

读书报告

陈延娜

2018年04月14日



Obesity Research & Clinical Practice (2017) xxx, xxx–xxx



ELSEVIER

ORIGINAL ARTICLE

Aerobic endurance training improves nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) features via miR-33 dependent autophagy induction in high fat diet fed mice



目录

01 研究背景

02 材料方法

03 实验结果

04 结论分析



1



研究背景



研究背景

由于生活方式的改变，肥胖和与肥胖症相关的并发症如胰岛素抵抗、II型糖尿病和非酒精型脂肪肝等疾病引起了全球健康问题。开展规律运动可以对抗肥胖症的代谢并发症，但分子机制尚不清楚。先前的研究揭示高葡萄糖可以诱导固醇调节元件结合蛋白1（SREBP1）表达来增加肾小管细胞中的脂滴集聚。SREBP1主要调控脂肪生成基因如脂肪酸合成酶（FAS）和乙酰辅酶A羧化酶（ACC）。

研究背景

研究表明：小分子RNA（如miR-33）可以降低脂肪生成基因的表达；自噬作为细胞稳态机制可以清除脂滴，肝脏自噬诱导可能是肝脏异常的常规治疗方法。

已知miRNA靶向自噬相关基因调节他们的活性，尽管越来越多的研究表明miRNA调节自噬，但他们的靶基因和自噬途径中的精确作用尚不清楚。本文通过关注miR-33的表达和自噬途径诱导研究高脂饲喂小鼠后运动训练降脂效应的分子机制。

自噬定义

- 自噬（autophagy）是一个吞噬自身**细胞质蛋白或细胞器**并使其包被进入囊泡，并与溶酶体融合形成自噬溶酶体，**降解其所包裹的内容物**的过程，借此实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新。

自噬溶酶体的作用

➤ 自噬性溶酶体的作用底物是内源性的，即来自细胞内的衰老和崩解的**细胞器**或**局部细胞质**等。它们由单层膜包围，内部常含有尚未分解的内质网、线粒体和高尔基复合体或**脂类**、**糖原**等。正常细胞中的自噬性溶酶体在消化、分解、自然更替一些细胞内的结构上起着重要作用。当细胞受到药物作用、射线照射和机械损伤时，其数量明显地增多。在病变的细胞中也常可见到自噬性溶酶体。



2



材料与amp;方法



材料与amp;方法

24
只
小
鼠

正常投喂 (NC) (n=8, 13周)

高脂投喂 (HFD) (n=8, 13周)

高脂投喂+持续耐力训练
(HFD+CET) (n=8, 13+10周)

材料与amp;方法

miR-33转染细胞

油红o浸染HepG2细胞

血样生化分析

实时荧光定量

Western blot analysis

实验结果1

Table 1 Clinical and biochemical characteristics of the study participants. The data presented as mean \pm SD. FBS: fasting blood sugar NC: normal chow diet, HFD: high fat diet, CET: continues endurance training.

