

甲基阿魏酸通过 microRNA-378b 介导 CaMKK2-AMPK 通路改善乙醇诱导的 L02 细胞脂肪变性

黄萍¹, 陈杏¹, 蒙荣华¹, 卢君¹, 张言¹, 李丽^{3*}, 李勇文^{1,2*}

(1. 桂林医学院 药学院, 广西 桂林 541199; 2. 广西糖尿病系统医学研究中心重点实验室, 广西 桂林 541199; 3. 桂林医学院 基础医学院, 广西 桂林 541199)

[摘要] 酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD) 随着其发病率和病死率的不断上升, 已严重且广泛地影响着全世界人民的健康。甲基阿魏酸(methyl ferulic acid, MFA) 在前期已被证实可通过腺苷活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK) 信号显著抑制乙醇诱导的 L02 细胞内脂质生成, 但深层作用机制尚不清楚。该研究旨在现有基础上, 进一步阐明 MFA 可通过 microRNA-378b(miR-378b) 介导钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶 2(calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, CaMKK2)-AMPK 信号通路改善乙醇诱导的 L02 细胞脂质积累的机制。通过 100 mmol·L⁻¹ 乙醇诱导 L02 细胞 48 h 建立体外 ALD 模型, 并给予不同浓度(100、50、25 μmol·L⁻¹) 的 MFA 处理。采用电穿孔法将 miR-378b 质粒(含过表达质粒-miR-378b mimics、沉默质粒-miR-378b inhibitor 及各自的阴性对照-miR-378b NCs) 转染进 L02 肝细胞以上调或下调细胞中 miR-378b 水平。采用市售诊断试剂盒和全自动生化分析仪检测细胞中胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG) 水平。采用定量实时聚合酶链反应(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 L02 细胞中 miR-378b 的表达水平, 采用 PCR 检测 CaMKK2 mRNA 水平, 采用 Western blot 检测脂质代谢过程中参与脂质合成、分解和转运的相关因子的蛋白表达。结果显示乙醇能显著诱导细胞内 TG、TC 水平的上升, 而 MFA 则能显著降低 TG、TC 水平。乙醇使 miR-378b 的水平急剧上调, 而 MFA 有效地抑制了 miR-378b 水平。miR-378b 过表达刺激了乙醇诱导的 L02 细胞中的脂质积累, miR-378b 沉默改善了乙醇诱导的脂质沉积, 而 MFA 通过降低 miR-378b 来激活 CaMKK2-AMPK 信号通路, 调节脂质合成、分解与转运, 从而改善 L02 细胞内脂代谢紊乱。实验结果表明, MFA 通过 miR-378b 调控 CaMKK2-AMPK 通路改善 L02 细胞内脂质沉积。

[关键词] 甲基阿魏酸; miR-378b; CaMKK2; 肝脂积累; 酒精性肝病

Methyl ferulic acid ameliorates ethanol-induced L02 cell steatosis through microRNA-378b-mediated CaMKK2-AMPK pathway

HUANG Ping¹, CHEN Xing¹, MENG Rong-hua¹, LU Jun¹, ZHANG Yan¹, LI Li^{3*}, LI Yong-wen^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541199, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Diabetic Systems Medicine, Guilin 541199, China; 3. School of Basic Medicine, Guilin Medical University, Guilin 541199, China)

[Abstract] Alcoholic liver disease (ALD), with its increasing morbidity and mortality, has seriously and extensively affected the health of people worldwide. Methyl ferulic acid (MFA) has been proven to significantly inhibit alcohol-induced lipid production in L02 cells through the AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway, but its in-depth mechanism remains unclear. This study aimed to further clarify the mechanism of MFA in improving lipid accumulation in L02 cells through the microRNA-378b (miR-378b)-mediated calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2)-AMPK signaling pathway based on existing researches. L02 cells were induced by 100 mmol·L⁻¹ ethanol for 48 h to establish the model of ALD *in vitro*, and 100, 50, and 25 μmol·L⁻¹ concentration

[收稿日期] 2022-07-12

[基金项目] 广西壮族自治区重点研究课题(2018GXNSFDA281012); 国家自然科学基金项目(82060673)

[通信作者] * 李丽, 研究员, 研究方向为肝脏药理学, E-mail: 112005025@glmc.edu.cn; * 李勇文, 教授, 研究方向为抗炎免疫药理学, E-mail: liyongwen99@163.com

[作者简介] 黄萍, 研究方向为抗炎免疫药理学, E-mail: 1570826370@qq.com

of MFA was treated. MiR-378b plasmids (containing the overexpression plasmid-miR-378b mimics, silence plasmid-miR-378b inhibitor, and their respective negative control-miR-378b NCs) were transfected into L02 cells by electroporation to up-regulate or down-regulate the levels of miR-378b in L02 cells. The levels of total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) in cells were detected by commercial diagnostic kits and automatic biochemical analyzers. The expression levels of miR-378b in L02 cells were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). CaMKK2 mRNA levels were detected by PCR, and protein expressions of related factors involved in lipid synthesis, decomposition, and transport in lipid metabolism were detected by Western blot. The results displayed that ethanol significantly increased TG and TC levels in L02 cells, while MFA decreased TG and TC levels. Ethanol up-regulated the miR-378b level, while MFA effectively inhibited the miR-378b level. The overexpression of miR-378b led to lipid accumulation in ethanol-induced L02 cells, while the silence of miR-378b improved the lipid deposition induced by ethanol. MFA activated the CaMKK2-AMPK signaling pathway by lowering miR-378b, thus improving lipid synthesis, decomposition, and transport, which improved lipid deposition in L02 cells. This study shows that MFA improves lipid deposition in L02 cells by regulating the CaMKK2-AMPK pathway through miR-378b.

