

EVA1A 过表达通过调节脂质代谢和促进脂滴自噬改善非酒精性脂肪肝

徐嘉艺, 杨迪, 臧开来, 褚孟恩, 赵庆瑶, 李晴, 鲁森, 陈修丽, 李宁
青岛大学青岛医学院基础医学院生物化学与分子生物学系, 山东 青岛 266071

摘要:目的 研究跨膜蛋白EVA1A在肝脏脂质代谢及非酒精性脂肪肝发展过程中的作用及机制。方法 将8周龄雄性ob/ob小鼠随机分为对照组和实验组,8只/组,实验周期为7周。对照组通过尾静脉注射AAV空载体(AAV-null组),实验组注射重组载体AAV-Eva1a(AAV-Eva1a组)。在人HepG2细胞中使用慢病毒载体LV-EVA1A过表达EVA1A后,使用油酸诱导构建NAFLD细胞模型,设为实验组LV-EVA1A组,对照组为LV-Vector组。采用RT-qPCR、Western blotting、免疫荧光实验测定EVA1A、脂质代谢相关基因以及自噬相关基因的表达情况;采用HE染色、油红O染色以及血脂四项试剂盒检测肝脏、血液和细胞中的脂质积累情况;采用丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒、门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒、白细胞介素-6(IL-6)试剂盒、白细胞介素-1 β (IL-1 β)试剂盒以及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒测定炎症指标;采用透射电镜观察肝脏脂滴自噬情况。**结果** 与对照组相比,实验组小鼠肝脏和实验组细胞中EVA1A的mRNA水平和蛋白水平升高($P<0.05$),小鼠肝重和肝脏系数降低($P<0.01$),脂质沉积减少,细胞内甘油三酯(TG)含量降低($P<0.01$);小鼠血清中的总胆固醇、低密度脂蛋白-胆固醇、高密度脂蛋白-胆固醇和肝脏中的TG水平均降低($P<0.05$),血清ALT、AST的水平和炎症相关细胞因子IL-6、TNF- α 的水平均降低($P<0.05$);实验组小鼠肝脏和实验组细胞中的乙酰辅酶A羧化酶、脂肪酸转运酶、二酰基甘油酰基转移酶的表达均降低($P<0.05$),而甘油三酯脂肪酶的表达升高($P<0.05$);实验组小鼠肝脏中的脂滴自噬增强,实验组细胞中的自噬体数量增多,实验组小鼠肝脏以及细胞中p62的表达均降低($P<0.05$),LC3-II和ATG5的表达均升高($P<0.05$)。**结论** EVA1A能够改善ob/ob小鼠脂肪肝和炎症,通过抑制脂质摄取和合成相关基因的表达,促进脂质分解相关基因的表达和促进脂滴自噬来清除肝脏积累的脂质。

关键词:脂肪肝;EVA1A;炎症;脂质代谢;脂滴自噬

EVA1A overexpression improves non-alcoholic fatty liver disease in mice by regulating lipid metabolism and promoting lipophagy

XU Jiayi, YANG Di, ZANG Kailai, CHU Menggen, ZHAO Qingyao, LI Qing, LU Sen, CHEN Xiuli, LI Ning
Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Qingdao Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, China

Abstract: Objective To investigate the role of transmembrane protein EVA1A in liver lipid metabolism and development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Eight-week-old male ob/ob mice were randomized into control group injected with AAV null vector *via* the tail vein (AAV-null group) and AAV-Eva1a group injected with recombinant vector AAV-Eva1a ($n=8$). HepG2 cells transfected with the lentiviral vector LV-EVA1A or the null vector were induced with oleic acid to construct a cell model of NAFLD. The expression levels of EVA1A, lipid metabolism-related and autophagy-related genes in mouse livers were detected with RT-qPCR, Western blotting, and immunofluorescence staining, and lipid accumulation in mouse livers and blood and in the treated cells was examined with HE and Oil Red O staining and lipid detection kits. Serum levels of ALT, AST, IL-6, IL-1 β , and TNF- α of the mice were detected, and hepatic lipophagy was observed with transmission electron microscopy. **Results** The mouse livers in AAV-Eva1a group and LV-EVA1A-transfected cells showed significantly increased expression levels of EVA1A mRNA and protein. The liver weight and coefficient and lipid deposition of the mice with AAV-Eva1a injection and triglyceride (TG) content in LV-EVA1A-transfected cells were significantly decreased. The mice in AAV-Eva1a group showed significantly reduced serum total cholesterol, LDL-C, and HDL-C levels and hepatic TG levels with lowered serum levels of ALT, AST, IL-6 and TNF- α . In both mouse livers in AAV-Eva1a group and LV-EVA1A-transfected HepG2 cells, acetyl-CoA carboxylase, fatty acid transport protein, and diacylglycerol acyltransferase expressions were all

significantly decreased and adipose triglyceride lipase increased. Hepatic lipophagy, autophagosome numbers and LC3-II and ATG5 expressions were enhanced and p62 expression was lowered in the mice in AAV-Eva1a group and LV-EVA1A-transfected cells. **Conclusion** EVA1A overexpression alleviates fatty liver and inflammation in ob/ob mice by regulating lipid metabolism-related genes and enhancing lipophagy to promote clearance of accumulated hepatic lipids.

Keywords: fatty liver; EVA1A; inflammation; lipid metabolism; lipophagy

收稿日期:2025-05-22

基金项目:国家自然科学基金(82570683);山东省自然科学基金(ZR2022MC053);国家级大学生创新创业训练计划项目(202311065062)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82570683).

作者简介:徐嘉艺,在读本科生,E-mail: 2624309950@qq.com;杨迪,在读硕士研究生,E-mail: 13792651232@163.com;徐嘉艺、杨迪共同为第一作者

通信作者:李宁,副教授,硕士生导师,E-mail: lining@qdu.edu.cn

非酒精性脂肪肝(NAFLD)是一种以肝脂肪变性为特征的疾病谱,包括相对良性的非酒精性脂肪肝(NAFL)以及病情较为严重的非酒精性脂肪性肝炎(NASH)等^[1],而NASH又可进一步发展为肝纤维化、肝硬化甚至是肝细胞癌。NAFLD的发病机制非常复杂,包括胰岛素抵抗、氧化应激、脂肪毒性和线粒体功能障碍等^[2]。研究表明,肝脏脂质的沉积是NAFLD发病的首要环节,主要由肝脏脂质代谢失衡所致^[3]。因此,筛选调控肝脏脂质代谢的关键基因可为非酒精性脂肪肝病的治疗提供科学依据。