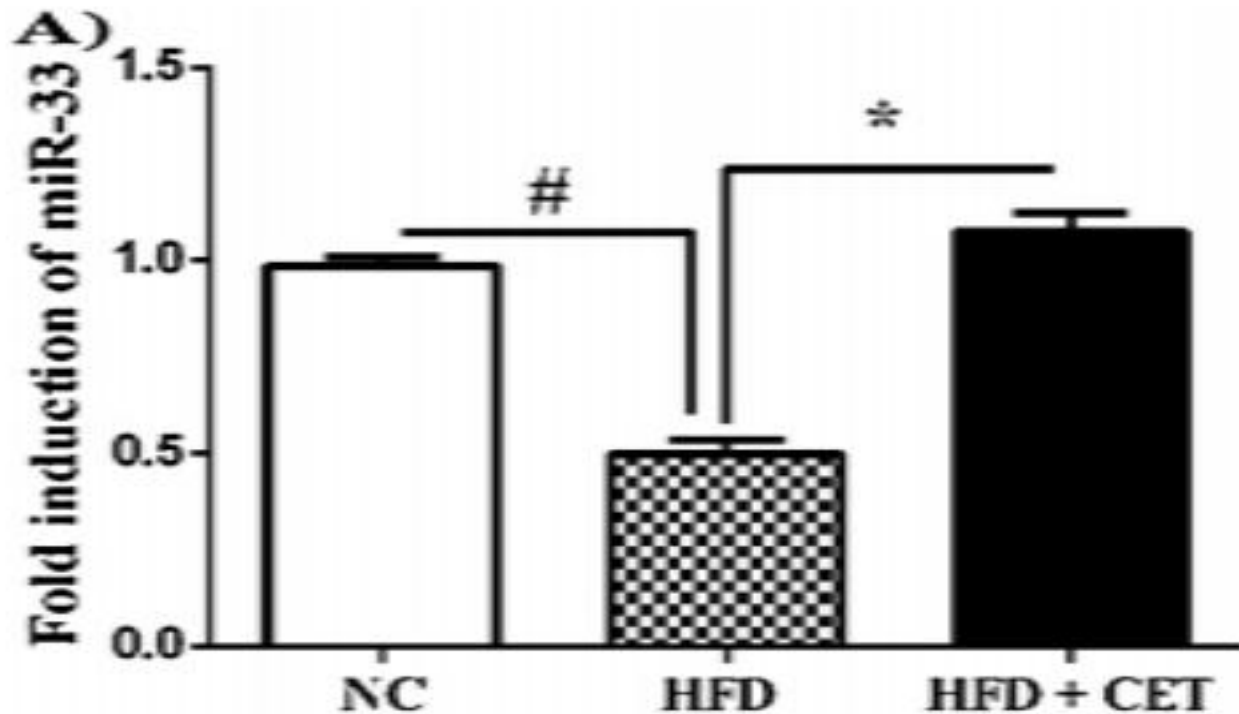
Variable	Normal chow	HFD	HFD + CET
Body weight (gr)	24 \pm 2.1	46 \pm 3.4 [*]	34 \pm 3.2 ^{*,#}
FBS (mg/dl)	76.2 \pm 6.4	131.1 \pm 9.8 [*]	94 \pm 8.4 ^{*,#}
Triglyceride (mg/dl)	66.67 \pm 9.3	216 \pm 10.7 [*]	123 \pm 12.6 ^{*,#}
Cholesterol (mg/dl)	131 \pm 12.5	197 \pm 9.7 [*]	159 \pm 8.2 ^{*,#}
AST (IU/L)	33 \pm 5.8	88.3 \pm 6.7 [*]	51 \pm 3.8 ^{*,#}
ALT (IU/L)	21.4 \pm 4.7	56.7 \pm 4.5 [*]	33 \pm 3.1 ^{*,#}

^{*} Significant differences between normal chow diet and high fat diet.

[#] Significant differences between HFD and HFD + CET $p < 0.05$, $n = 8$.

- HFD +CET组体重明显降低。
- 高脂肪投喂增加空腹血糖、甘油三酯、胆固醇水平而训练显著减少血清FBS、甘油三酯和胆固醇含量
- 高脂投喂显着增加转氨酶的水平，同时运动改善了这种现象。

