

内质网应激在高脂诱导的代谢障碍相关脂肪变性肝病中的作用

胡韦康^{1*}, 周文静^{1*}, 张 军¹, 杨 振¹, 白红枚¹, 王子涵¹, 齐胤良², 张胜权¹, 张素梅¹

[¹ 安徽医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 合肥 230032;

² 安徽医科大学附属合肥医院(合肥市第二人民医院), 合肥 230012]

摘要 **目的** 探究内质网应激在高脂诱导的脂肪肝发生发展中的作用。**方法** 果蝇模型及小鼠模型分为普通饲料组(对照组)、高脂饲料组(高脂组); HepG2 细胞模型分为 DMEM 诱导组(对照组)、棕榈酸(PA)诱导组(高脂组)。拍照观察果蝇三龄幼虫脂肪体大小, HE 及油红 O 染色观察小鼠肝脏及 HepG2 细胞脂肪变性情况。实时荧光定量 PCR (qPCR) 及蛋白质印迹 (Western blot) 分析转录激活因子 6 (ATF6)、重链结合蛋白 (Bip) 和 C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 在上述对照组与高脂组的果蝇幼虫、小鼠肝脏组织及 HepG2 细胞中的表达水平。**结果** 果蝇模型中, 与对照组相比, 高脂组果蝇的脂肪体明显增大, 脂肪储存增加; 油红染色证实高脂组的小鼠肝脏及 PA 诱导的 HepG2 细胞脂滴形成以及空泡化。高脂组的果蝇幼虫、小鼠肝脏及 PA 诱导的 HepG2 细胞中均发现 ATF6、Bip 和 CHOP 表达水平较各自对照组升高 (均 $P < 0.05$)。**结论** 高脂饲料可能通过激活内质网应激诱导肝脏脂肪变性发生发展。

关键词 内质网应激; 高脂; 脂肪肝; 果蝇; 棕榈酸; 脂肪变性

中图分类号 Q 591.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)06-1086-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.06.016

代谢障碍相关性脂肪变性肝病 (metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD) 是一组以伴有心血管危险因素的肝脏脂肪变性疾病, 包括: 肝脂肪变性、脂肪变性性肝炎、肝纤维化及肝硬化, 甚至发展成肝细胞肝癌^[1-2]。MASLD 患病率逐年上升, 在中国大约为 32.5%, 严重威胁人类健康^[3]。研究^[4-5]表明肝细胞中过多的脂质积累会改变其内质网脂质成分、影响蛋白质内质网中的合成, 进而诱导内质网应激, 提示内质网应激可能参与 MASLD 的发生发展, 但其发病机制仍不十分清楚。果蝇是常见的模式动物之一, 其基因与人类具有高达 74% 的同源性, 其体内与哺乳动物有着高度相似的能量代谢平衡机制, 逐渐成为研究代谢性疾病的良好模型。脂肪体是果蝇体内的重要组织, 果蝇幼虫体内的脂肪体负责能量的储存和利用, 参与营养物质代谢并储存大量糖原和脂质, 与人类肝脏功能相似^[6-7]。该研究通过高脂饲养果蝇幼虫、小鼠及棕榈酸 (palmitic acid, PA) 诱导的 HepG2 细胞, 初步

探讨内质网应激在高脂诱导的果蝇和小鼠脂肪变性发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 野生型黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) w1118 在果蝇培养箱中培养繁殖, 培养温度 (25 ± 1) °C、相对湿度 60% ~ 70%。C57BL/6J 小鼠在 SPF 级动物房内饲养与繁殖, 饲养温度 18 ~ 22 °C, 相对湿度 40% ~ 70%, 明暗循环 12 h/12 h, 自由进食和饮水。