*EVA1A*是近年来筛选出的自噬调节基因,位于人2号染色体短臂12区(2P12),编码152个氨基酸。*EVA1A*在人、小鼠、大鼠中的蛋白氨基酸序列高度保守,组织表达谱分析显示,*EVA1A*在肝脏中高表达^[4],提示其在脊椎动物的肝脏中可能具有重要功能。研究发现,*EVA1A*是主要定位于内质网的TYPE I型跨膜蛋白^[5],在响应营养缺乏信号时,定位于溶酶体的量增多。*EVA1A*还能够定位于早期自噬体,并通过与ATG16L1相互作用,参与自噬体的形成^[4]。目前的研究表明,*EVA1A*主要通过调控自噬和凋亡参与肿瘤的发生发展^[3,6,7],但它是否参与脂质代谢尚未有相关报道。有研究发现,部分肝癌患者中CCAAT增强子结合蛋白A(C/EBPA)上调,通过*EVA1A*促进肝癌细胞的脂滴分解应对能量饥饿促进肿瘤细胞存活^[7]。基于以上研究基础和*EVA1A*在肝脏组织高表达的特征,推测*EVA1A*可能参与肝脏的脂质代谢。本研究拟通过在ob/ob脂肪肝小鼠模型和油酸处理的NAFLD细胞模型中过表达*EVA1A*,初步研究*EVA1A*对肝脏脂质代谢的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

油酸(OA)、总RNA提取试剂Trizol(生工生物工程(上海)股份有限公司),油红O、苏木精-伊红染液(上海碧云天生物技术有限公司),BCA蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),实时荧光定量PCR试剂盒和RNA逆转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C)、肝脏TG及TC、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(南京建成生物工程研究所),炎症相关细胞因子白细胞介素-6(IL-6)、IL-1 β 以及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒(上海纪宁生物科技有限公司),ECL试剂盒(苏州新赛美生物科技有限公司),*EVA1A*抗体(Abcam)、脂肪酸转运酶(CD36)抗体(Novus),乙酰辅酶A羧化酶(ACC1)、甘油三酯脂肪酶(ATGL)(Cell Signaling Technology),p62、LC3、ATG5、

β -actin抗体(武汉三鹰生物技术有限公司)、HRP标记的二次抗体和免疫荧光二次抗体(武汉爱博泰克生物科技股份有限公司),含GFP标记的慢病毒载体LV-EVA1A及空病毒对照载体LV-Vector(上海吉凯基因医学科技股份有限公司)。

1.2 动物实验

本研究动物实验经青岛大学青岛医学院伦理委员会审查批准(伦理批号:QDU-AEC-2024767)。C57BL/6J系ob/ob遗传型肥胖合并脂肪肝模型小鼠购自江苏集萃药康生物科技有限公司,雄性,8周龄,体质量约45 g,在SPF级动物房采用普通饲料饲养。将ob/ob小鼠随机分为2组,8只/组,分别通过尾静脉注射血清型8型的AAV空载体(AAV-null组)和重组载体AAV-Eva1a(AAV-Eva1a组)(注射量200 μ L/只,病毒包装量为 1.3×10^{11} v.g.),注射7周后禁食过夜,使用戊巴比妥钠麻醉小鼠(50 mg/kg剂量,腹腔注射),眼眶取血,断颈处死,收集血液和肝脏组织样本。

1.3 细胞实验

人HepG2细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司),用含10%胎牛血清和1%双抗的DMEM培养于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱内。将细胞铺于多孔板中,生长至30%汇合度时,使用慢病毒载体LV-EVA1A(1.05×10^8 TU/mL)按说明书感染72 h,感染最后12 h加入400 μ mol/L的OA处理,构建*EVA1A*过表达的NAFLD细胞模型(LV-EVA1A组),对照组等量感染LV-Vector载体(LV-Vector组)。

1.4 测定指标与方法

1.4.1 RT-qPCR测定肝脏组织及细胞中脂质代谢相关基因表达水平 将ob/ob小鼠的肝脏组织或HepG2细胞用Trizol试剂提取总RNA,使用超微量紫外分光光度计测定RNA浓度与纯度,取500 ng RNA使用HiScript[®] II Q RTSuperMix试剂盒进行RNA反转录反应,合成cDNA,然后使用SYBR Color qPCR Master Mix试剂盒进行RT-qPCR。每个样品设4个复孔,比较试验组与对照组小鼠肝脏*Eva1a*基因以及脂代谢相关基因mRNA相对表达丰度。以 β -actin作为内参基因,将实验中涉及的每个基因进行比对计算并以Ct值作为统计数据输出形式。实验重复3次,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示样本中mRNA的相对表达量。本试验基因的引物由上海吉玛制药技术有限公司设计合成(表1)。

1.4.2 免疫荧光检测肝脏组织Eva1a表达水平 将小鼠肝脏以4%多聚甲醛固定后,30%蔗糖沉糖脱水,OCT包埋组织,使用Leica CM1520冰冻切片机进行切片。用0.2% Triton X-100进行通透处理,随后用山羊血清进行封闭,滴加*EVA1A*一抗(1:50),4 $^{\circ}$ C孵育过夜,次日复温后,用FITC标记的荧光二抗(1:200)室温避光孵

表1 用于RT-qPCR的引物序列

Tab.1 Primers sequences for RT-qPCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Mus <i>Eva1a</i>	CCTTGGCCGCTTGGTGATGAG	TACCATCCTCGCTGCTGCTGCT
Homo <i>EVA1A</i>	AGATGGCTTTGCTCAGCAACA	GATGCACACGCCAGAAACAA
Mus <i>ACC1</i>	TCGGATCGGTTCTTTGGGCCT	TGTTTCGCTGCCACGTAGATGCG
Mus <i>CD36</i>	TGACGTGGCAAAGAACAGCAGCA	AGACACAGTGTGGTCTCGGGG
Mus <i>DGAT2</i>	TCCCAGCAGCTGTGGCCTTACT	GCACCACAGTTGACATCCCGG
Mus <i>ATGL</i>	TCCAAGGGGTGCGCTATGTGGA	GTGGAGCTGCTCTGAGGGCAGA
Mus β -actin	CCCGGGTGTATCCCTCCAT	CCTCTCTGCTCTGGGCCTCGT
Homo β -actin	AGGATTCCTATGTGGGCGAC	ATAGCACAGCCTGGATAGCAA

育1 h, PBS 冲洗后用即用型 DAPI 染色 15 min, 再次用 PBS 冲洗后封片, 使用荧光显微镜观察和拍照。

1.4.3 血清及肝脏脂质代谢指标生化检测 收集血液后 4 °C 过夜, 3500 r/min 离心 15 min, 随后取上清, 使用试剂盒检测血清 TG、TC、LDL-C、HDL-C 及肝匀浆中 TG、TC 的水平。

1.4.4 血清炎症因子检测 参照 ELISA 试剂盒说明书对两组小鼠血清中的 ALT、AST, 炎症相关细胞因子 IL-2、IL-6 以及 TNF- α 等炎症因子进行检测。

