·基础研究·

有氧运动经CNPY2调控PERK-CHOP信号通路改善小鼠非酒精性脂肪肝的机制研究*

李军汉[1] 王佳倩[1] 李亚龙[1] 蒋昌君[1]

摘要

目的:采用冠层同源物2(CNPY2)基因敲除,结合运动干预,探讨CNPY2和有氧运动在高脂膳食诱导非酒精性脂肪肝(NAFLD)中的作用及机制。

方法:(12±1)周龄SPF级C57BL/6J雄性CNPY2基因敲除(KO)小鼠及其同系同龄同窝野生型(WT)小鼠适应性喂养1周后,随机分为对照组、模型组和模型运动组。对照组予普通饲料喂养,模型组和模型运动组予高脂饲料喂养,连续17周。模型运动组从第10周开始进行连续有氧运动干预,直至第18周实验结束。HE和油红O染色观察肝组织病理形态;全自动生化仪检测小鼠血清高密度脂蛋白(HDL-c)、低密度脂蛋白(LDL-c)、血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT)水平;Western Blot法检测肝组织CNPY2、PERK、p-eIF2α、CHOP蛋白表达;qRT-PCR法检测肝组织PERK mRNA和eIF2α mRNA表达;Tunel法检测肝细胞凋亡。

结果:WT小鼠模型组CNPY2表达较对照组显著升高($P<0.05$),WT小鼠模型运动组CNPY2表达较模型组显著降低($P<0.05$)。同时,与对照组比较,KO和WT小鼠模型组均可见明显肝细胞脂肪性变和脂滴,其血清ALT、AST、TC、TG和LDL-c水平、肝组织PERK、p-eIF2α、CHOP、PERK mRNA和eIF2α mRNA表达、肝细胞凋亡显著升高($P<0.05$),血清HDL-c水平显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,KO和WT小鼠模型运动组上述指标得到显著改善($P<0.05$)。与WT小鼠比较,KO小鼠肝组织脂肪性变减轻,肝组织CNPY2、PERK、p-eIF2α、CHOP、PERK mRNA和eIF2α mRNA表达显著降低($P<0.05$)。

结论:CNPY2基因缺失和有氧运动均可有效改善NAFLD,其机制可能与其下调CNPY2表达,抑制PERK-CHOP信号通路活性,降低PERK-CHOP信号通路相关分子表达,减少肝细胞凋亡有关。

关键词 有氧运动;脂肪肝;冠层同源物2;PKR样内质网激酶;内质网应激

中图分类号:R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2023)-03-0291-08

Aerobic exercise improves non-alcoholic fatty liver diseases by regulating PERK-CHOP pathway via CNPY2/LI Junhan, WANG Jiaqian, LI Yalong, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2023, 38(3):291—298

Abstract

Objective: To investigate the role of CNPY2 and aerobic exercise in nonalcoholic fatty liver disease(NAFLD) induced by high fat diet and relative mechanism through CNPY2 gene deletion combined with exercise intervention.

Method: Thirty male CNPY2 knockout (KO) mice(12±1 weeks) and age-matched wild type (WT) littermates were randomly divided into control group, model group, and model with exercise group. Mice in model with exercise group were performed aerobic exercise training from the 10th week to the end of the experiment (week 18). HE and Oil Red O staining were used to observe the pathological morphology of liver tissues. Serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein (HDL-c), low-density lipoprotein

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2023.03.002

*基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(31900846);成都体育学院运动医学与健康研究所/四川省运动医学重点实验室资助项目(CX21B04)

1 成都体育学院运动医学与健康学院,四川省成都市,610041

第一作者简介:李军汉,女,副教授;收稿日期:2022-03-05

(LDL-c), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels were measured by automatic biochemical analyzer. The protein expression of CNPY2, PERK, p-eIF2α and CHOP in liver were detected by Western blot. The mRNA expression of PERK and eIF2α in liver were detected by qRT-PCR, and hepatocyte apoptosis was detected by Tunel assay.

Result: Among WT mice, the expression of CNPY2 in the model group was higher than that in the control group, and was lower in the exercise group than that in the model group. Meanwhile, compared with the control group, both KO and WT mice in the model group showed significant hepatic steatosis with significant inflammatory cell infiltration, and a large number of fat droplets in hepatocytes. The ALT, AST, TC, TG and LDL-c levels in serum, the expression of PERK, p-eIF2, CHOP, PERK mRNA and eIF2 mRNA in liver and the hepatocyte apoptosis were also higher. However, the HDL-c content in serum was lower. Compared with model group, aerobic exercise partially reversed the parameters in both KO and WT mice. Compared with WT mice, KO mice showed less hepatic steatosis and the expression of CNPY2, PERK, p- eIF2α, CHOP, PERK mRNA and eIF2α mRNA also decreased.

