

有氧运动对 CNPY2 调控 NF- κ B 信号通路改善非酒精性脂肪肝的作用研究

蒋昌君^{1,2}, 王佳倩², 李亚龙², 李军汉²

1.西南石油大学体育学院, 四川 成都 610000; 2.成都体育学院运动医学与健康学院, 四川 成都 610041

摘要:目的 探讨冠层同源物 2 (canopy homolog 2, CNPY2) 和有氧运动经核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路在高脂膳食诱导非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 中的作用机制。方法 (12 \pm 1) 周龄雄性 CNPY2 基因敲除 (CNPY2 KO) 小鼠及同系同窝同龄野生 (WT) 小鼠经一周适应性喂养后随机分为对照组 (CON), 高脂模型组 (MOD) 和高脂模型运动组 (MOD+EX)。CON 组喂养普通饲料, MOD 组和 MOD+EX 组喂养高脂饲料, 直至 18 周实验结束。从第 10 周开始, MOD+EX 组小鼠进行一周的适应性跑台训练, 随后持续运动干预至 18 周实验结束。全自动生化分析仪检测血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C、ALT 和 AST 水平; HE 染色和油红 O 染色分析肝脏病理形态; Western Blot 检测肝脏 CNPY2、I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ B、p-NF- κ B 蛋白表达, ELISA 检测肝脏炎症因子 TNF- α 和 IL-6 水平; qRT-PCR 检测肝脏 NF- κ B mRNA、TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA 表达。通过单因素方差分析和独立样本 *t* 检验分析数据。结果 WT 小鼠 MOD 组 CNPY2 表达较 CON 组升高 ($t=-5.730$, $P=0.001$), MOD+EX 组 CNPY2 表达较 MOD 组降低 ($t=3.714$, $P=0.010$); 与 CON 组相比, WT 小鼠和 CNPY2 KO 小鼠 MOD 组血清 TC、TG、LDL-C、ALT、AST 水平均升高 (WT: $t=-13.325$ 、 -4.889 、 -10.442 、 -3.500 、 -15.122 , $P<0.001$ 、 <0.001 、 <0.001 、 $=0.003$ 、 <0.001 ; CNPY2 KO: $t=-6.910$ 、 -4.962 、 -7.457 、 -4.584 、 -7.336 , P 均 <0.001), 肝脏 TNF- α 、IL-6、p-I κ B α /I κ B α 、p-NF- κ B/NF- κ B、NF- κ B mRNA、TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA 水平均升高 (WT: $t=-25.179$ 、 -21.043 、 -9.177 、 -12.207 、 -5.205 、 -6.910 、 -4.802 , $P<0.001$ 、 <0.001 、 <0.001 、 <0.001 、 $=0.002$ 、 <0.001 、 $=0.003$; CNPY2 KO: $t=-18.878$ 、 -21.840 、 -14.033 、 -12.511 、 -6.870 、 -9.546 、 -8.303 , P 均 <0.001), HDL-C 水平均降低 (WT: $t=11.695$, $P<0.001$; CNPY2 KO: $t=6.598$, $P<0.001$), 肝细胞脂肪变性, 可见大量脂滴; 与 MOD 组相比, WT 小鼠和 CNPY2 KO 小鼠 MOD+EX 组上述指标均有效改善。与 WT 小鼠相比, CNPY2 KO 小鼠上述指标基本均有效改善。结论 CNPY2 调控 NF- κ B 信号通路参与 NAFLD 的形成与发展。CNPY2 基因缺失和有氧运动均能改善 NAFLD, 其机制可能与有氧运动降低肝脏 CNPY2 表达、抑制 NF- κ B 信号通路、下调肝脏炎症因子表达水平、减轻肝脏炎症有关。

关键词: 有氧运动; 非酒精性脂肪肝; CNPY2; 炎症; NF- κ B

中图分类号: R575.5; G804.54 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2024)11-2100-08

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202310070

Study on the effect of aerobic exercise on CNPY2 regulating NF- κ B signal pathway to improve non-alcoholic fatty liver

JIANG Chang-jun*, WANG Jia-qian, LI Ya-long

*School of Physical Education, Southwest University of Petroleum, Chengdu, Sichuan 610000, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Canopy homolog 2 (CNPY2) and aerobic exercise through nuclear factor kappa-B (NF- κ B) signal pathway in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) induced by high fat diet. **Methods** Male CNPY2 knockout (CNPY2 KO) mice and wild (WT) mice aged (12 \pm 1) weeks were randomly divided into control group (CON), hyperlipidemic model group (MOD), and hyperlipidemic model exercise group (MOD+EX) after one week of adaptive feeding. CON group was fed with normal diet, and MOD group and MOD+EX group were fed with high fat diet until the end of 18 weeks. From the 10th week, the mice in the MOD+EX group received adaptive treadmill training for a week, followed by continuous exercise intervention until the end of the 18-week experiment. The serum levels of TC, TG, LDL-C, HDL-C, ALT, and AST were detected by automatic biochemical analyzer, the pathological morphology of liver was analyzed by HE staining

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(31900846);四川省自然科学基金项目(2024NSFSC0644);运动医学四川省重点实验室暨国家体育总局重点实验室(2023-A007);成都体育学院运动医学与研究所/郑怀贤骨伤研究所项目(CX21B04)

