

分类号：
学号：20212014026

密级：
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



miR-454-3p 抑制 JARID2 促进非酒精性脂肪肝 发生发展的作用及机制研究

学位申请人	潘紫妍
指导教师	张君 教授 张婷 副教授
申请学位门类级别	医学硕士
学科、专业名称	免疫学
研究方向	肥胖相关代谢性疾病
所在学院	医学院

中国·新疆·石河子
2024年5月

分类号：
学号：20212014026

密级：
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



miR-454-3p 抑制 JARID2 促进非酒精性脂肪肝 发生发展的作用及机制研究

学位申请人	潘紫妍
指导教师	张君教授
	张婷 副教授
申请学位门类级别	医学硕士
学科、专业名称	免疫学
研究方向	肥胖相关代谢性疾病
所在学院	医学院

中国·新疆·石河子
2024年5月

**MiR-454-3p promotes NAFLD progression via suppressing
JARID2**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Pan Ziyan

(Immunology)

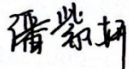
Dissertation Supervisor: Prof. Zhang Jun. Zhang Ting

May, 2024

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

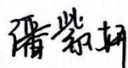
学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名： 时间：2024年5月9日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名： 时间：2024年5月9日

导师签名： 张婷 时间：2024年5月9日

摘要

目的:

本研究在构建动物模型和细胞脂代谢紊乱模型的基础上,明确 JARID2 在代谢功能障碍相关脂肪变性肝病 (metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD) 发生发展过程中的作用,并阐明 miR-454-3p 是否通过抑制 JARID2 促进 MASLD 的发生发展,为 MASLD 诊断和治疗提供新的分子靶标。

方法:

1. 人体血清样本实验:

收集正常受试个体 (n=21) 及 MASLD 受试个体 (n=21) 血清; ELISA 法检测受试个体血清油酸 (Oil Acid, OA) 和棕榈酸 (Palmitic Acid, PA) 含量; 实时定量 PCR (Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR) 检测受试个体血清中 miR-454-3p 含量。分析两组受试个体 OA、PA 及 miR-454-3p 含量的差异。

2. 体内动物实验:

(1) 模型构建: 构建 MASLD 小鼠及对照模型, 分别使用高脂饮食 (High Fat Diet, HFD n=6) 和普通饮食 (Normal Chow Diet, ND n=6) 饲养雄性 C57BL/6 小鼠 18 周; 试剂盒检测小鼠血清及肝脏中的甘油三酯 (Triglyceride, TG)、胆固醇 (Cholesterol, CHO) 含量, 油红 O 染色检测小鼠肝脏脂质积累情况, H&E 染色检测小鼠肝脏病理情况, Masson 和天狼星红染色检测小鼠肝脏胶原沉积情况, 以评价 MASLD 小鼠模型构建成功;

(2) 动物分组及处理: 小鼠经高脂饮食喂养后, 分为 NC 组 (n=6, 尾静脉注射 AAV8-GP-1-NC, 1×10^{11} V.G/mL)、mimic 组 (n=6, 尾静脉注射 AAV8-GP-1-hsa-miR-454-3p mimics, 1×10^{11} V.G/mL)、mimic+sponge 组 (n=6, 尾静脉注射 AAV8-GP-1-hsa-miR-454-3p mimics, 2 周后注射 AAV8-GP-1-hsa-miR-454-3p sponge, 1×10^{11} V.G/mL); 活体成像验证腺相关病毒是否在小鼠肝脏富集;

(3) 检测指标及方法: 蛋白免疫印迹 (Western blot, WB) 技术检测模型小鼠心脏、肝脏、脾、肺、肾、脑、骨骼肌中的 JARID2 表达量, 以及小鼠肝脏组织中脂质合成因子 PPAR γ 、Fasn、LxR、SREBP1 的表达水平; 试剂盒检测小鼠血清及肝脏中的 TG、CHO 含量; 油红 O 染色检测小鼠肝脏脂质积累情况、H&E 染色检测小鼠肝脏病理变化、Masson 和天狼星红染色检测小鼠肝脏胶原沉积情况; 葡萄糖耐量试验 (Intraperitoneal Glucose Tolerance Trial, IPGTT) 和胰岛素耐量试验 (Insulin Tolerance Test, ITT) 评价小鼠葡萄糖耐受能力及胰岛素敏感性。