1.4.5 HE 染色 将小鼠肝脏组织按常规程序制作石蜡切片, 对肝脏切片进行苏木精-伊红染色, 采用光学显微镜(OLYMPUS/CX43)进行观察及拍摄。

1.4.6 组织油红 O 染色 将小鼠肝脏的冰冻切片复温 20 min 后 PBS 漂洗 3 min, 再用 60% 异丙醇处理 1 min, 然后使用油红 O 工作液避光染色 10 min, 再用 60% 的异丙醇处理 3 s, 再使用 PBS 清洗, 苏木素染色 6 s 后置于水中清洗, 再用 1% 盐酸酒精分化 2 s, 快速取出, 置于水中清洗, 最后在 1% 氨水返蓝 2 s。55 °C 预热好的甘油明胶封片, 镜下观察后拍照。

1.4.7 透射电镜观察肝脏组织脂滴自噬情况 取各组小鼠部分肝脏组织标本, 使用 2.5% 戊二醛固定后浸泡在 1% 四氧化锇中, 分别用体积分数 0.5、0.7、0.8、0.9 的丙酮梯度脱水, 进行包埋后制作超薄(50~70 nm)切片, 然后用醋酸铀和柠檬酸铅进行染色, 在透射电镜下观察并拍照。

1.4.8 Western blotting 检测肝脏组织及细胞中 EVA1A 和脂质代谢及自噬相关蛋白的表达水平 将肝脏组织先用预冷 PBS 洗涤 3 次, 加入组织裂解液, 置于组织破碎仪中破碎, 细胞用 PBS 洗涤后直接加裂解液裂解, 提取总蛋白; BCA 试剂盒法测定蛋白浓度, 加入 5 \times Loading buffer 煮沸 10 min 使蛋白变性。然后 SDS-PAGE 上样电泳、转膜, 封闭 2 h, 按说明书的比例稀释相应一抗 [(EVA1A, 1: 1000)、(CD36, 1: 1000)、(ACC1, 1: 1000)、(ATGL, 1: 1000)、(p62, 1: 1000)、(LC3, 1: 1000)、(ATG5, 1: 1000)、(β -actin, 1: 5000)],

4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜以后, 二抗 (1: 10000) 室温孵育 1 h 后, TBST 洗膜, 使用 ECL 试剂盒发光显影, 以 β -actin 作为内参照蛋白, 使用 Image J 软件分析蛋白条带的灰度值, 以目的蛋白条带的灰度值与内参蛋白条带的灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量, 重复实验 3 次, 结果以均值表示。

1.4.9 细胞免疫荧光染色 将细胞接种到含 coverslip 的 12 孔板中, 按 1.3 部分的描述处理细胞后, 用 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, 用 PBS 冲洗, 使用 0.2% Triton X-100 进行透膜处理, 滴加适量 5% 山羊血清室温封闭 1 h, 加一抗 4 °C 孵育过夜, 随后加荧光二抗于室温避光孵育 1 h, 然后滴加即用型 DAPI 染液, 避光孵育 10 min。最后用抗荧光淬灭封片剂封片, 通过激光共聚焦显微镜观察。

1.4.10 细胞油红 O 染色 将细胞接种到六孔板中, 按 1.3 部分的描述处理细胞后, 待细胞汇合度达 80% 时弃去培养基, 取 2 mL 冰甲醇缓慢加到六孔板中, 静置 10 min 固定细胞。随后弃去冰甲醇, 用 60% 异丙醇润洗细胞 5~10 s, 然后将 60% 的油红 O 染液加到六孔板中, 室温孵育 30 min。孵育结束后, 使用苏木素染核 5 min, 用清水冲洗, 在倒置显微镜下观察。

1.4.11 细胞 TG 含量测定 收集 1 \times 10⁶ 细胞于 EP 管中, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清液保留细胞沉淀。加入无菌 PBS 重悬细胞, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清液保留沉淀, 重复 2 次。加入 0.2 mL 生理盐水进行机械匀浆。后续测定按 1.4.3 部分 TG 试剂盒说明操作。

1.5 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9 进行数据统计分析。独立重复实验 3 次, 计量资料以均数 \pm 标准差表示, 各组间差异比较采用独立样本 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *Eva1a* 基因在 ob/ob 小鼠肝脏组织中过表达

与 AAV-null 组相比, AAV-*Eva1a* 组小鼠肝脏组织中 *Eva1a* mRNA 相对表达量增加 (*P*<0.01, 图 1A); 免疫

荧光染色显示, AAV-Eva1a组小鼠肝脏组织中Eva1a蛋白的表达水平高于 AAV-null组 ($P < 0.001$, 图1B);

Western blotting结果显示, AAV-Eva1a组Eva1a蛋白的表达水平高于 AAV-null组 ($P < 0.05$, 图1C)。

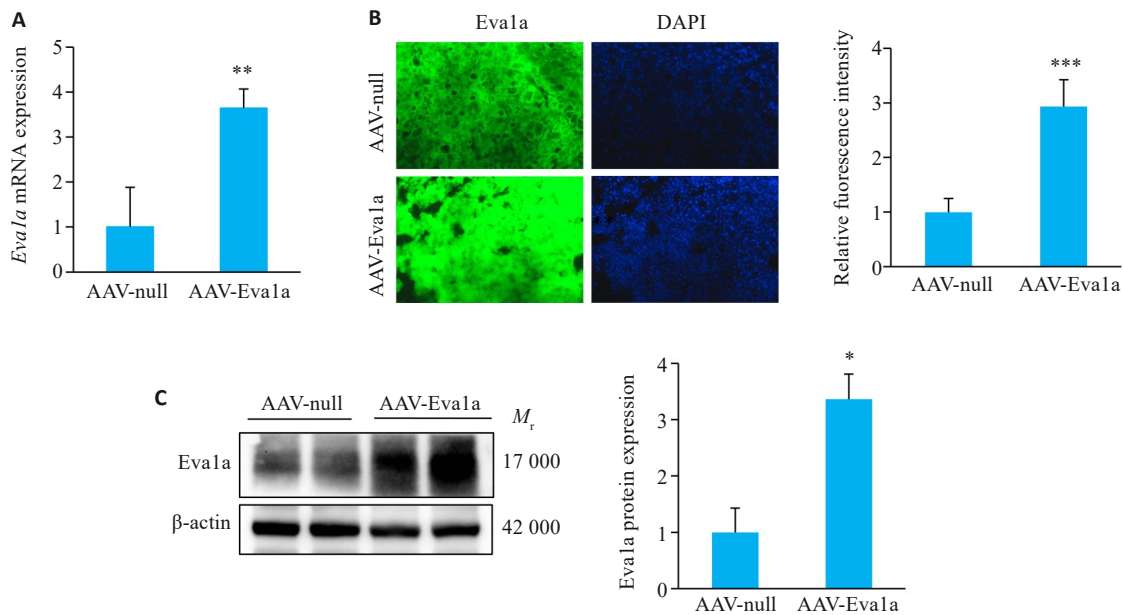


图1 Eva1a在ob/ob小鼠肝脏中的过表达

Fig.1 Overexpression of Eva1a in ob/ob mouse liver. A: Relative hepatic *Eva1a* mRNA levels. B: Immunofluorescence staining for detecting *Eva1a* expression in mouse liver tissues (Original magnification: $\times 200$). C: Hepatic *Eva1a* protein expression levels detected with Western blotting. AAV-Eva1a: Mice overexpressing *Eva1a*; AAV-null: Control mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs AAV-null group.

