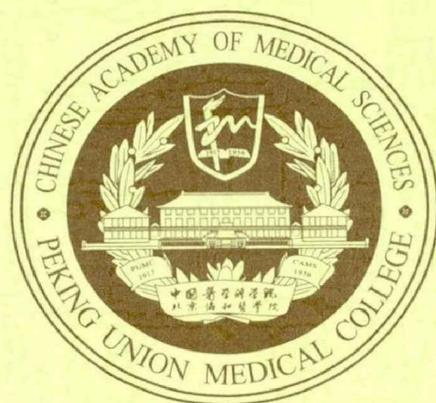


北京協和醫學院  
中國醫學科學院

# 碩士研究生學位論文



北京協和醫學院研究生院

学校代码: 10023  
学 号: S2019009045

## 硕 士 学 位 论 文

# 5'-肌苷酸 (IMP) 诱导非酒精性脂肪肝病发生 和演化的分子机制研究

所 院: 北京协和医学院 药用植物研究所  
姓 名: 刘金艳  
指导教师: 谢勇 研究员  
导师小组: 谢勇 研究员, 张彬 副研究员  
学科专业: 药学 (专业型)  
研究方向: 分子药理学  
完成日期: 2022 年 5 月

## 独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。论文中除了特别加以标注和致谢的地方外，不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：刘金艳 签字日期： 2022 年 6 月 10 日

## 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 北京协和医学院 有关保存、使用学位论文的管理办法。有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 北京协和医学院 可以将学位论文的全部或部分内 容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名：刘金艳

导师签名：谢勇

签字日期：2022 年 6 月 10 日

签字日期：2022 年 6 月 10 日

学位论文作者毕业后去向：

工作单位：

电话：

通讯地址：

邮编：

## 缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
ACC	Acetyl-CoA Carboxylase	乙酰辅酶 A 羧化酶
ACTIN	$\beta$ -actin	肌动蛋白
ACN	Acetonitrile	乙腈
ALP	Alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
ALT	Alanine amino transferase	谷氨酸-丙酮酸转氨酶
AMP	Adenosine monophosphate	单磷酸腺苷
AMPK	AMP-Activated Protein Kinase	单磷酸腺苷活化蛋白激酶
AST	Aspartate amino transferase	天冬氨酸氨基转移酶
ATP	Adenosine triphosphate	三磷酸腺苷
BP	Biological Process	生物过程
CC	Cellular Component	细胞组分
DTT	DL-Dithiothreitol	二硫苏糖醇
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
FA	Formic acid	甲酸
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
GO	Gene ontology	基因本体论
GTP	Guanosine triphosphate	三磷酸鸟苷
HDL	High density lipoprotein cholesterol	高密度脂蛋白
IAM	Iodoacetamide	碘乙酰胺

## 缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
IMP	Inosine 5'-mono-phosphate	5'-肌苷酸
LDL	Low density lipoprotein	低密度脂蛋白
MF	Molecular Function	分子功能
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	京都基因和基因组百科全书
NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease	非酒精性脂肪肝
NASH	Nonalcoholic steatosis hepatitis	非酒精性脂肪肝炎
NAFLD-LC	Nonalcoholic fatty liver disease-Liver Cirrhosis	非酒精性脂肪性肝硬化
PMSF	Phenylmethyl sulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
S-AMP	Adenylosuccinic acid	腺苷酸基琥珀酸
TC	Total cholesterol	总胆固醇
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
TG	Triglyceride	甘油三酯
TMT	Tandem mass tags for relative and absolute quantitation	串联质量标签定量

## 计量单位表

英文缩写	英文全称	中文全称
A	Absorbance	吸光度
mol/L	Mole per liter	摩尔/升
mmol/L	Millimole per liter	毫摩尔/升
$\mu\text{mol/L}$	Micromole per liter	微摩尔/升
L	Liter	升
mL	Milliliter	毫升
$\mu\text{L}$	Microliter	微升
rpm	Revolutions per minute	转/分
min	Minute	分钟
s	Second	秒钟
g	Gram	克
mg	Milligram	毫克
kg	Kilogram	千克
h	Hour	小时

## 目录

摘要	1
Abstract	错误! 未定义书签。
前言	8
第一章 IMP 诱导正常小鼠发生 NAFLD 的活性研究	11
引言	11
第一节 探究 IMP 给药对正常小鼠体重和体脂率的影响	122
1 实验材料与设备	122
2 实验方法	122
3 结果	133
第二节 IMP 给药结束后样品的采集及相关生理学指标分析	155
1 实验材料与设备	155
2 实验方法	166
3 结果	177
第三节 彗星电泳检测小鼠肝脏 DNA 损伤情况	22
1 试验材料与设备	22
2 实验方法	222
3 结果	23
讨论	245
第二章 IMP 引起 <i>db/db</i> 小鼠和正常小鼠肝脏脂质蓄积的机制研究	255
引言	255
第一节 通过 AMPK 抑制剂反向验证 IMP 的作用靶点	255
1 实验材料与设备	255
2 实验方法	266
3 结果	288
第二节 Western Blot 检测小鼠肝脏脂代谢通路蛋白表达	30
1 试验材料与设备	30
2 实验方法	31
3 结果	33
第三节 基于 TMT 蛋白质组学探究 IMP 促进不同体质小鼠 NAFLD 发生恶化的机制	355
1 试验材料与设备	355
2 实验方法	355

3 结果 .....	377
讨论 .....	49
总结与展望 .....	544
附件 已发表综述 .....	60
衰老进程中非酒精性脂肪肝病自发产生的分子机制的研究进展 .....	60
1. 衰老进程中的 SAHF 诱发 NAFLD .....	61
2. 衰老进程中的 SASP 诱发 NAFLD .....	63
3. 嘌呤核苷酸恶化衰老动物体内 NAFLD 症状 .....	63
4. 总结与展望 .....	65
致谢 .....	678
作者简介 .....	69
1. 基本信息 .....	69
2. 教育背景 .....	69
3. 成果目录 .....	69
4. 荣誉奖项 .....	69

## 摘要

### 研究目的

5'-肌苷酸(inosine 5'-monophosphate, 简称 IMP)调控核酸代谢、能量转移等重要生理功能。动物体内除了自身合成外, 也通过饮食摄取以维持代谢平衡。IMP 的二钠盐是食品行业中的鲜味剂, 尚未对单日摄入容许量做出规定。前期我们发现以 50 mg/(kg  $m_b \cdot d$ )的 IMP 对 *db/db* 小鼠灌胃给药 8 周, 小鼠出现了非酒精性脂肪性肝硬化 (NAFLD-LC) 症状, 首次揭示了 IMP 具有潜在的肝脏毒性。

鉴于 *db/db* 小鼠和正常小鼠的遗传学差异, 必须了解 IMP 对这两种体质小鼠的作用差别, 才能全面地理解 IMP 的食品安全性及损害肝脏的详细作用机制。

### 实验方法

参照 IMP 对 *db/db* 小鼠危害剂量, 开展了以 10, 50, 100 mg/(kg  $m_b \cdot d$ )的 IMP (以下简称低、中、高剂量)对 4 月龄 C57BL/6J 小鼠(正常小鼠)的肝损伤研究, 连续给药 4 个月后, 对小鼠体重、体脂率进行检测, 测定小鼠血清内血脂、炎症因子、肝损伤因子和乙酰辅酶 A 等含量以及肝脏组织油红 O 染色观测脂肪蓄积, 肝脂及乙酰辅酶 A 的含量分析。

为探究 IMP 是否具有致癌效果, 对正常小鼠、IMP 给药各组正常小鼠、*db/db* 小鼠以及 IMP 给药 *db/db* 小鼠的肝脏开展了 DNA 彗星电泳实验, 彗星电泳实验用于检测细胞 DNA 损伤情况。DNA 损伤越严重, DNA 超螺旋结构越松散, 产生的断裂点越多, 电泳结果显示出彗星形状, 根据彗尾的长度、面积和荧光强度判断细胞是否癌变。

在前期研究中, 我们发现 IMP 可以与 AMPK $\gamma$ 1 亚基形成稳定的复合体, 通过促进 AMPK 的磷酸化而活化 ACC-脂肪酸 $\beta$ 氧化, 在体外实验中 IMP 显示强烈的降脂活性, 但在 *db/db* 小鼠肝脏内显著促进了以乙酰辅酶 A 合成甘油三酯 (TG) 而导致 NAFLD 恶化, 出现了 NAFLD-LC。为证明 AMPK 是 IMP 调控脂肪代谢的作用靶点, 利用油酸诱导脂肪蓄积的 HepG2 细胞模型研究 AMPK 正常和被抑制功能期间 IMP 的降脂活性, 根据 IMP 的功效差异验证 AMPK 是 IMP 的作用靶点。利用蛋白质免疫印迹 (Western blot) 实验探究 IMP 给药对正常小鼠肝脏内 AMPK 下游的脂质分解代谢相关蛋白表达的影响情况。IMP 诱导正常小鼠产生早期 NAFLD 症状, *db/db* 小鼠自发产生 NAFLD 症状和 IMP 诱导 *db/db* 小鼠产生的肝硬化症状反映了高嘌呤饮食环境中的人类因瘦素抵抗逐渐恶化, 出现不同阶段的 NAFLD 的原因。发现每个阶段的差异表达的蛋白质种类可解析 NAFLD 演化的分子机制。基于 TMT 定量蛋白质组学发现不同诱因导致小鼠 NAFLD 发病的肝细胞内蛋白种类和利

用生物信息学方法研究 IMP 通过诱发这些蛋白质表达变化导致 NAFLD 发生和演化的作用机制。

## 实验结果

IMP 对正常小鼠体重无显著影响, 100 mg/(kg  $m_b \cdot d$ ) IMP 引起小鼠体脂率显著升高, 表明高剂量 IMP 促进正常小鼠体内脂质积累。IMP 给药后各组小鼠的血脂较正常组升高, 乙酰辅酶 A 含量随 IMP 给药剂量的升高而升高, 炎症因子随 IMP 给药剂量的升高而降低, 肝损伤因子无显著变化。肝组织切片经油红 O 染色观察发现低剂量组小鼠肝脏无明显的脂肪蓄积, 中、高剂量组小鼠肝脏内出现脂质蓄积现象, 脂肪蓄积量和 IMP 剂量为正相关, 表明高剂量的 IMP 给药依然促进正常小鼠 NAFLD, 但即使是高剂量 IMP, 诱导的正常小鼠 NAFLD 的症状可能逆转, 因此不能武断地判定 IMP 有食品危害性。但对严重瘦素抵抗体质的小鼠或人, 不宜在饮食中额外添加 IMP, 同时要避免高嘌呤饮食。

DNA 彗星电泳实验显示仅 IMP 给药的 *db/db* 小鼠肝脏 DNA 被损伤, 表明 IMP 对 *db/db* 这样的极端瘦素抵抗体质的小鼠有促进肝细胞癌变的活性, 验证了 IMP 诱导 *db/db* 小鼠出现的症状为癌变前期的 NAFLD-LC。

利用 AMPK 抑制剂进一步验证 AMPK 是否为 IMP 在肝细胞内的作用靶点, 证明 IMP 和 AMPK 形成复合体导致 AMPK 激活, 引发了脂肪酸 $\beta$ 氧化反应加速, 促进了乙酰辅酶 A 蓄积、TG 合成和肝脏氧化应激等诱发 *db/db* 小鼠的 NAFLD-LC。

蛋白质免疫印迹 (Western blot) 实验发现 IMP 活化 AMPK 促进 ACC1 和 ACC2 表达和磷酸化, 加速脂肪酸 $\beta$ 氧化生成乙酰辅酶 A, 促进脂肪合成; 同时诱导 ATGL 表达促进脂肪分解。表明 IMP 作用下正常小鼠肝脏内出现了促进脂肪蓄积和脂肪分解的互相拮抗。低剂量 IMP 作用时脂肪分解能力大于合成能力, 中、高剂量 IMP 作用时脂肪分解能力小于蓄积能力, 因而观察到 IMP 促进脂肪蓄积和剂量之间存在正相关。

TMT 定量蛋白质组学和生物信息学方法发现 IMP 导致正常小鼠肝脏内 Hcpidin 等 4 种蛋白含量显著增加, 补体成分 C9(C9)等 23 种蛋白表达显著减少; IMP 导致 *db/db* 小鼠肝脏内 Phospho1 等 65 种蛋白显著增加, Cam1g 等 110 种蛋白表达显著减少。*db/db* 小鼠相对于正常小鼠, 肝脏内 Get4 等 260 种蛋白表达显著增加, Jagn1 等 148 种蛋白表达显著减少。IMP 诱导正常小鼠、IMP 诱导 *db/db* 小鼠以及 *db/db* 小鼠产生各自表型的 NAFLD 进程中 C9 表达量都降低, 表明 IMP 通过下调 C9 表达引起肝细胞炎症是促进 NAFL 发生和进展为 NAFLD-LC 的原因, 这种炎症发生和肝细胞内脂质变性无因果关系。此外, *db/db* 小鼠相对于正常小鼠, 肝细胞胞间质 (ECM) 沉积相关的蛋白质如 ITB3、LAMB2 等的表达量显著提升, 是导致 NAFLD-LC 发生的必要条件。

## 结论

对照 IMP 诱导正常饮食的 C57/BL6J 小鼠和 *db/db* 小鼠出现的 NAFLD 的表型差异和作用机制证明 NAFLD-LC 发病的必要条件是高度瘦素抵抗体质动物体内出现 IMP 过剩。此外, IMP 导致肝脏内补体蛋白 C9 的表达下调是引发非酒精性脂肪肝炎, 加速 NAFLD 恶化, 为研究 NAFLD-LC 的发病机制提供新思路。这些结果证明了常规饮食条件下, 由于代谢异常或过量摄入 IMP 引发体内嘌呤核苷酸过剩是 NAFLD 发生和演化的原因。因此, 正常饲养条件下用 IMP 诱导正常小鼠可建立 NAFLD 的疾病新模型, IMP 诱导 *db/db* 小鼠可建立 NAFLD-LC 疾病新模型, 这两种模型分别反映了高嘌呤饮食环境中的人类 NAFLD 或 NAFLD-LC 的病理特征, 为 NAFLD 发病和演化为肝硬化分子机制研究指明了新方向。

**关键词:** 5'-肌苷酸(IMP); 非酒精性脂肪肝病; 肝硬化; 动物模型; 演化机制

## Abstract

### Aim

Inosine 5'-monophosphate (IMP) regulates nucleic acid metabolism, energy transfer and other important physiological functions. IMP can be produced in different organs of higher animals through *de novo* or remedial synthesis pathways. IMP disodium salt is the food industry as an additive to increase the fresh place, has not yet made provisions on a single day intake tolerance.

Given the genetic differences between *db/db* mice and normal mice, it is essential to understand the effects of IMP on these two types of mice in order to understand the food safety and liver damage mechanism of IMP in detail.

### Methods

According to the harmful dose of IMP to *db/db* mice, the liver injury of 4-month-old C57BL/6J mice (normal mice) was studied by using 10, 50 and 100 mg/(kg·m<sub>b</sub>·d) IMP (hereinafter referred to as low, medium, and high dose). After 4 months of continuous administration, the body weight and body fat percentage of mice were detected. Serum lipid, inflammatory factor, liver injury factor and acetyl-coA were analyzed. The contents of liver fat and acetyl-coA were determined, and the fat accumulation in liver tissue was observed by oil red O staining.

To investigate whether IMP has carcinogenic activity, DNA comet electrophoresis was performed using the liver tissues of normal mice, normal mice of IMP administration groups, *db/db* mice and the liver of IMP administration *db/db* mice as the samples. Comet electrophoresis was used to detect the DNA damage of liver cells. The more serious the DNA damage, the more loose the DNA superhelix structure, the more broken points, the smaller the DNA fragments, the more DNA fragments appeared in the tail of the comet, the greater the length, area, and fluorescence intensity of the comet tail.

In previous studies, we found that IMP can form a stable complex with AMPK- $\gamma$ 1 subunit promoting the fatty acid  $\beta$ -oxidation. *In vitro* experiments, IMP showed remarkable high lipid-lowering activity, but significantly promoted the synthesis of acetyl-CoA-TG in liver of *db/db* mice, leading to the NAFLD-LC emerged. In order to make sure that AMPK is the target of IMP regulating fat metabolism, the lipid-lowering activity of IMP during normal and inhibited AMPK function was studied in HepG2 cells with oleic acid induced fat accumulation, and AMPK was the target of IMP based on the efficacy difference of IMP. Western blot assay was used to investigate the effect of IMP

administration on the expression of lipid-catabolism related proteins downstream of AMPK in liver of normal mice. IMP induced early NAFLD symptoms in normal mice, spontaneous NAFLD symptoms in *db/db* mice and liver cirrhosis symptoms in IMP induced *db/db* mice reflect the causes of different stages of NAFLD in humans in a high-purine diet due to increasing leptin resistance. The discovery of differentially expressed protein species at each stage can elucidate the molecular mechanism of NAFLD evolution. Based on TMT quantitative proteomics, the types of proteins in liver cells that are caused by different inductions of NAFLD in mice were found, and bioinformatics methods were used to study the mechanism of IMP inducing changes in the expression of these proteins to cause NAFLD occurrence and evolution.

## Results

IMP had no significant increase of the body weight of normal mice, but 100 mg/(kg·m<sub>0</sub>·d) IMP induced that significantly increase of the body fat percentage of the normal mice, suggesting that high dose IMP promoted the accumulation of lipid content in normal mice. After IMP administration, the serum lipid of mice in each group was higher than that in the normal group, acetyl-CoA content was increased with the increase of IMP dose, inflammatory factors were decreased with the increase of IMP dose, liver injury factor had no significant change. Lipid accumulation was found in liver of mice in medium and high dose groups. There was a positive correlation between the amount of fat accumulation and IMP dose, indicating that high-dose IMP still promoted NAFLD in normal mice. The symptoms of NAFLD induced in normal mice may be reversed, and the harm to normal mice is less, therefore it can not arbitrarily determine IMP food hazard. For mice or people with severe leptin resistance, IMP should not be added in the diet, and the high purine diet should be avoided.

DNA comet electrophoresis showed that only the *db/db* mice treated by IMP was damaged, indicating that IMP has the activity of promoting hepatocyte carcinogenesis in *db/db* mice with extreme leptin resistance, confirming that the symptoms induced by IMP in *db/db* mice were NAFLD-LC in pre-cancerous stage.

AMPK inhibitors were used to further verify whether AMPK is the target of IMP in liver cells, and it was proved that the combination of IMP and AMPK leads to the activation of AMPK, which leads to the accelerated oxidation reaction of fatty acid  $\beta$ , and promotes the accumulation of acetyl-CoA, triglyceride synthesis and liver oxidative stress to induce NAFLD-LC in *db/db* mice.

Western blot assay showed that IMP activated AMPK promoted the expression and

phosphorylation of ACC1 and ACC2, accelerated the fatty acid  $\beta$ -oxidation to produce acetyl-CoA, promoted fat synthesis and inhibited lipid decomposition. At the same time, ATGL expression can be increased to promote fat decomposition. The results showed that there was antagonism to promote fat accumulation and fat decomposition in liver of normal mice treated with IMP. The fat decomposition capacity was greater than the synthesis capacity at low dose of IMP, while the fat decomposition capacity was less than the accumulation capacity at medium and high dose of IMP. Therefore, a positive correlation between the dosage and the promotion of fat accumulation was observed.

TMT quantitative proteomics and bioinformatics methods showed that IMP significantly increased the contents of 4 proteins, including Hcpidin, and significantly decreased the expression of 23 proteins, including complement C9 (C9) in liver of normal mice. IMP significantly increased 65 proteins, such as Phospho1, and decreased 110 proteins, such as Camlg, in liver of *db/db* mice. Compared with normal mice, the expressions of 260 proteins, including Get4, were significantly increased in *db/db* mice, while the expressions of 148 proteins, including Jagn1, were significantly decreased. The expression levels of C9 in NAFLD process induced by IMP in normal mice and *db/db* mice were all reduced, suggesting that IMP induces hepatocyte inflammation by down-regulating C9 expression, which is responsible for promoting the occurrence and progression of NAFLD-LC. There is no causal relationship between this inflammation and intrahepatic lipid degeneration. In addition, compared with normal mice, the expression levels of proteins related to ECM deposition in hepatocytes, such as ITB3 and LAMB2, were significantly increased in *db/db* mice, which is a necessary condition for the occurrence of NAFLD-LC.

### Conclusion

The phenotypic differences and pharmacological mechanism of NAFLD in C57/BL6J mice and *db/db* mice induced by IMP respectively suggested that high leptin resistance caused by IMP excess was the necessary condition for the occurrence of NAFLD-LC. IMP down-regulates the expression of C9 in liver, which is an independent factor causing liver inflammation, providing new ideas for understanding the pathogenesis and evolution of NAFLD and NAFLD-LC. Even under normal diet, liver inflammation and fat accumulation induced by excess purine nucleotides caused by abnormal metabolism or excessive intake are the causes of the occurrence and evolution of NAFLD. Therefore, under normal feeding conditions, normal mice induced by IMP can establish a new model of NAFLD, and *db/db* mice induced by IMP can establish a new model of NAFLD-LC disease. These two models, respectively, reflect the

pathological features of human NAFLD or NAFLD-LC in a high-purine diet setting a new direction for the study of the molecular mechanisms underlying the pathogenesis and evolution of NAFLD into cirrhosis.

**Key words:** Inosine 5'-monophosphate (IMP); NAFLD; liver cirrhosis; animal model; evolving mechanism

## 前言

非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 是一种进行性疾病<sup>[1]</sup>, 从非酒精性脂肪肝 (NAFL), 到非酒精性脂肪性肝炎 (NASH), 再到肝纤维化, 最后可能会发展成肝硬化 (NAFLD-LC) 和肝细胞癌 (HCC), 是引发肝脏相关疾病死亡率增加的危险因素<sup>[2]</sup>。NAFLD 的全球患病率约为 25%<sup>[3]</sup>, 并且呈现继续上升的趋势。随着我国社会经济的发展进步, 人民的生活方式和饮食习惯发生巨大变化, NAFLD 已成为中国最常见的肝脏疾病<sup>[4]</sup>。

NAFLD 的发生和进展是一个复杂的过程。NAFLD 的发病机制一直是学术界讨论的热点。最初, “二次打击”学说被用来解释 NAFLD 的发病机制<sup>[5]</sup>。根据该理论, 高脂饮食、肥胖和胰岛素抵抗等因素通过促进甘油三酯 (TG) 在肝脏中的沉积是 NAFLD 发病机制中的“第一击”。细胞因子、脂肪因子、内质网应激和线粒体功能障碍等通过激活炎症级联反应和纤维化进程是造成 NAFLD 进展的“第二次打击”<sup>[6]</sup>。随着人们对机体各种代谢过程之间的认识和联系不断加强, 传统的“双重打击”理论逐渐演变成“多重平行打击”假设<sup>[7]</sup>, 即 NAFLD 的发病及演化是多因素共同导致的结果。近期研究发现, 来自肝外器官中的下丘脑在促进 NAFLD 发展过程中发挥着重要作用<sup>[8]</sup>。下丘脑在感知和整合外周组织的信号及维持代谢稳态方面发挥着关键作用, 突变或炎症导致的下丘脑信号通路受损将会导致肥胖和 NAFLD 的发展<sup>[9, 10]</sup>。总之, NAFLD 的发病机制还需我们不断完善和补充, 为 NAFLD 的药物开发提供新思路。

发病机制复杂模糊是造成目前没有专门用于治疗 NAFLD 的上市批准药物的原因之一, 但我们面临的困难远不止于此。药物临床试验告诉我们, 在动物模型上有效的药物不一定对人类有效<sup>[11]</sup>, 制约 NAFLD 药物开发的另一障碍是缺乏经过适当验证以表征人类自然发病规律且符合人体生理病理学特点的动物模型。目前常用的 NAFLD 模型主要有饮食和药物诱导动物模型、遗传背景改变的动物模型<sup>[12]</sup>。NAFLD 饮食诱导动物模型主要以高脂、高糖、高胆固醇等饮食单独喂养及以多种组合形式喂养或喂养蛋氨酸、胆碱缺乏饲料<sup>[13]</sup>, 药物诱导模型通常伴随着饮食诱导以缩短造模时间。该类模型存在一定的局限性, 因为通过饮食或药物诱导虽然模拟了 NAFLD 相关的病理特征, 但与人类正常饮食状态相差甚远, 代谢状态也与人类 NAFLD 患者不同, 限制了该模型在研究中的使用。遗传背景改变的 NAFLD 动物模型主要有瘦素缺乏症 (*ob/ob*) 小鼠和瘦素受体缺乏症 (*db/db*) 小鼠。瘦素是一种主要由白色脂肪组织的脂肪细胞分泌的肽激素, 在能量平衡的调节中起着至关重要的作用, 瘦素缺乏或抵抗可导致人类严重肥胖、糖尿病和不育<sup>[14]</sup>。*ob/ob* 小鼠缺乏功能性瘦素, 它们易出现严重的胰岛素抵抗从而导致脂肪在肝脏中的积累<sup>[15]</sup>。由于 *ob/ob* 小

鼠对肝纤维化具有抗性且大多数人类 NAFLD 患者的血清瘦素水平正常<sup>[16]</sup>，因此 *ob/ob* 小鼠模型用于 NAFLD 研究的能力有限。*db/db* 小鼠体内瘦素受体缺陷，瘦素信号传导过程失效<sup>[17]</sup>。*db/db* 小鼠的表型与 *ob/ob* 小鼠相似，存在食欲增加，并出现肥胖、高血糖、高胰岛素血症、胰岛素抵抗和脂肪肝，但其发展为晚期肝纤维化和 HCC 的能力较弱<sup>[17]</sup>。为此我们迫切需要找到贴合人类 NAFLD 发病规律的稳定动物模型来评价和筛选 NAFLD 药物。

