论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201502051

过表达 MORC2 通过下调 p53 含量抑制 L02 肝细胞脂肪变性

王 涛,雷增杰,王 斌,李 青,王春华,刘 琴,魏艳玲,王 军,陈东风 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科)

[摘要] **目的** 研究过表达 MORC2 对人 L02 肝细胞脂肪变性程度的影响及可能机制。**方法** 利用慢病毒转染技术在 L02 肝细胞中过表达 MORC2,qRT-PCR 及 Western blot 鉴定过表达效果后,对 L02 肝细胞进行脂肪变性诱导,测定细胞甘油三酯(triglyceride,TG)含量并比较过表达前后 L02 肝细胞的脂肪蓄积程度;利用芯片技术对过表达 MORC2 前后的基因表达谱进行检测与 Pathway 分析,筛选过表达 MORC2 时发生变化的通路并选择对脂代谢有调控作用的 p53 进行研究; Western blot 检测在 L02 肝细胞脂肪变性诱导时过表达 MORC2 对 p53 蛋白含量的影响;在过表达 MORC2 的基础上对 L02 肝细胞过表达 p53,qRT-PCR 及 Western blot 鉴定 p53 过表达效果后,通过 TG 测定观察过表达 p53 对过表达 MORC2 改变的 L02 肝细胞脂肪蓄积程度产生的影响。**结果** qRT-PCR 及 Western blot 证明过表达 MORC2 成功;过表达 MORC2 的 L02 肝细胞在脂肪变性诱导后 TG 含量较 MORC2 正常表达的 L02 肝细胞明显降低($P<0.01$);基因表达谱芯片及 Pathway 分析显示脂代谢调控相关的 p53 通路在过表达 MORC2 后发生变化;Western blot 显示过表达 MORC2 后,L02 肝细胞中 p53 蛋白水平在脂肪变性诱导前后均降低;qRT-PCR 及 Western blot 验证 p53 过表达成功,且过表达 p53 可部分解除 MORC2 对 L02 肝细胞脂肪变性的缓解作用。**结论** 过表达 MORC2 可通过下调 p53 从而缓解肝细胞脂肪变性。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝病;脂肪变性;L02 肝细胞;MORC2;p53

[中图法分类号] R394-33;R394.2;R575.5 [文献标志码] A

Over-expression of MORC2 attenuates steatosis in L02 hepatocytes by down-regulating p53

Wang Tao, Lei Zengjie, Wang Bin, Li Qing, Wang Chunhua, Liu Qin, Wei Yanling, Wang Jun, Chen Dongfeng (Department of Gastroenterology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of microrchidia family CW-type zinc finger 2 (MORC2) over-expression on steatosis of immortalized hepatocyte line L02 and explore the potential mechanism. **Methods** MORC2 was over-expressed in L02 hepatocytes by lentivirus transfection, and then examined by qRT-PCR and Western blotting. Intracellular triglyceride (TG) was measured to evaluate cellular steatosis. A microarray chip was adopted to analyze related signaling pathways in the MORC2 over-expression process. Over-expression of p53 in the MORC2-over-expressed L02 hepatocytes was confirmed by qRT-PCR and Western blotting, and the effect of p53 over-expression on lipid accumulation was observed by measuring TG. **Results** Both qRT-PCR and Western blot data validated that MORC2 was over-expressed in the transfected L02 hepatocytes. Steatosis was significantly alleviated by MORC2 over-expression ($P<0.01$). The microarray chip data revealed that lipometabolism-related p53 pathway was changed after MORC2 over-expression. Western blot results demonstrated that p53 protein was down-regulated after MORC2 over-expression. Moreover, over-expression of p53 partially increased steatosis in the MORC2-over-expressed L02 hepatocytes. **Conclusion** MORC2 attenuates steatosis of L02 hepatocytes partially by down-regulating

[基金项目] 国家自然科学基金(81170382)

[通信作者] 陈东风,E-mail: chendf1981@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150327.1435.033.html(2015-03-27)

p53 expression.