作者简介:蒋昌君(1997—),男,硕士,助教,研究方向:运动干预慢性病的机制研究

通信作者:李军汉, E-mail: junhanli@cdu.edu.cn

and oil red O staining, the protein expressions of CNPY2, I κ B α , p-I κ B α , NF- κ B, and NF- κ B in liver were detected by Western Blot, the levels of TNF- α and IL6 in liver were detected by ELISA, and the expressions of NF- κ B mRNA, TNF- α mRNA, and IL-6 mRNA in liver were detected by q RT-PCR. The data were analyzed by single factor analysis of variance and independent sample *t*-test. **Results** The expression of CNPY2 in MOD group was higher than that in CON group ($t=-5.730, P=0.001$) while the expression of CNPY2 in MOD+EX group was lower than that in MOD group ($t=3.714, P=0.010$). Compared with CON group, the serum levels of TC, TG, LDL-c, ALT, and AST in MOD group of WT mice and CNPY2 KO mice were higher (WT: $t=-13.325, P < 0.001$; $t=-4.889, P < 0.001$; $t=-10.442, P < 0.001$; $t=-3.500, P=0.003$; $t=-15.122, P < 0.001$; CNPY2 KO: $t=-6.910, P < 0.001$; $t=-4.962, P < 0.001$; $t=-7.457, P < 0.001$; $t=-4.584, P < 0.001$; $t=-7.336, P < 0.001$). The levels of TNF- α , IL-6, p-I κ B α /I κ B α , p-NF- κ B/NF- κ B, NF- κ B mRNA, TNF- α mRNA, and IL-6 mRNA in liver were increased significantly (WT: $t=-25.179, P < 0.001$; $t=-21.043, P < 0.001$; $t=-9.177, P < 0.001$; $t=-12.207, P < 0.001$; $t=-5.205, P=0.002$; $t=-6.910, P < 0.001$; $t=-4.802, P=0.003$; CNPY2 KO: $t=-18.878, P < 0.001$; $t=-21.840, P < 0.001$; $t=-14.033, P < 0.001$; $t=-12.511, P < 0.001$; $t=-6.870, P < 0.001$; $t=-9.546, P < 0.001$; $t=-8.303, P < 0.001$), HDL-C level decreased (WT: $t=11.695, P < 0.001$; CNPY2 KO: $t=6.598, P < 0.001$), and hepatocyte steatosis with large amount of lipid droplets was observed. Compared with MOD group, the above-mentioned indexes were effectively improved in WT mice and CNPY2 KO mice in MOD+EX group. Compared with WT mice, the above-mentioned indexes of CNPY2 KO mice were improved effectively. **Conclusion** CNPY2 regulates NF- κ B signal pathway and participates in the formation and development of NAFLD. Both CNPY2 gene deletion and aerobic exercise can improve NAFLD, which may be related to the decrease of liver CNPY2 expression, inhibition of NF- κ B signal pathway, down-regulation of liver inflammatory cytokines and reduction of liver inflammation.

Keywords: Aerobic exercise; Non-alcoholic fatty liver; CNPY2; Inflammation; NF- κ B

非酒精性脂肪性肝 (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是当今全球最为常见的肝脏疾病,约有 25%的人被认为患上 NAFLD^[1-2],这种疾病的范围从肝脏单纯脂肪变性延伸至非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH),NASH 是一种更为严重的 NAFLD 形式,伴有脂肪变性、炎症和细胞损伤,到后期随着病情的加重可能进展为肝功能衰竭、晚期肝纤维化、肝硬化或肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma)^[3-4]。同时,NAFLD 与多种肝外疾病有关^[5],如肝外癌症和心血管疾病 (cardiovascular disease,CVD)并发病。

肝脏炎症反应是 NAFLD 形成与发展的关键环节,它导致了肝脏单纯脂肪变性向 NASH 的转变,炎症因子失衡是 NAFLD 病情发展过程中致肝细胞损伤的重要病理基础,典型的炎症反应是 NAFLD 主要病理表现之一。核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)被认为是炎症反应的主要调节因子,它能够控制触发免疫和炎症反应相关基因的转录^[6]。在静止细胞中,NF- κ B 被其抑制蛋白 (inhibitor of NF- κ B, I κ B)限制在细胞质中,不能发挥其调节功能^[7]。而当一些刺激如游离脂肪酸增加、脂肪变性、胰岛素抵抗等会使 I κ B 泛素化和降解,NF- κ B 获释放并转运至细胞核,在核内参与激活下游基因转录,如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)等炎症因子,从而介导肝细胞炎症反应^[8]。

内质网(endoplasmic reticulum)蛋白冠层同源物 2

(canopy homolog 2, CNPY2)在肝脏、心脏和肺组织中高度表达^[9],属于 CNPY 家族的一员。现针对 CNPY2 的研究较少,对其功能认识尚不完全。此前研究表明,CNPY2 可能是治疗未折叠蛋白反应 (unfolded protein response,UPR)相关疾病(如炎症、癌症和代谢障碍)的潜在新靶点^[10]。在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)中,CNPY2 表达上调导致 I κ B α 磷酸化水平增加,最终激活 NF- κ B^[11]。近期一项研究显示,有氧运动通过抑制 CNPY2-PERK 信号通路改善 NAFLD^[12]。然而,尚未见文献报道 CNPY2 能否通过调控 NF- κ B 信号通路在有氧运动改善 NAFLD 中发挥作用。本研究旨在通过 8 周高脂膳食喂养建立 NAFLD 小鼠模型,结合 8 周有氧运动训练研究有氧运动对 NAFLD 的改善效果,并重点探讨 CNPY2 在其中发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 动物跑台 (SA101, 江苏 SansBio 公司);凝胶成像系统(BioSpectrum,美国 UVP 公司);qRT-PCR 仪(Q2000A,杭州 LongGene 公司);酶标仪 (Multiskan SkyHigh, 美国 Thermo Fisher 公司);RIPA 裂解液(PC101,上海 Epizyme Bio 公司)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(ZJ102,上海 Epizyme Bio 公司)、特超敏 ECL(P0018AS,上海 Beyotime Bio 公司)、蛋白酶抑制剂混合物 (ST506, 上海 Beyotime Bio 公司);TNF- α ELISA 试剂盒(RK00027,武汉 ABconal 公司)、IL-6 ELISA 试剂盒 (RK00008, 武汉 ABconal 公

司);RNA 抽提试剂盒(R1200,北京 Solarbio 公司)及逆转录试剂盒 (FP205, 北京 TIANGEN 公司); 抗体: Anti-CNPY2 (14635-1-AP, 武汉 Proteintech 公司)、Anti- β -actin(CL495-66009, 武汉 Proteintech 公司)、Anti-I κ B α (A11168, 武汉 ABconal 公司)、Anti-p-I κ B α (AP0614, 武汉 ABconal 公司)、Anti-NF- κ B(A19653, 武汉 ABconal 公司)、Anti-p-NF- κ B (AP0124, 武汉 ABconal 公司);HRP 标记二抗:Goat anti-Rabbit (HA1001, 杭州 HuaBio 公司)、Goat anti-Mouse (HA1006, 杭州 HuaBio 公司)。

