

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.20.001

## • 基础研究 •

## OSBPL3 在代谢相关脂肪性肝病中的作用及机制研究\*

王倩倩 彭文芳 蒋小红 杜娟 李慧华 黄珊<sup>△</sup>

(上海市同仁医院 上海交通大学医学院附属同仁医院内分泌科 上海 200336)

**摘要 目的:**探究氧化固醇结合蛋白类似物 3(Oxysterol Binding Protein-like 3, OSBPL3)在代谢相关脂肪性肝病中的作用及可能机制。**方法:**建立肝脏特异性沉默 OSBPL3 小鼠模型和空载体对照组,分别予以普食和高脂喂养 12 周。分为正常对照组、OSBPL3 沉默组、肥胖对照组、肥胖 OSBPL3 沉默组。观察小鼠一般情况,Real-time PCR 检测脂质合成基因及脂质分解基因 mRNA 水平,western blot 检测 Akt/mTOR 通路关键蛋白的表达。人 HepG2 细胞株给予不同浓度油酸(oleic acid, OA)处理,观察油红 O 染色的变化,western blot 检测 OSBPL3 表达水平。**结果:**正常对照组与 OSBPL3 沉默组小鼠各项指标相比无统计学差异( $P>0.05$ );与对照组相比,肥胖对照组及肥胖 OSBPL3 沉默组体质量、内脏脂肪及内脏脂肪指数较高( $P<0.05$ );与肥胖对照组相比,肥胖 OSBPL3 沉默组体质量、内脏脂肪及内脏脂肪指数较低( $P<0.05$ )。与对照组相比,肥胖对照组及肥胖 OSBPL3 沉默组总胆固醇(Total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)较高( $P<0.05$ );与肥胖对照组相比,肥胖 OSBPL3 沉默组 TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 较低( $P<0.05$ )。与正常对照组与 OSBPL3 沉默组小鼠 SREBP-1C、FAS 及 PPAR $\alpha$  表达水平相比无统计学差异( $P>0.05$ );与对照组相比,肥胖对照组及肥胖 OSBPL3 沉默组 SREBP-1C、FAS 较高,PPAR $\alpha$  表达水平较低( $P<0.05$ );与肥胖对照组相比,肥胖 OSBPL3 沉默组 SREBP-1C、FAS 表达水平较低,PPAR $\alpha$  表达水平较高( $P<0.05$ )。与对照组相比,肥胖对照组 Akt 及 mTOR 磷酸化表达水平较高( $P<0.05$ );与肥胖对照组相比,肥胖 OSBPL3 沉默组 Akt 及 mTOR 磷酸化表达水平较低( $P<0.05$ )。随着 OA 作用浓度的升高,油红 O 染色逐渐加深。与 0  $\mu\text{mol/L}$  油酸相比,油酸以剂量依赖性方式增加 HepG2 细胞 OSBPL3 mRNA 水平( $P<0.05$ )。**结论:**OSBPL3 能够调控脂质代谢的表达,可能通过调控 Akt/mTOR 信号通路发挥生物学功能,有望为研究 NAFLD 疾病发生发展及治疗提供参考依据。

**关键词:**OSBPL3;代谢相关脂肪性肝病;C57BL/6J 小鼠;HepG2 细胞;Akt/mTOR

**中图分类号:**R-33;R589.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)20-3801-08

## The Role and Mechanism of OSBPL3 in Metabolism-related Fatty Liver Disease\*

WANG Qian-qian, PENG Wen-fang, JIANG Xiao-hong, DU Juan, HUANG Shan, LI Hui-hua, HUANG Shan<sup>△</sup>

(Department of Endocrinology, Shanghai Tongren Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200336, China)

**ABSTRACT Objective:** To explore the role of OSBPL3 in mediating metabolism-related fatty liver disease and its possible mechanism. **Methods:** Study on the role and mechanism of OSBPL3 in metabolism related fatty liver disease. Hepatic specific silencing OSBPL3 mouse model and empty vector control mouse model were established. They were fed normal diet and high fat diet for 12 weeks respectively. They were divided into normal control group, OSBPL3 silencing group, obese control group and obese OSBPL3 silencing group. To observe the general situation of mice, the lipid synthesis genes and lipid decomposition gene mRNA were detected by Real time PCR, and the key proteins of Akt/mTOR pathway were detected. Human HepG2 cell lines were treated with OA at different concentrations, and the staining changes of O were observed after treatment with different oleic acid concentrations. OSBPL3 expression levels were detected by resting western blot assay. **Result:** There were no significant differences in all indexes between normal control group and OSBPL3 silencing group ( $P>0.05$ ). Compared with the control group, the body mass, visceral fat and visceral fat index of the obese control group and the obese OSBPL3 silent group were higher ( $P<0.05$ ). Compared with the obese control group, the body mass, visceral fat and visceral fat index in the obese OSBPL3 silencing group were lower ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, the TC, TG, LDL-C and HDL-C of the obese control group and the obese OSBPL3 silent group were higher ( $P<0.05$ ). Compared with the obese control group, the TC, TG, LDL-C and HDL-C in the obese OSBPL3 silenced group were lower ( $P<0.05$ ). There were no significant differences in the expression levels of SREBP-1C, FAS and PPAR $\alpha$  compared with normal control group and OSBPL3 silencing group

\* 基金项目:上海交通大学医学院附属同仁医院院级课题[2020TRYJ(LB) 02];同仁英才(TRKYRC-yc202202)

作者简介:王倩倩(1990-),女,硕士,主治医师,研究方向:代谢相关性脂肪肝的发病机制及治疗研究,E-mail: kr2113@shtrhospital.com

<sup>△</sup> 通讯作者:黄珊(1972-),女,博士,研究方向:肥胖、糖尿病肾病的发病机制及治疗研究,E-mail: hs1147@126.com

(收稿日期:2023-03-31 接受日期:2023-04-26)

( $P>0.05$ )。Compared with the control group, the levels of SREBP-1C, FAS and PPAR $\alpha$  were higher in the obese control group and the obese OSBPL3 silenced group ( $P<0.05$ )。Compared with the obese control group, the expression levels of SREBP-1C and FAS in the obese OSBPL3 silenced group were lower, and the expression levels of PPAR $\alpha$  were higher ( $P<0.05$ )。Compared with the control group, the expression levels of Akt and mTOR phosphorylation in the obese control group were higher ( $P<0.05$ )。Compared with the obese control group, the expression levels of Akt and mTOR phosphorylation in the obese OSBPL3 silencing group were lower ( $P<0.05$ )。Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$  oleic acid, oil red O staining was gradually deepened with the increase of OA concentration。Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$  oleic acid and 0  $\mu\text{mol/L}$  oleic acid, oil red O staining was gradually deepened with the increase of OA concentration。Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$  oleic acid, OSBPL3 mRNA levels of 50  $\mu\text{mol/L}$ , 100  $\mu\text{mol/L}$  and 400  $\mu\text{mol/L}$  oleic acid were increased successively, with statistical difference ( $P<0.05$ )。The expression level of OSBPL3 increased with the increase of lipid accumulation。Conclusion: OSBPL3 can regulate the expression of lipid metabolism, and play a biological role by regulating Akt/mTOR signal pathway, which is expected to provide references to study the occurrence, development and treatment of MAFLD。