[**Key words**] nonalcoholic fatty liver disease; steatosis; L02 hepatocyte; MORC2; p53

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81170382). Corresponding author: Chen Dongfeng, E-mail: chendf1981@126.com

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)指除外酒精等明确肝损伤因素导致的一组肝代谢性疾病,以弥漫性肝细胞脂肪变性为主要病理特征。现我国成人NAFLD患病率已达到20%[1],已接近高脂饮食为主的西方国家水平[2]。NAFLD已成为全球性的重大公共健康问题;又因NAFLD具有进展为肝硬化、肝功能衰竭及原发性肝癌等严重肝脏疾病的可能性[3],引起人们广泛关注。

MORC2(microrchidia family CW-type zinc finger 2,也称ZCWCC1)在精原细胞分裂、DNA甲基化及异染色质形成过程中发挥重要作用[4-6],也可在前脂肪细胞中参与能量代谢与分化的调控[7]。肝细胞脂肪变性是NAFLD的病理基础,由于前脂肪细胞的分化过程与肝细胞的脂肪变性过程均有成脂基因激活、脂肪蓄积等共性,故上述发现为我们的研究提供了重要的理论基础。肿瘤抑制蛋白p53可在转录水平触发细胞周期阻滞或凋亡,值得关注的是,最近研究表明p53还可以通过调控脂代谢[8-9],在NAFLD发生中起重要作用[10-12]。

我们在前期研究中发现L02肝细胞在发生脂肪变性时,MORC2蛋白含量下降,提示MORC2蛋白可能参与L02肝细胞的脂肪变性过程[13]。故在前期实验的基础上,我们拟进一步观察MORC2蛋白对L02肝细胞脂肪变性的影响,初步探讨MORC2是否可以通过p53参与肝细胞脂肪变性的发生,以期为NAFLD的发病机制研究提供更多的实验证据。

1 材料与方法

1.1 材料

L02肝细胞购于中科院上海细胞库。空载慢病毒及过表达MORC2的慢病毒购自上海生博公司,对照及过表达p53的pCMV-XL5质粒购于Origene公司。胎牛血清、青链霉素、高糖DMEM培养基、0.25%胰蛋白酶均购于HyClone公司,油酸购于Sigma-Aldrich公司,细胞TG含量测定试剂盒购于北京普利莱公司,蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE上样缓冲液及凝胶配制试剂盒购于碧云天公司,兔抗人p53抗体购于Cell signal technologies公司,HRP标记的山羊抗鼠及抗兔抗体、鼠抗人β-actin抗体购自中杉金桥公司,RIPA裂解液及TRIzol试剂、Iipofectamine2000购买于Life techologies公司,反转录试剂盒及SYBR Green荧光定量PCR试剂盒购于TaKaRa公司,ECL化学发光试剂盒及PVDF膜购自Millipore公司。基因表达谱芯片检测服务由上海康成公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 L02肝细胞培养于含10%胎牛血清和1%青链霉素的高糖DMEM培养基中,孵箱湿度为95%,温度为37 ℃。根据细胞生长速度于汇合度至90%时传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 L02肝细胞分组及脂肪变性模型的诱导 实验分组:①野生型L02肝细胞组(L02-WT组);②转染空病毒的L02肝细胞组(L02-ctrl组);③转染MORC2过表达病毒的L02肝细胞组(L02-MORC2组);再根据是否进行脂肪变性诱导,分为诱导组与未诱导组。

将L02肝细胞以2×10^5/孔的密度铺于6孔板中,贴壁后用高糖DMEM培养基饥饿24 h。将无游离脂肪酸的BSA按1%的比例用高糖DMEM培养基溶解并无菌过滤,替换6孔板中原培养基。未诱导组细胞以此方案培养,诱导组细胞则向培养基中加入终浓度为0.5 mmol/L的无菌油酸并培养24 h[13-15]。