Conclusion: Both CNPY2 gene deletion and aerobic exercise can effectively improve NAFLD, which may be related to the down-regulation of CNPY2 expression, thereby inhibiting the activity of PERK-CHOP pathway and decreasing the related molecule expression of PERK-CHOP pathway and reducing the hepatocyte apoptosis.

Author's address College of Sports Medicine and Health, Chengdu Sports University, Sichuan, Chengdu, 610041

Key word aerobic exercise;fatty liver disease;CNPY2;protein kinase R-like endoplasmic reticulum;endoplasmic reticulum stress

非酒精性脂肪性肝病(non-alcohol fatty liver disease,NAFLD)是以肝细胞脂质蓄积过多而呈现弥漫性肝脂肪性变为主要病理特征的临床综合征。随着肥胖、糖尿病以及高脂血症等代谢性疾病的普遍增加,NAFLD的发生率逐渐升高,严重威胁人类身体健康。有氧运动是防治NAFLD的有效手段之一[1—2]。然而,有氧运动改善NAFLD的机制尚不清楚,因此,探讨其分子机制具有重要意义。

最新研究报道[3],有氧运动通过调控内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)PERK-CHOP信号通路,改善NAFLD。冠层同源物2(canopy homolog 2,CNPY2)是胞浆分泌型蛋白,在机体各组织器官广泛表达,以心、肝、胰腺表达较高,属于Canopy家族成员(CNPY1,2,3和4)之一。CNPY2的研究仍处于新型基因筛查的起步阶段[4],有限的文献仅见于直肠癌[5]、肾癌[6]、心肌缺血再灌注[7]和脑缺血再灌注[8]等研究报道。Hong[9]报道,CNPY2正向调控 PERK-CHOP信号通路,是ERS的重要分子组成。然而,CNPY2介导PERK-CHOP信号通路在有氧运动改善NAFLD中是否发挥作用,尚未见文献报道。本研究以CNPY2基因敲除小鼠及同系同窝野生小鼠为研究对象,通过8周高脂膳食诱导NAFLD模型,同时结合有氧运动干预,探讨CNPY2在NAFLD中的作用及运动干预机制,以期为运动防治NAFLD提供更多理论支撑,也为临床上NAFLD靶基因治疗和运动药物的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象及分组

12±1周龄SPF级CNPY2基因敲除小鼠(knockout,KO)及其同系同周龄同窝野生型小鼠(wild type,WT)各30只。CNPY2基因敲除小鼠最初由江苏集萃药康生物技术有限公司以C57BL/6J为背景构建雌雄CNPY2杂合子小鼠,后经成都达硕实验动物有限公司饲养繁育,繁殖历经10代,通过基因鉴定,以获得足够数量的CNPY2基因敲除纯合子小鼠。所有小鼠适应性喂养1周后,KO和WT小鼠随机分为对照组(KO-C,WT-C)、模型组(KO-M,WT-M)和模型运动组(KO-ME,WT-ME),每组10只。对照组予普通饲料喂养,模型组和模型运动组予高脂饲料喂养,连续17周。普通饲料和高脂饲料均由江苏协同医药生物工程有限公司提供[编号:苏饲证(2020)01006]。KO和WT小鼠按鼠种分笼饲养,每笼3—4只。饲养环境相对湿度50%—70%,温度

20—25℃,每天光照12h,自由进食饮水。动物研究方案符合《实验动物的护理和使用指南》规定,得到成都体育学院动物管理委员会批准实施。

1.2 运动方案

高脂膳食喂养8周后,分别从KO和WT小鼠对照组和模型组中随机抽取2只,判断造模是否成功[10]。在确定造模成功后,KO和WT小鼠模型运动组进行有氧跑台训练。跑台训练方案参考现有文献[11]。模型运动组小鼠先进行1周跑台适应性训练,初始速度为8m/min×10min,20min/d,每天以0.5m/min的速度和10min/d的时间递增,直至运动时间达到60min/d,运动速度达到12m/min,正式运动持续8周,每周运动5天,直至实验结束。

1.3 样本采集与处理

小鼠处死前先禁食12h,自由饮水。所有小鼠称体重后,以2%戊巴比妥钠溶液4ml/kg腹腔内注射麻醉,摘眼球取血,随后迅速离心,提取上清存到-80℃冰箱,用于血清生化检测。取出肝脏,称重,即肝湿重,计算肝指数(肝指数=肝湿重/体重)。在肝脏右缘处切取组织(1cm×1cm×1cm),用于HE及油红O染色。其余肝组织保存于-80℃冰箱储存,用于Western Blot和qRT-PCR检测。

1.4 HE和油红O染色观察肝组织形态

将肝脏从4%多聚甲醛液中取出,常规脱水、石蜡包埋、切片,HE染色,光镜下观察肝脏HE染色病理形态变化,采用NAS[10]评分标准对肝组织进行病理学评价。油红O染色时,将肝组织OCT包埋切片,油红O染液浸染,再经60%异丙醇分化,苏木素复染,甘油明胶封片,光镜下观察肝细胞脂滴蓄积情况,采用Image-Pro plus 6.0图像分析系统进行半定量分析。