1.2 实验动物 健康雄性 (12 \pm 1) 周龄 SPF 级 CNPY2 基因敲除(CNPY2 KO)小鼠及同系同窝同龄野生(WT)小鼠各 30 只。CNPY2 KO 小鼠是由江苏集萃药康生物技术有限公司 [许可证编号:JSNJ (苏)2020-0003] 以 C57BL/6J 为背景构建 CNPY2 杂合子小鼠,后交至成都达硕实验动物有限公司繁育,繁育总共历经 10 代,并进行基因鉴定,得到实验所需 CNPY2 KO 纯合子小鼠数量,后转移至成都体育学院实验动物中心实验室进行饲养、造模。CNPY2 KO 小鼠和 WT 小鼠按鼠种分笼饲养,所有小鼠均用耳标和尾标标记,每笼 3~4 只,室内温度 18~22 $^{\circ}$ C,相对湿度 45%~55%,12 h 光照和 12 h 熄灯模拟昼夜交替,期间自由饮食和饮水,每周更换垫料 2 次。本动物实验方案符合《实验动物的护理和使用指南》规定,并得到成都体育学院动物伦理委员会批准 (伦理编号:[2021]59 号)。

1.3 实验分组与运动方案 所有小鼠在一周的适应性喂养后随机分为对照组(CON)、高脂模型组(MOD)和高脂模型运动组(MOD+EX),每组 10 只。CON 组喂养普通饲料,MOD 组和 MOD+EX 组喂养高脂饲料,直至 18 周实验结束。

高脂膳食喂养 8 周后,分别从 CON 组和 MOD 组中各随机抽取 WT 小鼠和 CNPY2 KO 小鼠各 2 只检测,以判断造模是否成功^[13]。运动方案参照先前的文献报道^[14]。MOD+EX 组小鼠先进行一周的适应性训练,期间内小鼠的初始运动方案为 8 m/min,持续时间 20 min,每天以 0.5 m/min 的速度和 10min/d 的时间逐渐递增至 12 m/min,持续时间 60 min,具体适应性训练方案见表 1。适应性训练结束后,在接下来的 8 周内以 12 m/min,持续时间 60 min,每天一次,每周五天的训练方案进行正式训练。

1.4 实验样本取样 所有小鼠处死前先禁食 24 h。待小鼠称量体重后腹腔注射 2%戊巴比妥钠溶液,眼球静脉抽血。血液在室温下静置 30 min,3 000 r/min 离心 10 min,离心半径 8 cm,收集上清用于血清生化分析。从小鼠腹腔中迅速取出肝脏,称重,并用生理

盐水反复清洗血液。部分肝组织置于液氮中冷冻,并在 -80 $^{\circ}$ C 的冰箱中保存,用于 ELISA、Western Blot 和 qRT-PCR 检测,部分肝组织用 4%多聚甲醛固定,待进行病理检测。

表 1 适应性运动训练方案

Table 1 Adaptive exercise training protocol

运动速度(m/min)	运动时间(min)	跑台坡度	日期时间
8	20	0	Day1
9	30	0	Day2
10	40	0	Day3
11	50	0	Day4
12	60	0	Day5

1.5 肝脏病理形态检测 HE 染色:4%多聚甲醛固定肝组织 24 h,经脱水、透明、进蜡、包埋、切片等步骤,常规 HE 染色,光学显微镜下观察小鼠肝脏病理形态。

油红 O 染色:肝组织 OTC 包埋切片,入油红 O 工作染液浸润,经 60%异丙醇溶液分化,并用自来水清洗,苏木素复染,最后用甘油明胶封片,光学显微镜下观察小鼠肝细胞脂滴积聚情况,Image Pro plus 6.0 图像分析系统计算脂滴光密度值。

1.6 血清生化检测 按照操作流程标准,通过全自动化分析仪检测小鼠血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)、高密度脂蛋白(HDL-C)、丙氨酸转氨酶(ALT)和天门冬氨酸转氨酶(AST)水平。

1.7 ELISA 严格按照 ELISA 试剂盒说明书的操作流程标准检测小鼠肝脏炎症因子 TNF- α 和 IL-6 水平。

1.8 Western Blot 称取 20 mg 肝组织置入研磨管中,加入 200 μ l 的 RIPA 裂解液,研磨后冰上裂解 5~10 min,离心并提取上清部分,BCA 法检测蛋白浓度后进行 10 min 的蛋白变性。蛋白样品经凝胶电泳分离后湿转至 PVDF 膜,经 5%BSA 室温下封闭 2 h。5%BSA 稀释一抗 CNPY2、I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ B、p-NF- κ B、 β -actin,并在室温下孵育 1 h,放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜,次日取出,并用 TBST 洗涤 3 次,根据对应种属选择相应的二抗孵育 1.5 h,ECL 法显色曝光,采用 image J 软件分析灰度值,并根据“目的蛋白/ β -actin”计算方法计算蛋白相对表达量。

1.9 qRT-PCR 从肝细胞中提取总 RNA,根据试剂盒操作流程逆转录成 cDNA,加入扩增反应体系,以 GAPDH 为内参进行 qRT-PCR 检测,结果用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行相对表达。引物设计见表 2。

表 2 Real-time qPCR 引物序列
Table 2 Primer sequence for RT-qPCR

基因	5'-3'	引物序列
NF- κ B p65	Forward	AGCAACCAAAAACAGAGGGGA
	Reverse	TGCAAAATTTGACCTGTGGGT
TNF- α	Forward	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT
	Reverse	GCTACGACGTGGGCTACAG
IL-6	Forward	CCAAGAGGTGACTGCTTCCC
	Reverse	CTGTTGTTTCAGACTCTCTCCCT
GAPDH	Forward	AGGCCGGTGCTGAGTATGTC
	Reverse	TGCCTGCTTACCACCTTCT

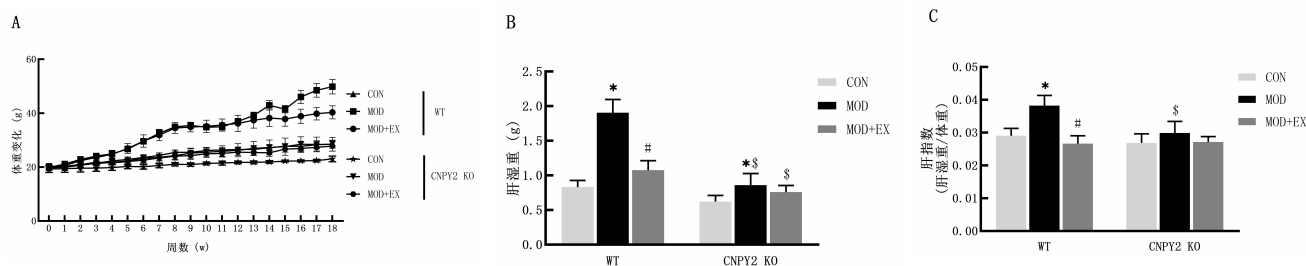
1.10 统计学分析 所有数据采用 SPSS 21.0 软件进行分析处理,结果以($\bar{x} \pm s$)的形式表示,采用 Graph Pad Prism 8.0 软件作图。WT 小鼠和 CNPY2 KO 小鼠各自组内比较采用单因素方差分析,通过 LSD- t 检验进行组间差异的多重比较。WT 小鼠和 CNPY2 KO 小鼠对应高脂喂养组(MOD, MOD+EX)间比较采用独立样本 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 体重、肝湿重和肝指数变化 各组小鼠的初始体重无显著性差异($F=0.479, P=0.789$),在整个实验过程中,各组小鼠体重均逐渐增长,但高脂膳食喂养小