1.1.2 主要材料和试剂 果蝇饲养用干酵母粉购自安琪酵母股份有限公司; 椰子油购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司 (货号: 8001-31-8); 油红 O 购自美国 Sigma-Aldrich (货号: 1320-06-5) 公司; PA 购自美国 MCE 公司 (货号: HY-N0830)。逆转录 PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒和实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR) 试剂盒购自日本 Takara 生物公司 (货号: 9109-036-820); PVDF 膜购自美国 Millipore 公司 (货号: ISEQ00010); TRIzol 试剂 (货号: 15596018CN)、BCA 蛋白定量试剂盒 (货号: 23227)、ECL 化学发光试剂盒 (货号: 34577)、转录激活因子 6 (activating tran-

2025-04-21 接收

基金项目: 安徽省高校自然科学基金项目 (编号: 2023AH050564)

作者简介: 胡韦康, 男, 硕士研究生;

张素梅, 女, 副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: zhangsumei@ahmu.edu.cn

* 对本文具有同等贡献

scription factor 6, ATF6) (货号:PA5-20216;浓度 1 : 400)、重链结合蛋白 (heavy-chain binding protein, Bip) (货号:PA1-014A;浓度 1 : 500) 和 C/EBP 同源蛋白 (the C/EBP homologous protein, CHOP) (货号: PA5-102305;浓度 1 : 500) 第一抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗小鼠 IgG (货号:31430;浓度 1 : 50 000) 和 HRP 标记山羊抗兔 IgG (货号:31460;浓度 1 : 50 000) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;β-actin 第一抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司 (货号:8457;浓度 1 : 1 000)。

1.2 方法

1.2.1 果蝇高脂模型 10 只雄性果蝇和 20 只雌果蝇随机分配为对照组和高脂组,每组 5 只雄性果蝇和 10 只雌果蝇,将每组果蝇分装至培养管中,培养管底部放置培养基,对照组给予正常培养基 (每升含玉米粉 85.5 g、琼脂 6.65 g、干酵母粉 20.25 g、蔗糖 92.10 g、黄豆粉 11.72 g、丙酸 6.5 ml);高脂组给予高脂培养基 (椰子油培养基:在正常培养基基础上添加 10% 的椰子油)。培养管放置于智能果蝇培养箱中培养 10 d 时间,培养基中会出现果蝇幼虫,之后果蝇幼虫会陆续向培养管壁上攀爬,此时在培养管壁上攀爬的果蝇幼虫即为三龄幼虫,将其用金属镊子小心取下,用 PBS 清洗 3 遍,显微镜拍照后置于 1.5 ml EP 管中放入 -80 ℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 小鼠高脂模型 8 周龄 C57BL/6J 雄鼠分为对照组和高脂组两组,每组 5 只,分别给予普通饲料和高脂饲料饲养,每天观察精神状态、活动情况等。饲养 27 周后,水合氯醛腹腔注射麻醉后,取肝脏组织,OCT 包埋或液氮速冻后保存于 -80 ℃ 冰箱。动物实验经安徽医科大学实验动物伦理委员会批准 (批号:20201102)。

1.2.3 高脂细胞模型 处于对数生长期的 HepG2

细胞用 0.25% 胰酶消化后种植于已放入无菌盖玻片 24 孔板上,贴壁生长 24 h,换成无血清的培养基饥饿 24 h 后,用含 0.5 mmol/L PA 的完全培养基处理细胞 24 h。

1.2.4 小鼠肝脏及 PA 处理的 HepG2 细胞油红 O 染色 取 OCT 包埋的肝脏进行冷冻切片,或 PA 处理的各组 HepG2 细胞爬片,4% 多聚甲醛固定 30 min,60% 的异丙醇中浸泡后用油红 O 工作液进行染色 5 ~ 10 min,然后用 60% 的异丙醇分色后蒸馏水进行漂洗,苏木精复染和盐酸乙醇分化并经蒸馏水反蓝后封片,镜下观察并拍照。

