

网络出版时间: 2022-11-28 19:42 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20221128.1710.005.html>

肝脏特异性敲除转录因子 EB 对饮食诱导的小鼠肝脏脂肪变性的影响

管玲玲, 程代川, 张恒, 门秀丽

摘要 目的 探究转录因子 EB (Tfeb) 肝脏特异性敲除对高脂饮食 (HFD) 诱导小鼠肝脏脂肪变性的影响。方法 野生型 C57BL/6J 小鼠和肝脏特异性敲除 Tfeb 的 C57BL/6J 小鼠分别给予 HFD 或正常饲料喂养 12 周, 分别测定每组小鼠血清三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、谷草转氨酶 (AST) 和谷丙转氨酶 (ALT); Western blot 方法检测各组小鼠肝组织 Tfeb 蛋白表达水平, HE 染色检测每组小鼠肝脏病理组织学变化, 油红 O 染色检测每组小鼠肝组织脂质沉积情况, F4/80 荧光染色检测每组小鼠肝脏组织巨噬细胞浸润情况。结果 肝脏特异性敲除 Tfeb 小鼠肝脏 Tfeb 基因无表达, 提示肝组织 Tfeb 基因敲除效果较好。与正常对照组相比, 模型对照组小鼠肝组织 Tfeb 蛋白表达下调; 与正常对照组相比, HE 染色结果和油红 O 染色结果均显示肝脏特异性敲除 Tfeb 可引起小鼠肝脏脂质沉积, 肝小叶结构紊乱, 这一结果与模型对照组小鼠肝脏变化相似, 而肝脏特异性敲除 Tfeb 小鼠 HFD 12 周时, 小鼠肝脏脂质沉积、肝小叶结构紊乱更严重; F4/80 荧光染色结果提示肝脏 Tfeb 特异性敲除可加重 HFD 诱导的小鼠肝脏巨噬细胞浸润。同时血清学检测结果提示: 与正常对照组相比, 肝脏特异性敲除 Tfeb 小鼠和模型对照组小鼠血清 TC、TG、TNF- α 、MCP-1、AST 和 ALT 水平升高, Tfeb 肝脏敲除小鼠 HFD 喂养后进一步升高。结论 Tfeb 肝脏特异性敲除可加重 HFD 诱导的小鼠肝脏脂肪变性。

关键词 Tfeb; 脂质沉积; 炎症

中图分类号 R 575.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)12-1875-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.005

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种发病机制与肥胖和胰岛素抵抗密切相关的常见肝脏疾病。过量的脂质引起肝组织炎症, 进一步发展为非酒精性脂肪性肝炎、纤维

化, 甚至是肝细胞癌^[1]。目前, 由于其发病机制尚不十分清楚, 合理饮食及适当的体育锻炼是改善 NAFLD 的主要方式, 但仍缺乏有效的治疗药物^[2]。转录因子 EB (transcription factor EB, Tfeb) 是 MiT/TFE 家族的成员, 该家族包括 Mitf、Tfec、Tfe3 和 Tfeb。Mitf 基因在黑素细胞、破骨细胞和自然杀伤细胞中表达, Tfec 表达仅限于骨髓来源, Tfe3 在骨骼肌中丰富, 而 Tfeb 被认为普遍表达^[3-4]。研究^[5]表明, 当 Tfeb 表达受损时, 高脂饮食 (high-fat diet, HFD) 会导致小鼠肝损伤且伴随脂肪变性的加重。

该研究使用正常饲料和 HFD 饲料分别喂养正常小鼠和肝脏特异性敲除 Tfeb 小鼠 (Tfeb^{Δhep}), 通过生物化学、分子生物学和免疫病理学等多重手段观察 Tfeb 在 NAFLD 发病过程中的作用, 进一步探讨 NAFLD 的发生机制, 旨在为临床防治 NAFLD 提供一定实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与饲料 该实验所用肝脏 Tfeb 特异性敲除 (Tfeb^{Δhep}) 的 C57BL/6J 小鼠购自北京中日友好医院临床医学研究所动物平台, 其他 C57BL/6J 小鼠购自北京华阜康生物有限公司 [SCXK(京)2020-0004], 饲养于华北理工大学动物实验中心 SPF 级屏障实验室 [SYXK(冀)2015-0038]。正常饲料购自中日友好医院临床医学研究所动物平台, 高脂饲料购自成都达硕实验动物有限公司。动物实验操作遵守 3R 原则, 动物饲养及实验通过华北理工大学动物实验伦理审查 (编号: 2017062)。