IMP 是一种内源性分子，在人体中可通过六种酶催化，经由十步反应将嘌呤碱基依次组装到磷酸核糖焦磷酸 (PRPP) 上而从头合成<sup>[18]</sup>。IMP 作为嘌呤从头合成的一个关键产物，在体内很容易通过四种酶的催化作用生成腺苷酸基琥珀酸 (S-AMP)、5'-单磷酸腺苷 (AMP) 或 5'-单磷酸鸟苷(GMP)。S-AMP 是 IMP 的结构类似物，也是 IMP 合成 AMP 过程中的中间产物<sup>[19]</sup>。我们的前期研究发现，S-AMP 通过与 AMPK 形成复合体，提高 AMPK 磷酸化水平进而激活 AMPK 下游通路，从而在体外显示出优于同等浓度的洛伐他汀的降脂活性，在体内显示出较强的降低小鼠血脂和抑制肝脏内脂质蓄积的作用<sup>[20]</sup>。作为 S-AMP 的结构类似物，IMP 也可以与 AMPK 相互作用形成复合体，同时显示出较强的体外降脂活性，但 IMP 体内实验结果却截然相反，前期实验以 50 mg/(kg *m*·d)剂量 IMP 灌胃给药六月龄 *db/db* 小鼠，连续给药八周后，发现 IMP 造成了 *db/db* 小鼠血清内 TC、TG 含量的显著上升，谷草转氨酶、谷丙转氨酶升高，小鼠肝脏内脂质严重蓄积，显示出肝硬化症状<sup>[21]</sup>。

IMP 的二钠盐是食品生产和菜肴烹饪过程中广泛使用的添加剂，呈味作用稳定持久，被业内誉为液体调味增鲜剂的最佳选择<sup>[22]</sup>。近年来，随着我国人民生活水平的提高，对食物的口感要求也相应提高，IMP 等食品添加剂的使用更加广泛，鉴于前期在 *db/db* 小鼠上发现 IMP 的危害，我们更需全面了解 IMP 的食品安全性，建立 IMP 食品安全标准。前期实验表明 IMP 具有造成 *db/db* 小鼠 NAFLD-LC 的危害性，这提示我们 IMP 可能具有诱导 C57BL/6J 小鼠（正常小鼠）NAFLD 的作用。因此本实验开展了探究 IMP 对于正常小鼠肝脏影响的实验。探索 IMP 诱导正常小鼠作为 NAFLD 模型的可行性，同时进一步探究 IMP 造成 *db/db* 小鼠非酒精性脂肪肝硬化的机制，全面理解 IMP 的食品安全性。

蛋白质是组成一切细胞、组织的重要成分<sup>[23]</sup>，它是机体生命活动的主要承担者同时也是生物过程中重要的信息传递者<sup>[24]</sup>。蛋白质是生物功能的效应物，它们的表达水平不仅取决于相应的 mRNA 水平，还取决于翻译及翻译后修饰的调节过程。蛋白质组的概念最早由 Marc Wilkins 提出<sup>[25]</sup>，指由一个基因组或一个细胞、组织表达的所有蛋白质。蛋白质组学是指在特定时间以蛋白质组为研究对象，研究细胞、组织或生物体蛋白质组成及蛋白定位、相互作用、翻译后修饰和转运特征及其变化规律的科学<sup>[26]</sup>。蛋白质组学在全面了解机体生物学功能方面发挥着关键作用，被视为最能表征生物系统各项生理过程和功能的相关数据集。近十年来，质谱技术的快速

发展为蛋白质组学的进步提供了腾飞的翅膀<sup>[27]</sup>，应用质谱技术来研究蛋白质组学解决生物领域的相关难题已成为蛋白质研究领域不可或缺的技术手段。

定量蛋白质组学（Quantitative Proteomics）是蛋白质组学研究领域最重要的应用之一，通过定量蛋白质组学技术，对不同组别样品之间的蛋白质水平的变化进行定量比较<sup>[28]</sup>。定量蛋白质组学技术包括基于稳定同位素标记的定量和非标定量（Label-free quantification）两大类。串联质量标签（Tandem Mass Tag, TMT）技术属于定量标记，利用多肽体外标记技术，通过特异性标记多肽的氨基基团，进行串联质谱分析，可同时比较多个不同样品中蛋白质的相对含量<sup>[29]</sup>。TMT 标签由三部分组成：报告离子、平衡基团、反应基团，每种标签的总分子量一致。报告离子的峰强度能够反应出所标记的多肽的样品丰度，再经过软件处理得到蛋白质的定量信息<sup>[30]</sup>。在高通量技术的支持下，收集得到大量的蛋白质组学数据。

生物信息学的迅速发展和应用为蛋白质组学数据的分析提供了有力支持，利用各种生物信息学工具和方法筛选差异表达的蛋白质<sup>[31]</sup>，通过 GO 分析、KEGG 分析、PPI 等生物信息学方法研究差异表达蛋白的主要功能、参与的主要信号通路，构建蛋白互作网络以探究蛋白质之间的相互作用关系，寻找潜在的上下游调控因子，筛选出调控重要信号通路的关键蛋白，评估关键差异蛋白的生物学意义。从高通量的数据分析中挖掘出对机制研究有价值的信息和规律，为生物学机制和通路的探究提供线索和帮助。

本实验基于 TMT 标记定量蛋白质技术联合液相色谱—串联质谱技术，通过对比 IMP 诱导下正常小鼠和前期实验 *db/db* 小鼠的肝脏蛋白质组学变化差异，结合生物信息学技术分析和寻找 IMP 促进 NAFLD 发生和恶化的关键通路，为全面理解 IMP 的食品安全性提供相关实验证据，同时为发现 NAFLD 相关的生物标志物、疾病产生机制、全新药物靶标提供新思路。

## 第一章 IMP 诱导正常小鼠发生 NAFLD 的活性研究

### 引言

IMP 是体内嘌呤核苷酸从头合成的关键分子,其二钠盐是常见的鲜味剂,1913 年由 Shintaro Kodama-Ikeda 的学生在鲑鱼干中检测发现<sup>[32]</sup>。我国《食品添加剂使用卫生标准》(GB2760-2014)对 IMP 在食品生产中的使用剂量未有明确规定。据报道,IMP 等鲜味剂通过促进核苷酸降解和尿酸产生,诱导雄性小鼠肥胖、下丘脑炎症和中央瘦素抵抗<sup>[33]</sup>。Natalie D. Luscombe-Marsh 等人发现,在高蛋白膳食中添加 IMP 和谷氨酸钠,没有增强饱腹感,并且可能会增加第二道菜的能量摄入<sup>[34]</sup>。王方等人发现腺苷单磷酸脱氨酶 2 (AMPD2)在肥胖患者中高表达,AMPD2 可将体内的 AMP 转化为 IMP,提示 IMP 的蓄积与肥胖发生存在重要联系<sup>[35]</sup>。以上研究均提示 IMP 在体内蓄积会给机体带来不利影响。

在课题组前期研究中,以 50 mg/(kg *m<sub>b</sub>*·d)剂量 IMP 灌胃给药六月龄 *db/db* 小鼠,连续给药八周后,发现其造成 *db/db* 小鼠体内血脂含量的急剧上升,其中胆固醇含量增加三倍,油红 O 染色观察到小鼠肝脏脂质严重蓄积,IMP 给药造成 *db/db* 小鼠严重肝损伤,小鼠出现肝硬化症状。首次观察到 IMP 诱导正常饮食状态下小鼠出现非酒精性脂肪性肝硬化症状,为建立疾病模型研究发病机制奠定基础。

鉴于 *db/db* 小鼠为瘦素受体缺陷小鼠,体质较为特殊,不能武断地认为 IMP 对 *db/db* 小鼠造成肝脏危害就判断其具有食品危害性。为全面了解 IMP 的食品安全性,我们还需了解 IMP 对正常小鼠的影响情况,加之正常小鼠在自然衰老过程中发生的 NAFLD 更能准确地模拟人体发病特点,本实验即开展了 IMP 给药诱导 4 月龄正常小鼠 NAFLD 发病活性研究,参照 IMP 给药对 *db/db* 小鼠引发肝硬化的剂量,我们将 IMP 给药剂量设为低、中、高三组,分别以 10, 50, 100 mg/(kg *m<sub>b</sub>*·d)剂量间隔 24 小时灌胃给药一次,连续给药四个月至小鼠八月龄,以期探究 IMP 对正常小鼠从体发育成熟期到老龄期间肝脏的影响。

在前期开展的体外实验中发现,IMP 促进高脂 HepG2 模型细胞产生过量的活性氧,为探究 IMP 是否具有致癌活性,我们进行彗星电泳实验。该实验可用于检测 DNA 损伤情况,DNA 损伤越严重,DNA 超螺旋结构越松散,产生的断裂点越多,DNA 片段越小,彗星尾部出现的 DNA 片断越多,慧尾的长度、面积和荧光强度越大。利用前期实验中的 *db/db* 小鼠和 IMP 给药 *db/db* 小鼠肝脏组织作为参照,通过测量对照组小鼠和 IMP 低、中、高剂量给药组小鼠肝细胞彗星尾部的长度、面积及荧光强度等指标,对各组小鼠肝脏 DNA 的损伤程度进行定性分析。

## 第一节 探究 IMP 给药对正常小鼠体重和体脂率的影响

### 1 实验材料与设备

#### 1.1 实验动物

实验动物：4 月龄雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠购自北京维通利华生物技术有限公司，【合格证号：SCXK（京）2019-0010】。

实验饲料：大小鼠生长维持饲料，购自江苏省协同医药生物工程有限公司，货号 1010009，配方组分表见表 1。

表 1：饲料配方组分表

水	脂肪	纤维	灰分	蛋白质	赖氨酸
≤100g	≥40g	≤50g	≤80g	≥180g	≥8.2g
甲硫氨酸+胱氨酸		Ca		P	Ca:P
5.3g		10-18g		6-12g	1.2:1~1.7:1

饲养环境：饲养于中国医学科学院药用植物研究所 SPF 动物房内，饲养室内温度维持在 22℃左右，相对湿度维持在 45%，噪音≤55 dB，明暗交替，保证照明时间为 12 h，严格按照实验动物饲养规程进行其他指标的调控。

#### 1.2 试剂及原料

含量约为 95%的 IMP 购自于山东聊城希杰生物技术有限公司，本实验室通过过滤、重结晶纯化的方法得到纯度大于 99.5%的 IMP。准确称量纯化后的 IMP，以双蒸水进行稀释，配制成 2 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L 水溶液，分装储存于-20℃冰箱，每次给药前放置于室温下回温。

#### 1.3 仪器和设备

精密电子分析天平（上海海康电子仪器厂），身体成分分析仪（The mimispec LF65 BRUKER），电子秤（北京赛多利斯）。

## 2 实验方法

实验动物 SPF 级 4 月龄 C57BL/6J (C57)小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司【合格证号：SCXK（京）2019-0010】。将到达动物房的小鼠放置紫外消毒室，打开紫外灯照射半小时以上，随后转移进入动物房屏障内，将小鼠进行随机分组，分为正常对照组（Normal）、IMP 处理低剂量组 10 mg/(kg  $m_b \cdot d$ )、IMP 处理中剂量组 50 mg/(kg  $m_b \cdot d$ )、IMP 处理高剂量组 100 mg/(kg  $m_b \cdot d$ )，每组 5 只一笼。在中国医

学科学院药用植物研究所 SPF 动物房内用普通维持饲料饲养，保证正常给水给食。在动物房适应性喂养五天后进行 IMP 给药，给药组小鼠分别以 10, 50, 100 mg/(kg  $m_b \cdot d$ ) 剂量灌胃，正常组小鼠灌胃等量蒸馏水，间隔 24 小时灌胃给药至小鼠 8 月龄。

每隔一月测量小鼠体重变化情况。测量前重新更换垫料和笼具，确保笼内无饲料，将小鼠禁食给水 12 h，电子秤测量体重，记录数据。测量完成后，恢复小鼠饮食。在最后一次灌胃结束后，将小鼠禁食给水 12 h，进行体脂率测定。提前打开小鼠身体成分分析仪，预热 4 h，将黑筒放入仪器内进行仪器自检，自检结束后将小鼠放入测量红桶中压紧固定，注意不能压太紧以保证小鼠的存活，随后放入机器内进行测量，记录数据，用 fat 值(g)除以体重(g)乘 100%得到小鼠的体脂率。

数据处理：实验结果用 Graphpad prism 8.01 进行行处理和分析，结果表示为 mean 士 SD。采用单因素方差分析、Tukey's 检验分析组间差异。以  $P < 0.05$  界定为差异有统计学意义。

### 3 结果

在正常小鼠给药期间，每隔一月测量的体重变化结果如图 1A 所示，随着给药时间的推移，各组小鼠体重呈上升趋势，正常组和中剂量 IMP 给药组体重增长较快。总体来看，IMP 给药对正常小鼠的体重无明显影响，各组小鼠未显示出一定的量效关系和统计学差异。在末次给药结束后，对各组小鼠体脂率进行测量，结果如图 1B 所示，与正常组小鼠相比，IMP 给药各组小鼠的体脂率均呈现上升趋势，低、中剂量组 IMP 给药的两组小鼠中，个别小鼠的体脂率增加明显，但相对正常组小鼠，平均体脂率无显著性变化。高剂量 IMP 给药组小鼠的平均体脂率增加了约 55%，且与正常组小鼠相比差异显著。体重和体脂率的结果表明，IMP 给药正常小鼠不会造成体重的明显变化，但会引起小鼠体内脂质含量的增加，脂质含量的增加表明小鼠的代谢可能产生了一定的问题。以上结果提示高剂量 IMP 摄入促进了正常小鼠明显的脂肪蓄积。

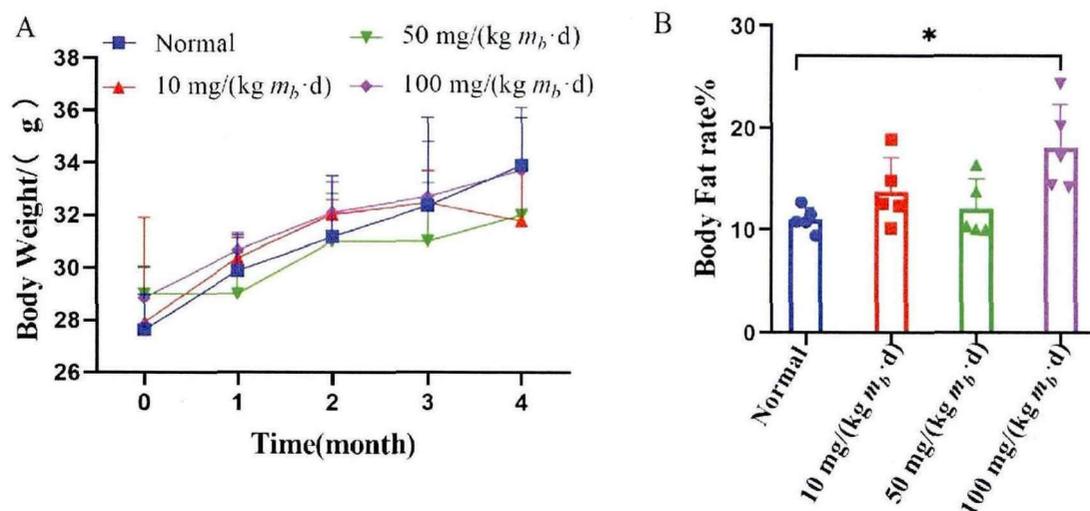


图 1.A: 给药期间正常组及 IMP 给药各组小鼠的体重变化; B: 末次给药后各组小鼠的体脂率。(与空白对照组比较 \*P < 0.05, n = 5)

## 第二节 IMP 给药结束后样品的采集及相关生理学指标分析

### 1 实验材料与设备

#### 1.1 试剂及原料

甘油三酯测定试剂盒(GPO-PAP 法)	中生北控生物科技有限公司
总胆固醇测定试剂盒(CHOD-PAP 法)	中生北控生物科技有限公司
直接高密度脂蛋白胆固醇测定试剂盒(清除法)	中生北控生物科技有限公司
低密度脂蛋白胆固醇测定试剂盒(清除法)	中生北控生物科技有限公司
乙酰辅酶 A 测定试剂盒(比色法)	北京华英生物技术研究所
碱性磷酸酶测定试剂盒(连续监测法)	中生北控生物科技有限公司
天门冬氨酸氨基转移酶试剂盒(连续监测法)	中生北控生物科技有限公司
丙氨酸氨基转移酶测定试剂盒(连续监测法)	中生北控生物科技有限公司
乳酸脱氢酶测定试剂盒(连续监测法)	中生北控生物科技有限公司
肿瘤坏死因子- $\alpha$ (酶联免疫法)	中生北控生物科技有限公司
白细胞介素-6 (酶联免疫法)	中生北控生物科技有限公司
白细胞介素- $\beta$ (酶联免疫法)	中生北控生物科技有限公司
游离脂肪酸 NEFA 试剂盒(酶法)	南京建成生物工程研究所
福尔马林	北京化工厂
无水乙醇	北京化工厂
二甲苯	北京化工厂

#### 1.2 仪器和设备

迈瑞 BS-420 全自动生化仪	深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司
连续波长酶标仪	TECAN 公司
台式多用途高速冷冻离心机	广州吉迪仪器有限公司
全景扫描仪 CS2 型	Aperio 公司
Leica 切片机 RM2135 型	强生医疗器械公司
Leica 包埋机 EG1160 型	强生医疗器械公司

## 2 实验方法

### 2.1 取材及预处理

末次给药结束,将各组小鼠从 SPF 动物房中取出,转移到动物取材室进行取材。采用摘眼球法进行取血,取血完成后拖颈椎处死小鼠。对每只小鼠进行组织取材,依次将完整的肾脏、肝脏、心脏取出。将左肾放入液氮冻存,右肾放入 10%福尔马林溶液中固定,心脏用 0.9%的生理盐水漂洗干净,一分为二,一半放入液氮冻存,一半放入 10%福尔马林溶液中固定。将肝脏分为大小两份,大份放入液氮冻存,小份放入 10%福尔马林溶液中固定。待取材结束后,将液氮中的组织分组装袋,做好标记,转移至-80℃冰箱保存,将福尔马林溶液中固定的组织放到水平摇床,左右摇晃,使组织充分固定。将取材后小鼠的尸体和笼具归还动物房进行集中处理。将摘眼球取得的血液放室温下静置 1 h, 7500 rpm 离心 30 min, 吸取上清转移至 1.5 ml 离心管中后放入-20℃冰箱中备用。

### 2.2 全自动生化仪进行生理指标检测

按照试剂盒检测说明书,用全自动生化仪检测小鼠高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)的含量,以及碱性磷酸酶(ALP)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH)这四项表征肝损伤情况的物质含量。根据仪器操作流程,将仪器开机预热 30 min, 预热完成后按照仪器操作指示将各个试剂盒放在对应的位置上,将准备好的血清样本依次放入样品架上,再将样品架放到传送轨道上进行各项指标的测量。按照试剂盒说明书进行血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素- $\beta$  (IL- $\beta$ ) 含量的检测。

### 2.3 血清中乙酰辅酶 A 含量检测

按照试剂盒说明书完成工作液的配置,置冰上待用。随后称取各组小鼠肝脏组织约 0.1 g, 血清 100  $\mu$ L, 加入 1 mL 试剂一, 肝组织进行冰浴匀浆, 血清进行冰浴超声。随后按照 8000 g, 4℃条件离心 10 min, 取上清, 置冰上待测, 打开分光光度计, 预热 30 min 后用蒸馏水在波长 340 nm 处调零。取 920  $\mu$ L 工作液和 100  $\mu$ L 样本至 1 mL 石英比色皿, 混匀, 立即准确记录 20 s 的吸光值 A1 和 80 s 时的吸光值 A2, 计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。按照蛋白浓度法计算乙酰辅酶 A 含量。

### 2.4 肝脏匀浆组织检测肝脂含量

准确称取各组小鼠同一部位肝组织,称重,按照质量(g):体积(mL)为1:9的比例加入无水乙醇,先用剪刀剪碎组织,随后置冰上机械匀浆,匀浆完成后12000 rpm/min离心15 min取上清,按照试剂盒说明书,在酶标仪上进行TC、TG和NEFA的测定。

## 2.5 肝脏油红O切片染色及拍照

(1) 取冻存在-80℃冰箱的肝组织适量,制作冷冻切片,油红O染色观察。

(2) 冷冻切片制作方法:组织取出后,用吸水纸拭去组织周围的液体,用取材刀切去合适大小的组织块,放于托盘上,使用冰冻包埋剂,将其完全包裹住,立即置于托盘中,将托盘放于-80℃冰箱中冰冻20 min;将冰冻组织放于冰冻切片机的凹槽位置,进行切片,根据实验要求切取厚度为6-10 μm的冰冻切片。

(3) 油红O染色:切片放入10%中性福尔马林固定15 min,蒸馏水浸洗3次,晾干。配制油红O工作液,以50%乙醇为溶解剂,配制油红O工作液。将组织置入油红O工作液中染色15 min,使其与油红充分接触。取出切片,停留3 s后于60%异丙醇中漂洗6次。将漂洗后的切片置于蒸馏水中浸洗3次,充分洗去组织表面异丙醇,苏木素染色液复染核2 min,蒸馏水浸洗1 min,滤纸吸干水分,甘油明胶封固。

(4) 观察

将制作好的肝组织油红O切片于全景扫描仪中扫描,调整适当的放大倍数拍照、观察染色结果。

## 2.6 数据处理

实验结果采用Graphpad prism 8.01分析,结果表示为mean士SD,采用单因素方差分析,Tukey's检验分析组间差异。与空白对照组比较\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ;与10 mg/(kg  $m_b \cdot d$ ) IMP组比较# $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ ,与50 mg/(kg  $m_b \cdot d$ ) IMP组比较, & $P < 0.05$ , && $P < 0.01$ , &&& $P < 0.001$ 。

## 3 结果

### 3.1 血脂四项含量测定结果

检测小鼠血清中血脂四项含量,检测结果如图2所示。与正常组相比,IMP给药后小鼠血清TG含量呈现上升趋势,其中IMP给药低剂量组TG含量最高,与之相比,IMP给药中、高给药剂量组TG含量下降,但仍高于正常组含量。与正常组相比,IMP给药低剂量组血清TC含量下降,IMP给药中、高剂量组TC含量有所

增加,但并无统计学差异。IMP 给药低剂量组小鼠血中 TG 含量显著上升,TC 含量显著下降,提示 IMP 给药造成其血脂代谢紊乱。与正常组相比,IMP 给药各组 LDL 含量呈现增加趋势,IMP 给药中剂量组 HDL 含量下降,但差异并不显著,与 IMP 给药低剂量组相比,IMP 给药中、高剂量组 HDL 含量有所上升。总体来看,IMP 给药后小鼠血清中血脂呈现上升趋势,但血脂上升程度小于前期在 *db/db* 鼠上测得的结果,提示 IMP 给药对不同体质小鼠的血脂变化造成的影响不同。

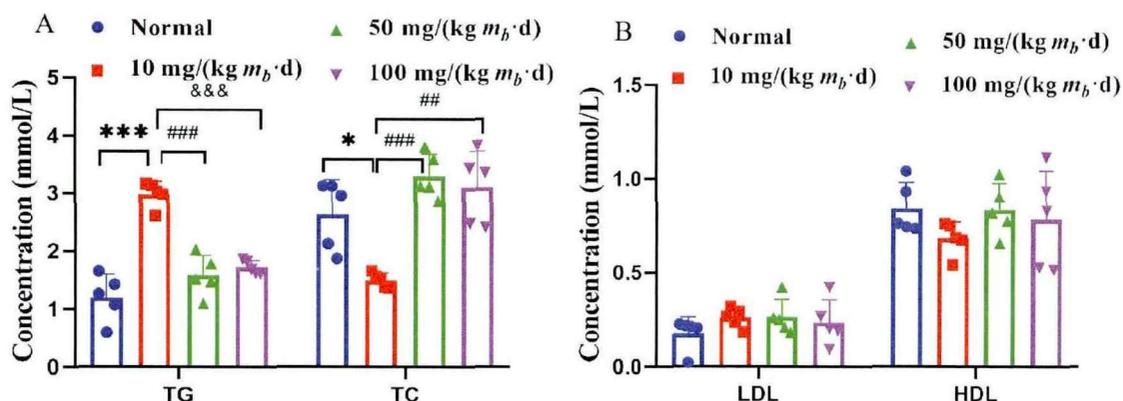


图 2.A: 正常组及 IMP 给药各组小鼠血清中 TG、TC 含量; B:正常组及 IMP 给药各组小鼠血清中 LDL、HDL 含量。(组间差异按 2.6 所述方式标注)

### 3.2 血清肝损伤指标检测结果

小鼠血清中的肝损伤测定结果如图 3 所示。与正常组相比,IMP 给药低、中剂量组小鼠血清的谷草转氨酶含量上升,谷草转氨酶含量上升是肝损伤的重要指标<sup>[36]</sup>,提示 IMP 给药后小鼠开始出现肝损伤的特征,但差异并不显著。IMP 给药低、中剂量组小鼠血清谷丙转氨酶、碱性磷酸酶的含量较正常组有所上升,与谷草转氨酶的含量变化趋势一致。与正常小鼠相比,IMP 给药低剂量组的碱性磷酸酶含量略有升高,但差异不显著。表明 IMP 给药对小鼠肝脏造成了一定的刺激,提示其具有肝损伤的危害性。