1.2.3 慢病毒与质粒转染 将培养的L02肝细胞消化计数后按2×10^4/孔铺于12孔板中,贴壁后将空载病毒及MORC2过表达病毒分别加至培养基中,同时加入终浓度为8 μg/mL的聚凝胺,混匀后弃去L02培养孔内原先培养基,加入病毒液转染24 h后用浓度为1 μg/mL的嘌呤霉素对细胞筛选,之后换为普通培养基继续培养。对照及过表达p53的pCMV-XL5质粒转染按Life techologies公司Lipofectamine2000说明书进行。

1.2.4 细胞总RNA提取与荧光定量PCR 将培养基吸去,按TRIzol试剂说明书进行细胞总RNA提取,并以30 μL体系将RNA反转录为cDNA。随后照TaKaRa定量PCR试剂盒说明书操作进行荧光定量PCR检测,检测体系为25 μL,95 ℃预温5 min,随后进行95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s和72 ℃ 15 s的扩增,共40个循环,最后72 ℃延伸2 min,测定溶解曲线。引物序列:MORC2正义链:5′-GGAGGTTCCTTCTCCCAAAGTC-3′,反义链:5′-CAGAAACTGCGACACTCCGCTT-3′,产物长度110 bp;p53正义链:5′-CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG-3′,反义链:5′-TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC-3′,产物长度128 bp;β-actin:正义链:5′-CCACGAAACTACCTTCAACTCC-3′,反义链:5′-GTGA-

TCTCCTTCTGCATCCTGT-3′,产物长度 132 bp。结果以 Ct 值表示,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因相对表达量,β-actin 为内参。

1.2.5 细胞 TG 含量测定 去除培养基后 6 孔板中每孔加入 100 μL 细胞裂解液,40 min 后 7 000 r/min 4 ℃离心 5 min,取 5 μL 上清进行蛋白浓度测定,余下的上清在 70 ℃水浴 10 min 后加入显色液并 37 ℃孵育 10 min,在 550 nm 处测定光密度[D(550)],按标准曲线计算 TG 含量后,除以蛋白浓度,得到标化的细胞 TG 含量。

1.2.6 基因表达谱芯片 采用 Roche 公司 NimbleGen 12×135K 人类基因表达谱芯片对 L02-ctrl 组及 L02-MORC2 组中细胞表达基因进行检测,每组实验重复 3 次,并基于 KEGG 数据库,对表达差异基因进行 Pathway 分析。

1.2.7 细胞蛋白提取与 Western blot 检测 在 4 ℃环境下使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液进行蛋白提取。提取结束后,加入上样缓冲液并煮沸 5 min 及测定浓度。照说明书配制 SDS-PAGE 浓缩胶及 10% 的分离胶。每孔蛋白上样量为 50 μg,以浓缩胶 60 V,分离胶 110 V 的电压进行电泳;并以 100 V、70 min 的条件进行转膜,8% 脱脂奶粉封闭 2 h 后一抗 4 ℃孵育过夜(p53 抗体稀释比例为 1∶1 000,MORC2 为 1∶5 000,β-actin 为 1∶1 000),TBST 洗膜 3 次后室温下孵育二抗 2 h,再次 TBST 洗膜,最后 ECL 显影。以 β-actin 为内参。

