果采用正交偏最小二乘法判别,筛选差异代谢物并从 KEGG 功能注释及富集分析两个方面进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 肝脏特异性高表达 GP73 诱发小鼠脂肪肝

实验用鼠分为 2 组,每组各 4 只,对一组小鼠尾静脉注射搭载 GP73 的腺相关病毒,计为 AAV-GP73 组;另一组小鼠注射未搭载任何蛋白的腺相关病毒,计为 AAV-V 组。5 个月,AAV-GP73 注射组小鼠肝脏中 GP73 的转录和蛋白表达水平显著上调(图 1A-B)。AAV-GP73 组小鼠与对照组相比空腹血糖明显升高(图 1C);糖耐受的结果也表明,AAV-GP73 组小鼠的血糖水平高于对照组,说明其糖耐受能力降低(图 1D)。AAV-GP73 组小鼠血清中 ALT、AST 水平显著升高(图 1E-F),TG 和 CHO 水平显著降低(图 1G-H)。油红染色的结果也发现,肝脏高表达 GP73 后,脂质积累明显增多(图 1I)。以上结果表明,肝脏特异性高表达 GP73 后,诱发了小鼠脂肪肝的形成。同时我们还发现,AAV-GP73 小鼠体内 IL-1 β 明显升高(图 1J)。GP73 在诱发脂肪肝的同时,还导致机体炎症应答。

2.2 GP73 高表达促使肝脏内脂质水平增加

鉴于 GP73 在脂肪肝中的重要作用,为更

深入系统地了解 GP73 高表达过程中肝脏脂质的变化。本研究利用 UPLC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) 技术对上述小鼠肝脏进行了脂质组学分析。为更直观地体现 AAV-GP73 组与对照组的脂质表达差异,本研究以 log₂ fold-change 的形式展示了 GP73 高表达对肝脏脂质水平的影响。以变量投影重要性分析值 (variable importance in project, VIP) ≥ 1 , 同时 fold change ≥ 2 或 fold change ≤ 0.5 作为显著性差异的界定标准。结果如图 2 所示,与对照组相比,共鉴定到 130 个有显著性差异的代谢产物。其中,119 个脂代谢物在 AAV-GP73 组的小鼠肝脏内显著上调,11 个脂代谢物下调说明 GP73 是影响肝脏中脂质水平的重要因素。

2.3 GP73 诱导肝脏中具体形式的脂质变化

对上述 130 个脂质进行归类分析后发现,与 AAV-V 对照小鼠相比,AAV-GP73 小鼠肝脏中上调最多的是甘油三酯 (TG),共计 102 种,占有上调脂质的 75%;其次为占上调脂质 3.6% 的 5 种甘油二酯 (DG)、占上调脂质比为 3.6% 的 5 种胆固醇酯 (CE)、3 种肉碱 (CAR)、2 种神经酰胺 (Cer),以及 1 种游离脂肪酸 (FFA) 和 1 种磷脂酰乙醇胺 (PE) (图 3A-B)。GP73 肝脏高表达后发生下调的脂质则主要有 8 种磷脂酰胆碱 (PC) 和 3 种磷脂酰乙醇胺 (PE) (图 3B)。以上结果表明,GP73 高表达导致肝脏细胞积累了大量饱和及低饱和的脂质。C12:0、C14:0、C20:5 以及 C22:6 形式 TG 的累积暗示了 GP73 高表达小鼠可能从饮食中吸收了过多的脂质。由于 PC 和 PE 都是 Kennedy 途径中 DG 的产物,GP73 导致的 DG 积累可能意味着 GP73 参与调控了 Kennedy 途径。