1.2.5 qPCR 检测内质网应激相关基因表达水平 TRIzol 提取各组果蝇三龄幼虫及 PA 处理的 HepG2 的总 RNA,反转录为 cDNA 后采用 SYBRGreen 法进行 qPCR 分析目的基因 mRNA 水平表达。反应体系为 10 μl,其中 SYBRGreen MasterMix 5.0 μl,上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μl, cDNA 2.0 μl,无酶 DEPC 水 2.2 μl。反应条件为:95 ℃ 预变性 3 min 后进入循环:95 ℃ 变性 10 s,55 ℃ 反应 30 s,扩增 38 个循环,每组设 3 个复孔,采用 2^{-ΔΔCt} 法分析各基因相对表达量。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,果蝇、小鼠及 HepG2 细胞引物序列见表 1。

1.2.6 Western blot 检测内质网应激相关蛋白表达水平 取新鲜冻存的肝脏组织及 PA 处理的各组 HepG2 细胞,加入 RIPA 蛋白裂解液匀浆并充分裂解后 4 ℃ 冷冻离心机离心,取上清液用 BCA 法定量总蛋白,进行蛋白定量。按比例加入蛋白上样缓冲液并煮沸 10 min 后,取等量总蛋白样品行 SDS-PAGE 电泳,转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后放入一抗 4 ℃ 孵育过夜,洗涤后放入 HRP 标记二抗中室温孵育 2 h,洗膜并用 ECL 化学发光试剂显影曝光。

1.3 统计学处理 实验结果至少重复 3 次,数据均

表 1 qPCR 引物序列
Tab.1 qPCR primer sequences

Genes	qPCR primer sequences (5'-3')		
	Drosophila	Mice	HepG2 cells
ATF6	F: AACGTAATTCACGGAAGCCCAACA R: GCGACGGTAGCTTGATTCTAGAGCC	F: GTCCGGTCTTCCTCATGGA R: TGGAGTCAGTCCATGTTCTGTT	F: AGTGTGAGCCCTGCAAATCA R: TCACTCCCTGAGTTCCTGATAC
BiP	F: GCTATTGCCTACGGTCTGGA R: CATCACACGCTGATCGAAGT	F: GTGTGTGAGACCAGAACCGT R: AACACACCGACGCAGGAATA	F: TCTTGCCGTTCAAGGTGGTT R: TCTTTGGTTGCTTGGCGTTG
CHOP	F: GCACCTCCCAGACCCCTCACTCTCC R: GTCTACTCCAAGCCTTCCCCCTGCG	F: AACCTGAGGAGAGAGAACCTGG R: ATGTGCGTGTGACCTCTGTT	F: ACCTCCTGAAATGAAGAGGAAG R: TCCTGCTTGAGCCGTTTCATT
Beta-actin	F: TGCCCATCTACGAGGGTTAT R: AGTACTTGCGCTCTGGCGG	F: CCAGCCTTCCTTCTTGGGTAT R: GGGTGTA AACGCAGCTCAG	F: CCACGAAACTACCTTCAACTCCATC R: AGTGATCTCCTTCTGCATCCTGTC

采用软件 GraphPadPrism 8.0 对结果进行统计学分析。两组均数的比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高脂饮食诱导果蝇三龄幼虫体内脂肪体增生

高脂饲养繁殖并收集果蝇三龄幼虫,从图 1A 可见,高脂模型组果蝇三龄幼虫虫体和体内的脂肪体均较对照组明显增大。qPCR 结果显示:与对照组比较,模型组果蝇三龄幼虫体内 ATF6、Bip 和 CHOP 的 mRNA 水平升高,其相对表达量分别约为对照组的 5.5、7.6、3.8 倍,差异有统计学意义(图 1B)。