[Key words] methyl ferulic acid; miR-378b; CaMKK2; hepatic lipid accumulation; alcoholic liver disease

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20220905.702

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)包括酒精性肝脏脂肪变性、肝炎、肝硬化,甚至是肝癌^[1]。在缺乏药物或其他治疗的情况下,ALD可能从肝脏脂肪变性开始,并逐渐发展为更严重的疾病形式,最终导致肝癌^[2]。蝉翼藤为广西民族特色中草药,有较强的抗菌消炎、抗癌、增强免疫等疗效^[3-5],而甲基阿魏酸(methyl ferulic acid, MFA)是从蝉翼藤中提取的一种有机酸^[6]。前期研究发现MFA对乙醇诱导的内源性脂质生成有良好的抑制作用。25~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MFA可以激活L02细胞中腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)信号,减少脂质积累^[7],但是其对AMPK的激活的过程及调节的方式还不清楚。

AMPK是生物能量代谢中的关键调节分子,参与多种代谢过程^[8]。而钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶2(calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, CaMKK2)作为AMPK的直接上游激酶^[9],广泛参与脂质代谢^[10]。更重要的是,一项研究证实,乙醇对CaMKK2有显著的抑制作用,导致肝细胞凋亡^[11]。综上所述,考虑到乙醇对CaMKK2的抑制作用、CaMKK2对AMPK的调节作用以及已证实的CaMKK2在肝脏脂质代谢中的作用, CaMKK2被认为是进一步探索MFA如何激活受乙醇抑制的AMPK信号通路的新切入点。microRNA-378b(miR-378b),一种调节脂质代谢和全身能量平衡的miRNA^[12-14],在L02细胞被乙醇诱导而呈现高表达^[15]。此外,近期的一项研究报道称,miR-378b通过负向调节CaMKK2并抑制AMPK级联反应,加

剧了乙醇诱导的L02细胞内脂质累积^[16]。这些发现表明miR-378b靶向CaMKK2极有可能参与了MFA调控AMPK信号改善L02细胞脂质代谢的过程。

本研究同样采用乙醇诱导L02细胞建立体外ALD模型,探究MFA改善L02细胞脂质代谢是否与miR-378b靶向的CaMKK2-AMPK信号通路有关,并阐明miR-378b-CaMKK2信号在MFA改善L02肝细胞脂质沉积中的作用。

1 材料

1.1 细胞株 L02肝细胞株购于北京北纳创联生物技术有限公司,采用DMEM完全培养基(含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素),在37℃、5% CO₂的培养箱中培养。

1.2 仪器及试剂 CO₂培养箱(Thermo公司,型号311),多功能酶标仪(Bio-Rad公司,型号ELX-800),垂直电泳仪(Bio-Rad公司,型号Mini PRO-TEAN)。

MFA(Sigma公司,批号101236152);胎牛血清(Thermo公司,批号10270106);总RNA提取试剂盒(北京天根生物科技有限公司,批号DP412);cDNA合成试剂盒(北京天根生物科技有限公司,批号KR103);DMEM培养基(Hyclone公司,批号AE29422280);二甲基亚砜(DMSO, Solarbio公司,批号D8371);RIPA细胞裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,批号P0013B);Western blot一抗稀释液(上海碧云天生物技术有限公司,批号P0023A);BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号P0012S);胆固醇、甘油三酯测定试剂

盒(南京建成生物科技有限公司,批号 A111-1-1、A110-1-1); β -actin(批号 AF7018)、p-CaMKK2(批号 AF4487)、CaMKK2(批号 DF4793)、AMPK(批号 AF6423)、p-AMPK(批号 AF3423)、乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-coA carboxylase,ACC,批号 AF6421)、p-ACC(批号 AF3421)、过氧化物酶体增殖物激活受体- α (peroxisome proliferator-activated receptor- α ,PPAR α ,批号 AF5301)、微粒体甘油三酯转移蛋白(microsomal triglyceride transfer protein,MTTP,批号 DF6591)、甾醇调节元件结合蛋白-1c(sterol regulatory element-binding protein-1c,SREBP-1c,批号 AF6283)、肉碱棕榈酰转移酶 1(carnitine palmitoyl transferase 1,CPT1,批号 DF12004)、叉头框蛋白 O1(forkhead box O1,FoxO1,批号 AF6416)、p-FoxO1(批号 AF3416)、goat anti-rabbit IgG-HRP(批号 S0001)、goat anti-mouse IgG-HRP(批号 S0002)均购自 Affinity Biosciences 公司;miR-378b mimics、inhibitor 及各自的阴性对照质粒(miR-378b NCs)购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司。PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成,序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
CaMKK2	F: CATGAACGGACGCTGCATCT
	R: ACAGTCCTGCATACCCGTGAT
miR-378b	F: ACACTCCAGCTGGGAGTGGAGTGGAGTCA
	R: CTCAACTGGTCTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCCTTCTGA
β -actin	F: TGGCTTCATAGGTGACTTCCA
	R: ACGGTTGGCCTTAGGGTTCA
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACA
	R: AACGCTTCACGAATTTGCGT

