

· 基础研究 ·

Derlin-1 对非酒精性脂肪肝形成的影响

刘林卉^{1,2},董成龙³

¹东南大学附属中大医院急诊医学科,江苏 南京 210009;²南京医科大学病理学系,江苏 南京 211166;³盐城市第一人民医院急救中心,江苏 盐城 224000

[摘要] 目的:探讨内质网相关降解蛋白1(endoplasmic reticulum correlative protein 1, Derlin-1)在非酒精性脂肪肝组织中的表达情况及其通过对蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase, PERK),即内质网应激中未折叠蛋白反应感受蛋白的影响,抑制非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发生机制。方法:通过免疫组织化学染色及Western bolt技术检测NAFLD小鼠肝脏组织中Derlin-1的表达;在HepG2细胞中利用质粒过表达Derlin-1,以Western blot技术检测其对内质网应激信号通路PERK的影响。结果:Derlin1在NAFLD肝组织中表达明显高于正常肝脏组织;过表达Derlin-1能抑制内质网应激信号通路的激活。结论:Derlin1在NAFLD肝组织的高表达提示其可能通过抑制内质网应激中未折叠蛋白反应感受蛋白PERK,减少内质网应激,阻止肝脏细胞脂肪变。

[关键词] Derlin-1;非酒精性脂肪肝;蛋白激酶R样内质网激酶

[中图分类号] R575.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)02-205-05

doi:10.7655/NYDXBNS20200211

The influence of Derlin-1 on non-alcoholic fatty liver disease

LIU Linhui^{1,2}, DONG Chenglong³

¹Department of Emergency, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009; ²Department of Pathology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ³Department of Emergency, Yancheng First People's Hospital, Yancheng 224000, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the endoplasmic reticulum correlative protein 1 (Derlin-1) expression in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its effect on PERK (protein kinase R-like ER kinase) signal pathway to inhibit NAFLD. **Methods:** The expressin of Derlin-1 in liver tissues of NAFLD mice was detected by immunohistochemical staining and Western blotting. The over-expression of Derlin-1 in HepG2 cell was performed by plasmid vector transfection. Derlin-1 inhibits PERK pathway detected by Western blotting. **Results:** The expression of Derlin-1 in liver tissues of NAFLD mice was increased compared with that in nomal liver tissues. Overexpression of Derlin-1 inhibited endoplasmic reticulum stress pathway activation. **Conclusion:** High expression of Derlin-1 in liver tissues of NAFLD pratients may play a critical role in decreasing endoplasmic reticulum stress and inhibiting liver cell pemelosis through inhibiting PERK expression.

[Key works] Derlin-1; NAFLD; PERK

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(02):205-209]

随着我国经济的快速发展,人民生活水平的提高,非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的患病率逐年升高,成为各类肝脏疾病的重要病因^[1]。肝脏是脂肪代谢的重要器官,肝脏细胞中含有大量的粗面内质网和滑面内质网,内质网主要负责脂肪与胆固醇的合成,如合成和分泌

低密度脂蛋白、清蛋白和载脂蛋白等^[2]。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)可直接影响应激细胞的转归,如适应、损伤或凋亡。内质网降解即清除内质网内错误折叠蛋白及未折叠蛋白,降低内质网的负荷,保护细胞内环境的稳态。近年来有研究表明,内质网降解相关的E3泛素化连接酶滑膜

素,能够抑制乳腺癌细胞的增殖与转移^[3]。

内质网相关降解蛋白1(Derlin-1)定位于内质网膜上,是与内质网降解相关的重要调节分子^[4],由4个跨膜蛋白构成,其C末端和N末端均暴露在胞质中,参与了错误蛋白的跨膜转运,协助其进入内质网相关降解途径,即蛋白底物被泛素化标记后进入胞浆中的蛋白酶体进行降解^[5]。不同的E3泛素化酶复合体决定了不同降解途径^[6]。E3泛素化连接酶在获得由Derlin-1通道传出的需要降解的错误折叠蛋白和未折叠蛋白后,快速地为其装配上泛素,由泛素引导蛋白质进入26S蛋白酶体进行降解^[7]。当Derlin-1缺失或不足时错误折叠的蛋白不能有效地转运至蛋白酶体,导致内质网腔错误折叠蛋白大量堆积引起内质网损伤。因此认为Derlin-1对维持内质网的功能起着重要作用,能够预防某些疾病的发生发展。近年来研究发现Derlin-1与霍乱、乙肝、慢性阻塞性肺疾病、癌症等多种疾病的发病有着密切的关系^[8-9]。