**Key words:** OSBPL3; Metabolic associated fatty liver disease; C57BL/6J mice; HepG2 cell lines; Akt/mTOR

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R589.2 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2023)20-3801-08

## 前言

代谢相关脂肪性肝病 (Metabolic associated fatty liver disease, MAFLD) 是基于肝活检组织学或影像学甚至血液生物标志物检查提示存在脂肪肝,同时满足以下三项条件之一:超重/肥胖、2 型糖尿病、代谢功能障碍<sup>[1]</sup>。近年来,随着肥胖及 2 型糖尿病的流行,MAFLD 患病率攀升,严重危害着人类身体健康并给社会带来沉重经济负担<sup>[2,3]</sup>。氧化固醇结合蛋白类似物 3 (Oxysterol-binding protein-like 3, OSBPL3) 定位于内质网膜与其他细胞器膜紧密相连的膜接触位点,在肿瘤发生、内质网应激以及糖脂代谢中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。研究显示 OSBPL3 与细胞迁移和癌变具有密切相关性<sup>[5]</sup>,在肿瘤发生过程中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。有学者研究<sup>[7]</sup>发现脂肪酸从头合成的重要调节途径之一是 AKT/mTORC1 信号通路。AKT 活化可促进肝细胞内脂肪合成转录因子与关键酶表达增加,如固醇调节元件结合蛋白-1 (sterol regulatory element binding protein-1, SREBP-1) 等,增加脂肪酸合成,促进 MAFLD 的发生<sup>[8]</sup>。但目前 OSBPL3 对肝脏脂代谢的影响及其具体作用机制尚未明确。因此,本研究主要探讨了 OSBPL3 对肝细胞功能调控作用及作用机制,以期为进一步开发新的治疗 MAFLD 的药物提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与实验动物

人 HepG2 细胞株经美国典型培养物中心 (American type culture collection, ATCC) 细胞资源库测定,货号:IMP-H020-1。35 只 C57BL/6J 小鼠,雌雄各半,均为 8 周龄,体重( $20\pm 2$ )g,合格证编号:SCXK(辽)2021-0018,购置于附属医科大学动物实验中心,适应环境 7 d 后进行实验,伦理审批号:M2020834。普通饮食予以 ANI-76A 饲料:12.4%脂肪,68.8%碳水化合物,18.8%蛋白质;高脂饲料:予以 37.1%脂肪,42.4%碳水化合物,20.5%蛋白质。饲料均由上海书玉生物科技有限公司提供。

### 1.2 试剂

DNA 聚合酶、Trizol 购自上海佰利莱生物科技有限公司;转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;DMEM 培养皿,上海天能科技有限公司;兔抗 SREBP-1C、脂肪酸合成酶

(fatty Acid Synthase, FAS)、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated Receptor- $\alpha$ , PPAR $\alpha$ )、OSBPL3、p-mTOR、mTOR、p-Akt、Akt 抗体购自广州奥瑞达生物科技有限公司;mRNA 提取试剂盒购自美国 OmegaBio-Tek 公司;甘油三酯(triglyceride, TG)、胆固醇(cholesterol, TC)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL-C)及高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL-C)检验试剂盒购自上海申能德赛有限公司;10%甲醛溶液、苏木素以及伊红染料均由广州中医药大学实验动物中心提供;EGTA、胰岛素、地塞米松购自 Gibco 公司;高糖 DMEM、胎牛血清、青霉素购自杭州四季青生物有限公司。

### 1.3 仪器

流式细胞仪购自上海初态生物科技有限公司;台式低温高速离心机购自济南好来宝医疗器械有限公司;恒温水浴锅购自东博科仪器有限公司;石蜡切片机购自沈阳誉德电子仪器有限公司;ThermoScientificMidi40 CO<sub>2</sub> 培养箱、恒温水浴仪购自赛默飞世尔科技;洁净工作台购自广州柏赛柯生物技术有限公司;全自动脱水机购自上海寰熙医疗器械有限公司;电热恒温培养箱购自无锡市海仕机械有限公司;凝胶成像分析系统 Imageproplus6.0/ipp6.0、ImageJ 软件购自山东云唐智能科技有限公司;ModFitLT2.0(PMac)软件系统购自北京柏奥易杰科技有限公司;荧光显微镜及成像系统购自安莱公司;-80℃低温冰箱购自上海天能科技有限公司;VENTANAVIAS 图像分析系统购自上海罗氏诊断产品有限公司。

### 1.4 实验方法

1.4.1 动物分组及操作分组和造模 在上海和元生物技术公司(合同号:HYKY-2109220199)通过利用 Lipofectamine2000 转染试剂,包装 OSBPL3 沉默腺病毒质粒,从而进一步构建 pAAV-mCherry-OSBPL3 腺病毒及腺病毒空载体。将其分别从小鼠两侧的尾静脉任选清晰的静脉缓慢推注进行移植治疗,随机选取 6 只小鼠分别构建 3 只 OSBPL3 沉默小鼠及 3 只构建空载体对照组,用于鉴定是否成功构建肝脏特异性沉默模型,确认 pAAV-mCherry-OSBPL3 腺病毒构建成功后,进一步构建 16 只 OSBPL3 沉默小鼠及 16 只构建空载体对照组。分别予以普食和高脂喂养 12 周。分为正常对照组( $n=8$ , 喂养普食下

注射腺病毒构建空载体)、OSBPL3 沉默组( $n=8$ , 喂养普食下注射腺病毒构建 OSBPL3 沉默小鼠)、肥胖对照组( $n=8$ , 喂养高脂饲料下注射腺病毒构建空载体)、肥胖 OSBPL3 沉默组( $n=8$ , 喂养高脂饲料注射腺病毒构建 OSBPL3 沉默小鼠)。禁食过夜, 第二天取眶后静脉丛取血,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $2000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心, 分离上清液冻存于  $-40^{\circ}\text{C}$  冰箱中; 迅速切取肝右叶置于匀浆器, 加入  $0.9\%$  氯化钠溶液  $100\text{ }\mu\text{L}$  于冰上充分匀浆待检。切取肝左叶液氮冻存, 后转入  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱, 用于分子生物学检测。一般情况检测: 观察小鼠毛色、精神状态、摄食、体质量、活动情况等改变。取白色脂肪组织(腹膜后、肠系膜、附睾旁脂肪组织)称质量记录, 即为内脏脂肪, 并计算相应的内脏脂肪指数( $\%$ )= 内脏脂肪质量/体质量 $\times 100\%$ 。比色法对肝组织肝组织 TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 水平进行测定。通过苏木精-伊红染色法评估高脂喂养小鼠组是否脂肪肝建模成功。