3. 体外细胞实验:

(1) 细胞培养及分组：体外培养人肝癌细胞系 HepG2 和 HuH-7，以及人胚胎肾细胞 HEK-293T；HepG2 和 HuH-7 细胞均进行如下处理：油酸和棕榈酸（OA：PA=2：1 混合）混合液处理（100 μ M, 24 h）；混合液处理的同时，分别下调或过表达 JARID2；混合液处理的同时，分别下调或过表达 miR-454-3p；混合液处理，同时过表达 miR-454-3p 和上调 JARID2；

(2) 检测指标：油红 O 染色检测肝细胞内脂质积累情况，试剂盒检测细胞内 TG、CHO 含量，qRT-PCR 和 WB 检测细胞中 JARID2 和 miR-454-3p 的表达情况；

(3) 生物信息学预测及验证：在线数据库 MIRDB、MR-microT、TargetScan 筛选调控 JARID2 的 miRNAs；Targetscan 数据库预测 miR-454-3p 与 JARID2 的结合位点；在 HEK-293T 细胞中利用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-454-3p 与 JARID2 之间的调控关系。

4. 统计学方法：

使用 SPSS 26.0 (IBM SPSS Statistics version 26) 进行统计分析。两组之间比较，数据服从正态分布用 *t* 检验分析，非正态分布用非参数秩和检验，三组及以上使用单因素方差分析，相关性数据分析采用 Pearson 相关评价。 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

结果：

1. MASLD 患者血清中油酸棕榈酸含量升高，miR-454-3p 的表达水平增加

与正常受试个体相比，MASLD 受试个体的体重、BMI、腰围、FPG、TG、TC、LDL-C、HDL-C 均增加；与正常受试个体相比，MASLD 受试个体血清中 OA、PA 及 miR-454-3p 的含量均显著升高，且 miR-454-3p 的含量与 OA、PA 含量呈显著正相关。以上差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2. 成功构建 MASLD 小鼠模型，且模型小鼠肝脏组织中 JARID2 表达降低

(1) HFD 喂养 18 周后，与 ND 组相比，HFD 组小鼠体重及肝脏组织重量显著增加，血清及肝脏组织中 CHO、TG 含量显著增加，小鼠葡萄糖耐量受损；HFD 小鼠肝脏组织中脂质积累、空泡样变性、以及炎症细胞浸润均显著增加。以上差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。HFD 小鼠肝脏组织中未见明显胶原沉积。以上结果提示：HFD 喂养 18 周后，小鼠处于 MASLD 到代谢功能障碍相关性脂肪性肝炎 (metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH) 阶段，但尚未进展至肝脏纤维化的阶段。

(2) WB 结果显示：ND 组小鼠肝脏组织中 JARID2 的蛋白表达水平显著高于心脏、脾、肺、肾、脑、骨骼肌、皮下脂肪组织、棕色脂肪组织；与 ND 组相比，HFD 组小鼠肝脏组织中 JARID2 的 mRNA 及蛋白表达水平显著降低；与 ND 组相比，HFD 组小鼠肝脏组织中脂质合成因子 PPAR γ 、Fasn、LxR、SREBP1 的 mRNA 表达水平显著增高。以上差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3. miR-454-3p 可靶向调控 JARID2

MIRDB、MR-microT、TargetScan 预测结果显示：脂质代谢相关 miR-454-3p 为 JARID2 的上游关键调控 miRNA；miR-454-3p 与 JARID2 存在结合位点，且结合位点序列在各物种间具有高度同源

性；双荧光素酶报告基因实验结果显示：过表达 miR-454-3p 可显著抑制 JARID2 3' UTR 荧光素酶活性值。以上差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

4. miR-454-3p 可抑制 JARID2 的表达，促进 HepG2/HuH-7 细胞内的脂质积累

(1) 与 NC 组相比，OA 和 PA 混合液处理可使 HepG2 和 HuH-7 细胞中 miR-454-3p 的表达水平增加，JARID2 的表达水平降低，细胞中脂质积累增加。以上差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