2 方法

2.1 MFA 溶液制备 精确称取 MFA 0.4 g,用 1 mL DMSO 将其溶解,待完全溶解后,以 2 μ m 的微孔滤膜进行过滤,得到 2 mol $\cdot$ L⁻¹ MFA 母液,临用时稀释至所需浓度。

2.2 L02 细胞的 ALD 模型的建立与 MFA 给药 将 L02 细胞以 1 $\times$ 10⁵ 个/mL 接种 10 mL 于 10 cm 大皿,待细胞密度达到 50%~60%时,更换无血清培养

基进行饥饿处理 12 h,分别设置空白对照组、模型组、MFA 高浓度(100 μ mol $\cdot$ L⁻¹)组、MFA 中浓度(50 μ mol $\cdot$ L⁻¹)组、MFA 低浓度(25 μ mol $\cdot$ L⁻¹)组。饥饿处理结束后,所有组都更换新鲜的完全培养基。除此之外,模型组及 MFA 处理组都添加 100 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的乙醇,且 MFA 处理组额外添加相应浓度(100,50,25 μ mol $\cdot$ L⁻¹)的 MFA,将培养皿轻微晃动使培养基中成分混合均匀。置于培养箱中继续培养 48 h,且每隔 12 h 更换 1 次培养基。

2.3 细胞转染与培养 收集处于对数生长期的 L02 细胞,用胰酶消化并计数,以 1 $\times$ 10⁷ 个/mL 浓度的细胞悬液加入 1.5 mL EP 管中,每一管 0.3 mL。按以下分组进行标记:miR-378b mimics NC 组、miR-378b mimics 组、miR-378b mimics + MFA 组、miR-378b inhibitor NC 组、miR-378b inhibitor 组、miR-378b inhibitor+MFA 组。按照分组加入对应的 20 μ g 质粒(miR-378b mimic、inhibitor 的质粒或相应的阴性对照)与培养基轻柔混匀,将细胞-质粒混合液转入电转杯中,使用电穿孔仪进行转染。结束后将电转杯置于培养箱孵育 10 min 后以含 15% 血清的培养基接种于 10 cm 培养皿培养 12 h,待细胞贴壁后所有组都给予 100 mmol $\cdot$ L⁻¹ 乙醇,另 MFA 组额外给予 50 μ mol $\cdot$ L⁻¹ MFA 培养 48 h,每隔 12 h 更换 1 次培养基。

2.4 细胞内 TG、TC 水平的测定 收集不同条件下处理下的 L02 细胞,加入细胞裂解液振荡,冰上放置 30 min,待细胞充分裂解后,于 4 $^{\circ}$ C 离心机以 14 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min 取上清液。以 BCA 法检测蛋白含量,以试剂盒分别检测细胞内 TG、TC 的含量。

2.5 蛋白质印迹分析 细胞培养 48 h 后,以 RIPA 裂解液提取总蛋白,以 BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白提取液加入 5 $\times$ buffer 煮沸 5 min 后取一定上样量(20 μ g)进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,后转膜 2 h、封闭 1 h、分别与特异性一抗和二抗孵育,取条带加 ECL 发光液进行显影,并用 ImageJ 软件分析目的蛋白灰度值。

2.6 RNA 提取及分析 L02 细胞经分组培养后,以 TRIzol 试剂按试剂盒说明提取总 RNA,于酶标仪检测 A₂₆₀/A₂₈₀ 测定 RNA 浓度及纯度,再通过试剂盒进行逆转录。根据引物序列在 PCR 扩增系统上反应,后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳或 qRT-PCR 进行定

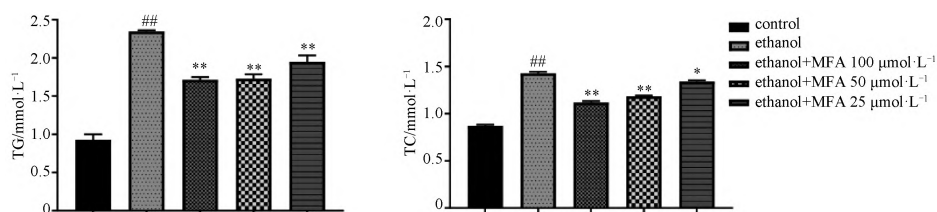
性或定量检测。

2.7 统计学分析 所有数据均代表至少 3 次重复实验,并以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。通过方差分析(ANOVA)和 t 检验来评估均值之间的差异。使用 GraphPad Prism 6.0 进行数据分析和图形准备。

3 结果

3.1 MFA 对乙醇诱导的 L02 细胞脂质水平的影响

将 L02 细胞置于 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙醇中孵育 48 h 构建 ALD 体外模型,再给予不同浓度的 MFA 处理,检测细胞内 TG 和 TC 水平。结果表明,乙醇显著促使 TG、TC 累积,而 MFA 显著降低 TG、TC 累积,见图 1。



MFA, 甲基阿魏酸(图 2~6 同); control, 空白对照组; ethanol, 模型组; ethanol+MFA $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, MFA 高浓度($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组; ethanol+MFA $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, MFA 中浓度($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组; ethanol+MFA $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, MFA 低浓度($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组; 与空白对照组相比^{##} $P < 0.01$; 与模型组相比^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ (图 2 同)。

图 1 MFA 对于乙醇摄入后 L02 细胞内 TG、TC 的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig.1 Effects of MFA on TG and TC levels in alcohol-intoxicated L02 cells($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2 MFA 对乙醇诱导的 L02 细胞 miR-378b-CAMKK2 信号的影响

乙醇作用 48 h 可明显增加细胞 miR-378b 的表达。而 MFA ($25 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在一定程度上均可有效抑制受乙醇诱导而上调的 miR-378b 水平,其中 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MFA 的抑制效果较为明显。另外,乙醇明显降低了 CaMKK2 mRNA

和蛋白表达,还抑制了 CaMKK2 蛋白磷酸化水平,但对于 p-CaMKK2/CaMKK2 蛋白的比例无明显影响。MFA 在一定程度上使受乙醇抑制的 CaMKK2 水平得到了恢复,且 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MFA 对于 miR-378b 的抑制及对 CaMKK2 信号的激活作用较显著,见图 2。