1.2 主要试剂与仪器 三酰甘油 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司, 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) ELISA 检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司, 油红 O 染液购自上海碧云天生物技术有限公司, 全自动生化分析仪 (3100) 购自上海日立诊断产品有限公司, 共聚焦显微镜和正置荧光显微镜均购自德国

2022-09-02 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81370918)

作者单位: 华北理工大学基础医学院, 唐山 063210

作者简介: 管玲玲, 女, 硕士研究生;

门秀丽, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xiuli-men@126.com

Zeiss 公司; 冷冻切片机购自上海徕卡显微系统贸易有限公司, Tfeb (13372-1-AP) 及 F4/80 (28463-1-AP) 抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 动物模型的建立与分组 12 只 Tfeb^{Δhep} 小鼠和 12 只野生型对照小鼠, 适应性饲养 1 周后, 分别随机分成正常对照组、Tfeb^{Δhep} 对照组、模型对照组、Tfeb^{Δhep} 模型组, 其中正常对照组和 Tfeb^{Δhep} 对照组予以普通饲料, 模型对照组和 Tfeb^{Δhep} 模型组予以 12 周高脂饲料喂养以诱导肝脏脂肪变性 ($n=6$)。见表 1。

表 1 实验分组及饲养方式

组别	饲料	饲养时间(周)
正常对照	普通	12
Tfeb ^{Δhep} 对照	普通	12
模型对照	高脂	12
Tfeb ^{Δhep} 模型	高脂	12

1.4 Western blot 检测 Tfeb 表达水平 提取各组小鼠肝组织的总蛋白, 并在 RIPA 缓冲液中均质化。小鼠蛋白通过 4%~12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离并转移到 PVDF 膜上。将膜在 PBS 封闭缓冲液(含 5% BSA 的 0.1% Tween-20) 中封闭 2 h, 并在 4 °C 下孵育 Tfeb (1:2 000) 一抗过夜, 在室温下使用 Tfeb 二抗(1:2 000) 标记。使用增强的化学发光系统显影。

1.5 小鼠血清 TG、TC 及炎症因子检测 各组喂养 12 周后, 禁食 12 h 后, 小鼠心脏取血 1 ml, 分离血清, 然后通过全自动生化分析仪检测小鼠血清 TG、TC、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT) 水平。酶联免疫吸附法检测促炎细胞因子: TNF- α 和 MCP-1 的血清水平, 按试剂盒说明书进行具体操作。

1.6 肝脏 HE 染色 各组小鼠喂养 12 周后麻醉处死, 用体积分数为 10% 甲醛溶液将新鲜小鼠肝左叶固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 制作 4 μ m 切片, 脱蜡、脱水、透明后 HE 染色, 中性树胶封片, 干燥后于光镜下连续观察组织切片肝脏的病理变化。

1.7 油红 O 染色 小鼠部分肝脏组织经 OCT 包埋后, 液氮速冻, 制备 8 μ m 冰冻切片, 首先使用 60% 异丙醇浸泡冰冻切片持续 1 min, 然后油红 O 染料染色 15 min, 用蒸馏水和 60% 异丙醇交叉清洗多余染料后, 再用苏木精复染 1 min, 最后甘油封片显微镜下观察并拍照记录。

1.8 免疫荧光染色法检测巨噬细胞浸润情况 取

肝脏组织的冰冻切片, 用封闭缓冲液封闭 2 h, 加巨噬细胞表面标记分子 F4/80 抗体 (1:400) 4 °C 湿盒中避光孵育过夜, PBS 洗涤后使用荧光二抗 (1:200) 37 °C 孵育 1 h。洗涤二抗苏木精复染, 封片, 在荧光显微镜下观察并采集图像。