1.5 全自动生化仪检测血液生化指标

采用全自动生化分析仪(HITACH公司)对血清总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol,LDL-c)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-c)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate minotransferase, AST)的含量严格按照试剂说明书进行检测。

1.6 Western Blot检测

取肝组织加入RIPA裂解液提取肝组织总蛋白。50μg蛋白样品经12.5% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,电转移至硝酸纤维素膜上,经5%脱脂奶粉室温下封闭1h。5% BSA-TBST稀释一抗CNPY2(1∶400, proteintech),PKR样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase,PERK)(1∶500, proteintech),磷酸化真核细胞翻译起始因子2α(phosphorylation eukaryotic translation initiation factor 2α,p-eIF2α)(1∶1000, 华安生物)、C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)(1∶1000, 华安生物),β-actin(1∶100000, abclonal),5% BSA-TBST稀释HRP结合的羊抗兔IgG(1∶5000,abcam)。ECL发光法曝光,显影,定影。β-actin作为内参,用Gel-pro32图像分析软件进行分析,蛋白表达量用"目的蛋白/β-actin"计算。

1.7 qRT-PCR检测

按照Trizol试剂盒说明书提取肝组织总RNA,依据TAKARA Prime ScriptTM RT Master Mix试剂盒说明书逆转录为cDNA后,加入扩增反应体系,采用实时PCR检测各组肝组织PERK、eIF2α基因的表达水平。反应条件为95℃预变性15min,1个循环;95℃变性10s,58℃退火30s,72℃延伸30s,40个循环。以ACTB为内参,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析计算mRNA的相对表达量。引物序列由上海生工公司设计合成。引物设计见表1。

1.8 TUNEL法检测肝细胞凋亡

肝组织于4%多聚甲醛溶液中浸泡固定,石蜡包埋切片,严格按照试剂盒说明书进行TUNEL染色,显微镜下观察肝细胞凋亡情况。以细胞核被标记上

表1 引物序列

引物名称	上游	下游	长度(bp)
PERK	GAGATCTGGCTCAAAGACGAAA	AAGGAGCTATGACTTCGATCTG	130
eIF2α	ACTGCTGGGACGCCTAACCTAC	TCATCATCTGACCAGGAAGGACACC	110
ACTB	CATCACTATTGGCAACGAGCGGTTCC	ACGCAGCTCAGTAACAGTCCGCCTA	410

绿色荧光的细胞作为凋亡细胞，用Image J软件对肝细胞凋亡进行定量分析。

1.9 统计学分析

数据采用统计软件SPSS 22.0进行处理，计量资料以平均值±标准差表示，WT和KO小鼠组内（对照组，模型组，模型运动组）比较，除体重（初始，第9周，第18周）采用重复测量方差分析以外，其余指标均采用单因素方差（one-way ANOVA）分析。WT和KO小鼠高脂喂养组（KO-M，WT-M，KO-ME，WT-ME）组间比较采用双因素方差（two-way ANOVA，基因×运动）分析，探讨CNPY2基因缺失和运动干预的主效应及交互效应，各组间的单独效应采用post hoc组间两两比较，$P<0.05$为具有显著性差异。