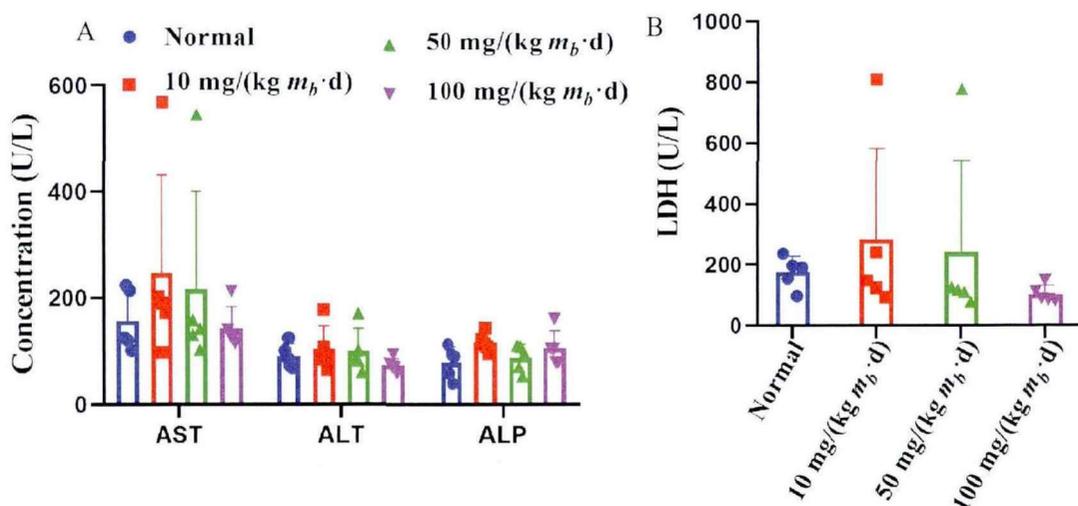


图 3.A: 正常组及 IMP 给药各组小鼠血清中 AST、ALT、ALP 含量; B:正常组及 IMP 给药各组小鼠血清中 LDH 含量。(组间差异按 2.6 所述方式标注)

### 3.3 血清炎症因子检测结果

小鼠血清中的炎症因子测定结果如图 4 所示。与正常组相比, IMP 给药后小鼠血清炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ 含量成先上升后下降趋势。与正常组相比, TNF $\alpha$ 含量在低、中、高三组小鼠血清中均显著上升。表明 IMP 给药后激活小鼠体内的炎症反应, 该炎症反应的强弱与 IMP 的给药剂量成负相关。

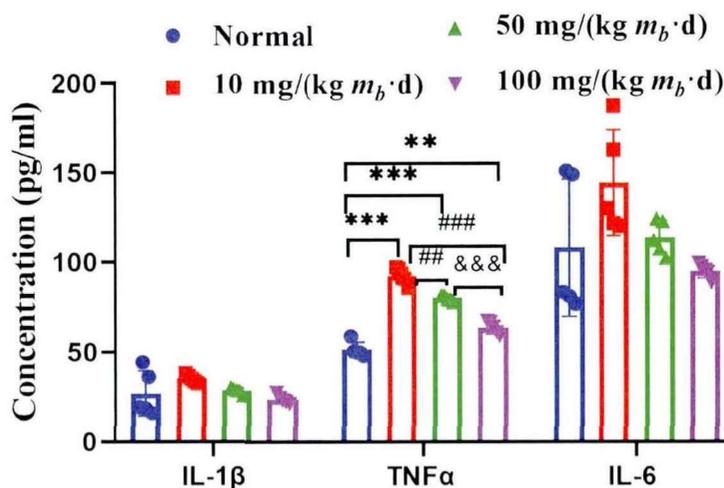


图 4.正常组及 IMP 给药各组小鼠血清中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$  含量。(组间差异按 2.6 所述方式标注)

### 3.4 肝脏和血清中乙酰辅酶 A 含量

小鼠肝脏和血清乙酰辅酶 A 含量测定结果图 5 所示。乙酰辅酶 A 是人体内重要的化学物质, 它是体内糖、脂肪、蛋白质的代谢产物, 同时又是是脂酸合成、胆

固醇合成和酮体生成的碳来源<sup>[37]</sup>。与正常组相比, IMP 给药组小鼠肝脏内乙酰辅酶 A 含量降低, 且随着给药剂量的增加, 乙酰辅酶 A 含量也相应增加。小鼠血清中乙酰辅酶 A 含量变化情况与肝脏结果相一致, 与正常对照组相比, IMP 给药后各组小鼠血清乙酰辅酶 A 含量下降。不同剂量的 IMP 给药组相比, 血清中乙酰辅酶 A 的含量随着给药剂量的增加而上升, 表明 IMP 诱导正常小鼠乙酰辅酶 A 含量的蓄积。乙酰辅酶 A 的变化提示 IMP 给药造成了小鼠体内代谢过程的紊乱。

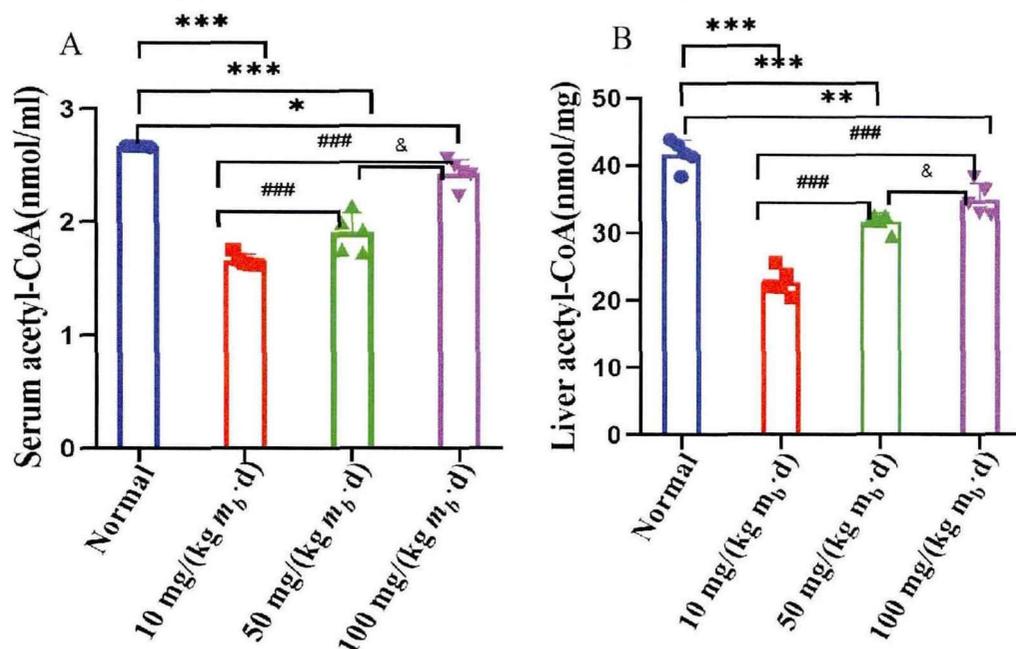


图 5.A: 正常组及 IMP 给药小鼠肝脏乙酰辅酶 A 浓度; B: 正常组及 IMP 给药小鼠血清内乙酰辅酶 A 浓度。(组间差异按 2.6 所述方式标注)

### 3.5 各组小鼠肝脏油红 O 染色切片

为探究 IMP 给药 C57 正常小鼠是否产生如课题组前期在 *db/db* 鼠中所观察到的严重肝脏脂肪变性, 将各组正常小鼠肝脏进行油红 O 切片染色, 结果如图 6 所示。切片结果表明, 正常对照组和 IMP 低剂量给药组未观察到红色脂滴, 中剂量给药组小鼠有少量的红色脂滴, 高剂量组小鼠的红色脂滴较为明显, 表明随着 IMP 给药剂量的增加, 小鼠肝脏内的脂质蓄积程度也增加。可见 IMP 作用于正常体质小鼠会造成脂质蓄积等肝脏损伤, 且随着 IMP 剂量的增加其危害程度变大。但各组 IMP 给药正常小鼠肝脏脂质蓄积程度小于前期实验中 IMP 给药后的 *db/db* 鼠<sup>[21]</sup>, 表明 IMP 对肝脏造成的危害程度因体质不同而有所差异, 并且随着剂量的增大对肝脏造成的危害加深。

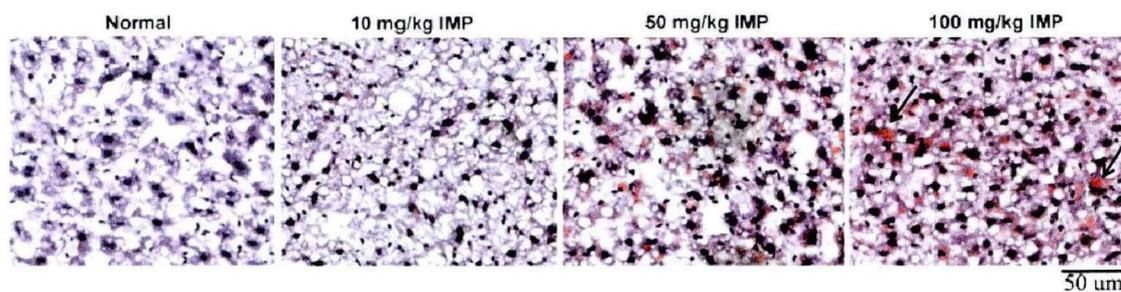


图 6.正常组及 IMP 给药各组小鼠肝组织油红 O 切片染色 (200×)

### 3.6 各组小鼠肝脏脂质含量

测定各组小鼠肝脏内 TG、NEFA、TC 含量,测定结果如图 7 所示。与正常组相比,IMP 给药低、中剂量组 TG 含量上升,因小鼠个体差异较大,各组比较之间无统计学意义。与正常对照组相比,IMP 给药各组 NAFA、TC 含量均上升,各组比较无显著差异。总体来看,IMP 有促进小鼠肝脏内脂质含量上升的趋势,但无明显的规律。

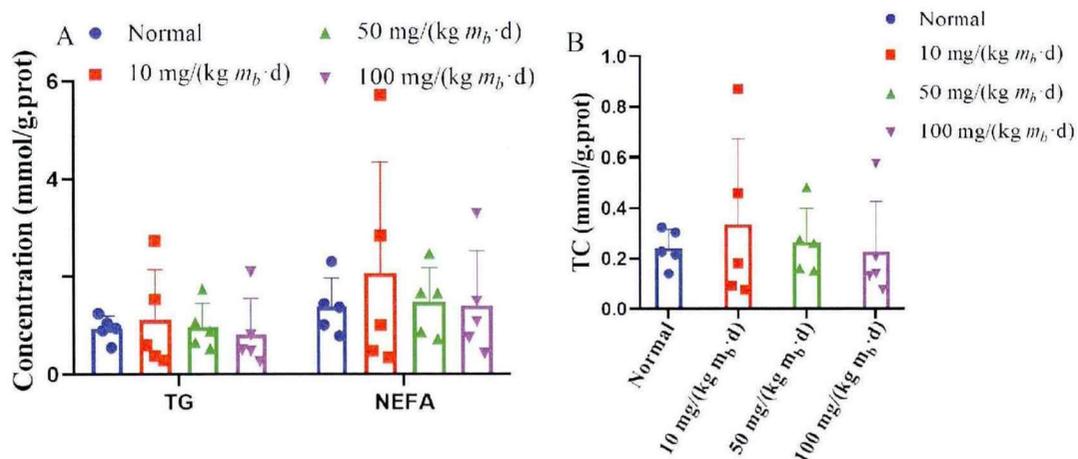


图 7.A: 各组小鼠肝脏内 TG、NEFA 含量; B: 各组小鼠肝脏内 TC 含量。(组间差异按 2.6 所述方式标注)

### 第三节 彗星电泳检测小鼠肝脏 DNA 损伤情况

#### 1 试验材料与设备

##### 1.1 试剂及原料

四型胶原酶 A	罗氏公司
DNA 损伤试剂盒	南京建成生物工程研究所
DMEM 高糖培养基	美国 HyClone
PBS 缓冲液	美国 HyClone

##### 1.2 仪器与设备

台式多用途高速冷冻离心机	广州吉迪仪器有限公司
倒置荧光显微镜	美国 OPLENIC
恒温水浴锅	上海昕仪

#### 2 实验方法

彗星电泳实验用于检测肝细胞 DNA 损伤情况。DNA 损伤越严重，DNA 超螺旋结构越松散，产生的断裂点越多，DNA 片段越小，彗星尾部出现的 DNA 片断越多，彗尾的长度、面积和荧光强度越大。通过测量正常对照组小鼠，IMP 各剂量给药正常小鼠和前期实验中的 *db/db* 小鼠和 IMP 给药 *db/db* 小鼠肝脏彗星尾部的长度、面积及荧光强度等指标，对各组小鼠肝脏 DNA 的损伤程度进行定性分析。

##### 2.1 肝细胞提取

分别从正常对照组、*db/db* 模型组、IMP 给药 *db/db* 小鼠、IMP 给药的低、中、高剂量组的正常小鼠肝脏组织中，称取适量肝组织，剪碎，胶原蛋白酶消化后制备细胞悬液。

##### 2.2 凝胶制备

将正常熔点琼脂糖铺于载玻片上制备第一层凝胶，将 2.1 制得的肝细胞悬液和低熔点琼脂糖混匀后铺在第一层凝胶上制得第二层凝胶，第二层凝胶凝固后，在室温下小心移去盖玻片，用低熔点琼脂糖制备第三层凝胶。

## 2.3 DNA 电泳

移去盖玻片，将载玻片置于平皿中，倒入预冷的裂解缓冲液于 4℃冰箱中裂解细胞 2 h，取出后 PBS 漂洗。在水平电泳槽内倒入新配制的碱性电泳缓冲液，将漂洗过的载玻片置入，常温静置 30 min 使 DNA 碱解旋。调节电压 25 V，电泳 25 min。

## 2.4 染色拍照

加入 0.4 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl PH7.5)缓冲液没过载玻片，4℃中和 10 min 共三次，弃去 Tris-HCl 缓冲液，加入 20  $\mu$ L PI 染液避光染色 10 min。荧光显微镜下观察、拍照和分析。

## 3 结果

通过彗星电泳实验检测各组小鼠肝脏 DNA 的损伤情况，结果如图 8 所示。通过观察发现 IMP 给药 *db/db* 小鼠的细胞核 DNA 出现明显的拖尾现象，表明 DNA 链不稳定性增加，遗传物质出现损伤。在正常对照组，IMP 给药低、中、高剂量正常对照组和 *db/db* 模型鼠中均未观察到 DNA 拖尾现象，由此可见，在正常小鼠肝脏内，IMP 给药并不会引起其核内 DNA 严重损伤，而 IMP 给药 *db/db* 鼠会使其肝细胞 DNA 链断裂，显示较强的促癌活性。该结果提示 IMP 对不同体质的小鼠造成的影响程度不同，只有瘦素受体缺陷体质加上 IMP 的额外刺激才会造成 DNA 的严重损伤。IMP 给药后，*db/db* 小鼠的 NAFLD 向 HCC 发展，这与该组出现 NAFLD-LC 的表型相印证。

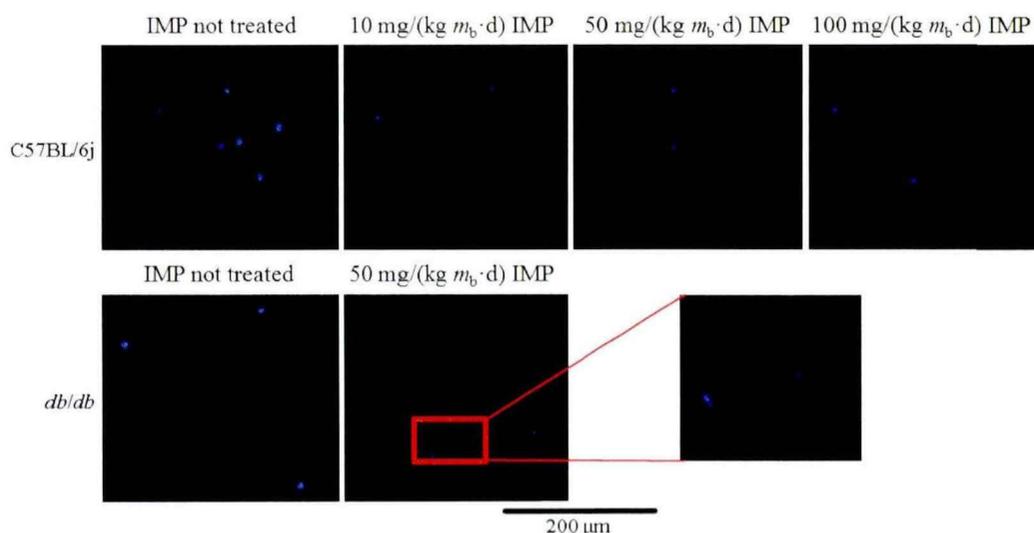


图 8.正常组及 IMP 给药各组、*db/db* 组和 IMP 给药 *db/db* 组小鼠肝细胞 DNA 彗星电泳图。

## 讨论

对比课题组前期用 50 mg/(kg  $m_b \cdot d$ ) 剂量 IMP 给药 *db/db* 鼠, 造成其体内血脂含量显著升高, 肝脏脂质严重蓄积并显示出现肝硬化病理特征的情况, 发现 IMP 按照 10, 50, 100 mg/(kg  $m_b \cdot d$ ) 剂量灌胃给药正常小鼠后, 小鼠血脂和肝脂含量呈现上升趋势, 但没有出现严重的高脂血症症状和肝损伤。肝组织油红 O 切片染色和体脂率测量结果表明, 高剂量 IMP 摄入会引起正常小鼠肝脏脂质的蓄积, 造成轻度的 NAFLD。Paola Toledo-Ibelles 等人在患有 NAFLD 的兔子肝组织中发现次黄嘌呤显著增加及嘌呤代谢变化异常<sup>[38]</sup>。结合我们的发现, 表明无论是体外补充额外补充嘌呤核苷酸类化合物还是体内嘌呤核苷酸类物质的自主蓄积, 都可能会引发 NAFLD。

IMP 给药后, 各组小鼠中肝脏和血清中的乙酰辅酶 A 含量随着 IMP 给药剂量的增大而升高, 该结果与前期 IMP 给药 *db/db* 小鼠造成其乙酰辅酶 A 含量显著上升的结果相符, 表明 IMP 刺激会造成体内乙酰辅酶 A 的蓄积。IMP 低、中剂量对小鼠肝脏影响相对较小, IMP 高剂量造成肝脏内一定的脂质蓄积, 为 NAFLD 发展的早期阶段。可以看出, IMP 以低、中剂量给药正常小鼠四个月, 尚未达到病理特征明显稳定的 NAFLD 模型条件, 高剂量摄入 IMP 对正常小鼠肝脏带来损害, 造成一定的脂质蓄积, 可作为 NAFLD 的早期模型进一步开发。

在彗星电泳实验中, 我们观察到在 IMP 的刺激下, *db/db* 小鼠肝细胞出现 DNA 拖尾现象, 表明 IMP 具有诱发 *db/db* 小鼠 HCC 的活性。IMP 引起 *db/db* 小鼠 DNA 损伤反应 (DDR) 促进癌变, 对 NAFLD 形成“多重打击”与其肝硬化的表型相符。IMP 给药正常小鼠并未造成 DNA 拖尾现象, 表明正常小鼠肝细胞 DNA 未出现损伤, IMP 对正常体质小鼠的危害性较小, 无促癌倾向。

IMP 作为常见的食品添加剂, 在我们日常饮食中随处可见, 虽然食品安全生管理产办法中未对其用量进行明确规定, 但上述发现提示我们, 在日常饮食中应注意 IMP 的每日摄入量。肥胖及代谢综合症人群在日常饮食中应严格注意 IMP 的摄入总量, 注意高嘌呤食物的摄入量, 尽量避免 IMP 等食品添加剂的使用, 以免对身体造成不利影响。

## 第二章 IMP 引起 *db/db* 小鼠和正常小鼠肝脏脂质蓄积的机制研究

### 引言

在前期研究中，我们发现 IMP 可以与 AMPK $\gamma$ 1 亚基形成稳定的复合体，通过促进 AMPK 的磷酸化而活化 AMPK 通路，加速脂肪酸 $\beta$ 氧化反应使得 IMP 在体外显示较强的降脂活性，在体内促进 *db/db* 小鼠肝脏乙酰辅酶 A 的蓄积导致 TG 合成加剧并沉积在肝脏内恶化 NAFLD。本实验通过 AMPK 抑制剂靶向干扰 AMPK，利用油酸诱导的高脂 HepG2 细胞模型进一步验证 IMP 的作用靶点。

为进一步探究 IMP 造成正常小鼠肝脏一定脂质蓄积的原因，我们采用 Western Blot 技术测定正常小鼠肝脏脂代谢通路中的相关蛋白的表达情况。

第一章结果表明，IMP 以低、中剂量给药正常小鼠对小鼠肝脏脂质蓄积造成的影响较轻，高剂量 IMP 给药造成正常小鼠肝脏内脂质的一定蓄积，属于早 NAFLD。与前期实验结果相比，IMP 给药对正常小鼠的危害整体小于对 *db/db* 小鼠。IMP 给药造成两种体质小鼠 NAFLD 的原因和机制值得我们深入探究，但生物体代谢过程复杂，信号通路繁多，AMPK 代谢通路只是糖脂代谢通路中的一条，因此我们借助蛋白质组学技术获得全面的差异蛋白质表达谱，通过比较不同样品中蛋白质表达的相对含量来进一步分析和探究。

利用该技术对正常组小鼠，IMP 给药高剂量组正常小鼠及前期实验中的 *db/db* 小鼠和 IMP 诱导的 *db/db* 小鼠的肝脏进行蛋白质组学检测，结合生物信息学技术筛选出差异蛋白质参与的生物学过程，有助于进一步明确 IMP 造成两种体质小鼠 NAFLD 发生和恶化的分子机制及造成两种体质肝脏影响差别原因，同时也为发现潜在的 NAFLD 诊断标志物提供分子水平的理论指导依据。

### 第一节 通过 AMPK 抑制剂反向验证 IMP 的作用靶点

#### 1 实验材料与设备

##### 1.1 细胞系

HepG2 细胞 北京协和医学院细胞库

##### 1.2 试剂及原料

DMEM 高糖培养基 美国 HyClone

PBS 缓冲溶液 天津灏洋生物

0.25%胰蛋白酶	美国 HyClone
青霉素-链霉素	北京博奥龙
胎牛血清 FBS	美国 Gibco Life Technologies
油酸	北京化工厂
洛伐他汀	美国 Sigma-Aldrich
bodipy493/503	美国 Thermo Fisher
AMPK 抑制剂	美国 Med Chemexpress

### 1.3 仪器与设备

双人单面超净工作台	苏州净化
恒温水浴锅	上海昕仪
低速离心机	湖南凯达科技
荧光倒置显微镜	美国 OPLENIC

### 1.4 溶液的配制（超净台中进行）

## 2 实验方法

为验证 IMP 的作用靶点是否为 AMPK，使用 AMPK 抑制剂靶向抑制 AMPK 通路，继而观察 IMP 的降脂作用是否受到影响，进一步确证 IMP 的作用靶点。

### 2.1 溶液配置

#### (1) 配制 50 mL 完全培养基

取 50 mL 无菌离心管放入超净台中紫外照射 30 min，倒入基本培养基 45 mL，取室温融化的胎牛血清 5 mL 和双抗 500  $\mu$ L 依次加入，盖紧盖子，轻摇使液体混合均匀，标记好日期、名称，用封口膜封口，置于 4°C 冰箱储存。

#### (2) 配置油酸造模液

用分析天平准确称取 0.1 g BSA、0.056 g 氢氧化钾放入 15 mL 离心管中，加入 10 mL PBS，待固体溶解混匀后加入 31.6  $\mu$ L 的油酸，0.22  $\mu$ m 无菌滤膜过滤后分装于 1.5 mL 离心管中。此溶液即为 10 mM 油酸储存液。使用时用 DMEM 基本培养基稀释成 100  $\mu$ M 油酸工作液。

#### (3) 配制 AMPK 抑制剂

将 5 mg AMPK 抑制剂粉末轻轻离心，加入 1.2516 mL DMSO，80°C 金属浴溶解，超声助溶，配置成 10 mM AMPK 抑制剂储存液，0.22  $\mu\text{m}$  无菌滤膜过滤后 200  $\mu\text{L}$  分装保存，锡箔纸包裹，随后放于 -80°C 冰箱储存。使用时用 DMEM 基本培养基稀释成 10  $\mu\text{M}$  AMPK 抑制剂工作液。

#### (4) 配制 IMP 工作液

准确称取 0.039 g IMP 标准品溶解于 1 mL 无菌水中，0.22  $\mu\text{m}$  无菌滤膜过滤后得到 100 mM IMP 工作液，储存于 -20°C 冰箱。使用时用 DMEM 基本培养基稀释成 10  $\mu\text{M}$  IMP 工作液。

#### (5) 配制洛伐他汀标准品母液

准确称取洛伐他汀粉末 0.0022 g 于离心管中，用 272  $\mu\text{L}$  的 DMSO 溶解，即得 10 mM 洛伐他汀标准品母液，储存于 -20°C 冰箱。使用时用 DMEM 基本培养基稀释成 10  $\mu\text{M}$  洛伐他汀工作液。

## 2.2 细胞复苏

提前 30 min 进入细胞间，打开紫外灯照射超净台。同时打开水浴锅，预热培养基。取出冻存于液氮中的 HepG2 细胞，放入自封袋内，将自封袋置于 37°C 水浴锅中快速升温融化，将融化后的冻存管表面喷洒酒精后移至超净台中，将细胞液转移至 15 mL 离心管中，在离心管中迅速加入 3 mL 预热至室温的基本培养基，移液枪轻轻吹打混匀。吹打后，置于离心机内以 1000 rpm 转速离心 5 分钟。离心后迅速弃去上清液。加入 1 mL 含有 10% FBS 和 1% 双抗的完全培养基，移液枪多次轻柔吹打后转移至细胞培养瓶中，补加 4 mL 完全培养基。拧好瓶盖，并注意留有一定的空隙保证细胞正常呼吸。左右轻轻摇晃，混匀细胞。随后在细胞培养瓶底部标记好相应的细胞名称、培养时间，置于恒温培养箱中培养。第二日，于显微镜下观察细胞生长状态和贴壁情况，及时进行换液或传代。

