

IRE1 α - JNK 通路对早期非酒精性脂肪性肝病作用研究

吴鹏波 王希君 吴晓曼 陈红光 谭诗云 夏洪森

摘要 **目的** 探讨 IRE1 α - JNK 通路对早期非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 小鼠模型作用。**方法** 将 20 只 C57/B6 小鼠分为对照组、高脂饮食组、空白载体组、IRE1 α - shRNA 组; 饮食干预前空白载体组, IRE1 α - shRNA 组分别腹部肝区注射空白慢病毒载体和 IRE1 α - shRNA 慢病毒载体。对照组小鼠正常饮食, 其余组小鼠高糖高脂饮食诱导 NAFLD。HE 染色观察肝内脂肪变性情况; 透射电镜观察肝组织自噬相关结构; Western blot 法检测 IRE1 α - JNK 通路蛋白、凋亡相关蛋白 caspase - 3、Bcl - 2、Bax; 自噬相关蛋白 LC3 II、Beclin - 1 的表达。**结果** 与对照组比较, 高脂饮食组 IRE1 α - JNK 通路激活, 与空白载体组比较, IRE1 α - shRNA 组 IRE1 α - JNK 通路被抑制。油红 O 染色显示与空白载体组比较, IRE1 α - shRNA 组肝脏脂肪变性加重。电镜观察提示与对照组比较, 高脂饮食组自噬相关结构增加, 与空白载体组比较, IRE1 α - shRNA 组自噬相关结构减少。Western blot 法检测提示与对照组比较, 模型组中肝组织 Bax、Bcl - 2、caspase - 3 蛋白表达无明显变化, 而 Beclin - 1、LC3 II / I 明显增加, P62 明显降低 (P 均 < 0.05), 注射 IRE1 α - shRNA 慢病毒载体后 Bax、caspase - 3、P62 蛋白表达均增加, 而 Bcl - 2、Beclin - 1、LC3 II / I 减少 (P 均 < 0.05)。**结论** IRE1 α - JNK 通路通过调节自噬和凋亡对早期 NAFLD 起保护作用。

关键词 IRE1 α JNK 自噬 凋亡 非酒精性脂肪性肝病

中图分类号 R575.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.11.016

Protective Effect of IRE1 α - JNK Pathway in Early Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Wu Pengbo, Wang Xijun, Wu Xiaoman, et al. Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 437100, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of IRE1 α - JNK pathway in early nonalcoholic fatty liver disease. **Methods** 20 C57/B6 mice were divided into control group, high - fat diet group, IRE1 α - shRNA group and lentivirus blank vector group. Before the experiment, mice in IRE1 α - shRNA group and lentivirus blank vector were injected with IRE1 α - shRNA lentivirus vector and lentivirus blank vector respectively. Mice were fed normal diet in control group, but high - fat diet in the other group. Fatty degeneration in liver were detected by routine method and oil red O staining. The autophagic structures were observed by transmission electron microscopy. Western blot was used to detect the expression of IRE1 α - JNK pathway protein, apoptosis related protein caspase - 3, Bcl - 2, Bax, autophagy related protein LC3 II, Beclin - 1. **Results** Compared with the control group, the IRE1 α - JNK pathway was activated in the high - fat diet group and were partially inhibited in the IRE1 α - shRNA group. HE staining showed that compared with high fat diet group, liver steatosis of IRE1 α - shRNA group was more serious. Electron microscopy showed that autophagic structures increased in the high - fat diet group compared with the control group, but decreased after IRE1 α - shRNA injection. Western blot showed that compared with the control group, expression of Bax, Bcl - 2, caspase - 3 protein in the liver tissue of the model group had no significant changes, but Beclin - 1, LC3 II / I increased significantly (all $P < 0.05$). The expression of Bax, caspase - 3 protein increased after the injection of IRE1 α - shRNA lentiviral vector, while Bcl - 2, Beclin - 1, LC3 II / I decreased (all $P < 0.05$). **Conclusion** IRE1 α - JNK pathway has a protective effect by inducing autophagy on early nonalcoholic fatty liver disease.

