

乳源五肽 PGPIP 缓解酒精性脂肪肝及其机制研究

黄九九,耿奇龙,李安琪,秦宜德,戚楠

摘要 目的 研究乳源五肽脯氨酸-甘氨酸-脯氨酸-异亮氨酸-脯氨酸(PGPIP)缓解小鼠慢性酒精性肝损伤及其相关的分子机制。方法 40只C57BL/6小鼠,随机均分为对照组、模型组、谷胱甘肽(GSH)组、PGPIP组。采用10d Lieber-Decarli酒精饲料喂养加1次急性酒精灌胃的方法建立小鼠慢性酒精性脂肪肝模型,造模的同时给予药物干预。根据已有的基因表达综合(GEO)数据库中RNA测序数据,采用聚类热图对肝脏内质网应激相关基因差异表达分析。肝脏苏木素-伊红(HE)染色分析各处理组对小鼠酒精性肝损伤的病理学影响,油红O染色分析各处理组对小鼠肝脏脂滴积累的影响。透射电子显微镜分析酒精代谢引起的脂滴积累对肝细胞显微结构的影响并验证PGPIP的作用效果。蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测内质网应激相关信号转导蛋白表达变化。结果 PGPIP组病理学检查类似正常对照组,小鼠肝脏损伤明显减轻。模型组小鼠肝脏中有明显的脂滴积累,表现为大小不同程度的混合型脂滴,PGPIP处理后明显减少酒精诱导的肝脏脂滴积累。PGPIP对PERK-eIF2 α -ATF4通路有较大影响,且对转录激活因子6(ATF6)和Cleaved Caspase 3蛋白的表达有显著性的效果。结论 五肽PGPIP能缓解小鼠慢性酒精性脂肪肝和肝损伤,其机制可能是通过减少肝细胞中的脂滴积累,并且减少内质网应激和肝细胞凋亡从而发挥作用。

关键词 PGPIP;酒精性脂肪肝;内质网应激;ATF4;ATF6

中图分类号 R 575.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)11-1813-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.002

酒精性肝病在人类肝脏疾病中排名前列,根据肝脏损伤的病程差异可分为急性肝损伤和慢性肝损伤,其发病过程包括早期的肝脏脂肪化,脂肪性肝炎,一些患者最终可能发展成肝脏纤维化和肝癌。由于酒精性肝病的病因复杂,确切的发病机制仍不清楚,目前没有明确预防或治疗的方法^[1]。生物活

性肽和许多抗氧化剂或免疫抑制剂相比,分子量较小,易于通过肠道屏障而被吸收。天然牛乳来源的五肽脯氨酸-甘氨酸-脯氨酸-异亮氨酸-脯氨酸(prolin-glycine-proline-isoleucine-proline, PGPIP)位于A2 β -酪蛋白的63~67残基上,含有3个Pro,不易被蛋白酶分解,并且所有的氨基酸都是非极性疏水性氨基酸。疏水性氨基酸有助于维持蛋白质的天然构象和功能,疏水相互作用也是多肽和脂蛋白之间结合的重要作用力^[2]。慢性酒精喂养加急性酒精灌胃小鼠模型是由美国国立卫生研究院酒精滥用与酒精中毒研究所(NIAAA)建立的。随着喂养时间的延长,模型组小鼠发展出类似人类酒精性肝病的肝脏中性粒细胞浸润和肝脏纤维化^[3]。该研究拟建立NIAAA小鼠模型,并利用其研究乳源五肽PGPIP对酒精性脂肪肝的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 40只清洁级,健康8周龄C57BL/6小鼠,购自安徽医科大学实验动物中心[许可证号:SCXK(皖)2017-001]。分笼饲养于12h/12h昼夜交替,相对湿度45%~55%、温度20~25℃的环境中,可自由饮水。

