

小鼠 PNPLA7 敲降重组腺病毒的构建及其生物学功能的初步研究

雷永强,王秀云,李 仲*

江苏省功能基因组学重点实验室,南京医科大学罕见代谢性疾病研究重点实验室,南京医科大学生物化学与分子生物学系,江苏 南京 210029

[摘要] **目的:**构建小鼠 PNPLA7 基因的敲降重组腺病毒,检测 PNPLA7 敲降重组腺病毒对小鼠肝脏 PNPLA7 蛋白的敲降效率及对肝脏甘油三酯含量的影响。**方法:**将对对照 siNC 以及敲降 PNPLA7 的 siRNA 设计为 shRNA 并插入到 pshuttle-CMV-silence 穿梭质粒中,挑选克隆并测序鉴定,测序成功后将质粒进行 *Pme* I 线性化,转入含有腺病毒骨架 pAdeasy 的 BJ5183 感受态细胞中进行同源重组,重组成功后的质粒经 *Pac* I 线性化转染 293A 细胞进行腺病毒包装,得到 Ad-shNC 对照腺病毒以及 Ad-shPNPLA7 敲降腺病毒。通过尾静脉注射腺病毒 7 d 后根据免疫印迹实验检测小鼠肝脏中 PNPLA7 敲降效率,同时利用 Folch 提脂方法提取并检测小鼠肝脏中甘油三酯含量。**结果:**成功获得对照腺病毒 Ad-shNC 以及敲降腺病毒 Ad-shPNPLA7。通过尾静脉注射进行小鼠肝脏 PNPLA7 敲降,结果显示 Ad-shPNPLA7 腺病毒可成功降低 PNPLA7 的蛋白表达,敲降 PNPLA7 后引起肝脏甘油三酯含量上调。**结论:**小鼠 PNPLA7 的敲降腺病毒构建成功,敲降 PNPLA7 引起肝脏中甘油三酯含量升高。

[关键词] PNPLA7;腺病毒;甘油三酯;脂代谢

[中图分类号] R392.69

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)02-155-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20180203

Construction of recombinant adenovirus carrying mouse PNPLA7 shRNA and Preliminary investigation on the biology function of PNPLA7

Lei Yongqiang, Wang Xiuyun, Li Zhong*

The Key Laboratory of Human Functional Genomics of Jiangsu Province, The Key Laboratory of Rare Medical Diseases, Department of Biochemistry and Molecular Biology, NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To construct recombinant PNPLA7 shRNA adenovirus and check its knockdown efficiency in liver. Provide a new approach for further investigating the role of PNPLA7 on hepatic triglyceride metabolism. **Methods:** siNC and siPNPLA7 were designed and cloned into the p-shuttle-CMV-silence vector. After Sequencing identification, the plasmid was linearized by *Pme* I and recombined with backbone pAdeasy in BJ5183 competent cells. The recombinant plasmid was linearized by *Pac* I and transfected into 293A cells for packaging Ad-shPNPLA7 and Ad-shNC adenovirus. After 7 days of tail vein injection, Western blot was applied to determine the knockdown efficiency of pAdeasy-shPNPLA7 adenovirus in liver, and hepatic triglycerides content were measured. **Results:** The hepatic PNPLA7 protein levels were significantly decreased while the hepatic TAG levels were significantly increased in mice with tail vein injection of pAdeasy-shPNPLA7 adenovirus compared with control mice. **Conclusion:** The recombinant adenovirus of pAdeasy-shPNPLA7 and pAdeasy-shNC were successfully constructed. The PNPLA7 may play a role in hepatic triglycerides metabolism.