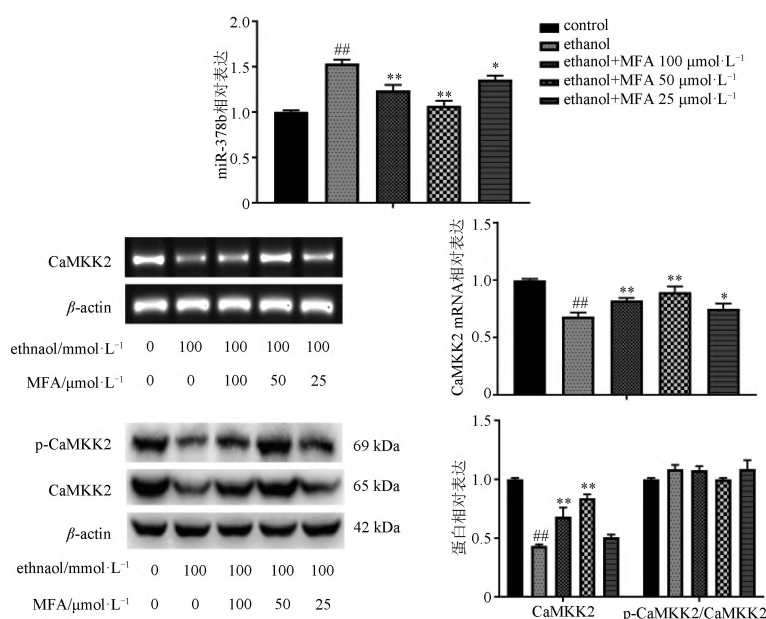
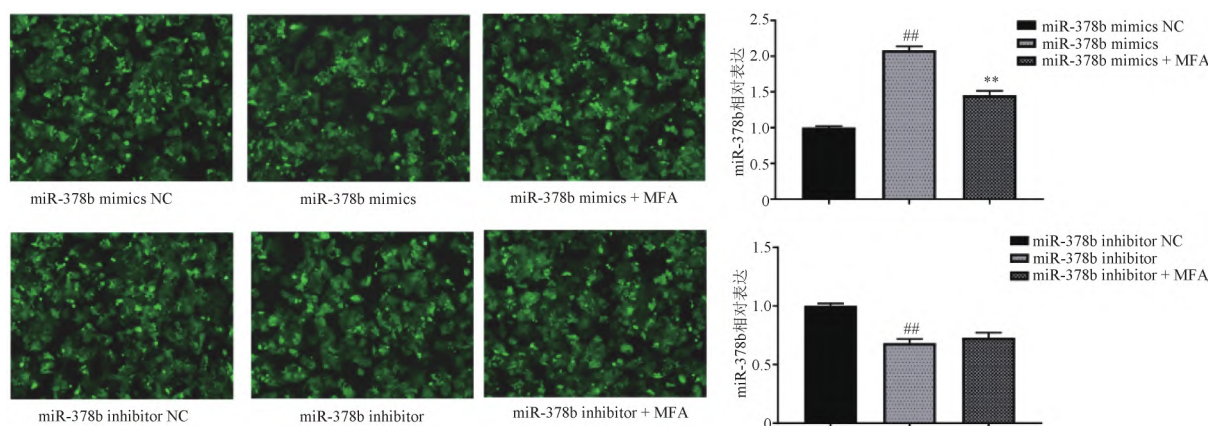


图 2 MFA 对乙醇诱导的 L02 细胞中 miR-378b-CaMKK2 信号的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig.2 Effects of MFA on miR-378b-CaMKK2 signal in ethanol-induced L02 cells($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.3 miR-378b 的转染效率 将 miR-378b mimics、inhibitor 包括各自的 NCs 质粒转染到 L02 细胞中。按分组培养 48 h 后,在荧光显微镜下观察绿色荧光标记细胞,结合 qPCR 检测 miR-378b 的表达,评价

转染效率。含有绿色荧光的细胞占 80% 以上,与各自的 NCs 组相比,miR-378b mimics 和 inhibitor 转染后,miR-378b 表达分别显著上调和下调,表明转染成功,见图 3。



与 miR-378b NC 组相比^{##} $P < 0.01$; 与 miR-378b mimic 或 miR-378b inhibitor 组相比^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ (图 4~6 同)。

图 3 绿色荧光观察及 miR-378b 水平检测($\times 4$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig.3 Observation of green fluorescence and detection of miR-378b levels ($\times 4$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.4 MFA 对转染 miR-378b 的 L02 细胞脂质水平的影响 与各自的阴性对照组相比,miR-378b mimics 组的 TC 和 TG 水平显著升高,经 MFA 干预后则

明显降低。miR-378b 沉默会使得细胞内 TG 及 TC 水平下降,而在继续的 MFA 治疗后,TC 水平轻微降低,见图 4。

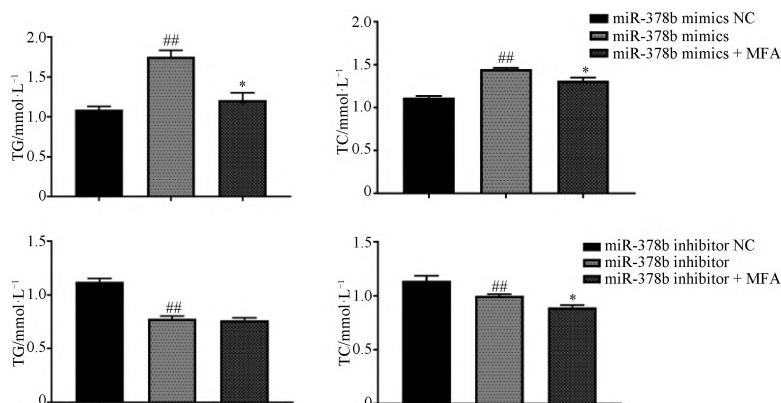


图 4 MFA 对转染 miR-378b 质粒后的 L02 细胞 TG、TC 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig.4 Effects of MFA on TG and TC levels of L02 cells after transfection with miR-378b plasmid($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.5 MFA 对转染 miR-378b 的 L02 细胞中 CaMKK2-AMPK 信号的影响 MFA 可以部分恢复因 miR-378b 过表达引起的 CaMKK2 mRNA 水平的下调,但对于 miR-378b 沉默后的 CaMKK2 mRNA 水平无明显影响。Western blot 结果显示,miR-378b 上调