## 2.3 细胞传代

从培养箱中取出细胞，于显微镜下观察细胞状态，当细胞生长到 70~80% 时，进行细胞传代。打开紫外灯照射超净台 30 min 以上。将完全培养基、分装好的胰蛋白酶、PBS 放入 37°C 水浴锅中回温。弃掉细胞培养瓶中旧液，加入 3 mL 无菌 PBS 左右混匀清洗细胞，弃清洗液，加入 1 mL 胰酶，在培养瓶中左右轻轻摇匀，置于培养箱中消化，1 min 后取出并于显微镜下察看细胞形态，当细胞变得又亮又圆，轻磕培养瓶发现大片细胞脱落时，立即加入 3 mL 完全培养基终止消化。用移液枪

将细胞从瓶上轻轻吹下来，随后转移至 15 mL 离心管中，1000 rpm 离心 5 分钟，弃旧液，加入 3 mL 完全培养基，重复吹打混悬细胞，取 1 mL 细胞混悬液分别加入到三个培养瓶中，随后补加 4 mL 完全培养基，标记好细胞名称和时间。

## 2.4 细胞铺板

取状态良好且处于对数生长期的 HepG2 细胞，加入 1 mL 胰蛋白酶进行消化，随后按照上述传代步骤得到细胞混悬液。将得到的细胞混悬液转移至 50 mL 离心管中，摇匀后进行细胞计数。根据细胞计数结果适当稀释，将细胞密度控制在  $1 \times 10^4$  个/mL，将细胞接种于 96 孔细胞培养板中，每孔 200  $\mu$ L 悬液。盖好培养板的盖子，做好标记后左右轻轻晃匀，置于培养箱中继续培养。

## 2.5 换液加药

当 96 孔板细胞生长到 70 % 时，开始加药。吸弃板中的旧液，加入 200  $\mu$ L PBS 清洗一次。弃去 PBS 后，分别在 AMPK 抑制剂处理组和未加抑制剂的对照组中加入基本培养基配置的 10  $\mu$ mol/L AMPK 抑制剂工作液 200  $\mu$ L 和添加千分之一的 DMSO 的基本培养基 200  $\mu$ L。细胞培养箱内 37°C 培养 8 小时后弃去培养液。PBS 清洗后，分别将两种处理的细胞分为四组：空白组，模型组，阳性药对照组，IMP 给药组。各组加入 200  $\mu$ L DMEM 基本培养基，100  $\mu$ mol/L 油酸，10  $\mu$ mol/L 洛伐他汀和 100  $\mu$ mol/L 油酸混合液，10  $\mu$ mol/L 的 IMP 和 100  $\mu$ mol/L 油酸混合液。随后置于细胞培养箱中培养约 24 h。

## 2.6 Bodipy 染色

每孔用 200  $\mu$ L 的 PBS 清洗 1 次，弃去 PBS，每孔加入 100  $\mu$ L 的 4% 多聚甲醛常温固定细胞 30 min，于摇床上轻轻摇晃。弃去多聚甲醛后，每孔加入 100  $\mu$ L 的 Bodipy 工作液染色，置于 37°C 恒温箱中避光孵育 30 min。弃去染液后用 PBS 清洗三次，每次摇床摇晃 5 min。荧光显微镜下观察并拍照。

## 3 结果

细胞中的脂质被 Bodipy 493/503 染色后，会呈现出绿色荧光。因此，观测细胞产生的荧光强度可以直观反映化合物的降脂活性强弱。如图 9 所示，在添加 0.1% DMSO 的未加 AMPK 抑制剂的培养体系内，IMP 给药组的降脂活性显著高于同等浓度的洛伐他汀组，和已报道的未添加 DMSO 培养体系内 IMP 的降脂活性相似。10  $\mu$ mol/L 的 AMPK 抑制剂导致 AMPK 失活的情况下，IMP 的降脂活性明显低

于同等浓度的洛伐他汀,此外,抑制剂导致 AMPK 失活对洛伐他汀的降脂活性无显著影响。这些研究结果证明了 AMPK 是 IMP 加速脂肪酸 $\beta$ 氧化形成乙酰辅酶 A 蓄积诱导 *db/db* 小鼠 NAFLD 恶化的作用靶点。

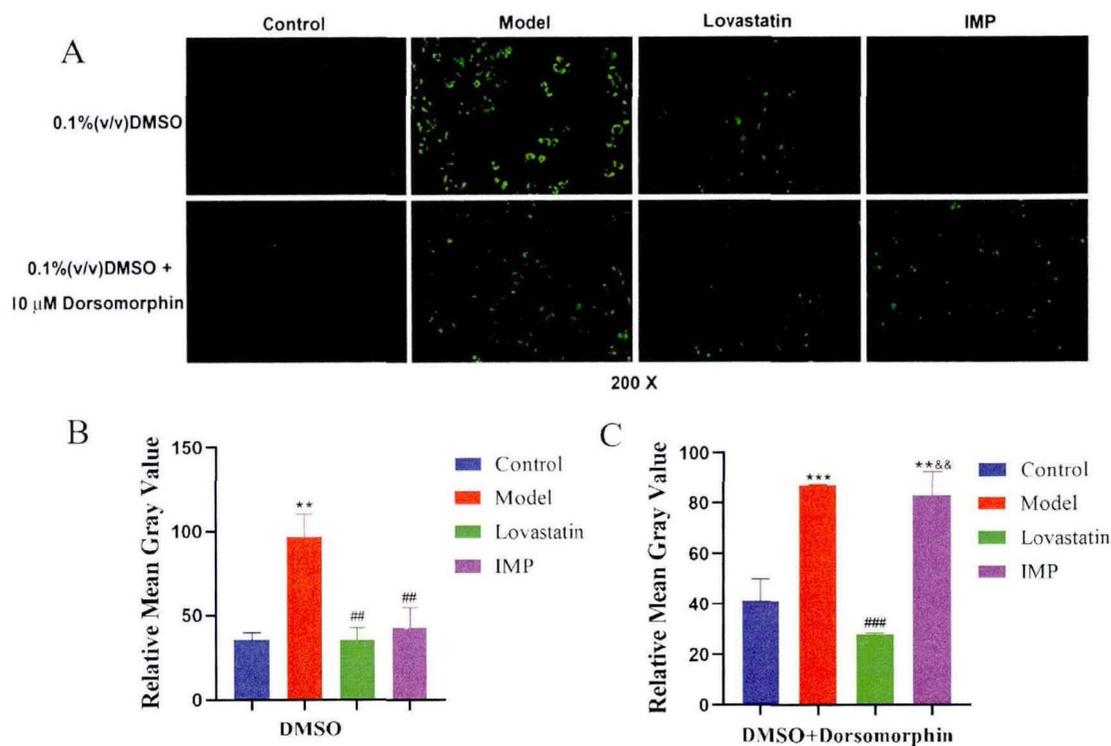


图 9. A:油酸诱导的 HepG2 细胞内 AMPK 抑制剂对 IMP 降脂活性的影响; B: 添加 0.1%DMSO 组细胞荧光强度值; C:添加 AMPK 抑制剂组细胞荧光强度值。(与 Control 相比\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 Model 相比## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ ,与 Lovastatin 相比, && $P < 0.01$ , )

## 第二节 Western Blot 检测小鼠肝脏脂代谢通路蛋白表达

### 1 试验材料与设备

#### 1.1 试剂及原料

脱脂奶粉	美国 Becton Dickinson
BCA 试剂盒	美国 Thermo
蛋白磷酸酶抑制剂混合物 (100×)	北京索莱宝
RIPA 裂解液(strong)	北京康为世纪生物科技有限公司
增强型 ECL 化学发光试剂	大连美仑生物技术有限公司
标准分子量预染彩虹 Marker	大连美仑生物技术有限公司
SDS-PAGE 电泳预制胶	GenScript 公司
SDS-PAGE 电泳缓冲液粉末	GenScript 公司
PVDF 转印膜	美国默克密理博
GAPDH 兔多克隆抗体	美国 Cell Signaling TECHNOLOGY
山羊抗兔 IgG (H+L)	北京博奥龙
Phospho-AMPK $\alpha$ 兔多克隆抗体	美国 Cell Signaling TECHNOLOGY
AMPK $\alpha$ 兔多克隆抗体	美国 Cell Signaling TECHNOLOGY
Phospho-Acetyl-CoA Carboxylase 兔抗	美国 Cell Signaling TECHNOLOGY
Acetyl-CoA Carboxylase 兔抗	美国 Cell Signaling TECHNOLOGY
Acetyl-CoA Carboxylase1 兔抗	美国 Cell Signaling TECHNOLOGY
Anti-Adipose Triglyceride Lipase 兔抗	美国 Abcam 公司

#### 1.2 仪器与设备

台式多用途高速冷冻离心机	广州吉迪仪器有限公司
电泳仪	美国 Bio-Rad
制冰机	杭州亿捷科技有限公司
多功能成像分析系统	上海琴翔科学技术有限公司

#### 1.3 实验对象

正常对照组、IMP 给药低、中、高剂量组小鼠肝脏

## 2 实验方法

### 2.1 溶液配制

#### (1) RIPA 工作液

取 RIPA 裂解液 (strong) 19.6 mL+100x 蛋白酶抑制剂 200 $\mu$ L+100x 磷酸酶抑制剂 200 $\mu$ L, 注意现用现配, 配完立即使用。

#### (2) BCA 蛋白定量工作液

取 15 mL 离心管, 按照 50:1 比例吸取 A:B 试剂, 混匀后用锡箔纸包被, 现用现配, 使用时避光。

#### (3) 预制胶电泳液

将一袋 Tris-MOPS-SDS 预制胶粉末倒入大烧杯, 量筒取 1000 mL 蒸馏水, 转移大烧杯中, 玻璃棒搅匀, 室温放置。

#### (4) 转膜液

称取 Tris 碱粉末 3.03 g、甘氨酸粉末 14.4 g 倒入量筒, 加入 10% SDS 溶液 1 ml, 无水甲醇 200 mL, 蒸馏水定容至 1000 mL。

#### (5) 封闭液

称取 5 g 脱脂奶粉, 加入 TBST 定容至 100 mL, 置-20 $^{\circ}$ C 储存。

#### (6) TBST 缓冲液

称取氯化钠 8.8 g 于烧杯中, 加入 10 mL 的 1 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mL Tween 20 溶液, 蒸馏水定容至 1000 mL, 常温储存。

#### (7) 抗体的配制

按照说明书的稀释比例用封闭液进行配置, 注意置-20 $^{\circ}$ C 储存。

GAPDH 兔多克隆抗体	1: 5000
山羊抗兔 IgG (H+L)	1: 5000
P-AMPK $\alpha$ 兔多克隆抗体	1: 1000
AMPK $\alpha$ 兔多克隆抗体	1: 1000
P-ACC 兔多克隆抗体	1: 1000

ACC 兔多克隆抗体	1: 1000
AAC1 抗体	1: 1000
ATGL 抗体	1: 1000

#### (8) 发光液的配置

增强型 ECL 工作液由 A、B 两种液体组成，1:1 等体积混合配置，避光保存。

## 2.2 蛋白样品的制备

从-80 °C的冰箱中取出各组小鼠肝组织，置入冰上解冻，迅速称取 0.1 g 组织加入配好的 1 mL RIPA 裂解液中，用剪刀将组织剪碎，随后置于匀浆机上低温匀浆，冰水浴中超声 30 min。提起打开离心机预冷，将转子冻于-20 °C。随后将离心机温度设置为 4 °C、转速调节为 12000 rpm，离心 15 min。离心后，小心吸取 400  $\mu$ L 透明上清液于新离心管中，即组织蛋白，加入 400  $\mu$ L 的 2 $\times$ protein sample buffer。打开高温金属浴，温度调节为 100 °C。将离心管放入金属浴中，煮 10 min，使蛋白变性。待蛋白样品自然冷却至室温，将样品分装于冰箱冷冻保存。

## 2.3 蛋白含量的测定

按前面所述方法配置好 BCA 工作液，取 0.5 mg/mL 的 BSA 母液，蒸馏水稀释，使其终浓度分别为 0.5 mg/mL、0.25 mg/mL、0.125 mg/mL、0.0625 mg/mL、0.03125 mg/mL、0 mg/mL。向 96 孔酶标板中加入工作液 200  $\mu$ L/孔，再分别加入 25  $\mu$ L 稀释好的标准品，用来制作蛋白标曲。将肝脏组织样品稀释十倍，取 25  $\mu$ L 待测样品加入 200  $\mu$ L 工作液中，每个样品重复三次。将处理好的 96 孔板放入提前调整至 37 °C 的恒温箱中孵育 30 min。随后放入酶标仪，设置波长为 552 nm，测定每孔吸光度值。

## 2.4 SDS-PAGE 电泳

取 4 %-12 %的梯度预制胶，打开外包装后拆下预制胶底部塑料贴条，将预制胶用卡槽夹好后放入电泳槽中，加入电泳缓冲液使其没过电泳槽电极。随后小心拔出预制胶的梳子，确保电泳液没入孔道且孔道中无气泡。根据蛋白质定量的结果调整蛋白上样量使每个样品中均含有 30  $\mu$ g 的蛋白。用 20  $\mu$ L 移液枪上样，在胶的最左侧加如彩虹 Marker 3  $\mu$ L。打开电泳仪，设置电压 100 V，蛋白样品跑至浓缩胶后重新调节电压为 120 V，继续电泳至样品跑到预制胶底部后暂停电泳，关闭电源，准备转膜操作。

## 2.5 转膜

根据电泳凝胶大小裁剪 PVDF 膜，甲醇活化 15 S，取一干净托盘，倒入转膜液，将 PVDF 膜放入转膜液中漂洗，取 4 张滤纸、2 张海棉，泡入转膜液中。取转膜夹子，打开后按照黑色朝下、白色朝上的顺序在转膜盒中摆放。取一张浸泡过的海绵平铺在黑面上，叠铺两张滤纸，注意不要有小气泡，可用离心管来回滚动排除气泡来保证转膜效果。将预制胶撬开，拿掉单侧板子后，切掉浓缩胶后根据 Marker 指示将不需要的部分切掉，小心剥下分离胶，在转膜液中舒展分离胶后使其平铺于滤纸上，保证 Marker 在右侧，同时注意排赶气泡，将活化后的 PVDF 平铺于胶上，保证 PVDF 膜盖过胶面并排赶气泡，随后在膜上叠加两张滤纸再盖上一张海棉。对齐后，合上夹子，按照黑对黑，白对红的顺序，放入转膜槽中，同时放入一盒冰袋，将转膜液倒入转膜槽。将转膜槽放入加入冰袋的水盆中，接通电源，300 mA 恒流，小分子量蛋白转膜 55 min，大分子量蛋白转膜 5 h。

## 2.6 免疫反应

转膜结束后，参考 Marker 的位置进行裁膜，随后放入抗体孵育盒中，加满封闭液，常温下封闭 2 h，并于水平摇床上轻轻摇动。封闭结束后，将提前配好的一抗加到相应的槽内，同时在抗体孵育盒上做好标记。将孵育盒放入左右摇晃的摇床上，将摇床置入 4°C 冰箱，过夜孵育。转天，将孵育盒从冰箱拿出。将抗体分别回收，用 TBST 清洗膜，15 分钟×3 次后弃去 TBST。于室温下用二抗在水平摇床摇动孵育 1.5 h，回收二抗，TBST 洗膜，15 min×3 次。

## 2.7 化学发光、显影、定影

洗膜结束后进行化学发光反应，根据膜的多少，配制一定量的 ECL 工作液。将爆片仪打开，预冷到 -30°C 方可进行工作。将膜置于黑板上，蛋白面朝上，将发光液均匀滴加在膜上，同时轻轻晃匀，使发光液完全覆盖在膜上。放入仪器内，选择化学发光，超高灵敏度，自动曝光，显影、拍照、保存照片。

## 2.8 凝胶图像分析

用 Image J 软件，进行条带灰度扫描，计算相对强度进行分析。

## 2.9 统计分析

将扫描的灰度值结果表示为平均值 (mean) 士标准偏差 (SD)，GraphPad Prism 8.0.1 软件用于统计分析，单因素方差分析，Tukey's 检验，分析各组间统计学差异，组间差异按 2.6 所述方式标注。

### 3 结果

在真核细胞中,腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)在调节细胞能量平衡中起着重要作用。AMPK 响应细胞内腺嘌呤核苷酸水平的变化,AMP 可触发 AMPK 的变结构激活,促进 Thr172 位点的磷酸化并抑制去磷酸化,磷酸化后的 AMPK 促进糖、脂质等代谢通路活化<sup>[39]</sup>。IMP 作为 AMP 的结构类似物,可以与 AMPK 形成复合体,促进 AMPK 的磷酸化<sup>[21]</sup>。小鼠肝脏中 Western Blot 结果如图 10 所示,低、中、高剂量 IMP 给药 C57 正常小鼠肝脏内 AMPK 的磷酸化水平均显著增加,这与 IMP 给药 *db/db* 小鼠的结果一致,表明 IMP 激活小鼠肝脏内 AMPK 信号通路。

脂肪甘油三酯脂肪酶(ATGL)催化细胞内甘油三酯的水解,释放脂肪酸供机体能量代谢<sup>[40]</sup>。与正常组相比,正常小鼠低、中、高剂量组的 ATGL 表达量提高,表明 IMP 给药后小鼠肝脏内脂肪分解过程被促进。这与我们之前用 IMP 给药 *db/db* 小鼠的结果不同,IMP 给药后促进了正常小鼠的 ATGL 表达,而对 *db/db* 小鼠的 ATGL 无影响,这解释了 IMP 给药正常小鼠未造成同给药 *db/db* 小鼠肝脏内严重 NAFLD 的原因,IMP 促进了正常小鼠肝脏甘油三酯的分解,因而未造成肝脏内严重的脂质蓄积。乙酰辅酶 a 羧化酶(ACC)是催化合成脂肪酸底物丙二酰辅酶 a 的关键调节分子,在调控机体能量代谢中发挥着重要作用<sup>[41]</sup>。在哺乳动物中发现了 ACC 的两种亚型,一种是 ACC1 (ACC $\alpha$ , 265 kDa),定位于细胞质中,多表达在肝脏和脂肪组织中。另一种是 ACC2 (ACC $\beta$ , 275 kDa)定位于线粒体中,多表达在心脏和骨骼肌。与正常组相比,IMP 给药低、中、高剂量组小鼠 ACC1 的表达量显著提高,IMP 给药高剂量组 ACC2 及总磷酸化 ACC 显著提高,表明 IMP 给药促进了小鼠肝脏内脂肪酸的合成。以上结果表明,IMP 给药促进正常小鼠肝脏内脂质的分解代谢以及脂肪酸的合成,肝脏内脂质代谢处于亢进状态。

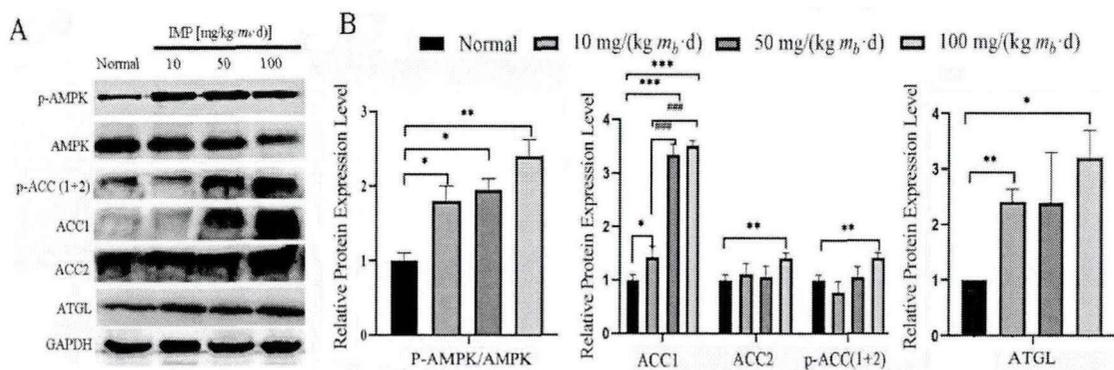


图 10.WB 法测定各组小鼠肝脏内 AMPK、ACC 表达量和磷酸化水平及 ATGL 的表达量变化(组间差异按 2.6 所述方式标注)

### 第三节 基于 TMT 蛋白质组学探究 IMP 促进不同体质小鼠

#### NAFLD 发生恶化的机制

##### 1 试验材料与设备

###### 1.1 试剂及原料

碳酸氢铵、TEAB、甲酸	美国 Sigma-Aldrich
尿素、二硫苏糖醇 DTT、碘代乙酰胺 IAM	美国 Amresco
蛋白定量染液	北京华兴博创
牛血清白蛋白	美国 Thermo Scientific
胰蛋白酶	北京普洛麦格
Ziptip	美国 Millipore
乙腈	美国 J.T.Baker
氨水	日本 Wako Pure Chemical Industries Ltd
TMT10plex™ Isobaric Label Reagent Set	美国 Thermofisher
XBridge Peptide BEH 5um C18 色谱柱	美国 waters

###### 1.2 仪器与设备

RIGOL L-3000 高效液相色谱系统	美国 Sigma-Aldrich
涡旋振荡器	美国 SCILOGEX
真空离心浓缩仪	北京吉艾母科技有限公司
电热恒温水浴锅	北京市光明医疗仪器有限公司
超低温四度离心机	德国 Eppendorf
酶标仪	德朗 DR200B
电泳系统	美国 BIO-RAD
高通量组织研磨器	上海贺帆仪器有限公司
超声破碎仪	上海沪析实业有限公司

##### 2 实验方法

基于 TMT 蛋白质组学方法，通过筛选正常对照组与 IMP 高剂量给药正常小鼠组、*db/db* 模型组与 IMP 给药 *db/db* 小鼠组、正常对照组与 *db/db* 模型组小鼠肝脏差异表达蛋白质，结合生物信息学探索 IMP 给药对两种不同体质小鼠的影响通路，寻

找 IMP 在 NAFLD 进展过程中涉及到的关键通路，并基于以往相关研究，筛选出有进一步研究价值的差异蛋白，探讨其作为新的 NAFLD 标志物及恶性进展评估指标的潜在可能。

## 2.1 样品处理

取出储存于-80℃冰箱的八月龄正常对照组、*db/db* 模型组、IMP 给药 *db/db* 组和 IMP 给药正常对照组各三只小鼠肝脏组织，放在冰上解冻。解冻后准确称取 0.1 g 肝脏组织，放入预冷 EP 管中，加入 300  $\mu$ L 8M 尿素，冰水浴中超声 1 s，停 2 s，累计 120 s，4℃ 14000 g 离心 20 min，取上清进行蛋白定量，采用 SDS-PAGE 电泳进行质控。将提取的 100  $\mu$ g 蛋白加入终浓度为 10 mM DTT 溶液，30℃ 水浴 1 h，之后恢复室温，加入终浓度为 40 mM 的 IAM，室温静置 45 min。用 25 mM 碳酸氢铵将样本稀释 4 倍。按照 50:1 的比例加入蛋白和胰酶，37℃ 过夜。转天加入 50  $\mu$ L 0.1% 的 FA 进行终止。取 100  $\mu$ L 100% ACN 清洗 C18 柱，1200 rpm 离心 3 min，之后用 100  $\mu$ L 0.1% FA 清洗一次，1200 rpm 离心 3 min。更换 EP 管，加入样品，1200 rpm 离心 3 min。用 100  $\mu$ L 0.1% FA 清洗柱子，1200 rpm 离心 3 min。取 100  $\mu$ L PH 10 的水清洗一次。更换 EP 管，用 70% ACN 洗脱。取洗脱液，冻干。取样进行 TMT 标记，标记操作过程按照 TMT 生产厂家的说明进行。标记后的样品等量混合后，使用 Sep-Pak C18 除盐。真空抽干，利用 high PH 反向色谱分离法分级分离混合样品。真空抽干，存于-80℃ 冰箱，准备上机检测。

## 2.2 质谱检测

质谱数据使用 Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪串联 EASY-nLC 1200 液相的液质联用系统进行采集。

## 2.3 数据分析

质谱数据通过 Max Quant (V1.6.6) 软件进行检索，采用的数据库检索算法是 Andromeda。检索使用的数据库是 Uniprot 中 Mouse 的蛋白质组参考数据库。主要检索参数如下：项目类型选 TMT；可变修饰选 Oxidation (M), Acetyl (Protein N-term)；固定修饰 Carbamidomethyl；酶切选 Trypsin/P；一级质谱匹配容差在初次检索中设置为 20 ppm，主要检索中设置为 4.5 ppm；二级质谱匹配容差设置为 20 ppm。检索结果以蛋白和肽段水平 1% FDR 为标准进行筛选，删去反库蛋白、污染蛋白、只有一个修饰肽段的蛋白条目，余下的鉴定信息用作后续分析。

## 2.4 生信分析

### (1) 差异蛋白筛选

将得到的差异蛋白筛选定量值，中值归一化后用 *perseuse* 进一步归一化，得到最后结果。样品的重复次数大于等于 3 次，直接采用 *t-test* 进行差异分析。当 *P* 值小于 0.05 时，将差异蛋白表达变化量 (fold change, FC) 1.2 作为变化阈值， $FC > 1.2$  为上调差异表达蛋白， $FC < 1/1.2$  (0.833) 为下调差异表达蛋白。

### (2) GO 分析

使用 GO 数据库，将基因按照其参与的生物过程 (Biological Process, BP)、细胞组分 (Cellular Component, CC)，分子功能 (Molecular Function, MF) 三个方面进行分类注释。本部分研究通过 *Inter ProScan* 软件对小鼠肝脏组织中鉴定到的差异表达蛋白进行分类注释和统计分析。

### (3) KEGG 分析

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 是指京都基因与基因组百科全书。将各组小鼠肝脏中的鉴定蛋白与差异蛋白数据上传至 KEGG 网站，使用 KEGG 在线服务工具 KAAS 注释差异表达蛋白，后续通过 KEGG mapper 软件将差异表达蛋白富集到对应的通路中，得到所有通路的 map 结果。