2.2 过表达EVA1A改善ob/ob小鼠脂肪肝以及OA诱导的NAFLD细胞模型中的脂质沉积

相较于AAV-null组, AAV-Eva1a组小鼠肝脏的暗黄程度明显减轻, 肝脏体积明显变小(图2A); 过表达Eva1a有效改善了肝细胞气球样变和脂滴的累积(图2B)。相较于AAV-null组, AAV-Eva1a组小鼠的肝重以及肝脏系数降低(图2C), 肝脏中的TG、TC和血清中的TC、LDL-C、HDL-C水平均降低($P < 0.05$), 肝脏脂质积累明显改善(图2D), 小鼠血清中AST和ALT水平降低($P < 0.05$), 炎症相关细胞因子IL-6、TNF- α 的表达水平下调($P < 0.05$), 但IL-1 β 差异无统计学意义(图2E)。在细胞实验中, HepG2细胞感染LV-EVA1A72 h后, 通过GFP荧光蛋白鉴定感染率高于80%(图2F); RT-qPCR与Western blotting结果显示, LV-EVA1A组细胞EVA1A的mRNA水平和蛋白水平较LV-Vector组细胞均升高($P < 0.001$, 图2G、H); 油红O染色结果显示, 相较于LV-Vector组, LV-EVA1A组细胞内的脂质沉积改善(图2I), 该组细胞内的TG含量也降低($P < 0.01$, 图2J)。

2.3 EVA1A过表达对ob/ob小鼠肝脏和OA诱导的NAFLD细胞模型中脂质代谢基因表达的影响

RT-qPCR结果显示, 相比AAV-null组, AAV-Eva1a组小鼠肝脏中CD36、脂肪酸合成的关键酶ACC1和脂肪合成的关键酶二酰基甘油酰基转移酶(DGAT2)的

mRNA表达量均降低($P < 0.05$), 而介导脂肪分解的ATGL的mRNA表达量增加($P < 0.05$, 图3A)。Western blotting结果显示, AAV-Eva1a组小鼠肝脏组织CD36和ACC1的蛋白表达水平降低, ATGL的蛋白表达水平升高($P < 0.05$, 图3B)。相比于LV-Vector组, LV-EVA1A组细胞CD36和ACC1的蛋白表达水平降低, ATGL的蛋白表达水平升高($P < 0.05$, 图3C)。

2.4 EVA1A过表达促进ob/ob小鼠肝脏及OA诱导的NAFLD细胞模型中脂滴的自噬

通过透射电镜观察到, 与AAV-null组相比, AAV-Eva1a组小鼠肝脏组织中脂滴的体积减小, 且被包裹在自噬体中, 脂滴的自噬增强(图4A); 细胞免疫荧光染色结果显示, 相较于LV-Vector组, LV-EVA1A组细胞中自噬相关蛋白LC3标记的自噬体数量增多($P < 0.001$, 图4B); Western blotting结果显示, 相较于AAV-null组, AAV-Eva1a组小鼠肝脏组织中p62蛋白的累积减少($P < 0.01$), LC3-II的转换增多($P < 0.05$), ATG5的蛋白表达升高($P < 0.05$, 图4C); 与此一致, LV-EVA1A组细胞中p62蛋白的累积减少($P < 0.05$), LC3-II的转换增多($P < 0.05$), ATG5的蛋白表达升高($P < 0.05$, 图4D)。