内质网内错误折叠蛋白聚集,其环境平衡失调时可发生ERS,降解错误折叠蛋白,维持细胞功能。但是持续的ERS也可触发细胞凋亡。在ERS中有3种重要的蛋白,分别是蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase, PERK)、活化转录因子6(the activating transcription factor 6, ATF6)和肌醇酶1(inositol requiring enzyme 1, IRE1)。PERK是内质网膜上的感应蛋白,在ERS时PERK磷酸化而活化,活化的PERK通过磷酸化eIF2 α ,减少蛋白合成而缓解ERS;另一方面也选择性地增加转录因子ATF4及CHOP的表达而激活其下游通路,促进细胞凋亡^[10]。

环磷酸腺苷(cAMP)能够加强肝脏组织对脂肪的分解,通过激活蛋白激酶,进而使激素敏感的脂酶活化,抑制肝细胞合成胆固醇和中性脂肪。因此,本课题主要研究Derlin-1在NAFLD中的表达以及其对ERS中PERK的影响,以期为临床治疗非酒精性肝硬化找到新的治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF级8周龄的雌性小鼠20只,均购自南京大学模式动物研究所。其中C57BL/KsJ db/db小鼠(Leptin受体点突变,导致小鼠出现肥胖、胰岛素抵抗和脂肪肝等症)10只,C57BL/KsJ db/m小鼠10只。分笼饲养,所有小鼠均在(22 \pm 2) $^{\circ}$ C室温下,每天予以

12 h光照,自由饮水、摄食,适应性喂养1周后开始实验。采用完全随机的方法,选5只db/db小鼠分为脂肪肝组,5只db/m小鼠为正常对照组。HepG2细胞系(美国模式培养物集存中心,ATCC),兔抗 β -actin(SAB公司,美国),兔抗Derlin-1、兔抗PERK(Seta Cruz公司,美国),羊抗兔二抗(中国凯基生物公司),cAMP(X-treme GENE HP DNA Transf, Roche公司,美国),Derlin1质粒由美国匹兹堡大学细胞生物与生理系孙飞教授赠送,蛋白裂解液、BCA蛋白定量试剂盒(杭州碧云天公司),脱脂奶粉(碧迪公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HepG2肝癌细胞使用含10%FBS胎牛血清的DMEM低糖培养基,置于含5%CO₂饱和湿度37 $^{\circ}$ C的细胞培养箱中培养。

1.2.2 免疫组织化学染色

此过程均在南京医科大学第二附属医院生物治疗中心完成。所有标本均用10%福尔马林液固定,常规石蜡包埋、切片,行免疫组化染色,梯度酒精脱水,丙酮固定,抗原修复,加入Derlin-1抗体过夜,次日经PBST冲洗3次,加入二抗,室温孵育30 min,冲洗3次。

1.2.3 Western blot检测

快速称量适量肝脏组织块置于RIPA裂解液用匀浆仪冰上匀浆、离心后取上清,用4 \times Loading buffer变性蛋白浓度。以70 μ g蛋白上样并应用Western blot蛋白电泳方法检测Derlin-1、PERK的表达。以 β -actin条带灰度值为对照计算目的蛋白相对表达量,进行组间比较。HepG2细胞裂解前用磷酸盐缓冲液洗3遍,加入RIPA裂解液,超声离心提取细胞总蛋白,BCA比色法测量蛋白浓度。