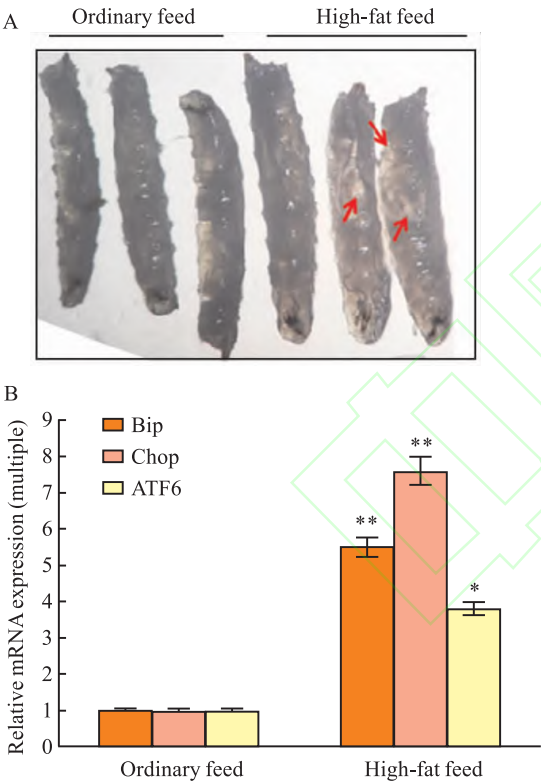


图 1 高脂诱导果蝇三龄幼虫体内脂肪体增生及内质网应激相关蛋白表达

Fig. 1 High fat induced fat body hyperplasia and endoplasmic reticulum stress-related protein expression in third-instar larvae of *Drosophila* flies

A: General photograph of the third instar larvae of *Drosophila*, in which the red arrows point to the fat body of the third instar larvae of *Drosophila*; B: qPCR analysis of the mRNA expression of endoplasmic reticulum stress-related proteins in third-instar larvae of *Drosophila* flies ($n = 5$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs ordinary feed group.

2.2 高脂饮食促进小鼠肝脏脂肪沉积 肝脏组织切片油红 OA 染色显示,高脂喂养小鼠肝脏细胞中

出现脂肪变性、脂滴形成以及空泡化,提示高脂饮食可以诱导脂肪性肝病(图 2A)。qPCR 及 Western blot 分析内质网应激相关蛋白 mRNA 表达及蛋白质表达水平,结果显示,与正常饮食对照小鼠比较,Bip、CHOP 和 ATF6 在高脂小鼠肝脏中表达均升高(图 2B、C)。

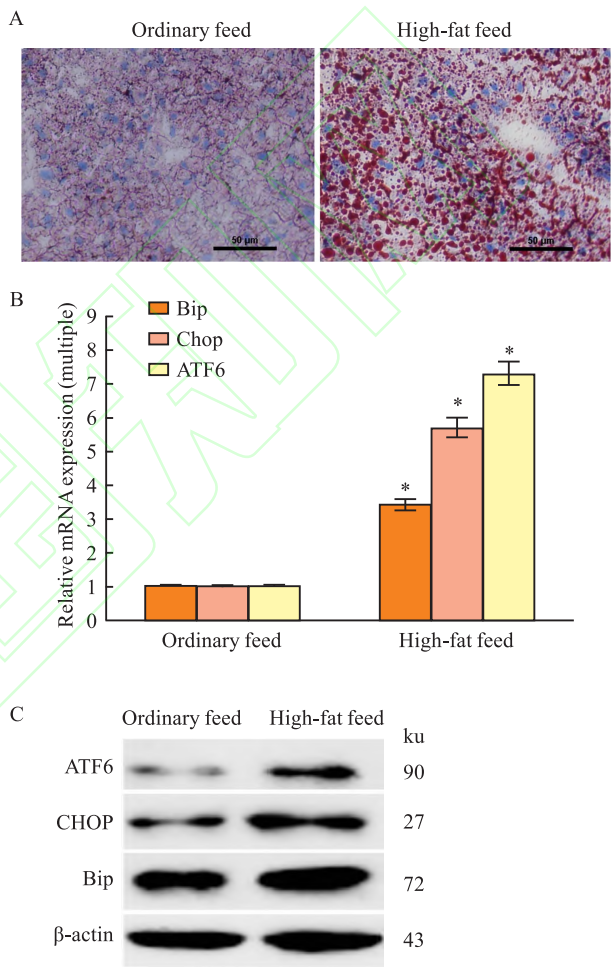


图 2 小鼠肝脏组织油红染色、qPCR 及 Western blot 分析结果
Fig. 2 The results of Oil Red staining, qPCR and Western blot analysis of mouse liver tissue