3 讨论

EVA1A是一种内质网和溶酶体相关蛋白, 通过调节自噬和/或凋亡在许多疾病中发挥作用。现有研究表

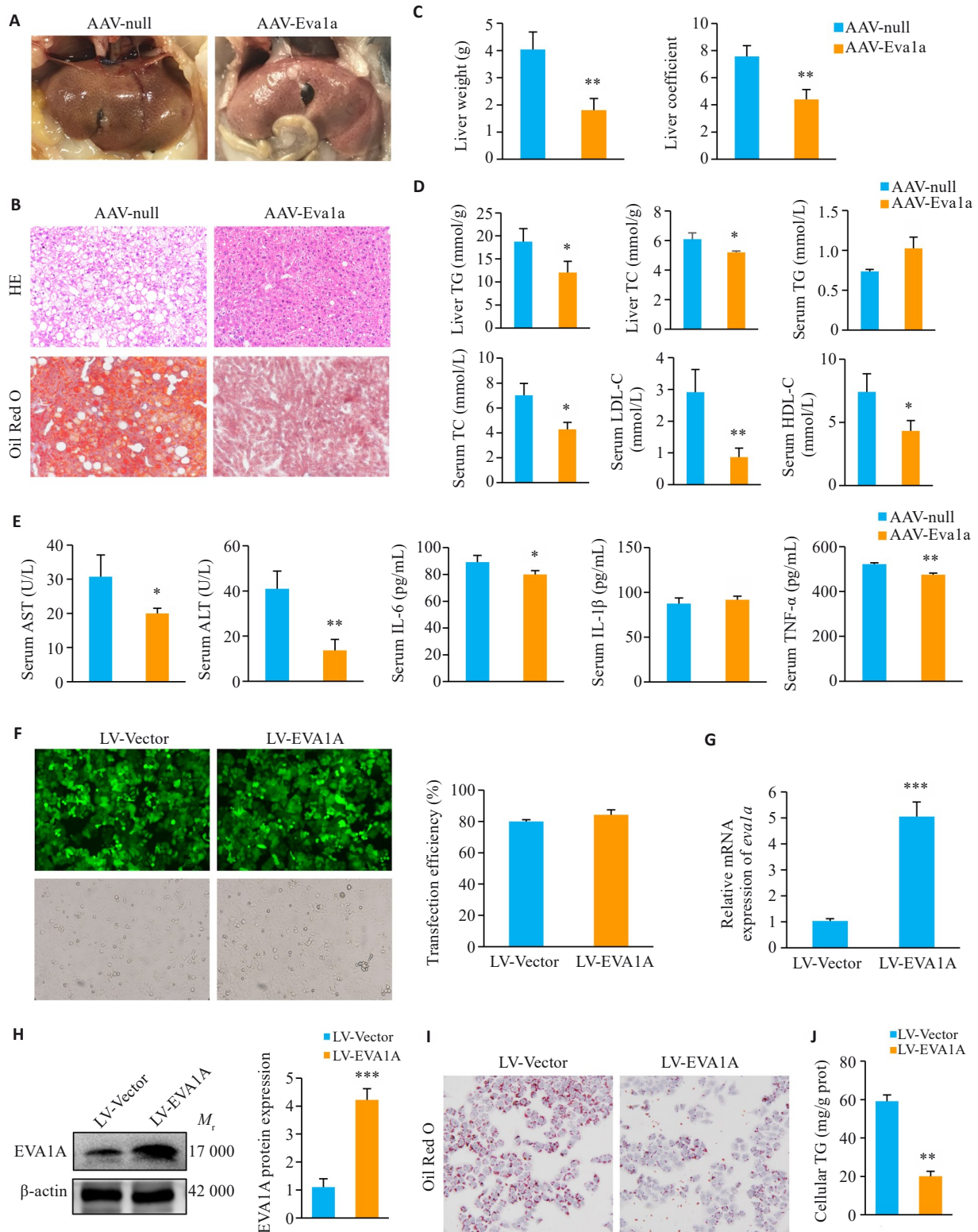


图2 EVA1A过表达对ob/ob小鼠脂肪肝、炎症及OA诱导的NAFLD细胞模型脂质沉积的影响

Fig.2 Effect of EVA1A overexpression on steatosis and inflammation in ob/ob mice and on lipid deposition in OA-induced HepG2 cells. **A**: Observation of mouse livers. **B**: Liver tissue HE staining and Oil Red O (ORO) staining ($\times 200$). **C**: Liver weight and liver coefficients of the mice. **D**: Triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) levels in mouse livers, and TG, TC, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels in mouse serum. **E**: Serum levels of AST, ALT, IL-6, IL-1 β , and TNF- α of the mice. **F**: Infection efficiency of LV-EVA1A or LV-Vector in HepG2 cells determined by fluorescence microscopy ($\times 200$). **G**: RT-qPCR analysis of *Eva1a* mRNA levels in HepG2 cells infected with LV-EVA1A or LV-Vector. **H**: Western blotting of EVA1A protein levels in HepG2 cells infected with LV-EVA1A or LV-Vector. **I**: ORO staining for lipid droplets in the cells in LV-Vector and LV-EVA1A groups treated with 400 $\mu\text{mol/L}$ OA for 12 h ($\times 400$). **J**: Quantitative analysis of cellular TG contents. AAV-Eva1a: Mice overexpressing *Eva1a*; AAV-null: Control mice. LV-EVA1A: HepG2 cells overexpressing EVA1A; LV-Vector: Control cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs AAV-null group or LV-Vector group.

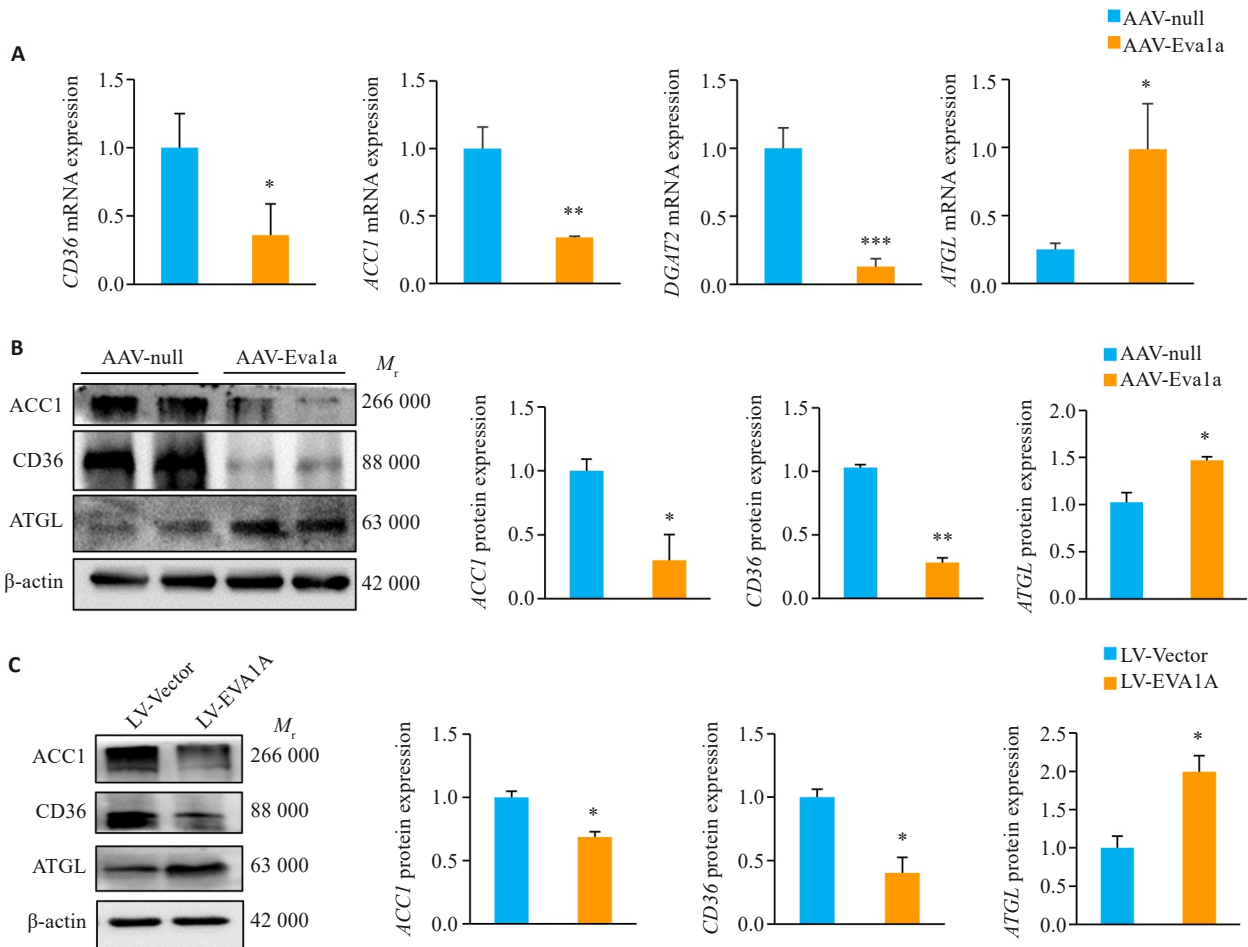


图3 EVA1A过表达对ob/ob小鼠肝脏和OA诱导的NAFLD细胞模型中脂质代谢相关基因表达的影响

Fig.3 Effect of EVA1A overexpression on expression of lipid metabolism-related genes in the liver of ob/ob mice and in HepG2 cells induced by OA. A: Relative hepatic mRNA levels of CD36, ACC1, DGAT2 and ATGL. B: Protein expression levels of ACC1, CD36, and ATGL in the liver of ob/ob mice. C: Protein expression levels of ACC1, CD36, and ATGL in HepG2 cells treated with OA. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs AAV-null group or LV-Vector group.