**1.4.2 各组小鼠 OSBPL3 蛋白表达情况** 蛋白免疫印迹 (Western blot) 法分别在  $-80^{\circ}\text{C}$  低温冰箱取正常对照组、OSBPL3 沉默组、肥胖对照组、肥胖 OSBPL3 沉默组小鼠肝脏组织, 放入研磨珠匀浆仪匀浆后, 加入蛋白裂解液提取肝脏组织细胞总蛋白。用  $10\%$  SDS-PAGE 凝胶将蛋白进行电泳分离  $70\text{ min}$ , 湿法转印至 PVDF 膜上, 后用  $5\%$  牛奶室温封闭  $90\text{ min}$ , 选择目标条带分别加入一抗 OSBPL3 (浓度  $1:1000$ )、GAPDH (浓度  $1:1000$ ),  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 次日复温  $30\text{ min}$  后, 二抗室温孵育  $1.5\text{ h}$ , 加显影液后放入化学发光分析仪中分析条带结果, 运用增强化学发光法显色曝光后, 予以 ImageJ 软件分析条带相对表达。

**1.4.3 Real-timePCR 检测小鼠组织脂质合成及分解基因表达** 获得 4 组小鼠肝组织, 经胰蛋白酶消化, 用 Trizol Reagent 试剂盒提取肝脏总 RNA, 逆转录获得 cDNA。Real-timePCR 检测不同组间小鼠脂质合成基因 SREBP-1C、FAS 及脂质分解基因 PPAR $\alpha$  表达水平。引物(种属均为小鼠)序列为: SREBP-1C, 上游引物:  $5'\text{-CACTTCTGGAG-ACATCGCAAAC-3'}$ , 下游引物:  $5'\text{-ATGGTAGACAACAGCCGCATC-3'}$ ; FAS, 上游引物:  $5'\text{-CTGCGGAACTACAGGAAATG-3'}$ , 下游引物:  $5'\text{-GGTTC-GGAATCGAATCCAGG-3'}$ ; PPAR $\alpha$ , 上游引物:  $5'\text{-TGG-GGATGAAGAGGGCTGAG-3'}$ , 下游引物  $5'\text{-GGGGACTGCCGTTG-TCTGT-3'}$ ; GAPDH, 上游引物:  $5'\text{-TCACC-ACCATGGAGAAGGC-3'}$ , 下游引物:  $5'\text{-GCTATGCTCTTGGTCCAG-CA-3'}$ 。

经荧光定量 PCR 进行扩增, 根据两步法 SYBRReal-Time-PCR Kit (Roche) 试剂盒说明书配制反应体系; 温度循环参数: 预变性  $95^{\circ}\text{C}$ ,  $10\text{ min}$ ;  $95^{\circ}\text{C}$ ,  $5\text{ s}$ ;  $59^{\circ}\text{C}$ ,  $30\text{ s}$ ;  $72^{\circ}\text{C}$ ,  $1\text{ min}$ ;  $40$  个循环进行 PCR 扩增反应。每组选取 3 个样本, 每个样本进行 3 个复孔检测, 即每组获得 9 个数据进行统计学分析。图像分析系统内予以进行吸光度扫描, 以管家基因 GAPDH 作为内参照校正, 并获得相对表达含量。

**1.4.4 Akt/mTOR 通路关键蛋白检测** 提取四组小鼠肝脏组织细胞总蛋白, 电泳, 转膜, 封闭, 具体步骤如前所述。选择目标条带分别加入一抗 p-Akt, Akt (浓度  $1:1000$ )、p-mTOR、mTOR (浓度  $1:1000$ ),  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 次日复温  $30\text{ min}$  后, 二抗室温孵育  $1.5\text{ h}$ , 加显影液后放入化学发光分析仪中分析条带结果,

运用增强化学发光法显色曝光后, 予以 ImageJ 软件分析条带相对表达。

**1.4.5 细胞水平油红 O 染色** 称取油红 O 粉末溶于异丙醇中, 配制成  $5\text{ mg/mL}$  储存液, 油红 O 储存液: 双蒸水 =  $3:2$  稀释成工作液, 吸取弃掉 6 孔板中的培养基, 经 PBS 漂洗, 添加  $10\%$  中性甲醛固定  $30\text{ min}$ , 弃掉甲醛, 加入  $2\text{ mL}$  油红 O 工作液, 染色  $10\text{ min}$ 。弃掉油红 O 后继续 PBS 洗涤, 加入  $2\text{ mL}$  PBS。将处于最佳生长期的人 HepG2 细胞株接种于 6 孔板中, 分别采用  $0, 100, 200, 300\text{ }\mu\text{mol/L}$  浓度油酸处理 HepG2 细胞  $24\text{ h}$ , 诱导其发生不同程度的脂肪变, 并经上述配制好的油红 O 染色后, 在显微镜下观察油红 O 染色变化。

**1.4.6 Real-time PCR 检测细胞中 OSBPL3 表达水平** 将处于最佳生长期的人 HepG2 细胞株接种于 6 孔板中, 分别采用  $0, 100, 200, 300\text{ }\mu\text{mol/L}$  浓度油酸处理 HepG2 细胞  $24\text{ h}$ , 用 Trizol Reagent 试剂盒提取细胞总 RNA, 逆转录。Real-timePCR 检测不同浓度油酸处理 HepG2 细胞 OSBPL3 mRNA 表达水平。引物(种属为人)序列为: OSBPL3, 上游引物:  $5'\text{-CTGTCTG-CAAGTGGCCATCC-3'}$ , 下游引物:  $5'\text{-GGAAACCCTAAAAC-CTGAGCG-3'}$ ;

$\beta$ -actin, 上游引物:  $5'\text{-GGATGCAGAAGGAGATCACTG-3'}$ , 下游引物  $5'\text{-CGATCCACACGGAGTACTTG-3'}$ 。

**1.4.7 Western blot 实验检测细胞中 OSBPL3 表达水平** 将处于最佳生长期的人 HepG2 细胞株接种于 6 孔板中, 分别采用  $0, 100, 200, 300\text{ }\mu\text{mol/L}$  浓度油酸处理 HepG2 细胞  $24\text{ h}$ , 获得 HepG2 细胞经缓冲液洗 2 次, 加入细胞裂解液, 在冰面上静置  $10\text{--}20\text{ min}$ , 用细胞刮匀浆后,  $4^{\circ}\text{C}$  下  $15000\text{ r/min}$  离心  $10\text{ min}$ , 取上清。应用 Lowry 法对上清进行蛋白定量, 加入一抗、二抗, 室温孵育  $1\text{ h}$ , 洗膜后, 经成像仪扫描膜并成像, 成像图用 Imageproplus6.0/ipp6.0 图像分析系统测定其灰度值。