(2) 与 NC 组相比，分别过表达/抑制 miR-454-3p 后，HepG2 和 HuH-7 细胞中 JARID2 的表达水平显著减少/增加，脂质合成因子 PPAR γ 、Fasn、LxR、SREBP1 的表达水平显著增加/减少；细胞中的脂质积累被显著促进/抑制。以上差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

(3) 与 NC 组相比，分别上/下调 JARID2 后，HepG2 和 HuH-7 细胞中脂质合成因子 PPAR γ 、Fasn、LxR、SREBP1 的表达水平显著降低/升高，细胞中的脂质积累被显著抑制/促进。以上差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

(4) 与 NC 组相比，过表达 miR-454-3p 可显著抑制 HepG2 和 HuH-7 细胞中 JARID2 的表达，显著促进脂质合成因子 PPAR γ 、Fasn、LxR、SREBP1 的表达，细胞中脂质积累增加；过表达 miR-454-3p 的同时上调 JARID2 可显著逆转单独过表达 miR-454-3p 导致的上述表型。以上差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

5. 抑制 miR-454-3p 可上调 HFD 小鼠肝脏组织 JARID2 表达，并减少肝脏脂质积累

与 NC 组相比，上调 miR-454-3p 后小鼠体重、肝脏组织重量显著增加，血清及肝脏组织中 CHO、TG 含量显著增加，葡萄糖耐量及胰岛素敏感性受损；肝脏组织中 JARID2 的表达水平降低，脂质合成因子 PPAR γ 、Fasn、LxR、SREBP1 的表达水平增加；同时，与 NC 组相比，上调 miR-454-3p 后小鼠肝脏组织中脂质积累、空泡样变性、以及炎症细胞浸润均显著增多。以上差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。Masson 及天狼星红染色未见显著性差异。与单独注射 miR-454-3p 过表达腺相关病毒组相比，注射 miR-454-3p 过表达腺相关病毒的同时，给予小鼠尾静脉注射 miR-454-3p sponge 腺相关病毒，可显著逆转 miR-454-3p 过表达导致的上述表型。

结论：

肥胖状态下 miR-454-3p 含量增加，可通过抑制 JARID2 的表达促进 MASLD 的发生。

关键词：miR-454-3p; JARID2; MASLD

论文类型：A（基础研究）

Abstract

Object:

On the basis of constructing animal models and cellular lipid metabolism disorder models, this study clarifies the role of JARID2 in the occurrence and development of metabolic dysfunction associated steatotic liver disease (MASLD) and elucidates whether miR-454-3p promotes the occurrence and development of MASLD by inhibiting JARID2, can provide a new molecularly targeted site for the diagnosis and treatment of MASLD.

Method:

1. Human serum sample experiment:

Collect serum from normal individuals (n=21) and MASLD individuals (n=21). ELISA method was used to detect the serum Oil Acid (OA) and Palmitic Acid (PA) levels of the subjects. Real-time quantitative Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) was used to detect the content of miR-454-3p in the serum of the subjects. Analyze the differences in OA, PA, and miR-454-3p levels between two groups of subjects.

2. Animal experiment in vivo:

(1) Model construction: MASLD mice and control models were established. Male C57BL/6 mice were fed with high fat diet (High Fat Diet, HFD n=6) and normal diet (Normal Chow Diet, ND n=6) for 18 weeks respectively. The reagent kit detects the levels of triglycerides (TG) and cholesterol (CHO) in the serum and liver of mice, Oil red O staining was used to detect lipid accumulation in mouse liver, H&E staining was used to detect pathological changes in mouse liver. Masson and Sirius red staining were used to detect collagen deposition in mouse liver, to evaluate the successful construction of the MASLD mouse model.

(2) Animal grouping and handling: After feeding mice with a high-fat diet, they were divided into NC group (n=6, tail vein injection of AAV8-GP-1-NC, 1×10^{11} V.G/mL), mimic group (n=6, tail vein injection of AAV8-GP-1-hsa-miR-454-3p mimics, 1×10^{11} V.G/mL), and mimic+sponge group (n=6, tail vein injection of AAV8-GP-1-hsa-miR-454-3p mimics, after two weeks, tail vein injection of AAV8-GP-1-hsa-miR-454-3p sponge 1×10^{11} V.G/mL). Live imaging to verify whether adenovirus is enriched in mouse liver.