鼠体重增长较快,CNPY2 KO 小鼠较 WT 小鼠体重增加较缓;实验第 9 周,无论是 WT 小鼠还是 CNPY2 KO 小鼠,MOD 组体重均显著高于 CON 组(WT: $t=-12.932, P<0.001$; CNPY2 KO: $t=-5.059, P<0.001$),相较于 WT 小鼠,CNPY KO 小鼠体重降低($t=12.53, P<0.001$; $t=11.46, P<0.001$);实验第 18 周,WT 小鼠 MOD+EX 组体重均显著低于 MOD 组 ($t=7.653, P<0.001$),相较于 WT 小鼠,CNPY KO 小鼠体重降低($t=14.16, P<0.001$; $t=10.16, P<0.001$)。见图 1。

小鼠肝湿重和肝指数结果显示,WT 小鼠 MOD 组肝湿重、肝指数较 CON 组均显著增加($t=-13.393, P<0.001$; $t=-6.298, P<0.001$),MOD+EX 组肝湿重、肝指数较 MOD 组均显著降低 ($t=10.342, P<0.001$; $t=7.975, P<0.001$);CNPY2 KO 小鼠 MOD 组肝湿重较 CON 组显著增加($t=-3.295, P=0.005$),肝指数未见显著性差异($t=-1.878, P=0.080$),MOD+EX 组肝湿重、肝指数较 MOD 组均未见显著性差异 ($t=1.392, P=0.184$; $t=1.702, P=0.109$);相较于 WT 小鼠,CNPY2 KO 小鼠肝湿重降低 ($t=9.994, P<0.001$; $t=4.735, P<0.001$),肝指数方面,CNPY2 KO 小鼠 MOD 组降低($t=4.306, P=0.002$)。见图 1。



注:图 A 为体重变化曲线;图 B 为肝湿重;图 C 为肝指数;* $P<0.05$,与 CON 相比;# $P<0.05$,与 MOD 相比;\$\$ $P<0.05$,与对应组野生小鼠相比;WT 为野生小鼠;CNPY2 KO 为 CNPY2 基因敲除小鼠。

图 1 小鼠体重、肝湿重与肝指数($\bar{x} \pm s, n=6 \sim 7$)

Figure 1 Body weight, liver wet weight and liver index in mice ($\bar{x} \pm s, n=6 \sim 7$)

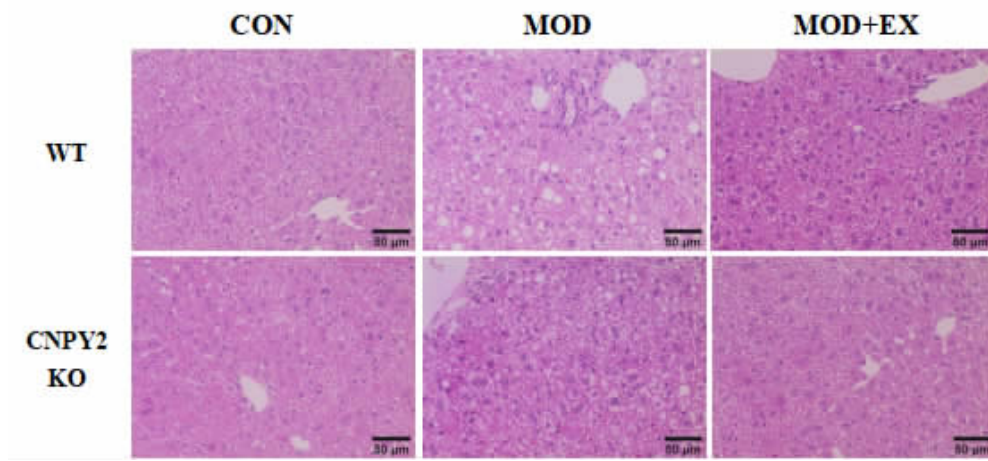
2.2 肝脏病理形态变化 HE 染色和油红 O 染色结果显示,无论是 WT 小鼠还是 CNPY2 KO 小鼠,CON 组小鼠肝细胞形态结构正常,肝索排列整齐,肝小叶结构清晰,几乎无脂滴分布;MOD 组小鼠肝细胞肿胀,出现明显的脂肪变性和空泡化,脂滴数量较 CON 组小鼠增加 (WT: $t=-9.643, P<0.001$; CNPY2 KO: $t=-8.021, P<0.001$),肝索排列紊乱,并伴有炎性细胞浸润;MOD+EX 组小鼠肝细胞脂肪变性和空泡化程度有所改善,脂滴数量较 MOD 组小鼠有所降低(WT: $t=6.396, P=0.001$; CNPY2 KO: $t=5.646, P=0.001$)。与 WT 小鼠相比,CNPY2 KO 小鼠肝细胞形态结构改善,脂肪空泡化减少,脂滴数量有所降低($t=3.570, P=0.023$;

$t=2.897, P=0.044$)。见图 2、3。

2.3 血液生化指标变化 全自动生化分析仪检测小鼠血液生化指标结果显示,无论是 WT 小鼠还是 CNPY2 KO 小鼠,MOD 组相较于 CON 组,血清 TC、TG、LDL-C、ALT 和 AST 水平均显著升高(WT: $t=-13.325, -4.889, -15.122, -10.442, -3.500, P<0.001, <0.001, <0.001, =0.003$; CNPY2 KO: $t=-6.910, -4.962, -7.336, -7.457, -4.584, P$ 均 <0.001),HDL-C 水平显著降低 (WT: $t=11.695, P<0.001$; CNPY2 KO: $t=6.598, P<0.001$);无论是 WT 小鼠还是 CNPY2 KO 小鼠,MOD+EX 组相较于 MOD 组,血清 TC、TG、LDL-C、ALT 和 AST 水平均显著降低 (WT: $t=-4.310,$