1.2.4 Derlin-1质粒转染

在HepG2细胞以4 \times 10⁵个/孔的密度接种至6孔板中,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂细胞培养箱中培养。待其生长至密度融合约80%时,将含有Ad-Derlin-1的无血清DMEM高糖培养基置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂细胞培养箱中培养8 h,换无血清DMEM高糖培养基,继续培养16 h提取细胞总蛋白。

1.3 统计学方法

所有数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$),采用SPASS 20.0软件进行统计学分析。两组间的比较采用 t 检验,多组比较采用方差分析,组间比较采用 q 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。每组实验均独立重复至少3次。

2 结果

2.1 Derlin-1在NAFLD小鼠肝脏组织中的表达水平

为了检测Derlin-1在正常肝脏及NAFLD肝脏中的表达,分别取5只正常小鼠肝脏组织及NAFLD肝脏组织及石蜡切片进行相关实验。免疫组织化学染色(图1)及Western blot(图2)结果均表明,Derlin-1在NAFLD肝脏组织中的表达明显高于正常肝脏组织,这提示,Derlin-1可能与NAFLD的形成有关。

2.2 NAFLD小鼠血浆中cAMP的水平

为了检测cAMP在正常小鼠与NAFLD小鼠血浆中表达的差异,采用放射免疫法测血浆cAMP含量(图3),结果表明cAMP在正常小鼠血浆中的水平高于NAFLD小鼠。

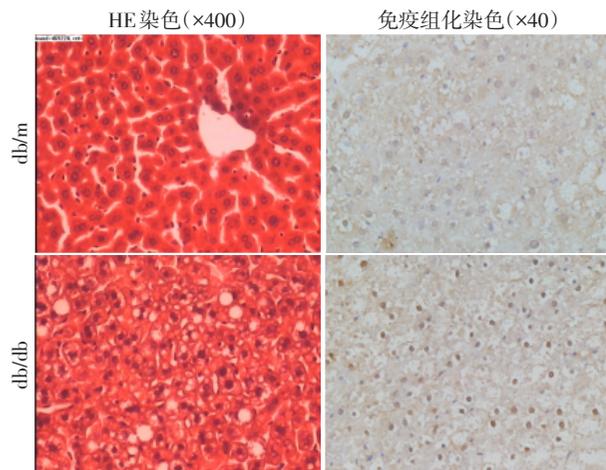


图1 Derlin-1在NAFLD小鼠肝脏组织中的表达

Figure 1 Expression of Derlin - 1 in liver tissues of NAFLD mice

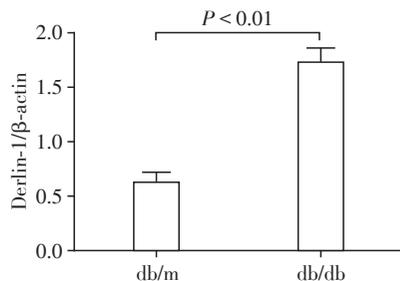
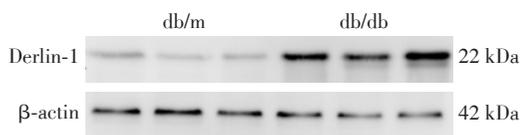


图2 Western blot 检测 Derlin-1 在 NAFLD 肝脏组织中的表达

Figure 2 Expression of Derlin-1 in liver tissue of NAFLD mice detected by Western blot

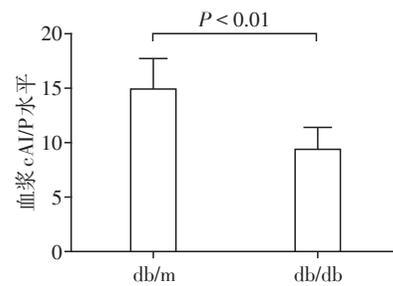


图3 NAFLD小鼠血浆中cAMP水平

Figure 3 The level of cAMP in plasma of NAFLD mice

2.3 Derlin-1的表达

为了明确Derlin-1及PERK与血浆cAMP水平的关系,在细胞中观察不同cAMP水平下Derlin-1及PERK的表达。结果表明,随着细胞外液中cAMP水平的增高,Derlin-1及PERK的表达增多(图4)。