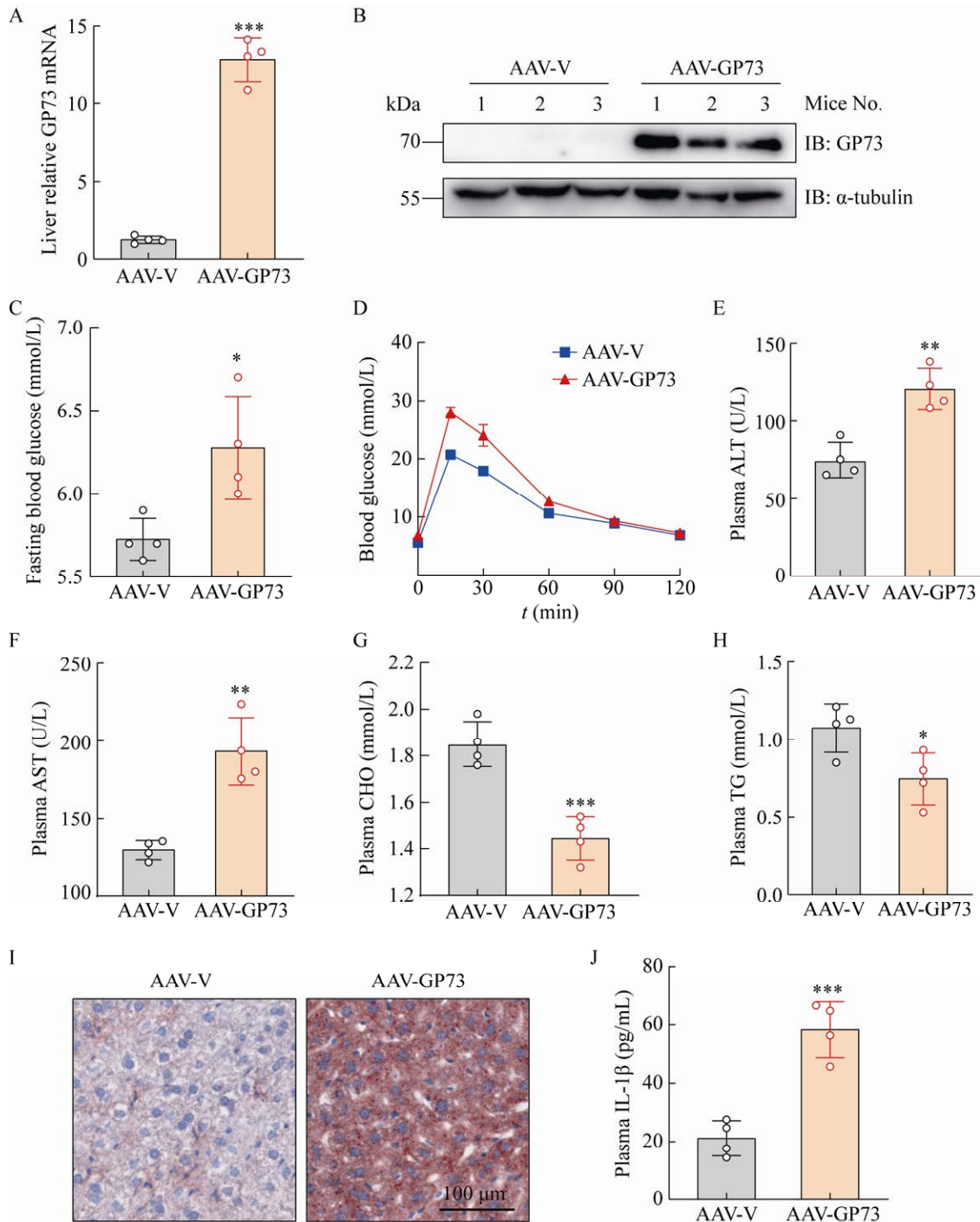


图 1 肝脏 GP73 特异性高表达诱发小鼠脂肪肝

Figure 1 High expression of GP73 in liver induces fatty liver in mice. (A–B) Liver level of GP73 mRNA and protein, (C) Fasting blood glucose, (D) Glucose tolerance test (GTT) results, (E–F) Plasma levels of ALT and AST, (G–H) Plasma levels of CHO and TG, (I) Oil red O (ORO) and (J) Plasma levels of IL-1β in AAV-V or AAV-GP73 injected mice at 5 months after injection ($n=4$ or 3 per group). Differences between the two groups were evaluated using two-tailed student's t -test.