明,EVA1A诱导的自噬或凋亡被证实在多种肿瘤^[8-10]、急性肝损伤^[11]、胚胎神经发生^[12]、造血干细胞再生^[13]、血管内皮修复^[14]和延缓动脉粥样硬化^[15]以及仑伐替尼耐药^[16]中发挥重要作用,但它是否参与脂质代谢尚未有相关报道。本研究采用遗传型肥胖ob/ob合并脂肪肝小鼠和油酸诱导的HepG2细胞作为NAFLD模型,通过尾静脉注射血清型8型的AAV病毒载体,实现Eva1a在ob/ob小鼠肝脏中过表达;采用慢病毒重组载体LV-EVA1A感染HepG2细胞,使EVA1A在该细胞中过表达。本文通过RT-qPCR,免疫荧光实验和Western blotting实验,验证了EVA1A在ob/ob小鼠肝脏和HepG2细胞中其mRNA水平和蛋白水平达到了对照组3倍以上;发现Eva1a过表达后肝脏的暗黄程度明显减轻,肝脏体积和重量明显减小,肝脏系数明显减小,肝细胞气球样病变明显改善,肝脏中脂滴的累积明显减轻,与此一致的是,肝脏中的TG、TC水平显著降低,HepG2细胞内的TG水平显著降低;同时过表达Eva1a后,小鼠血清中TC、LDL-C、HDL-C水平显著降低,血清中的AST、ALT、IL-6和

TNF- α 水平显著下降,说明小鼠的脂肪肝症状和肝脏炎症明显减轻,表明Eva1a显著改善了ob/ob小鼠的脂肪肝,是NAFLD治疗的有效的靶点。

由于脂质的摄取和合成增加与肝脏的脂质沉积密切相关,而脂质的分解代谢加强可减缓甚至抑制NAFLD的发生发展,为进一步探索EVA1A改善NAFLD的作用机制,本研究对参与上述过程的关键基因进行检测。发现EVA1A过表达下调了ob/ob小鼠肝脏和油酸诱导的NAFLD细胞模型中脂肪酸转运酶CD36和脂肪酸合成酶ACC1以及二酰基甘油酰基转移酶DGAT2的表达量,上调了甘油三酯脂肪酶ATGL的表达量。CD36是一种重要的脂肪酸传感器^[17],介导脂质的摄取,在调节细胞脂质的稳态中发挥关键作用^[18],在肝细胞内,长链脂肪酸通过细胞膜上的CD36转运蛋白介导摄取后,转运至内质网参与甘油三酯的酯化合成。研究表明,NAFLD患者及模型小鼠肝脏中CD36的表达水平上调,导致脂肪酸摄取增加,从而加速了NAFLD的病理进程^[19-21];而CD36缺失有效改善了高脂

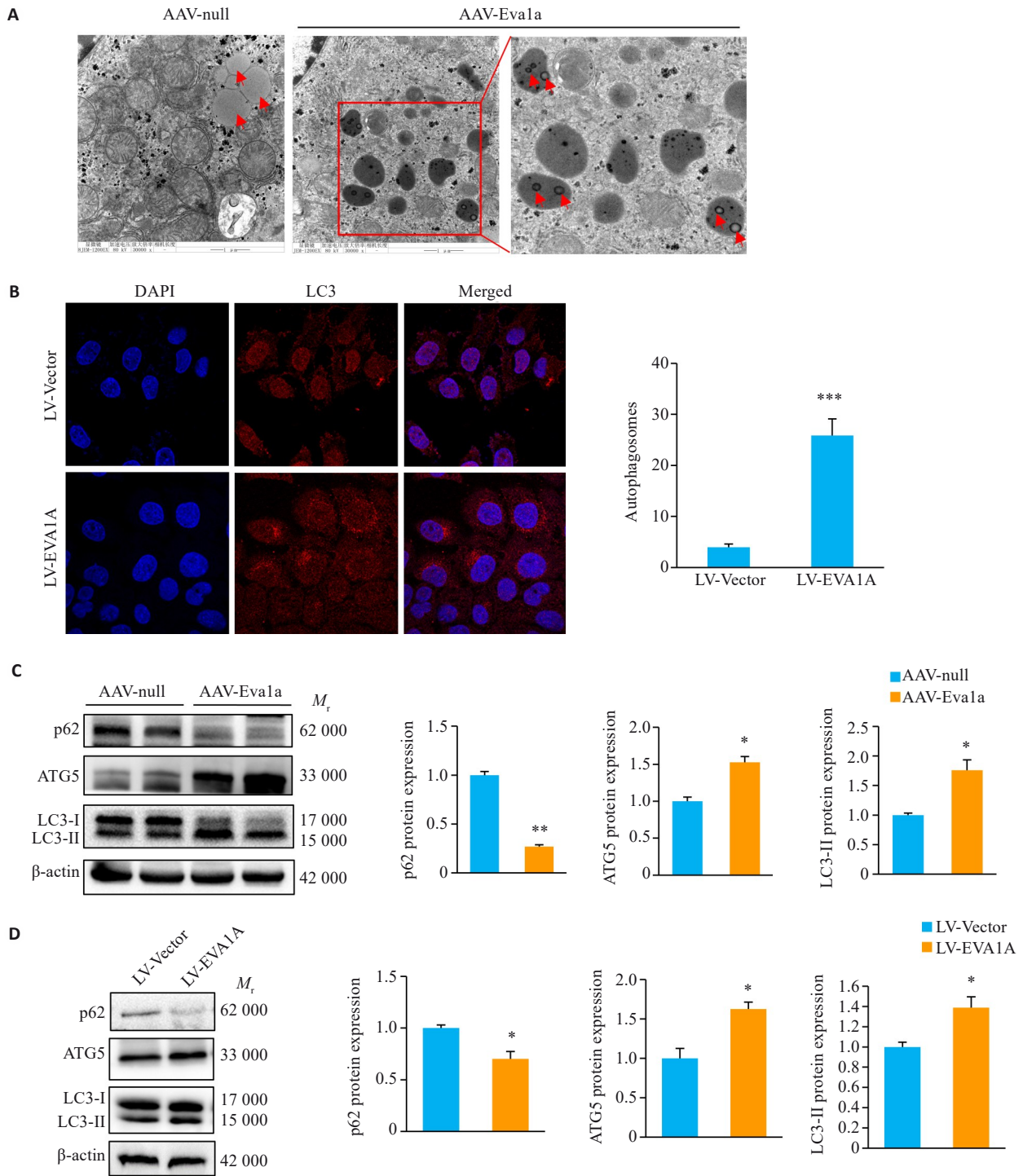


图4 EVA1A过表达对小鼠肝脏及OA诱导的NAFLD细胞模型中脂滴自噬的影响

Fig.4 Effect of Eva1a overexpression on lipophagy in the liver of ob/ob mice and in OA-induced HepG2 cells. **A:** Lipophagy in mouse liver observed with transmission electron microscopy ($\times 30\ 000$). **B:** Immunofluorescence staining of LC3-labeled autophagosomes in HepG2 cells treated with OA ($\times 1260$). **C:** Protein expression levels of autophagy-related genes p62, LC3, and ATG5 in ob/ob mouse liver. **D:** Protein expression levels of autophagy-related genes p62, LC3, and ATG5 in HepG2 cells treated with OA. The red arrows indicate lipid droplets. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs AAV-null group or LV-Vector group.