### (4) 相互作用分析

以本实验中筛选到的差异表达蛋白进行网络构建，寻找这些差异蛋白的相互关系以及可能处于的功能群。分析使用 STRING 在线软件 (<https://string-db.org/Version:11.0>)，分析选到的蛋白质的相互关联的紧密程度并提取出目标蛋白的互作关系构建网络。

## 3 结果

### 3.1 鉴定蛋白的评估和统计分析

本次实验质谱分析共得到 369462 个二级谱图 (Total spectra)，经数据库搜索，可得 137399 有效谱图数 (Matched spectrum)，54163 个鉴定到的肽段总数 (Peptide)，其中，鉴定到的蛋白质总数 (Identified protein) 为 5889 个，如下表所示。鉴定蛋白质的理化性质反应了在肽段推导蛋白的过程中以及蛋白质组样品的鉴定情况，从蛋白质匹配的肽段数分布、蛋白质匹配的 PSM 数目分布、鉴定蛋白质的分子量分布、鉴定蛋白被肽段覆盖率的分布这四个方面对试验样本进行鉴定。反应肽段的蛋白质鉴定效率和蛋白质鉴定的重复性。从结果可看出，平均每个蛋白匹配的肽段较少，说明肽段的蛋白质鉴定效率较高。由于 PSM 数目可以用于图谱计数的定量，这项指标显示了不同蛋白质丰度水平的蛋白质的数量分布。鉴定蛋白质的分子量分布，反应整体鉴定到的蛋白的分子量的分布情况，大部分蛋白分子量大小集中在

0~200KDa 范围内。鉴定蛋白被肽段覆盖率指标能显示蛋白质被鉴定的情况,覆盖率越高,越有利于解释蛋白质的异构体,检测结果显示蛋白质被肽段覆盖率良好,检测结果可靠。

表 2. 蛋白质鉴定结果统计

name	Total spectra	Matched spectrum	peptide	Identified protein
Total	369462	137399	54163	5889

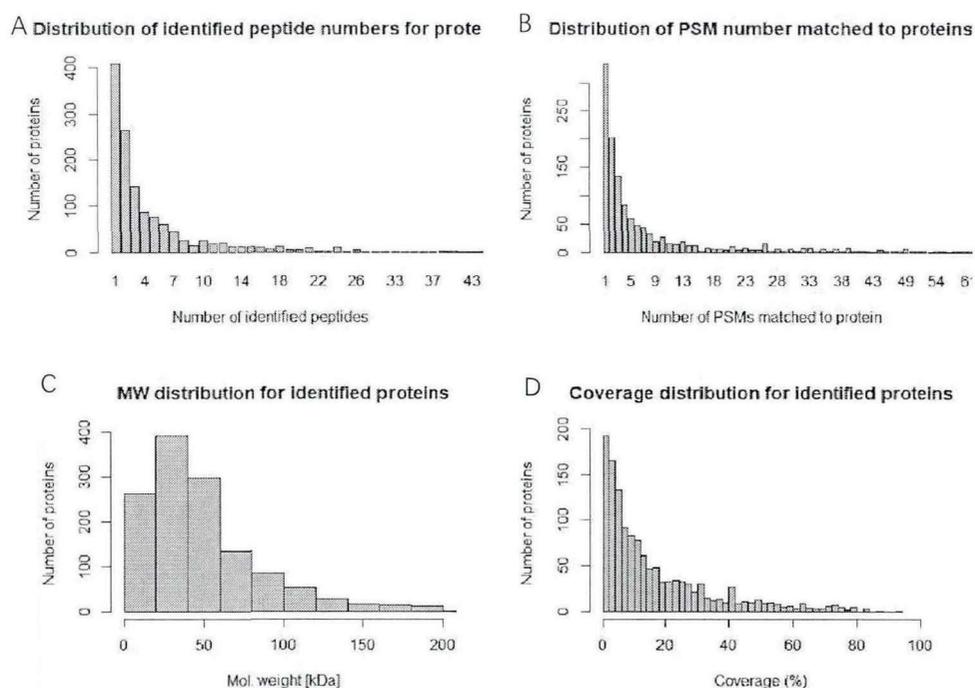


图 11.A:为蛋白匹配到的肽段数目统计图;B:为蛋白质匹配的 PSM 数目分布统计图;C:为蛋白分子量分布统计图;D:为鉴定蛋白的肽段覆盖率分布统计图。

### 3.2.1 正常对照组与 IMP 给药正常对照组差异蛋白统计分析

使用 R 语言中 `t.test` 函数计算样本间差异显著性  $p$  值,本实验中,显著差异表达蛋白的筛选标准为:  $p < 0.05$  且  $FC < 0.83$  或  $FC > 1.20$ 。正常对照组与 IMP 给药正常对照组差共富集到 27 个差异蛋白,其中上调蛋白 4 个,下调蛋白 23 个,表 2 为两组小鼠肝脏差异蛋白统计。

与正常对照组相比,IMP 给药正常对照组共有四个差异蛋白显著上调,分别是铁调素 (HEPC)、磺基转移酶 1A1 (ST1A1)、单酰基甘油脂肪酶 (ABHD2)、超长链脂肪酸延伸蛋白 5 (ELOV5)。IMP 给药后下调的 23 个蛋白中大多是补体成分相关蛋白,如补体成分 C8 链 (CO8A)、补体成分 5 (CO5)、补体成分 9 (C9)、补体因子 (CFAH)、补体成分 C4 (CO4B) 等。

表 3.正常对照组与 IMP 给药正常对照组差异蛋白统计分析

Accession	Symbol	Description	Ratio	p-Value
Q9EQ21	HEPC	Hepcidin	1.2	0.0257
P52840	ST1A1	Sulfotransferase 1A1	1.26	0.0331
Q9QXM0	ABHD2	Monoacylglycerol lipase ABHD2	1.3	0.0353
Q8BHI7	ELOV5	Elongation of very long chain fatty acids protein 5	1.24	0.0436
Q8K182	CO8A	Complement component C8 alpha chain	0.79	0.0024
A6X935	ITIH4	Inter alpha-trypsin inhibitor, heavy chain 4	0.78	0.0049
P06684	CO5	Complement C5	0.81	0.0069
P06909	CFAH	Complement factor H	0.82	0.0081
P06683	C9	Complement component C9	0.78	0.0091
Q61646	HPT	Haptoglobin	0.6	0.0114
Q9ET22	DPP2	Dipeptidyl peptidase 2	0.81	0.0129
Q8K558	TRML1	Trem-like transcript 1 protein	0.81	0.0143
Q8VCG4	CO8G	Complement component C8 gamma chain	0.81	0.017
Q9D1M7	FKB11	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP11	0.78	0.023
P58044	IDI1	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	0.81	0.0264
P01029	CO4B	Complement C4-B	0.81	0.032
P53798	FDFT	Squalene synthase	0.72	0.032
Q61704	ITIH3	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	0.81	0.0341
O35988	SDC4	Syndecan-4	0.77	0.0346
Q91X72	HEMO	Hemopexin	0.7	0.0356
P33146	CAD15	Cadherin-15	0.78	0.0372
Q8R2E9	ERO1B	ERO1-like protein beta	0.79	0.0391
Q9D964	GATM	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	0.81	0.0408
Q6P5D3	DHX57	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57	0.79	0.0434
P01642	KV5A9	Ig kappa chain V-V region L7 (Fragment)	0.78	0.044
Q9R112	SQOR	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	0.8	0.0465
P63168	DYL1	Dynein light chain 1, cytoplasmic	0.82	0.0485

### 3.2.2 正常对照组与 IMP 给药正常对照组 GO 分析

对 IMP 给药 C57 组和 C57 正常组的差异蛋白进行 GO 条目富集分析，取具有显著性的条目制作成直观的分析图，纵坐标表示 GO 条目，横坐标为该条目所包含的差异蛋白数量，富集到的条目如图 12 所示。发现其差异蛋白显著影响的生物学过程为定位、机体物种间相互作用、免疫系统过程。细胞组分包括其他有机部分。分子功能包括分子传感器活动、分子功能调控。

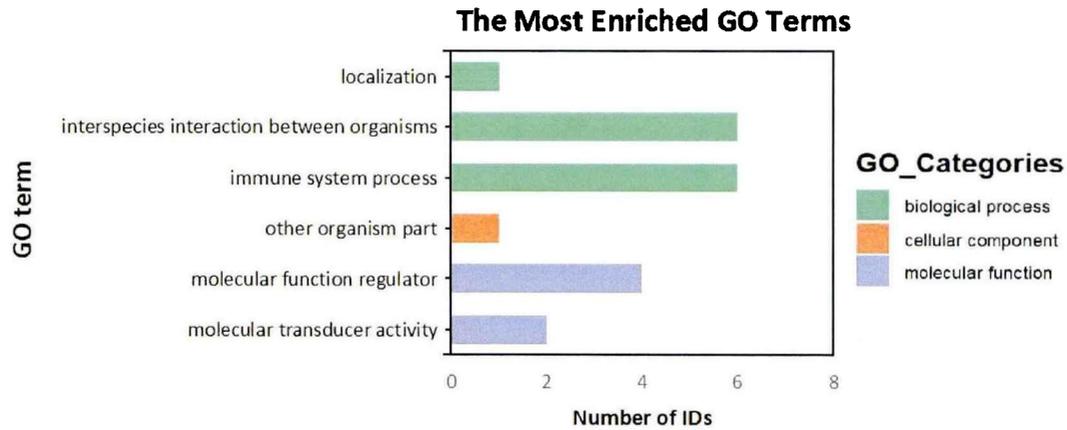


图 12. IMP 给药正常组小鼠肝脏差异蛋 GO 分析

### 3.2.3 正常对照组与 IMP 给药正常对照组 KEGG 分析

对正常对照组与IMP给药正常对照组的差异蛋白进行KEGG通路富集分析，显著富集到的通路结果如图13所示，图中每个气泡为一个KEGG条目，横坐标表示富集率，颜色表示富集的显著性即P值的负对数，如右边图例所示。气泡大小表示此通路中富集到的蛋白个数。该组差异蛋白显著富集到的通路有阿米巴病、系统性红斑狼疮、朊病毒疾病、金黄色葡萄球菌感染、百日咳、补体系统和凝血级联系统，细胞粘附分子(CAMs)等。与GO富集到的条目类似，炎症信号因子和免疫过程被富集得到。

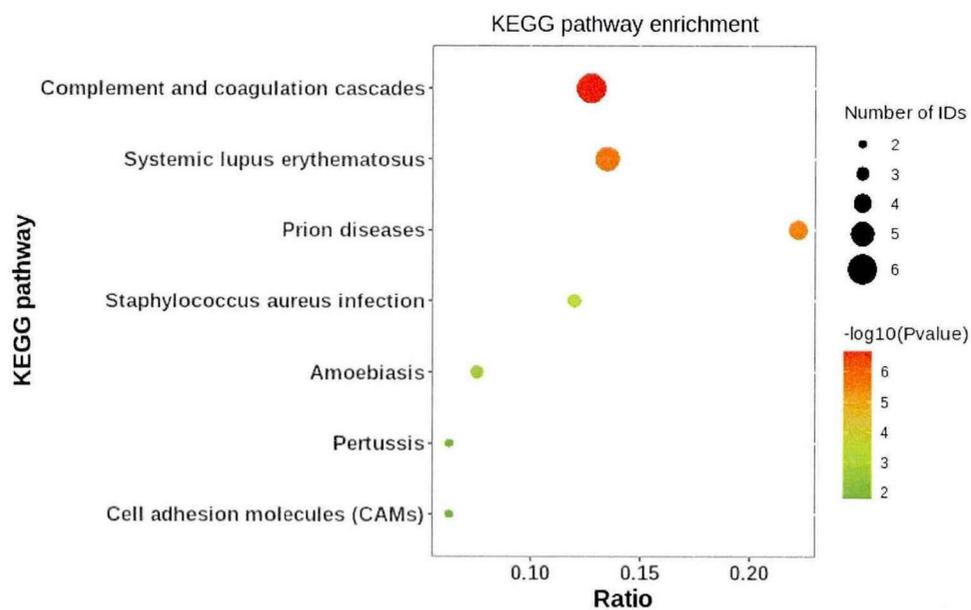


图 13.IMP 给药正常对照组肝脏差异蛋白 KEGG 分析

### 3.3.1 IMP 给药 *db/db* 组和 *db/db* 模型组差异蛋白分析

与上述方法相同,按照  $p < 0.05$ ,  $FC < 0.83$  或  $FC > 1.20$  筛选显著差异表达蛋白。IMP *db/db* 给药组与 *db/db* 模型组相比,有 175 个显著差异蛋白,其中上调蛋白 65 个,下调蛋白 110 个。表 4 按照 P 值从小到大的顺序,列出了差异表达上调和下调的二十个蛋白。其中,显著上调的蛋白有磷酸乙二醇胺/磷光啉磷酸酶腺苷酸环化酶 (Phospho1), 腺苷酸环化相关蛋白 1 (Cap1), tata 框结合蛋白相关因子 4 (Taf4) 等,显著下调蛋白有钙信号调节亲环素配体 (Cam1g), 受体表达增强蛋白 5 (reep5), 四肽重复蛋白 1 (Wdte1) 等。

表 4. IMP *db/db* 给药组和 *db/db* 组差异蛋白统计分析

Accession	Symbol	Description	FC	p-Value
Q8R2H9	Phospho1	Phosphoethanolamine/phosphocholine phosphatase	1.42	0.001
Q99J10	Ctu1	Cytoplasmic tRNA 2-thiolation protein 1	1.22	0.0018
P51881	Slc25a5	ADP/ATP translocase 2	1.48	0.0027
P40124	Cap1	Adenylyl cyclase-associated protein 1	1.31	0.004
Q9D3D9	Atp5f1d	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	1.38	0.0054
A0A0R4J187	Xrcc6	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1	1.35	0.0058
P26150	Hsd3b3	3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase / Delta 5-->4-isomerase type 3	1.56	0.0063
Q3TW96	Uap1l1	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase-like protein 1	1.43	0.0064
P61079	Ube2d3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3	3.11	0.0066
Q8R4N0	Clybl	Citramalyl-CoA lyase, mitochondrial	1.41	0.0091
G5E8K5	Ank3	Ankyrin-3	1.29	0.0096
Q8R059	Gale	UDP-glucose 4-epimerase	1.23	0.0127
Q64261	Cdk6	Cyclin-dependent kinase 6	1.61	0.0129
P17426	Ap2a1	AP-2 complex subunit alpha-1	1.45	0.0132
Q8R0A0	Gtf2f2	General transcription factor IIF subunit 2	1.31	0.0138
E9QKW2	Smoc1	SPARC-related modular calcium-binding protein 1	1.43	0.0151
A0A0R3P9C8	Ndufa9	NADH dehydrogenase [ubiquinone]1 $\alpha$ subcomplex subunit 9, mitochondrial	2.08	0.0155
Q9CX56	Psm8	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	1.34	0.0158
Q8C2Q8	Atp5c1	ATP synthase subunit gamma	1.42	0.0162
A0A1B0GSU0	Aldh16a1	Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	2.05	0.018
P49070	Cam1g	Calcium signal-modulating cyclophilin ligand	0.34	0.0004

A0A0U1RQ20	Pycard	Apoptosis-associated speck-like protein-containing a CARD (Fragment)	0.77	0.0005
Q8C3J5	Dock2	Dedicator of cytokinesis protein 2	0.66	0.0005
A0A1D5RLV1	Epb41	Band 4.1 (Fragment)	0.74	0.0008
Q64339	Isg15	Ubiquitin-like protein ISG15	0.64	0.0012
P28293	CtsG	Cathepsin G	0.79	0.0018
D3YU69	Txndc11	Thioredoxin domain-containing protein 11	0.76	0.0022
Q8K297	Colgalt1	Procollagen galactosyltransferase 1	0.79	0.0026
Q8C0Z1	Fam234a	Protein FAM234A	0.71	0.0028
O35963	Rab33b	Ras-related protein Rab-33B	0.8	0.0034
P40240	Cd9	CD9 antigen	0.75	0.0041
O54890	Itgb3	Integrin beta-3	0.66	0.0047
P21550	Eno3	Beta-enolase	0.68	0.0047
Q3TRM8	Hk3	Hexokinase-3	0.54	0.0049
D6RFB8	Pold1	DNA polymerase	0.79	0.0064
Z4YM84	Acbd5	Acyl-CoA-binding domain-containing protein 5	0.81	0.0074
P01800	N/A	Ig heavy chain V-III region T957	0.55	0.0086
Q9WV54	Asah1	Acid ceramidase	0.68	0.0092
Q9D0I8	Mrto4	mRNA turnover protein 4 homolog	0.71	0.0094
Q9D903	Ebna1bp2	Probable rRNA-processing protein EBP2	0.82	0.0104

### 3.3.2 IMP *db/db* 给药组和 *db/db* 模型组 GO 分析

对 IMP *db/db* 给药组和 *db/db* 模型组的差异蛋白进行 GO 条目富集分析, 发现该组差异蛋白对生物学过程的影响主要涉及吞噬作用、吞噬作用的正向调节、活化 T 细胞增殖、白细胞黏附分子、对革兰氏阴性菌的防御反应、白细胞迁移的正向调节、单核细胞外渗、蛋白质定位到早期核内体的正向调节、参与凋亡过程的半胱氨酸型内肽酶活性的正向调节、病毒对宿主凋亡过程的抑制、干扰素 (IFN)- $\gamma$  分泌、蛋白质水解作用。

差异蛋白重点涉及到的细胞组分包括整合素 $\alpha$ - $\beta$ 2 亚基复合物、NLRP1 炎症小体、AIM2 炎症小体复合物、整合素复合物、NLRP3 炎症小体复合物、免疫球蛋白复合体、吞噬小泡、膜质子转运 ATP 合酶复合、内质网腔、光滑型内质网。

富集得到的分子功能包括 ICAM-3 受体活动、细胞间粘附分子(ICAM) -3、肽酶活力、CARD 结合区域、BH3 结合区域、白细胞介素-6 受体活动、半胱氨酸型内肽酶活性参与凋亡信号通路、免疫球蛋白受体结合抗原结合、整合素结合、蛋白标签、肿瘤坏死因子受体结合、激素绑定、DNA 解旋酶的活动、细胞周期蛋白

结合、水解酶活性、细胞粘附分子结合、胆酸结合能力。

从富集得到的 GO 条目中可以看出, IMP 给药 *db/db* 小鼠引起了小鼠体内炎症反应、免疫反应、癌症通路的活化。

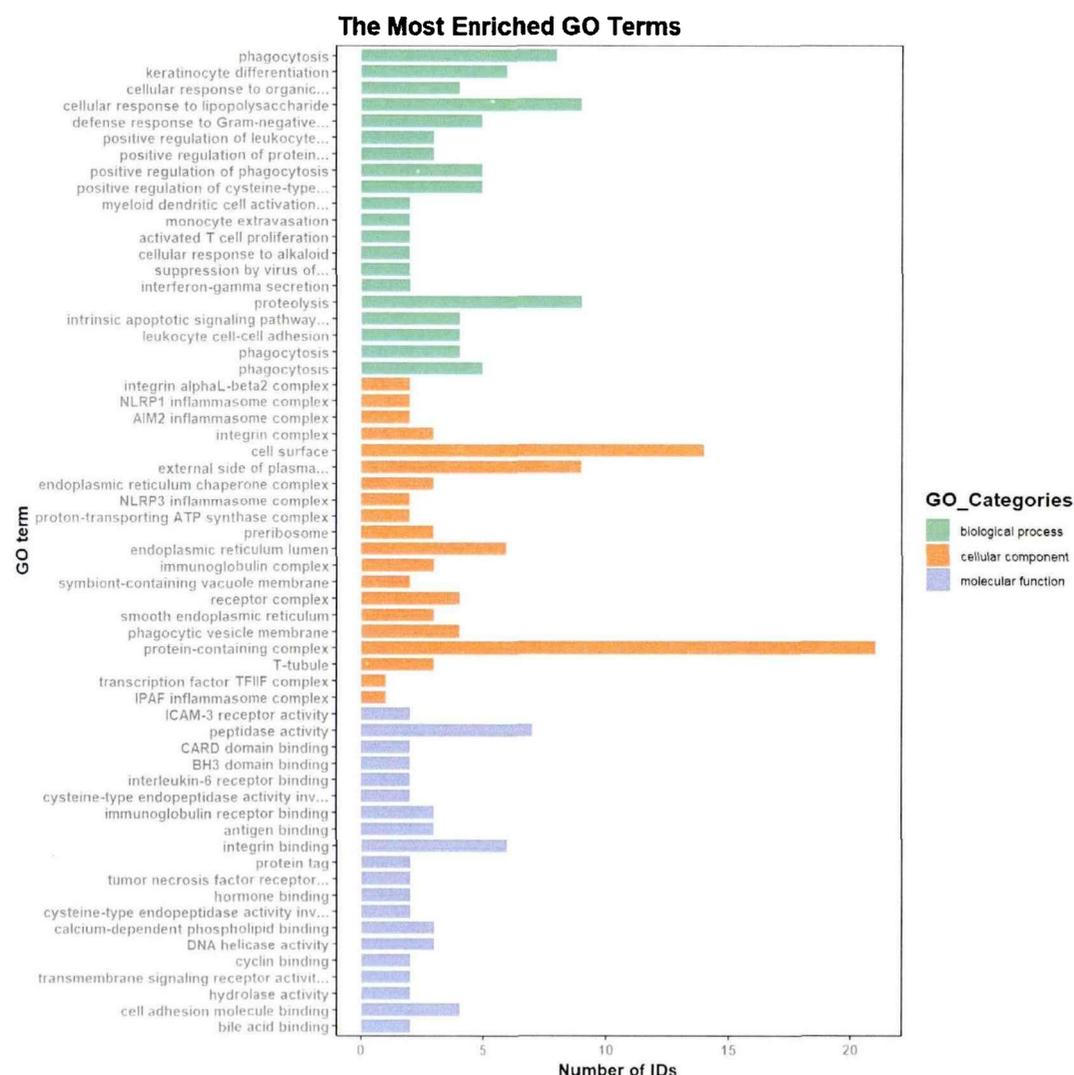


图 14. IMP *db/db* 给药组小鼠肝脏差异蛋白 GO 白分析

### 3.3.3 IMP *db/db* 给药组和 *db/db* 模型组 KEGG 分析

对 IMP *db/db* 给药组和 *db/db* 模型组的差异蛋白进行 KEGG 通路富集分析结果如图 15 所示, 其主要富集到的通路包括病毒感染通路 (单纯疱疹病毒 1 感染、麻疹、疟疾、军团病、EB 病毒感染、人类乳头瘤病毒感染、百日咳、甲型流感), 信号传导通路 (坏死性凋亡通路、胞质 DNA 传感通路、P53 信号通路、肾素-血管紧张素系统), 肿瘤通路 (黑素瘤、胰腺癌、非小细胞肺癌、慢性粒细胞白血病), 癌症中的小分子核糖核酸, 溶酶体, 造血通路, 类风湿性关节炎通路。这些通路的活跃表明 IMP 给药 *db/db* 小鼠使其自身的免疫系统受到影响, 易受病毒和细菌的感

染，一些癌症通路被激活，与彗星电泳的结果相符。图 16 为该组差异蛋白氧化磷酸化通路的 KEGG 通路图，红色代表差异显著上调蛋白，绿色代表差异显著下调蛋白，IMP 给药 *db/db* 小鼠促进了其体内氧化磷酸化过程，与前期实验结果相符。

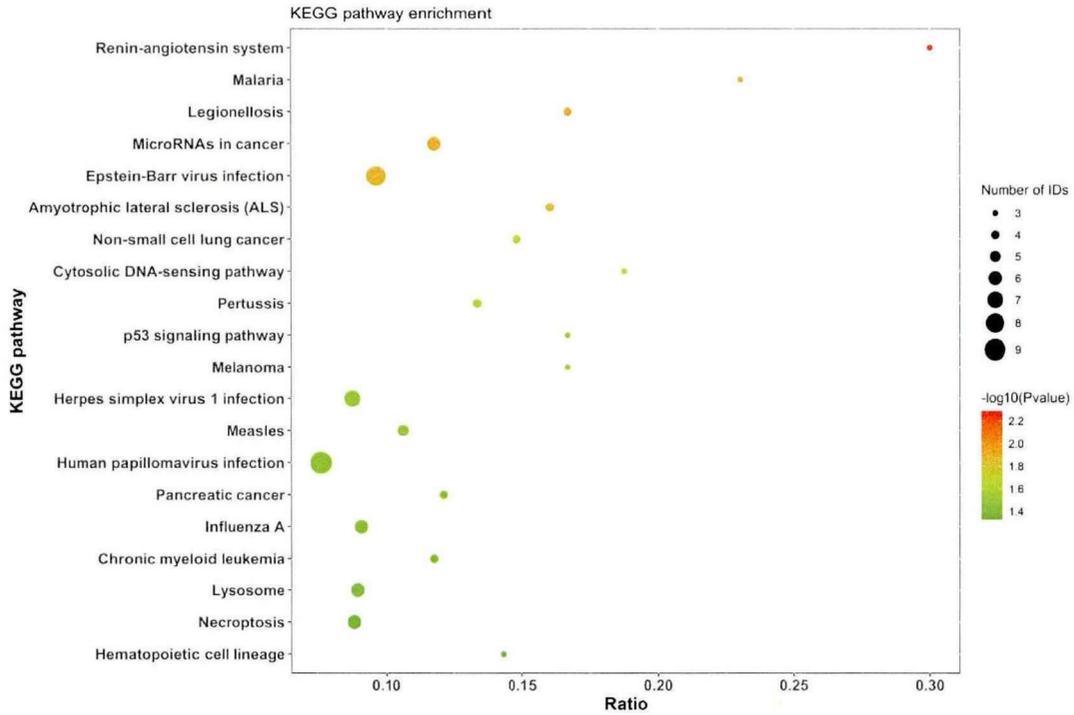


图 15. IMP *db/db* 给药组小鼠肝脏差异蛋白 KEGG 分析

### 3.4.1 *db/db* 模型组与正常对照组差异蛋白统计分析

与上述方法相同，按照  $p < 0.05$ ， $FC < 0.83$  或  $FC > 1.20$  筛选显著差异表达蛋白。*db/db* 模型组与 C57 对照组相比，有 408 个显著差异蛋白，其中上调蛋白 260 个，下调蛋白 148 个。表 5 按照 P 值从小到大的顺序，列出了差异表达上调和下调的二十个蛋白。其中，与 C57 正常组相比 *db/db* 小鼠中显著上调蛋白的蛋白有磷酸酶家族结构域蛋白 1 (Eepd1)，整合素 $\beta$ 3 (Itgb3)等，*db/db* 组中显著下降的蛋白有 Jagunal 同源物 1 (Jagn1) 等。