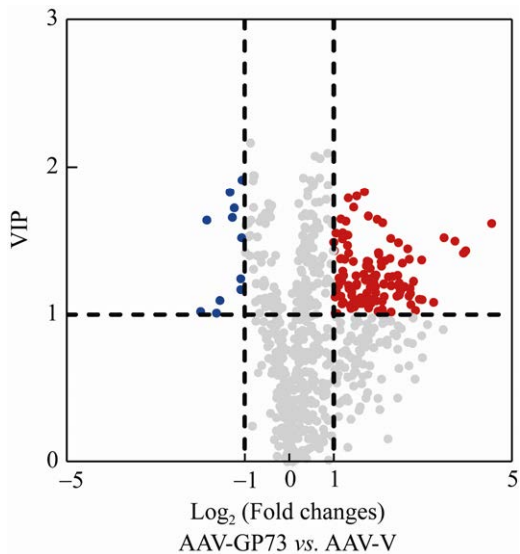


图2 小鼠肝脏脂质代谢物差异分析火山图

Figure 2 Volcano plot of the differentially regulated lipid metabolites in the livers from AAV-GP73-injected mice at 5 months after injection ($n=4$ per group). The black vertical lines highlight fold changes (FCs) of -2 and 2 , while the Y-axis represents variable importance in project (VIP). $VIP \geq 1$ and fold change ≥ 2 or fold change ≤ 0.5 were declared significant and marked with dashed lines. Significantly downregulated lipids are in blue, significantly upregulated lipids are in red, and lipids that did not have any significant difference are in gray.

2.4 GP73 引发肝脏脂质代谢物的改变对细胞代谢活性的影响

为深入分析 GP73 肝脏高表达造成的脂质代谢变化对细胞生命活动的影响,本研究通过 KEGG 富集的方式分析了这些脂质代谢产物所属的代谢途径。KEGG 富集分析显示,GP73 引起的这些脂质代谢产物变化涉及诸多细胞代谢活动,比如脂肪细胞的脂分解、脂肪消化和吸收、胆固醇代谢、甘油磷脂代谢和胰岛素抵抗;特别是与人类相关的疾病如 II 型糖尿病、非酒精性脂肪肝以及癌症中的胆碱代谢也出现异常(图 4A)。GP73 高表达后 DG、Cer、CE

以及 FFA 的增多有可能会引起脂肪性病变、胰岛素抵抗以及诱发强烈的炎症应答(图 4B),这与我们前期研究结果一致。

3 讨论

GP73 作为一种位于高尔基体上的 II 型跨膜糖蛋白,正常肝脏中 GP73 的表达非常低^[1]。但在有肝脏疾病的患者中,其不仅在肝脏中表达量显著升高,患者血清中亦能够检测到很高的 GP73 含量^[6,17]。在诊断早期肝癌方面,GP73 优于甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)成为更好地诊断肝癌尤其是早期肝癌的血清标志物^[11,18-19]。GP73 在机体的生理病理活动中发挥多种重要作用。

本实验室前期研究发现,GP73 通过募集固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element-binding proteins, SREBPs)至高尔基体,促进 SREBPs 的转录活性^[20],由此揭开了 GP73 参与脂质代谢调控的面纱。考虑到 GP73 在脂肪肝发展中的重要性,本研究借助 AAV 携带 GP73 构建肝脏特异性高表达小鼠模型,通过解剖肝脏进行脂质组学研究,采用液相色谱-串联质谱技术分析脂质组,系统地分析了 GP73 诱导小鼠脂肪肝中的脂质代谢谱,正如预期的那样,AAV-GP73 小鼠肝脏内脂质明显积累,GP73 诱导饱和及低饱和脂肪酸积累显著,其中 C12:0、C14:0、C20:5 和 C22:6 甘油三酯的积累表明 GP73 促使小鼠从正常饲料中摄取的脂肪增加。由于磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺都是由甘油二酯通过 Kennedy 途径产生,甘油二酯的特异性积累可能是由于 GP73 对 Kennedy 途径调控作用所导致^[21]。肝脏代谢物表现出 CE、TG、FFA、DG 和 Cer 的积累,这些都是脂肪

