

# 类泛素分子UBD通过抑制脂肪酸氧化加重代谢功能障碍相关脂肪性肝炎的机制研究



江长锦<sup>1</sup>, 张家兴<sup>2</sup>, 田瑞锋<sup>3</sup>, 张晓晶<sup>1, 2</sup>

1. 武汉大学泰康医学院(基础医学院)(武汉 430071)
2. 赣南创新与转化医学研究院重大疾病新药靶向及新药创制全国重点实验室(江西赣州 341000)
3. 武汉大学中南医院心血管内科(武汉 430071)

**【摘要】**目的 通过深入挖掘基因表达综合(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库,筛选潜在调控代谢功能障碍相关脂肪性肝炎(metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH)的关键基因,利用体内外模型对其功能进行研究,初步揭示其潜在调控机制。方法 整合 GEO 数据库中鼠类[胆碱缺乏饲料(choline deficient diet, CD)组 vs. 高脂肪/高胆固醇饮食(high-fat/high-cholesterol diet, HFHC)组; CD 组 vs. 蛋氨酸、胆碱联合缺乏饲料(methionine- and choline deficient diet, MCD)组]及人类(健康 vs. MASH)对比组的转录组数据,筛选差异表达基因并进行富集分析。构建体外 MASH 模型[棕榈酸(palmitic acid, PA)/油酸(oleic acid, OA)联合刺激小鼠原代肝细胞]和体内模型(腺相关病毒介导肝细胞特异性基因敲除的 Cas9 转基因小鼠, HFHC 喂养 16 周)。通过定量逆转录聚合酶链式反应(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR)、蛋白免疫印迹(Western blot, WB)验证候选基因表达,采用尼罗红染色、脂质检测(甘油三酯)评估脂质积累。通过体内实验检测血清指标,包括低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine transaminase, ALT)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH),采用苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)、天狼星红染色(picrisirius red, PSR)、油红 O(oil red O, ORO)染色、免疫组织化学染色(immunohistochemistry, IHC)等组织染色方法评估肝脏病理改变。通过转录组测序(RNA sequencing, RNA-seq)分析代谢通路。结果 共筛选出 16 个共同差异基因(*Ubd*、*ANAX2*、*TREM2*、*LGALS3*、*CAPG*、*LPL*、*CCL2*、*TOP2A*、*CD52*、*EMP3*、*MKI67*、*TMSB10*、*CCDC88A*、*SI00A4*、*CRIP1*、*TAGLN2*),其中 *Ubd* 的表达量最高。在临床 MASH 患者及小鼠 MASH 模型中, *Ubd* 基因的 mRNA 表达水平显著上调( $P < 0.05$ )。小鼠原代肝细胞内过表达 *Ubd* 会加重 PA/OA 刺激诱导的脂质堆积,而敲低 *Ubd* 能够减轻 PA/OA 诱导的脂质堆积。在小鼠体内 MASH 模型中,与对照组相比,敲除 *Ubd* 组肝脏组织能使脂质堆积明显改善,肝脏 ORO 染色显著减少,肝脏组织 CD11b+ 炎症细胞显著降低,PSR 染色阳性区域显著减少。基于转录组学的机制分析表明, *Ubd* 敲低后会导致脂肪酸代谢途径显著激活,从而有效降低 MASH 相关脂质堆积及脂毒性。结论 UBD 分子对 MASH 具有显著影响,其可能通过抑制脂肪酸分解加重脂质堆积,从而加剧 MASH 疾病的进程。

**【关键词】**代谢功能障碍相关脂肪性肝炎;类泛素分子;脂肪酸氧化;转录组学

DOI: 10.12173/j.issn.1004-4337.202503006

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(82460122);江西省自然科学基金重点项目(S2023ZRZDL0068);赣州市科技创新人才项目(2022CXRC9712)

通信作者:张晓晶,博士,特聘研究员,博士研究生导师,Email: zhangxj@gimi.ac.cn

<https://slyyx.whuzhmedj.com/>

【中图分类号】R 575.5 【文献标识码】A

## The mechanism of the ubiquitin-like molecule UBD exacerbating metabolic dysfunction-associated steatohepatitis by inhibiting fatty acid oxidation

JIANG Changjin<sup>1</sup>, ZHANG Jiaying<sup>2</sup>, TIAN Ruifeng<sup>3</sup>, ZHANG Xiaojing<sup>1,2</sup>

1. Taikang Medical School (School of Basic Medical Sciences), Wuhan University, Wuhan 430071, China

2. State Key Laboratory of New Targets Discovery and Drug Development for Major Diseases, Gannan Innovation and Translation Medicine Research Institute, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China

3. Department of Cardiology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: ZHANG Xiaojing, Email: zhangxj@gimi.ac.cn

**【Abstract】Objective** To identify key genes potentially regulating metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH) through comprehensive mining of the Gene Expression Omnibus (GEO) database, validate their functions in vitro and in vivo models, and preliminarily reveal their potential regulatory mechanisms. **Methods** Transcriptional data from mouse [choline deficient diet (CD) group vs. high-fat/high-cholesterol diet (HFHC) group; CD group vs. methionine- and choline deficient diet (MCD) group] and human (healthy vs. MASH) in the GEO database were integrated to screen differentially expressed genes and conduct enrichment analysis. In vitro MASH model [palmitic acid (PA)/oleic acid (OA) co-stimulation of mouse primary hepatocytes] and in vivo model (adeno-associated virus-mediated liver-specific gene knockout *Cas9* transgenic mice fed with HFHC for 16 weeks) were constructed. The expression of candidate genes was verified by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot (WB), and lipid accumulation was evaluated by Nile red staining and lipid detection (triglycerides). Serum indicators including low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), and lactate dehydrogenase (LDH) were detected in vivo, and liver pathological changes were assessed by hematoxylin-eosin staining (HE), picosirius red (PSR), oil red O (ORO) staining, and immunohistochemistry (IHC). Metabolic pathways were analyzed by RNA sequencing (RNA-seq). **Results** A total of 16 common differentially expressed genes (*Ubd*, *ANAX2*, *TREM2*, *LGALS3*, *CAPG*, *LPL*, *CCL2*, *TOP2A*, *CD52*, *EMP3*, *MKI67*, *TMSB10*, *CCDC88A*, *S100A4*, *CRIP1*, *TAGLN2*) were screened, among which *Ubd* had the highest expression level. The mRNA expression level of the *Ubd* gene was significantly upregulated in clinical MASH patients and mouse MASH models ( $P < 0.05$ ). Overexpression of *Ubd* in primary mouse hepatocytes aggravates lipid accumulation which is induced by PA/OA stimulation, while knockdown of *Ubd* can alleviate PA/OA-induced lipid accumulation. In the in vivo MASH model of mice, compared with the control group, the liver tissue of the *Ubd* knockout group shows significant improvement in lipid accumulation, with a significant reduction in liver ORO staining, a significant decrease in CD11b+ inflammatory cells in liver tissue, and a significant reduction in PSR staining positive areas. Mechanism analysis based on transcriptomics indicated that knockdown of *Ubd* could lead to significant activation of the fatty acid metabolism pathway, thereby effectively reducing MASH-related lipid accumulation and lipotoxicity. **Conclusion** UBD significantly promotes MASH, possibly by inhibiting fatty acid oxidation and aggravating lipid accumulation, thereby accelerating the progression of MASH disease.

**【Keywords】** Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis; Ubiquitin-like molecule; Fatty acid oxidation; Transcriptomics

代谢功能障碍相关脂肪性肝炎 (metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH) 作为代谢功能障碍相关脂肪性肝病 (metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD) 的严重形式, 主要特征为肝脏脂肪积累、炎症和肝细胞损伤<sup>[1]</sup>。流行病学研究显示, MASLD 发病率在全球范围内正逐年上升, 影响了全球 25%~30% 的人口, 已成为全球最常见的慢性肝脏疾病, 并在 20% 的 MASLD 患者中观察到了 MASH<sup>[2-4]</sup>。在肝脏疾病中, MASH 进展为肝硬化、肝衰竭和肝癌的风险更高<sup>[5-6]</sup>。2024 年 3 月, 美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准了首款针对 MASH 的甲状腺激素受体  $\beta$  选择性激动剂 Resmetirom, 其通过调节肝脏脂质代谢及炎症反应改善纤维化进程<sup>[7]</sup>。目前针对临床 MASH 可供选择的药物仍有限, 因此, 针对其发病机制进行深入研究将有助于为该疾病提供新的治疗策略。

目前研究认为, 脂肪酸代谢失衡是 MASH 发展的重要原因, 其病理过程涉及脂肪酸的异常累积与代谢紊乱, 过量的膳食甘油三酯 (triglyceride, TG) 摄入或外周脂肪组织过度分解 (如胰岛素抵抗状态下), 导致肝脏游离脂肪酸 (nonesterified fatty acid, FFA) 输入增加<sup>[8-9]</sup>。在胰岛素抵抗或高碳水化合物摄入下, 肝脏 SREBP-1c/ChREBP 通路激活, 促进乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl coA carboxylase, ACC) 和脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, FASN) 表达, 加速脂质从头合成 (de novo lipogenesis, DNL), 进一步加剧肝内脂质沉积<sup>[10]</sup>。肝细胞中 FFA 的异常堆积会引发多重损伤<sup>[11]</sup>。FFA 衍生的神经酰胺、二酰甘油等毒性脂质激活蛋白激酶 C 和 NF- $\kappa$ B 通路, 触发肝细胞凋亡、炎症因子释放及星状细胞活化, 推动肝炎-纤维化级联反应<sup>[12]</sup>。尽管 FFA 可通过肉碱棕榈酰转移酶 1 (carnitine palmitoyltransferase 1, CPT1) 介导的线粒体  $\beta$ -氧化分解供能, 但丙二酰辅酶 A (ACC 产物) 对 CPT1 的反馈抑制及过氧化物酶体氧化途径的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成会加剧代谢压力<sup>[13]</sup>; TG 合成相关酶 (如甘油-3-磷酸酰基转移酶、二酰甘油酰基转移酶) 表达失调, 导致脂滴动态平衡破坏, 未酯化的 FFA 比例升高, 放大脂毒性<sup>[14-15]</sup>。靶向脂肪酸代谢治疗策略包括增强脂肪酸的氧化, 如