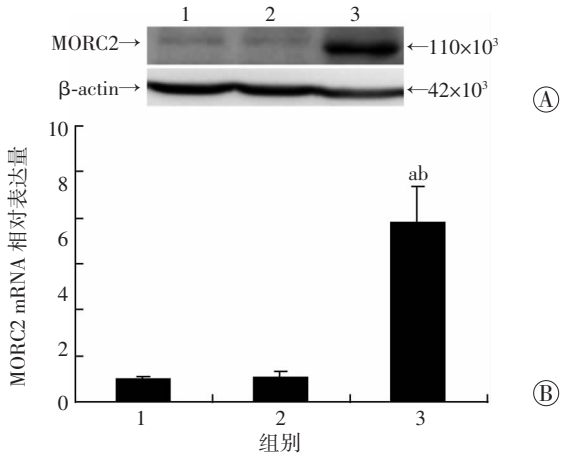
1.3 统计学处理

采用 StepOne 软件分析 qRT-PCR 结果,使用 Image J 软件测量 Western blot 条带灰度值,数据采用 SPSS 18.0 软件进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验进行两组间均数的比较,采用单因素方差分析与 LSD 法进行多组间均数的比较。

2 结果

2.1 L02 肝细胞过表达 MORC2 的效果鉴定

qRT-PCR 检测结果显示,MORC2 的 mRNA 相对表达量在 L02-WT 组与 L02-ctrl 组中无明显差别[L02-WT 组(1.00 ± 0.12)、L02-ctrl 组(1.11 ± 0.20),P > 0.05],而 L02-MORC2 组较前两组明显上升[L02-WT 组(1.00 ± 0.12)、L02-ctrl 组(1.11 ± 0.20)、L02-MORC2 组(7.81 ± 1.59),P < 0.01]。在 Western blot 检测中,可见 L02-MORC2 组的 MORC2 含量较另两组明显增加[L02-WT 组(118.71 ± 2.37)、L02-ctrl 组(123.20 ± 3.83)、L02-MORC2 组(224.61 ± 10.92),P < 0.01]。证明 MORC2 慢病毒载体构建及转染成功、过表达 MORC2 的 L02 肝细胞系成功建立(图 1)。

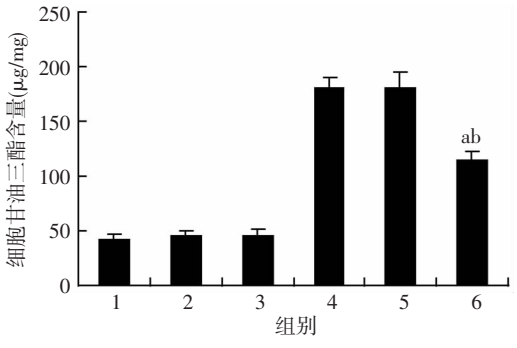


1:L02-WT 组;2:L02-ctrl 组;3:L02-MORC2 组 A:Western blot 检测结果;B:qRT-PCR 检测 MORC2 mRNA 相对表达量 a:P < 0.01,与 L02-WT 组比较,b:P < 0.01,与 L02-ctrl 组比较

图 1 MORC2 的过表达效果鉴定

2.2 过表达 MORC2 对 L02 肝细胞脂肪变性的影响

我们已在前期实验中对 L02 肝细胞脂肪变性模型的构建方法及效果进行了鉴定[13,15]。在未进行脂肪变性诱导培养时,3 组细胞的 TG 含量无明显差异[L02-WT 组(41.84 ± 5.29),L02-ctrl 组(45.01 ± 5.51),L02-MORC2 组(45.75 ± 6.06),P > 0.05]。而经过脂肪变性诱导后,3 组细胞的 TG 含量均较未进行脂肪变性诱导时明显上升,但 L02-MORC2 组的 TG 含量上升幅度与 L02-WT 组及 L02-ctrl 组相比均明显减少[L02-WT 组(180.68 ± 9.04)、L02-ctrl 组(180.31 ± 14.88)、L02-MORC2 组(115.16 ± 7.59),P < 0.01],而 L02-WT 组与 L02-ctrl 组之间的 TG 含量无明显差别[L02-WT 组(180.68 ± 9.04),L02-ctrl 组(180.31 ± 14.88),P > 0.05,图 2]。以上结果提示过表达 MORC2 可减轻 L02 肝细胞在脂肪变性诱导后的 TG 蓄积程度。