2 结果

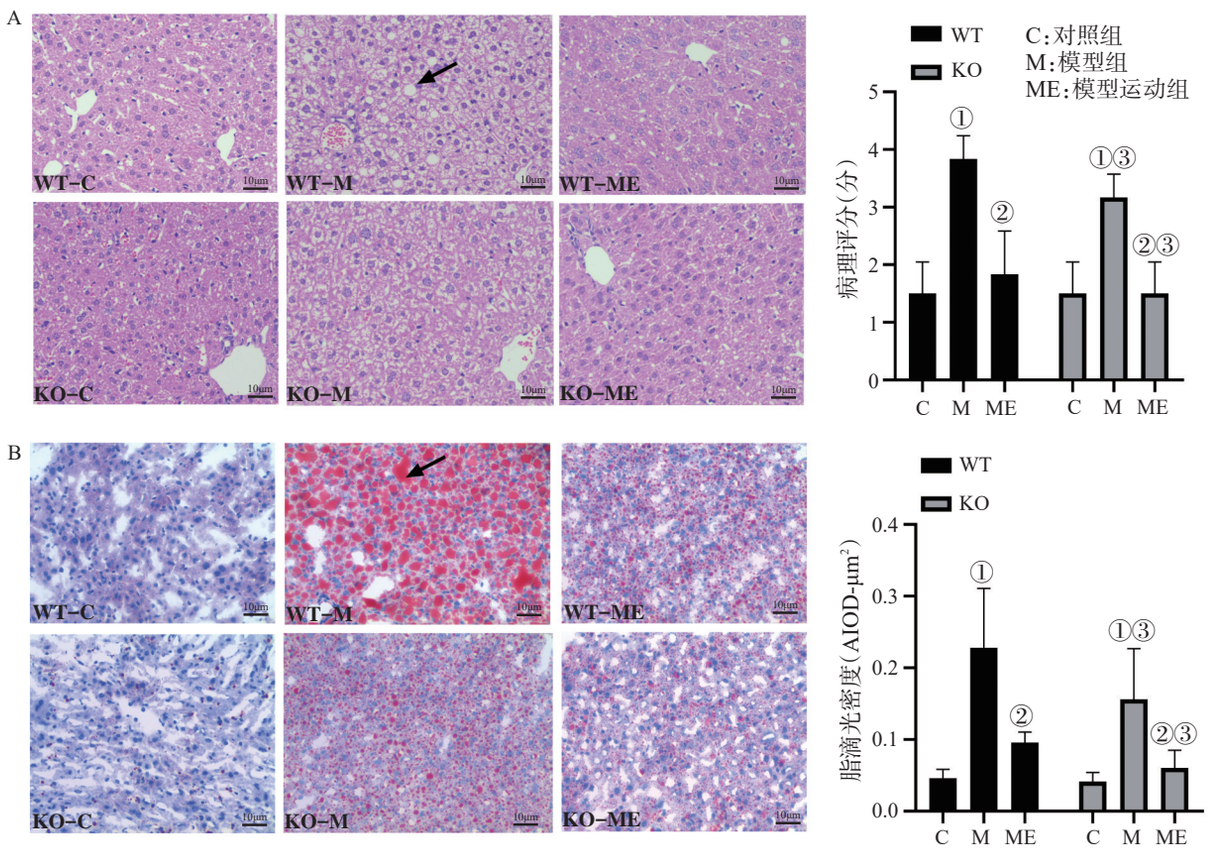
2.1 各组小鼠肝组织病理形态结构变化

肝组织病理形态学结果显示（见图1）：WT和KO小鼠C组肝细胞大小均匀，肝小叶清晰，肝细胞内未见明显脂滴；M组肝细胞排列紊乱，肝细胞内可见明显气球样变，脂滴数量增加。ME组肝细胞脂肪性变程度和脂滴数量位于M组和C组之间。与WT小鼠比较，KO小鼠肝细胞脂肪性变减轻，肝细胞脂滴数量减少。定量分析结果显示：在同种WT或KO小鼠内，M组与C组比较，WT和KO小鼠M组肝细胞脂肪性变积分和脂滴数量显著增加（$P<0.05$）；在同种WT或KO小鼠内，ME组与M组比较，WT和KO小鼠ME组肝细胞脂肪性变积分和脂滴数量显著降低（$P<0.05$）；与WT小鼠比较，KO小鼠肝细胞脂肪性变积分和脂滴数量显著降低（$P<0.05$）。

2.2 各组小鼠体重、肝湿重和肝指数变化

体重结果显示（见表2）：高脂膳食喂养后，WT和KO小鼠体重均增加，KO小鼠体重较WT小鼠增加缓

图1 各组小鼠肝组织病理形态结构变化 （10μm，×400，n=6）



注：A. 肝组织HE染色；B. 肝组织油红O染色。①$P<0.05$，与C组比较；②$P<0.05$，运动的主效应（在同种WT或KO小鼠内，ME组与M组比较）；③$P<0.05$，基因的主效应（在运动或不运动状态下，WT与KO比较）。

慢。所有小鼠初始体重均不具显著差异（P>0.05）。在同种WT或KO小鼠内，M组与C组比较，WT小鼠M组第9周和第18周体重增加（P<0.05），KO小鼠M组第18周体重增加（P<0.05）；在同种WT或KO小鼠内，ME组与M组比较，WT小鼠ME组第18周体重显著减少（P<0.05），KO小鼠ME组第18周体重不具显著差异（P>0.05）。与WT小鼠比较，KO 小鼠M组和ME组第9周体重下降（P<0.05），KO小鼠第18周M组体重降低（P<0.05），但ME组不具显著差异（P>0.05）。

肝湿重和肝指数结果显示（见表2）：在同种WT或KO小鼠内，M组与C组比较，WT小鼠M组肝湿重和肝指数均升高（P<0.05），KO小鼠M组肝指数升高（P<0.05）；在同种WT或KO小鼠内，ME组与M组比较，WT小鼠ME组肝湿重和KO小鼠ME组肝指数降低（P<0.05）。与WT小鼠比较，KO小鼠M组肝湿重降低（P<0.05）。CNPY2基因和运动对第18周体重和肝湿重具有交互效应。