激活过氧化物酶体增植物激活受体  $\alpha$  (peroxisome proliferators-activated receptor  $\alpha$ , PPAR $\alpha$ ), 可上调 CPT-1 的表达, 促进 FAA 在线粒体的氧化, 减少脂毒性, 还可以抑制脂质新生, 靶向 ACC 或 FASN 减少 DNL, 降低肝细胞内 FAA 的负荷<sup>[16-17]</sup>。阻断脂毒性信号可有效改善炎症和纤维化, 从而缓解 MASH 的进展<sup>[18-20]</sup>。因此, 探究脂肪酸氧化分解的调控机制有望为 MASH 治疗提供新的靶点。

泛素 D (ubiquitin D, UBD) 分子是泛素化修饰因子中的一种<sup>[21]</sup>, 既往研究揭示了 UBD 分子具有多重作用机制<sup>[22]</sup>。作为类泛素分子, UBD 可通过共价修饰靶蛋白, 并介导这些蛋白质经蛋白酶体途径降解<sup>[23]</sup>。UBD 还可通过不依赖于经典修饰功能的方式发挥作用, 参与调控机体重要的生理及病理功能。具体而言, UBD 能够与关键靶蛋白 (如 p53、NF- $\kappa$ B 等) 以非共价结合的形式形成复合物, 改变构象, 影响其稳定性或活性<sup>[24]</sup>。UBD 还可通过非共价结合自噬相关蛋白 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 来调控自噬-溶酶体途径<sup>[25]</sup>。另外, UBD 可以通过与组蛋白修饰酶 (如组蛋白去乙酰化酶) 相互作用, 影响染色质重塑和基因转录结合, 在肿瘤发生、免疫逃逸和细胞应激中发挥重要的病理生理作用<sup>[26]</sup>。然而, 尽管 UBD 的多种功能已被广泛研究, 但肝细胞中 UBD 在 MASH 中具体的作用及机制尚未完全明确。本研究基于基因表达综合 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据库分析挖掘潜在调控 MASH 的关键基因 *Ubd*, 进一步构建体内外模型, 探究肝细胞内 UBD 在 MASH 中的功能及其机制, 以期制定 MASH 的新型治疗策略提供新思路。

## 1 资料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

实验所用动物均来自湖北贝恩特生物科技有限公司, 在无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 环境下饲养, 自由饮水进食, 原代肝细胞取自 6 周龄雄性野生型 C57BL/6J 小鼠。用于造模的小鼠均为 6~8 周龄、20~26 g 的雄性野生型 C57BL/6J 小鼠。所有动物实验均是双盲进行, 本研究已获得赣南创新与转化医学研究院实验动物伦理委员会批准 (GIMI-K2024082)。

### 1.1.2 实验试剂

胎牛血清(美国 Gibco 公司, 货号 A5256701)、DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司, 货号 12491015)、青霉素-链霉素(美国 Gibco 公司, 货号 15070063)、IV 型胶原酶(美国 Gibco 公司, 货号 17104019)、HiScript III 逆转录试剂盒(中国南京 Vazyme 公司, 货号 R333-01)、BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司, 货号 23227)、ECL 化学发光显影剂(Bio-Rad 公司, 货号 1705061)、TRIzol 试剂(美国 Sigma 公司, 货号 T9424)、戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司, 货号 A0650000)、蛋白 Marker(美国 Thermo Fisher 公司, 货号 26616)、三氯甲烷(国药集团, 货号 10006818)、二甲苯(国药集团, 货号 10023418)、尼罗红染料(美国 Sigma 公司, 货号 19123)、脱脂奶粉(北京索莱宝, 货号 LP0033B)、DEPC 水(上海生工, 货号 B501005)、一抗稀释液(上海碧云天, 货号 P0023A)、天狼星红染液(北京索莱宝, 货号 S8060)、苏木素染液(武汉谷歌生物, 货号 E607317)、伊红染液(珠海贝索生物, 货号 BA4025)、棕榈酸(美国 Sigma 公司, 货号 P0500)、油酸(美国 Sigma 公司, 货号 05508)、油红 O 染液(美国 Sigma 公司, 货号 09755)、PVDF 膜(美国 Millipore 公司, IPFL00010)、琼脂糖(武汉擎科生物, 货号 TSJ001)、鼠尾胶原蛋白 I 型(北京索莱宝 C8062)、RIPA 裂解液(上海碧云天, 货号 P0013B)、三乙醇胺缓冲盐水溶液(TBS)(国药集团, 货号 XW120842961)、三羟甲基氨基甲烷(Tris-Bas)(上海翌圣生物, 货号 60105ES25)、Krebs-Ringer 缓冲液(武汉普诺赛, 货号 PB180347)、乙二胺四乙酸(EDTA)(中国医药集团, 货号 10009617)、Hanks 平衡盐溶液(美国 Gibco 公司, 货号 14025092)。

### 1.1.3 抗体

兔抗- $\beta$ -actin、兔抗 anti-HA、兔抗 -Flag 均购自美国 Sigma 公司, 货号分别为 A5316、H6908、F7425; 兔抗 -CD11b 购自武汉博士德生物, 货号为 BM3925。

### 1.1.4 质粒及病毒

病毒入门质粒、腺病毒载体质粒、pHAGE 载体购自 Addgene 公司, 货号为 ZT1665。腺相关病

毒包装由武汉擎科公司提供。

### 1.1.5 细胞系

HEK293T、HEK293A 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 目录号分别为 SCSP-5209、GNHu48。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 利用数据库挖掘代谢功能障碍相关脂肪性肝炎相关基因

从 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)获取与 MASH 相关的小鼠和人类肝组织转录组数据集共 17 个对比组的 GSE 数据。筛选标准: 符合(Normal vs. MASH)的 GSE, 采用 R 4.3.3 软件中的 limma 包或 DESeq2 包进行差异分析。差异分析的数据集包括 GSE51432、GSE53381、GSE93132、GSE126848-FALD、GSE109345-24W、GSE35961、GSE126848-MASH、GSE194346、GSE195483、GSE109345-18W、GSE137449、GSE162276、GSE156918、GSE119340、GSE207856-8W、GSE120977、GSE207856-16W。使用 R 4.3.3 软件的 DESeq2 包进行差异分析得到差异表达谱。从列名中提取样本条件信息, 并将其转换为因子类型。使用 DESeqDataSetFromMatrix 函数创建 DESeqDataSet 对象, 其中 countData 为计数矩阵, colData 为包含样本条件信息的数据框, design=~condition 表示使用样本条件作为差异分析的因子。利用 DESeq 函数对 DESeqDataSet 对象进行差异表达分析, 从 DESeqDataSet 对象中提取标准化后的数据。使用芯片 GSE35961、GSE53381、GSE51432 的值, 通过 R 4.3.3 软件的 oligo 包对原始芯片数据进行标准化处理, 再使用  $t$  检验进行组间的显著性检验, 计算  $P$  值, 采用均值的差计算两组(Normal vs. MASH)的差异倍数。通过 upset() 函数对 17 个数据集中 1.5 倍的差异上调且  $P$  值符合条件的基因进行交集。交集基因筛选标准: 表达谱  $P$  校正值( $P_{adj}$ ) < 0.05; 芯片  $P < 0.05$ ,  $\log_2FC > \log_2(1.5)$ 。在 17 个数据集的差异表达谱中筛选出显著表达的差异基因及其差异倍数 [ $\log_2(\text{Fold Change})$ ]。计算出它们在 17 个数据集中的平均差异倍数, 按照降序进行排列, 得到这些共同的差异基因在 17 个数据集中的平均差异倍数情况, 使用 R 4.3.3 软件中 pheatmap 包绘制热图。在 17 个 GSE 的

表达谱中筛选出这些基因的平均差异倍数，再绘制柱状图，使用 FC 列的值作为文本标签，GSE 名字居中显示在柱子的底部并去除一些不必要的背景和网格线。

### 1.2.2 小鼠原代肝细胞分离培养

选用 6 周龄 C57BL/6J 雄性野生型小鼠（体重  $20 \pm 2$  g），经腹腔切开术后建立原位灌注系统。具体操作如下：经下腔静脉留置 22G 导管（BD Biosciences），连接恒温（37 °C）蠕动泵（Harvard Apparatus）进行梯度灌注。首先以 Krebs-Ringer 缓冲液（含 0.5 mM 乙二醇四乙酸）进行门静脉灌注（流速 5 mL/min，持续 10 min），待肝脏血液充分清除后，换用含 0.1% IV 型胶原酶的 Hanks 平衡盐溶液进行消化灌注（流速 3 mL/min，持续 15 min）。当观察到肝脏包膜破裂、组织质地明显软化时，完整摘除肝脏并转移至含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中。依次经过 100  $\mu$ m 和 70  $\mu$ m 细胞筛网双重过滤获得单细胞悬液。通过梯度离心（50  $\times$  g，4 °C，3 min  $\times$  2 次）去除非实质细胞及细胞碎片，最终用含 1% 青霉素-链霉素的完全 DMEM 培养基调整细胞密度至  $1 \times 10^6$  cells/mL，接种于 IV 型胶原包被的培养皿，置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱（Thermo Scientific）中进行原代培养。