## 1.5 统计学方法

应用 SPSS19.0 统计软件, 所有计量资料数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 两组均数比较选择  $t$  检验, 多组间比较采用方差分析。  $P<0.05$  表示统计学上有差异,  $P<0.01$  表示两组间差异显著, 有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度油酸对人 HepG2 细胞株的脂质堆积的影响

采用不同油酸浓度 ( $0\text{--}300\text{ }\mu\text{M}$ ) 处理 HepG2 细胞并经油红 O 染色后, 在显微镜下观察, 与正常对照组相比, 随着 OA 作用浓度的升高, 油红 O 染色逐渐加深, 通过 Image pro plus 半定量分析提示: 与正常对照组相比,  $200, 300\text{ }\mu\text{mol/L}$  油酸处理的细胞油红 O 染色加深, 成像图用 Imageproplus6.0/ipp6.0 图像分析系统测定其脂滴面积比。有统计学差异 ( $P<0.05$ ), 表明肝细胞发生了脂肪变, 见图 1。

### 2.2 不同浓度油酸对 HepG2 细胞 OSBPL3 mRNA 表达的影响

采用不同浓度 ( $0\text{--}300\text{ }\mu\text{M}$ ) 油酸处理 HepG2 细胞, 结果显示, 与正常对照组相比,  $100, 200, 300\text{ }\mu\text{mol/L}$  油酸处理的细胞 OSBPL3 mRNA 水平逐渐升高, 呈浓度依赖性, 有统计学差异 ( $P<0.05$ ), 见图 2。

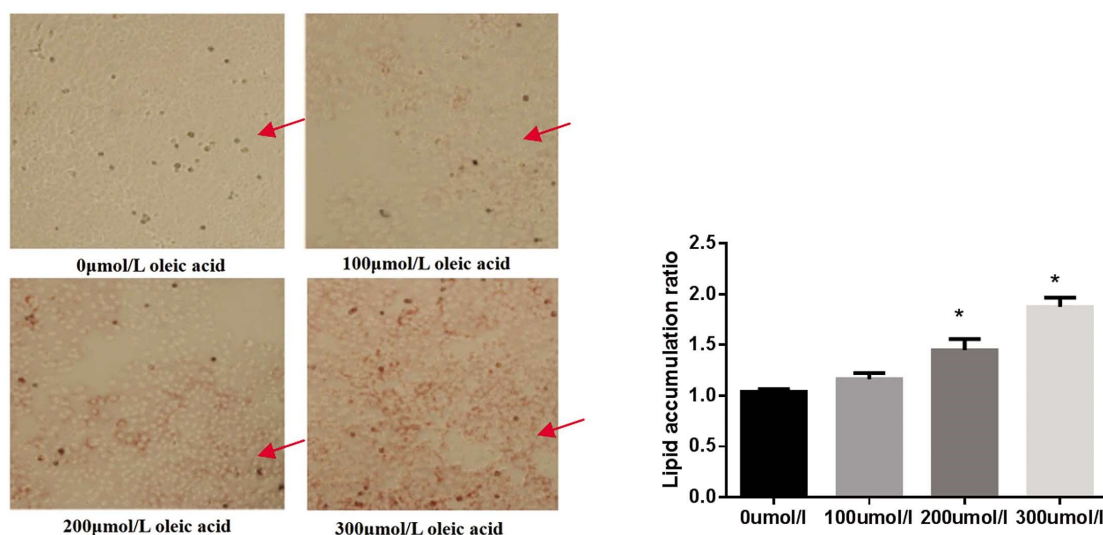
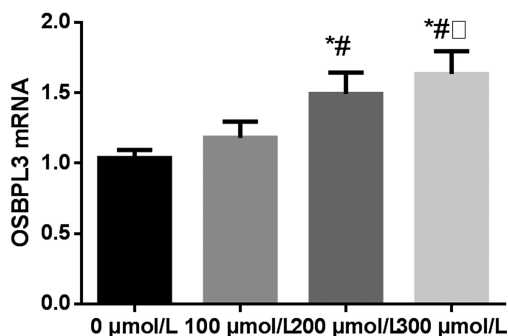
图1 不同浓度油酸下油红O染色( $\times 100$ )Fig.1 Observation of different concentration oleic acid induced oil Red O staining( $\times 100$ )Note: Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$ , \* $P<0.05$ .

图2 不同油酸浓度下 OSBPL3 表达水平比较

Fig. 2 Comparison of OSBPL3 expression levels in different oleic acid concentrations in each group

Note: Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$ , \* $P<0.05$ ; Compared with 100  $\mu\text{mol/L}$ , # $P<0.05$ ; Compared with 200  $\mu\text{mol/L}$ , □ $P<0.05$ .

### 2.3 不同浓度油酸对 HepG2 细胞 OSBPL3 蛋白表达的影响

采用不同浓度(0-300  $\mu\text{M}$ )油酸处理 HepG2 细胞,western-blot 实验检测细胞中 OSBPL3 表达,结果显示:与正常对照组相比,100、200、300  $\mu\text{mol/L}$  油酸处理的细胞 OSBPL3 蛋白水平

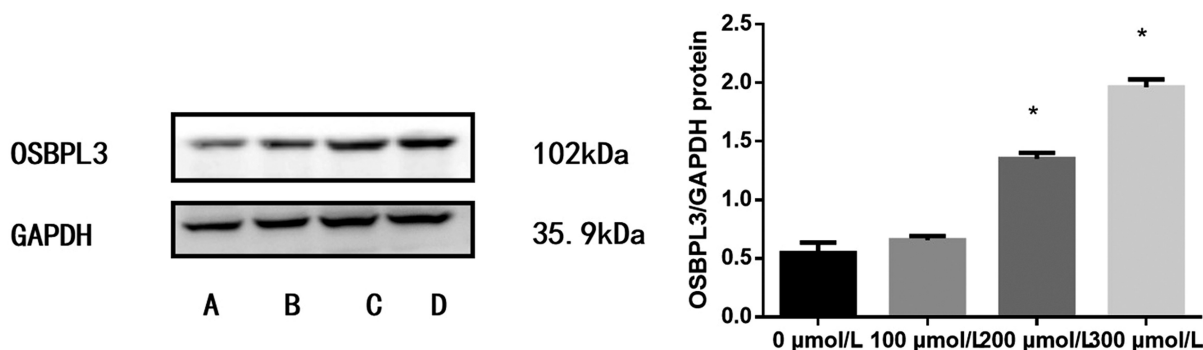
逐渐升高,呈浓度依赖性,有统计学差异( $P<0.05$ ),具体情况见图 3。