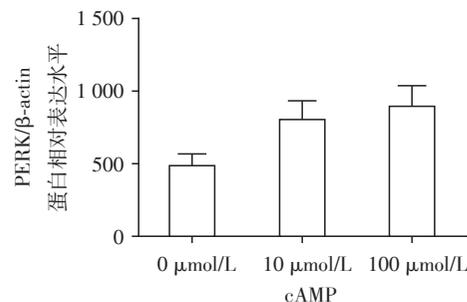
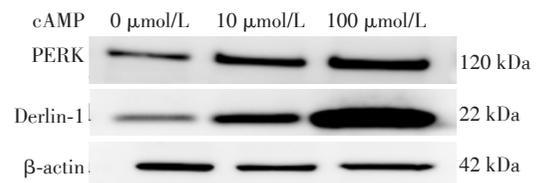


图4 Western blot检测HepG2细胞中Derlin1及PERK表达
Figure 4 Expression of Derlin - 1 and PERK in HepG2 cells detected by Western blot

2.4 Derlin-1抑制PERK的作用

为了明确Derlin-1在NAFLD发生发展的作用,选取HepG2细胞进行相关实验,检测Derlin-1对ERS作用的影响。在HepG2细胞中分别转染Ad-Derlin1和Ad-pcDNA3.1 24 h后,经胰酶消化,Western blot实验(图5)表明高表达Derlin1能够抑制PERK信号通路,而对IRE-1及ATF6两条通路无影响。在细胞培养液中cAMP升高的环境下,Derlin1抑制PERK作用更显著。这说明了,Derlin1可能是通过抑制ERS PERK信号通路阻止非酒精性脂肪肝的发生。而且,cAMP抑制肝脏细胞合成胆固醇和脂肪的作用可能是通过调控Derlin1的表达而实现的。

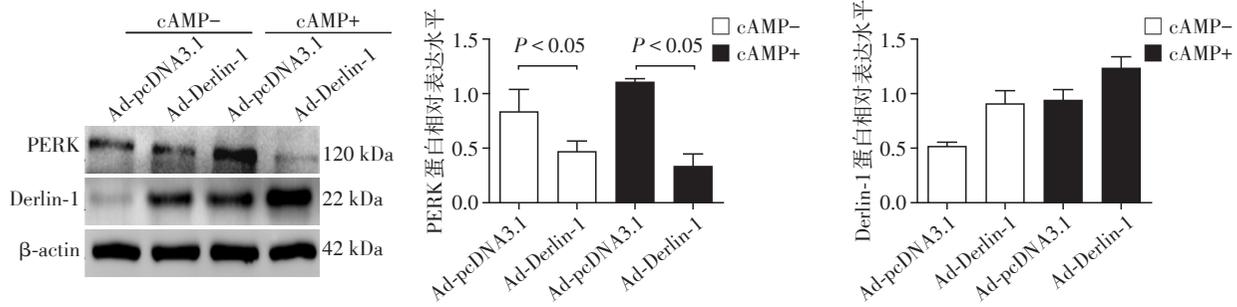


图5 Western blot检测过表达Derlin-1能够抑制PERK信号通路

Figure 5 Overexpression of Derlin-1 can inhibit PERK signaling pathway detected by Western blot