[Key words] PNPLA7;adenovirus; triglycerides; lipid metabolism

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(02): 155-160]

非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 作为一种慢性肝损伤疾病,是指除酒精因素外其他因素导致肝脏中脂质过度堆积的现象,

[基金项目] 国家自然科学基金(81471079, 31271268)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: lizhong@njmu.edu.cn

NAFLD 代表一系列复杂肝脏损伤情况,从单纯性肝脏脂肪堆积以及非酒精性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 到发展成为肝脏纤维化以及最终的肝癌都属于 NAFLD 的范畴^[1]。NAFLD 是慢性肝功能损伤最常见的病因,也是世界范围内最常见的公共

卫生问题之一。最近流行病学研究表明NAFLD患者占美国总人口的12%~38%,而NASH患病率为3%~15%^[2]。在中国,随着代谢紊乱疾病如肥胖、2型糖尿病、血脂异常等发生几率的增加,NAFLD逐渐成为人们普遍关注的健康问题。在2型糖尿病患者中,NAFLD患病率为28%~55%,而在高脂血症患者中为27%~92%^[3]。NAFLD被认为是代谢综合征的肝脏表现,与肥胖和胰岛素抵抗密切相关。

马铃薯样磷脂酶结构域蛋白(patatin-like phospholipase domain-containing protein, PNPLA)家族包括9个成员(PNPLA1~9)^[4]。PNPLA家族蛋白中研究最为广泛的是PNPLA2即脂肪甘油三酯脂酶(adipose triglyceride lipase, ATGL),以及PNPLA3。ATGL具有水解甘油三酯(triglyceride, TG)成为甘油二酯的功能,是调节TG水解的限速酶^[5-7]。最新研究报告ATGL通过SIRT1调控肝脏中自噬、脂质自噬过程从而调节肝脏中脂质含量^[8]。PNPLA3是PNPLA家族蛋白中发现与NAFLD最显著相关的蛋白,它的第148位亮氨酸突变为异亮氨酸会导致严重的NAFLD^[6,9-10]。最近研究发现,PNPLA5通过调节脂质水解促进自噬体形成的过程,从而调节脂质代谢过程^[11]。

作为PNPLA家族成员,PNPLA7具有溶血磷脂酶活性,在体外可以水解溶血磷脂酸和溶血磷脂胆碱,提示PNPLA7可能在脂代谢过程中发挥作用。本实验室前期研究发现,PNPLA7在脂肪、肝脏、肌肉等代谢旺盛的器官中高表达,并且PNPLA7在NAFLD病理模型小鼠ob/ob、db/db的肝脏中表达量明显升高,由此提示PNPLA7可能在肝脏脂代谢过程中发挥重要作用(未发表资料)。但是到目前为止,PNPLA7在肝脏中的功能还鲜有报道,为了明确PNPLA7在肝脏脂代谢过程中的作用,本研究构建PNPLA7敲降腺病毒探究其在体内的功能。

1 材料和方法

1.1 材料

pShuttle-CMV-silence质粒由清华大学李蓬老师实验室惠赠;pAdeasy质粒由南京医科大学韩晓老师实验室惠赠;含pAdeasy载体的BJ5183菌种由本实验室自制;引物由南京捷瑞公司合成;限制性内切酶Xho I、Hind III以及T4 DNA连接酶(TaKaRa公司,日本);内切酶Pac I、Pme I(NEB公司,美国);DMEM细胞培养液(Gibco公司,美国);胎牛血清(天杭生物科技有限公司);细胞培养皿、细胞培养板

(Corning公司,美国);转染试剂Lipofectamine 2000(Life公司,美国);质粒抽提试剂盒(Qiagen公司,德国);抗Calnexin抗体(Stressgen公司,比利时),抗PNPLA7抗体由本实验室自制;甘油三酯酶法测定试剂盒(Life公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 引物退火

取引物稀释为20 μmol/μL的溶液。分别取上下游引物Ad-sip7-3F、Ad-sip7-3R 5 μL加入10×bufferG 5 μL,最后用ddH₂O补至50 μL配成反应体系。退火PCR程序:95℃ 5 min,25℃ 2 min,4℃保持。