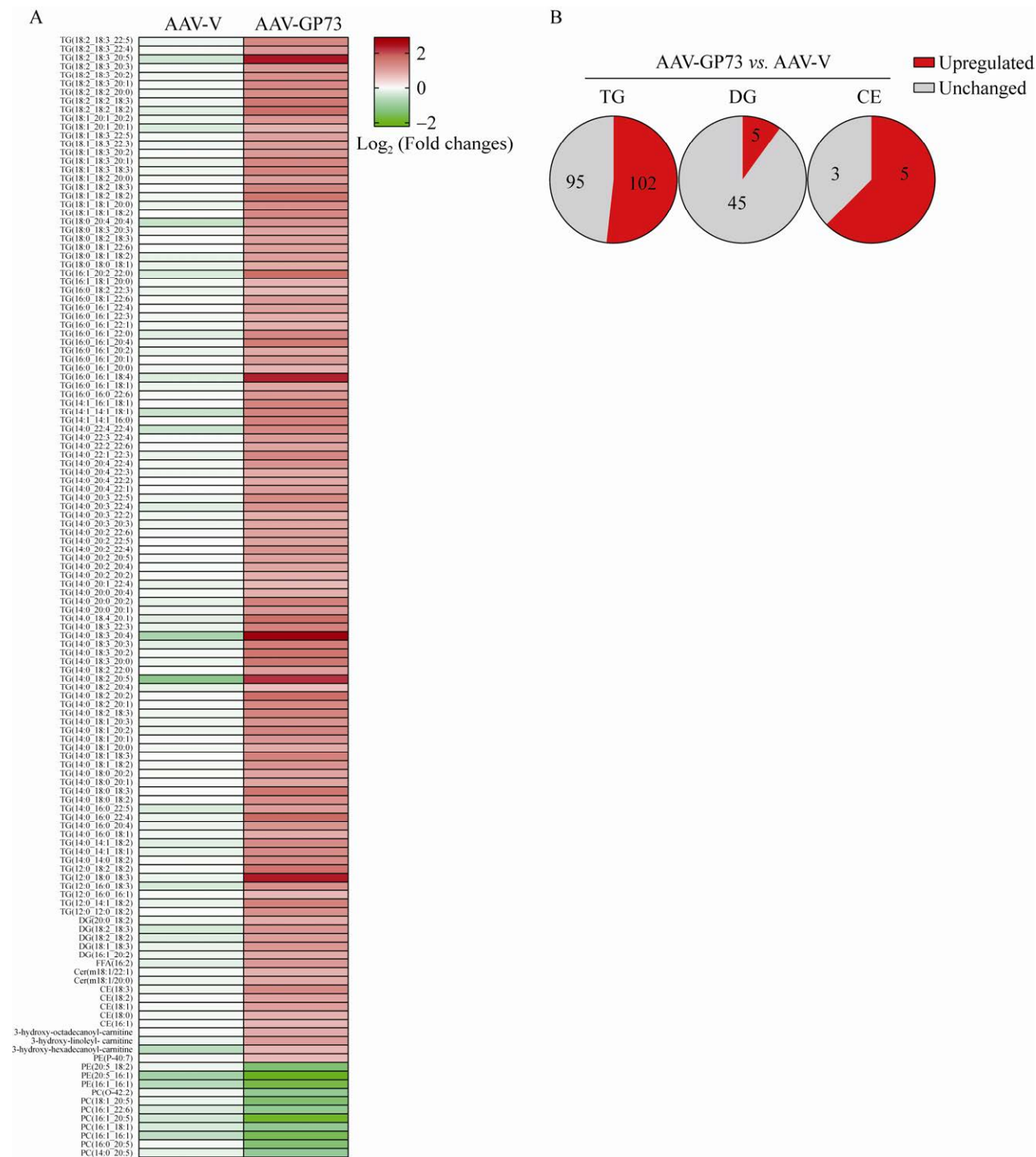


图 3 GP73 特异性高表达小鼠肝脏内发生显著性变化的脂质代谢物

Figure 3 The lipid metabolites with significant changes in GP73 high expression liver. (A) Effect of GP73 on hepatic lipid metabolite profiles ($n=4$). Red indicates a strong positive correlation and green indicates a strong negative correlation. The shape of color represents the degree of correlation. (B) Hepatic TG, DG and CE alterations in the livers from AAV-GP73 mice at 5 months after injection. Significantly downregulated lipids are in green, significantly upregulated lipids are in red, and unchanged lipids are in gray.