1:L02-WT 未诱导组;2:L02-ctrl 未诱导组;3:L02-MORC2 未诱导组;4:L02-WT 诱导组;5:L02-ctrl 诱导组;6:L02-MORC2 诱导组 a:P < 0.01,与 L02-WT 诱导组比较;b:P < 0.01,与 L02-ctrl 诱导组比较

图 2 过表达 MORC2 对 L02 肝细胞脂肪变性的影响

2.3　基因表达谱芯片结果中 MORC2 可能影响的通路

Roche NimbleGen 12×135K 人类基因表达谱芯片涵盖了 45 033 个来自包括 NCBI 在内的权威数据库的基因。与 L02-ctrl 组细胞相比，L02-MORC2 组中发生变化的、表达差异大于 2 倍的基因共 1 736 个。从根据它们进行通路聚类后的 Pathway 分析结果来看，MORC2 可能影响的通路包括 Hippo、p53、TGF-β、MAPK 及一些肿瘤相关通路（图 3）。

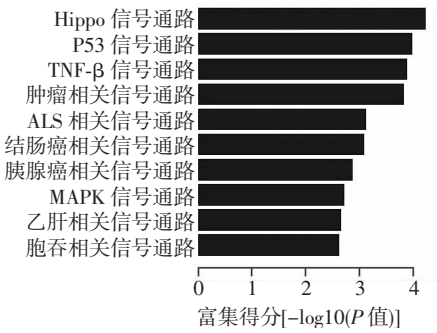
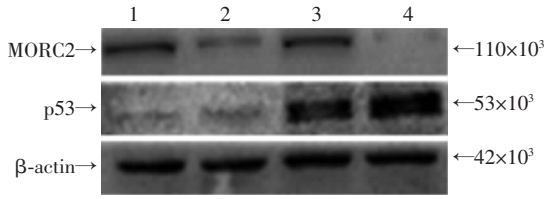


图 3　基因表达谱芯片结果中 MORC2 可能影响的通路

2.4　过表达 MORC2 对 L02 肝细胞中 p53 蛋白水平的影响

Western blot 检测结果显示，未经脂肪变性诱导时，L02-MORC2 未诱导组细胞中的 p53 蛋白含量低于 L02-ctrl 未诱导组［L02-MORC2 未诱导组（112.65 ± 3.06）、L02-ctrl 未诱导组（134.19 ± 4.43），$P<0.01$］；而在脂肪变性诱导后，p53 蛋白含量均比未诱导时明显上升，且 L02-MORC2 诱导组 p53 蛋白含量仍低于 L02-ctrl 诱导组［L02-MORC2 诱导组（194.33 ± 1.80）、L02-ctrl 诱导组（234.69 ± 2.64），$P<0.01$，图 4］。MORC2 可下调 L02 肝细胞中 p53 的蛋白水平，进一步提示 MORC2 减轻肝细胞脂肪变性的作用可能与降低 p53 表达有关，故我们拟通过上调 p53 表达，观察是否能减弱 MORC2 的这种作用。



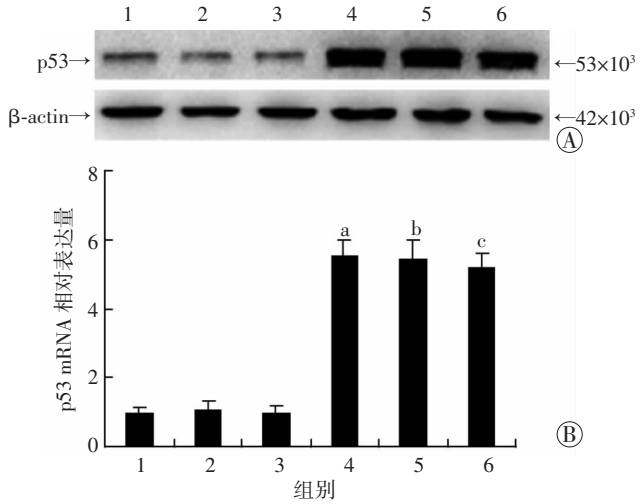
1：L02-MORC2 未诱导组，2：L02-ctrl 未诱导组，3：L02-MORC2 诱导组，4：L02-ctrl 诱导组