1.2.2 穿梭质粒pShuttle-CMV-shPNPLA7的构建和鉴定

取pshuttle-CMV-silence质粒1 μg,以及退火产物分别用限制性内切Hind III、Xho I在37℃细菌培养箱中进行酶切过夜,琼脂糖电泳,根据胶回收试剂盒说明书回收酶切产物。利用T4 DNA连接酶按照合适比例将片段和载体放于16℃恒温水浴锅中进行连接过夜。取50 μL大肠杆菌感受态细胞,加入适量连接产物冰浴30 min后,42℃热激90 s,马上放回冰上,冰浴2 min;加200 μL LB培养基,于37℃摇床慢振荡培养45 min;取50~100 μL涂在含有卡那霉素的LB固体培养基上,37℃倒置培养过夜。挑选单克隆,在含卡那霉素的培养液中37℃培养16 h,小提质粒,EcoRV酶切质粒,初步鉴定。选取样品,进行测序。测序成功后,中提质粒,Pme I酶切质粒37℃16 h后,1%琼脂糖凝胶电泳两条带,PCR产物清洁试剂盒回收,20 μL溶解获得目的产物。

经测序鉴定成功的穿梭质粒pShuttle-CMV-shPNPLA7,转化摇菌中提质粒,取2 μg质粒用限制性内切酶Pme I酶切线性化。37℃16 h后,1%琼脂糖凝胶电泳两条带,PCR产物清洁试剂盒回收,20 μL水溶解回收获得目的片段。将20 μL的清洁回收产物加入到100 μL含pAdeasy的BJ5183感受态细胞,用上述方法进行转化,最后涂于卡那抗性平板上,37℃培养过夜。挑选单克隆在含卡那霉素的培养液中37℃培养16 h,小提质粒。用Pac I单酶切2~4 h,酶切产物用0.8%的琼脂糖凝胶电泳分离,阳性克隆应该得到1条30 kb左右的大片段和1条3.0 kb或者4.5 kb的小片段。鉴定成功的质粒,摇菌中提^[12]。

1.2.3 重组腺病毒质粒载体pAdeasy-shPNPLA7质粒线性化

取20 μg质粒用限制性内切酶Pac I 1.5 μL,

cutmart buffer 5 μL ddH₂O 补至 100 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 16 h。

1.2.4 酚氯仿抽提

首先向 1.2.3 所得酶切产物加入 ddH₂O 补至 400 μL , 加入等体积酚氯仿, 剧烈震荡 3 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 取 340 μL 上清加入 34 μL 3 mol NaAc、800 μL 无水乙醇, 混匀后放置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 7 500 r/min 离心 5 min 再次用 75% 乙醇洗涤沉淀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 7 500 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 加入 20 μL ddH₂O 室温静置 30 min, 即可得到纯化的质粒。

1.2.5 质粒转染、病毒包装、扩增、纯化

将 293A 细胞种到 6 cm 培养皿中贴壁培养过夜, 在细胞密度达到 80% 时进行细胞转染, 将上述纯化的质粒用脂质体 Lipofectamine 2000 转染 293A 细胞, 细胞转染 4 h 之后, 换成含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 继续培养, 包装第 1 代病毒。期间, 只能不断补充培养液, 而不能换液更不能传代。10 d 左右, 细胞会出现明显的病变效应; 将细胞自培养皿上吹打下来, 收集在 1 个 15 mL 离心管中。将细胞冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$, 然后 37 $^{\circ}\text{C}$ 解冻, 反复冻融 3 次, 使得细胞中的病毒颗粒充分释放。最后 1 次解冻之后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 10 min, 得到 6 mL 培养液, 病毒颗粒位于培养液中, 此为第 1 代病毒。