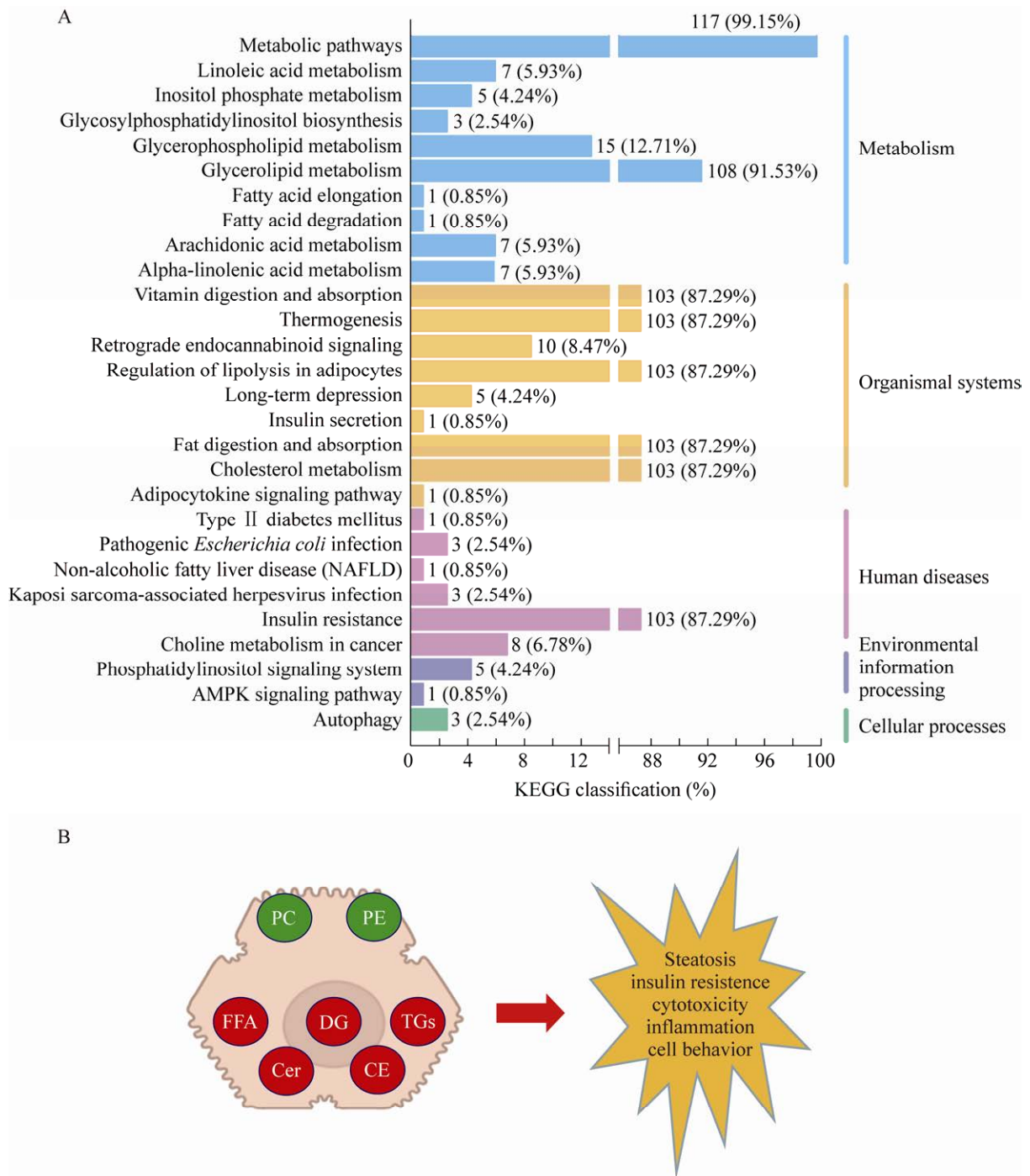


图 4 KEGG 富集分析 GP73 特异性高表达小鼠肝脏中代谢通路

Figure 4 KEGG analysis of metabolic pathways in GP73 high expression liver. (A) KEGG-enriched metabolic pathway analysis of the alterations in lipid metabolites induced by GP73. The number and percentage of unique lipid metabolites are shown in the column. (B) Primary lipid metabolite profiles in the livers from AAV-GP73-injected mice at 5 months after injection ($n=4$). Significantly downregulated lipids are in green, and significantly upregulated lipids are in red.