使得 CaMKK2 总蛋白水平及其磷酸化水平降低,抑制了 AMPK 和 ACC 的活性,而这种抑制作用在 MFA 处理后有所改善。而 miR-378b 沉默导致 CaMKK2 蛋白高表达,AMPK 和 ACC 磷酸化水平升高,但在继续给予 MFA 后这些水平基本没有变化,见图 5。

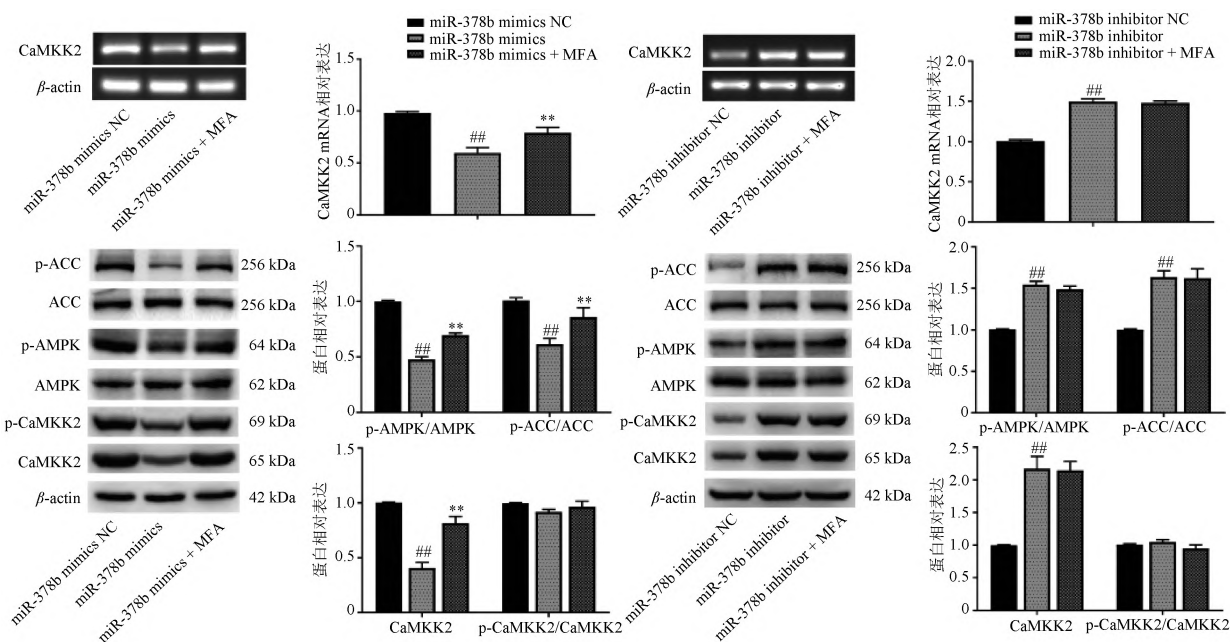


图 5 MFA 对转染 miR-378b 质粒后的 L02 细胞中 CaMKK2-AMPK 信号的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.5 Effect of MFA on CaMKK2-AMPK signaling in miR-378b plasmid-transfected L02 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.6 MFA 对转染 miR-378b 的 L02 细胞中脂质合成、氧化分解、转运的影响 miR-378b 过表达使得脂质合成相关因子 FASN 和 SREBP-1c 蛋白水平升高,显著降低脂质分解相关因子 PPAR α 和 CPT1 蛋白表达,使脂质转运相关因子 MTTP 蛋白水平下降,同时还促进 FoxO1 的低磷酸化。而 miR-378b 沉默则表现出相反的作用,使得 FASN 和 SREBP-1c 的蛋白水平升高,而 PPAR α 和 CPT1、MTTP 以及 p-FoxO1 蛋白水平急剧下降。除此之外,通过在转染 miR-378b mimic 或 inhibitor 的基础上使用 MFA,发现 MFA 可以改善因 miR-378b 过表达引起的上述因子的异常变化,但对 miR-378b 沉默后的上述因子的蛋白水平,除 FASN 和 CPT1 外,无明显影响,见图 6。

4 讨论

众所周知,过度饮酒会导致酒精性脂肪性肝病、肝炎、肝硬化甚至肝癌^[17]。既往研究表明,MFA 通过激活 AMPK 和 FoxO1 通路,对乙醇诱导的肝脏内源性脂质生成有明显的抑制作用,但其更深层次的分子机制尚未阐明^[7]。CaMKK2 作为 AMPK 的上游激酶,直接调控 AMPK 的表达。CaMKK2 在脂质代谢中的作用似乎在不同的疾病中有所不同。在原代肝细胞中敲除 CaMKK2 会抑制 AMPK 的活性,并