取 1 mL 第 1 代病毒感染 1 个 10 cm 皿扩增得到第 2 代病毒, 同样的方法反复冻融 3 次后离心, 得到 10 mL 第 2 代病毒。然后再取 1 mL 第 2 代病毒感染 1 个 15 cm 皿扩增得到 30 mL 第 3 代病毒。接着再取 0.5 mL 第 3 代病毒感染 1 个 15 cm 皿, 扩增 30 个 15 cm 皿得到的培养液, 利用 CsCl 密度梯度离心的方法进行病毒纯化, 保存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中^[13]。注意每一轮病毒扩增中, 细胞要在 2~3 d 内病变完全, 并且收集, 如果某一轮扩增没有在 2~3 d 内病变完全, 要重复该轮扩增, 直到在 2~3 d 内病变完全为止。

1.2.6 Western blot 检测 Ad-shPNPLA7 腺病毒敲降效率

尾静脉注射经纯化后的腺病毒到小鼠体内, 7 d 后安乐死小鼠并解剖收集肝脏组织, 提取组织蛋白。根据 BCA 方法计算各蛋白样品浓度, 将含有上样缓冲液蛋白样品煮沸 5 min 使其变性。定量后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 以 PNPLA7 抗体 (1:500) 作为一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 第 2 天回收抗体, TBST 洗膜, 以

辣根过氧化物酶标记的兔抗作为二抗 (1:10 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜, 采用 ECL 化学发光法检测 PNPLA7 蛋白表达。

1.2.7 肝脏油红染色以及肝脏中 TG 含量检测

切取新鲜肝脏组织, 放入液氮中冷却, 然后石蜡包埋切片, 室温回温, 蒸馏水浸洗, 洗掉包埋剂, 60% 异丙醇浸洗 2 min, 油红 O 工作液染色 2~5 min, 60% 异丙醇调色, 调色结束后, 立即水洗, 苏木精复染 (严格控制时间, 1 min 以内), 盐酸酒精分化 1~5 s, 流水反蓝甘油明胶封片。

肝脏 TG 检测: 称量 100 mg 组织样品, 加入 5 mL 氯仿: 甲醇混合液 (氯仿: 甲醇=2:1), 匀浆, 加入 800 μL 0.9% NaCl 离心, 转移上清至 5 mL 容量瓶, 静置 16 h, 加入氯仿补至 5 mL, 震荡混匀, 之后在深孔板中分别加入 25 μL 样品以及标准品, 然后每孔加入 10 μL chloroform: triton-100 混液 (chloroform: triton-100=1:1), 放入超净工作台吹干 3.0~3.5 h, 加入 200 μL 工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱, 放置 5 min, 转移 150 μL 液体至 96 孔板中, 波长分别为 500、660 nm 分光光度计读数, 计算数值。

1.3 统计学方法

所有计量数据均使用 GraphPad 软件进行统计学分析。计算 3 次实验的均数和标准误 (means \pm SEM), 采用成组 *t* 检验对不同组数据进行比较并计算 *P* 值, *P* \leq 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Ad-shPNPLA7 的引物设计

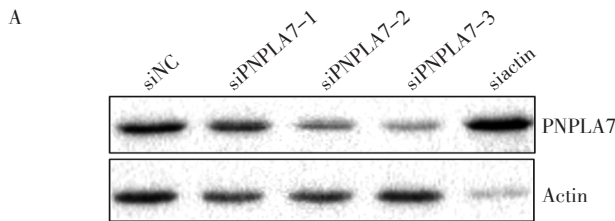
设计 3 条 siRNA 转染 AML12 细胞, Western blot 检测敲降效率, 结果显示 3 号 PNPLA7 siRNA 干扰片段敲降效率最高 (图 1A), 因此, 选取该序列设计 PNPLA7 shRNA。根据 shRNA 设计规则, 将该 PNPLA7 siRNA 干扰片段设计为发卡结构 shRNA, 具体引物序列如图 1B 所示。

2.2 穿梭质粒 pShuttle-CMV-shNC、pShuttle-CMV-shPNPLA7 的构建及鉴定

EcoR V 酶切 pShuttle-CMV-silence 以及挑取的 pShuttle-CMV-shNC、pShuttle-CMV-shPNPLA7 克隆质粒, p1、p2、p3 可能为阳性克隆, 利用通用引物 CMV 进行测序, 测序结果显示 p1 为 pShuttle-CMV-shNC, p2、p3 为 pShuttle-CMV-shPNPLA7 阳性克隆质粒 (图 2)。