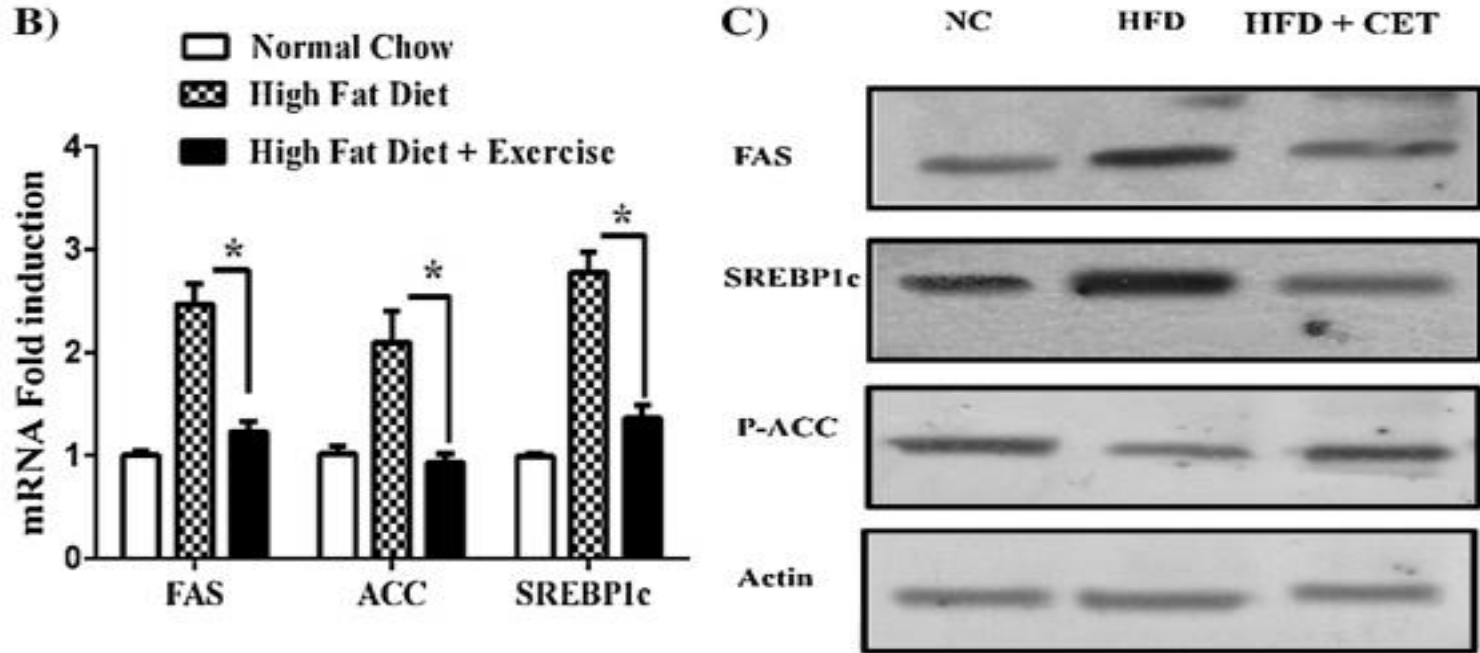
实验结果2 运动训增强了高脂小鼠miR-33的表达



为了解决运动对脂代谢的有益作用的分子机制，对miR-33的表达量进行了分析，结果表明HFD降低miR-33表达而锻炼显著恢复miR-33表达（ $p < 0.05$ ）。