显示出脂肪从头生成的明显增加^[18]。然而,系统性抑制 CaMKK2 已被证明可以改善高脂饮食引起的脂质紊乱^[19]。这可能是由于 CaMKK2 在不同组织中的分布和不同的饲料成分造成的。例如,在低脂饮食的小鼠中,CaMKK2 突变导致脂质积累增加,而在高脂饮食的小鼠中,CaMKK2 突变使得肝脏脂肪变性减少^[20]。为了阐明乙醇饮食对 CaMKK2 的影响以及 CaMKK2 是否与 MFA 对肝脏的保护作用有关,构建了 ALD 细胞模型,并检测了 CaMKK2 在肝细胞中的表达。在本研究中,乙醇诱导 L02 细胞脂质沉积,伴随着 CaMKK2 蛋白和 mRNA 水平下降,而 MFA 呈现与乙醇相反的作用。此外,发现氧化应激也诱导了 CaMKK2 的抑制^[21],提示乙醇产生的 ROS 可能是 CaMKK2 下调的多重原因之一。在本研究中,MFA 显著改善脂质积累,减轻了乙醇对 CaMKK2 的抑制。因此 MFA 可能通过激活 AMPK 的上游因子 CaMKK2 来调节脂质代谢,并提出 CaMKK2 可能参与了乙醇诱导的肝脏脂肪变性,这为 ALD 的防治提供了方向。

miRNA 作为重要的转录调控因子,已被证实参与脂质代谢的多种生物学过程。miRNA-16-5p 在 3T3-L1 前脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化过程中显著上调,miRNA-16-5p 过表达导致体内外成熟脂肪

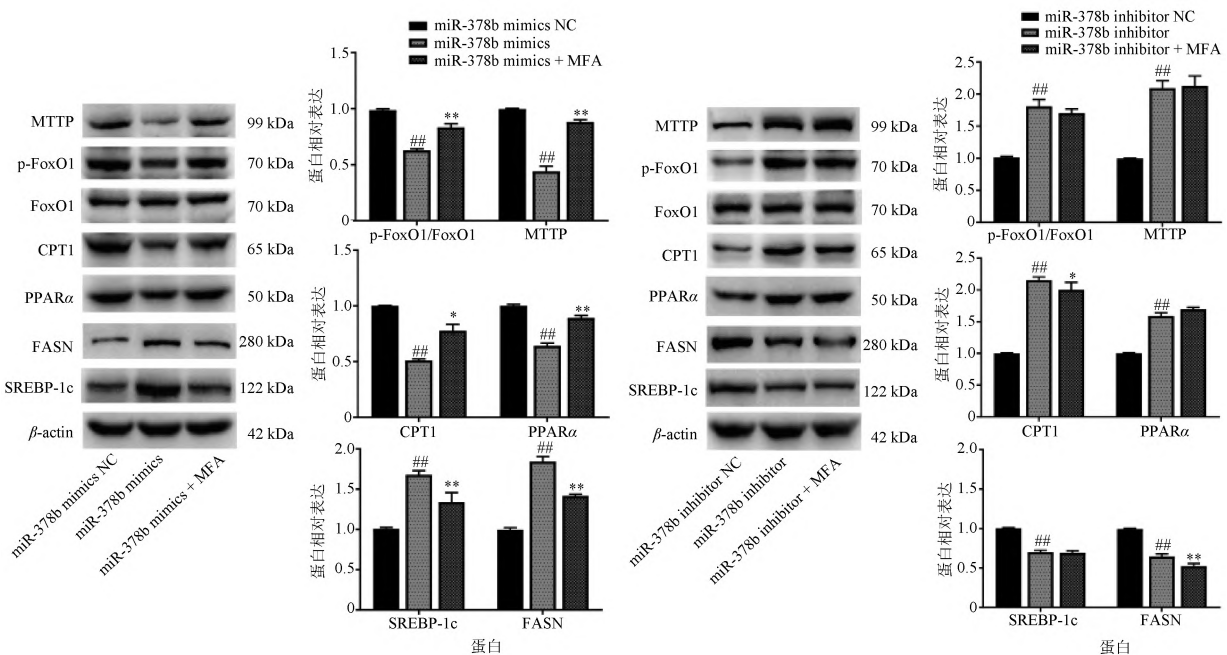

 图 6 MiR-378b 介导 MFA 对 L02 细胞脂质合成、分解及转运过程的调控 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

 Fig.6 Regulation of miR-378b-mediated MFA on lipid synthesis, decomposition, and transport in L02 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞特异性基因表达和脂肪滴积累^[22]。另一项结果表明, miR-130b 通过刺激 MTTP 表达和 TG 动员, 在促进极低密度脂蛋白(VLDL) 的组装和甘油代谢标记甘油三酯的分泌方面具有潜在的作用^[23]。值得注意的是, 最近的一项研究声称, miR-378b 在肝脏中被乙醇上调, 并通过靶向 p110 和胰岛素受体参与乙醇诱导的肝脏胰岛素抵抗^[15]。随后, 通过 Star-Base 数据库的生物信息学靶点预测, 发现 miR-378b 与脂质代谢信号通路中的几个因子如 CaMKK2、PPAR α 和 FoxO1 有多个潜在的结合位点, 标志着 miR-378b 在脂质代谢中的重要性。此外, 一些研究阐明, HCC 细胞和肝纤维化小鼠的 miR-378b 水平下调^[24-25]。然而, 在缺乏无氧运动的肥胖小鼠中, miR-378b 的上调已被报道^[26]。在本研究中, 结果表明, 乙醇诱导肝脏脂肪紊乱, 但确实升高了 miR-378b, 这与之前报道的结果一致。miR-378b 在不同肝脏疾病中表现不同, 或许与生活方式干预相关的因素, 如喂养时间、饮食组成、运动方式、肝脏损伤程度等有关。同时, miRNA 对疾病的调控是一个复杂的系统, miRNA 不仅独立发挥调控作用, 还与其他因素重叠相互作用。接下来, 为了研究 MFA 对乙醇刺激的脂质紊乱的改善是否与 miR-378b 有关, 构建