饮食诱导的NAFLD小鼠模型的肝脂肪变性^[22]。从头合成脂肪酸是肝脏脂质的另一个主要来源,ACC1是该合成途径的限速酶,通过将丙二酰辅酶A转化为棕榈酸酯,调节新生脂肪生成流量^[23];研究表明,ACC1在NAFLD患者的肝脏中表达上调,促进脂肪肝的形成和

发展^[23];相反,抑制ACC的活性可有效改善人类肝脂肪变性^[24]。DGAT2是肝细胞TG合成的关键酶,负责将二酰基甘油和脂肪酸-CoA酯化形成TG,其表达或活性增加会导致肝内脂质堆积,促进单纯性脂肪肝的形成。研究证实,NAFLD患者肝脏中DGAT2表达上调,且与肝

脂肪变程度正相关,而DGAT2的抑制或缺失显著改善脂肪肝但不加剧纤维化^[25,26]。ATGL是一种中性脂解酶,可将甘油三酯分解成甘油二酯和游离脂肪酸^[27],ATGL的表达或活性下降会导致肝细胞内TG水解受阻,促进肝细胞脂肪变性;反之,上调ATGL的表达和活性可减轻肝脏脂肪变性^[28,29]。研究表明,EVA1A具有调控肝脏脂质代谢的作用,EVA1A通过下调肝脏细胞CD36、ACC1和DGAT2的表达,引起肝脏的脂质摄取和脂质合成速率下降,同时上调肝脏细胞ATGL的表达,促进肝脏脂质分解。

NAFLD可诱发肝脏组织发生炎症反应。脂肪变性的肝细胞会破裂释放脂肪酸,激活肝细胞内的炎症信号通路,触发炎症反应并加重肝脏损伤^[30]。在关于EVA1A调节急性肝衰竭机制的研究中发现,*Evala*的肝细胞特异性缺失造成ALT和AST、髓过氧化物酶和炎性细胞因子如TNF- α 和IL-6水平升高,这与*Evala*缺失表现出的肝脏结构紊乱和肝细胞自噬障碍有关,表明*Evala*的缺失加重了急性肝衰竭小鼠肝损伤^[11]。与此一致,本研究发现,过表达*Evala*降低了ob/ob小鼠血清中AST、ALT水平和炎症相关细胞因子IL-6、TNF- α 的水平,表明*Evala*过表达可以减轻小鼠肝损伤和炎症反应,其机制可能与EVA1A介导的脂质积累减少,降低脂毒性有关。

肝脏内脂质的分解通过脂解和脂滴自噬两种方式进行,脂解是由细胞内的脂肪酶分解,脂噬是一种以脂滴为降解底物的选择性自噬。EVA1A是一种自噬相关蛋白,先前的研究表明EVA1A与自噬体膜的形成和生长有关^[5],然而EVA1A是否参与脂滴的自噬尚不清楚。本研究发现,过表达EVA1A的小鼠肝脏和NAFLD细胞模型中p62的表达降低,LC3-II和ATG5的表达升高,LC3标记的自噬体数量显著增多;更为重要的是,透射电镜结果表明,过表达EVA1A的小鼠肝脏内的脂滴体积明显减小,且小脂滴在自噬溶酶体中广泛出现,说明EVA1A过表达促进了自噬,通过自噬降解脂滴,减少肝脏的脂质积累。

关于EVA1A调控脂质代谢基因的表达的机制,基于脂质代谢基因转录水平的改变,其上游转录因子的活性或者表达可能发生改变。其中,肝脏中脂质摄取基因CD36的表达主要受过氧化物酶体增殖物激活受体PPAR γ 2的转录调节^[31],肝脏中脂质合成基因主要受脂质转录因子甾醇调节元件结合蛋白SREBP1c的调控^[32],而PPAR γ 2和SREBP1c的转录活性和表达量均受哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物mTORC1的正向调控。研究表明,mTORC1促进脂肪组织中PPAR γ 2所诱导的脂肪酸摄取^[33],mTORC1信号通路促进SREBP1c的转录、翻译和酶解加工,促进其成熟进而调控脂肪生

成^[34,35];在脂肪细胞中,mTORC1在胰岛素刺激下抑制ATGL的转录,早期生长反应因子Egr 1通过mTORC1介导ATGL下调^[36,37]。此外,mTORC1通过磷酸化抑制ULK1(自噬启动激酶),阻断脂滴通过自噬途径降解^[38]。而EVA1A是否能够通过抑制mTORC1的活性,进而抑制PPAR γ 2和SREBP1c下调脂质摄取和脂质合成的基因表达,上调脂肪分解基因的表达,以及促进脂滴自噬,尚待进一步研究。