2.3 重组质粒 pAdeasy-shNC、pAdeasy-shPNPLA7 的鉴定

构建成功的穿梭质粒 pAdeasy-shNC、pShuttle-



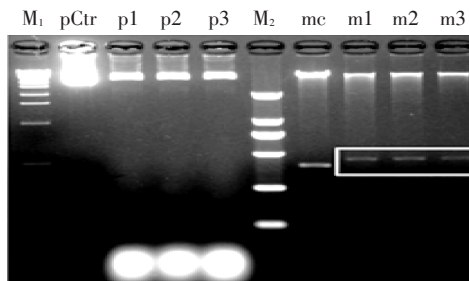
B

| | |
|----------------|--|
| Ad-siPNPLA7-3F | TCGAGGCCAAGAGGATTCTGC GCTTTTCAAGAGAAAGC GCAGAATCCTCTTGGTTTTTGGAA |
| Ad-siPNPLA7-3R | AGCTTTCCAAAAACCAAGAG GATTCTGCGCTTCTCTTGAAAAGC GCAGAATCCTCTTGGCC |
| Ad-siNC-F | TCGAGGCCAAGAGGATTCTGC GCTTTTCAAGAGAAAGC GCAGAATCCTCTTGGTTTTTGGAA |
| Ad-siNC-R | AGCTTTCCAAAAACCAAGAG GATTCTGCGCTTCTCTTGAAAAGC GCAGAATCCTCTTGGCC |

A: 3条PNPLA7 siRNA分别转染AML12细胞,48 h后收样检测PNPLA7蛋白表达;B:PNPLA7和阴性对照shRNA引物设计序列。

图1 Ad-siPNPLA7的引物设计

Figure 1 Primer design of Ad-siPNPLA7



pCtr为对照质粒,p1、p2、p3为挑取单克隆,摇菌小提质粒。mc、m1、m2、m3对应EcoRV酶切产物。M:DNA Marker。

图2 穿梭质粒pShuttle-CMV-shPNPLA7的鉴定

Figure 2 Identification of pShuttle-CMV-shPNPLA7 shuttle plasmid

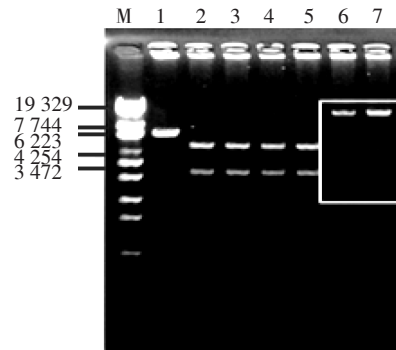
CMV-shPNPLA7经Pme I酶切线性化,转化到含有Adeasy的BJ5183感受态细菌中进行同源重组,重组成功质粒经Pac I酶切后,由于不同的同源重组方式会出现两条带,1条30 kb;另1条为3.0 kb或4.5 kb。结果显示6、7号样品腺病毒质粒重组成功(图3)。

2.4 重组腺病毒的包装

重组成功的腺病毒质粒转染293A细胞,6 h之后换液继续培养,病毒感染10 d后,观察到细胞开始变圆、肿大、脱落等病变效应,呈彗星状(图4)。

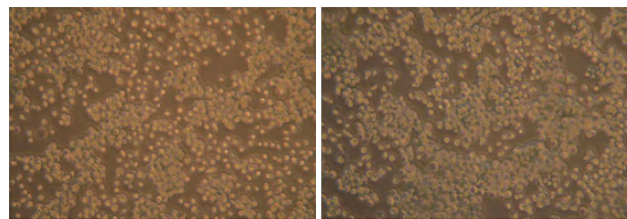
2.5 尾静脉注射重组腺病毒,体内检测敲降效率

通过尾静脉注射方式,给8周龄C57BL6/J小鼠尾静脉注射腺病毒,7 d后提取肝脏组织总蛋白,运用Western blot检测PNPLA7蛋白的表达。结果显示Adeasy-shPNPLA7实验组相对Adeasy-shNC对照