Key words IRE1 α - JNK; Autophagy; Nonalcoholic fatty liver disease

非酒精性脂肪性肝病 (non - alcoholic fatty liver

disease, NAFLD) 是一种无过量饮酒史, 由各种致病因素导致肝脏以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征。目前认为内质网应激、炎症反应、细胞凋亡、自噬水平紊乱等多种因素参与 NAFLD 发展^[1-3]。

近年来研究发现, 内质网应激通过未折叠蛋白反应参与 NAFLD 发生、发展^[4]。肌醇依赖酶 1 (inositol

基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目 (2018CFB236); 湖北省卫生和计划生育委员会基金资助项目 (面上项目) (WJ2017M019)

作者单位: 430060 武汉大学人民医院消化内科 (吴鹏波、吴晓曼、谭诗云), 体检中心 (夏洪森); 437500 咸宁, 湖北科技学院基础医学院 (王希君、陈红光)

通讯作者: 夏洪森, 电子邮箱: 493630914@qq.com

-requiring enzyme 1, IRE1) 是一种内质网跨膜蛋白, 作为细胞未折叠蛋白反应重要传感器, 在 NAFLD 疾病进程中发挥着至关重要的作用^[4]。活化的 IRE1 α 通过多条信号通路促进异常蛋白质的降解、保证新生蛋白质正确折叠。近年来研究发现, IRE1 α - JNK 信号通路是调控细胞内质网应激后细胞命运转归的关键环节^[5]。不同 NAFLD 中细胞内质网应激强度不同, 不同强度的内质网应激对细胞命运转归影响不同^[4]。因此本研究探讨 IRE1 α - JNK 通路对早期非酒精性脂肪肝病小鼠模型影响。

材料与方法

1. 材料: (1) 试剂: 高脂饲料自制 (高糖高脂饲料组成: 基础饲料 66.5%, 蔗糖 10%, 猪油 20%, 胆固醇 3.4%, 胆酸钠 0.1%); 丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、肿瘤坏死因子 - α (TNF - α) 和白介素 - 1 β (IL - 1 β) 均购自南京建成生物工程有限公司; IRE1 α 、JNK、p - JNK、Bcl - 2、caspase - 3、Bax、LC3、Beclin - 1 一抗购自美国 Sigma 公司; 二抗购自武汉三鹰生物有限公司; (2) 动物: SPF 级健康雄性 C57/BL6 小鼠由购自武汉大学动物中心, 小鼠 6 ~ 8 周龄, 体质量 20 ~ 25g, 实验动物饲养于 SPF 动物房, 室温 20 ~ 24 $^{\circ}$ C, 相对湿度约 40% ~ 60%。(3) 主要仪器: 石蜡切片机 (日本 Olympus 公司), 普通光学显微镜 (日本 Olympus 公司), 电泳系统 (美国 Bio - Rad 公司), 透射电子显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2. 动物分组及干预: 将 C57/BL6 小鼠随机分为对照组、高脂饮食组、IRE1 α - shRNA 组、慢病毒空白载体组, 每组 5 只; 在造模前 IRE1 α - shRNA 组, 慢病毒空白载体组小鼠给予腹部肝区注射 IRE1 α - shRNA 慢病毒载体及慢病毒空白载体 100 微升/次, 连续 3 天, 适应性饲养 2 天后进行后续实验。对照组给予正常饮食, 其余组高糖高脂饮食诱导 NAFLD, 饲养 3 周。

3. HE 染色: 实验结束后处死小鼠获取肝组织组织放入 10% 甲醛溶液中固定 72h, 石蜡包埋, 切片机切 4 μ m 厚切片, 经过脱蜡、脱水、苏木精染色、盐酸乙醇分化、伊红染色, 再经过梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封片, 在倒置显微镜下观察肝组织病变。

4. 肝功能及炎性水平检测: 处死小鼠后提心获取各组小鼠血清, 南京建成生物有限公司试剂盒检测各组小鼠血清 AST、ALT、TNF - α 、IL - 1 β 水平。

5. 电镜观察肝组织自噬结构: 处死小鼠后获取

肝组织, 迅速获取大小约 1mm³ 肝组织用预冷的 4% 戊二醛固定, 经过 PBS 充分漂洗后 1% 饿酸固定, 经过乙醇及丙酮处理脱水后包埋, 采取醋酸铀 - 硝酸铅双重染色, 最后透射电镜观察肝组织内自噬相关结构。

6. Western blot 法检测蛋白表达: 处死小鼠后获取新鲜的肝组织, 碾磨并用裂解液裂解, 水煮法制作蛋白样品。蛋白样品经过 SDS - PAGE 分离胶中电泳、转膜、切膜, 加入相应的一抗孵育过夜, 次日早晨加入二抗后孵育 2h, 显影定影检测各目标相对表达。