1.9 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 One-way ANOVA 及 Tukey's post-hoc 检验进行组间比较。使用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝脏特异性敲除 Tfeb 对 HFD 诱导的肝脏脂质沉积的影响 12 周饮食诱导后, 首先检测各组小鼠肝脏 Tfeb 基因表达水平, Western blot 结果显示, 与野生型小鼠相比, Tfeb 特异性敲除小鼠肝脏组织中 Tfeb 基因无表达, 模型对照组小鼠肝脏组织 Tfeb 蛋白表达下调, 提示 HFD 可能与 Tfeb 蛋白表达水平有关 (图 1A)。进一步检测 4 组小鼠血清 TC 和 TG 水平以及肝组织中的脂质沉积情况, 与正常对照组相比, 模型对照组的空腹血清 TG、TC 含量增加 ($F=5.376, P < 0.01$), 而 Tfeb^{Δhep} 模型组的 TG、TC 进一步增加 ($F=0.962, P < 0.05$)。见表 2 和图 1B。通过观察肝脏外观, 结果显示正常对照组小鼠肝脏表面光滑, 颜色正常, 模型对照组小鼠肝脏表面具有颗粒感, 表面较脆, Tfeb^{Δhep} 模型组肝脏表面颗粒感增强 (图 1C)。为评估肝组织内脂质含量, 使用油红 O 染液进行组织化学染色, 其中红色染料表示脂质区域, 着色即表示富含中性 TG, 结果显示, 与正常对照组相比, 模型对照组小鼠肝脏染色丰富, 存在大量脂质沉积, 而 Tfeb^{Δhep} 模型组小鼠肝脏油红 O 染色高于模型对照组 (图 1D)。

表 2 小鼠血清 TC 和 TG 水平 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)
正常对照	0.44 $\pm$ 0.19	0.93 $\pm$ 0.27
Tfeb ^{Δhep} 对照	0.48 $\pm$ 0.22	1.05 $\pm$ 0.29
模型对照	0.82 $\pm$ 0.45 **	2.74 $\pm$ 0.64 **
Tfeb ^{Δhep} 模型	0.90 $\pm$ 0.47 ***	3.12 $\pm$ 0.88 ***
F 值	5.376	0.962
P 值	<0.001	<0.001

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较: # $P < 0.05$

2.2 肝脏特异性敲除 Tfeb 对 HFD 诱导的肝脏组织炎症的影响 各组小鼠 HFD 喂养 12 周后, 检测炎症标志物。结果显示: 血清促炎细胞因子 MCP-1