Adeasy重组腺病毒质粒经Pac I进行酶切后产物,6、7号为重组成功质粒。M:DNA Marker。

图3 重组腺病毒质粒pAdeasy-shPNPLA7的酶切鉴定
Figure 3 Identification of pAdeasy-shPNPLA7 vector by restriction enzyme



Adeasy-shNC Adeasy-shPNPLA7

图4 重组腺病毒的体外包装(×40)

Figure 4 Recombinant adenovirus in vitro packaging(×40)

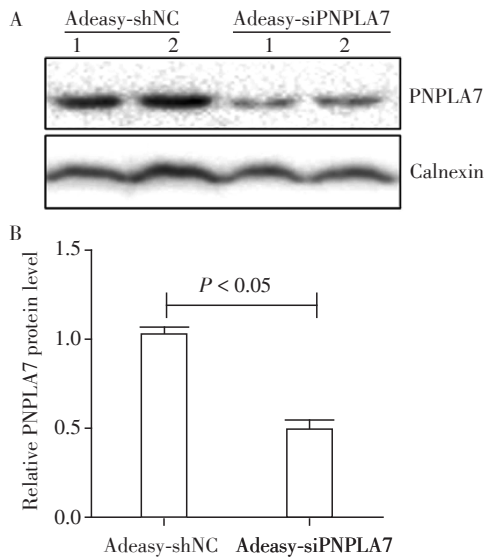
组小鼠肝脏中PNPLA7蛋白表达量明显下调(图5A)。通过进一步灰度扫描分析显示,和对照组PNPLA7的蛋白水平 1.000 ± 0.048 相比,注射腺病毒后肝脏中PNPLA7的蛋白水平为 0.627 ± 0.102 ,下降了大约40%,差异有统计学意义($P=0.011$,图5B)。该结果证实Adeasy-shPNPLA7确实可以有效敲降肝脏中PNPLA7蛋白的表达水平。

2.6 油红染色肝脏,观察肝脏中脂质含量

待小鼠注射腺病毒7 d后,解剖并剪取小鼠肝脏组织,分别进行油红O染色和小鼠肝脏TG含量检测。和对照组相比,在肝脏中敲降PNPLA7之后,肝脏中油红O染色的脂滴含量明显增多(图6A),同时TG含量检测结果显示,和对照组相比,小鼠肝脏中敲降PNPLA7后TG含量显著上调(图6B)。

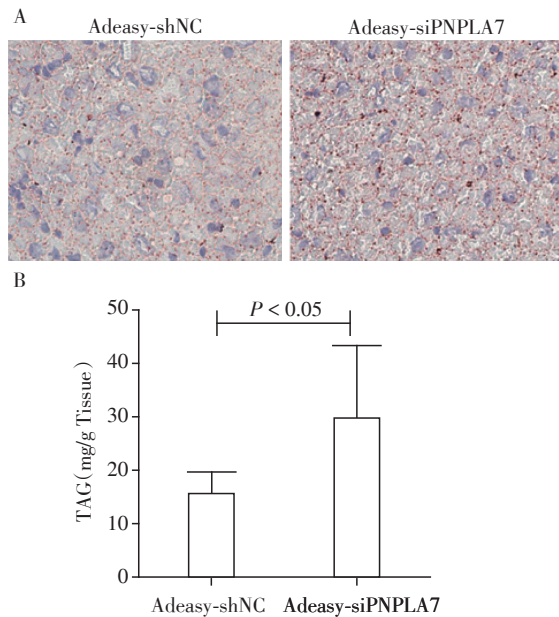
3 讨论

NAFLD是指肝脏病理表现与酒精性脂肪肝相类似但无过量饮酒史的一种临床病理综合征,非酒精性因素的情况(饮酒量男性低于30 g/d,女性低于20 g/d)下,常伴有肝脏脂肪异常堆积现象^[14]。NAFLD代表了一系列的肝脏病理学变化,包括在肝脏中发生的单纯性脂肪堆积、带有炎症现象的脂肪