图 4　过表达 MORC2 对 L02 肝细胞中 p53 蛋白水平的影响

2.5　L02 肝细胞过表达 p53 的效果鉴定

qRT-PCR 检测结果显示，在转染对照质粒 pCMV-XL5-ctrl 时，p53 的 mRNA 的相对表达量在 L02-WT 组、L02-ctrl 组及 L02-MORC2 组中无明显差别［L02-WT 组（1.00 ± 0.15）、L02-ctrl 组（1.17 ± 0.24）、L02-MORC2 组（1.04 ± 0.22），$P>0.05$］；在转染 p53 过表达质粒 pCMV-XL5-p53 时，各组 MORC2 在转录水平均较转染对照质粒时明显上升［L02-WT 组（1.00 ± 0.15）、（5.57 ± 0.42），L02-ctrl 组（1.07 ± 0.24）、（5.47 ± 0.53），L02-MORC2 组（0.96 ± 0.22）、（5.19 ± 0.39），$P<0.01$］。但各组间无明显差别［L02-WT 组（5.57 ± 0.42）、L02-ctrl 组（5.47 ± 0.53）、L02-MORC2 组（5.19 ± 0.39），$P>0.05$］。

Western blot 检测结果显示，可见转染对照质粒 pCMV-XL5-ctrl 的 3 组细胞中，L02-MORC2 组的 p53 蛋白水平较 L02-WT 组、L02-ctrl 组降低［L02-WT 组（139.54 ± 5.51）、L02-ctrl 组（131.28 ± 6.27）、L02-MORC2 组（119.63 ± 3.20），$P<0.05$］；转染 p53 过表达质粒 pCMV-XL5-p53 时，各组 p53 的蛋白水平较转染对照质粒时明显上升［L02-WT 组（139.54 ± 5.51）、（236.04 ± 3.90），L02-ctrl 组（131.28 ± 6.27）、（234.52 ± 4.66），L02-MORC2 组（119.63 ± 3.20）、（224.02 ± 3.59），$P<0.01$］。但 L02-MORC2 组中 p53 水平较另两组略低［L02-WT 组（236.04 ± 3.90），L02-ctrl 组（234.52 ± 4.66），L02-MORC2 组（224.02 ± 3.59），$P<0.05$］。进一步提示 p53 的蛋白含量可被过表达 MORC2 降低（图 5）。



1、4：L02-WT 组；2、5：L02-ctrl 组；3、6：L02-MORC2 组；1～3：转染 pCMV-XL5-ctrl，4～6：转染 pCMV-XL5-p53
A：Western blot 检测结果；B：qRT-PCR 检测结果　a：$P<0.01$，与转染 pCMV-XL5-ctrl 的 L02-WT 组比较；b：$P<0.01$，与转染 pCMV-XL5-ctrl 的 L02-ctrl 组比较；c：$P<0.01$，与转染 pCMV-XL5-ctrl 的 L02-MORC2 组比较