3 讨论

流行病学调查分析,我国NAFLD的患病率高达15%,已取代慢性乙型肝炎,成为我国慢性肝脏疾病的第一大病因,为多种肝脏疾病发病的基础^[11]。因此,深入认识NAFLD的发病机制,对预防和治疗NAFLD有着重要的意义。已有研究发现Derlin-1在非小细胞肺癌细胞质膜上高表达,与抑制肿瘤细胞生长有关。而且近年来国内外有研究发现ERS导致的肺上皮细胞凋亡是引起慢性阻塞性肺病肺泡结构改变的原因,而在COPD中Derlin-1呈高表达,与加强内质网对错误蛋白降解,抑制细胞凋亡的发生有关^[12]。脂肪肝细胞内异常的脂肪堆积与内质网蛋白质平衡紊乱有关。为维持内质网蛋白质稳态,ERS首先导致未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),但这一反应也可激活炎症介质,甚至导致肝细胞死亡。内质网功能失调时,ERS信号通路参与NAFLD的病理生理过程^[13]。生理情况下,即使肝脏经历短暂的内质网应激,这仍会转变为慢性的过程,形成NAFLD,最终可导致更严重炎症反应和细胞死亡。有研究报道,活化PERK-eIF2 α -ATF4信号通路参与调解脂肪合成与脂肪变性。肝脏细胞高表达GADD34使eIF2 α 去磷酸化,保护小鼠不发生肥胖和NAFLD。ATF4基因缺失小鼠罹患由饮食导致的肥胖和肝脏脂肪变性的风险明显降低^[14]。CD154被认为是参与炎症反应形成肝脏脂肪变性的基因,CD154基因敲除小鼠,给予高油脂饮食后,发现其体内的脂肪酶表达升高,并伴随着p-eIF2 α 的表达降低,肝脏脂肪变性明显减轻^[15]。在ob/ob小鼠模型中PERK和IRE1 α 的表达明显高于正常对照组^[16]。在人类肝脏细胞中,CHOP调控的NF- κ B通路的激活,可导致肝脏脂肪变性发展为脂肪性肝炎^[17]。而PERK通路的激活明显上调

NF- κ B通路,导致NAFLD的发生^[18]。这些实验结果均证明ERS PERK通路的激活导致了NAFLD的形成,而本研究发现Derlin-1能够明确抑制PERK通路。

关于Derlin-1在NAFLD中的作用机制尚未有过报道。本课题通过Western bolt及免疫组织化学技术在NAFLD小鼠肝脏中检测到Derlin-1表达明显升高,这提示Derlin-1可能参与了NAFLD的发生发展。本课题组进一步开展了细胞实验,发现随着细胞外液cAMP浓度升高,Derlin-1的表达逐渐增强,而已有实验证实,在NAFLD大鼠血浆中cAMP浓度明显降低,本实验结果亦表明NAFLD小鼠血浆cAMP水平低于正常对照组,这提示在低浓度的cAMP环境下以及Derlin-1的低表达与脂肪肝发生有关。在肝脏HepG2细胞中分别转染Derlin-1和pcDNA3.1空质粒24h后,经胰酶消化进行Western blot检测,结果表明,过表达Derlin-1能够抑制参与NAFLD发生的ERS相关PERK通路,在cAMP浓度升高的状态下这种作用更明显。国内实验室已有研究报道PERK及p-PERK蛋白在胰岛素抵抗大鼠肝脏组织中表达升高^[19]。在NAFLD小鼠肝脏组织中PERK及IRE-1的表达较正常健康小鼠明显升高,运动可以通过抑制NAFLD小鼠肝脏组织中PERK及IRE-1两条ERS相关通路治疗NAFLD^[20]。本研究首次发现了Derlin-1在NAFLD中通过抑制PERK信号通路,减轻ERS,可能参与保护肝脏细胞,延缓NAFLD的发病。

综上所述,本研究发现,Derlin-1在NAFLD中的表达显著高于正常小鼠肝脏组织;在肝脏细胞中过表达Derlin-1能够抑制NAFLD发病相关的PERK-eIF2 α -ATF4通路。Derlin-1在脂肪肝的发生发展中起保护性作用,在发生脂肪肝病变时,其表达增高,保护性抑制疾病的发生发展,但是由于某种发病机

制导致这一保护性调控不能逆转所有脂肪肝的发生,进而部分病例可能继续发展为脂肪肝。这提示 Derlin-1 可能抑制 NAFLD 的发生发展。为临床发现治疗 NAFLD 相关药物作用靶点打下基础。