A:敲降PNPLA7小鼠肝脏蛋白表达检测;B:PNPLA7蛋白的灰度扫描结果。

图5 Western blot 检测小鼠肝脏PNPLA7蛋白的表达
Figure 5 Western blot analysis of hepatic PNPLA7 Protein level in mice



A:小鼠肝脏油红染色;B:小鼠肝脏中TAG测定。

图6 腺病毒感染的小鼠肝脏脂质含量的检测
Figure 6 The measurement of hepatic lipid content

浸润、非酒精性脂肪肝炎、肝纤维化,最终发展成为肝癌。

研究显示NAFLD与代谢综合征有较强的相关性,肥胖、胰岛素抵抗、2型糖尿病以及血脂紊乱等患者NAFLD发病率明显高于正常人群^[15-16]。近5年来,NAFLD引起的病死率逐年增大^[17],肝脏相关死亡因素中,NAFLD所占比率由0.2%上升到2.8%,升

高了10倍,是同期心血管疾病所导致死亡率的2倍^[18]。研究表明,随着肥胖、胰岛素抵抗的发生以及人们久坐、饮食结构、生活方式的改变,NAFLD不仅在发达国家,在发展中国家也逐渐成为导致肝脏功能紊乱的重要因素^[19]。尽管现在有很多对NAFLD的研究,但其发病机制仍不十分清楚,参与其发病及进展的关键基因也需要进一步探索。

诸多研究表明,PNPLA家族成员与肝脏脂质代谢及NAFLD发病密切相关。作为PNPLA家族成员,PNPLA7在肝脏、脂肪、等脂代谢旺盛的器官中高表达,且其在NAFLD病理模型小鼠ob/ob、db/db的肝脏中表达量明显升高,提示PNPLA7在小鼠肝脏脂质代谢中发挥重要作用,可能参与了NAFLD的发病过程。为了研究PNPLA7在小鼠肝脏脂质代谢中的功能,拟采用腺病毒尾静脉注射的方式进行小鼠肝脏PNPLA7的敲降。腺病毒具有转基因效率高、病毒颗粒稳定、多数组织细胞具有感染性、性质稳定等优点^[20]。利用Adeasy-1系统(Stratagene),本研究构建了PNPLA7敲降腺病毒,并通过尾静脉方式注射小鼠体内,Western blot结果显示PNPLA7表达量明显降低,说明该腺病毒构建成功,并且在小鼠肝脏中表达成功。在小鼠肝脏中敲降PNPLA7之后,脂质含量明显升高,这提示着PNPLA7可能在肝脏脂质代谢中发挥重要作用。肝脏脂质变性是NAFLD发生的重要原因,由此提示PNPLA7可能通过调节肝脏中脂质含量,进而影响NAFLD的发生。

肝脏中脂质堆积的可能原因有3种:肝脏脂质从头合成增加;肝脏中脂质分解减少;肝脏中脂质分泌可能减少。肝脏中脂质合成过程中,其中2个重要的转录因子为甾醇调控原件结合蛋白-1c[sterol-regulatory element-binding protein(SREBP)-1c,SREBP-1c]、碳水化合物反应原件结合蛋白(carbohydrate-responsive element-binding protein,ChREBP)^[21-22]。它们都可以促进体内脂肪酸合成相关基因的表达,ChREBP能增加肝脏特异性的丙酮酸激酶的表达,从而为脂肪以及TG的合成提供更多底物^[21]。而肝脏中脂质分解过程主要涉及到脂质水解酶介导的脂质水解以及线粒体介导的 β 氧化过程,研究表明ATGL或者线粒体肉毒碱棕榈酰转移酶-1(carnitine palmitoyltransferase 1,CPT1)功能受损会导致肝脏中脂质堆积^[23]。另外肝脏中脂质的分泌主要以超低密度脂蛋白(very low-density lipoprotein,VLDL)形式分泌到血液中,VLDL上结构蛋白的功能受损可能会增加肝脏中脂质含量,如apoB基因的突变导致肝