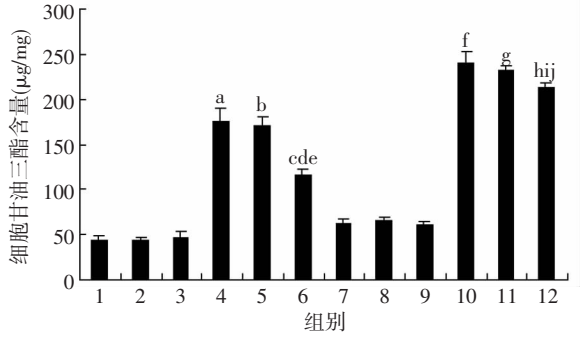
图 5　p53 的过表达效果鉴定

2.6　过表达 p53 对 MORC2 减轻 L02 肝细胞脂肪变性效应的影响

在细胞 TG 含量测定中，正常表达 p53 时，L02-WT

组、L02-ctrl 组、L02-MORC2 组细胞经诱导后，TG 含量均较未脂肪变性诱导时明显增加[L02-WT 组(43.69 ± 4.31)、(175.50 ± 14.08)、L02-ctrl 组(43.46 ± 3.74)、(171.68 ± 8.47)、L02-MORC2 组(46.78 ± 5.85)、(115.69 ± 7.24)，$P<0.01$]，但 L02-MORC2 组的增加幅度最小，且与 L02-WT 组及 L02-ctrl 组相比，有显著性差异[L02-WT 组(175.50 ± 14.08)、L02-ctrl 组(171.68 ± 8.47)、L02-MORC2 组(115.69 ± 7.24)，$P<0.01$]。

在过表达 p53 时，脂肪变性诱导后 L02-WT 组、L02-ctrl 组、L02-MORC2 组细胞内 TG 含量均较未脂肪变性诱导时显著增加[L02-WT 组(62.99 ± 3.78)、(240.12 ± 12.50)、L02-ctrl 组(65.52 ± 4.13)、(233.23 ± 3.95)、L02-MORC2 组(61.50 ± 2.51)、(213.68 ± 4.28)，$P<0.01$]，但 L02-MORC2 组与 L02-WT 组及 L02-ctrl 组相比，虽有显著性差异[L02-WT 组(240.12 ± 12.50)、L02-ctrl 组(233.23 ± 3.95)、L02-MORC2 组(213.68 ± 4.28)，$P<0.05$]，但 L02-MORC2 组的 TG 含量已明显恢复，并接近 L02-ctrl 组水平。以上结果提示上调 p53 后可部分解除过表达 MORC2 对 L02 肝细胞脂肪变性的减轻作用，即 MORC2 减轻肝细胞脂肪变性的过程可能与 p53 有关(图 6)。



1、7：L02-WT 未诱导组；2、8：L02-ctrl 未诱导组；3、9：L02-MORC2 未诱导组；4、10：L02-WT 诱导组；5、11：L02-ctrl 诱导组；6、12：L02-MORC2 诱导组；1～6：p53 正常表达，7～12：p53 过表达　a：$P<0.01$，与 1 组比较；b：$P<0.01$，与 2 组比较；c：$P<0.01$，与 3 组比较；d：$P<0.01$，与 4 组比较；e：$P<0.01$，与 5 组比较；f：$P<0.01$，与 7 组比较；g：$P<0.01$，与 8 组比较；h：$P<0.01$，与 9 组比较；i：$P<0.01$，与 10 组比较；a：$P<0.01$，与 11 组比较

图 6　TG 含量测定过表达 p53 对 MORC2 减轻 L02 肝细胞脂肪变性效应的影响

3　讨论

Hippo 信号通路主要参与肿瘤细胞的增殖[16]，尚未发现其与脂代谢的联系；TGF-β 主要参与细胞增殖、分化的调控[17]。而 p53 通路作为本基因表达谱芯片中变化最显著的通路之一，且 p53 与脂代谢关系密切，故我们选用研究 p53 通路代表分子 p53 来解释 L02 肝细胞脂肪变性在过表达 MORC2 后减轻的现象。

NAFLD 发病机制的研究已成为近年来肝病领域的重要热点，但它的机制还未完全阐明。肝细胞的脂肪变性可使肝细胞对损伤因素更为敏感，同时也是向肝脏不可逆损伤进展的关键环节[18]。MORC2 是在前脂肪细胞中新近发现的脂代谢调控分子[7]，但 MORC2 的具体调控方式也可能因组织及细胞不同而有所区别[13]。故我们在前期实验的基础上进一步研究 MORC2 调控肝细胞脂代谢的机制，具有重要意义。