表 5. *db/db* 模型组和 C57 正常组差异蛋白统计分析

Accession	Symbol	Description	FC	p-Value
Q9D1H7	Get4	Golgi to ER traffic protein 4 homolog	1.95	0.0001
Q6PAJ1	Bcr	Breakpoint cluster region protein	3.54	0.0001
Q3U5Q7	Cmpk2	UMP-CMP kinase 2, mitochondrial	1.9	0.0002
Q3TGW2	Eepd1	phosphatase family domain-containing protein 1	2.37	0.0003
O54890	Itgb3	Integrin beta-3	2.32	0.0003
G5E898	Ppl	Periplakin	1.55	0.0003
Q8R3V5	Sh3glb2	Endophilin-B2	3.15	0.0003

E9Q7A5	Trabd	TraB domain-containing protein (Fragment)	4.02	0.0004
A0A1W2P7K6	Rab3ip	Rab-3A-interacting protein	4.65	0.0004
Q9CZX9	Emc4	ER membrane protein complex subunit 4	4.78	0.0004
P0C7L0	Wipf3	WAS/WASL-interacting protein family member 3	2.74	0.0004
Q99LM2	Cdk5rap3	CDK5 regulatory subunit-associated protein 3	1.65	0.0005
Q8VCU2	Gpld1	Glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase D	1.83	0.0005
Q80UJ7	Rab3gap1	Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit	2.73	0.0007
D3Z479	Snx15	Sorting nexin-15	2.27	0.0007
A0A075B5T2	Ighv6-3	Immunoglobulin heavy variable 6-3 (Fragment)	1.83	0.0009
Q6ZWZ2	Ube2r2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 R2	2.11	0.0009
Q9JKK1	Stx6	Syntaxin-6	2.06	0.0009
Q9R0E2	Plod1	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	2.07	0.001
H3BJB4	Rnf141	RING finger protein 141	2.69	0.0011
Q5XKN4	Jagn1	Protein jagunal homolog 1	0.75	0.0003
P28666	Mug2	Murinoglobulin-2	0.36	0.0003
E9QAF4	Phldb3	Pleckstrin homology-like domain, family B, member 3	0.22	0.0004
A0A0G2JE97	Ttc14	Tetratricopeptide repeat protein 14	0.59	0.0006
Q9D162	Ccdc167	Coiled-coil domain-containing protein 167	0.44	0.0007
A0A0G2JDT9	Lrrc7	Leucine-rich repeat-containing protein 7	0.62	0.0008
Q8C7I4	Apol9b	Apolipoprotein L 9b	0.53	0.0018
A0A1L1SSF2	Adpgk	ADP-dependent glucokinase	0.63	0.002
Q3U3K9	Aup1	Ancient ubiquitous protein1	0.71	0.0021
P33267	Cyp2f2	Cytochrome P450 2F2	0.39	0.0023
Q03147	Cdk7	Cyclin-dependent kinase 7	0.64	0.0025
Q9D1P4	Chordc1	Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1	0.62	0.0025
Q8R2E9	Ero1b	ERO1-like protein beta	0.69	0.0029
Q8BGC0	Htatsf1	HIV Tat-specific factor 1 homolog	0.39	0.003
E9Q264	Myh15	Myosin, heavy chain 15	0.2	0.0033
Q9CR09	Ufc1	Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1	0.24	0.0034
Q5F2E8	Taok1	Serine/threonine-protein kinase TAO1	0.61	0.0036
Q8R3R8	Gabarapl1	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1	0.57	0.0036
Q61503	Nt5e	5'-nucleotidase	0.54	0.0038
Q9CPY7	Lap3	Cytosol aminopeptidase	0.76	0.0038

### 3.4.2 *db/db* 模型组和正常对照组 GO 分析

对 *db/db* 模型组和 C57 正常组差异蛋白进行功能注释，GO 富集结果如图 16 所示，其主要生物学过程涉及对细菌的抵抗反应、白细胞迁移、糖原代谢过程的调节、糖酵解过程调节、甘油三酯分解代谢过程的负调控等免疫反应过程和糖脂代谢通路过程的调节。差异蛋白重点参与的细胞组分包括胞外组分、含胶原蛋白的细胞外基质、细胞质膜、整合素复合物、免疫球蛋白复合物等。富集得到的分子功能包括细胞外基质结构成分、整合素结合、碳水化合物激酶活性、乳酸跨膜转运活性、酮己糖激酶、脂多糖结合、水解酶活性、磷脂酰胆碱结合、乙酰辅酶 A 氧化活性等。可见瘦素基因受体敲除后，小鼠体内炎症反应增强，糖脂代谢紊乱，肝脏细胞内的信号传导增强，细胞氧化应激过程激活。

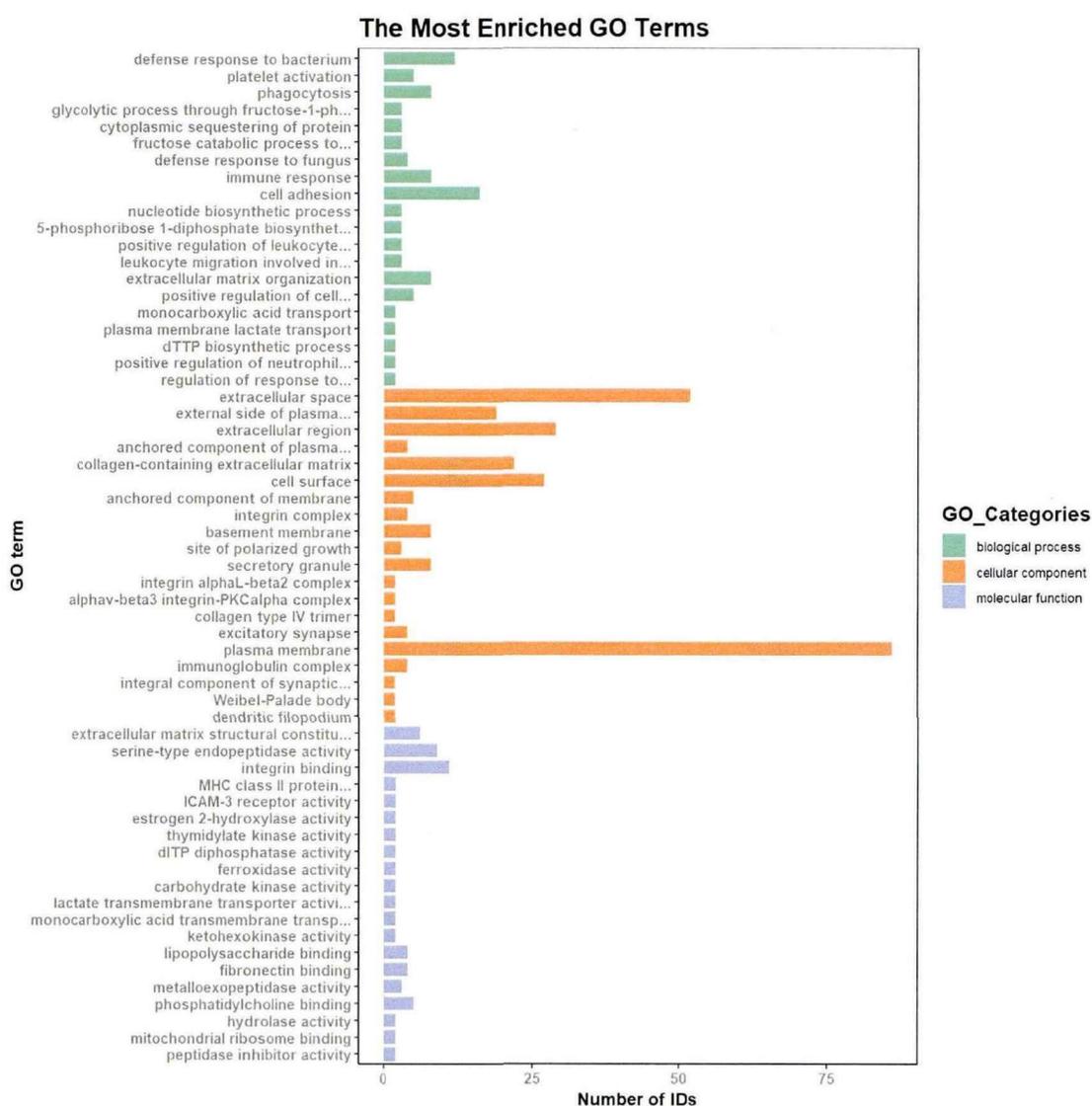


图 16. *db/db* 模型组小鼠肝脏差异蛋白 GO 分析

### 3.4.3 *db/db* 模型组和正常对照组 KEGG 分析

对 *db/db* 模型组和正常对照组差异蛋白进行 KEGG 通路富集分析结果如图 17 所示,发现这些差异蛋白主要与细胞外基质-受体相互作用、补体和凝血级联激活通路、糖尿病通路、病毒和寄生虫感染通路(朊病毒、人类乳头瘤病毒感染、阿米巴病)、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、白细胞跨内皮迁移、血小板激活、粘着斑、PI3K/AKT 信号通路、疾病缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 、松弛素信号通路,小细胞肺癌和蛋白质消化吸收等通路相关。

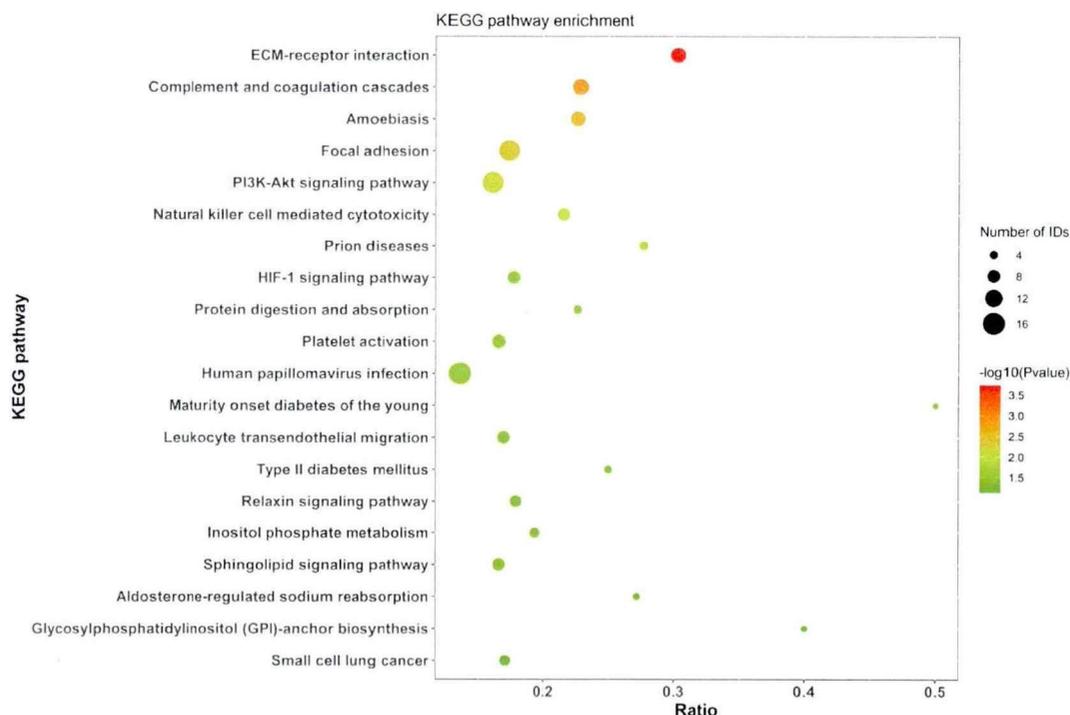


图 17. *db/db* 模型组小鼠肝脏差异蛋白 KEGG 分析

### 3.5 共同差异蛋白分析

对各组差异蛋白进行韦恩图分析,分析结果如图 18 所示。其中, a 表示正常对照组与 IMP 给药正常对照组差异蛋白, b 表示正常对照组与 *db/db* 模型组差异蛋白, c 表示 *db/db* 模型组与 IMP 给药 *db/db* 组差异蛋白。在各组差异蛋白的分析中,我们发现差异蛋白 C9 的表达在 a、b、c 三组中均显著下降。正常对照组, IMP 给药正常对照组, *db/db* 模型组, IMP 给药 *db/db* 组四组小鼠中,肝脏 NAFLD 从无到有,依次加重, C9 蛋白的表达也逐渐下降。表明 C9 蛋白在 NAFLD 的进展中发挥重要作用,可能是 NAFLD 的发病进展中的潜在新靶点。

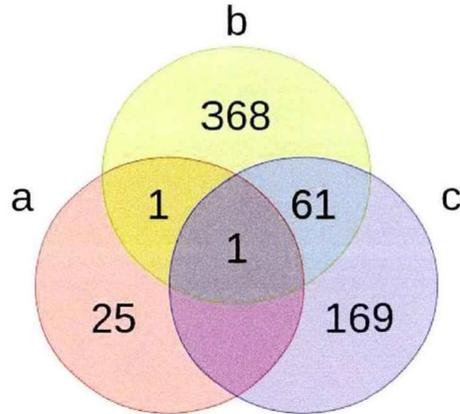


图 18.各组差异蛋白韦恩图

### 3.6 正常对照组和 IMP 给药正常对照组差异蛋白互作分析

对正常对照组和 IMP 给药正常对照组的 27 个差异蛋白进行互作分析，选取可信度前 150 的互作关系绘制了网络平面图，见图 19。补体组分 C9, C8, C4 在网络蛋白互作的中心位置，表明 IMP 给药正常小鼠后主要是通过影响补体系统促进小鼠肝脏 NAFLD 的发展，这与前面 GO 和 KEGG 的分析结果一致。

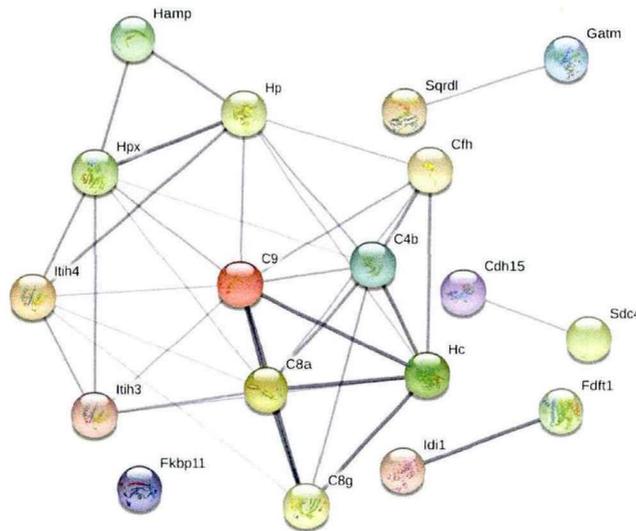


图 19.正常对照组和 IMP 给药正常对照组差异蛋白互作分析

## 讨论

本章实验结果显示,在油酸造模的 HepG2 细胞中,IMP 显示出较强的降脂活性,在加入 AMPK 抑制剂后,IMP 的降脂活性下降,验证了 IMP 是通过靶向 AMPK 通路激活脂肪酸 $\beta$ 氧化发挥体外降脂活性。在 Western Blot 结果中,我们观察到在 IMP 给药正常小鼠的肝脏内,随着 IMP 给药剂量的增加,其 AMPK 蛋白的磷酸化水平也随之增强,与前期在 *db/db* 小鼠肝脏中发现的结果一致<sup>[21]</sup>,表明 IMP 在体内激活 AMPK 通路,活化脂质代谢过程。表征肝细胞内脂肪酸氧化活性的 ACC2 蛋白磷酸化水平升高,表明 AMPK 通路激活后活化肝脏内的脂肪酸氧化过程。动物体内脂肪酸氧化主要以 $\beta$ 氧化为主,生成大量的乙酰辅酶 A 作为合成脂质、酮体的原料或供给 TCA 循环为机体供能。结合第一章小鼠血清和肝脏中的乙酰辅酶 A 随着 IMP 给药剂量的增大而升高的现象,表明 IMP 在正常小鼠体内活化 AMPK 信号通路激活下游脂肪酸 $\beta$ 氧化使乙酰辅酶 A 逐渐沉积,肝脏利用乙酰辅酶 A 为机体不断合成 TG、TC,从而导致正常小鼠肝脏内脂质的蓄积。但 IMP 同时提高正常小鼠 ATGL 表达量,ATGL 可促进体内 TG 的水解,减轻肝脏内的脂质蓄积,缓解 NAFLD 的症状。

IMP 等鲜味剂可以诱导中枢瘦素抵抗<sup>[33]</sup>,随着 IMP 摄入剂量的增大,机体瘦素抵抗愈加强烈,这可能是随着 IMP 给药剂量增大,正常小鼠肝脏脂质蓄积严重的原因之一。当正常小鼠瘦素抵抗情况达到 *db/db* 小鼠的严重程度时,蛋白表达异常情况也将 *db/db* 小鼠类似。结合蛋白质组学结果,我们发现 *db/db* 小鼠中整合素 $\alpha$ 3 (Integrin  $\alpha$ 3)、补体蛋白  $\alpha$ 4 (Collagen  $\alpha$ 4)、粘连蛋白 (Laminin)、血管假性血友病因子 (von willebrand factor) 等与细胞外基质(Extracellular matrix, 简称 ECM)合成相关的蛋白表达显著升高,*db/db* 小鼠中肝纤维化过程被激活,*db/db* 小鼠由于瘦素受体基因缺失而先天肥胖,小鼠体内脂质大量积累,细胞内游离脂肪酸和其他脂质代谢物水平升高,进而导致肝星状细胞(HSC)的激活,活化的 HSC 分泌过多的细胞外基质 (ECM)<sup>[42]</sup>,这些细胞外基质会积聚并损害肝脏的结构和功能,促进肝纤维化的发生和进展。在 ECM 大量合成的 *db/db* 小鼠内,加上 IMP 的额外刺激,使得小鼠由 NASH 进展为 NAFLD-LC。

综上,我们可以得出结论,IMP 促进乙酰辅酶 A 合成导致 TG 合成加剧并沉积在肝脏内引发第一重打击是 NAFLD 发病的原因。由于 IMP 没有提高 *db/db* 小鼠肝脏内 ATGL 表达量,表明肝脏分解脂肪的活性没有增加。体内自身分解脂肪产生的脂肪酸不能满足被加速的脂肪酸 $\beta$ 氧化反应需求时,乙酰辅酶 A 被用于合成 TC,经肝脏分泌进入小肠促进脂肪消化,产生的脂肪酸被吸收入肝脏加剧了新一轮脂肪酸 $\beta$ 氧化 $\rightarrow$ 乙酰辅酶 A 沉积 $\rightarrow$ TG 沉积 $\rightarrow$ NAFLD 恶化,于是形成了 TC 介导的 IMP 促进肝细胞内 TG 合成和沉积的恶性循环。此外小鼠肝脏 DNA 受损,引发对肝脏的“多

重打击”，加之 *db/db* 小鼠 ECM 合成过程活跃，小鼠肝纤维化易感，在以上多种因素共同作用下最终诱发 *db/db* 小鼠的肝硬化。与之相反的是 IMP 能提高正常小鼠 ATGL 表达量，增加体内脂肪分解，产生的脂肪酸可以供给加速的脂肪酸 $\beta$ 氧化反应，TC 介导的肠道内脂肪酸吸收活性被降低，肝脏内氧化反应压力较小，因而 NAFLD 的症状轻微。

结合蛋白质组学结果，我们对 IMP 给药造成正常小鼠轻度 NAFLD 的原因进行进一步分析。与正常小鼠相比，IMP 给药正常小鼠造成其铁调素（HFE）的表达显著上升。铁调素是普遍存在于包括人类在内的多种生物体内的一种抗微生物肽，最初因其抗菌特性而被发现，后续研究发现，铁调素是铁代谢的主要调节剂，主要由肝细胞产生，以响应细胞中的铁负荷<sup>[43]</sup>。当肝细胞内铁负荷增加时，肝细胞中的铁调素表达就会上升，从而导致血清铁调素水平升高。有人提出，铁可能参与肝细胞氧化应激的产生，作为 NASH 发病机制中的传统“第二次打击”。研究表明，血清铁蛋白水平与 NASH 的存在之间存在相关性。在肝硬化、酒精性肝硬化、肝脏自身免疫性疾病和 NAFLD 等一系列肝脏疾病中均观察到铁调素紊乱<sup>[44]</sup>。Senates E 等研究发现与正常对照组相比，NAFLD 组中铁调素水平显著上升<sup>[45]</sup>，但关于 NAFLD 中铁调素紊乱的原因和具体机制尚未清楚。Ravasi 等人发现 NAFLD 组中铁调素的上调与炎症标志物及脂质代谢紊乱有关<sup>[46]</sup>。Lu 等人发现脂质代谢异常和铁调素的表达存在一定的相互作用，可能在 NAFLD 的进展中发挥重要作用<sup>[47]</sup>。铁调素可能通过影响脂质代谢紊乱和炎症反应促进 NAFLD 的进展。结合本实验发现 IMP 给药刺激正常小鼠引起小鼠肝脏中铁调素表达量显著上升的结果，我们推测 IMP 通过促进铁调素蛋白表达活跃进而影响肝脏内的脂质代谢和炎症过程，诱发早期 NAFLD。

蛋白质组学中富集到的另一个差异蛋白补体蛋白 C9 同样引起我们的关注。在正常对照组，IMP 给药正常对照组，*db/db* 模型组，IMP 给药 *db/db* 组四组小鼠中，肝脏 NAFLD 从无到有，依次加重，C9 蛋白的表达也逐渐下降，提示 C9 是 NAFLD 发生及恶化的关键分子。C9 是补体系统的一种相关蛋白，补体系统是一个复杂的血清蛋白网络，在人体的先天性免疫和适应性免疫中均发挥重要作用<sup>[48]</sup>。补体激活通过三种不同的途径启动：经典途径、替代途径和凝集素途径，补体蛋白之间联合形成膜攻击复合物（MAC）共价沉积到靶标表面，最终通过裂解或吞噬破坏靶标，从而达到清除病原体保护宿主细胞的作用<sup>[49]</sup>。C9 是一种大小 61 kDa 的糖蛋白，作为 MAC 组装的最终成分，它在功能和结构上类似于穿孔素<sup>[50]</sup>，与穿孔素相似，多个 C9 蛋白自行聚合成孔发挥作用。越来越多的研究表明，补体系统在人类疾病和异常代谢中发挥作用，如神经系统疾病<sup>[51]</sup>，肥胖和胰岛素抵抗<sup>[52]</sup>，癌症<sup>[53]</sup>，酒精相关性肝炎<sup>[53]</sup>，甚至近期严重威胁全球人民健康的 COVID-19<sup>[54]</sup>。作为补体系统的一个关键成分，C9 蛋白引起许多研究者的重视。WR 等人的研究表明，血浆 C9 水平是类风湿性关节炎疾病活动的良好标志物<sup>[55]</sup>。C9 蛋白在 NAFLD 领域也曾经被报

道。Sonu Subudhi 等人发现与人类正常肝脏组相比, NAFLD 组肝脏内的 C9 表达下降, 同时伴随着其他炎症基因表达增加<sup>[56]</sup>。这与我们在小鼠体内发现随着 NAFLD 的进展 C9 表达下降的结果一致。而 Sander S Rensen 等人发现, 与健康组相比, 大多数 NAFLD 患者的肝脏中出现补体激活, 且 NASH 阶段患者较 NAFLD 轻度患者中更频繁地观察到膜攻击复合物 (MAC) 相关 C9 沉积<sup>[57]</sup>, 与我们发现 C9 蛋白在 NAFLD 进展中表达降低的结果相反。C9 蛋白与 NAFLD 的发展关系具体机制目前仍不清楚, 值得深入探索, 有望成为 NAFLD 的发病进展中的重要靶点。

结合生物信息学分析结果, 在各组小鼠差异蛋白的 GO 和 KEGG 分析中我们发现, IMP 给药正常小鼠后主要通过影响免疫过程, 促进肝脏细胞内的炎症反应, 恶化 NAFLD, IMP 给药 *db/db* 小鼠中, 不仅一些炎症小体被富集到, 细胞凋亡信号通路和肿瘤坏死信号通路也被富集到。表明 IMP 给药 *db/db* 小鼠后, 不仅促进了肝脏内的炎症反应, 还促进肝细胞内肿瘤信号通路的活化, 使该组小鼠 NAFLD 进一步恶化, 向肝硬化与 HCC 过程发展, 与该组小鼠出现彗星电泳拖尾现象相符。由此可见, IMP 对瘦素抵抗受体缺乏体质为代表的肥胖和代谢综合症人群造成的危害更大。

Paola Toledo-Ibelles 等人报道, 高脂饮食诱导产生 NAFLD 的兔子肝组织内, 其次黄嘌呤含量显著增加, 并且肝组织显示出 ROS 浓度增加和嘌呤代谢变化<sup>[38]</sup>。我们的研究发现, 正常饮食中额外补充大量次黄嘌呤核苷酸会导致正常小鼠发生轻度 NAFLD, *db/db* 小鼠发生肝硬化, 这提示我们体外额外补充 IMP 等嘌呤核苷酸类物质或体内嘌呤核苷酸类物质代谢紊乱引起的过量蓄积是导致 NAFLD 发生发展的重要推动力, 改善嘌呤代谢的降尿酸药物可能是治疗 NAFLD 的新方法。