### 2.4 小鼠建模及一般情况观察

Western blot 检测结果显示:与正常对照组小鼠对比,肝脏特异性 OSBPL3 沉默组小鼠中 OSBPL3 表达水平明显减少,证明已成功构建肝脏特异性 OSBPL3 沉默小鼠模型,见图 4。正常对照组、OSBPL3 沉默组小鼠一般状况良好,毛色光亮。肥胖对照组、肥胖 OSBPL3 沉默组小鼠出现毛色枯皱,活动下降,易激惹,摄食、饮水减少,精神状态低下。正常对照组与 OSBPL3 沉默组小鼠体质量、内脏脂肪及内脏脂肪指数相比无统计学差异( $P>0.05$ );与对照组相比,肥胖对照组及肥胖 OSBPL3 沉默组体质量、内脏脂肪及内脏脂肪指数较高( $P<0.05$ );与肥胖对照组相比,肥胖 OSBPL3 沉默组体质量、内脏脂肪及内脏脂肪指数较低( $P<0.05$ ),具体情况见表 1。

### 2.5 各组小鼠 OSBPL3 蛋白表达情况

与正常对照组相比,OSBPL3 沉默组小鼠 OSBPL3 表达水平明显下降,有统计学差异( $P<0.05$ );与肥胖对照组相比,肥胖 OSBPL3 沉默组 OSBPL3 表达水平明显下降( $P<0.05$ ),提示小鼠模型中 OSBPL3 成功沉默,具体情况见图 5。

图3 不同浓度(0-300  $\mu\text{M}$ )油酸处理 HepG2 细胞 OSBPL3 蛋白的条带图Fig. 3 Bands of OSBPL3 protein detected by Western blot in HepG2 cells treated with oleic acid at different concentrations (0-300  $\mu\text{M}$ )Note: A: 0  $\mu\text{mol/L}$ ; B: 100  $\mu\text{mol/L}$ ; C: 200  $\mu\text{mol/L}$ ; D: 300  $\mu\text{mol/L}$ ; Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$  group, \* $P<0.05$ .

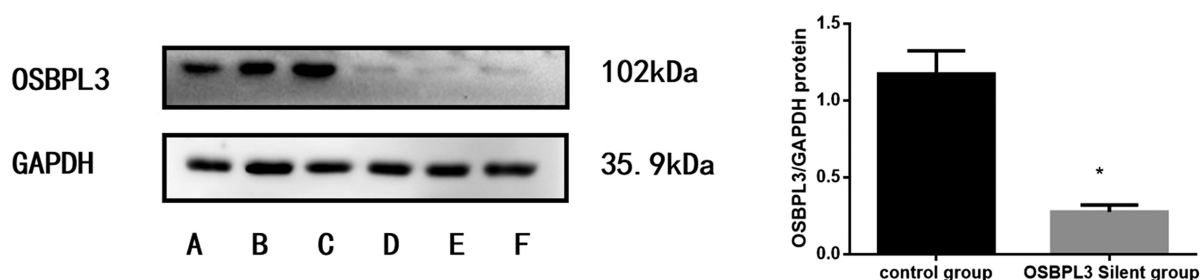


图4 Western blot 检测构建肝脏特异性沉默 OSBPL3 蛋白的条带图

Fig. 4 Bands of OSBPL3 proteins detected by Western blot

注:A:正常对照小鼠1;B:正常对照小鼠2;C:正常对照小鼠3;D:OSBPL3 沉默小鼠1;E:OSBPL3 沉默小鼠2;F:OSBPL3 沉默小鼠3

Note: A: normal control 1; B: normal control 2; C: normal control 3; D: OSBPL3 silent mouse 1; E: OSBPL3 silent mouse 2; F: OSBPL3 silent mouse 3

Compared with normal control group, \* $P<0.05$ .表1 各组小鼠一般情况比较( $\bar{x}\pm s$ )Table 1 Comparison of general conditions of mice in each group ( $\bar{x}\pm s$ )

| Groups                           | Body weight(g)     | Visceral fat(g)   | Visceral fat index |
|----------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Normal control group(n=8)        | 22.78 $\pm$ 2.76   | 1.45 $\pm$ 0.18   | 5.91 $\pm$ 0.69    |
| Normal OSBPL3 Silent group(n=8)  | 22.80 $\pm$ 2.81   | 1.50 $\pm$ 0.17   | 5.93 $\pm$ 0.70    |
| Obesity control group(n=8)       | 33.65 $\pm$ 3.98*  | 2.88 $\pm$ 0.32*  | 8.11 $\pm$ 1.02*   |
| Obesity OSBPL3 silent group(n=8) | 28.34 $\pm$ 2.95** | 2.02 $\pm$ 0.25** | 6.33 $\pm$ 0.72**  |

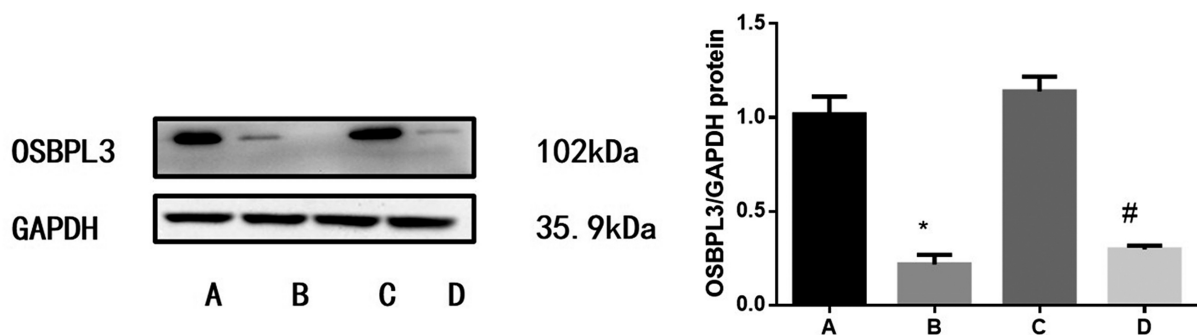
Note: Compared with normal control group and OSBPL3 silence group, \* $P<0.05$ ; Compared with obese control group, \*\* $P<0.05$ .

图5 各组小鼠 OSBPL3 蛋白的条带图

Fig. 5 Bands of OSBPL3 protein detected by Western blot in mice liver in each group

注:A:正常对照组;B:OSBPL3 沉默组;C:肥胖对照组相比;D:肥胖 OSBPL3 沉默组

Note: A: normal control group; B: OSBPL3 silent group; C: Compared with obesity control group; D: obese OSBPL3 silent group

Compared with normal control group, \* $P<0.05$ ; Compared with obese control group, # $P<0.05$ .