A: Mouse liver Oil Red staining photos; B: qPCR analysis of mRNA expression of endoplasmic reticulum stress-related protein in mouse liver ($n = 5$); C: Western blot analysis of endoplasmic reticulum stress-related protein expression in mouse liver; * $P < 0.05$ vs ordinary feed group.

2.3 PA 诱导 HepG2 细胞中脂质累积 PA 处理 HepG2 24 h 后,PA 处理 HepG2 细胞中油红组染色的红色脂肪成分显著增加,而对照组仅轻度着色,提示 PA 诱导 HepG2 细胞脂肪变性(图 3A)。提取各组 HepG2 细胞总 RNA 及总蛋白,qPCR 及 Western blot 分析内质网应激提示升高(图 2B、C)。

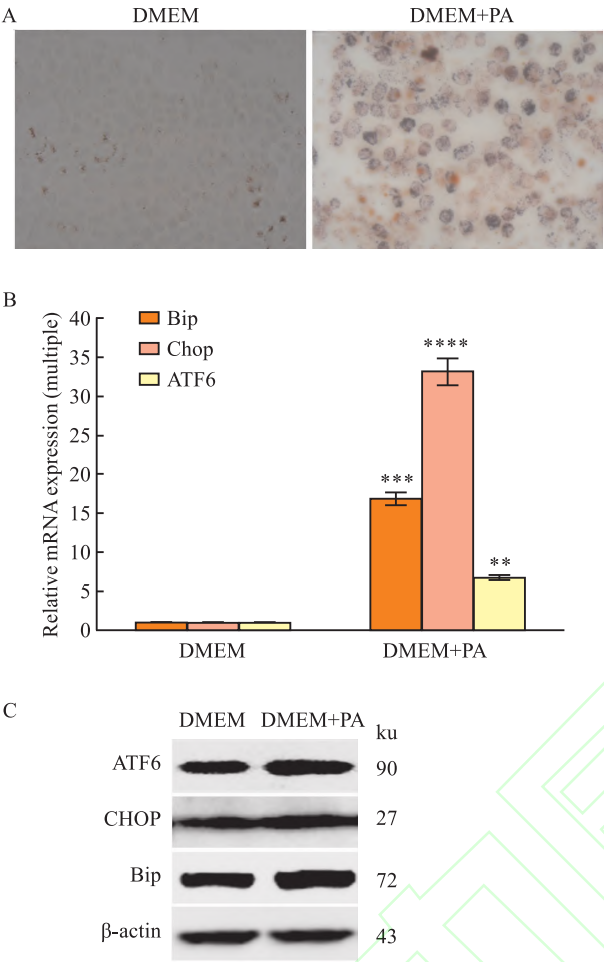


图3 HepG2 细胞油红 Q 染色、qPCR 及 Western blot 分析结果
Fig.3 The results of Oil Red staining, qPCR and Western blot analysis of HepG2 cells

A: HepG2 cell Oil Red staining photos $\times 20$; B: mRNA expression of endoplasmic reticulum stress-related protein in HepG2 cells detected by qPCR; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs ordinary feed group; C: Western blot analysis of endoplasmic reticulum stress-related protein expression in HepG2 cells.