1.1.2 主要试剂 对照和模型 Lieber-Decarli 液体饲料(江苏南通特洛菲公司);PGPIP(纯度>98%);qRT-PCR引物(上海生物工程有限公司);谷胱甘肽(glutathione, GSH)、苏木精、4%的多聚甲醛和中性树胶(江苏碧云天生物技术公司);无水乙醇(上海苏懿化学试剂公司);C/EBP同源蛋白质(C/EBP-homologous protein, CHOP)、半胱天冬酶3(Caspase 3)、Cleaved Caspase 3、 β -actin抗体(美国Abcam生物技术公司);磷酸化RNA-依赖蛋白激酶样内质网激酶(P-PERK)、PERK、磷酸化真核翻译起始因子2 α (P-eIF2 α)、eIF2 α 、转录激活因子4(activating transcription factor 4, ATF4)和ATF6抗体(美国Cell Signaling生物技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 NIAAA小鼠模型肝脏内质网应激相关基因

2023-06-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81472448);安徽省自然科学基金(编号:1908085MH280)

作者单位:安徽医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,合肥 230032

作者简介:黄九九,女,硕士研究生;

戚楠,男,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:2002500034@ahmu.edu.cn

差异表达热图 NIAAA 小鼠模型肝脏 RNA 测序数据来自美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 的基因表达综合 (GEO) 数据库, 检索号 GSE163444^[4]。

1.2.2 NIAAA 小鼠模型的建立 C57BL/6 小鼠进行 5 d 的酒精饲料适应期。对照组小鼠被喂养对照 LD 液体饲料 5 d, 实验组小鼠结束适应期开始喂养含 1% 酒精的 Lieber-Decarli 模型液体饲料, 每天喂养的酒精浓度增加 1%, 直到达到 5% 的酒精浓度为止。随后小鼠被允许自由饮食, 对照组每天继续喂养对照液体饲料, 实验组喂养 5% 酒精浓度的模型液体饲料, 分别持续 10 d。实验期间小鼠每天称重, 检测健康状况。在最后 1 天, 实验组小鼠进行 1 次 5 g 酒精/kg 体质量的酒精灌胃, 对照组小鼠则灌胃同等热量的麦芽糖糊精。9 h 后处死小鼠, 收集肝脏组织和血清备用。

1.2.3 实验分组设计 所有小鼠随机分成 4 组, 每组 10 只小鼠, 分别为: 对照 LD 饲料喂养 (对照组)、含酒精模型 LD 饲料喂养 (模型组)、含酒精模型 LD 饲料喂养, 同时每天用 GSH 灌胃 (GSH 组)、含酒精模型 LD 饲料喂养, 同时每天用 PGPIP 灌胃 (PGPIP 组)。所有小鼠在慢性酒精液体饲料喂养加急性酒精灌胃后都存活下来。GSH 组和 PGPIP 组, 每天在最后 1 天酒精灌胃之前 30 min 的同样时间, 分别灌胃 4×10^{-6} mol/kg 体质量的 GSH 和 PGPIP。对照组和模型组, 每天灌胃同等体积的去离子水。

1.2.4 组织学分析 取小鼠新鲜肝脏放置 4% 多聚甲醛中固定 24 h 以上。固定结束后放入自动组织脱水机中脱水, 石蜡包埋机包埋, 石蜡切片厚度为 5 μ m, 切片烘干后脱蜡。苏木精染细胞核, 盐酸酒精分化, 碳酸锂反蓝, 伊红染细胞质。中性树胶封片观察。

1.2.5 油红 O 染色 通过油红 O 染色确定肝脏脂肪化。取小鼠新鲜肝脏置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 以上。将固定好的小鼠肝组织置于蔗糖溶液中脱水, PBS 清洗组织表面的蔗糖溶液, OCT 包埋剂包埋肝组织。切片厚度为 10 μ m, 干冰冷冻后, 切片置于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。油红 O 工作液按照 3 : 2 比例配置, 取 30 ml 油红 O 染色储备液与 20 ml 的去离子水混匀, 静置 10 min 后, 过滤, 现配现用。冰冻切片用油红 O 工作液避光染色 10 min, 异丙醇分化, 苏木精染细胞核, 盐酸酒精分化, 碳酸锂反蓝。甘油明胶封片观察。

1.2.6 透射电镜分析 取材器械提前在 4 $^{\circ}$ C 冰箱内预冷, 取新鲜小鼠肝脏, 切成大小为 1 mm³ 左右

或横切面为 1 mm² 的长条形, 将组织放入 2.5% 戊二醛固定液内于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内前固定, 磷酸缓冲溶液漂洗, 1% 锇酸于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内后固定, 渗透包埋后, 切片厚度为 70 nm, 枸橼酸铅染色, 透射电镜观察拍照。