(3) Detection indicators and methods: Western blotting (WB) was used to detect the expression of JARID2 in heart, liver, spleen, lung, kidney, brain and skeletal muscle of model mice, and the expression of lipid accumulation related factors PPAR γ , Fasn, LxR and

SREBP1 mRNA in the liver of mice was detected. The contents of TG and CHO in serum and liver of mice A special reagent detection kit was used to detect the content of TG and CHO in the serum and liver of mice, and the accumulation of lipids in the liver tissue of mice was observed by the oil red O staining method, pathological changes of liver were detected by H&E staining, collagen deposition in liver was detected by Masson and Sirius red staining, glucose tolerance test (IPGTT) and insulin tolerance test (ITT) were used to evaluate glucose tolerance and insulin sensitivity.

3. Cell experiment in vitro:

(1) Cell culture and grouping: In vitro cultured human liver cancer cell lines HepG2 and HuH-7, as well as human embryonic kidney cell line HEK-293T, HepG2 and HuH-7 cells were treated with a mixture of oleic acid and palmitic acid (OA:PA=2:1 mixture, 100 μ M, 24 h). At the same time of mixed solution treatment, JARID2 was downregulated or overexpressed, respectively. During mixed solution treatment, miR-454-3p was downregulated or overexpressed, respectively. Mixed solution treatment, simultaneous overexpression of miR-454-3p and upregulation of JARID2.

(2) Detection indicators: The Oil Red O staining kit was used to detect the accumulation of lipid droplets in hepatocytes. The assay kit was used to detect the levels of TG and CHO in cells. qRT-PCR and WB were used to detect the expression of JARID2 and miR-454-3p in cells.

(3) Bioinformatics prediction and validation: Screening miRNAs regulating JARID2 through online databases such as MIRDB, MR microT, and TargetScan. Targetscan database predicts the binding site between miR-454-3p and JARID2. Verify the regulatory relationship between miR-454-3p and JARID2 in HEK-293T cells using dual luciferase reporter gene experiments.

4. Statistical methods:

Perform statistical analysis using SPSS 26.0 (IBM SPSS Statistics version 26). Comparison between two groups, data follows a normal distribution and is analyzed using *t* test. Non normal distribution is analyzed using nonparametric rank sum test. Three or more groups are analyzed using one-way ANOVA. $P < 0.05$ has statistical significance.

Results:

1. The serum palmitic acid content in MASLD patients increases, and the expression level of miR-454-3p increases

Compared with normal subjects, MASLD subjects showed an increase in body weight, BMI, waist circumference, FPG, TG, TC, LDL-C, and HDL-C. Compared with non MASLD

subjects, the serum levels of OA, PA, and miR-454-3p in MASLD subjects were significantly increased, and the content of miR-454-3p was significantly positively correlated with OA and PA levels. The above differences are statistically significant ($P < 0.05$).

2. Successfully constructed a MASLD mouse model with reduced expression of JARID2 in the liver tissue of the model mice

(1) After 18 weeks of high-fat diet feeding, compared with the normal diet group, the HFD group mice showed a significant increase in body weight and liver tissue weight, as well as a significant increase in CHO and TG content in serum and liver tissue, and a decrease in glucose tolerance. The accumulation of lipids, vacuolar degeneration, and infiltration of inflammatory cells in the liver tissue of HFD mice were significantly increased. The above differences are statistically significant ($P < 0.05$). No significant collagen deposition was observed in the liver tissue of HFD mice. The above results suggest that after 18 weeks of HFD feeding, mice are in the stage from MASLD to metabolic dysfunctional associated steatohepatitis (MASH) but have not yet progressed to the stage of liver fibrosis.

(2) The WB data indicate a ratio of the expression levels of JARID2 protein in the liver tissue of the ND group of mice was significantly higher than that in heart, spleen, lung, kidney, brain, skeletal muscle, subcutaneous adipose tissue, and brown adipose tissue. The WB data showed that the expression level of JARID2 protein in the liver tissue of the ND group was higher than that of the liver tissue of the HFD group. The above differences are statistically significant ($P < 0.05$).