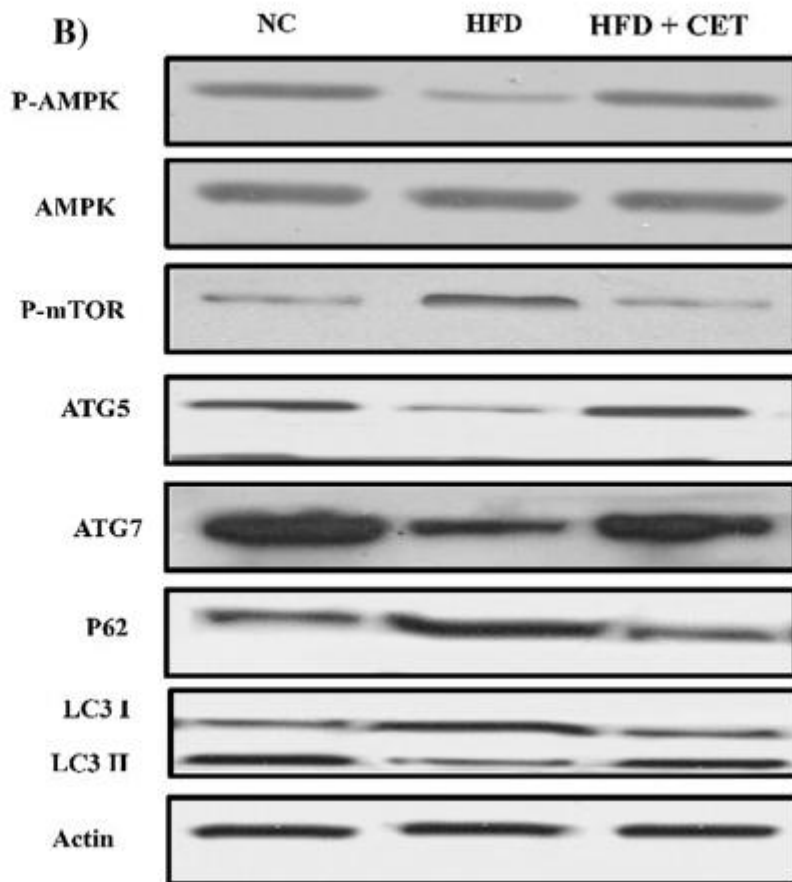
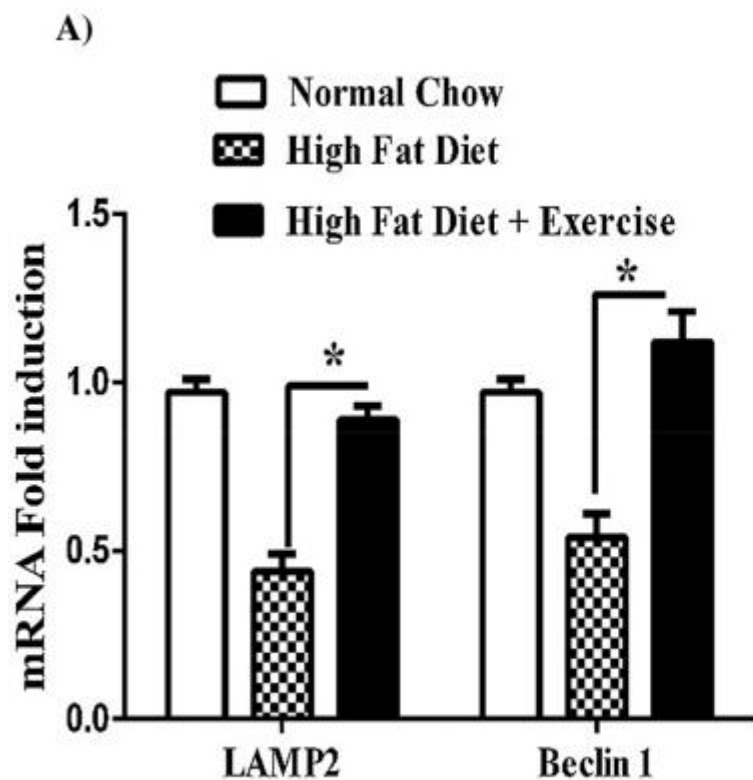
实验结果3