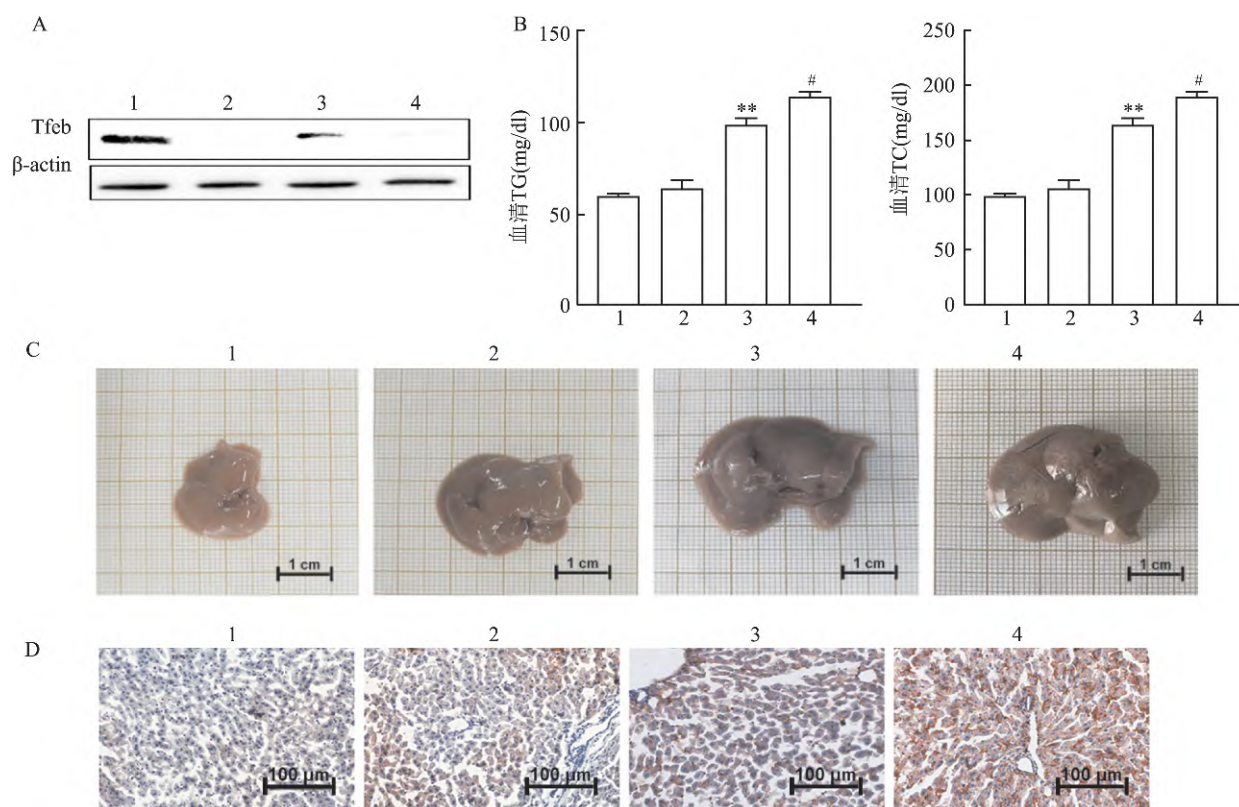


图1 肝脏特异性敲除 Tfeb 对 HFD 诱导脂质沉积的影响

A: Western blot 检测 Tfeb 在各组表达水平; B: 血清 TG、血清 TC 水平; C: 肝脏外观; D: 肝组织油红 O 染色 $\times 200$; 1: 正常对照组; 2: Tfeb^{Δhep} 对照组; 3: 模型对照组; 4: Tfeb^{Δhep} 模型组; 与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较: # $P < 0.05$

表3 小鼠血清促炎因子 MCP-1、TNF- α 和肝功能指标 ALT、AST 水平 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	MCP-1 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	ALT (U/L)	AST (U/L)
正常对照	46.38 $\pm$ 4.75	30.41 $\pm$ 4.52	21.88 $\pm$ 3.39	24.42 $\pm$ 5.06
Tfeb ^{Δhep} 对照	50.44 $\pm$ 6.23	31.05 $\pm$ 4.70	22.03 $\pm$ 3.51	27.37 $\pm$ 8.85
模型对照	135.54 $\pm$ 14.62 **	64.33 $\pm$ 5.76 **	50.17 $\pm$ 4.84 **	138.59 $\pm$ 12.82 **
Tfeb ^{Δhep} 模型	163.71 $\pm$ 18.58 ***	75.05 $\pm$ 11.49 ***	68.63 $\pm$ 8.46 ***	152.20 $\pm$ 14.13 ***
F 值	9.046	5.379	7.574	2.843
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较: # $P < 0.05$

和 TNF- α 的水平增加 ($F = 9.046, P < 0.01$), Tfeb^{Δhep} 模型组较模型对照组进一步增加 ($F = 5.379, P < 0.05$), 见表3和图2A。肝功能血清生化指标 AST、ALT 结果提示模型对照组肝脏功能严重受损,在 Tfeb^{Δhep} 模型组中受损程度加重 ($F = 7.574, P < 0.01$, 表3, 图2B)。HE 染色切片表现出肝脏炎症的典型组织病理学特征。模型对照组肝脏切片显示肝小叶紊乱、小叶细胞中充满脂肪空泡、细胞肿胀和炎症细胞浸润, Tfeb^{Δhep} 模型组中的炎症细胞浸润更为严重(图2C)。F4/80 荧光染色检测巨噬细胞浸润情况,提示肝脏特异性敲除 Tfeb 可加重肝脏炎症反应,加速 NAFLD 的发生发展(图3D)。