2.3 各组小鼠血脂和肝功能酶水平变化

血液生化指标结果显示（见表3）：在同种WT或KO小鼠内，M组与C组比较，WT和KO小鼠M组血清ALT、AST、TC、TG和LDL-c水平均显著升高（P < 0.05），血清HDL-c水平显著降低（P < 0.05）；在同种WT或KO小鼠内，ME组与M组比较，WT和KO小鼠ME组血清AST、TC、TG和LDL-c水平显著降低（P < 0.05），HDL-c水平显著升高（P < 0.05），血清ALT水平仅WT小鼠ME组降低（P < 0.05），KO小鼠ME组不具显著差异（P>0.05）；与WT小鼠比较，KO小鼠M组以上指标均具有显著降低（P < 0.05），而ME组仅TC，TG 和LDL-c水平显著降低（P < 0.05）。CNPY2基因和运动对血清ALT、LDL-c和HDL-c水平具有交互效应（P < 0.05）。

2.4 各组小鼠肝脏CNPY2介导PERK-CHOP信号通路分子表达变化

PERK-CHOP信号通路分子表达结果显示（见表4，图2）：在同种WT或KO小鼠内，KO小鼠各组仅有极少量CNPY2表达，各组组间比较不具显著性差异（P>0.05）；WT小鼠M组CNPY2表达较C组显著升高（P < 0.05），WT小鼠ME组CNPY2表达较M组显著降低（P < 0.05）。在同种WT或KO小鼠内，M组与C组比较，WT和KO小鼠M组PERK、p-eIF2α、CHOP、PERK mRNA和eIF2α mRNA表达显著升高（P < 0.05）；在同种WT或KO小鼠内，ME组与M组比较，WT小鼠ME组以上分子表达显著降低（P < 0.05）；与WT小鼠比较，KO小鼠以上分子表达显著降低（P < 0.05）。

2.5 各组小鼠肝细胞凋亡变化

肝细胞凋亡结果如图3所示，荧光显微镜下观察肝组织切片凋亡细胞核为绿色，正常细胞核为蓝

表2 各组小鼠体重、肝湿重和肝指数变化 （$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	初始体重（g）	第9周体重（g）	第18周体重（g）	肝湿重（g）	肝指数
KO-C	17.58±0.577	18.10±0.705	17.78±0.705	0.723±0.037	0.035±0.002
KO-M	18.44±0.479	20.80±1.002③	25.54±1.389①③	0.740±0.027③	0.041±0.004①
KO-ME	18.10±0.574	21.87±1.307③	24.42±1.266④	0.732±0.040④	0.034±0.001②
WT-C	18.16±0.532	22.35±0.991	22.36±1.107	0.772±0.906	0.027±0.001
WT-M	18.65±0.520	30.21±2.639①	41.41±1.153①	1.314±0.100①	0.041±0.003①
WT-ME	18.67±0.773	26.14±1.769	28.09±1.929②	0.731±0.045②	0.036±0.001

注：①P < 0.05，与C组比较；②P < 0.05，运动的主效应（在同种WT或KO小鼠内，ME组与M组比较）；③P < 0.05，基因的主效应（在运动或不运动状态下，WT与KO比较）；④P < 0.05，基因和运动的交互效应。

表3 各组小鼠血脂和肝功能酶水平变化 （$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	AST（μ/L）	ALT（μ/L）	TC（mmol/L）	TG（mmol/L）	LDL-c（mmol/L）	HDL-c（mmol/L）
KO-C	130±13.92	22.33±0.617	2.075±0.065	0.39±0.042	0.163±0.004	3.148±0.088
KO-M	203.5±8.664①③	66.58±0.555①③	3.573±0.176①③	0.89±0.059①③	0.353±0.012①③	1.652±0.038①③
KO-ME	158.1±10.65②	37.62±0.816④	2.688±0.111②③	0.553±0.006②③	0.208±0.009②③④	2.4±0.056②④
WT-C	134.6±3.695	39.62±3.831	2.662±0.065	0.667±0.019	0.202±0.012	3.932±0.211
WT-M	246.8±9.31①	167.8±25.41①	5.76±0.304①	1.422±0.142①	1.175±0.088①	2.102±0.067①
WT-ME	183.9±5.122②	58.08±4.87②	4.983±0.229②	0.865±0.065②	0.618±0.050②	2.477±0.068②

注：①P < 0.05，与C组比较；②P < 0.05，运动的主效应（在同种WT或KO小鼠内，ME组与M组比较）；③P < 0.05，基因的主效应（在运动或不运动状态下，WT 与KO比较）；④P < 0.05，基因和运动的交互效应。

色或蓝黑色。定量分析结果显示，在同种WT或KO小鼠内，M组与C组比较，WT和KO 小鼠M组肝细胞凋亡显著增加（$P<0.05$）。在同种WT或KO小鼠内，ME组与M组比较，WT和KO小鼠ME组肝细胞凋亡显著降低（$P<0.05$）。与WT小鼠比较，KO小鼠肝细胞凋亡显著降低（$P<0.05$）。