1.2.7 qRT-PCR 实验 各处理组小鼠肝脏组织剪碎研磨后用 TRIzol 试剂盒提取组织总 RNA, 然后逆转录成 cDNA。目的基因的 mRNA 表达水平用 GAPDH 作为内参定量测定。每组设置 3 个复孔, 目的引物序列见表 1, 根据实验结果获得 Ct 值, 目的基因 mRNA 的表达水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法定量。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列 (5'-3')
CHOP	F: GACCAGGTTCTGCTTTTCAGG R: CAGCGACAGAGCCAGAATAA
Bip/GRP78	F: ATCTTTGGTTGCTTGTGCGCT R: ATGAAGGAGACTGCTGAGGC
GAPDH	F: AGTCCGTTGTGAACGGATTTC R: TGTAGACCATGCTAGTTGAGGTCA

1.2.8 Western blot 实验 取新鲜小鼠肝脏, 剪切成细小的碎片, 按照每 20 mg 组织加入 200 μ l RIPA 裂解液裂解。裂解液经过蛋白浓度定量后, 等量的蛋白 (20 μ g) 加到上样孔中进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。Western blot 转膜后, 用含 5% 的脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 1 h, 一抗 1 : 1 000 TBST 稀释后 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗 3 次后, 辣根酶标记的二抗 1 : 1 000 TBST 稀释后 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 显色。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NIAAA 小鼠模型肝脏内质网应激相关基因差异表达分析 为了探索 NIAAA 小鼠模型肝脏中酒精代谢对内质网应激的影响, 选取酒精代谢酶细胞色素 P4502E1 (CYP2E1) 和非折叠蛋白质反应 (unfolded protein response, UPR) 经典通路相关基因, 根据已有的 GEO 数据库中 RNA 测序数据进行聚类热图分析, 其中对照组和模型组各选取 3 只小鼠肝脏样本数据, 结果如图 1 所示, 对照组和模型组样本之间生物重复性较好, ATF4、CHOP、ATF6 和 PERK 基因在对照组肝脏样本中表达相对较低, 而在模型组样本中表达相对较高。

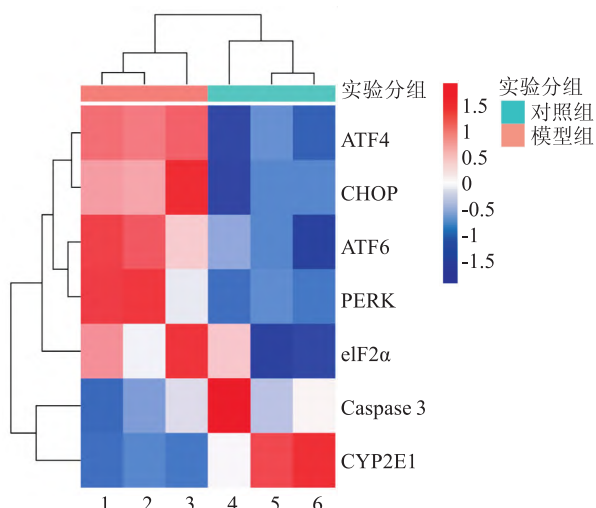


图1 NIAAA小鼠模型肝脏RNA测序基因差异表达热图
1~3:酒精组;4~6:对照组

2.2 各处理组对小鼠酒精性肝损伤的病理学影响

HE常规染色如图2所示,正常对照组小鼠在中央静脉周围分布着放射状的肝细胞,形成肝细胞索。肝小叶结构清晰,肝细胞索排列整齐。模型组小鼠肝细胞索排列紊乱,肝细胞出现重度脂肪变性,表现为大脂肪泡和小脂肪泡相间的混合型脂肪病变。此外,肝小叶间可见不同程度的炎症细胞浸润。GSH组小鼠肝细胞脂肪变性程度和模型组类似。PGPIP组小鼠肝细胞脂肪病变程度比模型组和GSH组小鼠明显减轻,肝小叶结构完整。