3. miR-454-3p can target and regulate JARID2

The prediction results of MIRDB, MR-microT, and TargetScan showed that miR-454-3p, which is related to lipid metabolism, is a key upstream regulatory miRNA of JARID2. miR-454-3p has a binding site with JARID2, and the binding site sequence has high homology among different species. The detection of miR-454-3p mimic by double luciferase reporter assay could significantly reduce the activity of JARID2 3'UTR luciferase. All of the above data comparisons are statistically significant ($P < 0.05$).

4. miR-454-3p can inhibit the expression of JARID2 and promote lipid accumulation in HepG2/HuH-7 cells

(1) Compared with the NC group, treatment with a mixture of OA and PA increased the expression level of miR-454-3p in HepG2 and HuH-7 cells, decreased JARID2 expression level and increase the accumulation of lipids inside the cell. The above differences are statistically significant ($P < 0.05$).

(2) Compared with NC group, after overexpression/inhibition of miR-454-3p, the expression of JARID2 in HepG2 and HuH-7 cells decreased/increased significantly, the expression levels of lipid synthesis factors PPAR γ , Fasn, LxR and SREBP1 increased/decreased significantly, and lipid accumulation in cells was significantly promoted/inhibited. The above differences are statistically significant ($P < 0.05$).

(3) Compared with NC group, the expression of lipid synthesis factors PPAR γ , Fasn, LxR and SREBP1 in HepG2 and HuH-7 cells decreased/increased significantly after up/down regulation of JARID2, and lipid accumulation in cells was significantly inhibited/promoted. The above differences are statistically significant ($P < 0.05$).

(4) Compared with NC group, overexpression of miR-454-3p significantly inhibited the expression of JARID2 in HepG2 and HuH-7 cells, significantly promoted the expression of lipid synthesis factors PPAR γ , Fasn, LxR and SREBP1, and increased lipid accumulation in cells, while overexpression of miR-454-3p and up-regulation of JARID2 significantly reversed the above phenotypes induced by overexpression of miR-454-3p alone. The above differences are statistically significant ($P < 0.05$).

5. Inhibition of miR-454-3p upregulates JARID2 expression in the liver tissue of HFD mice and reduces liver lipid accumulation

Compared with NC group, the body weight and liver weight of mice increased significantly, the contents of CHO and TG in serum and liver increased significantly, Impaired glucose tolerance and insulin sensitivity, the expression level of JARID2 in liver decreased, and the expression level of lipid synthesis factors PPAR γ , Fasn, LxR and SREBP1 increased after up-regulation of miR-454-3p. At the same time, compared with NC group, lipid accumulation, vacuolar degeneration and inflammatory cell infiltration in liver tissue were significantly increased after up-regulation of miR-454-3p. The above differences are statistically significant ($P < 0.05$). Masson and Sirius Red staining showed no significant difference. Compared with the miR-454-3p overexpression adeno-associated virus group alone, miR-454-3p overexpression adeno-associated virus injection and tail vein injection of miR-454-3p adeno-associated virus in mice could significantly reverse the above phenotype caused by miR-454-3p overexpression.

Conclusion:

The increase in miR-454-3p content in obese individuals can promote the occurrence of MASLD by inhibiting the expression of JARID2.

Key words: miR-454-3p; JARID2; MASLD

Paper Type: A (Basic Research)