### 1.2.3 体外棕榈酸/油酸处理造模

为研究棕榈酸（palmitic acid, PA）/油酸（oleic acid, OA）联合刺激（PA : OA=1 : 2）对 *Ubd* 在小鼠肝细胞内表达情况的影响，将分离的小鼠原代肝细胞铺满提前加入鼠尾胶包被的六孔细胞培养盘，每孔细胞数量为 60 万个，设计多个时间点刺激，选择加入 PA/OA 刺激 0 h（即未刺激对照）、3 h、6 h 和 12 h 四个时间点。

### 1.2.4 过表达和敲低 *Ubd* 腺病毒构建

过表达质粒构建以小鼠原代肝细胞的 cDNA 作为模板，利用 KOD FX Neo 酶，通过聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）技术扩增出目的基因 *Ubd* 全长序列。将目的片段与 BamHI 酶与 XhoI 酶双酶切后的 pHAGE-FLAG 进行重组。将重组的质粒转入感受态细胞中扩菌培养，提取质粒并送入擎科生物测序比对序列。将测序正确的序列提取质粒。鼠源 *Ubd* 上游引物为 5'-CTCACTATAGGGAGAGGATCCTCCATAGAAGACACCGGCGG-3'，下游引物为 5'-TCGAGCGGCCG

CGTACGCGCATCGATTCAGGGCAAGGCGG-3'。

敲低质粒构建：将上下游 sg 引物以退火的方式制备成双链。利用 ESP31 酶对慢病毒 CRISPRv2 质粒进行酶切（37 °C 水浴），完成后对产物利用试剂盒进行回收。将退火后的双链 sg 序列和酶切完成的 CRISPRv2 载体用 Ligation high 酶进行连接（16 °C）。连接完成后进行转化、筛选、质粒提取。*SgUbd* 上游引物序列为 5'-CACCTTGTCCGTTTCAGACCATGG-3'，下游引物序列为 -AAACCCATTGGTCTGAACGGACAA-3'。

### 1.2.5 *Ubd* 在代谢功能障碍相关脂肪性肝炎中的功能实验

针对过表达 / 敲低 *Ubd* 的腺病毒感染小鼠原代肝细胞，利用 PA/OA（PA : OA=1 : 2）进行造模。设计不同时间点及不同浓度 PA/OA 对小鼠原代肝细胞进行刺激造模。

### 1.2.6 RNA 提取及实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应

造模完成后，弃掉细胞培养液，并利用磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline, PBS）对细胞培养皿冲洗两遍后加入 TRIzol 试剂，按照说明书进行细胞 RNA 的提取，测定 RNA 的浓度，利用 HiScript III 逆转录试剂盒进行逆转录成 cDNA 后加入 SYBR Green PCR Master Mix 试剂进行 PCR。所有基因 mRNA 的表达以  $\beta$ -actin 为内参。每个孔设置两个复孔，用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  的方法对 PCR 数据进行分析得出 mRNA 的相对表达变化。*Acc1* 上游引物序列为 5'-AATGAACGTGCAATCCGATTTG-3'，下游引物序列为 5'-ACTCCACATTTGCGTAATTGTTG-3'；*Fasn* 上游引物序列为 5'-GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT-3'，下游引物序列为 5'-TGGGTAATCCATAGAGCCAG-3'；*Cpt1a* 上游引物序列为 5'-ACAA TTCCCCTCTGCTCTGC-3'，下游引物序列为 5'-TACACGACAATGTGCCTGCT-3'；*Srebp1c* 上游引物序列为 5'-GACCCTACGAAGTGCACACA-3'，5'-TGTCGGGCTCAGAGTCACTA-3'；*Tnfa* 上游引物序列为 5'-CCGGGAGAAGAGGGATAGCTT-3'，下游引物序列为 5'-TCGGACAGTCACTCACCAAGT-3'；*Il-1 $\beta$*  上游引物序列为 5'-CGGACCCC AAAAGATGAAGGGCTG-3'，下游引物序列为 5'-AGCTGCCACAGCTTCTCCACA-3'；*Cxcl10* 上游引物序列为 5'-ATCATCCCTGCGAGCCTATCCT-3'，下游引物序列为 5'-GACCTTTTTTGGCTAAACGCTTT

C-3'。

### 1.2.7 蛋白质免疫印迹检测蛋白表达水平

使用 RIPA 裂解液 (含 1× 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂), 冰上裂解 30 min, 期间涡旋震荡 3 次。4 °C 12 000 × g 离心 15 min, 取上清。采用 BCA 法测定浓度, 调整至相同浓度, 按 4:1 比例混合蛋白样品与 5× SDS 上样缓冲液, 95 °C 煮沸 10 min, 冰上骤冷。配制分离胶 (10% 丙烯酰胺) 和 5% 浓缩胶, 灌注后插入梳齿, 室温聚合 30 min。上样量: 20~40 μg/孔, 同时加入预染蛋白 Marker 进行电泳。电泳条件: 浓缩胶 80 V, 分离胶 120 V, 至溴酚蓝迁移至胶底部。利用甲醇活化 PVDF 膜 1 min 后转膜, 转膜夹层的顺序: 负极→海绵→滤纸→凝胶→膜→滤纸→海绵→正极。转膜条件: 4 °C 预冷转膜液, 恒流 250 mA。利用 5% 脱脂奶粉溶于 TBST, 室温摇床封闭 1 h。封闭完成后孵育一抗, 一抗稀释: 按说明书比例用封闭液稀释。条件: 4 °C 摇床孵育过夜 (或室温 2 h)。TBST 漂洗膜 3 次, 每次 5 min。HRP 标记二抗 (抗兔 IgG), 1:5 000 稀释, 室温摇床 1 h 后洗涤最后显影, ECL 发光液 (A 液: B 液 = 1:1) 均匀覆盖膜表面, 避光孵育 1 min。化学发光成像仪采集信号, 优化曝光时间 (1 s~10 min)。使用 ImageJ 2.14.0 软件分析条带灰度值, 以内参 β-actin 标准化目标蛋白表达量。

### 1.2.8 细胞尼罗红染色

利用 4% 多聚甲醛固定后利用尼罗红染液染色, 加入 24 孔细胞培养盘中 (预先放入细胞爬片) 孵育 10~15 min, 利用 PBS 洗三遍, 将爬片取出, 滴加 DAPI 荧光核酸染料倒置放到载玻片上进行拍照。

### 1.2.9 动物模型构建

本实验将动物随机分成 NC-GFP、NC-Ubd-sgRNA、HFHC-GFP、HFHC-Ubd-sgRNA 四个组, 每组各 6 只小鼠, 其中 NC-GFP 为对照组, 给予正常饲料 (10%~12% 蛋白质, 3%~6% 脂肪, 65%~75% 碳水化合物) 喂养; HFHC 组为高脂高胆固醇饲养组 (40% 脂肪供能、20% 果糖和 2% 胆固醇), 用于诱导小鼠 MASH 模型。造模前四周分别注射 AAV8-GFP 和 AAV8-Ubd-sgRNA。16 周后进行样本取材, 取小鼠血液分离血清, 摘除肝脏分别制备福尔马林固定病理标本、OCT 包埋剂固定组织标本及液氮速冻的分子生物学检测

标本。

### 1.2.10 血清生化分析

为评估动物血清脂代谢紊乱程度及肝损伤程度, 分别检测动物血清中的低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate transaminase, AST)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine transaminase, ALT)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH), 使用 ADVIA2400 化学系统分析仪进行分析。

### 1.2.11 组织学分析

①苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE): 将组织固定好后用石蜡包埋, 制成 5 μm 的石蜡切片, 按照烤片-脱蜡-水合-细胞核染色 (苏木素)-分化-胞浆染色 (伊红)-脱水-封片步骤进行染色, 染色完成后在显微镜下观察并拍照; ②油红 O (oil red O, ORO) 染色: 将包埋在 OCT 中的组织在冰冻切片机中切片, 制成 8 μm 的冰冻切片, 按照 4% 多聚甲醛固定-浸泡-异丙醇处理-ORO 染色-酒精分化-苏木素染核-甘油明胶封片步骤进行染色, 在显微镜下观察并拍照; ③天狼星红 (picrosirius red, PSR) 染色: 将已经制好的蜡块进行 5 μm 切片制成石蜡切片, 通过烤片-脱蜡-水和-PSR 染色-分化-脱水-封片步骤进行染色, 染色完成后在显微镜下观察并拍照; ④免疫组化 (immunohistochemistry, IHC) 染色: 将石蜡切片通过烤片-通透/抗原修复-封闭-CD11b 一抗-二抗-DAB 显色-苏木素染核步骤进行染色, 染色完成后封片镜检。

### 1.2.12 统计分析

使用 GraphPad Prism 9 和 SPSS 27.0 软件进行统计分析, 符合正态分布的计量资料以均数和标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验; 不符合正态分布使用 Mann-Whitney *U* 检验; 多组间比较使用方差分析。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肝脏中 Ubd 表达在代谢功能障碍相关脂肪性肝炎中显著上调

通过 GEO 数据库基因比对分析, 分别对比正常小鼠及 MASH 模型、人类及 MASH 疾病中多个数据集, 通过 upset() 函数对 17 个数据集中的 1.5 倍差异上调且 P 值符合条件的基因进行交集。