7. 统计学方法: 采用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行统计分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. IRE1 α - JNK 通路变化: 与对照组比较, 高脂饮食组肝组织中 IRE1 α 表达增加, 高脂饮食组与空白载体组肝组织中 IRE1 α 表达比较, 差异无统计学意义; 与模型组比较, IRE1 α - shRNA 组肝组织中 IRE1 α 表达明显降低。与对照组比较, 高脂饮食组肝组织中 p - JNK 表达增加, 高脂饮食组与空白载体组肝组织中 p - JNK 表达比较, 差异无统计学意义; 与空白载体组比较, IRE1 α - shRNA 组肝组织中 p - JNK 表达明显降低。结果提示在造模过程中 IRE1 α - JNK 通路激活, 而 IRE1 α - shRNA 慢病毒载体注射可以抑制 IRE1 α - JNK 通路, 详见图 1。

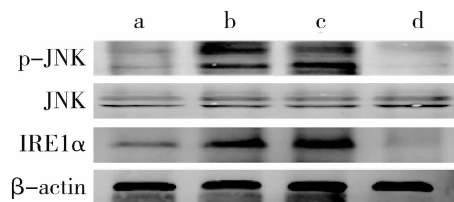


图 1 Western blot 法检测 IRE1 α - JNK 通路变化

a. 对照组; b. 模型组; c. 空白载体组; d. IRE1 α - shRNA 组

2. 肝功能及炎性水平: 与对照组小鼠比较, 模型组小鼠血清 AST、ALT、TNF - α 、IL - 1 β 明显升高 (P 均 < 0.05); 与空白载体组小鼠比较, IRE1 α - shRNA 组小鼠血清 AST、ALT、TNF - α 、IL - 1 β 明显升高 (P 均 < 0.05), 空白载体组与模型组小鼠血清 AST、ALT、TNF - α 、IL - 1 β 比较, 差异无统计学意义 (P 均 > 0.05), 详见图 2。

3. 肝组织病理染色结果: 对照组小鼠肝组织肝小叶结果正常, 细胞无明显脂肪变性, 无炎症及坏死; 模

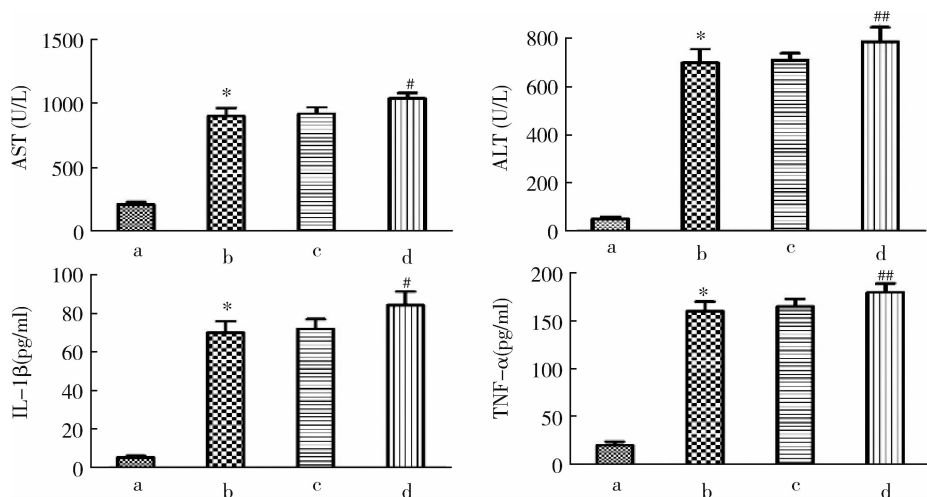


图2 各组小鼠肝功能及炎性水平

a. 对照组; b. 模型组; c. 空白载体组; d. IRE1α-shRNA 组; 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与空白载体组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

型组和空白载体组可见肝小叶结构尚整齐, 可见少量细胞脂肪变性, 少许炎性细胞, 未见明显的细胞坏死; 与空白载体组比较, IRE1α-shRNA 组肝脏组织可见肝小叶轻度紊乱, 大量炎性细胞, 肝细胞脂肪变性明显, 详见图3。

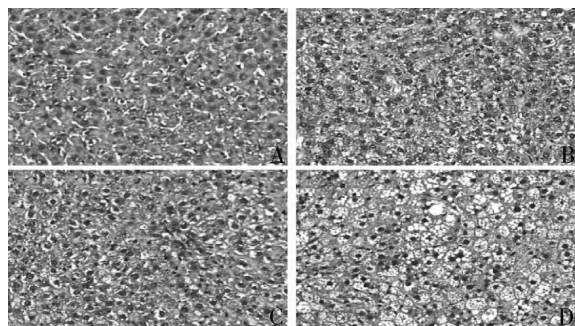


图3 各组小鼠肝组织的病理学改变 (HE, ×200)