3 讨论

NAFLD 以肝脏内 TG 异常沉积为主要病理特征,随着病程进展可进一步发展成脂肪性肝炎,甚至是肝纤维化、肝癌^[1]。在 NAFLD 的体内研究中,HFD 喂养常被用来诱导肝脏脂肪变性^[2]。Tfeb 是一种自噬相关基因,据报道^[7-8] Tfeb 与脂质沉积和炎症密切相关。在血管平滑肌中,HFD 诱导平滑肌脱分化增加和新内膜形成与 Tfeb 下调有关^[9];在肌肉中,用 HFD 喂养的小鼠能够激活 mTOR,降低 Tfeb 和参与氧化代谢的基因的表达,减少线粒体异常,改善肌肉病理,延长生存期^[10];然而,鉴于肝脏

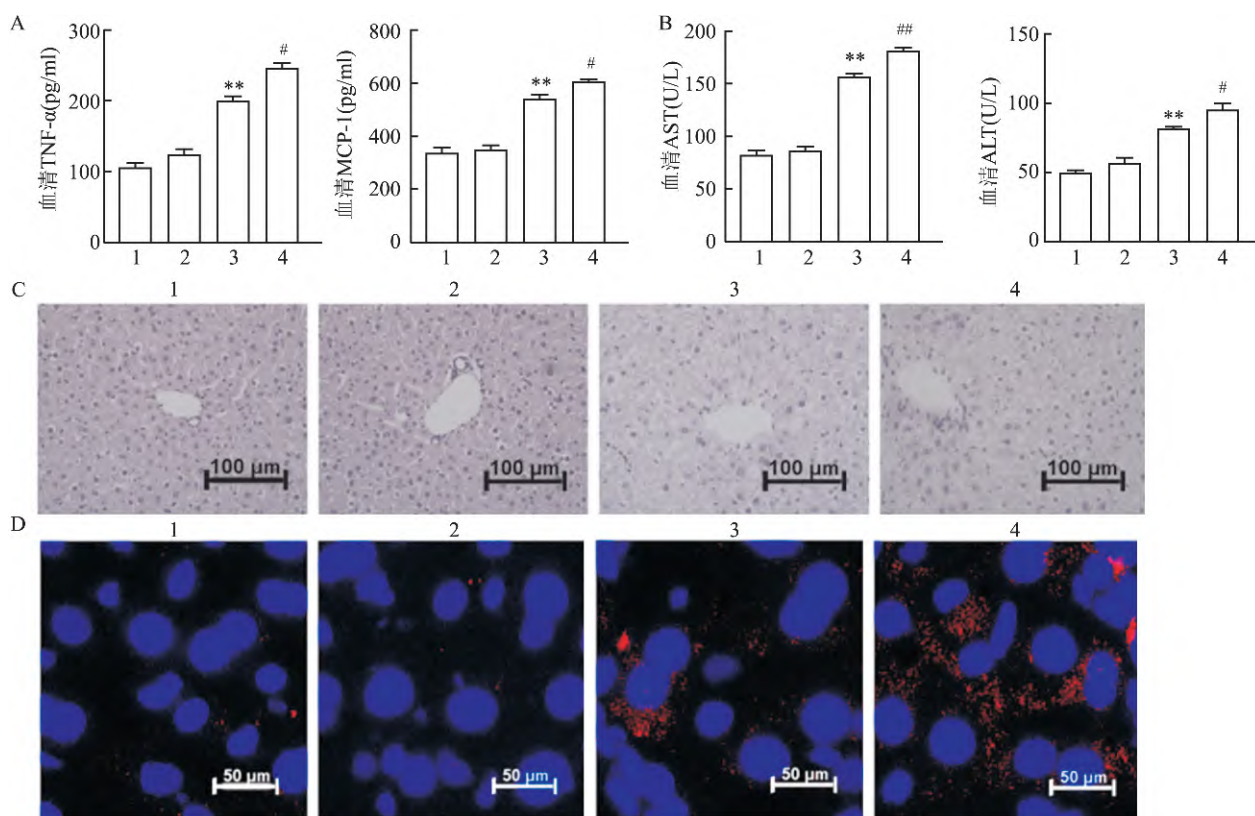


图2 肝脏特异性敲除 Tfeb 对 HFD 诱导肝脏炎症的影响

A: 血清 TNF-α、血清 MCP-1 水平; B: 血清 AST、血清 ALT 水平; C: 肝脏 HE 染色 ×200; D: F4/80 荧光染色 ×400; 1: 正常对照组; 2: Tfeb^{Δhep} 对照组; 3: 模型对照组; 4: Tfeb^{Δhep} 模型组; 与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