运动训练通过减少SREBP1c的表达来降低脂肪的生成



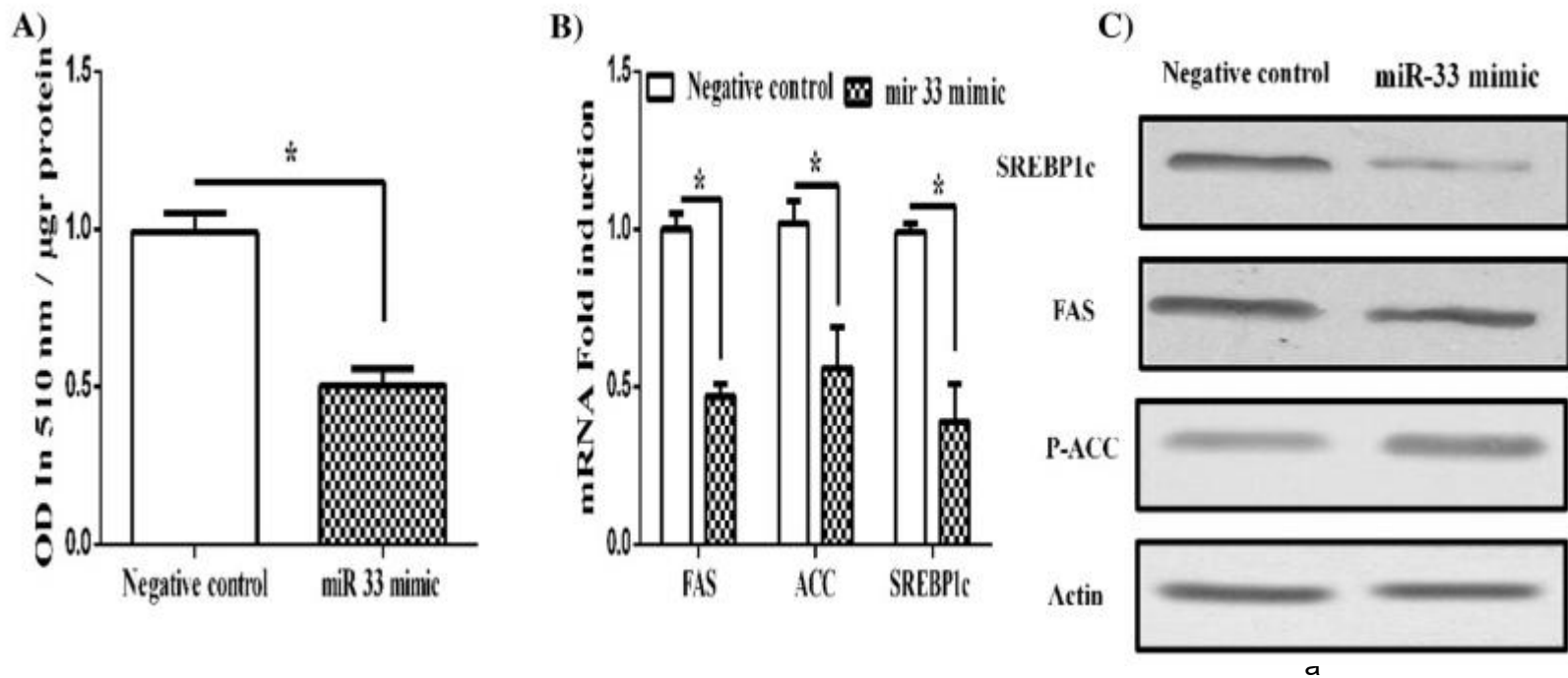
数据显示，高脂投喂诱导了SREBP1c和靶基因（FAS和ACC）蛋白和mRNA的表达，运动训练促进了SREBP1c和其他脂肪合成基因（FAS和ACC）的表达。