筛选出多个显著上调的差异基因 (图 1-A), 垂直红柱显示 17 个数据集的共有 1.5 倍差异上调基因数为 16 个, 分别为 *Ubd*、*ANAX2*、*TREM2*、*LGALS3*、*CAPG*、*LPL*、*CCL2*、*TOP2A*、*CD52*、*EMP3*、*MKI67*、*TMSB10*、*TAGLN2*、*CCDC88A*、*S100A4*、*CRIP1*。通过文献查阅发现多个基因在癌症中发挥重要作用, 部分基因在 MASH 中作为炎症趋化因子, 促进疾病进展<sup>[27-35]</sup>。通过分析这些差异基因的表达情况, 对差异基因的 Log<sub>2</sub>(FC) 值进行排序, 其中 *Ubd* 排名第一 (图 1-B)。在 GSE207856 数据集中, 表达差异倍数的对数值最为显著 (图 1-C)。采用小鼠原代肝细胞进行 PA 刺激以构建体外小鼠原代肝细胞内脂质沉积模型, 通过在不同时间点进行造模, 发现 *Ubd* 的 mRNA 表达水平显著提高 (图 1-D)。

选择 12 h 为造模终点, 选择 PA/OA 联合刺激造模以模拟 MASH 体外模型, 发现 *Ubd* 蛋白的表达水平呈上升趋势 (图 1-E)。

## 2.2 抑制 *Ubd* 能够改善棕榈酸/油酸诱导的肝细胞内脂质堆积

### 2.2.1 过表达 *Ubd* 促进棕榈酸/油酸刺激诱导的肝细胞脂质堆积及炎症反应

为探究 UBD 分子在 MASH 病理过程中发挥的具体调控机制, 构建过表达 *Ubd* 腺病毒 (Ad-*Ubd*), 其中 Ad-*GFP* 作为对照, 验证了腺病毒感染后细胞内过表达效率 (图 2-A)。在造模前将这两种腺病毒分别感染小鼠原代肝细胞, 持续感染 24 h 后对细胞 PA/OA 刺激处理, 模拟 MASH 环境。为进一步直观地评估 *Ubd* 在促进 PA/OA 刺激后细胞脂质堆积方面的作用, 进行肝细胞

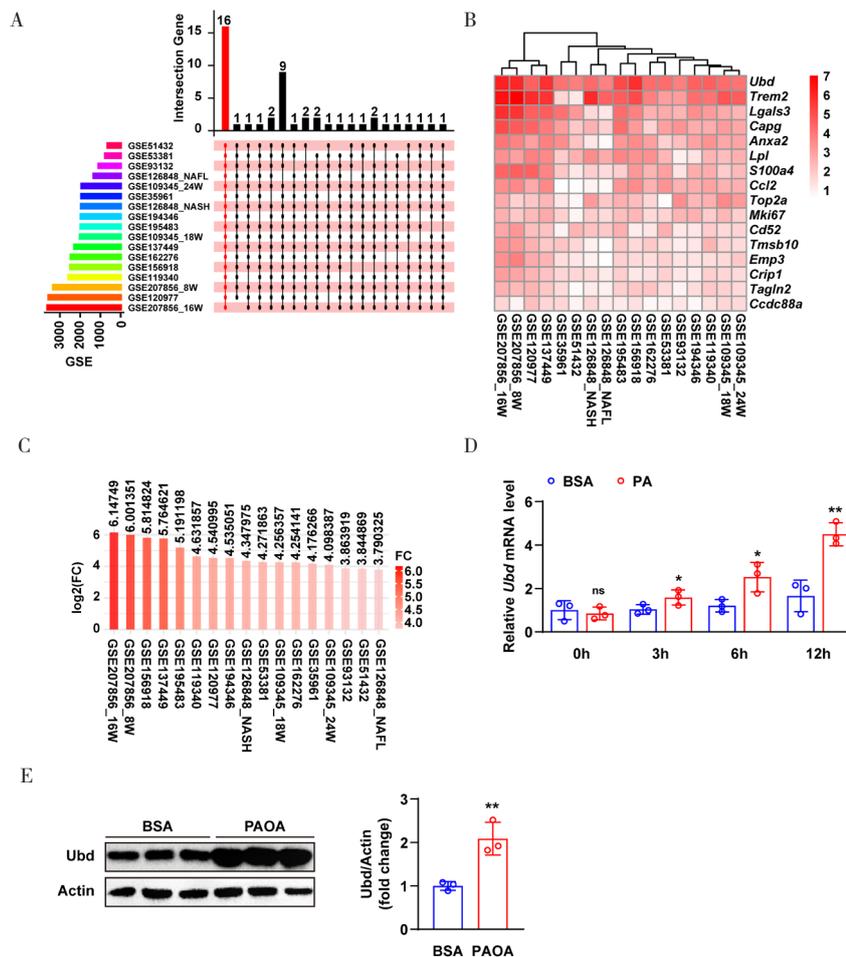


图1 生物信息筛选及代谢功能障碍相关脂肪性肝炎体外模型 *Ubd* 表达

Figure 1. Bioinformatics analysis and the expression of *Ubd* in vitro model of metabolic dysfunction-associated steatohepatitis

注: A. 通过17个GSE数据富集差异基因表达情况; B. 筛选出的17个GSE数据集取表达上调的差异基因的FC值排序热图; C. *Ubd*在数据集里的表达情况; D. 棕榈酸/油酸不同时间刺激组与对照组肝细胞中*Ubd*的mRNA水平表达情况; E. 棕榈酸/油酸12小时刺激组与对照组肝细胞中*Ubd*蛋白水平表达的免疫印迹图及转录水平表达情况 (n=3)。ns, 无统计学意义; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01。

尼罗红染色实验。结果显示, PA/OA 刺激 12 h 后, 小鼠肝细胞内的脂滴明显增大, 而过表达 *Ubd* 的肝细胞中脂质的堆积程度显著高于对照组 (图 2-B), 这表明小鼠肝细胞过表达 *Ubd* 能够促进 PA/OA 刺激诱导的脂质的堆积。通过对造模后小鼠原代肝中甘油三酯 (triglyceride, TG) 检测, 发现 PA/OA 刺激后小鼠肝细胞内的 TG 水平上升 (图 2-C)。此外, 通过对 mRNA 水平进行检测, 发现过表达 *Ubd* 能够显著上调 PA/OA 刺激后肝细胞内脂质合成基因 (*Acc1*、*Fasn*、*Srebp1c*) 水平, 而脂质代谢相关基因 (*Cpt1a*) 转录水平表达降低 ( $P < 0.05$ )。 *Tnfa*、*Il-1 $\beta$*  及 *Cxcl10* 的 mRNA 水平也显著升高 ( $P < 0.05$ ) (图 2-D), 表明过表达 *Ubd* 不仅促进了脂质的堆积, 还可能通过调控这些炎症相关基因的表达来加剧炎症反应。

### 2.2.2 敲低 *Ubd* 改善棕榈酸/油酸诱导的肝细胞脂质堆积及炎症反应

为进一步验证 *Ubd* 在 MASH 中的功能, 设计并构建了敲低 *Ubd* 的腺病毒 (Ad-sh*Ubd*), 其中 Ad-sh*GFP* 作为实验对照, 并检测了构建效率 (图 3-A)。敲低 *Ubd* 腺病毒感染小鼠原代肝细胞 24 h 后, 实施 PA/OA 刺激以建立疾病模型。尼罗红染色结果显示, Ad-sh*Ubd* 组的脂滴面积和数量均少于对照组, 表明敲低 *Ubd* 能够

减少 PA/OA 刺激诱导的肝细胞脂滴的产生和积累 (图 3-B)。通过检测炎症和脂代谢相关基因的 mRNA 表达水平发现, 在 PA/OA 刺激后, Ad-sh*Ubd* 组 *Tnfa*、*Cxcl10*、*Il-1 $\beta$*  的 mRNA 水平显著低于对照组 (图 3-C), 并且调控脂质合成相关的基因 *Fasn*、*Srebp1c*、*Acc1* 的 mRNA 水平明显低于对照组, 而脂肪酸氧化的关键基因 *Cpt1a* 显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 3-C)。综上可知, 敲低 *Ubd* 能够有效减少 PA/OA 刺激诱导的肝细胞脂质堆积和细胞炎症产生。

## 2.3 敲除 *Ubd* 缓解小鼠肝炎进程

### 2.3.1 肝脏特异性敲除 *Ubd* 减少小鼠肝脂质堆积

为深入研究 *Ubd* 在调控 MASH 中的作用, 设计并构建了由高脂高胆固醇饲料 (high-fat/high-cholesterol, HFHC) 诱导的 MASH 小鼠模型。构建 *Ubd* 肝脏特异性敲除小鼠, 并对敲除效率进行了检测 (图 4-A)。在造模前 4 周, 给小鼠尾静脉注射预先构建好的腺相关病毒, AAV8-*GFP* 作为对照组, AAV8-*Ubd*-sgRNA 作为实验组, 以特异性敲除小鼠肝脏中 *Ubd* 的表达。随后进行 16 周的 HFHC 造模, 并在造模结束后获取实验材料。对小鼠的血清样本进行血生化分析, 结果显示, 与对照组相比, 造模组小鼠血清 LDL-C 含