在全身代谢中的关键作用, Tfeb 肝脏缺失对 NAFLD 的影响以及交互影响的代谢性疾病的病理机制有待进一步阐明。该研究使用 HFD 经典 NAFLD 造模方式, 并通过血生化指标, 病理切片和荧光染色评估 Tfeb 基因对 NAFLD 发生发展的影响。结果表明, Tfeb 肝脏特异性敲除进一步加重饮食诱导高脂血症和炎症反应, 导致肝脏脂肪变性进一步加重。

Tfeb 是 MiT/TFE 家族中第 1 个被确定为调控溶酶体生物发生的基因^[1]。溶酶体则是存在于绝大多数真核细胞中的主要消化细胞器, 对脂质代谢以及炎症发生具有重要调节意义。研究^[12-13]表明, Tfeb 有益于饮食引起的代谢紊乱, 一方面通过上调溶酶体生物发生增强脂质自噬, 另一方面可上调脂质分解代谢的关键介质的表达, 如脂肪酸、线粒体和过氧化物酶体中脂肪酸的 β 氧化和脂质分解代谢的主要调控因子 PGC1-α 和 PPAR-α。因此, 肝脏特异性 Tfeb 敲除会导致脂滴的积累和脂质降解缺陷。相反, Tfeb 过度表达可增强脂肪酸分解代谢和全身能量代谢, 同时预防 HFD 喂养小鼠的肥胖和代谢综合征^[14]。此外, Tfeb 表达缺陷的细胞表现出重要促炎细胞因子的转录诱导缺陷, 如: TNF-α、白介素 1β

和白介素 6^[15]。该研究结果显示, Tfeb^{Δhep} 模型组小鼠肝脏肿大, 血清 TC、TG 和部分炎症因子水平升高。因此, Tfeb 可能对饮食引起的脂质代谢紊乱以及炎症发生具有调节作用, Tfeb 可能是靶向治疗 NAFLD 的一个潜在基因。然而, Tfeb 过表达对于缓解饮食引发的代谢紊乱和炎症发生以及该病理过程与溶酶体之间的关系有待进一步研究。

综上所述, 肝脏特异性敲除 Tfeb 加剧饮食引起的肝脏脂肪变性, 这为 Tfeb 在 NAFLD 病理发展过程的关键作用提供实验依据, 为临床进一步研发防治药物提供理论依据。

参考文献

- [1] Foerster F, Gairing S, Müller L, et al. NAFLD-driven HCC: safety and efficacy of current and emerging treatment options [J]. J Hepatol, 2022, 76(2): 446-57.
- [2] Van Der Windt D, Sud V, Zhang H, et al. The effects of physical exercise on fatty liver disease [J]. Gene Expr, 2018, 18(2): 89-101.
- [3] Raben N, Puertollano R. TFEB and TFE3: linking lysosomes to cellular adaptation to stress [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2016, 32: 255-78.
- [4] Mony V, Benjamin S, O'Rourke E. A lysosome-centered view of