6.063、9.006、10.564、6.427, P 均 <0.001 ; CNPY2 KO: $t=4.599、5.804、4.553、7.668、9.154$, P 均 <0.001), HDL-C 水平显著升高 (WT: $t=-5.163$, $P<0.001$; CNPY2 KO: $t=-3.037$, $P=0.008$)。相较于 WT 小鼠, CNPY2 KO 小鼠 MOD 组血清 TC、TG、LDL-C 和 ALT 水平均显著降低 ($t=7.470、4.317、10.340、6.367$, P 均 <0.001), HDL-C 水

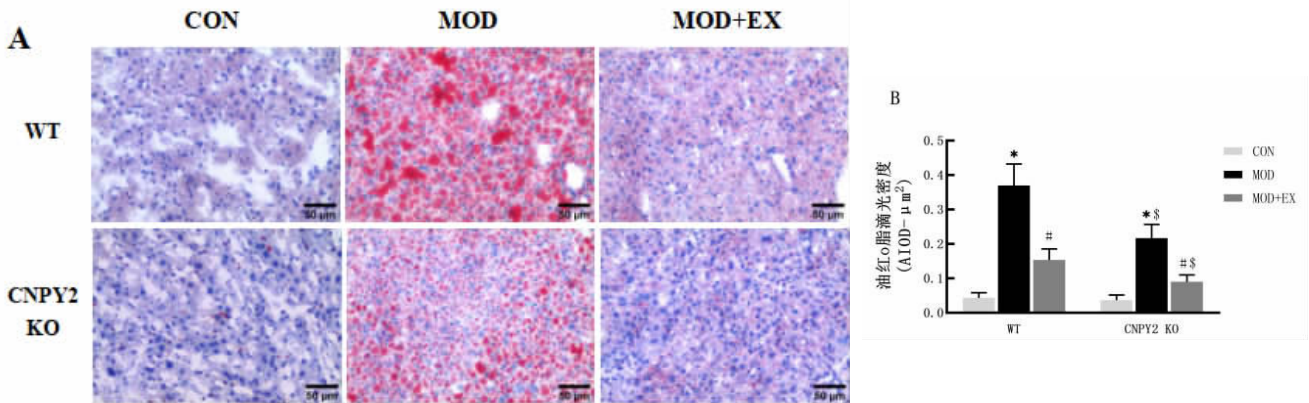
平显著升高 ($t=4.703$, $P=0.001$), AST 无显著性差异 ($t=0.128$, $P=0.901$); 相较于 WT 小鼠, CNPY2 KO 小鼠 MOD+EX 组血清 TC、TG 和 LDL-C 水平显著降低 ($t=12.070、4.266、7.160$, $P<0.001、=0.001、<0.001$), HDL-C 水平显著升高 ($t=2.217$, $P=0.049$), ALT 和 AST 无显著性差异 ($t=0.674、0.277$, $P=0.514、0.786$)。见图 4。



注: HE 染色 ($\times 400, 50 \mu\text{m}$)。

图 2 小鼠肝脏 HE 染色

Figure 2 The liver of mice was stained with HE



注: 图 A 为油红 O 染色 ($\times 400, 50 \mu\text{m}$); 图 B 为油红 O 脂滴光密度分析。

图 3 小鼠肝脏油红 O 染色及油红 O 脂滴光密度

Figure 3 The oil red O staining and optical density of oil red O lipid droplets in mouse liver

2.4 肝脏炎症因子水平变化 ELISA 检测小鼠肝脏相关炎症因子水平显示, 无论是 WT 小鼠还是 CNPY2 KO 小鼠, MOD 组 TNF- α 和 IL-6 表达水平较 CON 组均显著升高 (WT: $t=-25.179、-21.043$, P 均 <0.001 ; CNPY2 KO: $t=-18.878、-21.840$, P 均 <0.001), MOD+EX 组 TNF- α 和 IL-6 表达水平较 MOD 组显著降低 (WT: $t=14.113、11.289$, P 均 <0.001 ; CNPY2 KO: $t=16.683、16.805$, P 均 <0.001)。相较于 WT 小鼠, CNPY2 KO 小鼠 TNF- α 和 IL-6 表达水平均显著降低 ($t=4.778、5.838、11.950、6.673$, $P=0.003、=0.002、<0.001、=0.001$)。见图 5。

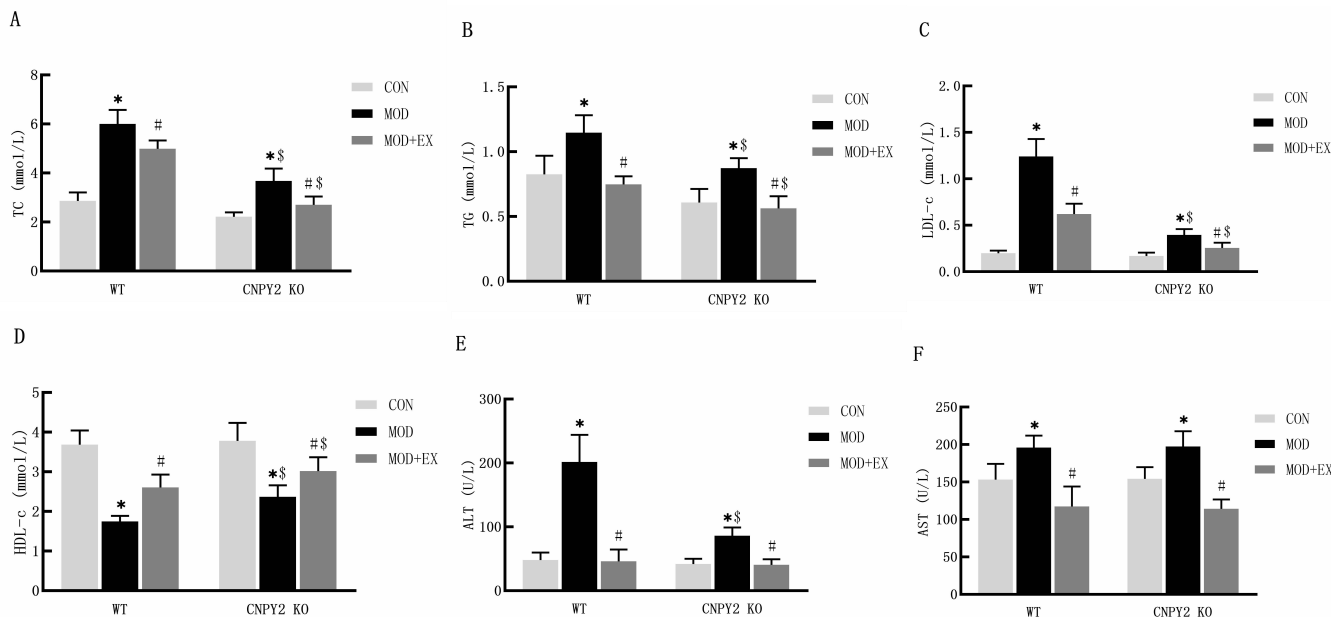
2.5 肝脏 CNPY2、p-I κ B α /I κ B α 和 p-NF- κ B/NF- κ B