## 2.6 各组小鼠 HE 染色及血脂水平的比较

通过观察肝组织 HE 染色显示:肥胖对照组及肥胖 OSBPL3 沉默组肝细胞中有多个脂滴存在,存在肝脏炎症反应现象,肝组织内有明显的脂质沉积,而正常对照组小鼠及 OSBPL3 沉默组肝脏未见上述脂肪变(图6)。与正常对照组相比,OSBPL3 沉默组小鼠 TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 无统计学差异( $P>0.05$ );与正常对照组相比,肥胖对照组及肥胖 OSBPL3 沉默组 TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 较高( $P<0.05$ );与肥胖对照组相比,肥胖 OSBPL3 沉默组 TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 较低( $P<0.05$ ),具体情况见表2。

## 2.7 各组小鼠血脂相关基因的表达情况

与正常对照组相比,OSBPL3 沉默组小鼠 SREBP-1C、FAS

及 PPAR $\alpha$  表达水平无统计学差异( $P>0.05$ ),肥胖对照组及肥胖 OSBPL3 沉默组 SREBP-1C、FAS 较高,PPAR $\alpha$  表达水平较低( $P<0.05$ );与肥胖对照组相比,肥胖 OSBPL3 沉默组 SREBP-1C、FAS 表达水平较低,PPAR $\alpha$  表达水平较高( $P<0.05$ ),具体情况见表3。

## 2.8 各组小鼠 Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达情况

为了验证 OSBPL3 与 Akt/mTOR 通路的关系,检测该通路相关蛋白表达。结果如图7,与正常对照组相比,OSBPL3 沉默组小鼠 Akt 及 mTOR 磷酸化表达水平无统计学差异( $P>0.05$ );与对照组相比,肥胖对照组 Akt 及 mTOR 磷酸化表达水平较高( $P<0.05$ );与肥胖对照组相比,肥胖 OSBPL3 沉默组 Akt 及 mTOR 磷酸化表达水平较低( $P<0.05$ )。

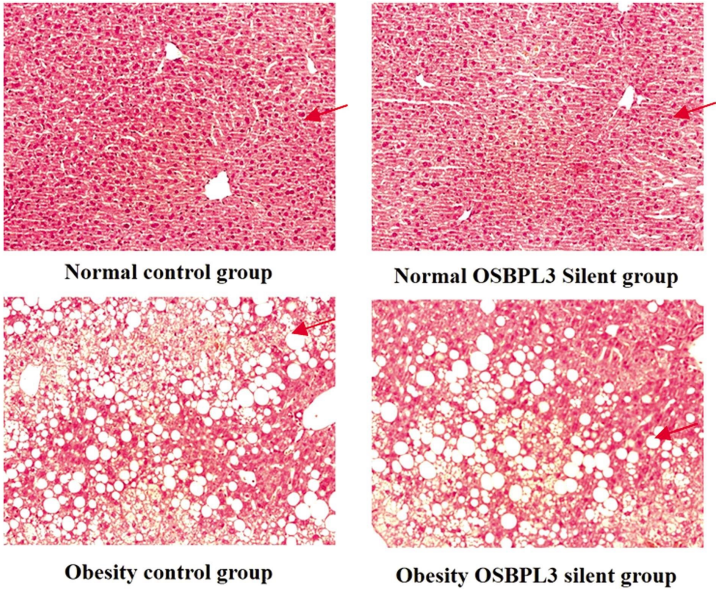


图6 各组小鼠肝脏 HE 染色( $\times 200$ )  
Fig.6 HE staining of mice liver in each group( $\times 200$ )

表2 各组小鼠血脂情况比较( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 Comparison of serum lipids of mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

| Groups                           | TC( mmol /L)      | TG( mmol /L)      | LDL-C( mmol /L)   | HDL-C( mmol /L)   |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Normal control group(n=8)        | 0.68 $\pm$ 0.10   | 2.11 $\pm$ 0.25   | 0.55 $\pm$ 0.08   | 1.24 $\pm$ 0.15   |
| Normal OSBPL3 Silent group(n=8)  | 0.70 $\pm$ 0.11   | 2.09 $\pm$ 0.23   | 0.56 $\pm$ 0.09   | 1.22 $\pm$ 0.14   |
| Obesity control group(n=8)       | 1.45 $\pm$ 0.21*  | 4.18 $\pm$ 0.45*  | 1.21 $\pm$ 0.24*  | 2.30 $\pm$ 0.28*  |
| Obesity OSBPL3 silent group(n=8) | 1.22 $\pm$ 0.14*# | 2.77 $\pm$ 0.31*# | 0.77 $\pm$ 0.09*# | 1.64 $\pm$ 0.18*# |

Note: Compared with normal control group and OSBPL3 silence group, \* $P < 0.05$ ; Compared with obese control group, # $P < 0.05$ .

表3 各组小鼠血脂相关基因表达情况比较( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3 Comparison of the expression of lipid-related genes in mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

| Groups                           | SREBP-1C          | FAS               | PPAR $\alpha$     |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Normal control group(n=8)        | 1.00 $\pm$ 0.08   | 1.00 $\pm$ 0.09   | 4.55 $\pm$ 0.53   |
| Normal OSBPL3 Silent group(n=8)  | 1.02 $\pm$ 0.09   | 1.01 $\pm$ 0.08   | 4.49 $\pm$ 0.57   |
| Obesity control group(n=8)       | 4.77 $\pm$ 0.53*  | 5.28 $\pm$ 0.62*  | 1.13 $\pm$ 0.17*  |
| Obesity OSBPL3 silent group(n=8) | 3.02 $\pm$ 0.34*# | 3.02 $\pm$ 0.38*# | 2.43 $\pm$ 0.35*# |

Note: Compared with normal control group and OSBPL3 silence group, \* $P < 0.05$ ; Compared with obese control group, # $P < 0.05$ .

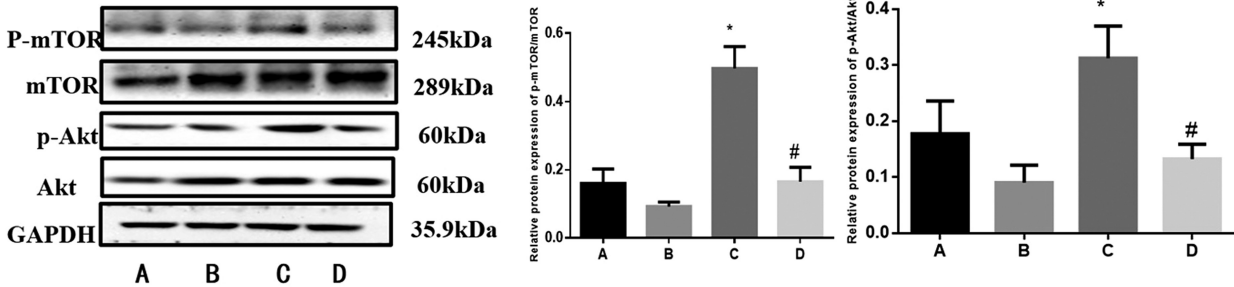


图7 Western blot 检测 Akt、mTOR 及磷酸化蛋白的条带图

Fig.7 Bands of Akt and mTOR proteins detected by Western blot

注:A:正常对照组;B:OSBPL3 沉默组;C:肥胖对照组相比;D:肥胖 OSBPL3 沉默组

Note: A: normal control group; B: OSBPL3 silent group; C: Compared with obesity control group; D: obese OSBPL3 silent group

Compared with normal control group, \* $P < 0.05$ ; Compared with obese control group, # $P < 0.05$ .