变性、细胞毒性和炎症的促成因素。这一系列的变化有可能会诱发 II 型糖尿病、非酒精性脂肪肝等疾病。

综上所述, GP73 促使肝脏内脂质代谢发生剧烈变化, 与脂肪肝的发生密切相关。该发现表明, GP73 可能是脂肪性肝病治疗的新靶点, 但仍需更深入的研究予以支持、佐证。

REFERENCES

- [1] Kladney RD, Bulla GA, Guo L, et al. GP73, a novel Golgi-localized protein upregulated by viral infection. *Gene*, 2000, 249(1/2): 53-65.
- [2] Hu LB, Li LK, Xie HB, et al. The Golgi localization of GOLPH2 (GP73/GOLM1) is determined by the transmembrane and cytoplasmic sequences. *PLoS One*, 2011, 6(11): e28207.
- [3] Wang YN, Wan YJY. Golgi protein 73, hepatocellular carcinoma and other types of cancers. *Liver Res*, 2020, 4(4): 161-167.
- [4] Bachert C, Fimmel C, Linstedt AD. Endosomal trafficking and proprotein convertase cleavage of Cis Golgi protein GP73 produces marker for hepatocellular carcinoma. *Traffic*, 2007, 8(10): 1415-1423.
- [5] Iftikhar R, Kladney RD, Havlioglu N, et al. Disease- and cell-specific expression of GP73 in human liver disease. *Am J Gastroenterol*, 2004, 99(6): 1087-1095.
- [6] Marrero JA, Romano PR, Nikolaeva O, et al. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2005, 43(6): 1007-1012.
- [7] Mao YL, Yang HY, Xu HF, et al. Golgi protein 73 (GOLPH2) is a valuable serum marker for hepatocellular carcinoma. *Gut*, 2010, 59(12): 1687-1693.
- [8] Li XH, Wu KC, Fan DM. Serum Golgi phosphoprotein 2 level: a better marker than alpha-fetoprotein for diagnosing early hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2009, 50(1): 325.
- [9] Wang Y, Yang H, Xu H, et al. Golgi protein 73, not Glypican-3, may be a tumor marker complementary to α -fetoprotein for hepatocellular carcinoma diagnosis. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 29(3): 597-602.
- [10] Wang MJ, Long RE, Comunale MA, et al. Novel fucosylated biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18(6): 1914-1921.
- [11] Hou SC, Xiao MB, Ni RZ, et al. Serum GP73 is complementary to AFP and GGT-II for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*, 2013, 6(4): 1152-1158.
- [12] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Association for the study of liver diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*, 2012, 55(6): 2005-2023.
- [13] Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to treatment. *Frontline Gastroenterol*, 2014, 5(4): 277-286.
- [14] Dietrich P, Hellerbrand C. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2014, 28(4): 637-653.
- [15] Sato K, Kamada T. Regulation of bile acid, cholesterol, and fatty acid synthesis in chicken primary hepatocytes by different concentrations of T0901317, an agonist of liver X receptors. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2011, 158(2): 201-206.
- [16] Gibbons GF. Regulation of fatty acid and cholesterol synthesis: co-operation or competition? *Prog Lipid Res*, 2003, 42(6): 479-497.
- [17] Kladney RD, Cui X, Bulla GA, et al. Expression of GP73, a resident Golgi membrane protein, in viral and nonviral liver disease. *Hepatology*, 2002, 35(6): 1431-1440.
- [18] Liu YM, Cao Y, Cai WC, et al. Combined detection of AFP-L3, GP73 and TIP30 enhances diagnostic accuracy for HBV-related cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Pak Med Assoc*, 2019, 69(9): 1279-1286.
- [19] Liu YJ, Wang JY, Yang RX, et al. GP73-mediated secretion of AFP and GP73 promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *Oncogenesis*, 2021, 10(10): 69.
- [20] Yang XL, Wu FX, Chen JK, et al. GP73 regulates hepatic steatosis by enhancing SCAP-SREBPs interaction. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14932.
- [21] Gibellini F, Smith TK. The Kennedy pathway—*de novo* synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*, 2010, 62(6): 414-428.

(本文责编 郝丽芳)