蛋白相对表达水平变化 Western Blot 检测肝脏相关蛋白表达水平显示, 在 WT 小鼠内, MOD 组肝脏 CNPY2 表达较 CON 组显著升高 ($t=-5.730$, $P=0.001$), MOD+EX 组 CNPY2 表达量较 CON 组显著降低 ($t=3.714$, $P=0.010$); 在 CNPY2 KO 小鼠内, 各组小鼠肝脏 CNPY2 表达量极少, 且各组间对比不具有显著性差异 ($t=0.838$, $P=0.434$; $t=-0.541$, $P=0.608$)。见图 6。

无论是 WT 小鼠还是 CNPY2 KO 小鼠, MOD 组相较于 CON 组 p-I κ B α /I κ B α 和 p-NF- κ B/NF- κ B 表达量均显著升高 (WT: $t=-9.177、-12.207$, P 均 <0.001 ; CNPY2 KO: $t=-14.033、-12.511$, P 均 <0.001), MOD+EX 组较 MOD 组 p-I κ B α /I κ B α 和 p-NF- κ B/NF- κ B

NF- κ B 表达量均显著降低 (WT: $t=6.063, 7.676, P=0.001, <0.001$; CNPY2 KO: $t=10.363, 5.873, P<0.001, =0.001$)。与 WT 小鼠相比, CNPY2 KO 小鼠 p-I κ B α /

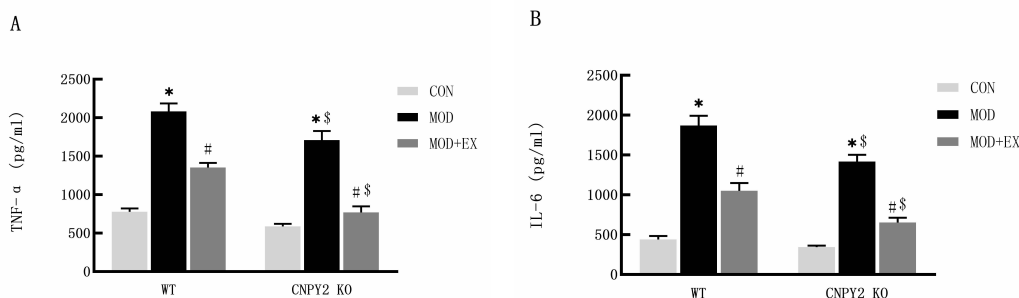
I κ B α 和 p-NF- κ B/NF- κ B 表达量均显著降低 ($t=5.417, 5.456, 4.673, 5.666, P=0.006, 0.006, 0.010, 0.005$)。见图 6。



注:A 为血清 TC 水平;B 为血清 TG 水平;C 为血清 LDL-c 水平;D 为血清 HDL-c 水平;E 为血清 ALT 水平;F 为血清 AST 水平。

图 4 小鼠血液生化指标($\bar{x} \pm s, n=6 \sim 7$)

Figure 4 Blood biochemical parameters in mice ($\bar{x} \pm s, n=6 \sim 7$)



注:A 为肝脏 TNF- α 水平;B 为肝脏 IL-6 水平。

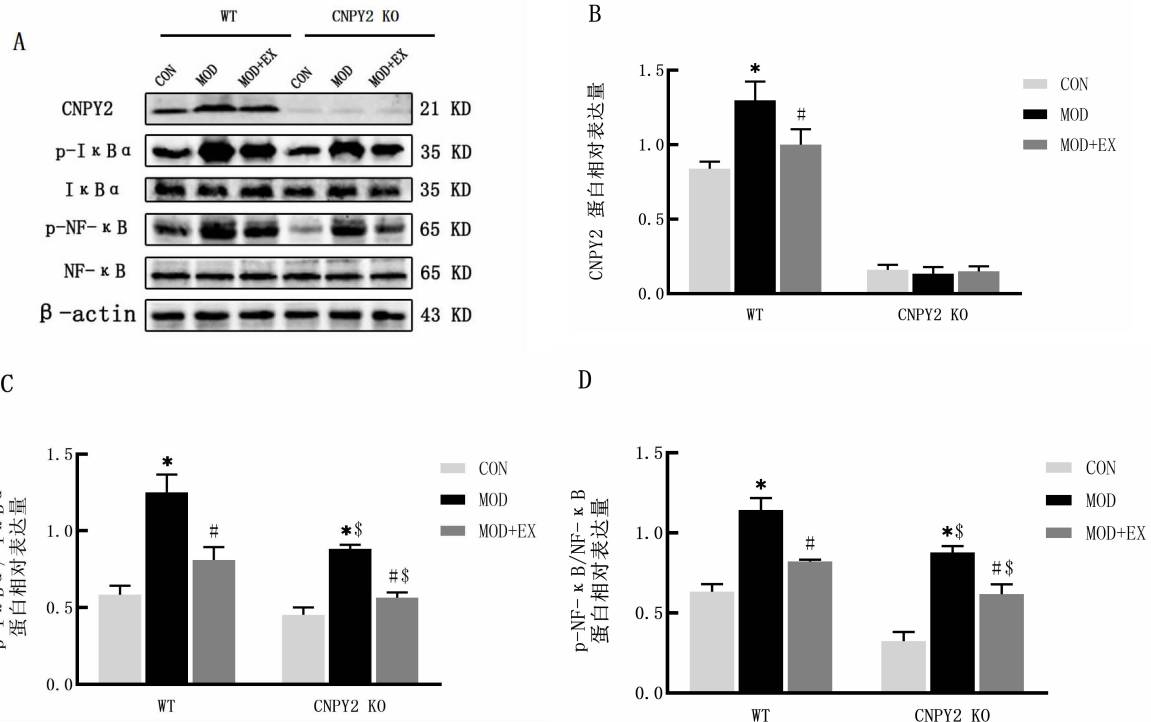
图 5 小鼠肝脏炎症因子表达水平($\bar{x} \pm s, n=6 \sim 7$)