目录

摘要	I
Abstract	IV
目录	VIII
中英文缩略词对照表.....	XI
1 前言.....	1
2 实验材料.....	4
2.1 人体血清样本来源、实验动物及饲料.....	4
2.2 细胞系	4
2.3 miR-454-3p mimic、inhibitor、过表达质粒和腺相关病毒载体	4
2.4 实验试剂耗材	4
2.5 实验仪器	7
2.6 各种引物序列表.....	9
3 实验方法.....	10
3.1 细胞的常规培养、OA/PA 处理及脂质积累检测	10
3.1.1 完全培养基的配制方案	10
3.1.2 细胞复苏	10
3.1.3 细胞传代	10
3.1.4 细胞冻存	11
3.1.5 OA/PA 诱导 HepG2/HuH-7 细胞脂代谢紊乱	11
3.1.6 细胞转染	11
3.1.7 甘油三酯、胆固醇试剂盒检测细胞 TG、CHO 含量	12
3.1.8 油红 O 染色	13
3.2 OA/PA 的配制	13
3.3 组织与细胞 RNA 提取	14
3.3.1 细胞样本	14
3.3.2 组织样本	15
3.4 RNA 反转录.....	15
3.4.1 总 RNA 反转录.....	15
3.4.2 miRNAs 反转录.....	15
3.5 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR) ..	16
3.5.1 mRNA 的 qRT-PCR.....	16

3.5.2miRNAs 的 qRT-PCR.....	16
3.6 细胞及组织蛋白提取.....	17
3.6.1 细胞样本	17
3.6.2 组织样本	18
3.7 蛋白免疫印迹分析 (Western Blot, WB)	18
3.8 活化菌株及质粒提取.....	20
3.9 小鼠模型构建	21
3.10 小鼠肝脏组织油红 O 染色	21
3.11 小鼠肝脏组织 H&E 染色	21
3.12 小鼠肝脏组织 F4/80 免疫组化.....	22
3.13 小鼠肝脏组织天狼星红染色.....	23
3.14 小鼠肝脏组织 Masson 染色	23
3.15 小鼠血清及肝脏组织 TG、CHO 检测	24
3.15.1 小鼠血清 TG、CHO 检测.....	24
3.15.2 小鼠肝脏 TG、CHO 检测.....	24
3.16 小鼠全身葡萄糖耐量 (Intraperitoneal Glucose Tolerance Trial, IPGTT) 和胰岛素敏感性 (Insulin Tolerance Test, ITT) 实验	24
3.16.1IPGTT.....	24
3.16.2ITT.....	24
3.17 生物信息学预测上游调控基因.....	24
3.18 双荧光素酶报告基因实验.....	25
3.19 血清提 miRNAs	25
3.20ELISA 检测人体血清 OA 和 PA 含量.....	25
3.21 RIP (RNA Binding Protein Immunoprecipitation Assay, RIP)	25
3.22 统计方法	25
4 结果.....	26
4.1MASLD 患者血清中油酸棕榈酸含量升高, miR-454-3p 的表达水平增加	26
4.2 成功构建 MASLD 小鼠模型, 且模型小鼠肝脏内 JARID2 表达降低	27
4.3JARID2 受 miR-454-3p 的靶向调控	30
4.4 油酸和棕榈酸处理后, 肝细胞中 miR-454-3p 表达增加、JARID2 表达降低, 肝细胞脂代谢紊乱	32
4.5miR-454-3p 通过抑制 JARID2 的表达, 促进肝细胞脂质积累	34
4.5.1 过表达 miR-454-3p, 肝细胞内 JARID2 表达显著减少, 脂质积累增加	34
4.5.2 抑制 miR-454-3p, 肝细胞内 JARID2 表达显著增加, 脂质积累减少	37

4.5.3 上调 JARID2, 肝细胞内的脂质积累减少	40
4.5.4 下调 JARID2, 肝细胞内脂质积累增加	43
4.5.5 miR-454-3p 可通过靶向下调 JARID2, 促进肝细胞内的脂质积累	47
4.6 miR-454-3p 抑制剂可增加小鼠肝脏 JARID2 的表达, 改善肝脏中脂质积累情况	50
5 讨论	55
6 结论	58
7 综述	59
参考文献	67
致谢	78
作者简介	79