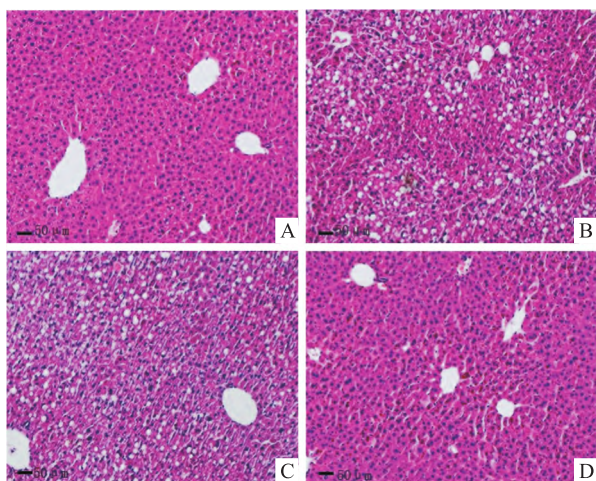


图2 各处理组对慢性酒精性脂肪肝模型病理学改变的影响 ×200
A:对照组;B:模型组;C:GSH组;D:PGPIP组

2.3 各处理组对小鼠肝脏脂滴积累的影响 油红O染色如图3所示,正常对照组小鼠肝脏中可见较少的脂滴,与之相比,模型组小鼠肝脏中有明显的脂

滴积累,表现为大小不同程度的混合型脂滴,GSH组小鼠肝脏与模型组相似,但脂滴的尺寸有所减少。PGPIP组小鼠肝脏脂滴数目与模型组和GSH组相比明显减少,与对照组类似。

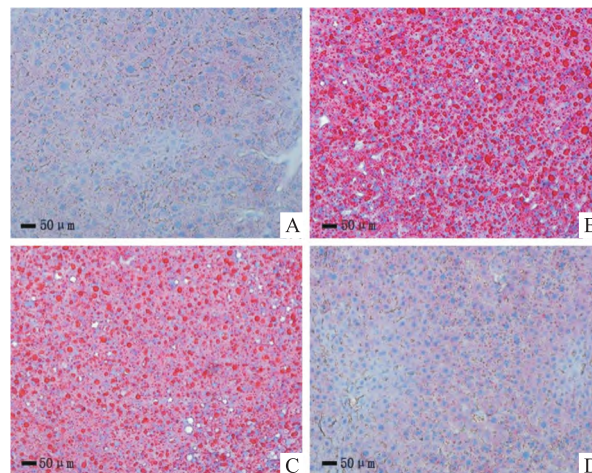


图3 各处理组对慢性酒精性脂肪肝模型脂滴积累的影响 ×200
A:对照组;B:模型组;C:GSH组;D:PGPIP组

2.4 各处理组对肝细胞显微形态的影响 为了进一步分析酒精代谢引起的脂滴积累对肝细胞显微结构的影响并验证PGPIP的作用效果,对各处理组小鼠肝脏进行透射电子显微镜分析。结果如图4所示,对照组小鼠肝细胞细胞质膜边界明显,细胞核结构清晰,呈椭圆形,周围环绕着许多大小不等的线粒体,线粒体的周围可见内质网。细胞内仅有少量的脂滴存在,且脂滴的尺寸较小。模型组小鼠肝细胞细胞膜边界模糊,肝细胞胞质空间被许多较大的脂滴占据(大于5 μm),此外还有一些小的脂滴。肝细胞细胞核有明显的形态改变,可能是由于周围大脂滴的挤压所致。与模型组类似,GSH组小鼠肝细胞中也有较大的脂滴(大于5 μm)。PGPIP组小鼠肝细胞脂滴的数目和尺寸明显减少,细胞核重新恢复成椭圆形,细胞内可见许多线粒体和线粒体周围的内质网。

2.5 PGPIP调节肝脏中内质网应激相关基因的表达 通过qTR-PCR,分析各处理组小鼠肝脏组织中和内质网应激相关的CHOP和Bip mRNA的表达。通过Western blot分析内质网应激相关的P-PERK、PERK、P-eIF2α、eIF2α、ATF4、ATF6、CHOP、Cleaved Caspase 3和Caspase 3蛋白。结果如图5所示,与对照组相比,模型组中CHOP mRNA表达水平显著增加,PGPIP恢复了表达水平的改变。与对照组相比,模型组中P-PERK、P-eIF2α、ATF4、ATF6、CHOP、