Figure 5 Expression levels of inflammatory factors in mouse liver ($\bar{x} \pm s, n=6 \sim 7$)

2.6 肝脏 NF- κ B mRNA、TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA 相对表达水平变化 qRT-PCR 法检测肝脏相关 mRNA 表达水平显示, 无论是 WT 小鼠还是 CNPY2 KO 小鼠, MOD 组相较于 CON 组 pNF- κ B mRNA、TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA 表达量均显著升高(WT: $t=-5.205, -6.910, -4.802, P=0.002, <0.001, =0.003$; CNPY2 KO: $t=-6.870, -9.546, -8.303, P$ 均 <0.001), MOD+EX 组较 MOD 组 NF- κ B mRNA、TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA 表达量均显著降低 (WT: $t=5.963, 3.187, 3.261, P=0.001, 0.019, 0.017$; CNPY2 KO: $t=6.469, 7.197, 6.180, P=0.001, <0.001, =0.001$)。与 WT 小鼠相比, CNPY2 KO 小鼠上述各指标表达量均显著降低 ($t=3.467, 3.393, 3.421, 4.424, 3.579, 3.135, P=0.026, 0.028, 0.027, 0.012, 0.023, 0.035$)。见图 7。

3 讨论

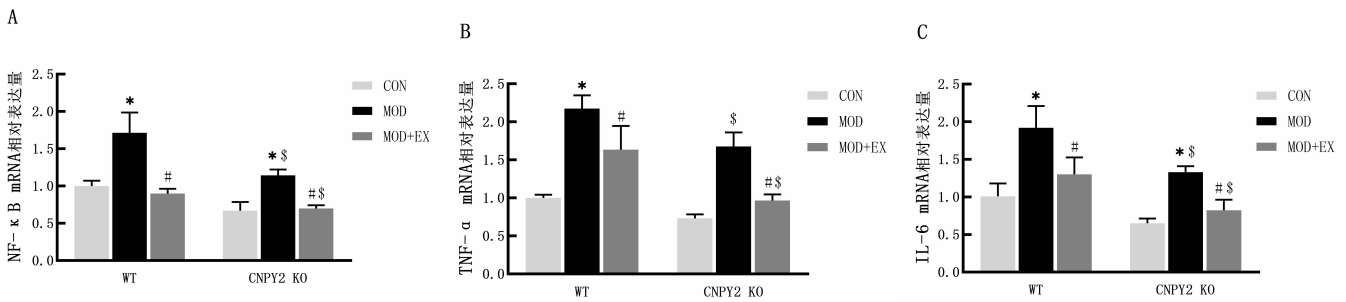
高脂膳食建立 NAFLD 小鼠模型是当今最为常见的一种 NAFLD 模型造模方式, 尽管其造模时间较长, 但其与人类 NAFLD 发病过程相似且发病率稳定^[15]。目前多项研究已经证明了运动训练在改善 NAFLD 方面存在有益作用, 但运动如何在分子水平上影响肝脏尚不清楚。肝脏脂肪的异常堆积会导致脂质代谢问题, 并产生慢性炎症, 促使肝脏单纯脂肪变性向 NASH 转化, 甚至可能导致肝细胞癌的发生和发展^[16-17]。有氧运动可有效改善高脂膳食诱导的肝脏脂质代谢紊乱^[18], 抑制趋化因子和黏附分子, 减少肝脏炎症巨噬细胞浸润, 减轻 NAFLD^[19]。此外, 有研究表明有氧运动可以通过降低炎症因子的表达来改善肝脏炎症^[20]。



注:A 为各蛋白表达水平;B 为肝脏 CNPY2 蛋白相对表达水平;C 为肝脏 p-IκBα/IκBα 蛋白相对表达水平;D 为肝脏 p-NF-κB/NF-κB 蛋白相对表达水平。

图 6 小鼠肝脏 CNPY2、p-IκBα/IκBα 和 p-NF-κB/NF-κB 蛋白相对表达水平($\bar{x} \pm s, n=6 \sim 7$)

Figure 6 The relative protein expression levels of CNPY2, p-IκBα/IκBα and p-NF-κB/NF-κB in mouse liver ($\bar{x} \pm s, n=6 \sim 7$)



注:A 为肝脏 NF-κB mRNA 表达水平;B 为肝脏 TNF-α mRNA 表达水平;C 为肝脏 IL-6 mRNA 表达水平。

图 7 小鼠肝脏 NF-κB mRNA、TNF-α mRNA 和 IL-6 mRNA 相对表达水平($\bar{x} \pm s, n=6 \sim 7$)

Figure 7 The relative expression levels of NF-κB mRNA, TNF-α mRNA, and IL-6 mRNA in mouse liver ($\bar{x} \pm s, n=6 \sim 7$)

CNPY2 是一种新型促血管生成分泌因子,越来越多的研究指出其在健康和疾病中发挥着重要作用^[21],尤其是 CNPY2 在代谢性疾病中发挥的作用逐渐得到关注。有研究通过 10 周高脂膳食喂养成功建立 NAFLD 小鼠模型,通过对比发现 CNPY2 基因缺失改善了 NAFLD 小鼠脂代谢紊乱,并延缓了 NAFLD 进程,指出 CNPY2 缺失阻断 PERK-CHOP 通路,对肝细胞受到 UPR 介导的肝细胞损伤和脂肪变性具有保护作用^[10]。另一项研究发现 CNPY2 在高 TC 倾向性的 ApoE 基因敲除鼠中高度表达,注射外源性 CNPY2 引起了机体代谢紊乱,加剧了动脉粥样硬化的发病进程^[22],这些研究都表明 CNPY2 与脂代谢密切相关。本实验发现 MOD 组小鼠肝细胞形态异常,肝细胞肿胀,肝索排列紊乱,出现脂肪空泡,脂滴数量增加,血