A. 对照组; B. 模型组; C. 空白载体组; D. IRE1α-shRNA 组

4. 电镜观察自噬结构: 对照组肝细胞形态正常, 偶见自噬小体或自噬溶酶体出现; 模型组和空白载体组肝细胞出现轻度肿胀, 线粒体轻度空泡化, 少许嵴消失, 与正常对照组比较, 肝细胞内自噬小体或自噬溶酶体增加; IRE1α-shRNA 组肝细胞中度肿胀, 线粒体上述病变加重, 肝细胞中鲜见自噬小体或自噬溶酶体结构, 详见图4。

5. 凋亡及自噬相关蛋白表达: 与对照组比较, 模型组和空白载体组肝组织内 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白无明显变化, 而 Beclin-1、LC3 II/I 均明显增加, P62 明显降低, 模型组和空白载体组上述蛋白表达比较, 差异无统计学意义; 与空白载体组比较,

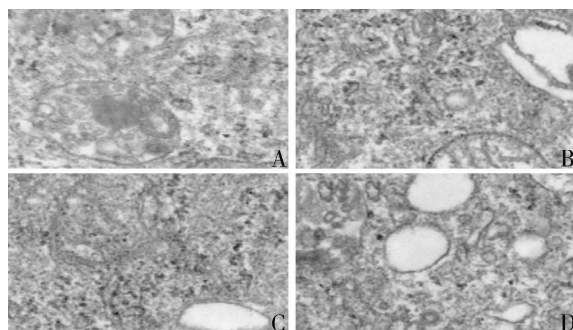


图4 透射电镜观察小鼠肝细胞超微结构 (×12000)

A. 对照组; B. 模型组; C. 空白载体组; D. IRE1α-shRNA 组

IRE1α-shRNA 组肝组织 Beclin-1、LC3 II/I 表达明显减少, 而 Bax、P62、caspase-3 表达明显增加, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05), 详见图5。

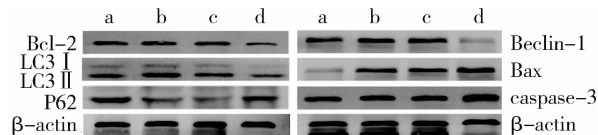


图5 Western blot 法检测凋亡及自噬相关蛋白表达

a. 对照组; b. 模型组; c. 空白载体组; d. IRE1α-shRNA 组

讨 论

目前国内学者认为内质网应激在 NAFLD 发展中扮演着重要的角色^[6,7]。内质网通过激活未折叠蛋白质反应以保护由内质网应激所引起的细胞损伤, 恢复细胞稳态。近年来发现不同程度的内质网应激对 NAFLD 发挥不同的作用^[4]。在 NAFLD 早期, 短暂(轻度)的内质网应激虽然直接诱导细胞凋亡, 内质网应激可通过启动自噬等保护机制对抗凋亡, 最终细

胞即使承受内质网应激刺激, 凋亡不会出现明显增加; 而 NAFLD 晚期, 长期(重度)的内质网应激可通过一方面可直接诱导细胞凋亡, 另一方面内质网直接损伤细胞保护机制直接导致细胞凋亡率明显增加。IRE1 及其介导的内质网应激——非折叠蛋白反应因被发现参与细胞应激后细胞存亡抉择而引起广泛的关注^[8]。本研究发现通过注射 IRE1 α - shRNA 慢病毒载体沉默 IRE1 α - JNK 通路发现肝脏脂肪变性加重, 组织中炎性细胞明显增加, 血清炎性介质明显升高, 提示 IRE1 α - JNK 通路对 NAFLD 具有保护作用。而既往研究提示 IRE1 α - JNK 在 NAFLD 中扮演有害角色, 本研究结果与既往研究相矛盾^[9]。