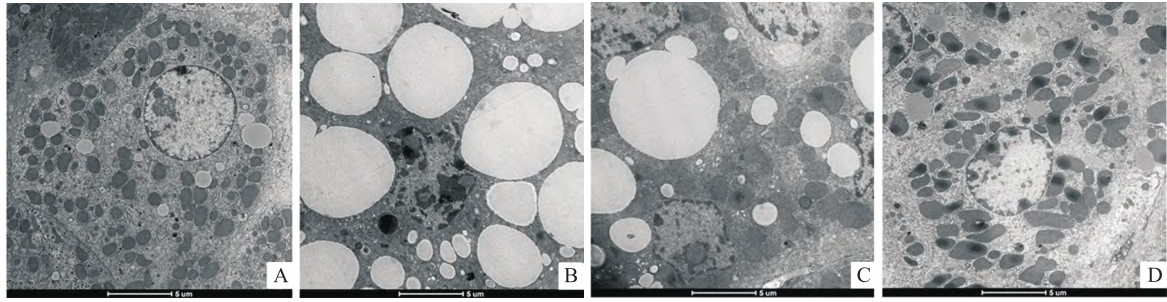


图4 各处理组对慢性酒精性脂肪肝模型肝细胞显微结构的影响 ×1 600
A:对照组;B:模型组;C:GSH组;D:PGPIP组

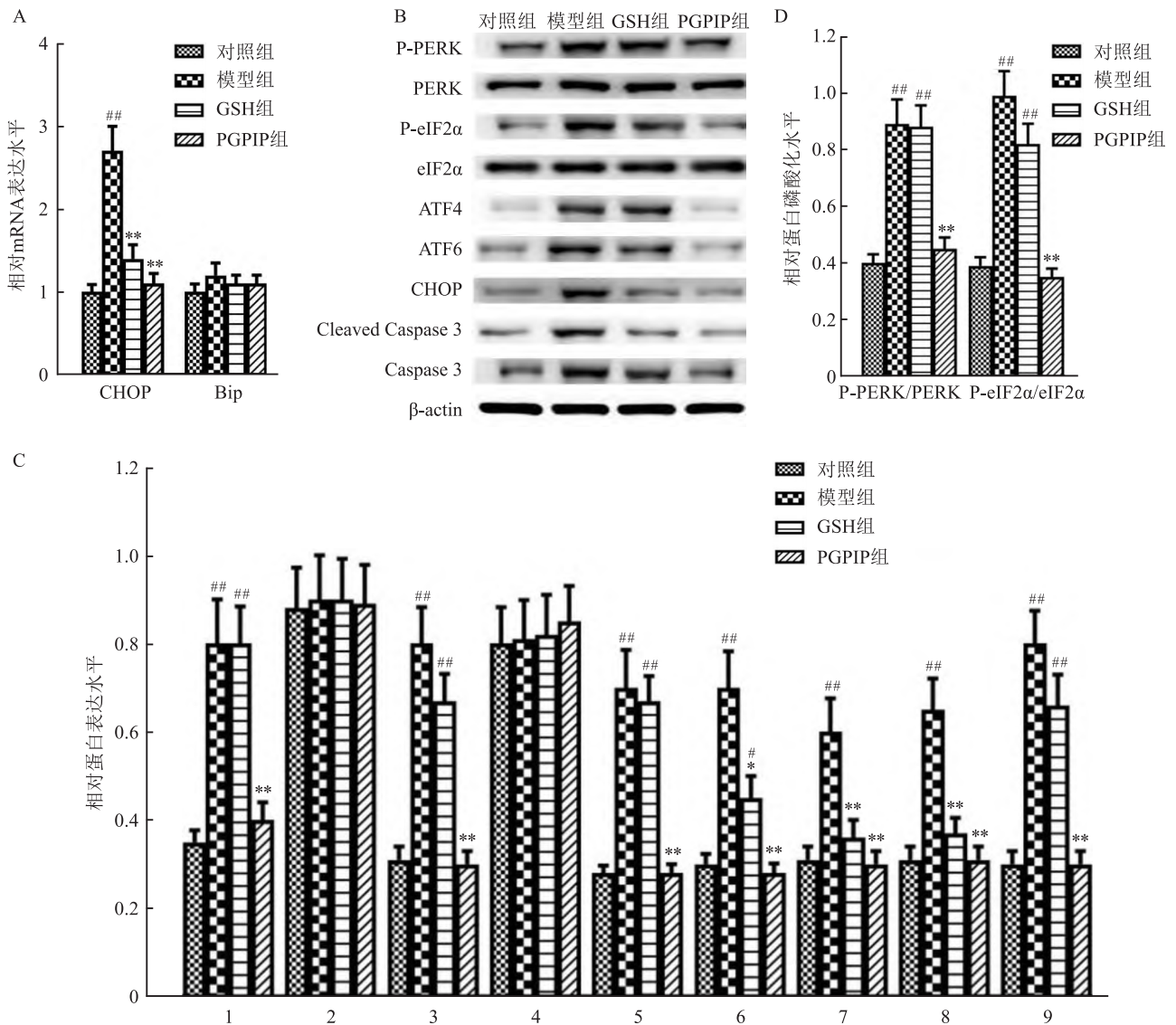


图5 PGPIP调节内质网应激相关 mRNA 表达水平和蛋白表达水平/活性

A:小鼠肝脏组织中各组 CHOP 和 Bip 相对 mRNA 的表达水平; B:Western blot 检测小鼠肝脏组织中各组内质网应激相关蛋白表达; C:小鼠肝脏组织中各组内质网应激相关蛋白相对表达水平; D:小鼠肝脏组织中各组 P-PERK/PERK 和 P-eIF2α/eIF2α 的相对磷酸化水平;1:P-PERK 组;2:PERK 组;3:P-eIF2 组;4:eIF2 组;5:ATF4 组;6:ATF6 组;7:CHOP 组;8:Cleaved Caspase 3 组;9:Caspase 3 组;与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与对照组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Cleaved Caspase 3 和 Caspase 3 蛋白的表达水平显著增加,但 PERK、eIF2α 的蛋白表达水平并没有显著