脏中脂质含量是正常人的3倍^[24]。但是敲降PNPLA7之后具体如何引起肝脏脂质堆积以及相关机制的研究,还需要进一步研究。总之本研究构建的Adeasy-shPNPLA7腺病毒为后续研究提供便利的实验工具,为深入探讨PNPLA7在肝脏中的功能及其机制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights[J]. *Science*, 2011, 332(6037):1519-1523
- [2] Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011, 34(3):274-285
- [3] Fan JG, Farrell GC. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China[J]. *J Hepatol*, 2009, 50(1):204-210
- [4] Kienesberger PC, Oberer M, Lass A, et al. Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(Suppl):S63-68
- [5] Romeo S, Kozlitina J, Xing C, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(12):1461-1465
- [6] Speliotes EK, Butler JL, Palmer CD, et al. PNPLA3 variants specifically confer increased risk for histologic non-alcoholic fatty liver disease but not metabolic disease[J]. *Hepatology*, 2010, 52(3):904-912
- [7] Li JZ, Huang Y, Karaman R, et al. Chronic overexpression of PNPLA3I148M in mouse liver causes hepatic steatosis[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(11):4130-4144
- [8] Sathyanarayan A, Mashek MT, Mashek DG. ATGL Promotes autophagy/lipophagy via SIRT1 to control hepatic lipid droplet catabolism[J]. *Cell Rep*, 2017, 19(1):1-9
- [9] Kotronen A, Johansson LE, Johansson LM, et al. A common variant in PNPLA3, which encodes adiponutrin, is associated with liver fat content in humans[J]. *Diabetologia*, 2009, 52(6):1056-1060
- [10] He S, McPhaul C, Li JZ, et al. A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(9):6706-6715
- [11] Dupont N, Chauhan S, Arko-Mensah J, et al. Neutral lipid stores and lipase PNPLA5 contribute to autophagosome biogenesis[J]. *Curr Biol*, 2014, 24(6):609-620
- [12] 郑月, 张许, 韩晓. 小鼠PPA1重组腺病毒的构建及在胰岛β细胞中的表达[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(08):1019-1024
- [13] Ye J, Li JZ, Liu Y, et al. Cideb, an ER- and lipid droplet-associated protein, mediates VLDL lipitation and maturation by interacting with apolipoprotein B[J]. *Cell Metab*, 2009, 9(2):177-190
- [14] Wong RJ, Cheung R, Ahmed A. Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S[J]. *Hepatology*, 2014, 59(6):2188-2195
- [15] Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, et al. Prevalence of fatty liver in children and adolescents[J]. *Pediatrics*, 2006, 118(4):1388-1393
- [16] Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(11):686-690
- [17] Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review[J]. *JAMA*, 2015, 313(22):2263-2273
- [18] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(7):1592-1609
- [19] McPherson S, Hardy T, Henderson E, et al. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management[J]. *J Hepatol*, 2015, 62(5):1148-1155
- [20] He TC, Zhou S, da CLT, et al. Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(5):2509-2514
- [21] Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis[J]. *Cell Metab*, 2006, 4(2):107-110
- [22] Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(9):1125-1131
- [23] Hooper AJ, Adams LA, Burnett JR. Genetic determinants of hepatic steatosis in man[J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(4):593-617
- [24] Tanoli T, Yue P, Yablonskiy D, et al. Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: roles of the APOB defects, intra-abdominal adipose tissue, and insulin sensitivity[J]. *J Lipid Res*, 2004, 45(5):941-947

[收稿日期]2017-06-19