### 3 讨论

近年来,由于生活方式的巨大改变,我国肥胖和代谢综合征的发病率逐年增加,肥胖是众多慢性疾病如脂肪肝、糖尿病等的重要诱因<sup>[9-12]</sup>。因此,代谢相关脂肪性肝病患者也相应增多。代谢相关脂肪性肝病,又称非酒精性脂肪肝,是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的,以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征<sup>[13]</sup>。有国内学者研究发现:我国成年人 MAFLD 的发病率约为 15%<sup>[14]</sup>。肥胖儿童中 MAFLD 的患病率上升到 68.2%。MAFLD 晚期将进一步发展为肝癌,成为威胁人类生命健康的重大公共健康问题。此可见,了解 MAFLD 的疾病发生过程及早期积极干预并治疗 MAFLD 有着更为深远意义。国外学者研究<sup>[15-21]</sup>发现目前关于 MAFLD 的药物治疗包括胰岛素增敏剂、抗炎细胞因子等,但应用于临床中发现效果并不显著,需要开发新的药物应用于临床治疗 MAFLD。

近年来,关于氧化固醇结合蛋白(OSBP)在脂类代谢,尤其是固醇的信号和运输功能中的作用备受关注。与 OSBP 结构具有较高同源性的氧化固醇结合蛋白类似物(OSBPL)蛋白也被称为氧化固醇结合蛋白相关蛋白(ORP)<sup>[22,23]</sup>。OSBPL 是真核生物中广泛存在的一类蛋白,主要在细胞的胞质、内质网膜与高尔基体膜之间转运氧化固醇。还参与调节脂质的动态平衡、信号传递等作用。Olkonen<sup>[24]</sup>在研究中发现小鼠肝脏中 OSBP 的腺病毒过表达导致了血浆中 VLDL(超低密度脂蛋白)和 TG(肝组织甘油三酯)的增加。此外,OSBP 的过表达会抑制肝脏细胞和活体动物中的 ERK(细胞外信号调节激酶)的磷酸化。证明了 OSBP 的一个新的功能:作为 TG 代谢的调节者,并且也涉及到可以控制肝脏脂肪生成的胰岛素信号释放。人类 ORP 家族包括 12 个成员,并根据氨基酸序列同源性和结构特点分为 6 个亚型。我们发现 ORP 家族成员之一 ORP3(也称为 OSBPL3),在参与肿瘤、内质网应激以及糖脂代谢中也有重要作用<sup>[25-27]</sup>。研究发现<sup>[6]</sup>:缺氧诱导因子 1(HIF-1A)可以通过与 OSBPL3 启动子中的缺氧反应元件(HRE)结合来调节 OSBPL3 的表达,通过激活 RAS 信号通路从而促进了大肠癌的进展。Xue 等<sup>[28]</sup>学者发现 OSBPL3 是一种依赖 CDK8 的磷酸蛋白,它作为胰岛素分泌的负调节因子,对葡萄糖代谢有着重要作用。还有研究发现<sup>[29]</sup>OSBPL3 的 C-末端区域位于严格定义的脂质转移结构域之后,对于蛋白质的正确定位和功能是至关重要的。目前 Yan<sup>[30]</sup>研究发现 OSBP 可使 VLDL 甘油三酯(TG)显著升高,注射 AdOSBP 的小鼠肝组织甘油三酯(TG)升高,脂肪酸合成酶及其转录调节因子 SREBP-1C 表达上调,从而影响脂质代谢。相关研究发现<sup>[6]</sup>,OSBPL3 在肝癌 HepG2 细胞中存在沉默效应,肝癌细胞内存在该基因的表达受抑,即为转录后的基因沉默,此外细胞内还存在信号扩增现象,产生级联放大效应。

本实验研究证实,采用不同浓度油酸处理 HepG2 细胞,mRNA 及蛋白水平检测均提示 OSBPL3 表达水平随着油酸浓度升高,OSBPL3 蛋白水平逐渐升高,呈浓度依赖性,提示 OSBPL3 与脂质堆积有着密切关联。本研究目前主要在动物水平进行验证。结果显示:OSBPL3 沉默肥胖小鼠组较肥胖对照组小鼠 ALT、AST 及肝脏 TG、TC、HDL-C、LDL-C 明显下降,具

有统计学差异,体重及内脏脂肪沉积均降低。早有研究<sup>[31-33]</sup>发现:脂质合成相关基因(SREBP-1C、FAS)能够介导脂质的从头合成途径,从乙酰辅酶 A 合成至长链脂肪酸;而在脂质的氧化代谢途径中 PPAR $\alpha$  则与脂质的氧化代谢具有显著相关性。我们研究为阐明 OSBPL3 作用机制,在 4 组小鼠中进行 SREBP-1C、FAS 及 PPAR $\alpha$  检测,结果显示:OSBPL3 沉默肥胖小鼠较正常肥胖小鼠 SREBP-1C、FAS 水平降低,PPAR $\alpha$  增加,提示 OSBPL3 能够调控脂质代谢的表达,通过沉默 OSBPL3 能减少脂质合成和增加脂质氧化。这与前期 Yan<sup>[30]</sup>研究发现注射 AdOSBP 的小鼠肝组织 TG 升高,SREBP-1C 表达水平增加结果一致。经 OSBPL3 沉默处理的肥胖小鼠 Akt 及 mTOR 磷酸化表达水平升高具有明显降低作用,提示其调控作用可能与 Akt/mTOR 信号通路具有密切相关性,但目前只是初步机制探讨,仍需进一步研究验证。综上,OSBPL3 能调控脂质代谢的表达,可能通过调控 Akt/mTOR 信号通路发挥生物学功能,有望为研究 MAFLD 疾病发生发展及治疗提供参考依据。