性改变。PGPIP 肽能够显著恢复酒精诱导的上述蛋白表达水平的增加,并且 PGPIP 对 PERK 和 eIF2 α 的蛋白表达水平没有明显影响。此外,结果显示,与对照组相比,模型组中 P-PERK/PERK 和 P-eIF2 α /eIF2 α 的磷酸化水平显著增加,然而 PGPIP 恢复了磷酸化水平的改变。因此,PGPIP 对 PERK-eIF2 α -ATF4 通路有较大影响,且对 ATF6 和 Cleaved Caspase 3 蛋白的表达有显著性的效果。

3 讨论

肝脏是人体酒精代谢的主要器官,肝细胞中负责酒精代谢的酶类主要有两种,乙醇脱氢酶和 CYP2E1。CYP2E1 主要定位于肝细胞的内质网,肝细胞的内质网还发挥许多重要的生物学功能,包括胞质共翻译蛋白质折叠,调节钙离子平衡和脂类的生物合成。内质网内的氧化还原环境是通过 GSH 氧化还原产物的比率来维持的。在慢性重度酒精性肝病患者体内,CYP2E1 基因被大量诱导表达,催化乙醇转变成乙醛,同时生成大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)^[5]。过量的 ROS 能够氧化内质网内的蛋白质和脂质,改变内质网内的氧化还原环境,导致蛋白质折叠错误^[6]。在内质网腔中错误折叠/未折叠的蛋白质和内质网折叠机器之间平衡被打破,导致错误折叠/未折叠的蛋白质聚集,引起内质网应激。在内质网应激发生时,GSH 氧化还原产物的比率改变,进一步增加 ROS 产生,改变内质网内的氧化还原环境。