清 TC、TG、ALT、AST 和 LDL-C 水平升高,HDL-C 水平降低,相较于 WT 小鼠,CNPY2 KO 小鼠肝细胞形态结构改善,脂滴数量减少,TC、TG、ALT 和 LDL-C 水平降低,HDL-C 水平上升,另外 8 周的有氧运动训练同样改善了肝细胞形态结构,减少了脂滴数量,降低了 TC、TG、ALT、AST 和 LDL-C 水平,升高了 HDL-C 水平,提示 CNPY2 缺失和有氧运动可有效改善高脂膳食诱导的 NAFLD,调节肝脏脂代谢,保护肝细胞功能。

NF-κB 信号通路作为经典的炎症信号通路,可通过炎症因子的转录介导肝脏炎症,而炎症因子又可再度激活 NF-κB 信号通路,形成慢性炎症的恶性循环^[6]。研究发现 NF-κB 信号通路在 NAFLD 小鼠^[23]肝脏中持续激活。近期一项研究表明,CNPY2 的过表达

显著激活了 NSCLC 中 NF- κ B 信号通路^[1],提示 CNPY2 与 NF- κ B 信号通路密切相关。目前关于 CNPY2 与 NAFLD 联系报道较少,在 NAFLD 中,有氧运动能够抑制 CNPY2-PERK 信号通路改善 NAFLD^[12],其中,CNPY2 是关键启动子^[10]。在本研究中,我们发现高脂膳食诱导 WT 小鼠肝脏 CNPY2 表达增加,NF- κ B 信号通路上调,肝脏炎症因子 TNF- α 和 IL-6 表达水平升高,而 8 周的有氧运动训练降低了 CNPY2 表达,抑制了 NF- κ B 信号通路,肝脏炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的表达水平降低。本实验利用基因编辑技术敲除小鼠 CNPY2 基因,以进一步研究 CNPY2 的功能。最后,研究结果显示 NF- κ B 信号通路表达水平下调,肝脏中炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的表达水平显著降低,肝细胞形态结构改善,脂滴数量减少,表明 CNPY2 缺失改善了肝脏炎症,有效减缓了 NAFLD 的发病进程。

综上所述,CNPY2 通过调控信号通路参与 NAFLD 的形成与发展。有氧运动和 CNPY2 缺失均对改善 NAFLD 存在有益作用,其机制可能为 CNPY2 表达下调,抑制 NF- κ B 信号通路,从而减少炎症因子的转录,减轻肝脏炎症,最终改善 NAFLD。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Younossi Z, Tacke F, Arrese M, et al. Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Hepatology*, 2019, 69(6): 2672-2682.
- [2] Zhou JH, Zhou F, Wang WX, et al. Epidemiological features of NAFLD from 1999 to 2018 in China [J]. *Hepatology*, 2020, 71(5): 1851-1864.
- [3] Powell EE, Wong VWS, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Lancet*, 2021, 397(10290): 2212-2224.
- [4] Huang DQ, El-Serag HB, Loomba R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 18(4): 223-238.
- [5] Li M, Wang HM, Zhang XJ, et al. NAFLD: an emerging causal factor for cardiovascular disease [J]. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 2023, 38(6): 921-937.
- [6] Capece D, Verzella D, Flati I, et al. NF- κ B: blending metabolism, immunity, and inflammation [J]. *Trends in Immunology*, 2022, 43(9): 757-775.
- [7] Priester J, Dreute J, Kracht M, et al. Post-Transcriptional control of mRNA metabolism and protein secretion: the third level of regulation within the NF- κ B system[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(9): 2108.
- [8] Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity [J]. *Annual Review of Immunology*, 2000, 18: 621-663.
- [9] Hatta K, Guo J, Ludke A, et al. Expression of CNPY2 in mouse tissues: quantification and localization [J]. *PLOS One*, 2014, 9(11): e111370.
- [10] Hong F, Liu B, Wu BX, et al. CNPY2 is a key initiator of the PERK-CHOP pathway of the unfolded protein response [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2017, 24(10): 834-839.
- [11] Yu D, Qin Y, Jun-Qiang L, et al. CNPY2 enhances resistance to apoptosis induced by cisplatin via activation of NF- κ B pathway in human non-small cell lung cancer [J]. *Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2018, 103: 1658-1663.
- [12] Li JH, Huang L, Xiong W, et al. Aerobic exercise improves non-alcoholic fatty liver disease by down-regulating the protein expression of the CNPY2-PERK pathway [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2022, 603: 35-40.
- [13] Guo YQ, Wu Q, Wu YT, et al. Effect of lycium barbarum polysaccharide and aerobic exercise on rats with non-alcoholic fatty liver disease and its mechanism [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University(Medical Science)*, 2020, 40(1): 30-36.
- [14] Marques CMM, 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.
- [15] Gallage S, Avila JEB, Ramadori P, et al. A researcher's guide to preclinical mouse NASH models [J]. *Nat Metab*, 2022, 4(12): 1632-1649.
- [16] Fourman LT, Stanley TL, Zheng I, et al. Clinical predictors of liver fibrosis presence and progression in human immunodeficiency Virus-Associated nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2021, 72(12): 2087-2094.
- [17] Filali-Mouneef Y, Hunter C, Rocco F, et al. The m é nage à trois of autophagy, lipid droplets and liver disease[J]. *Autophagy*, 2022, 18(1): 50-72.
- [18] Li H, Dun YS, Zhang WL, et al. Exercise improves lipid droplet metabolism disorder through activation of AMPK-mediated lipophagy in NAFLD[J]. *Life Sciences*, 2021, 273: 119314.
- [19] Callegari I, Rocha GZ, Oliveira APE, et al. And disease treatment: the role of macrophages [J]. *Frontiers in Physiology*, 2023, 14: 1061353.
- [20] Simoes e silva LL, Santos de Sousa Fernandes M, Kubrusly MS, et al. Effects of aerobic exercise protocol on genes related to insulin resistance and inflammation in the pancreas of ob/ob mice with NAFLD [J]. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 2020, 13: 223-234.
- [21] Chen KQ, Zhang YQ, Wang ZB, et al. Progress in research on CNPY2 in diseases [J]. *Mini - Reviews in Medicinal Chemistry*, 2024, 24(4): 391-402.
- [22] Huang H, Tang N, Li Y, et al. The role of CNPY2 in endothelial injury and inflammation during the progress of atherosclerosis [J]. *Journal of Molecular Histology*, 2023, 54(3): 195-205.
- [23] Ding Y, Xu XL, Meng BY, et al. Myeloid-derived growth factor alleviates non-alcoholic fatty liver disease alleviates in a manner involving IKK β /NF- κ B signaling [J]. *Cell Death & Disease*, 2023, 14(6): 376.

收稿日期:2023-10-06