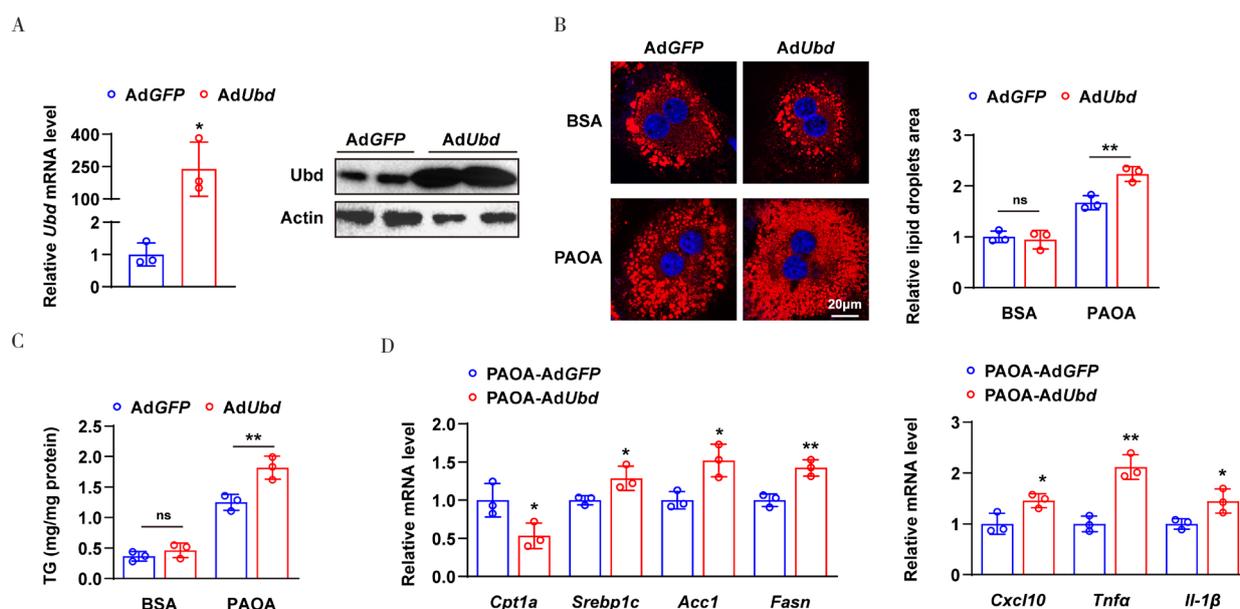


图2 体外过表达 *Ubd* 在代谢功能障碍相关脂肪性肝炎中的功能

Figure 2. The function of overexpression of *Ubd* in vitro model of metabolic dysfunction-associated steatohepatitis

注: A. 原代肝细胞中过表达 *Ubd* 效率检测结果; B. 过表达 *Ubd* 造模肝细胞尼罗红染色及定量结果 ( $\times 63$  倍) (3 次独立重复实验), 标尺 20  $\mu$ m; C. 原代肝细胞造模后 TG 表达水平 ( $n=3$ ); D. 检测过表达 *Ubd* 造模后脂质代谢及炎症相关因子的 mRNA 表达水平 (3 次独立重复实验)。ns, 无统计学意义; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

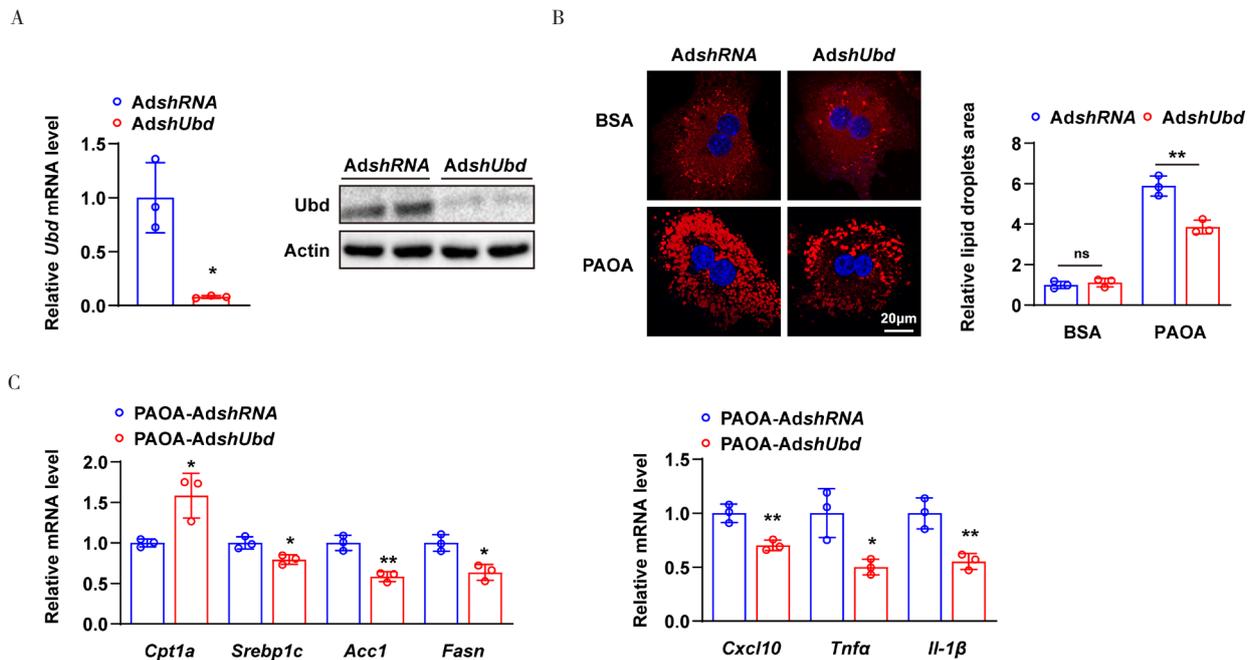


图3 体外敲低 *Ubd* 在代谢功能障碍相关脂肪性肝炎中的功能

Figure 3. The function of knockdown *Ubd* in vitro model of metabolic dysfunction-associated steatohepatitis

注：A. 原代肝细胞中敲低*Ubd*效率检测结果；B. 敲低*Ubd*造模肝细胞尼罗红染色及定量结果（×63倍）（3次独立重复实验）；C. 检测脂质代谢及验证相关因子的mRNA表达水平（ $n=3$ ）；ns, 无统计学意义；\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

量显著上升，而在造模组中敲除 *Ubd* 能够显著降低 LDL-C 含量，表明敲除 *Ubd* 具有降低 LDL-C 表达并缓解脂代谢紊乱的作用（图 4-B）。进一步对小鼠肝脏组织进行组织学分析，包括 HE 染色及 ORO 染色。HE 染色结果显示，HFHC 饲料喂养的小鼠肝脏脂肪变性程度明显高于正常对照组喂养且未敲除 *Ubd* 的小鼠。值得注意的是，在 HFHC 喂养的条件下，敲除 *Ubd* 小鼠与未敲除 *Ubd* 的小鼠相比，肝脏中的脂滴明显减少（图 4-C）。ORO 染色更直观地显示，HFHC 喂养且敲除 *Ubd* 的小鼠肝脏脂滴显著少于 HFHC 喂养但未敲除 *Ubd* 的小鼠（图 4-C）。

### 2.3.2 敲除 *Ubd* 能够缓解小鼠肝脏损伤

为深入研究敲除 *Ubd* 对小鼠肝脏损伤的影响，系统分析了小鼠的血清生化指标，通过对比正常饲料饲养（NC）与高脂高胆固醇饮食（HFHC）饲养条件下小鼠的血清样本，发现 HFHC 组的小鼠血浆中 ALT、AST、LDH 浓度均显著升高（图 4-D）。敲除 *Ubd* 表达后，ALT 与 AST 的水平均显著降低，表明敲除 *Ubd* 可能有效减缓肝脏的受损程度，并能够改善脂质造模引起的肝脏损伤。为更精准地评估 *Ubd* 在 MASH 发展中的作用，采用 PSR 染色和 IHC 染色对小

鼠肝脏组织进行组织病理学分析。染色结果显示，HFHC 诱导的小鼠肝脏表现出更严重的纤维化病变，炎症细胞数量更多，而在 HFHC 组中敲除 *Ubd* 的小鼠，其肝脏纤维化程度相较于未敲除 *Ubd* 的对照组有明显降低，炎症明显减轻（图 4-E）。

### 2.4 *Ubd* 显著抑制脂肪酸氧化，加重代谢功能障碍相关脂肪性肝炎进展

为了更深入地分析 *Ubd* 在小鼠原代肝细胞中对脂质代谢及炎症发生的影响，取 HFHC 造模组的小鼠肝脏组织，提取了小鼠肝脏组织 RNA，并进行 RNA-seq 测序。首先对两个组别进行主成分分析（principle component analysis, PCA），将数据去中心化（图 5-A）。对组中的差异基因进行基因集富集分析（gene set enrichment analysis, GSEA）发现，在小鼠 MASH 模型中敲除 *Ubd*，脂质代谢、炎症、纤维化及细胞死亡的关键通路均受到显著影响（图 5-B）。进一步通过基因本体论（Gene Ontology, GO）富集分析比较 HFHC-GFP 和 HFHC-*Ubd*-sgRNA 组，发现 *Ubd* 参与脂质代谢的生物学过程（图 5-C）。进一步对差异基因在细胞死亡、纤维化、炎症、脂质通路进行富集分析，结果显示，与敲除组相比，对照组