肝细胞中脂质积累是酒精性肝病早期的主要特征之一,积累的脂质主要以磷脂单层膜包裹的脂滴的形式存在,脂滴中心则是由富含三酰甘油的疏水性的中性脂质组成的内核。参与三酰甘油合成的脂肪酸的来源,有食物来源的,脂肪组织经过脂解后释放进入血液的,以及肝细胞通过脂肪酸合成途径生成的。慢性饮酒会促进脂肪组织脂解,并且促进肝细胞合成脂肪酸^[3]。在肝细胞中,脂肪酸被运输到内质网合成三酰甘油,继而从内质网以脂滴的形式出芽进入细胞质^[7]。过多的脂肪酸进入内质网,超出了内质网的三酰甘油合成载量,在内质网中积累会导致内质网应激。在酒精性肝病小鼠模型中,肝细胞特异性敲除主要表达于内质网膜上的甘油二酯酰基转移酶 1,一种三酰甘油合成的限速酶,会促进肝脏脂肪酸合成,生成过多的脂肪酸继而诱导内质网应激,而降低肝脏脂肪酸水平能够抑制内质网应激^[8]。

内质网应激发生时,启动 UPR,通过减少蛋白质翻译,增加蛋白质折叠,以及促进错误折叠/未折叠的蛋白质降解,恢复内质网平衡。UPR 包含 3 种经典信号转导通路,被 3 种通常称为 UPR 感受器的内质网跨膜蛋白起始,包括肌醇需求酶 1- α (IRE1 α)、PERK、ATF6。在生理条件下,UPR 感受器的内质网腔面结构域和内质网固有伴侣相互作用并结合,特别是 BiP/GRP78 蛋白。当未折叠/错误折叠的蛋白质积累在内质网腔内,它们就结合并饱和 BiP,竞争性使 BiP 从 UPR 感受器的内质网腔面结构域解离,继而导致后者寡聚化并激活。PERK 激活后,通过磷酸化激活 eIF2 α ,选择性诱导激活 ATF4。已有研究^[9]报道酒精性肝病小鼠模型在肝脏中激活 PERK/eIF2 α /ATF4 信号通路,并诱导脂肪酸合成相关基因的表达,导致肝脏脂肪化,提示内质网应激会促进脂肪酸的合成。转录因子 ATF4 和 ATF6 激活后进入细胞核,诱导 CHOP 的表达^[10-13]。在内质网应激诱导的肝细胞凋亡过程中,CHOP 表达并在细胞核内积累^[14]。CHOP 并不直接诱导凋亡,而是激活 Caspase 3 起始凋亡通路^[15]。剪切后激活的 Caspase 3 切割细胞核和细胞质中的活性蛋白质,导致肝细胞凋亡。凋亡的肝细胞作为损伤相关的分子模式进一步促进酒精性肝病的发展。目前的结果显示 PGPIP 显著性减少 PERK/eIF2 α 通路磷酸化水平和 ATF6 表达水平,导致 CHOP 表达显著性减少。减少的 CHOP 表达导致 Caspase 3 的激活减少,因此减少了内质网应激,从而缓解酒精性脂肪肝。综上所述,PGPIP 在酒精性肝病的防治过程中起到较大作用,且 PGPIP 具有副作用小、成本低廉、分子量小、不易引起免疫反应、可口服等多种方式给药等优点,但其更为详细的分子机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] Xiang X, Hwang S, Feng D, et al. Interleukin-22 in alcoholic hepatitis and beyond[J]. *Hepatol Int*, 2020, 14(5):667-76.
- [2] Wang W, Xu C, Wang Q, et al. Protective effect of polyphenols, protein, peptides, and polysaccharides on alcoholic liver disease: a review of research status and molecular mechanisms[J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(15):5861-83.
- [3] Mathur M, Yeh Y T, Arya R K, et al. Adipose lipolysis is important for ethanol to induce fatty liver in the national institute on alcohol abuse and alcoholism murine model of chronic and binge ethanol feeding[J]. *Hepatology*, 2023, 77(5):1688-701.
- [4] Bathula C S, Chen J, Kumar R, et al. ZFP36L1 regulates fgf21 mRNA turnover and modulates alcoholic hepatic steatosis and inflammation in mice[J]. *Am J Pathol*, 2022, 192(2):208-25.