实验结果4 运动训练对高脂小鼠肝细胞自噬通路的诱导



为了在分子水平上显示运动训练对肝脏脂肪生成和NAFLD进展的预防作用，我们研究了小鼠肝细胞自噬途径的关键中间子从而确定运动训练诱导高脂饮食小鼠的自噬作用。

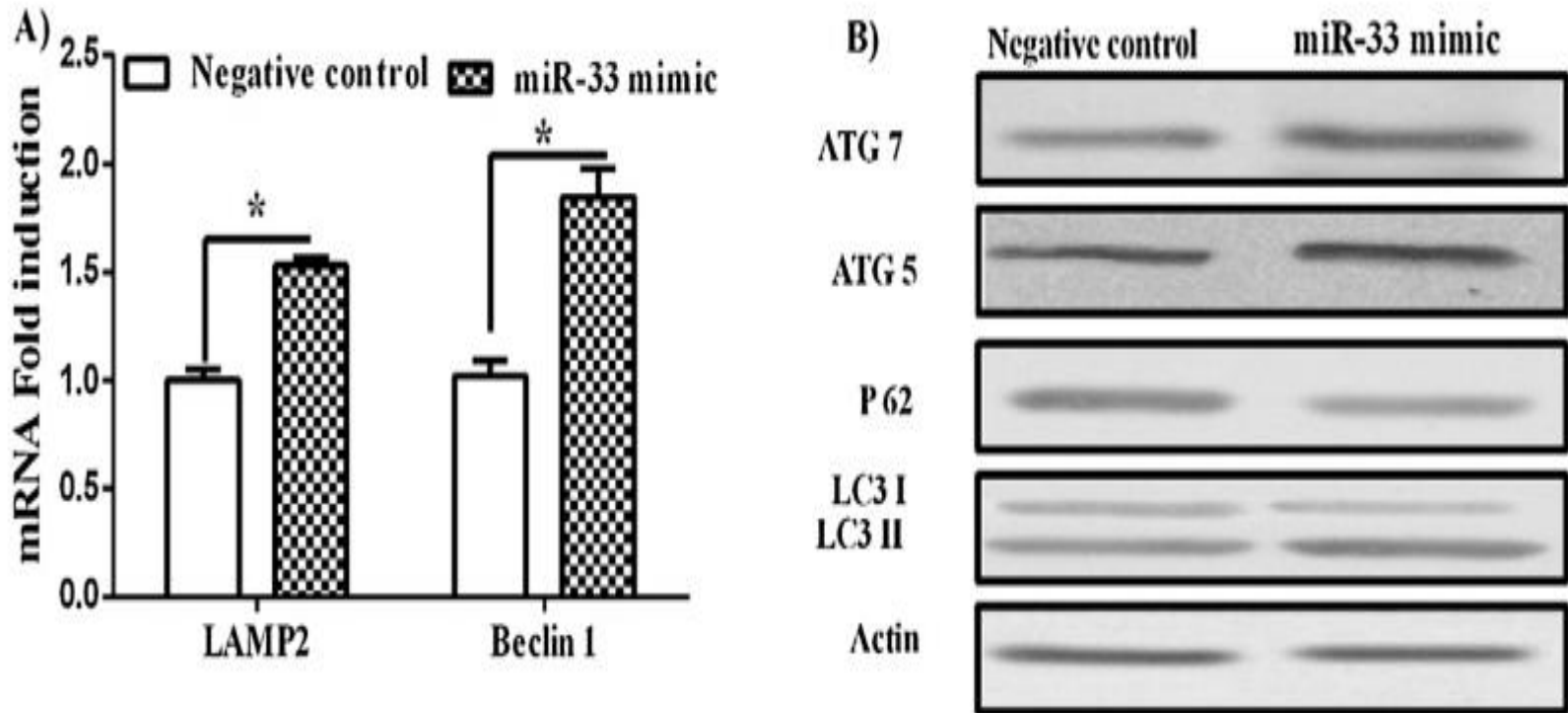
实验结果5 miR-33转染HepG2细胞减少了脂肪的生成



为了阐明运动降脂作用中miR-33的重要性，直接用miR-33模拟序列转染HepG2细胞

实验结果6