- nutrient homeostasis [1]. *Autophagy*, 2016, 12(4): 619–31.
- [6] Yu S, Wang Z, Ding L, et al. The regulation of TFEB in lipid homeostasis of non-alcoholic fatty liver disease: molecular mechanism and promising therapeutic targets [1]. *Life Sci*, 2020, 246: 117418.
- [7] 徐强, 黄松, 季珂, 等. DEHP 促进酒精结合高脂饮食诱导大鼠酒精性脂肪肝的机制 [1]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(11): 1718–22.
- [8] Paquette M, Yan M, Ramírez-reyes J, et al. Loss of hepatic Fln protects against fibrosis and inflammation by activating autophagy pathways [1]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 21268.
- [9] Chao X, Wang S, Hlobik M, et al. Loss of hepatic transcription factor EB attenuates alcohol-associated liver carcinogenesis [1]. *Am J Pathol*, 2022, 192(1): 87–103.
- [10] Wang Y, Li X, Chen J, et al. Activation of TFEB ameliorates dedifferentiation of arterial smooth muscle cells and neointima formation in mice with high-fat diet [1]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(9): 676.
- [11] Rocchi A, Milioto C, Parodi S, et al. Glycolytic-to-oxidative fiber-type switch and mTOR signaling activation are early-onset features of SBMA muscle modified by high-fat diet [1]. *Acta Neuropathol*, 2016, 132(1): 127–44.
- [12] López-hernández T, Puchkov D, Krause E, et al. Endocytic regulation of cellular ion homeostasis controls lysosome biogenesis [1]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(7): 815–27.
- [13] Zhang Z, Yan J, Bowman A, et al. Dysregulation of TFEB contributes to manganese-induced autophagic failure and mitochondrial dysfunction in astrocytes [1]. *Autophagy*, 2020, 16(8): 1506–23.
- [14] Zhang H, Lu J, Liu H, et al. Ajugol enhances TFEB-mediated lysosome biogenesis and lipophagy to alleviate non-alcoholic fatty liver disease [1]. *Pharmacol Res*, 2021: 105964.
- [15] Chao X, Wang S, Zhao K, et al. Impaired TFEB-mediated lysosome biogenesis and autophagy promote chronic ethanol-induced liver injury and steatosis in mice [1]. *Gastroenterology*, 2018, 155(3): 865–79.
- [16] Visvikis O, Ihuegbu N, Labed S, et al. Innate host defense requires TFEB-mediated transcription of cytoprotective and antimicrobial genes [1]. *Immunity*, 2014, 40(6): 896–909.

Effects of liver – specific knockout of transcription factor EB on diet – induced hepatic steatosis in mice

Guan Lingling, Cheng Daichuan, Zhang Heng, Men Xiuli

(School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210)

Abstract Objective To explore the effect of liver-specific knockout of transcription factor EB (Tfeb) on high-fat diet (HFD)-induced hepatic steatosis in mice. **Methods** Wild-type C57BL/6J mice and liver-specific Tfeb knockout C57BL/6J mice were fed with HFD or normal chow for 12 weeks, respectively, and then the serum triglyceride (TG), total cholesterol (TC), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), aspartate aminotransferase (AST) and alanine transaminase (ALT) were measured in each group of mice; Western blot was used to detect Tfeb protein expression levels in liver tissues of mice in each group, HE staining was used to monitor histopathological changes in liver tissues of mice in each group, oil red O staining was used to monitor lipid deposition in liver tissues of mice in each group, and F4/80 fluorescence staining was used to monitor macrophage infiltration in liver tissues of mice in each group. **Results** There was no expression of Tfeb gene in liver of liver-specific knockout Tfeb mice, suggesting that the effect of Tfeb gene knockout in liver tissue was better. Compared with the normal control group, the expression of Tfeb protein in the liver tissue of the model control group was down-regulated. Compared with the normal control group, both the HE staining results and the oil red O staining results showed that the liver specific Tfeb caused lipid deposition and liver lobule disorder in mice, which was similar to the liver changes in the model control mice, however, liver-specific knockout of Tfeb mice at 12 weeks of HFD had more severe liver lipid deposition and hepatic lobular structural disorder. The results of F4/80 fluorescence staining indicated that the specific knockout of liver Tfeb could aggravate the infiltration of macrophages in the liver of mice induced by high-fat feeding. At the same time, the serological test results indicated that compared with the normal control group, the serum levels of TC, TG, TNF- α , MCP-1, AST and ALT in the liver-specific knockout Tfeb group and the model control group increased, and these changes were further elevated in Tfeb knockout mice after HFD feeding. **Conclusion** Liver-specific knockout of Tfeb aggravates HFD-induced hepatic steatosis in mice.

Key words Tfeb; lipid deposition; inflammation