表4　各组小鼠肝脏CNPY2介导PERK-CHOP信号通路分子表达变化　（$\bar{x}\pm s$，n=6）

组别	CNPY2（A.U）	PERK（A.U）	p-eIF2α（A.U）	CHOP（A.U）	PERK mRNA	eIF2α mRNA
KO-C	0.074±0.005	0.181±0.014	0.143±0.013	0.275±0.023	1.008±0.064	0.983±0.173
KO-M	0.085±0.004③	0.542±0.024①③	0.272±0.015①③	0.759±0.048①③	1.488±0.137①③	1.705±0.186①③
KO-ME	0.081±0.005③	0.288±0.027②③	0.168±0.003②③	0.481±0.028②③	1.037±0.088②③	0.995±0.119②③
WT-C	0.614±0.032	0.765±0.044	0.720±0.020	1.024±0.011	3.198±0.146	1.800±0.165
WT-M	1.061±0.076①	1.221±0.077①	1.030±0.043①	1.658±0.056①	4.438±0.167①	2.888±0.180①
WT-ME	0.725±0.034②	1.026±0.048②	0.818±0.029②	1.285±0.049②	3.753±0.256②	2.050±0.224②

注：①$P<0.05$，与C组比较；②$P<0.05$，运动的主效应（在同种WT或KO小鼠内，ME组与M组比较）；③$P<0.05$，基因的主效应（在运动或不运动状态下，WT与KO比较）。

图2　各组小鼠肝脏CNPY2介导PERK-CHOP信号通路蛋白表达变化

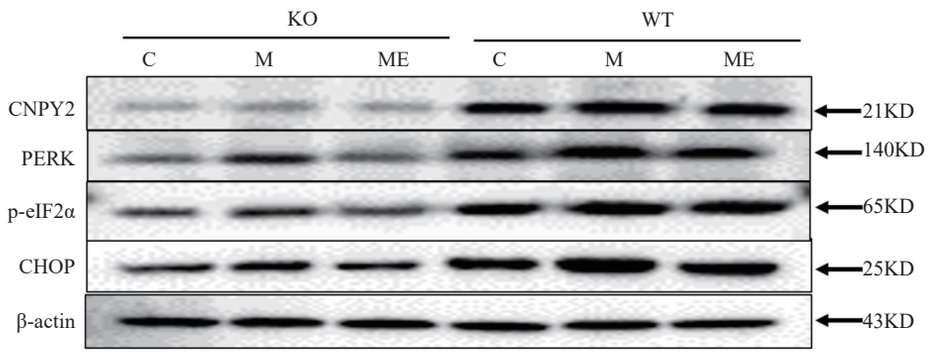
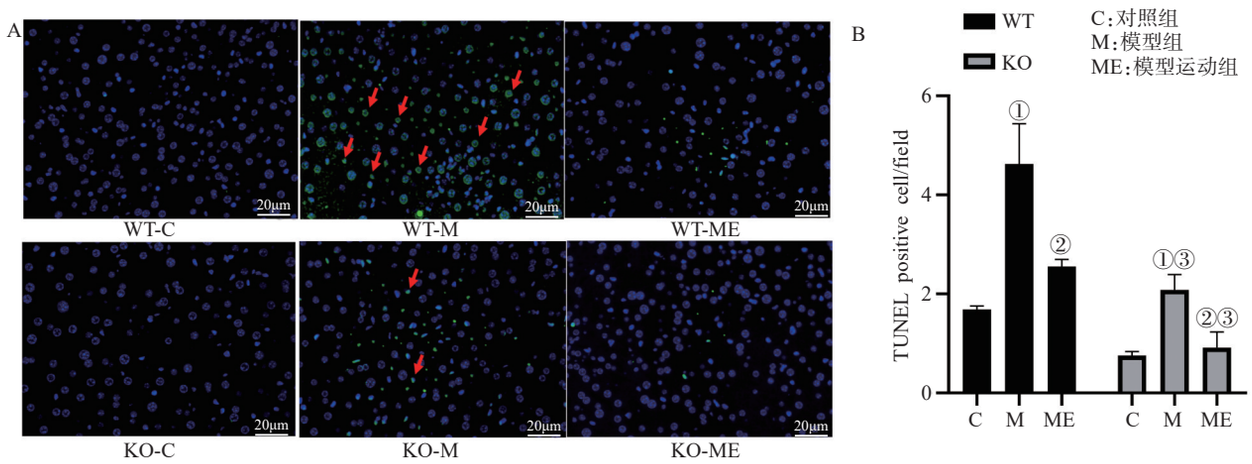


图3　各组小鼠肝细胞凋亡变化　（$\bar{x}\pm s$，n=3）



注：A: 荧光显微镜下观察结果; B: 定量分析结果。①$P<0.05$，与C组比较；②$P<0.05$，运动的主效应（在同种WT或KO小鼠内，ME组与M组比较）；③$P<0.05$，基因的主效应（在运动或不运动状态下，WT与KO比较）。