L02 细胞的 ALD 模型并结合 MFA 处理, 检测 miR-378b 的水平。结果显示, 乙醇可诱导 L02 细胞 miR-378b 的表达增加, 引发脂质沉积, 而 MFA 可减轻乙醇诱导的脂质紊乱, 降低 miR-378b 的表达。总的来说, MFA 对 miR-378b 的调控以及 miR-378b 与脂质水平的相关性提示 MFA 对乙醇诱导的肝脏脂肪沉积的改善作用可能与 miR-378b 有关。

大量研究表明, 乙醇参与多种肝脏脂质代谢途径, 包括脂质摄取、脂肪生成、分解和转运^[27]。在乙醇喂养的啮齿动物中, 乙醇抑制 AMPK 活性, 但通过激活一系列脂质合成相关因子(如 ACC、FASN、SREBP-1c 和 ChREBP) 增加肝细胞脂质积累^[28]。同时, 乙醇通过抑制 PPAR α 和 CPT1 的活性, 破坏线粒体 β -氧化, 从而破坏脂肪酸分解代谢^[29]。此外, 有报道称乙醇通过促使 FoxO1 的低磷酸化和对 MTTP 水平的抑制, 阻碍肝脏肝外脂质的分泌, 从而促进肝脏脂肪的积累^[30-31]。在发现 miR-378b 和 CaMKK2 可能与 MFA 的减脂作用有关的基础上, 进一步研究了 miR-378b 在 MFA 改善这些多种脂质代谢过程中的作用。更具体地说, 通过质粒转染的方式在细胞中上调或下调 miR-378b, 并结合 MFA 的干预, 检测 CaMKK2 信号和下游的脂质合成、分解

和转运信号。实验结果中,miR-378b 负向调控 CaMKK2 和 AMPK-ACC 信号通路。miR-378b 正向调控 FASN、SREBP-1c,反向调控 CPT1、PPAR α 、MTTP 和 p-FoxO1。MFA 不仅能减轻乙醇诱导上调的 miR-378b,改善肝脏脂肪变性,还能抑制 miR-378b 过表达引起的脂质代谢紊乱。同时,抑制 miR-378b 可减少脂肪沉积,消除 MFA 对脂质沉积的改善作用。总之,miR-378b 介导了 MFA 对乙醇诱导的肝细胞脂质损伤的保护作用。MiR-378b 和 MFA 在脂质合成、分解和转运中具有如此多的调控功能,表明其在 ALD 的机制研究和药物开发中极具潜力。此外,值得一提的是,多项研究表明,MTTP 激活剂虽然降低了肝脏脂质,但却极易造成脂质在血浆中同步积累,导致了另一个问题^[32]。而本研究表明,MFA 可升高肝脏中用于脂肪酸转运的 MTTP 水平,同时还能降低血脂水平。因此,在不引起血脂紊乱的前提下,MFA 作为一种降低肝脏脂肪变性的药物具有很大的开发潜力。

在本研究中,乙醇上调 miR-378b 的表达,抑制 CaMKK2,刺激肝细胞脂肪沉积,而 MFA 对脂肪沉积的改善伴随着 miR-378b 表达的抑制和 CaMKK2 的升高。此外,miR-378b 过表达引起肝脂紊乱,与 MFA 表现出相反的作用。然而,miR-378b 敲除可改善脂质累积,且 miR-378b 敲除可显著消除 MFA 对脂质代谢的有益作用。综上所述,MFA 通过抑制 miR-378b 激活 CaMKK2-AMPK 通路,减少脂质生成,促进脂质分解和转运,最终改善 L02 细胞脂肪变性。通过本研究,明确了 MFA 在 ALD 的预防和治疗方面有很大的研究价值,而 miR-378b 则是一个潜在的治疗靶点。但本研究也存在一些不足或局限性,仍需要进一步完善。一方面,本研究缺乏对 miR-378b 与其他脂代谢因子如 PPAR α 、FoxO1 之间靶向关系的挖掘。另一方面,MFA 和 miR-378b 对脂质代谢的调控目前仅限于体外实验,尚未在其他动物实验及人体组织中得到验证。因此,在可能的情况下,将进一步挖掘 miR-378b 与 PPAR α 、FoxO1 的相互作用,构建 miRNA-mRNA 通路的网络,并在多种动物模型甚至临床标本中检测 miR-378b、CaMKK2 及 AMPK 级联成员的表达,这对于深层次的研究将是有益的。

本研究表明,MFA 通过下调 miR-378b 来改善乙醇诱导的肝细胞脂质沉积。挖掘 MFA 对乙醇诱

导的肝脂肪变性的保护作用及机制,可能为 ALD 的研究和药物治疗开辟新方向、提供新靶点。

[参考文献]