3 讨论

MASLD 患病率逐年上升,是中国乃至全球较为严重的公共卫生安全问题之一,在中青年人人群中发病率较高^[8]。MASLD 发病原因复杂,在遗传和环境因素共同作用下,肝脏脂质成分含量增加和毒性脂质累积,诱导炎症反应,引起肝脏纤维化、肝细胞坏死与再生,导致肝硬化甚至肝细胞肝癌^[9]。并逐渐成为肝移植的重要原因以及肝脏相关疾病死亡的主要原因^[10]。本研究通过果蝇模型、小鼠模型及 HepG2 细胞探究脂肪肝发病的可能分子机制。

该研究中高脂饲养的果蝇三龄幼虫虫体和脂肪

体的体积增大,高脂饲养的小鼠肝脏出现明显脂肪变性和脂质沉积,PA 可以诱导 HepG2 细胞脂肪变性发生,表明高脂导致细胞脂肪变性而诱导脂肪肝发生。研究^[11]表明高脂饮食会导致肝脏细胞中毒性脂质成分增加,诱导内质网应激及炎症因子释放,引起炎症反应,导致细胞损伤和脂质沉积,参与肝细胞脂肪变性和脂肪肝的发生。与本研究结果一致。ATF6 通路为内质网应激的一条经典途径,在非应激状态下,与 BIP 形成稳定的复合物,通过 BIP 对 GLS 的抑制作用而停留在内质网上^[12]。当内质网应激发生,内质网腔内未折叠蛋白聚集能够使 ATF6 蛋白与 BIP 分离,BIP 对 GLS 抑制作用的解除导致 ATF6 转移到高尔基体,由高尔基体蛋白酶对该分子进行切割,产生 ATF6(p50)小片段^[13]。该小片段可进入真核生物细胞核内促进未折叠蛋白反应靶分子 BIP 和 CHOP 等基因的转录,抑制脂肪酸 β -氧化和脂蛋白分泌等^[14];同时,CHOP 蛋白能够诱导凋亡相关蛋白表达促进细胞凋亡^[15]。以上内质网应激途径的激活引起脂质沉积、肝细胞炎症,进而引起肝细胞脂肪变性、肝纤维化甚至肝癌^[16]。

参考文献

[1] Rinella M E, Lazarus J V, Ratziu V, et al. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature[J]. J Hepatol, 2023, 79(6): 1542–56. doi: 10.1016/j.jhep.2023.06.003.

[2] Riaz K, Azhari H, Charette J H, et al. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2022, 7(9): 851–61. doi: 10.1016/s2468-1253(22)00165-0.

[3] Zhou F, Zhou J, Wang W, et al. Unexpected rapid increase in the burden of NAFLD in China from 2008 to 2018: a systematic review and meta-analysis[J]. Hepatology, 2019, 70(4): 1119–33. doi: 10.1002/hep.30702.

[4] Hotamisligil G S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease[J]. Cell, 2010, 140(6): 900–17. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.034.

[5] Friedman S L, Neuschwander-Tetri B A, Rinella M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies[J]. Nat Med, 2018, 24(7): 908–22. doi: 10.1038/s41591-018-0104-9.

[6] Musselman L P, Fink J L, Ramachandran P V, et al. Role of fat body lipogenesis in protection against the effects of caloric overload in Drosophila[J]. J Biol Chem, 2013, 288(12): 8028–42. doi: 10.1074/jbc.M112.371047.

[7] Diehl A M, Day C. Cause, pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis[J]. N Engl J Med, 2017, 377(21): 2063–72. doi: 10.1056/nejmra1503519.