3 讨论

NAFLD是多方面因素相互作用的结果,自然病程较长。高脂饮食诱导NAFLD小鼠模型,虽然造模的时间比较长,但与人体NAFLD的发病过程相似[12]。病理组织学是诊断NAFLD的金标准[13]。肝脏作为脂质代谢与脂蛋白合成的重要器官,脂质代谢紊乱是NAFLD发生发展的常见原因[14]。脂肪肝疾病发展中的脂质代谢紊乱导致肝细胞损伤。肝细胞受损时,ALT和AST渗入血液循环,导致血液中的ALT、AST水平升高[15]。本研究结果显示,WT和KO模型组小鼠肝细胞脂肪性变加重,脂滴数量增加,血脂代谢紊乱,ALT、AST水平升高,提示高脂膳食喂养成功复制WT和KO小鼠NAFLD模型。

CNPY2是新型胞浆分泌型蛋白,属于CNPY家族(包括CNPY1、CNPY2、CNPY3和CNPY4)。目前,CNPY2已知的生物学功能十分有限。研究报道[16],CNPY2参与神经突生长、胶质瘤C6细胞和血管平滑肌细胞(smooth muscle cells,SMCs)的增殖和迁移过程。在缺氧时,低氧诱导因子1α(hypoxia inducible factor 1α, HIF-1α)可引起血管SMCs中CNPY2表达增加[17]。由此可见,CNPY2在细胞生长、迁移和抑制细胞凋亡中扮演重要作用。最新文献[18]报道,CNPY2在肝细胞癌中表达上调,并与肝癌患者生存率呈负相关,CNPY2参与肝癌形成,CNPY2缺失可减缓肝癌发生。有学者通过10周高脂膳食喂养成功诱导NAFLD小鼠模型[9],结果发现CNPY2基因缺失有效减缓NAFLD形成,CNPY2靶向调控PERK-CHOP信号通路,在NAFLD形成中发挥重要作用。本研究结果显示,与WT小鼠比较,KO小鼠肝细胞脂肪性变减轻,脂滴数量减少,PERK-CHOP信号通路相关分子表达下降,提示CNPY2介导PERK-CHOP信号通路参与NAFLD的形成,CNPY2基因缺失可减少肝细胞脂肪性变,减轻肝损伤,有效减缓NAFLD进程。这一结果与以往研究报道一致[9]。

流行病学调查显示,久坐和缺乏活动与NAFLD的发生密切相关,运动是防治NAFLD有效手段之一[19]。大量研究认为,运动改善NAFLD与运动减轻体重有关[2]。然而,也有研究表明,运动后肝脏TG和血清AST、ALT的降低与体重减轻无关[20]。本研究结果显示,高脂喂养小鼠经运动干预,WT小鼠体重显著减轻,而KO小鼠体重未见明显变化,提示运动改善NAFLD与体重减轻无关。现有研究报道[21—22],有氧运动可改善脂代谢,降低NAFLD患者血清ALT、TG水平[23]。本研究结果显示,与模型组比较,WT和KO小鼠模型运动组血清ALT、AST、TC、TG水平显著降低,提示有氧运动可有效改善NAFLD脂代谢和肝功能,减轻肝损伤。

目前,有关有氧运动改善NAFLD的作用机制,主要体现在改善胰岛素抵抗、减少脂质积累、抑制炎症通路、增强细胞功能等[24]。虽然大多数研究没有提到ERS,但我们发现ERS的关键信号分子是运动的主要效应分子[25]。研究报道[26],不同强度运动均可通过调控ERS途径PERK-CHOP信号通路,从而发挥对NAFLD不同程度的改善作用。本研究结果显示,与模型组比较,WT小鼠模型运动组CNPY2介导PERK-CHOP通路相关分子表达下降,KO小鼠模型运动组PERK-CHOP通路相关分子表达下降,KO和WT小鼠模型运动组肝细胞凋亡均减少;与WT小鼠比较,KO小鼠CNPY2介导PERK-CHOP通路相关分子表达显著降低,提示CNPY2介导PERK-CHOP通路在有氧运动改善NAFLD中发挥作用,CNPY2是有氧运动调控NAFLD肝脏PERK-CHOP信号通路的重要分子途径之一。

4 结论

CNPY2介导PERK-CHOP信号通路参与NAFLD形成。有氧运动和CNPY2基因缺失均可改善NAFLD,其机制可能与其下调肝脏CNPY2表达,抑制PERK-CHOP通路活性,降低PERK-CHOP信号通路相关分子表达,减少肝细胞凋亡有关。

参考文献

[1] Abdelbasset WK, Elsayed SH, Nambi G, et al. Effect of moderate-intensity aerobic exercise on hepatic fat content and visceral lipids in hepatic patients with diabesity: a single-blinded randomised controlled trial[J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2020,19(2):735—743.

[2] Wong VW, Wong GL, Chan RS, et al. Beneficial effects of lifestyle intervention in non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Hepatol, 2018, 69(6):1349—

1356.

[3] Ruan L, Li F, Li S, et al. Effect of different exercise intensities on hepatocyte apoptosis in HFD-induced NAFLD in rats: the possible role of endoplasmic reticulum stress through the regulation of the IRE1/JNK and eIF2α/CHOP signal pathways[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 63(7):685—698.