miR-33增强细胞的自噬作用

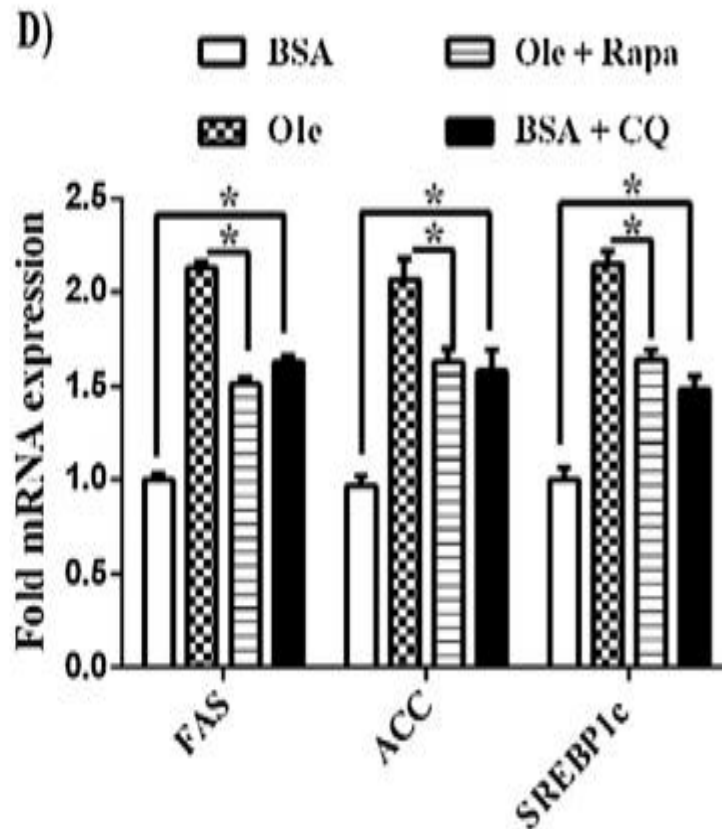
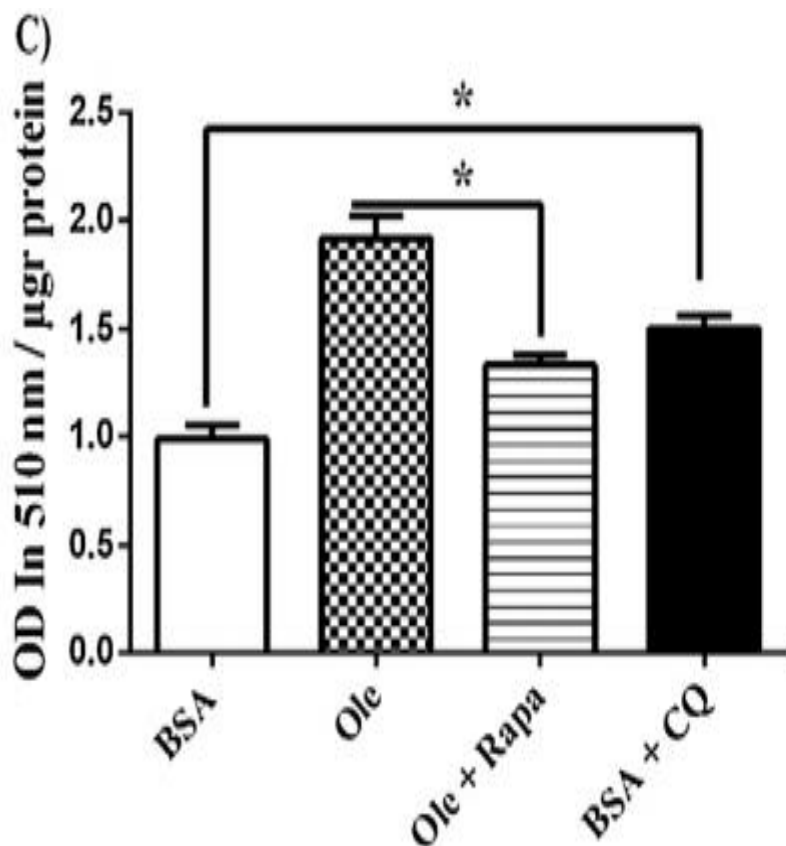


为了验证miR-33诱导自噬，研究了与自噬相关的基因及蛋白的表达

LAMP2: 自噬体膜蛋白, Beclin1: 参与自噬体的形成, 调节自噬
ATG5、ATG7、P62: 自噬相关蛋白参与自噬调节, 但P62与自噬负相关
LC3 I、LC3 II自噬标志物