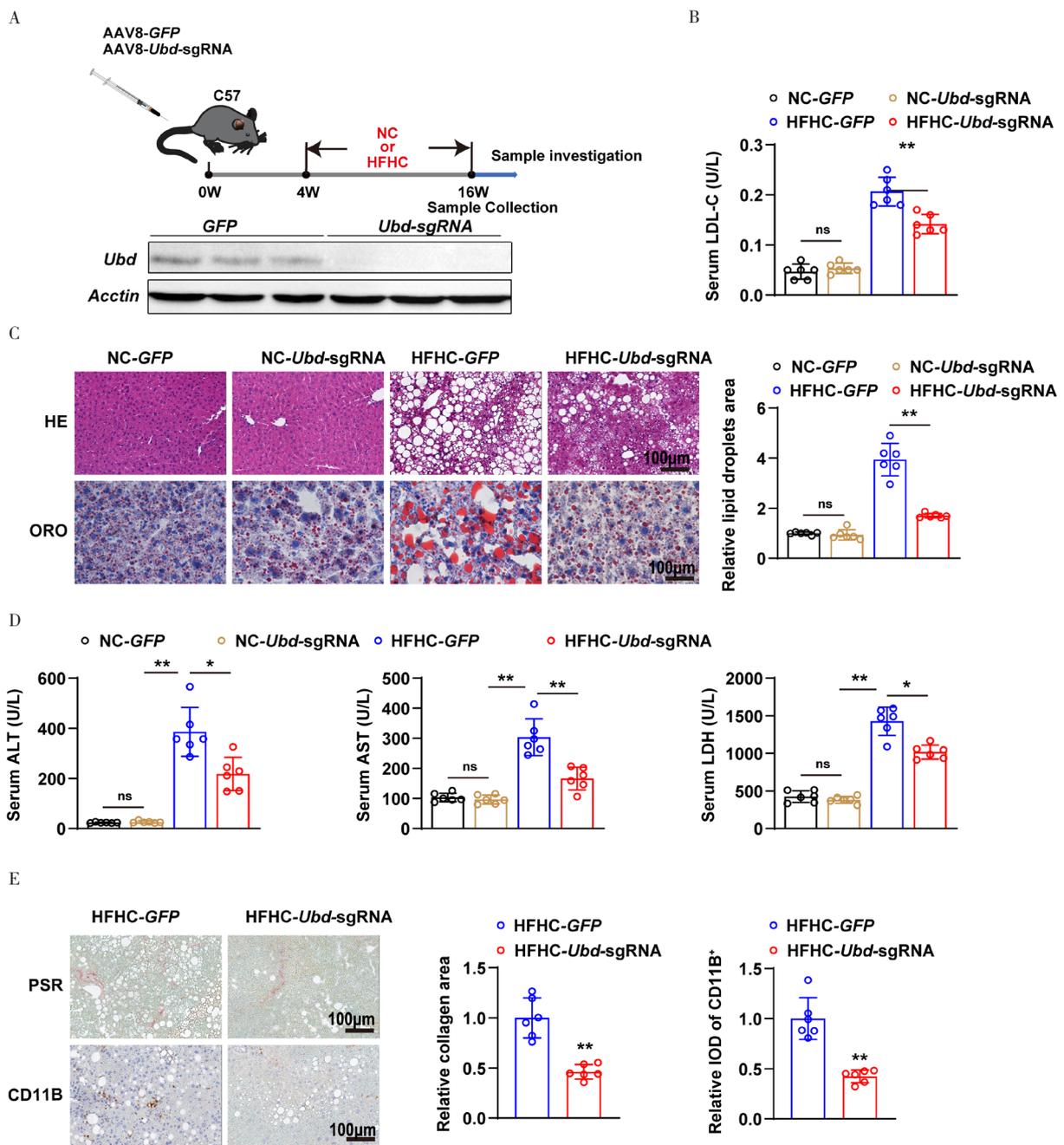


图4 敲除Ubd对小鼠肝细胞中脂质代谢及炎症应答的影响

Figure 4. The impact of *Ubd* knockout on fatty acid metabolism and inflammatory response in mouse liver tissue

注: A. 小鼠造模流程及敲除效率检测图; B. 小鼠血清中低密度脂蛋白胆固醇含量检测 ( $n=6$ ); C. 小鼠肝脏组织苏木精-伊红 (HE) 染色、油红O (ORO) 染色及定量结果 ( $\times 200$ 倍) ( $n=6$ ), 标尺100  $\mu\text{m}$ ; D. 小鼠血清中肝细胞损伤相关蛋白含量检测 ( $n=6$ ); E. 小鼠肝脏组织 PSR、IHC染色及定量结果 ( $\times 200$ 倍) ( $n=6$ ), 标尺100  $\mu\text{m}$ ; ns, 无统计学意义; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

在细胞死亡、脂质代谢、纤维化及炎症通路中显著富集, 这表明 *Ubd* 影响并参与到这些通路中 (图 5-D)。为了探究 *Ubd* 与炎症通路的关系, 对两组差异基因进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 分析, 富集了相关的功能通路, 结果显示, *Ubd* 与 WNT 信号通路、TNF 信号通路等炎

症通路呈现显著的相关性 (图 5-E)。通过抑制 *Ubd* 可以影响炎症通路, 从而延缓 MASH 疾病发展进程。进一步绘制参与脂肪酸代谢、细胞死亡、炎症的差异基因表达热图, 发现参与炎症的基因 *Illrn*、*Nupr1*、*Egr1*、*Osmr*、*Orm1* 等的表达下调, 参与脂肪酸合成相关的基因 *Dkk3*、*Egr1*、*Akr1b1* 等表达下调, 参与细胞死亡相关的基因 *Cd74*、

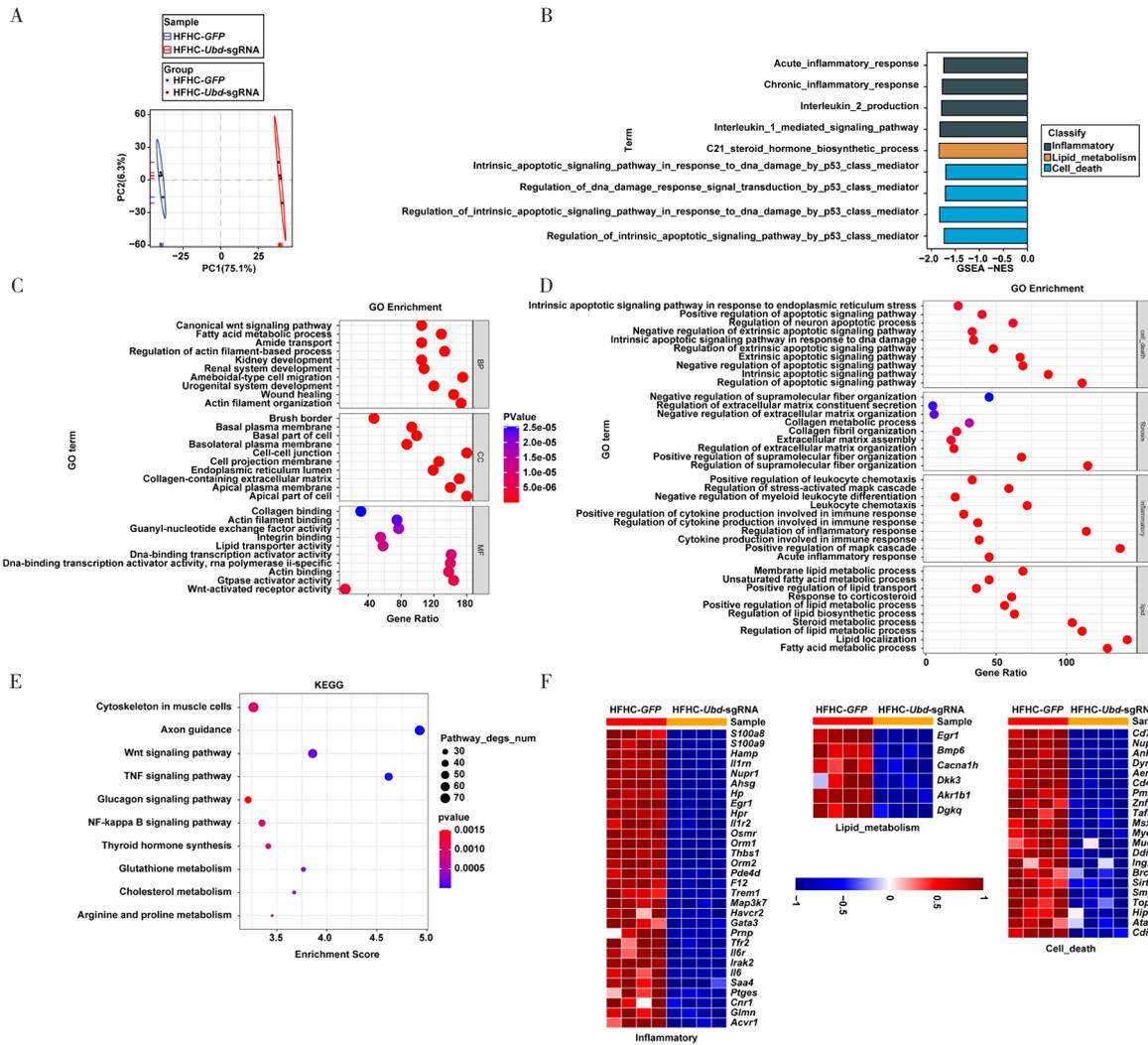


图5 Ubd影响的相关通路

Figure 5. Relevant pathways affected by Ubd

注: A. 对HFHC敲低的两组进行PCA聚类分析结果; B. HFHC-GFP组和HFHC-Ubd-sgRNA组差异基因富集的功能通路基因富集分析; C. 两组差异基因GO数据库在生物过程、细胞组分、分子功能的富集分析; D. 两组差异基因GO数据库通路比较分析; E. 两组差异基因经KEGG数据库分析后富集的功能通路; F. HFHC-GFP组和HFHC-Ubd-sgRNA组差异基因在脂质代谢、纤维化、炎症及细胞死亡相关通路的差异基因的表达变化。红色代表表达上调, 蓝色代表表达下调。

Nupr1、Dyk3、Aen、Cd44等表达下调, 结果显示, 敲除Ubd可能通过促进脂肪酸氧化, 抑制脂肪酸合成, 从而改善HFHC诱导的MASH。

### 3 讨论

MASH作为MASLD的一种进行性病理演变形态, 已成为全球范围内肝病发病的主要病因之一[36]。据估计, 中国成年人中MAFLD的患病率已达29.2%, 而MASH作为MAFLD中一种较严重的临床类型, 其患病率也随之增加[37]。MASH的临床表现通常涵盖了肝脏脂肪变性、炎症反应和纤维化过程, 若未能在疾病初期采取有效干预措施, 患者将面临肝细胞性肝癌(hepatocellular

carcinoma, HCC)、肝硬化等高风险并发症的威胁[38]。鉴于目前针对MASH的药物疗法手段较为有限, 深入探索该疾病的内在分子调控机制并挖掘其潜在治疗靶点, 对于开发新型治疗方案及策略具有重要意义[39]。