[4] Kakehashi A, Suzuki S, Shiota M, et al. Canopy homolog 2 as a novel molecular target in hepatocarcinogenesis[J]. Cancers, 2021, 13(14):986—989.

[5] Yan P, Gong H, Zhai X, et al. Decreasing CNPY2 expression diminishes colorectal tumor growth and development through activation of p53 pathway[J]. Am J Pathol, 2016, 186(4):1015—1024.

[6] Taniguchi H, Ito S, Ueda T, et al. CNPY2 promoted the proliferation of renal cell carcinoma cells and increased the expression of TP53[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 485(2):267—271.

[7] Liu C, Liu Y, He J, et al. Liraglutide increases VEGF expression via CNPY2-PERK pathway induced by hypoxia/reoxygenation injury [J]. Front Pharmacol,2019,10(3):789—803.

[8] Zhao L, Li H, Gao Q, et al. Berberine attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury induced neuronal apoptosis by down-regulating the CNPY2 signaling pathway [J]. Front Pharmacol, 2021, 12(2):689—693.

[9] Hong F, Liu B, Wu B X, et al. CNPY2 is a key initiator of the PERK-CHOP pathway of the unfolded protein response [J]. Nat Struct Mol Biol, 2017, 24(10):834—839.

[10] 郭怡琼，吴琼，吴雅婷，等. 枸杞多糖和有氧运动对大鼠非酒精性脂肪肝的干预效果及其机制研究[J]. 上海交通大学学报(医学版)[J]. 2020, 40(1):30—36.

[11] Marques CM, Motta VF, Torres TS, et al. Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in high-fat fed C57BL/6 mice[J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2010, 43(5):467—475.

[12] Gao J, Song J J, Du M, et al. Bovine alpha-lactalbumin hydrolysates (alpha-LAH) attenuate high-fat diet induced nonalcoholic fatty liver disease by modulating hepatic lipid metabolism in C57BL/6J mice[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 54(2):254—262.

[13] Castera L, Friedrich-Rust M, Loomba R. Noninvasive assessment of liver disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Gastroenterology,2019,156(5):1264—1281.

[14] Cai H, Qin YL, Shi ZY, et al. Effects of alternate-day fasting on body weight and dyslipidaemia in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomised controlled trial[J]. BMC Gastroenterology, 2019, 19(1):21—29.

[15] Gastaldelli A, Perego L, Paganelli M, et al. Elevated concentrations of liver enzymes and ferritin identify a new phenotype of insulin resistance: effect of weight loss after gastric banding[J]. Obesity Surgery, 2009, 19(1):80—86.

[16] Chu M, Liu H, Xiong Z, et al. Canopy fibroblast growth factor signaling regulator 2 (CNPY2) inhibits neuron apoptosis in Parkinson's disease via the AKT/GSK3beta pathway[J]. Curr Neurovasc Res, 2021, 18(1):102—112.

[17] Tian T, Dong Y, Zhu Y, et al. Hypoxia-induced CNPY2 upregulation promotes glycolysis in cervical cancer through activation of AKT pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 55(1):63—70.

[18] Hong F, Lin CY, Yan J, et al. Canopy homolog 2 contributes to liver oncogenesis by promoting unfolded protein response-dependent destabilization of tumor protein P53[J]. Hepatology (Baltimore, Md), 2022, 65(3):78—89.

[19] Anderson EL, Fraser A, Howe LD, et al. Physical activity is prospectively associated with adolescent nonalcoholic fatty liver disease[J]. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2016, 62(1):110—117.

[20] Trovato FM, Castrogiovanni P, Malatino L, et al. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) prevention: role of Mediterranean diet and physical activity[J]. Hepatobiliary Surgery and Nutrition, 2019, 8(2):167—169.

[21] Vorland CJ, Goote G, Dickinson SL. A randomized controlled trial on the effectiveness of 8-week high intensity interval exercise on interahepatic triglycerides, visceral lipids, and health-related quality of life in diabetic obese patients with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Medicine, 2020, 99(37):14918—14932.

[22] Haus JM, Solomon TPJ, Kelly KR, et al. Improved hepatic lipid composition following short-term exercise in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2013, 98(7):1181—1188.

[23] Yao JL, Meng MM, Yang SN, et al. Effect of aerobic and resistance exercise on liver enzyme and blood lipids in Chinese patients with nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial[J]. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2018, 11(5):4867—4874.

[24] Werling K, Lango A. Effects of physical activity in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Orvosi Hetilap, 2020, 161(6):203—207.

[25] Zou Y, Qi Z. Understanding the role of exercise in nonalcoholic fatty liver disease: ERS-linked molecular pathways [J]. Mediators of Inflammation, 2020, 64(1):291—306.

[26] 阮凌，李方晖. 运动训练和白藜芦醇保护NAFLD大鼠肝细胞凋亡的内质网应激机制研究[J]. 体育科学，2016，36(8)：56—66.