### 参考文献(References)

- [1] Lin S, Huang J, Wang M, et al. Comparison of MAFLD and MAFLD diagnostic criteria in real world[J]. Liver Int, 2020, 40(9): 2082-2089
- [2] 肖倩倩,王梦雨,范建高. 亚太肝病研究学会代谢相关脂肪性肝病临床诊疗指南(治疗部分)简介[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(1): 41-45
- [3] Qu W, Ma T, Cai J, et al. Liver Fibrosis and MAFLD: From Molecular Aspects to Novel Pharmacological Strategies [J]. Front Med (Lausanne), 2021, 22(8): 761538
- [4] Barchetta I, Cimini FA, Cavallo MG. Vitamin D and Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease (MAFLD)[J]. An Update. Nutrients, 2020, 12(11): 3302
- [5] Hao N, Zhou Y, Li Y, et al. Clinical Value and Potential Mechanisms of Oxysterol-Binding Protein Like 3 (OSBPL3) in Human Tumors[J]. Front Mol Biosci, 2021, 19(8): 78
- [6] Jiao HL, Weng BS, Yan SS, et al. Upregulation of OSBPL3 by HIF1A promotes colorectal cancer progression through activation of RAS signaling pathway[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(7): 571
- [7] Hu Junjie, Che Li, Li Lei, et al. Co-activation of AKT and c-Met triggers rapid hepatocellular carcinoma development via the mTORC1/FASN pathway in mice[J]. Sci Rep, 2016, 6: 20484
- [8] Zhang Cong, Sheng Lei, Yuan Ming, et al. Orlistat delays hepatocarcinogenesis in mice with hepatic co-activation of AKT and c-Met[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020, 392: 114918
- [9] 贾敏杰,冯波. 2 型糖尿病合并代谢相关脂肪性肝病患者胆汁酸谱水平变化的研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2021, 29(7): 497-502
- [10] Gaffney KF, Brito AV, Kitsantas P, et al. Institute of Medicine Early Infant Feeding Recommendations for Childhood Obesity Prevention: Implementation by Immigrant Mothers From Central America [J]. Pediatr Nurs, 2018, 40: 27-33
- [11] Knight JA. Diseases and disorders associated with excess body weight[J]. Ann Clin Lab Sci, 2011, 41: 107-121
- [12] Alabduljader K, Cliffe M, Sartor F, et al. Ecological momentary assessment of food perceptions and eating behavior using a novel phone application in adults with or without obesity [J]. Eat Behav, 2018, 30: 35-41

- [13] 薛芮, 范建高. 代谢相关脂肪性肝病新定义的国际专家共识简介[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(6): 1224-1227
- [14] 沈波, 陆伦根. 代谢相关脂肪性肝病 / 非酒精性脂肪性肝病的过去、现在和未来[J]. 胃肠病学, 2021, (6): 321-324
- [15] Safari Z, Gérard P. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (MAFLD)[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(8): 1541-1558
- [16] Rong Li, Zou Junyan, Ran Wei, et al. Advancements in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023, 13: 1087260
- [17] Clayton-Chubb Daniel, Kemp William, Majeed Ammar, et al. Understanding NAFLD: From Case Identification to Interventions, Outcomes, and Future Perspectives[J]. Nutrients, 2023, 15(3): 687
- [18] Marques Patrice, Francisco Vera, Martínez-Arenas Laura, et al. Overview of Cellular and Soluble Mediators in Systemic Inflammation Associated with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3): 2313
- [19] Liao Yudi, Wang Liya, Liu Fang, et al. Emerging trends and hotspots in metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD) research from 2012 to 2021: A bibliometric analysis [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023, 14: 1078149
- [20] Yabut Julian M, Drucker Daniel J. Glucagon-like Peptide-1 Receptor-based Therapeutics for Metabolic Liver Disease [J]. Endocr Rev, 2023, 44(1): 14-32
- [21] Targher G, Byrne CD, Tilg H. MAFLD and increased risk of cardiovascular disease: clinical associations, pathophysiological mechanisms and pharmacological implications [J]. Gut, 2020, 69(9): 1691-1705
- [22] 汪菲, 牛杰, 李银, 等. 氧化固醇结合蛋白相关蛋白 9 多态性与瑞舒伐他汀与阿托伐他汀治疗后心肌梗死患者血脂水平变化的相关性[J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(4): 360-364
- [23] Olkkonen Vesa M, Ikonen Elina. Cholesterol transport in the late endocytic pathway: Roles of ORP family proteins [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2022, 216: 106040
- [24] Olkkonen VM. The emerging roles of OSBP-related proteins in cancer: Impacts through phosphoinositide metabolism and protein-protein interactions[J]. Biochem Pharmacol, 2022, 196(3): 114455
- [25] Bensen Ryan C, Gunay Gokhan, Finneran Matthew C, et al. Small Molecule Targeting of Oxysterol-Binding Protein (OSBP)-Related Protein 4 and OSBP Inhibits Ovarian Cancer Cell Proliferation in Monolayer and Spheroid Cell Models[J]. ACS Pharmacol Transl Sci, 2021, 4(2): 744-756
- [26] Olkkonen Vesa M. OSBP-Related Protein Family in Lipid Transport Over Membrane Contact Sites [J]. Lipid Insights, 2015, 8 (Suppl 1): 1-9
- [27] Arora Amita, Taskinen Juuso H, Olkkonen Vesa M. Coordination of inter-organelle communication and lipid fluxes by OSBP-related proteins[J]. Prog Lipid Res, 2022, 86: 101146
- [28] Xue Jing, Scotti Elena, Stoffel Markus. CDK8 Regulates Insulin Secretion and Mediates Postnatal and Stress-Induced Expression of Neuropeptides in Pancreatic  $\beta$  Cells[J]. Cell Rep, 2019, 28(1): 2892-2904.e7
- [29] Gulyás Gergő, Sohn Mira, Kim Yeun Ju, et al. ORP3 phosphorylation regulates phosphatidylinositol 4-phosphate and Ca dynamics at plasma membrane-ER contact sites[J]. J Cell Sci, 2020, 133(473): 1
- [30] Yan Daoguang, Lehto Markku, Rasilainen Laura, et al. Oxysterol binding protein induces upregulation of SREBP-1C and enhances hepatic lipogenesis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(1): 1108-14
- [31] 张猛, 陈暘, 刘娇, 等. 非酒精性脂肪性肝病小鼠肝组织与脂质代谢相关基因 FAS、ACC 和 SREBP-1 水平分析[J]. 实用肝脏病杂志, 2020, 23(2): 163-166
- [32] Tanaka Yuki, Minami Yasuhiro, Endo Mitsuharu. Ror1 promotes PPAR $\alpha$ -mediated fatty acid metabolism in astrocytes[J]. Genes Cells, 2023 [Epub ahead of print]
- [33] Guo Cui, Zhang Lanlan, Zhao Maoyuan, et al. Targeting lipid metabolism with natural products: A novel strategy for gastrointestinal cancer therapy [J]. Phytother Res, 2023 [Epub ahead of print]