既往研究 NAFLD 时, 动物模型制作多高脂饮食 8 周甚至以上^[9-11], 而在本研究中动物仅高脂饮食 3 周。本研究反映 IRE1 α - JNK 对早期 NAFLD 的作用, 而既往的研究是 IRE1 α - JNK 对晚期 NAFLD 的作用。故本研究与既往研究结果矛盾可能原因在于早晚期 NAFLD 中内质网应激程度不同, 在 NAFLD 早期, 适度的内质网应激通过 IRE1 α - JNK 通路通过促进自噬抵抗细胞凋亡扮演有利的角色。凋亡和自噬作为一种维持机体自身稳定的基本生理机制, 它们分别通过清除损伤、衰老与突变的细胞和降解错误折叠的蛋白质等途径来维持自身的稳态和各种器官及系统的正常功能^[12-17]。内质网应激可通过调控自噬和细胞凋亡参与 NAFLD 发生、发展^[13]。本研究发现早期 NAFLD 中 IRE1 α - JNK 通路激活后自噬水平增高, 凋亡无明显增加; 抑制 IRE1 α - JNK 通路后自噬水平降低, 凋亡明显增加。

综上所述, IRE1 α - JNK 通路可能通过促进自噬对早期 NAFLD 起保护作用, 然而 IRE1 α - JNK 通路信号如何通路调控自噬有待于进一步探索。明确 IRE1 α - JNK 通路在 NAFLD 中自噬调控的具体作用机制, 将有利揭示自噬 NAFLD 中鲜为人知的一面, 为 NAFLD 临床治疗及预防提供新的思路。

参考文献

- 1 吴鹏波, 宋琪, 俞媛洁, 等. siRNA 靶向抑制 eIF2 α 基因对 NAFLD 自噬及凋亡的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2019, 28(12): 1326 - 1330
- 2 吴鹏波, 宋琪, 俞媛洁, 等. 二甲双胍对 NAFLD 细胞模型线粒体途径凋亡及氧化应激的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2020, 28(1): 64 - 68
- 3 吴鹏波, 宋琪, 俞媛洁, 等. 姜黄素激活自噬干预非酒精性脂

- 肪肝病模型大鼠氧化应激及炎症反应[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(11): 1720 - 1725
- 4 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
- 5 Lin JH, Li H, Yasumura D, *et al.* IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response[J]. Science, 2007, 318(5852): 944 - 949
- 6 Wang J, He W, Tsai PJ, *et al.* Mutual interaction between endoplasmic reticulum and mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Lipids Health Dis, 2020, 19(1): 72
- 7 Ghemrawi R, Battaglia - Hsu SF, Arnold C. Endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders[J]. Cells, 2018, 7(6). pii: E63
- 8 Sun R, Wang H, Zeng X, *et al.* IRE1 impairs insulin signaling transduction of fructose - fed mice via JNK independent of excess lipid[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(1): 156 - 165
- 9 徐嘉好, 敖娜, 都健, 等. 胰升糖素样 1 类似物对非酒精性脂肪肝大鼠 IRE1 α - JNK 通路的干预效应[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2015, 31(3): 272 - 276
- 10 赵晓芳, 唐友明, 徐新杰, 等. JNK1 基因沉默对非酒精性脂肪性肝病小鼠模型高分子量脂联素表达的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(10): 2257 - 2260
- 11 Duan X, Meng Q, Wang C, *et al.* Effects of calyculin against high - fat diet - induced nonalcoholic fatty liver disease in mice[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2018, 33(2): 533 - 542
- 12 Ezquerro S, Mocha F, Frühbeck G, *et al.* Ghrelin reduces TNF - α - induced human hepatocyte apoptosis, autophagy, and pyroptosis: role in obesity - associated NAFLD[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2019, 104(1): 21 - 37
- 13 Lee S, Kim S, Hwang S, *et al.* Dysregulated expression of proteins associated with ER stress, autophagy and apoptosis in tissues from nonalcoholic fatty liver disease[J]. Oncotarget, 2017, 8(38): 63370 - 63381
- 14 Li S, Dou X, Ning H, *et al.* Sirtuin 3 acts as a negative regulator of autophagy dictating hepatocyte susceptibility to lipotoxicity[J]. Hepatology, 2017, 66(3): 936 - 952
- 15 Tanaka S, Hikita H, Tatsumi T, *et al.* Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice[J]. Hepatology, 2016, 64(6): 1994 - 2014
- 16 He Y, Ao N, Yang J, *et al.* The preventive effect of liraglutide on the lipotoxic liver injury via increasing autophagy[J]. Ann Hepatol, 2020, 19(1): 44 - 52
- 17 Ren H, Wang D, Zhang L, *et al.* Catalpol induces autophagy and attenuates liver steatosis in ob/ob and high - fat diet - induced obese mice[J]. Aging: Albany NY, 2019, 11(21): 9461 - 9477

(收稿日期: 2020 - 05 - 13)

(修回日期: 2020 - 05 - 29)