各组差异蛋白可作为 NAFLD 不同进展过程中的预测分子。其中, IMP 给药正常小鼠引起的差异蛋白可作为早期 NAFLD 的预测分子。与正常对照组相比, IMP 给药正常对照组的显著上调差异蛋白中, 磺基转移酶 1A1 (ST1A1)、单酰基甘油脂肪酶 (ABHD2)、超长链脂肪酸延伸蛋白 5 (ELOV5) 尚未报道与 NAFLD 的发生相关, 为新发现的 NAFLD 早期发生的潜在标志物。ST1A1 是利用 3'-磷酸-5'-腺苷酸硫酸盐 (PAPS) 作为磺酸盐供体催化多种带有羟基或胺基的受体分子的硫酸盐结合的磺基转移酶, 可通过磺化过程增加大多数化合物的水溶性, 促进它们的肾脏排泄, 它亦可通过活化化合物生物结构促进活性代谢物的生成。此外它还介导致癌 N-羟基芳胺的代谢活化, 促进 DNA 加合物高反应性中间体的形成, 可能导致 DNA 诱变。ABHD2 是 TG 水解生成甘油和脂肪酸 (FAs) 的最后一步关键调节酶<sup>[58]</sup>, TG 的异常代谢对细胞有害, TG 过量积累在脂肪和肝脏组织可造成肥胖和 NAFLD, TG 过量分解生成的游离脂肪酸在炎症过程中发挥着关键信号分子的作用<sup>[59]</sup>。ABHD2 的显著上调与 Western Blot 结果中 ATGL 的表达量上调相符, 他们均促进 TG 的分解。ELOV5 蛋白是参与哺乳动物中微粒体脂肪酸延长的七种脂肪酸缩合酶之一。Yun Wang 等人报道<sup>[60]</sup>, ELOV5 活性升高会影响控制肝脏脂质和碳水化合物

物组成的多种途径。上述三种蛋白中作为早期 NAFLD 中发现的相关新蛋白, 可作为 NAFLD 的早期预测分子值得我们进一步研究。

IMP 给药 *db/db* 小鼠引起的差异蛋白可作为 NAFLD-LC 的预测分子。IMP 给药 *db/db* 小鼠, 促进其从 NASH 恶化为肝硬化<sup>[21]</sup>。两组小鼠肝脏的差异蛋白可作为肝硬化发生的预警分子。其中, 显著上调蛋白磷酸乙二醇胺/磷光磷酶腺苷酸环化酶 (Phospho1)、腺苷酸环化相关蛋白 1 (Cap1)、tata 框结合蛋白相关因子 4 (Taf4) 尚未被报道与 NAFLD-LC 相关。Phospho1 在矿物质化细胞中高表达, 参与基质矿化的无机磷酸盐的生成过程<sup>[61]</sup>。Karla J Suchacki 等人报道, 在小鼠中敲除 Phospho1 基因后, 小鼠基础葡萄糖稳态改善, 并能抵抗高脂饮食引起的体重增加和糖尿病, 因此 Phospho1 被确定为治疗肥胖和糖尿病的潜在骨源性治疗靶点<sup>[62]</sup>。IMP 给药后, *db/db* 小鼠肝细胞 Phospho1 显著上调, 提示 IMP 可能通过影响 Phospho1, 使肝细胞的矿化, 引起小鼠肝细胞糖脂代谢恶化, 造成 *db/db* 小鼠 NAFLD-LC。CAP1 是一种参与调节肌动蛋白丝的蛋白质, Yuyu Zhu 等人报道, 巨噬细胞中 CAP1 的敲低消除了抵抗素介导的炎症活动, CAP1 的过度表达会加重巨噬细胞中的炎症<sup>[63]</sup>。Yanhua Liu 等人报道, CAP1 的表达上调促进肝细胞癌中的肿瘤迁移和转移<sup>[64]</sup>。有学者发现, Cap1 和抵抗素可调节小鼠肝细胞中胰岛素抵抗相关基因的表达<sup>[65]</sup>, 但具体机制尚不清楚。IMP 给药 *db/db* 小鼠后, Cap1 的表达显著上调, 可作为肝硬化发生的潜在标志物。Taf4 蛋白是转录过程中的关键调控蛋白, 是细胞分化和癌症转移扩散的关键调节剂<sup>[66]</sup>。Margarita Kalogeropoulou 等人发现 Taf4 通过特异性调节上皮间质转化和整合素 $\alpha$ 的靶基因, 改变细胞迁移特性促进癌症进展<sup>[67]</sup>。在 IMP 给药的 *db/db* 小鼠肝脏中 Taf4 蛋白显著高表达, 提示其可能小鼠与肝细胞的癌变过程相关。IMP 给药后 *db/db* 鼠中显著下调的蛋白有钙信号调节亲环素配体 (Camlg)、受体表达增强蛋白 5 (reep5)、四肽重复蛋白 1 (Wdte1) 等。Camlg 是一种完整的内质网跨膜蛋白, 可增加细胞溶质钙浓度, 激活细胞转录活性, 增加细胞内钙的动员<sup>[68]</sup>。Camlg 是成熟外周 T 细胞存活的关键蛋白, 是适应性免疫过程中重要的蛋白。尚未有报道指出 Camlg 与 NAFLD-LC 的关系, IMP 给药 *db/db* 小鼠后, 小鼠肝脏内 Camlg 显著下调, 造成小鼠 NAFLD-LC, 可作为该病的潜在标志物。reep5 蛋白含量的降低会导致肌内质网膜不稳定、管腔空泡化及  $Ca^{2+}$  循环的中断<sup>[69]</sup>。IMP 给药后 reep5 蛋白在肝脏中表达下降, 提示其可能会小鼠肝细胞 NAFLD 的恶化相关, 与 Camlg 的下降影响一致, reep5 蛋白的下降也会影响  $Ca^{2+}$  信号的传导,  $Ca^{2+}$  信号传导可能在 IMP 刺激下恶化 *db/db* 小鼠 NAFLD 进程中发挥关键作用。Wdte1 蛋白是一种脂质积累抑制因子, 低表达 Wdte1 与小鼠和人类的肥胖有关, 据报道 Wdte1 通过 CRL4-WDTC1-E3 连接酶抑制脂肪生成<sup>[70]</sup>。IMP 给药后 *db/db* 鼠肝脏内 Wdte1 的低表达促进了其脂肪的积累, 从而进一步恶化 NAFLD, 可作为 NAFLD-LC 的预测分子。

正常小鼠与 *db/db* 小鼠的差异表达蛋白可作为 NAFLD-LC 和 HCC 易感的预警分子。瘦素受体敲除后, *db/db* 小鼠体内瘦素信号传导异常, 小鼠出现肥胖、二型糖尿病, 肝组织切片显示 NASH 症状。其与正常小鼠差异表达的蛋白中, 显著上调蛋白磷酸酶家族结构域蛋白 1 (Eepd1) 引起我们的关注。Eepd1 为一种核酸酶, 可通过调节甾醇反应性核受体诱导胆固醇流出转运蛋白的表达, 以促进过量细胞胆固醇的流出, 从而在动脉粥样硬化的发展中起作用<sup>[71]</sup>, Eepd1 蛋白表达的显著升高与 *db/db* 小鼠血清中胆固醇含量增加的结果相一致<sup>[21]</sup>, 且 Eepd1 蛋白尚未被报道与 NAFLD 的进展相关, 可作为预测 NAFLD 发生和恶化的新型诊断标志物。与 C57 正常组相比, 我们特别关注 *db/db* 组中表达显著下调的蛋白为 Jagunal 同源物 1 (Jagn1)。Jagn1 在调节胰腺β细胞中胰岛素原生物合成中发挥作用, Jagn1 的敲低导致葡萄糖刺激的胰岛素分泌增加<sup>[72]</sup>, *db/db* 组中 Jagn1 表达下降, 与其体内胰岛素表达升高、糖脂代谢紊乱的表型相符, 可作为 NAFLD-LC 和 HCC 易感的预警分子。

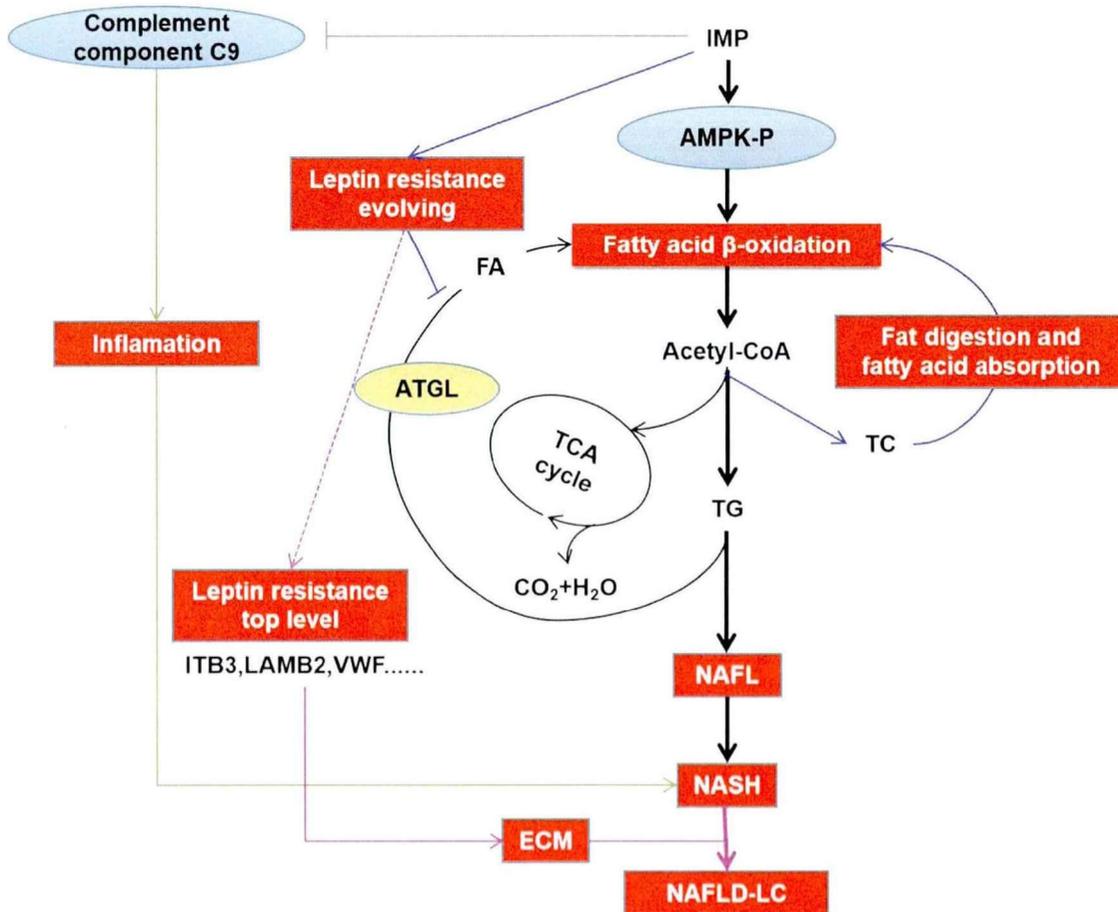


图 20. IMP 造成 NAFLD 发生和演化的作用机制。

## 总结与展望

(1) NAFLD 发病机制尚不清楚，一般认为脂质代谢水平降低、胰岛素抵抗等多为 NAFLD 的诱因。本研究结果证明了生物体内的 IMP 过量蓄积是 NAFLD 发生和演化的促进剂。在正常饲养条件下，发现 IMP 诱导正常小鼠可作为 NASH 的疾病新模型，IMP 诱导 *db/db* 小鼠可建立 NAFLD-LC 疾病模型。为今后开展嘌呤核苷酸调控脂质代谢引发 NAFLD 的机制研究奠定基础。

(2) 鉴于 IMP 促肝脏炎症和肝脏内脂肪蓄积，建议肥胖人群在饮食中避免额外添加含 IMP 等呈味核苷酸的调味品，同时减少高嘌呤饮食以降低肝硬化发病的风险。由于嘌呤核苷酸等物质在体内最终被代谢为尿酸排出体外，我们建议 NAFLD 人群适量增加饮水促进排尿，通过降低嘌呤核苷酸的蓄积，避免 NAFLD 的恶化。

(3) IMP 促进乙酰辅酶 A 合成导致 TG 合成加剧并沉积在肝脏内引发第一重打击是 NAFLD 发病的原因。在正常对照组，IMP 给药正常对照组，*db/db* 模型组，IMP 给药 *db/db* 组四组小鼠中，肝脏 NAFLD 从无到有，依次加重，C9 蛋白的表达也逐渐下降。C9 蛋白是补体系统中引发肝脏内部炎症反应的关键蛋白质，在 NASH 发展进程中发挥关键作用。C9 蛋白促进 NAFLD 的发病和演化机制尚不清楚，可通过基因敲除或过表达 C9 的方法全面探究 C9 对肝脏的影响，有望发现 NAFLD 药物作用新靶标，为建立诊疗新方案奠定基础。

(4) IMP 作用的 *db/db* 小鼠肝脏内炎症、脂肪蓄积和肝细胞间质沉积都恶化，满足 NAFLD-LC 发病三要素，而 IMP 作用的正常小鼠仅出现肝脏炎症和脂肪蓄积，因此诱导细胞间质沉积的蛋白质如 ITB 等有望作为诊断 NAFLD-LC 的分子标志物。

## 参考文献

- [1] YOUNOSSI ZM. Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective[J]. *J Hepatol*, 2019,70(3): 531-544.
- [2] MUNDI MS, VELAPATI S, PATEL J, et al. Evolution of NAFLD and Its Management[J]. *Nutr Clin Pract*, 2020,35(1): 72-84.
- [3] FAN JG, KIM SU, WONG VW. New trends on obesity and NAFLD in Asia[J]. *J Hepatol*, 2017,67(4): 862-873.
- [4] ZHOU J, ZHOU F, WANG W, et al. Epidemiological Features of NAFLD From 1999 to 2018 in China[J]. *Hepatology*, 2020,71(5): 1851-1864.
- [5] DAY CP, JAMES OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"?[J]. *Gastroenterology*, 1998,114(4): 842-845.
- [6] PEVERILL W, POWELL LW, SKOIEN R. Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation[J]. *Molecular sciences*, 2014,15(5): 8591-8638.
- [7] BUZZETTI E, PINZANI M, TSOCHATZIS EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. *Metabolism*, 2016,65(8): 1038-1048.
- [8] SCHWARTZ MW, WOODS SC, PORTE D J, et al. Central nervous system control of food intake[J]. *Nature*, 2000,404(6778): 661-671.
- [9] MILANSKI M, ARRUDA AP, COOPE A, et al. Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver[J]. *Diabetes*, 2012,61(6): 1455-1462.
- [10] STEWART GC. The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host[J]. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2015,79(4): 437-457.
- [11] REIMER KC, WREE A, RODEBURG C, et al. New drugs for NAFLD: lessons from basic models to the clinic[J]. *Hepatology international*, 2020,14(1): 8-23.
- [12] KANURI G, BERGHEIM I. In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. *Molecular sciences*, 2013,14(6): 11963-11980.
- [13] CLAPPER JR, HENDRICKS MD, GU G, et al. Diet-induced mouse model of fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis reflecting clinical disease progression and methods of assessment[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013,305(7): G483-G495.
- [14] ZHANG Y, CHUA SJ. Leptin Function and Regulation[J]. *Comprehensive Physiology*, 2017,8(1): 351-369.
- [15] LINDSTRÖM P. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice][J]. *Scientific World Journal*, 2007,7: 666-685.
- [16] BRIX AE, ELGAVISH A, NAGY TR, et al. Evaluation of liver fatty acid oxidation in the leptin-deficient obese mouse[J]. *Molecular genetics and metabolism*, 2002,75(3): 219-226.
- [17] SAHAI A, MALLADI P, PAN X, et al. Obese and diabetic *db/db* mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004,287(5): G1035-G1043.

- [18]ZHANG Y, MORAR M, EALICK SE. Structural biology of the purine biosynthetic pathway[J]. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2008,65(23): 3699-3724.
- [19]PAREEK V, PEDLEY AM, BENKOVIC SJ. Human de novo purine biosynthesis[J]. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 2021,56(1): 1-16.
- [20]王洋, 姜允嘉, 成钟, 等. 腺苷酸基琥珀酸活化 AMPK 抑制肝细胞内脂质蓄积的作用机制[J]. 中国医药生物技术, 2020,15(03): 240-248.
- [21]姜允嘉, 刘金艳, 许赛君, 等. 增鲜剂 5'-肌苷酸二钠恶化老龄 *db/db* 小鼠脂质代谢紊乱的分子机制[J]. 食品科学, 2021,42(15): 150-158.
- [22]铃木千秋. 液体调味料增鲜的最佳选择——IMP[J]. 中国食品添加剂, 1996(02): 31-38.
- [23]FORTECUE-BRICKDALE JM. Proteins and Protein Metabolism[J]. Bristol medico-chirurgical journal (1883), 1906,24(94): 318-324.
- [24]BEREZOVSKY IN, GUARNERA E, ZHENG Z. Basic units of protein structure, folding, and function[J]. Progress in biophysics and molecular biology, 2017,128: 85-99.
- [25]PANDEY A, MANN M. Proteomics to study genes and genomes[J]. Nature, 2000,405(6788): 837-846.
- [26]KELLNER R. Proteomics. Concepts and perspectives[J]. Fresenius' journal of analytical chemistry, 2000,366(6-7): 517-524.
- [27]GUERRERA IC, KLEINER O. Application of mass spectrometry in proteomics[J]. Bioscience reports, 2005,25(1-2): 71-93.
- [28]CALDERÓN-CELIS F, ENCINAR JR, SANZ-MEDEL A. Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry[J]. Mass spectrometry reviews, 2018,37(6): 715-737.
- [29]ZHANG L, ELIAS JE. Relative Protein Quantification Using Tandem Mass Tag Mass Spectrometry[J]. Methods in molecular biology, 2017,1550: 185-198.
- [30]宋如铮, 彭英, 王广基, 等. 定量蛋白质组学常用研究技术及其在肝源性疾病发病机制中的应用进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021,26(05): 570-578.
- [31]KEERTHIKUMAR S. An Introduction to Proteome Bioinformatics[J]. Methods in molecular biology, 2017,1549: 1-3.
- [32]LINDEMANN B, OGIWARA Y, NINOMIYA Y. The discovery of umami[J]. Chemical senses, 2002,27(9): 843-844.
- [33]ANDRES-HERNANDO A, CICERCHI C, KUWABARA M, et al. Umami-induced obesity and metabolic syndrome is mediated by nucleotide degradation and uric acid generation[J]. Nature metabolism, 2021,3(9): 1189-1201.
- [34]LUSCOMBE-MARSH ND, SMEETS AJ, WESTERTERP-PLANTENGA MS. The addition of monosodium glutamate and inosine monophosphate-5 to high-protein meals: effects on satiety, and energy and macronutrient intakes[J]. The British journal of nutrition, 2009,102(6): 929-937.
- [35]WANG F, LIU Y, JIANG J, et al. High expression of AMPD2 and obesity are associated with poor prognosis in colorectal cancer[J]. International journal of clinical and experimental pathology, 2018,11(1): 216-223.
- [36]郭霜. 肝功能与血脂血清学指标水平检验在脂肪肝诊断中的效果[J]. 中国社区医师, 2021,

- 37(14): 37-38.
- [37]SHI L, TU BP. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences[J]. *Current opinion in cell biology*, 2015,33: 125-131.
- [38]TOLEDO-IBELLES P, GUTIÉRREZ-VIDAL R, CALIXTO-TLACOMULCO S, et al. Hepatic Accumulation of Hypoxanthine: A Link Between Hyperuricemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease[J]. *Archives of medical research*, 2021,52(7): 692-702.
- [39]GOWANS GJ, HAWLEY SA, ROSS FA, et al. AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both all osteric activation and enhancing net phosphorylation[J]. *Cell metabolism*, 2013,18(4): 556-566.
- [40]SCHREIBER R, XIE H, SCHWEIGER M. Of mice and men: The physiological role of adipose triglyceride lipase (ATGL)[J]. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 2019,1864(6): 880-899.
- [41]ABU-ELHEIGA L, BRINKLEY WR, ZHONG L, et al. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000,97(4): 1444-1449.
- [42]KUCHAY MS, CHOUDHARY NS, MISHRA SK. Pathophysiological mechanisms underlying MAFLD[J]. *Diabetes & metabolic syndrome*, 2020,14(6): 1875-1887.
- [43]AGARWAL A K, YEE J. Hepcidin[J]. *Advances in chronic kidney disease*, 2019,26(4): 298-305.
- [44]SUMIDA Y, YOSHIKAWA T, OKANOUE T. Role of hepatic iron in non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*, 2009,39(3): 213-222.
- [45]SENATES E, YILMAZ Y, COLAK Y, et al. Serum levels of hepcidin in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Metabolic syndrome and related disorders*, 2011,9(4): 287-290.
- [46]RAVASI G, PELUCCHI S, TROMBINI P, et al. Hepcidin expression in iron overload diseases is variably modulated by circulating factors[J]. *Public Library of Science one*, 2012,7(5): e36425.
- [47]LU S, NATARAJAN SK, MOTT JL, et al. Ceramide Induces Human Hepcidin Gene Transcription through JAK/STAT3 Pathway[J]. *Public Library of Science one*, 2016,11(1): e147474.
- [48]RAMBACH G, WÜRZNER R, SPETH C. Complement: an efficient sword of innate immunity[J]. *Contributions to microbiology*, 2008,15: 78-100.
- [49]GADJEVA M. The complement system. Overview[J]. *Methods in molecular biology*, 2014,1100: 1-9.
- [50]SHINKAI Y, TAKIO K, OKUMURA K. Homology of perforin to the ninth component of complement (C9)[J]. *Nature*, 1988,334(6182): 525-527.
- [51]DALAKAS MC, ALEXOPOULOS H, SPAETH PJ. Complement in neurological disorders and emerging complement-targeted therapeutics[J]. *Nature reviews. Neurology*, 2020,16(11): 601-617.
- [52]MORENO-NAVARRETE JM, FERNÁNDEZ-REAL JM. The complement system is dysfunctional in metabolic disease: Evidences in plasma and adipose tissue from obese and insulin resistant subjects[J]. *Seminars in cell & developmental biology*,

- 2019,85: 164-172.
- [53] ROUMENINA LT, DAUGAN MV, PETITPREZ F, et al. Context-dependent roles of complement in cancer[J]. *Nature reviews. Cancer*, 2019,19(12): 698-715.
- [54] BOSMANN M. Complement control for COVID-19[J]. *Science immunology*, 2021,6(59).
- [55] RUMFELD W R, MORGAN B P, CAMPBELL A K. The ninth complement component in rheumatoid arthritis, Behçet's disease and other rheumatic diseases[J]. *British journal of rheumatology*, 1986,25(3): 266-270.
- [56] SUBUDHI S, DRESCHER HK, DICHTEL LE, et al. Distinct Hepatic Gene-Expression Patterns of NAFLD in Patients With Obesity[J]. *Hepatology communications*, 2022,6(1): 77-89.
- [57] RENSEN SS, SLAATS Y, DRIESSEN A, et al. Activation of the complement system in human nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2009,50(6): 1809-1817.
- [58] TARDELLI M. Monoacylglycerol lipase reprograms lipid precursors signaling in liver disease[J]. *World journal of gastroenterology*, 2020,26(25): 3577-3585.
- [59] MATO JM, ALONSO C, NOUREDDIN M, et al. Biomarkers and subtypes of deranged lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *World journal of gastroenterology*, 2019,25(24): 3009-3020.
- [60] WANG Y, TORRES-GONZALEZ M, TRIPATHY S, et al. Elevated hepatic fatty acid elongase-5 activity affects multiple pathways controlling hepatic lipid and carbohydrate composition[J]. *Journal of lipid research*, 2008,49(7): 1538-1552.
- [61] ROBERTS SJ, STEWART AJ, SCHMID R, et al. Probing the substrate specificities of human PHOSPHO1 and PHOSPHO2[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2005,1752(1): 73-82.
- [62] SUCHACKI KJ, MORTON NM, VARY C, et al. PHOSPHO1 is a skeletal regulator of insulin resistance and obesity[J]. *BMC biology*, 2020,18(1): 149.
- [63] ZHU Y, WAN N, SHAN X, et al. Celastrol targets adenylyl cyclase-associated protein 1 to reduce macrophages-mediated inflammation and ameliorates high fat diet-induced metabolic syndrome in mice[J]. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 2021,11(5): 1200-1212.
- [64] LIU Y, CUI X, HU B, et al. Upregulated expression of CAP1 is associated with tumor migration and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *Pathology, research and practice*, 2014,210(3): 169-175.
- [65] AVTANSKI D, CHEN K, PORETSKY L. Resistin and adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP1) regulate the expression of genes related to insulin resistance in BNL CL.2 mouse liver cells[J]. *Data in brief*, 2019,25: 104112.
- [66] KAZANTSEVA J, PALM K. Diversity in TAF proteomics: consequences for cellular differentiation and migration[J]. *International journal of molecular medical science*, 2014,15(9): 16680-16697.
- [67] KALOGEROPOULOU M, VOULGARI A, KOSTOUROU V, et al. TAF4b and Jun/activating protein-1 collaborate to regulate the expression of integrin alpha6 and cancer cell migration properties[J]. *Molecular cancer research : MCR*, 2010,8(4): 554-568.
- [68] GLADUE DP, LARGO E, HOLINKA LG, et al. Classical Swine Fever Virus p7

- Protein Interacts with Host Protein CAMLG and Regulates Calcium Permeability at the Endoplasmic Reticulum[J]. *Viruses*, 2018,10(9).
- [69] LEE S H, HADIPOUR-LAKMEHSARI S, MURTHY H R, et al. REEP5 depletion causes sarco-endoplasmic reticulum vacuolization and cardiac functional defects[J]. *Nature communications*, 2020,11(1): 965.
- [70] GROH BS, YAN F, SMITH MD, et al. The antiobesity factor WDTC1 suppresses adipogenesis via the CRL4WDTC1 E3 ligase[J]. *European Molecular Biology Organization reports*, 2016,17(5): 638-647.
- [71] NELSON JK, KOENIS DS, SCHEIJ S, et al. EEPD1 Is a Novel LXR Target Gene in Macrophages Which Regulates ABCA1 Abundance and Cholesterol Efflux[J]. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2017,37(3): 423-432.
- [72] NOSAK C, SILVA P N, SOLLAZZO P, et al. Jagn1 Is Induced in Response to ER Stress and Regulates Proinsulin Biosynthesis[J]. *PLoS One*, 2016,11(2): e149177.