综上所述,本研究揭示了EVA1A通过抑制肝脏脂质摄取和脂质合成的基因表达,促进脂质分解的基因表达,促进脂滴自噬,以及减轻肝脏炎症反应从而改善NAFLD,为NAFLD的治疗提供了新的靶点和实验基础。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Pouwels S, Sakran N, Graham Y, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss[J]. BMC Endocr Disord, 2022, 22(1): 63.
- [2] Shi MR, Zhang H, Wang W, et al. Effect of dapagliflozin on liver and pancreatic fat in patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Diabetes Complicat, 2023, 37(10): 108610.
- [3] Xu S, Wu X, Wang S, et al. TRIM56 protects against nonalcoholic fatty liver disease by promoting the degradation of fatty acid synthase[J]. J Clin Invest, 2024, 134(5): e166149.
- [4] Wang L, Yu CF, Lu Y, et al. TMEM166, a novel transmembrane protein, regulates cell autophagy and apoptosis[J]. Apoptosis, 2007, 12(8): 1489-502.
- [5] Hu J, Li G, Qu L, et al. TMEM166/EVA1A interacts with ATG16L1 and induces autophagosome formation and cell death[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(8): e2323.
- [6] De Minicis S, Day C, Svegliati-Baroni G. From NAFLD to NASH and HCC: pathogenetic mechanisms and therapeutic insights[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(29): 5239-49.
- [7] Lu GD, Ang YH, Zhou J, et al. CCAAT/enhancer binding protein α predicts poorer prognosis and prevents energy starvation-induced cell death in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2015, 61(3): 965-78.
- [8] Xu Q, Liao Z, Gong Z, et al. Down-regulation of EVA1A by miR-103a-3p promotes hepatocellular carcinoma cells proliferation and migration[J]. Cell Mol Biol Lett, 2022, 27(1): 93.
- [9] Yang JJ, Wang B, Xu Q, et al. TMEM166 inhibits cell proliferation, migration and invasion in hepatocellular carcinoma via upregulating TP53[J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476(2): 1151-63.
- [10] Zhen Y, Yuan Z, Zhang J, et al. Flubendazole induces mitochondrial dysfunction and DRP1-mediated mitophagy by targeting EVA1A in breast cancer[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(4): 375.
- [11] Lin X, Cui M, Xu D, et al. Liver-specific deletion of *Evala*/Tmem166 aggravates acute liver injury by impairing autophagy[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(7): 768.

- [12] Li MT, Lu G, Hu J, et al. EVA1A/TMEM166 regulates embryonic neurogenesis by autophagy[J]. *Stem Cell Rep*, 2016, 6(3): 396-410.
- [13] Liu B, Liu B, Zhou Y, et al. EVA1A regulates hematopoietic stem cell regeneration *via* ER-mitochondria mediated apoptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(1): 71.
- [14] Canham L, Sendac S, Diabougua MR, et al. EVA1A (*Eva-1* homolog A) promotes endothelial apoptosis and inflammatory activation under disturbed flow *via* regulation of autophagy[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2023, 43(4): 547-61.
- [15] Li J, Chen Y, Gao J, et al. *Eva1a* ameliorates atherosclerosis by promoting re-endothelialization of injured arteries *via* Rac1/Cdc42/Arpc1b[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(2): 450-61.
- [16] Liu XK, Gao X, Yang YL, et al. EVA1A reverses lenvatinib resistance in hepatocellular carcinoma through regulating PI3K/AKT/p53 signaling axis[J]. *Apoptosis*, 2024, 29(7): 1161-84.
- [17] Li YX, Huang XG, Yang G, et al. CD36 favours fat sensing and transport to govern lipid metabolism[J]. *Prog Lipid Res*, 2022, 88: 101193.
- [18] Yang YX, Liu XK, Yang D, et al. Interplay of CD36, autophagy, and lipid metabolism: insights into cancer progression[J]. *Metabolism*, 2024, 155: 155905.
- [19] Zeng H, Qin H, Liao M, et al. CD36 promotes *de novo* lipogenesis in hepatocytes through INSIG2-dependent SREBP1 processing[J]. *Mol Metab*, 2022, 57: 101428.
- [20] Zeng S, Wu F, Chen M, et al. Inhibition of fatty acid translocase (FAT/CD36) palmitoylation enhances hepatic fatty acid β -oxidation by increasing its localization to mitochondria and interaction with long-chain acyl-CoA synthetase 1[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2022, 36(16/17/18): 1081-100.
- [21] Zhu HL, Zhao TM, Zhao S, et al. O-GlcNAcylation promotes the progression of nonalcoholic fatty liver disease by upregulating the expression and function of CD36[J]. *Metabolism*, 2024, 156: 155914.
- [22] Wilson CG, Tran JL, Erion DM, et al. Hepatocyte-specific disruption of CD36 attenuates fatty liver and improves insulin sensitivity in HFD-fed mice[J]. *Endocrinology*, 2016, 157(2): 570-85.
- [23] Brownsey RW, Zhande R, Boone AN. Isoforms of acetyl-CoA carboxylase: structures, regulatory properties and metabolic functions[J]. *Biochem Soc Trans*, 1997, 25(4): 1232-8.
- [24] Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA, et al. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2[J]. *Science*, 2001, 291(5513): 2613-6.
- [25] Akheruzzaman M, Hegde V, Shin AC, et al. Reducing endogenous insulin is linked with protection against hepatic steatosis in mice[J]. *Nutr Diabetes*, 2020, 10(1): 11.
- [26] Gluchowski NL, Gabriel KR, Chittraju C, et al. Hepatocyte deletion of triglyceride-synthesis enzyme acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 reduces steatosis without increasing inflammation or fibrosis in mice[J]. *Hepatology*, 2019, 70(6): 1972-85.
- [27] Bai R, Rebelo A, Kleeff J, et al. Identification of prognostic lipid droplet-associated genes in pancreatic cancer patients *via* bioinformatics analysis[J]. *Lipids Health Dis*, 2021, 20(1): 58.
- [28] Fang QH, Shen QL, Li JJ, et al. Inhibition of microRNA-124a attenuates non-alcoholic fatty liver disease through upregulation of adipose triglyceride lipase and the effect of liraglutide intervention[J]. *Hepatol Res*, 2019, 49(7): 743-57.
- [29] Reid BN, Ables GP, Otlivanchik OA, et al. Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(19): 13087-99.
- [30] Saadati S, Sadeghi A, Mansour A, et al. Curcumin and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease: a randomized, placebo controlled clinical trial[J]. *BMC Gastroenterol*, 2019, 19(1): 133.
- [31] Yu HY, Yang F, Zhong WT, et al. Secretory Galectin-3 promotes hepatic steatosis *via* regulation of the PPAR γ /CD36 signaling pathway[J]. *Cell Signal*, 2021, 84: 110043.
- [32] Lin CW, Zhang H, Li M, et al. Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice[J]. *J Hepatol*, 2013, 58(5): 993-9.
- [33] Blanchard PG, Festuccia WT, Houde VP, et al. Major involvement of mTOR in the PPAR γ -induced stimulation of adipose tissue lipid uptake and fat accretion [S][J]. *J Lipid Res*, 2012, 53(6): 1117-25.
- [34] Owen JL, Zhang Y, Bae SH, et al. Insulin stimulation of SREBP-1c processing in transgenic rat hepatocytes requires p70 S6-kinase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(40): 16184-9.
- [35] Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, et al. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway[J]. *Cell*, 2011, 146(3): 408-20.
- [36] Chakrabarti P, English T, Shi J, et al. Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage[J]. *Diabetes*, 2010, 59(4): 775-81.
- [37] Chakrabarti P, Kim JY, Singh M, et al. Insulin inhibits lipolysis in adipocytes *via* the evolutionarily conserved mTORC1-Egr1-ATGL-mediated pathway[J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(18): 3659-66.
- [38] Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1[J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(2): 132-41.

(编辑:林萍)