[参考文献]

- [1] 汪江波,袁旭,张瑞. 非酒精性脂肪肝发病机制的研究进展[J]. 现代医药卫生,2017,(15):2284-2288
- [2] WANG M, KAUFMAN R J. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease [J]. *Nature*,2016,529(7586):326-335
- [3] 徐月梅,帅玄钰,李红妍,等. 滑膜素对乳腺癌细胞迁移和增殖的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2015,35(4):496-502
- [4] PI L, ZHU G, SHE L, et al. Elevated expression of Derlin-1 associates with unfavorable survival time of squamous cell carcinoma of the head and neck and promotes its malignance[J]. *J Cancer*,2017,8(12):2336-2345
- [5] YOU H, GE Y, ZHANG J, et al. Derlin-1 promotes ubiquitylation and degradation of the epithelial Na⁺ channel, ENaC[J]. *J Cell Sci*,2017,130(6):1027-1036
- [6] KADOWAKI H, SATRIMAFITRAH P, TAKAMI Y, et al. Molecular mechanism of ER stress-induced pre-emptive quality control involving association of the translocon, Derlin-1, and HRD1[J]. *Sci Rep*,2018,8(1):7317
- [7] BAGOLA K, MEHNERT M, JAROSCH E, et al. Protein dislocation from the ER[J]. *Biochim Biophys Acta*,2011,1808(3):925-936
- [8] MERULLA J, FASANA E, SOLDÀ T, et al. Specificity and regulation of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery[J]. *Traffic*,2013,14(7):767-777
- [9] LIM J J, LEE Y, YOON S Y, et al. Structural insights into the interaction of human p97 N-terminal domain and SHP motif in Derlin-1 rhomboid pseudoprotease [J]. *FEBS Lett*,2016,590(23):4402-4413
- [10] KELLNER J, GAMARRA F, WELSCH U, et al. IL-13Ralpha2 reverses the effects of IL-13 and IL-4 on bronchial reactivity and acetylcholine-induced Ca²⁺ signaling [J]. *Int Arch Allergy Immunol*,2007,142(3):199-210
- [11] FAN J G. Epidemiology of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease in China [J]. *J Gastroenterol Hepatol*,2013,28(Suppl 1):11-17
- [12] 彭艳,胡瑞成,戴爱国,等. 烟草烟雾诱导的慢性阻塞性肺疾病大鼠模型肺组织中 Derlin-1 表达[J]. 中华结核和呼吸杂志,2013,36(6):455-457
- [13] PAGLIASSOTTI M J. Endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Annu Rev Nutr*,2012,32:17-33
- [14] SEO J, FORTUNO E S, SUH J M, et al. Atf4 regulates obesity, glucose homeostasis, and energy expenditure [J]. *Diabetes*,2009,58(11):2565-2573
- [15] VILLENEUVE J, LEPREUX S, MULOT A, et al. A protective role for CD154 in hepatic steatosis in mice [J]. *Hepatology*,2010,52(6):1968-1979
- [16] YANG L, LI P, FU S, et al. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance[J]. *Cell Metab*,2010,11(6):467-478
- [17] WILLY J A, YOUNG S K, STEVENS J L, et al. CHOP links endoplasmic reticulum stress to NF-κB activation in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Mol Biol Cell*,2015,26(12):2190-2204
- [18] DENG J, LU P D, ZHANG Y, et al. Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2 [J]. *Mol Cell Biol*,2004,24(23):10161-10168
- [19] 林志楠,罗红飞,都健,等. 胰岛素抵抗大鼠肝脏组织 PERK 和 P-PERK 的表达及意义[J]. 中国医科大学学报,2010,39(7):529-538
- [20] 陈潇迪,陈东风,王军,等. 非酒精性脂肪性肝病细胞凋亡的内质网应激启动机制[J]. 现代生物医学进展,2013,8(6):1172-1175

[收稿日期] 2019-05-17