## 综述

### 非酒精性脂肪肝病自发产生的分子机制的研究进展

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是肝细胞从单纯性脂肪变性(SS)逐步发展到非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、肝纤维化、肝硬化甚至肝细胞癌进程中一系列疾病的统称<sup>[1]</sup>。流行病学调查显示在全球范围内, NAFLD 的发病率约为 25%且呈现日益增长趋势<sup>[2]</sup>, 在男性中, NAFLD 的患病率倾向于从年轻到中年人群增加, 并且与 NAFLD 的非老年患者相比, 老年患者的 NASH 和晚期纤维化患病率更高<sup>[3]</sup>, 在美国, 从 2005 年到 2017 年 NAFLD 发展为急性肝衰竭(ACLF)患者的增加率达 331.6%, 随着 NAFLD 人群的持续增长和年龄增长, NAFLD-ACLF 患者死亡的风险激增<sup>[4]</sup>。一项对日本 1829 名女性的调查显示, NAFLD 的患病率在该群体中随年龄增长而增加, 且与体重增加或代谢综合征的影响无关, 表明衰老是绝经前妇女 NAFLD 的危险因素<sup>[5]</sup>。因此随着年龄增加, NAFLD 发病率也随之增加, 已被世界卫生组织(WHO)确认为危害身体健康的慢性病。迄今为止, NAFLD 的发病机制有“双重打击”和“多重打击”学说。双重打击学说针对肝脏病变机制, 认为肝细胞内脂肪增加, 突出表现为甘油三酯蓄积和胰岛素抵抗引起的肝脂肪变性为第一重打击; 肝细胞内的炎症反应、线粒体功能障碍和氧化应激等增强诱导 NAFL 发展为 NASH、肝纤维化以及肝硬化为第二重打击<sup>[6]</sup>。多重打击学说针对肝脏以外的诱导肝脏病变机制, 认为遗传和环境因素的相互作用以及不同组织器官, 诸如脂肪组织、胰腺、肠、肝脏等的代谢循环紊乱引发的广泛代谢失调诱发 NAFLD<sup>[7]</sup>。近年来的研究表明, 伴随衰老导致的肝细胞代谢失调和炎症与 NAFLD 发生和恶化的呈现正相关性。伴随细胞逐渐衰老, “双重打击”和“多重打击”随之增强是导致 NAFLD 发生和恶化的重要因素。动物细胞衰老主要表现为从正常分化二倍体细胞进入细胞周期停滞状态并丧失其增殖能力导致细胞分裂能力下降<sup>[8]</sup>。在光学显微镜下可见衰老细胞的特征是细胞和细胞核明显变大。细胞的代谢失调被衰老进程中染色质病灶(SAHF)和分泌表型(SASP)增加等促进<sup>[9]</sup>。SASP 涉及促炎细胞因子、生长因子、蛋白酶、纤连蛋白、活性氧(ROS)和一氧化氮等的含量变化, 细胞内这些物质含量显著增加表明细胞已经衰老。迄今为止, 伴随衰老 NAFLD 自发产生的分子机制尚不清楚, 其他因素诱导的 NAFLD 产生的详细的分子机制也不清楚。全面深入研究衰老进程中 NAFLD 自发产生的分子机制不仅补充 NAFLD 的发病机制认识的空白点, 而且能为研发 NAFLD 新药提供新思路。

## 1. 衰老进程中的 SAHF 诱发 NAFLD

### 1.1. 端粒缩短诱发 NAFLD

细胞衰老进程中 SAHF 增加的表型之一是端粒缩短。端粒位于染色体末端, 为重复 DNA 序列和端粒结合蛋白组成的复合体, 端粒长度变短证明细胞已经衰老<sup>[10]</sup>。端粒酶是端粒酶逆转录酶(hTERT)和端粒酶 RNA(hTERC)形成的复合体, 具有核糖核酸蛋白酶功能, 可催化真核生物端粒 DNA 的延伸<sup>[11]</sup>。正常肝脏中, 伴随肝细胞衰老端粒酶活性也随之降低, 导致端粒缩短。在年龄相仿情况下, NAFLD 患者的肝细胞端粒短于作为对照组的正常肝<sup>[12]</sup>, 表明端粒缩短与脂肪变性存在紧密关联, 同时也显示在同样年龄的人类中, 细胞衰老进程加快的个体肝细胞内脂肪变性程度显著增加, 可迅速发展为 NAFLD。动物实验表明, 端粒酶功能障碍导致小鼠肝脏再生受损, 并响应慢性肝损伤而加速了肝硬化的发展<sup>[13]</sup>, 有学者认为端粒长度减少可作为判断肝组织硬化发生的一种标志<sup>[14]</sup>。在 NASH 发展为肝硬化的年轻患者来源的肝细胞内的端粒长度明显短于作为对照的正常人<sup>[15]</sup>, 且细胞衰老标记物诸如 $\beta$ -半乳糖苷酶, p16, p21 和 p53 等在肝细胞中表达量也显著高于正常人, SASP 为严重衰老型<sup>[16]</sup>。此外, 端粒缩短也增加 NAFLD 介导的癌症易感性。从健康肝脏到 NAFLD-肝硬化-肝细胞癌(HCC)的发展进程中, 外周血白细胞的端粒长度逐渐降低<sup>[17]</sup>。因此, 衰老进程中端粒缩短导致 SAHF 增加, 是 NAFLD 加速恶化推动力之一。

### 1.2. DNA 损伤诱发 NAFLD

细胞抵抗外部和内部环境变化产生的应激反应导致 DNA 损伤称为 DNA 损伤反应(DDR)。已经存在 DDR 的细胞通常激活 DNA 修复机制或通过抑制细胞周期来抵抗 DDR 对生命活动带来的不良影响。在抑制细胞周期的情况下, DDR 触发共济失调-毛细血管扩张突变(ATM)和提高 Rad3 相关的蛋白激酶表达量, 提高 p53 磷酸化水平并激活 p21, 导致细胞周期停滞<sup>[18]</sup>。同时, p21 和 p16 抑制视网膜母细胞瘤因子(Rb)的磷酸化, 使其与 E2F 转录因子结合并终止细胞周期的进程<sup>[19]</sup>, 有利于肝细胞内变性脂肪蓄积。对比易发生 NAFLD 大鼠与 NAFLD 抵抗大鼠肝脏蛋白表达也观察到这样的 p21 和 p16 变化差异, 但这种差异是由组蛋白的修饰差异引起的。与 NAFLD 抵抗大鼠相比, 易发生 NAFLD 大鼠 p16 启动子和编码区组蛋白 H4 的乙酰化水平显著升高, p16 编码区中组蛋白 H3 赖氨酸 27 甲基化水平较低。在 p21 启动子上, 组蛋白 H3 和 H4 的乙酰化水平均显著增加, p21 启动子组蛋白 H3 赖氨酸 27 三甲基化降低而二甲基化显著升高<sup>[20]</sup>。由此可见, 衰老细胞内 DDR 和特定的组蛋白修饰差异具有正相关性, p21、p16 等蛋白的表达增加可作为判断 NAFLD 发生或

恶化的标志<sup>[21]</sup>。

### 1.3 DNA 甲基化水平降低诱发 NAFLD

DNA 甲基化水平降低是衰老细胞 SAHF 的另一种表型。比较缺乏胆碱和叶酸饲料喂养引起的 NAFLD 小鼠的 DNA 甲基化水平发现肝脏 DNA 甲基化水平较低的小鼠更容易发生肝损伤<sup>[22]</sup>。而在人类肝脏活检中发现，相对于轻度 NAFLD，晚期 NAFLD 表现出明显的 DNA 低甲基化现象。在重度 NAFLD 中，纤维细胞生长因子受体 2(FGR2)和胱天蛋白酶 1(CASP1)基因的甲基化水平显著降低，蛋氨酸腺苷甲基转移酶 1A(MAT1A)基因的甲基化水平升高<sup>[23]</sup>。肝脏内这些蛋白质基因的甲基化水平增加和 DNA 甲基化水平降低也可以作为判断 NAFLD 是否恶化的标志。

## 2. 衰老进程中的 SASP 诱发 NAFLD

### 2.1 衰老基因表达诱发 NAFLD

衰老基因表达变化促进肝脏内脂肪变性。张西元等人通过研究高脂饮食(HFD)诱导的易肥胖和抗肥胖大鼠的衰老基因表达差异发现在基因转录水平上，易肥胖大鼠的 p16 和 p21 的 mRNA 水平显著升高；在蛋白水平上，NAFLD 大鼠肝脏中 p21 蛋白水平明显升高，激活 p16 的转录因子的 Ets1 蛋白质表达量也增加了 2.5 倍，但是 Rb 磷酸化水平却显著降低<sup>[20]</sup>。衰老标记蛋白 30(SMP30)是一种抗凋亡蛋白，具有随着年龄的增加而减少的特点。动物实验显示，与单纯 *db/db* 小鼠相比，敲除 SMP30 的 *db/db* 小鼠的肝脂质和脂质过氧化水平升高，内质网应激增加，显示出伴有炎症反应和氧化应激的脂肪肝<sup>[24]</sup>。由此可见，SMP30 表达量减少和 p16, p21 等蛋白表达量增加有关，可能是筛选治疗 NAFLD 新药潜在的靶标。

### 2.2 衰老引起的线粒体失调诱发 NAFLD

线粒体生物合成减少是衰老的一项显著特征。细胞衰老可以通过诱导线粒体功能障碍，导致脂肪代谢活性低下，从而导致细胞脂肪变性。体外实验表明，与代谢年轻的肝细胞相比，代谢衰老肝细胞的线粒体分解棕榈酸诱导蓄积在细胞内脂质的能力降低<sup>[25]</sup>。因此衰老细胞中变性脂肪容易积累。在动物实验中，与幼年和青年鼠相比，中年小鼠更容易产生饮食诱导的胰岛素抵抗，发展为 NAFLD 的敏感性更高，同时细胞内线粒体质量减少，肝脏中柠檬酸合酶活性降低，可能与核因子类红细胞衍生因子 2 样蛋白 2(NFE2L2)介导的肝线粒体的脂肪酸氧化能力降低有关<sup>[26]</sup>，意味着衰老动物体内的三羧酸循环活性低下。人类肝脏活检发现，与轻度脂肪变性相比，

NASH 患者肝脏中线粒体编码的 NADH 脱氢酶 6(MT-ND6)高度甲基化, DNA 甲基转移酶水平也升高, 线粒体出现形态缺陷和过氧化物酶体增殖等<sup>[27]</sup>是促进变性脂肪蓄积的原因。

### 3. 嘌呤核苷酸恶化衰老动物体内 NAFLD 症状

近期我们发现肌苷酸(IMP)、腺苷酸基琥珀酸(S-AMP)、腺苷酸(AMP)等嘌呤核苷酸都能和人体内 AMP 活化蛋白激酶(AMPK)的 $\gamma$ 亚基形成复合体, 提高 AMPK  $\alpha$  亚基上 Thr172 的磷酸化水平而活化 AMPK<sup>[28, 29]</sup>。应用油酸诱导的脂质蓄积的 HepG2 细胞的降脂实验显示 AMPK 被 IMP 等嘌呤核苷酸活化后显示出比洛伐他汀更强的降脂活性, 细胞内甘油三酯脂肪酶(ATGL)和乙酰辅酶 A 羧化酶 2(ACC2)的表达量和磷酸化显著上升, 表明细胞内的脂肪分解为脂肪酸以及脂肪酸被氧化代谢的活性被显著增加<sup>[28, 29]</sup>。对饮食诱导产生 NAFLD 的 3 月龄小鼠以剂量 300 mg/kg 的 S-AMP 灌胃给药 18 天后能导致小鼠的血脂浓度和肝细胞内脂质蓄积降低<sup>[28]</sup>, 而对 6 月龄 *db/db* 小鼠以剂量 50 mg/kg 的 IMP 灌胃给药 8 周后发现小鼠肝细胞内蓄积增加, 血清中总胆固醇(TC)含量比未给药 *db/db* 小鼠增加约 3 倍, 磷酸化的乙酰辅酶 A 羧化酶 2(ACC2)的表达量显著上升, 肝脏内乙酰辅酶 A 含量也显著增加, 和体外实验结果不同的是肝细胞内 ATGL 表达量未见显著变化 NAFLD 症状反而恶化<sup>[29]</sup>, 造成上述差别的原因是嘌呤核苷酸激活 AMPK 后促进肝细胞体内脂肪酸加速氧化, 乙酰辅酶 A 是脂肪酸 $\beta$ 氧化的重要中间产物, 是体内合成 TC、TG 和经由三羧酸循环(TCA)分解为 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O 的原料。伴随身体衰老 TCA 循环活性随之降低<sup>[30]</sup>, 当 TCA 循环不能消耗因脂肪酸过度氧化产生的乙酰辅酶 A 时, 乙酰辅酶 A 蓄积在肝脏内主要被用于合成 TC 和 TG。TC 进入到小肠内促进脂肪消化为脂肪酸, 脂肪酸被吸收后直接进入肝脏后加大肝细胞内脂肪酸氧化水平, 于是形成了嘌呤核苷酸驱动的胆固醇介导的肝脏内利用外源脂肪酸合成新甘油三酯的通路。肝脏组织形态学分析表明, 正常饲料饲养的 8 月龄小鼠已经存在明显的 NAFLD 症状, 而 4 月龄小鼠尚未有明显的肝脏细胞内脂质蓄积<sup>[28, 29]</sup>。因此, 这个通路的活性随衰老导致的 TCA 循环活性降低而更加活跃, 是肝脏受到第一重打击的重要推动力。此外, 由于脂肪酸加速氧化, 肝脏内需要产生更多的活性氧来完成相应的脂肪酸氧化, 因此形成了肝脏氧化应激, 使得 SAHF 和 SASP 中显著提高, 这是肝脏受到第二重打击的重要推动力。

### 4. 总结与展望

高脂、高糖等特殊饲料诱导产生 NAFLD 的小鼠或大鼠以及敲除瘦素受体或瘦素基因的小鼠等是常用于研究 NAFLD 的发病机制和药物研究的模型动物<sup>[31]</sup>, 从中发现了用于筛选治疗 NAFLD 药物的靶蛋白。在新药研发方面国内外都取得了重大

进展,一些候选药物已进入到 III 期临床试验,但迄今为止依然没有新药获批上市<sup>[32-33]</sup>。中华医学会肝病分会药物性肝病学组组长茅益民教授认为迄今为止还没有任何动物模型能够完全模拟 NASH 等的病理特征、发病机制等是造成这一困境的重要原因(上海国际肝病高峰论坛,中国,上海,2020.12.11-13)。鉴于人、小鼠等动物在自然衰老进程中会自发产生 NAFLD,正常饲养小鼠产生 NAFLD 的年龄段是小鼠从发育成熟期到中年衰老期间<sup>[28,29]</sup>,这个正好和人体自发产生 NAFLD 的年龄段高度吻合,因此 4-8 月龄小鼠的 NAFLD 发病机制更准确地模拟人体内对应病症的病理特征、发病机制,应该作为研究 NAFLD 发病机制的新模式,深入开展不同衰老时间点的代谢失调机制。

非酒精脂肪肝病 (NAFLD) 又称代谢相关脂肪肝病是一种进行性疾病,病情演化进程中依次出现脂肪肝及肝炎、肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌。传统观点认为过量摄入糖分、脂肪是诱发 NAFLD 的根本原因,但尽管随着避免过量摄入脂肪的健康饮食不断推广,NAFLD 的发病率依然呈现增长趋势,因此解析常规饮食条件下 NAFLD 的发病机制更能准确地判断当今社会生活中人群的 NAFLD 的病因和病理特征,为药物研究指明新方向。

## 参考文献

- [1] LONARDO A, TARGHER G. NAFLD: Is There Anything New under the Sun?[J]. *Int J Mol Sci*, 2017,18(9):1955
- [2] BYRNE C D, TARGHER G. NAFLD: a multisystem disease[J]. *J Hepatol*, 2015, 62 (1Suppl): S47-S64.
- [3] BERTOLOTTI M, LONARDO A, MUSSI C, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and aging: epidemiology to management[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(39): 14185-14204.
- [4] SUNDARAM V, JALAN R, SHAH P, et al. Acute on Chronic Liver Failure From Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Growing and Aging Cohort With Rising Mortality[J]. *Hepatology*, 2021, 73(5): 1932-1944.
- [5] HAMAGUCHI M, KOJIMA T, OHBORA A, et al. Aging is a risk factor of nonalcoholic fatty liver disease in premenopausal women[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(3): 237-243.
- [6] NEUSCHWANDER-TETRI B A. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. *BMC Med*, 2017, 15(1): 45.
- [7] BUZZETTI E, PINZANI M, TSOCHATZIS E A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. *Metabolism*, 2016,65(8): 1038-1048.
- [8] ARAVINTHAN A. Cellular senescence: a hitchhiker's guide[J]. *Hum Cell*, 2015, 28(2): 51-64.
- [9] PAPTAEODORIDI A M, CHRYSAVGIS L, KOUTSILIERIS M, et al. The Role of Senescence in the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Progression to Nonalcoholic Steatohepatitis[J]. *Hepatology*, 2020, 71(1): 363-374.
- [10]BLACKBURN E H. Structure and function of telomeres[J]. *Nature*, 1991, 350(6319): 569-573.
- [11]SCHMIDT J C, CECH T R. Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation[J]. *Genes Dev*, 2015, 29(11): 1095-1105.
- [12]ARAVINTHAN A, SCARPINI C, TACHTATZIS P, et al. Hepatocyte senescence predicts progression in non-alcohol-related fatty liver disease[J]. *J Hepatol*, 2013, 58(3): 549-556.
- [13]RUDOLPH K L, CHANG S, MILLARD M, et al. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery[J]. *Science*, 2000, 287(5456): 1253-1258.
- [14]WIEMANN S U, SATYANARAYANA A, TSAHURIDU M, et al. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis[J]. *FASEB J*, 2002, 16(9): 935-942.
- [15]AIKATA H, TAKAISHI H, KAWAKAMI Y, et al. Telomere reduction in human liver tissues with age and chronic inflammation[J]. *Exp Cell Res*, 2000, 256(2): 578-582.
- [16]GUTIERREZ-REYES G, DEL C G D L, VARELA-FASCINETTO G, et al. Cellular senescence in livers from children with end stage liver disease[J]. *PLoS One*, 2010, 5(4): e10231.
- [17]DONATI B, PIETRELLI A, PINGITORE P, et al. Telomerase reverse transcriptase germline mutations and hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic fatty

- liver disease[J]. *Cancer Med*, 2017, 6(8): 1930-1940.
- [18] BAKKENIST CJ, KASTAN M B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation[J]. *Nature*, 2003, 421(6922): 499-506.
- [19] RUBIN S M, GALL A L, ZHENG N, et al. Structure of the Rb C-terminal domain bound to E2F1-DP1: a mechanism for phosphorylation-induced E2F release[J]. *Cell*, 2005, 123(6): 1093-1106.
- [20] ZHANG X, ZHOU D, STRAKOVSKY R, et al. Hepatic cellular senescence pathway genes are induced through histone modifications in a diet-induced obese rat model[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(5): G558-G564.
- [21] SIKORA E, BIELAK-ŻMIJEWSKA A, MOSIENIAK G. What is and what is not cell senescence[J]. *Postepy Biochem*, 2018, 64(2): 110-118.
- [22] TRYNDYAK V P, HAN T, FUSCOE J C, et al. Status of hepatic DNA methylome predetermines and modulates the severity of non-alcoholic fatty liver injury in mice[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 298.
- [23] MURPHY S K, YANG H, MOYLAN C A, et al. Relationship between methylome and transcriptome in patients with nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Gastroenterology*, 2013, 145(5): 1076-1087.
- [24] KONDO Y, HASEGAWA G, OKADA H, et al. *Lepr(db/db)* Mice with senescence marker protein-30 knockout (*Lepr(db/db)Smp30(Y/-)*) exhibit increases in small dense-LDL and severe fatty liver despite being fed a standard diet[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65698.
- [25] OGRODNIK M, MIWA S, TCHKONIA T, et al. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15691.
- [26] LOHR K, PACHL F, MOGHADDAS G A, et al. Reduced mitochondrial mass and function add to age-related susceptibility toward diet-induced fatty liver in C57BL/6J mice[J]. *Physiol Rep*, 2016, 4(19).
- [27] PIROLA C J, GIANOTTI T F, BURGUEÑO A L, et al. Epigenetic modification of liver mitochondrial DNA is associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Gut*, 2013, 62(9): 1356-1363.
- [28] 王洋, 姜允嘉, 成钟, 等. 腺苷酸基琥珀酸活化 AMPK 抑制肝细胞内脂质蓄积的作用机制[J]. *中国医药生物技术*, 2020, 15(03): 240-248.
- [29] 姜允嘉, 刘金艳, 许赛君, 等. 增鲜剂 5'-肌苷酸二钠恶化老龄 *db/db* 小鼠脂质代谢紊乱的分子机制[J]. *食品科学*, 2021, 42(15): 150-158.
- [30] SHARMA R, RAMANATHAN A. The Aging Metabolome-Biomarkers to Hub Metabolites[J]. *Proteomics*, 2020, 20(5-6): e1800407.
- [31] ALKHOURI N. NASH and NAFLD: emerging drugs, therapeutic targets and translational and clinical challenges[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2020, 29(2): 87.
- [32] BOECKMANS J, NATALE A, ROMBAUT M, et al. Anti-NASH Drug Development Hitches a Lift on PPAR Agonism[J]. *Cells*, 2019, 9(1).

## 致谢

时光如梭，三年的研究生生活转瞬即逝。首先感谢国家自然科学基金和中国医学科学院创新工程经费资助，使得本课题顺利开展！在读期间，感谢谢勇老师的悉心指导和帮助。无论是课题的选择还是实验操作的细节，老师都耐心帮我把关，帮助我解决实验中的困惑，推进课题的顺利进行。谢老师严于律己，宽以待人，每天都勤奋工作，印象特别深刻的是一个冬天的晚上，他在实验室做实验一直工作到凌晨，谢老师热爱科研勤恳工作的精神是我学习的榜样。谢老师不仅在科研中耐心地鼓励我和指导我，同时还关心我们的安全和健康。经常提醒我们不要在实验室待到太晚，所里晚上施工很不安全，尽量结伴回宿舍。时常提醒我们注意疫情防控，叮嘱我们在放假往返校时注意卫生和消毒。感谢张彬老师对我实验技术的指导和帮助，让我尽快掌握基本实验操作技术，规范仪器使用操作。感谢研究生处的林佳、张翔等老师，他们耐心细心地为我解决各种大事小情，让我拥有良好的成长和科研氛围。

同时感谢王洋师兄和姜允嘉师姐对我实验和生活上的帮助和鼓励，他们不仅是我学习和科研中的榜样，在生活中也带给我很多温暖和陪伴。感谢许赛君师妹对我实验上的帮助，师妹的勤奋和善良一直是我学习的榜样。三年的时间里感谢 219 舍友们的关心和爱护，每天晚上我们回到宿舍都会叽叽喳喳的聊天，分享一天的生活，为彼此加油打气。感谢我的好友王杰的陪伴和鼓励，给予我很多支持和信心。最后感谢我的父母和弟弟，他们的爱与鼓励是我前进的不竭动力！

最后感谢可爱的实验动物为科研的奉献，他们陪伴着我的给药过程，让我的实验得以顺利进行。

再次向各位老师、师兄师姐及同学们表示深深的谢意！

## 作者简介

### 1. 基本信息

姓名：刘金艳

性别：女

出生日期：1997年3月

籍贯：山东临沂

### 2. 教育背景

2015.09-2019.07 山东农业大学大学 农学院 理学学士 中药资源与开发专业

2016.09-2019.07 北京协和医学院 药用植物研究所 医学硕士 药学专业

### 3. 成果目录

[1] 刘金艳, 张彬, 许赛君, 赵晓宏, 许扬, 谢勇\* 衰老进程中非酒精性脂肪肝病自发产生的分子机制的研究进展, 中国医药生物技术, 2021, 16(03), 247-250.

[2] 姜允嘉, 刘金艳, 许赛君, 王洋, 张彬, 成钟, 许扬, 谢勇\* 增鲜剂5'-肌苷酸二钠恶化老龄 *db/db* 小鼠脂质代谢紊乱的分子机制, 食品科学, 2021, 42(15), 150-158.

[3] Bin zhang, Saijun Xu, Jinyan Liu, Sun Xiaobo\*, Yong Xie\*. Long Noncoding RNAs: Novel Important Players in Adipocyte Lipid Metabolism and Derivative Diseases, Front. Physiol., 2021, 12(2021/June): 1-12.

### 4. 荣誉奖项

2020.9 2019-2020年度中国医学科学院药用植物研究所优秀学生干部

2021.9 2020-2021年度中国医学科学院药用植物研究所优秀学生干部

2021.10 2021年北京协和医学院研究生社会实践优秀奖

2021.12 2020-2021年度北京协和医学院硕士研究生学业二等奖学金