- [8] 全小玲, 张连文. 中青年人群非酒精性脂肪肝病现状及影响因素分析[J]. 解放军预防医学杂志, 2021, 39(1): 70–2. doi: 10.13704/j.cnki.jyyx.2021.01.024.
- Tong X L, Zhang L W. Prevalence and influencing factors of non-alcoholic fatty liver disease in young and middle-aged people[J]. J Prev Med Chin People's Liberation Army, 2021, 39(1): 70–2. doi: 10.13704/j.cnki.jyyx.2021.01.024.
- [9] Musso G, Cassader M, Paschetta E, et al. Bioactive lipid species and metabolic pathways in progression and resolution of nonalcoholic steatohepatitis[J]. Gastroenterology, 2018, 155(2): 282–302. e8. doi: 10.1053/j.gastro.2018.06.031.
- [10] Bashiri A, Nesan D, Tavallae G, et al. Cellular cholesterol accumulation modulates high fat high sucrose (HFHS) diet-induced ER stress and hepatic inflammasome activation in the development of non-alcoholic steatohepatitis[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1861(7): 594–605. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.04.005.
- [11] Zhang X Q, Xu C F, Yu C H, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(7): 1768–76. doi: 10.3748/wjg.v20.i7.1768.
- [12] 梁珠珠, 陈 澍, 孙倩玉, 等. TRPP2 通过 UPR/AFT6/Ep-CAM 信号通路调节口腔鳞状细胞癌的迁移和侵袭[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(11): 2024–32, 2064. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2024.11.018.
- Liang Z Z, Chen S, Sun Q Y, et al. TRPP2 regulates the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma through the UPR/AFT6/EpCAM signaling pathway[J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(11): 2024–32, 2064. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2024.11.018.
- [13] Shen J, Chen X, Hendershot L, et al. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals[J]. Dev Cell, 2002, 3(1): 99–111. doi: 10.1016/s1534–5807(02)00203–4.
- [14] Maiers J L, Malhi H. Endoplasmic reticulum stress in metabolic liver diseases and hepatic fibrosis[J]. Semin Liver Dis, 2019, 39(2): 235–48. doi: 10.1055/s-0039–1681032.
- [15] Hwang J, Qi L. Quality control in the endoplasmic reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways[J]. Trends Biochem Sci, 2018, 43(8): 593–605. doi: 10.1016/j.tibs.2018.06.005.
- [16] Kleiner D E, Brunt E M, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2005, 41(6): 1313–21. doi: 10.1002/hep.20701.

Endoplasmic reticulum stress involved in high-fat induced metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease

Hu Weikang¹, Zhou Wenjing¹, Zhang Jun¹, Yang Zhen¹, Bai Hongmei¹,
Wang Zihan¹, Qi Yinliang², Zhang Shengquan¹, Zhang Sumei¹

[¹Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Affiliated Hefei Hospital of Anhui Medical University Hefei (The Second People's Hospital of Hefei), Hefei 230012]

Abstract Objective To investigate the role of endoplasmic reticulum stress in the occurrence and development of fatty liver induced by high fat. **Methods** In the high-fat *Drosophila* model, the high-fat group was fed with high-fat medium, while the control group was fed with normal medium; in the mouse fatty liver model, the high-fat group was fed with high-fat diet, and the control group was fed with normal diet; in the HepG2 cell steatosis model, the high-fat group was induced by palmitic acid (PA), and the control group was cultured with DMEM. The fat body size of the third instar larvae of *Drosophila melanogaster* was photographed. Steatosis in mice liver and HepG2 cells was observed by H&E and Oil Red staining. The expression levels of ATF6, Bip and CHOP in the third instar larvae, liver tissues of mice and HepG2 cells were analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) and Western blot. **Results** In *Drosophila* model, fat body and fat storage were obviously increased in high fat fed flies when compared with control group. The formation of liver fat droplets and cells vacuolation were confirmed by H&E and Oil Red staining in mice livers fed with high fat and HepG2 cells with palmitic acid treatment. The expression levels of ATF6, Bip and CHOP were significantly increased in third instar larvae and mice livers fed with high fat and palmitic acid treated HepG2 cells with palmitic acid treatment. **Conclusion** High fat may induce the occurrence and development of hepatic steatosis by activating endoplasmic reticulum stress.

Key words endoplasmic reticulum stress; high fat; MASLD; *Drosophila*; palmitic acid; seatosis

Fund program Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH050564)

Corresponding author Zhang Sumei, E-mail: zhangsume@ahmu.edu.cn