UBD作为一种泛素蛋白, 被发现于MASLD、MASH及HCC中有过表达状态[40-41]。本研究通过对多个小鼠和人类肝组织转录组数据集进行生物信息学分析, 从大量差异表达基因中筛选出UBD作为潜在研究靶点。对比正常小鼠与蛋氨酸、胆碱联合缺乏饲料(methionine- and choline deficient diet, MCD)小鼠、正常小鼠与HFHC饲养小鼠以及人类健康对照与MASH患者

的基因表达后,发现 *Ubd* 在 MASH 小鼠及患者中均显著上调。然而,目前对于 UBD 在脂质代谢中的报道较少。既往研究表明,UBD 可能通过调节脂质合成和影响相关代谢途径在 MASH 中发挥作用<sup>[42]</sup>。而本研究通过体内外实验均表明,UBD 对 MASH 疾病进程具有显著影响。在体外模型中,过表达 *Ubd* 可促进 PA/OA 刺激诱导的小鼠原代肝细胞脂质堆积及脂代谢相关基因的表达,敲低 *Ubd* 则能改善 PA/OA 诱导的肝细胞脂质堆积及脂代谢相关基因表达。在体内模型中,敲除 *Ubd* 可缓解 HFHC 饲料诱导的血脂代谢紊乱、肝功能损伤,同时减轻肝脏纤维化程度和炎症细胞浸润,提示肝脏特异性敲除 *Ubd* 能有效缓解 MASH 发展进程,提示 UBD 作为 MASH 及脂代谢相关疾病治疗靶点的潜力。

利用转录组学分析 UBD 潜在调控 MASH 的分子机制发现,UBD 可能通过影响脂肪酸代谢和炎症通路来调控 MASH 进程。一方面,敲除 *Ubd* 后,脂肪酸代谢途径显著激活,线粒体外膜上的 CPT I 是脂肪酸进入线粒体进行氧化分解的关键酶<sup>[43]</sup>。本研究中,降低 *Ubd* 在肝细胞中的水平后,参与脂肪酸降解的基因表达上调,脂肪酸合成相关基因表达下调,提示 UBD 在细胞中可能间接影响 CPT I 等脂肪酸氧化基因的转录,进而阻碍脂肪酸氧化途径。另一方面,UBD 与炎症反应紧密相连。在类风湿关节炎中,UBD 可通过激活 p38 MAPK 通路促进疾病进展<sup>[44]</sup>。过表达 UBD 会显著上调相关炎症因子的 mRNA 水平,敲低 UBD 则降低炎症因子 (*TNF $\alpha$* 、*CXCL10*、*IL-1 $\beta$* ) 的 mRNA 水平。同时,*Ubd* 过表达可刺激核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B),激活炎症通路,从而诱导炎症因子的产生,促进炎症反应的发生发展<sup>[45]</sup>。在 MASH 中,*Ubd* 可能通过影响巨噬细胞的功能和极化状态,进而影响炎症反应。UBD 还可能与巨噬细胞中的其他分子相互作用,调节其在 MASH 中的炎症反应<sup>[46]</sup>,提示 UBD 在 MASH 的发病过程中起着重要作用。通过生物信息学分析发现 *Ubd* 可能调控炎症通路,影响肝组织内 P53、MAPK、Wnt、Fc $\epsilon$ RI、TNF、JAK-STAT、NF- $\kappa$ B 等炎症信号通路,同时也影响了脂肪酸合成通路。表明 UBD 能够调控炎症相关基因表达影响细胞内炎症通路,并参与脂肪酸的代谢调控。目前认为,线粒体外膜上的 CPT I 能够将长链脂肪酸与肉碱结

合形成脂酰肉碱,从而使脂肪酸能够通过线粒体内膜上的转运体进入线粒体基质,为脂肪酸的氧化分解创造条件<sup>[47]</sup>。本研究中的 UBD 分子可能影响 CPT I 的转录,从而影响脂肪酸的氧化分解。脂肪生成相关基因 (*SREBP1c*、*FASN*、*ACCI*) 在 PA/OA 诱导的原代肝细胞中均与 *Ubd* 的转录表达水平呈正相关关系。这些证据都显示出研究 UBD 分子在调控脂质代谢方面的重要意义。在纤维化进展中,UBD 可能通过影响肝星状细胞的活化和增殖,参与肝纤维化的形成,从而加剧肝纤维化的发展,此外,UBD 可能参与调节细胞外基质的合成和降解,影响肝纤维化的程度<sup>[48]</sup>。UBD 在肝实质细胞与免疫细胞中作用的具体分子靶点及其下游效应分子有待进一步研究。本研究存在一定局限性:首先,体内研究缺乏肝细胞特异性 *Ubd* 过表达动物模型的验证,限制了对疾病阶段特异性功能的全面评估;其次,UBD 调控脂肪酸氧化的直接靶点及其具体的分子机制尚未完全阐明。

综上,本研究发现肝细胞 UBD 对 MASH 具有促进作用,其机制可能是通过抑制脂肪酸氧化分解加重 MASH。该发现为深入理解 MASH 发病机制并制定防治措施提供了理论依据。

## 参考文献

- 1 Carli F, Della Pepa G, Sabatini S, et al. Lipid metabolism in MASLD and MASH: from mechanism to the clinic[J]. JHEP Rep, 2024, 6(12): 101185. DOI: 10.1016/j.jhepr.2024.101185.
- 2 Huang DQ, El-Serag HB, Loomba R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(4): 223-238. DOI: 10.1038/s41575-020-00381-6.
- 3 Rinella ME, Neuschwander-Tetri BA, Siddiqui MS, et al. AASLD practice guidance on the clinical assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2023, 77(5): 1797-1835. DOI: 10.1097/HEP.000000000000323.
- 4 Younossi ZM, Alqahtani SA, Alswat K, et al. Global survey of stigma among physicians and patients with nonalcoholic fatty liver disease[J]. J Hepatol, 2024, 80(3): 419-430. DOI: 10.1016/j.jhep.2023.11.004.
- 5 Loomba R, Friedman SL, Shulman GI. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Cell, 2021, 184(10): 2537-2564. DOI: 10.1016/j.cell.2021.04.015.
- 6 Younossi ZM, Stepanova M, Ong J, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly increasing indication for liver transplantation in the United States[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2021, 19(3): 580-589. e5. DOI: 10.1016/j.cgh.2020.05.064.