中英文缩略词对照表

缩写	英文全称	中文全称
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
CHO	Cholesterol	胆固醇
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	改良杜氏伊格尔培养基
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲基亚砷
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
Fasn	Fatty Acid Synthase	脂肪酸合酶
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
HFD	High Fat Diet	高脂饮食
IPGTT	Intraperitoneal Glucose Tolerance Trial	腹腔内注射葡萄糖耐量试验
ITT	Insulin Tolerance Test	胰岛素耐量试验
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学染色法
JARID2	Jumonji And AT-Rich Interaction Domain Containing 2	含 Jumonji 和 AT-rich 交互域 2
LxR	liver X receptor	肝 X 受体
MASLD	Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease	代谢功能障碍相关脂肪变性肝病
MASH	Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis	代谢功能障碍相关性脂肪性肝炎
ND	Normal chow Diet	普通饮食
OA	Oil Acid	油酸
PA	Palmitic Acid	棕榈酸
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
qRT-PCR	Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction	实时定量 PCR
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核苷酸
SREBP1	Sterol regulatory element-binding protein 1	固醇调节元件结合蛋白 1
TBST	Tris-buffered saline-Tween	吐温-三氨基甲烷盐溶液
TG	Triglyceride	甘油三酯
WB	Western Blot	蛋白质印迹法
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ	过氧化物酶体增殖物激活受体 γ

1 前言

非酒精性脂肪肝病 (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 现更名为代谢功能障碍相关脂肪变性肝病 (Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD) 是目前世界上最常见的慢性肝病之一^[1]。约 5%~20% 的 MASLD 患者可发展为非酒精性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 现更名为代谢功能障碍相关性脂肪性肝炎 (Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH)^[1, 2]。MASH 的组织学特征包括大泡性脂肪变性、炎症以及肝细胞膨胀等病理改变, 可进一步发展为肝脏纤维化、肝硬化或肝细胞癌^[3, 4]。流行病学资料显示, 目前 MASLD 影响了全球超过四分之一的成年人 (超过 20 亿人), 21 世纪初国内 MASLD 患病率仅为 23.8%, 但随着饮食结构及生活方式的改变, 2019 年我国 MASLD 患者已超过 3.1 亿人^[5-7]。

MASLD 的发生发展是一个复杂的、多因素的渐进过程, 早期的研究认为 MASLD 的发生是“两次打击”的结果。根据这一观点, 久坐不动、高脂肪饮食、肥胖和胰岛素抵抗等是导致肝脏脂质积累的“第一次打击”, 增加了肝脏对“第二次打击”的敏感性^[8]。上述因素的“第二次打击”又激活了组织的炎症级联反应和纤维化病理学变化, 最终导致 MASLD 的发生^[5, 8, 9]。然而, 进一步的研究发现, 这种观点过于简单化, 不能概括 MASLD 的复杂性, MASLD 的发生是多种平行因素在遗传易感群体中协同作用的结果, 因此提出了“多重打击”的假说^[10, 11]。认为 MASLD 是运动缺乏、肥胖、过量脂肪和果糖、脂肪毒性、内质网应激、氧化应激和胰岛素抵抗 (Insulin resistance, IR) 等因素共同作用的结果^[5, 12-17]。肥胖不仅在 MASLD 的形成中起重要作用, 而且也参与了 MASLD 发展为 MASH 过程。已有的研究表明, 当皮下脂肪组织中脂肪分解加速或脂肪酸摄取减少时会使循环中的游离脂肪酸 (Free fatty acids, FFAs) 过剩, 导致异位脂肪堆积 (例如, 在肝脏和骨骼肌中), 进而使得多种器官形成 IR^[18, 19]。与此同时, 胰岛素抵抗又会加速肝细胞中脂肪的从头合成, 从而进一步促进肝脏中脂肪的积累^[20]。这些研究成果表明 MASLD 的发病机制与肥胖和 IR 所引起的脂代谢紊乱密切相关^[21, 22], 然而具体的分子机制尚未完全阐明。

JARID2 是 Jumonji 蛋白家族的一员, 作为组蛋白甲基转移酶复合物的调节剂, 可影响组蛋白 H3K27^[23-25]和 H3K9^[25, 26]的甲基化, 在维持胚胎干细胞的多能性和分化方面起着至关重要的作用^[27, 28]。体内研究结果显示: *JARID2* 基因的缺失会导致严重的肝脏发育缺陷, 进一步的研究表明, *JARID2* 的 mRNA 和蛋白表达水平在 MASH 患者肝组织中显著下调 (图 1-1)^[29, 30]。以上研究提示: *JARID2* 可能在 MASLD 的发生发展过