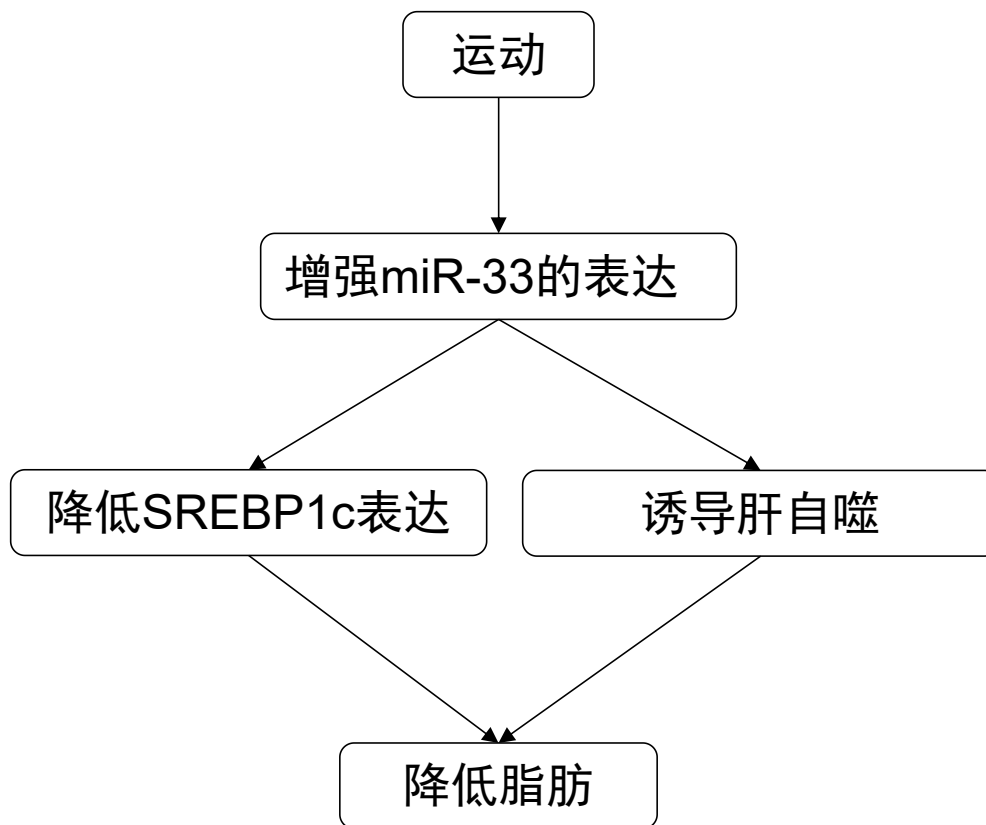
实验结果7

用化学剂诱导自噬减少了HepG2细胞中脂肪的生成

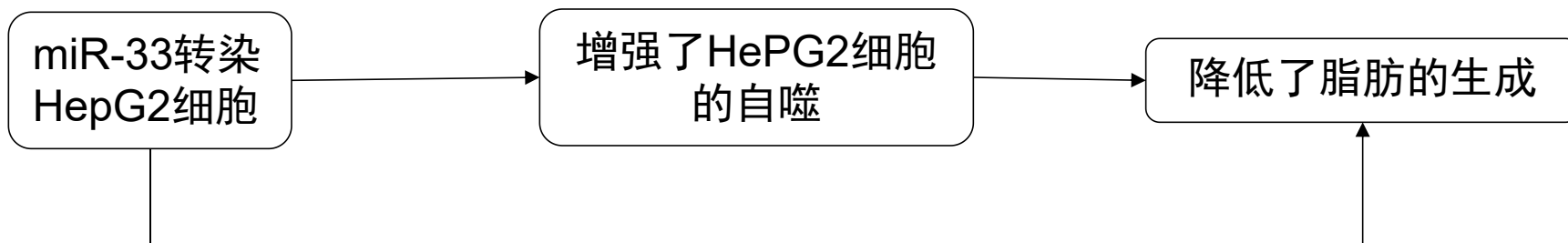


为了直接阐明自噬在降脂效应重要性，用雷帕霉素及氯喹处理细胞，结果如图所示，证明miR-33诱导的自噬可能是运动降脂的分子机制。

活体实验结论



细胞实验结论



启示

- 通过活体与细胞实验，充分解释了运动训练、miRNA和自噬诱导改善脂肪肝的作用机制
- 研究问题既有深度又有广度，如从基因水平、蛋白质水平及生化指标等方面阐明了运动训练缓解脂肪肝疾病的机制
- 对于研究miR-33调节脂质代谢的深入机理提供了参考



THANKS