- 7 Feng G, Hernandez-Gea V, Zheng MH. Resmetirom for MASH-related cirrhosis[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2024, 9(7): 594. DOI: [10.1016/S2468-1253\(24\)00124-9](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(24)00124-9).
- 8 Sabatini S, Sen P, Carli F, et al. Hepatic glucose production rises with the histological severity of metabolic dysfunction-associated steatohepatitis[J]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(11): 101820. DOI: [10.1016/j.xcrm.2024.101820](https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2024.101820).
- 9 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. DOI: [10.1172/JCI166149](https://doi.org/10.1172/JCI166149).
- 10 Steinberg GR, Valvano CM, De Nardo W, et al. Integrative metabolism in MASLD and MASH: pathophysiology and emerging mechanisms[J]. *J Hepatol*, 2025, 83(2): 584–595. DOI: [10.1016/j.jhep.2025.02.033](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2025.02.033).
- 11 Chen Z, Tian R, She Z, et al. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 152: 116–141. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025).
- 12 Musso G, Saba F, Cassader M, et al. Lipidomics in pathogenesis, progression and treatment of nonalcoholic steatohepatitis (NASH): recent advances[J]. *Prog Lipid Res*, 2023, 91: 101238. DOI: [10.1016/j.plipres.2023.101238](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2023.101238).
- 13 Harrison SA, Loomba R, Dubourg J, et al. Clinical trial landscape in NASH[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2023, 21(8): 2001–2014. DOI: [10.1016/j.cgh.2023.03.041](https://doi.org/10.1016/j.cgh.2023.03.041).
- 14 Gallage S, Ali A, Barragan Avila JE, et al. A 5:2 intermittent fasting regimen ameliorates NASH and fibrosis and blunts HCC development via hepatic PPAR $\alpha$  and PCK1[J]. *Cell Metab*, 2024, 36(6): 1371–1393. e7. DOI: [10.1016/j.cmet.2024.04.015](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2024.04.015).
- 15 Llovet JM, Willoughby CE, Singal AG, et al. Nonalcoholic steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma: pathogenesis and treatment[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20(8): 487–503. DOI: [10.1038/s41575-023-00754-7](https://doi.org/10.1038/s41575-023-00754-7).
- 16 Liao J, Xie X, Wang N, et al. Formononetin promotes fatty acid  $\beta$ -oxidation to treat non-alcoholic steatohepatitis through SIRT1/PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\alpha$  pathway[J]. *Phytomedicine*, 2024, 124: 155285. DOI: [10.1016/j.phymed.2023.155285](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.155285).
- 17 Bates J, Vijayakumar A, Ghoshal S, et al. Acetyl-CoA carboxylase inhibition disrupts metabolic reprogramming during hepatic stellate cell activation[J]. *J Hepatol*, 2020, 73(4): 896–905. DOI: [10.1016/j.jhep.2020.04.037](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.037).
- 18 Hu M, Zhang D, Xu H, et al. Salidroside activates the AMP-activated protein kinase pathway to suppress nonalcoholic steatohepatitis in mice[J]. *Hepatology*, 2021, 74(6): 3056–3073. DOI: [10.1002/hep.32066](https://doi.org/10.1002/hep.32066).
- 19 Yang P, Gao S, Shen J, et al. TRIM21-mediated ubiquitination of SQSTM1/p62 abolishes its Ser403 phosphorylation and enhances palmitic acid cytotoxicity[J]. *Autophagy*, 2025, 21(1): 178–190. DOI: [10.1080/15548627.2024.2394308](https://doi.org/10.1080/15548627.2024.2394308).
- 20 Shen B, Feng H, Cheng J, et al. Geniposide alleviates non-alcohol fatty liver disease via regulating Nrf2/AMPK/mTOR signalling pathways[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(9): 5097–5108. DOI: [10.1111/jcmm.15139](https://doi.org/10.1111/jcmm.15139).
- 21 Chen H, Tao L, Liang J, et al. Ubiquitin D promotes the progression of rheumatoid arthritis via activation of the p38 MAPK pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2023, 27(2): 53. DOI: [10.3892/mmr.2023.12940](https://doi.org/10.3892/mmr.2023.12940).
- 22 Negi H, Ravichandran A, Dasgupta P, et al. Plasticity of the proteasome-targeting signal Fat10 enhances substrate degradation[J]. *Elife*, 2024, 13: e91122. DOI: [10.7554/eLife.91122](https://doi.org/10.7554/eLife.91122).
- 23 Liu X, Ge J, Chen C, et al. FAT10 protects against ischemia-induced ventricular arrhythmia by decreasing Nedd4-2/Nav1.5 complex formation[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 25. DOI: [10.1038/s41419-020-03290-3](https://doi.org/10.1038/s41419-020-03290-3).
- 24 Guo Y, Wu H, Wiesmüller L, et al. Canonical and non-canonical functions of p53 isoforms: potentiating the complexity of tumor development and therapy resistance[J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(6): 412. DOI: [10.1038/s41419-024-06783-7](https://doi.org/10.1038/s41419-024-06783-7).
- 25 White J, Suklabaidya S, Vo MT, et al. Multifaceted roles of TAX1BP1 in autophagy[J]. *Autophagy*, 2023, 19(1): 44–53. DOI: [10.1080/15548627.2022.2070331](https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2070331).
- 26 Zellner S, Schifferer M, Behrends C. Systematically defining selective autophagy receptor-specific cargo using autophagosome content profiling[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(6): 1337–1354. e8. DOI: [10.1016/j.molcel.2021.01.009](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.01.009).
- 27 Liu XM, Wang ZH, Wei QX, et al. Equol exerts anti-tumor effects on choriocarcinoma cells by promoting TRIM21-mediated ubiquitination of ANXA2[J]. *Biol Direct*, 2024, 19(1): 78. DOI: [10.1186/s13062-024-00519-5](https://doi.org/10.1186/s13062-024-00519-5).
- 28 Wu X, Qian L, Zhao H, et al. CXCL12/CXCR4: an amazing challenge and opportunity in the fight against fibrosis[J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 83: 101809. DOI: [10.1016/j.arr.2022.101809](https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101809).
- 29 Wang X, He Q, Zhou C, et al. Prolonged hypernutrition impairs TREM2-dependent efferocytosis to license chronic liver inflammation and NASH development[J]. *Immunity*, 2023, 56(1): 58–77. e11. DOI: [10.1016/j.immuni.2022.11.013](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.11.013).
- 30 Tacke F, Puengel T, Loomba R, et al. An integrated view of anti-inflammatory and antifibrotic targets for the treatment of NASH[J]. *J Hepatol*, 2023, 79(2): 552–566. DOI: [10.1016/j.jhep.2023.03.038](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.03.038).
- 31 Chen H, Liang B, Luo X, et al. IKBIP might be a potential prognostic biomarker for glioblastoma multiforme[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 118: 110030. DOI: [10.1016/j.intimp.2023.110030](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110030).
- 32 Duan X, Li H, Wang M, et al. PSMC2/ITGA6 axis plays critical role in the development and progression of hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 217. DOI: [10.1038/s41420-021-00585-y](https://doi.org/10.1038/s41420-021-00585-y).
- 33 Li Z, Zhang B, Liu Q, et al. Genetic association of lipids and lipid-lowering drug target genes with non-alcoholic fatty liver disease[J]. *EBioMedicine*, 2023, 90: 104543. DOI: [10.1016/j.ebiom.2023.104543](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104543).

- 34 An Y, Liu W, Yang Y, et al. Identification and validation of a novel nine-gene prognostic signature of stem cell characteristic in hepatocellular carcinoma[J]. *J Appl Genet*, 2025, 66(1): 127–140. DOI: [10.1007/s13353-024-00850-7](https://doi.org/10.1007/s13353-024-00850-7).
- 35 Wu X, Zhou S, Wang L, et al. Circ\_103809 aggravates the malignant phenotype of pancreatic cancer through modulating miR-197-3p/TSPAN3 axis[J]. *Mol Biotechnol*, 2024, 66(9): 2455–2466. DOI: [10.1007/s12033-023-00874-0](https://doi.org/10.1007/s12033-023-00874-0).
- 36 Man S, Deng Y, Ma Y, et al. Prevalence of liver steatosis and fibrosis in the general population and various high-risk populations: a nationwide study with 5.7 million adults in China[J]. *Gastroenterology*, 2023, 165(4): 1025–1040. DOI: [10.1053/j.gastro.2023.05.053](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2023.05.053).
- 37 Zhou J, Zhou F, Wang W, et al. Epidemiological features of NAFLD from 1999 to 2018 in China[J]. *Hepatology*, 2020, 71(5): 1851–1864. DOI: [10.1002/hep.31150](https://doi.org/10.1002/hep.31150).
- 38 Yip TC, Fan JG, Wong VW. China's fatty liver crisis: a looming public health emergency[J]. *Gastroenterology*, 2023, 165(4): 825–827. DOI: [10.1053/j.gastro.2023.06.008](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2023.06.008).
- 39 Lou TW, Yang RX, Fan JG. The global burden of fatty liver disease: the major impact of China[J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2024, 13(1): 119. DOI: [10.21037/hbsn-23-556](https://doi.org/10.21037/hbsn-23-556).
- 40 Wimalaratne MM, Wilkerson-Vidal QC, Hunt EC, et al. The case for FAT10 as a novel target in fatty liver diseases[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 972320. DOI: [10.3389/fphar.2022.972320](https://doi.org/10.3389/fphar.2022.972320).
- 41 Zhang Y, Zuo Z, Liu B, et al. FAT10 promotes hepatocellular carcinoma (HCC) carcinogenesis by mediating P53 degradation and acts as a prognostic indicator of HCC[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2021, 12(4): 1823–1837. DOI: [10.21037/jgo-21-374](https://doi.org/10.21037/jgo-21-374).
- 42 Tsouka S, Kumar P, Seubnooch P, et al. Transcriptomics-driven metabolic pathway analysis reveals similar alterations in lipid metabolism in mouse MASH model and human[J]. *Commun Med (Lond)*, 2024, 4(1): 39. DOI: [10.1038/s43856-024-00465-3](https://doi.org/10.1038/s43856-024-00465-3).
- 43 Deja S, Fletcher JA, Kim CW, et al. Hepatic malonyl-CoA synthesis restrains gluconeogenesis by suppressing fat oxidation, pyruvate carboxylation, and amino acid availability[J]. *Cell Metab*, 2024, 36(5): 1088–1104. e12. DOI: [10.1016/j.cmet.2024.02.004](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2024.02.004).
- 44 Chen H, Tao L, Liang J, et al. Ubiquitin D promotes the progression of rheumatoid arthritis via activation of the p38 MAPK pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2023, 27(2): 53. DOI: [10.3892/mmr.2023.12940](https://doi.org/10.3892/mmr.2023.12940).
- 45 Arshad M, Abdul Hamid N, Chan MC, et al. NUB1 and FAT10 proteins as potential novel biomarkers in cancer: a translational perspective[J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2176. DOI: [10.3390/cells10092176](https://doi.org/10.3390/cells10092176).
- 46 Iwata A, Maruyama J, Natsuki S, et al. Egr2 drives the differentiation of Ly6Chi monocytes into fibrosis-promoting macrophages in metabolic dysfunction-associated steatohepatitis in mice[J]. *Commun Biol*, 7(1): 681. DOI: [10.1038/s42003-024-06357-5](https://doi.org/10.1038/s42003-024-06357-5).
- 47 Dong J, Li M, Peng R, et al. ACACA reduces lipid accumulation through dual regulation of lipid metabolism and mitochondrial function via AMPK-PPAR $\alpha$ -CPT1A axis[J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 196. DOI: [10.1186/s12967-024-04942-0](https://doi.org/10.1186/s12967-024-04942-0).
- 48 Zheng W, Guan F, Xu G, et al. FAT10 silencing prevents liver fibrosis through regulating SIRT1 expression in hepatic stellate cells[J]. *Int J Med Sci*, 2023, 20(4): 557–565. DOI: [10.7150/ijms.77367](https://doi.org/10.7150/ijms.77367).

收稿日期: 2025 年 03 月 03 日 修回日期: 2025 年 07 月 19 日

本文编辑: 张 苗 黄 笛

引用本文: 江长锦, 张家兴, 田瑞锋, 等. 类泛素分子UBD通过抑制脂肪酸氧化加重代谢功能障碍相关脂肪性肝炎的机制研究[J]. 数理医药学杂志, 2025, 38(8): 581–594. DOI: [10.12173/j.issn.1004-4337.202503006](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-4337.202503006).

Jiang CJ, Zhang JX, Tian RF, et al. The mechanism of the ubiquitin-like molecule UBD exacerbating metabolic dysfunction-associated steatohepatitis by inhibiting fatty acid oxidation[J]. *Journal of Mathematical Medicine*, 2025, 38(8): 581–594. DOI: [10.12173/j.issn.1004-4337.202503006](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-4337.202503006).