- [1] FUSTER D, SAMET J H. Alcohol use in patients with chronic liver disease[J]. N Engl J Med, 2018, 379(13): 1251.
- [2] BAGHY K, IOZZO R V, KOVALSZKY I. Decorin-TGF- β axis in hepatic fibrosis and cirrhosis[J]. J Histochem Cytochem, 2012, 60(4): 262.
- [3] TAO M Q, JI C L, WU Y J, et al. 1,7-dihydroxy-3,4-dimethoxyxanthone inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 macrophages by suppressing TLR4/NF- κ B signaling cascades[J]. Inflammation, 2020, 43(5): 1821.
- [4] ZUO J, DOU D Y, WANG H F, et al. Reactive oxygen species mediated NF- κ B/p38 feedback loop implicated in proliferation inhibition of HFLS-RA cells induced by 1,7-dihydroxy-3,4-dimethoxyxanthone[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 94: 1002.
- [5] WANG D D, LI Y, WU Y J, et al. Xanthones from *Securidaca inappendiculata* antagonized the antirheumatic effects of methotrexate *in vivo* by promoting its secretion into urine[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2021, 17(2): 241.
- [6] LIAO R, QI Z, TANG R, et al. Methyl ferulic acid attenuates human cardiac fibroblasts differentiation and myocardial fibrosis by suppressing PRB-E2F1/CCNE2 and EHOA/ROCK2 pathway[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 714390.
- [7] CHENG Q, LI Y W, YANG C F, et al. Methyl ferulic acid attenuates ethanol-induced hepatic steatosis by regulating AMPK and FoxO1 pathways in rats and L02 cells[J]. Chem Biol Interact, 2018, 291: 180.
- [8] PUROHIT V, GAO B, SONG B J. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2009, 33(2): 191.
- [9] RACIOPPI L, MEANS A R. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology[J]. J Biol Chem, 2012, 287(38): 31658.
- [10] MARCELO K L, MEANS A R, YORK B. The Ca²⁺/calmodulin/CaMKK2 axis: nature's metabolic camshaft[J]. Trends Endocrinol Metab, 2016, 27(10): 706.
- [11] LEE Y J, SHU M S, KIM J Y, et al. Cilostazol protects hepatocytes against alcohol-induced apoptosis via activation of AMPK pathway[J]. PLoS ONE, 2019, 14(1): e0211415.
- [12] LYU Q R, HUANG N, DONG K, et al. The miR-378/PGC1 β /mTOR axis as an alternative mechanism to promote autophagy during adipogenesis[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2021, 1866(6): 158921.
- [13] SUN C, LIU W, LU Z, et al. Hepatic miR-378 modulates serum cholesterol levels by regulating hepatic bile acid synthesis[J]. Theranostics, 2021, 11(9): 4363.
- [14] NAN K, ZHANG Y, ZHANG X, et al. Exosomes from miRNA-378-modified adipose-derived stem cells prevent glucocorticoid-

- induced osteonecrosis of the femoral head by enhancing angiogenesis and osteogenesis via targeting miR-378 negatively regulated suppressor of fused (sufu) [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 331.
- [15] LI Y Y, ZHONG Y J, CHENG Q, et al. MiR-378b regulates insulin sensitivity by targeting insulin receptor and p110 α in alcohol-induced hepatic steatosis [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 717.
- [16] WANG Y Z, LU J, LI Y Y, et al. MicroRNA-378b regulates ethanol-induced hepatic steatosis by targeting CaMKK2 to mediate lipid metabolism [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 12659.
- [17] GAO B, BATALLER R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1572.
- [18] JADEJA R N, CHU X, WOOD C, et al. M3 muscarinic receptor activation reduces hepatocyte lipid accumulation via CaMKK β /AMPK pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 169: 113613.
- [19] YORK B, LI F, LIN F, et al. Pharmacological inhibition of CaMKK2 with the selective antagonist STO-609 regresses NAFLD [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 11793.
- [20] MARCELO K L, RIBAR T, MEANS C R, et al. Research resource: roles for calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2 (CaMKK2) in systems metabolism [J]. *Mol Endocrinol*, 2016, 30(5): 557.
- [21] PARK S M, KIM S W, JUNG E H, et al. Sipjeondaabo-tang alleviates oxidative stress-mediated liver injury through activation of the CaMKK2-AMPK signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 8609285.
- [22] XU J, ZHANG L, SHU G, et al. MicroRNA-16-5p promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through regulating EPT1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 514(4): 1251.
- [23] ZHANG J, JAZII F R, HAGHIGHI M M, et al. MiR-130b is a potent stimulator of hepatic very-low-density lipoprotein assembly and secretion via marked induction of microsomal triglyceride transfer protein [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2020, 318(2): E262.
- [24] HYUN J, WANG S, KIM J, et al. MicroRNA-378 limits activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis by suppressing GLI3 expression [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10993.
- [25] CHEN Q, GUO H, ZONG Y, et al. Curcumin restrains hepatocellular carcinoma progression depending on the regulation of the circ_0078710/miR-378b/PRIM2 axis [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2022, 42(3): 313.
- [26] LU Y L, JING W, FENG L S, et al. Effects of hypoxic exercise training on microRNA expression and lipid metabolism in obese rat livers [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2014, 15(9): 820.
- [27] SOZIO M S, LIANGPUNSAKUL S, CRABB D. The role of lipid metabolism in the pathogenesis of alcoholic and nonalcoholic hepatic steatosis [J]. *Semin Liver Dis*, 2010, 30(4): 378.
- [28] SHEARN C T, SMATHERS R L, JIANG H, et al. Increased dietary fat contributes to dysregulation of the LKB1/AMPK pathway and increased damage in a mouse model of early-stage ethanol-mediated steatosis [J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24(8): 1436.
- [29] CORRENTI J M, GOTTSHALL L, LIN A, et al. Ethanol and C2 ceramide activate fatty acid oxidation in human hepatoma cells [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12923.
- [30] LIEBER C S, LEO M A, WANG X, et al. Alcohol alters hepatic FoxO1, p53, and mitochondrial SIRT5 deacetylation function [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373(2): 246.
- [31] WANG Z, YAO T, SONG Z. Chronic alcohol consumption disrupted cholesterol homeostasis in rats: down-regulation of low-density lipoprotein receptor and enhancement of cholesterol biosynthesis pathway in the liver [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2010, 34(3): 471.
- [32] PEREIRA I V, STEFANO J T, OLIVEIRA C P. Microsomal triglyceride transfer protein and nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 5(2): 245.

[责任编辑 陈玲]