- [5] Shi Y, Liu Y, Wang S, et al. Endoplasmic reticulum-targeted inhibition of CYP2E1 with vitamin E nanoemulsions alleviates hepatocyte oxidative stress and reverses alcoholic liver disease [J]. *Biomaterials*, 2022, 288; 121720.
- [6] Shergalis A G, Hu S, Bankhead A 3rd, et al. Role of the ER01-PDI interaction in oxidative protein folding and disease [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 210;107525.
- [7] Scorletti E, Carr R M. A new perspective on NAFLD: focusing on lipid droplets [J]. *J Hepatol*, 2022, 76(4);934–45.
- [8] Guo W, Zhong W, Hao L, et al. Fatty acids inhibit LAMP2-mediated autophagy flux *via* activating ER stress pathway in alcohol-related liver disease [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021, 12(5);1599–615.
- [9] Song Q, Chen Y, Wang J, et al. ER stress-induced upregulation of NNMT contributes to alcohol-related fatty liver development [J]. *J Hepatol*, 2020, 73(4);783–93.
- [10] Liu Q, Tang Q, Jing X, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor protects against paracetamol-induced liver injury by inhibiting PERK-ATF4-CHOP signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 602;163–9.
- [11] Tian G, Li J, Zhou L. Ginsenoside Rg1 regulates autophagy and endoplasmic reticulum stress *via* the AMPK/mTOR and PERK/ATF4/CHOP pathways to alleviate alcohol-induced myocardial injury [J]. *Int J Mol Med*, 2023, 52(1);56.
- [12] Yang C, Wang Z, Hu Y, et al. Hyperglycemia-triggered ATF6-CHOP pathway aggravates acute inflammatory liver injury by beta-catenin signaling [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1);115.
- [13] Jeong T B, Kwon D, Son S W, et al. Weaning mice and adult mice exhibit differential carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(3);201.
- [14] Borkham-Kamphorst E, Haas U, Van de Leur E, et al. Chronic carbon tetrachloride applications induced hepatocyte apoptosis in lipocalin 2 null mice through endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15);5230.
- [15] Hu H, Tian M, Ding C, et al. The C/EBP Homologous Protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection [J]. *Front Immunol*, 2018, 9;3083.

Study on alleviating alcoholic fatty liver with Milk derived pentapeptide PGPIP and its mechanism

Huang Jiujiu, Geng Qilong, Li Anqi, Qin Yide, Qi Nan

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effects of milk derived pentapeptide prolin-glycine-proline-isoleucine-proline (PGPIP) on chronic alcoholic liver injury in mice and its related molecular mechanism. **Methods** Forty C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group, glutathione (GSH) group, PGPIP group. The mice model of chronic alcoholic fatty liver was established by 10 d ad libitum oral feeding with the Lieber-DeCarli (LD) ethanol liquid diet plus one binge. Drug intervention was given at the same time. Based on the reported RNA sequencing data in gene expression omnibus (GEO) database, the differential expression of liver endoplasmic reticulum stress-related genes was analyzed by cluster heat map. Liver hematoxylin-eosin (HE) staining was used to analyze the pathological effects of each treatment group on alcoholic liver injury in mice. Oiled Red O staining was used to analyze the effects of each treatment group on the accumulation of liver lipid droplets in mice. Transmission electron microscopy was used to analyze the effect of lipid droplet accumulation caused by alcohol metabolism on the microstructure of hepatocytes and verify the effect of PGPIP. Endoplasmic reticulum stress-related signal transduction protein expression was detected by Western blot. **Results** The pathological examination of PGPIP group was similar to that of Control group, and the liver injury of mice was significantly reduced. The accumulation of lipid droplets in the liver of mice in the model group was manifested as mixed lipid droplets of different sizes, and PGPIP treatment significantly reduced the accumulation of liver lipid droplets induced by alcohol. PGPIP had significant effects on the PERK-eIF2 α -ATF4 pathway and the expression of transcriptional activator 6 (ATF6), Cleaved Caspase 3 protein. **Conclusion** Pentapeptide PGPIP can alleviate chronic alcoholic fatty liver and liver injury in mice. The mechanism may be attributed to reducing the accumulation of lipid droplets in hepatocytes, endoplasmic reticulum stress, and hepatocyte apoptosis.

Key words PGPIP; alcoholic fatty liver; endoplasmic reticulum stress; ATF4; ATF6