在我们的前期研究中，发现 MORC2 在 L02 肝细胞脂肪变性过程中蛋白含量降低，且该下降趋势随脂肪变性程度加重而更为明显[13]。故我们推测 MORC2 可能参与了 L02 肝细胞脂肪变性的过程。本实验中我们使用了慢病毒对 MORC2 进行过表达，发现 MORC2 可减轻 L02 肝细胞的脂肪变性，即对 L02 肝细胞的脂肪变性起保护作用。为寻找可能受 MORC2 影响的分子或通路，我们进行了基因表达谱芯片检测及 Pathway 分析。在过表达 MORC2 后，包括 p53 在内的多个通路关键分子发生改变。这些结果不仅提示了 MORC2 功能的多样性，更为我们后续的研究奠定了基础。

Derdak 等[19]发现部分抑制 p53 的活性即可显著减少高脂饮食喂养小鼠的肝脏脂肪变性，认为 p53 在 NAFLD 的发展中至关重要；Tomita 等[12]对 NAFLD 模型的 $p53^{-/-}$ 小鼠及野生型小鼠对比时发现，前者的肝脏脂肪变性减轻；以上研究结果提示 p53 对 NAFLD 的形成有重要作用。由于 p53 是细胞对内外各种刺激的感受分子，无论是 NAFLD 患者血液中的高水平游离脂肪酸还是脂肪变性诱导中使用的油酸对肝细胞都可以看作是一种刺激因素，故肝细胞中的 p53 可能在接受游离脂肪酸刺激的过程中发生活化，改变肝细胞的脂代谢稳态并引发肝细胞脂肪变性。而且，我们利用基因表达谱芯片及 pathway 分析观察到 p53 通路在过表达 MORC2 后发生了明显变化。因此，我们倾向用 p53 通路的代表分子 p53 来解释 MORC2 减轻脂肪蓄积的效应。在我们的实验中还发现 L02 肝细胞中 p53 的蛋白水平在过表达 MORC2 后发生下调，同时 MORC2 也能使脂肪变性诱导后上升的 p53 蛋白水平得到明显下降，并发现上调 p53 可部分解除 MORC2 减轻脂肪变性的效果。我们的这些研究结果进一步提示 p53 参与了 MORC2 缓解肝细胞脂肪蓄积的过程。由于 p53 的蛋白含量主要受泛素-蛋白酶体途径调控，在肝细胞脂肪变性中，p53 蛋白与泛素分子结合减少，降解受到抑制，造成了 p53 蛋白含量的上升，引发 TG 蓄积等后续

效应[20]；我们推测，MORC2可能与p53分子结合，改变后者的空间结构，使更多泛素化修饰位点暴露，最终使p53蛋白通过泛素-蛋白酶体途径降解增加、含量降低。但此推测仍需在后续实验中通过IP进行验证。我们也观察到，上调p53并不能完全解除MORC2对脂肪变性的缓解作用，提示在MORC2对脂代谢的调控过程中，仍有其他机制参与，同样需要在后续研究中进一步探讨。由于目前对MORC2的研究仅处于起步阶段，MORC2对脂肪代谢的调控机制仍有许多未知之处需要探索，这也导致了目前尚不能将MORC2的研究成果直接用于临床，需要进一步研究。

本研究发现，过表达MORC2可减轻NAFLD体外模型中L02肝细胞的脂肪变性程度，并可减少此过程中p53的蛋白含量，且上调p53可部分解除过表达MORC2对肝细胞脂肪变性产生的保护效应。结合前期实验及本研究中的结果，我们推测在L02肝细胞脂肪变性过程中，由于MORC2蛋白含量的减少，失去对p53的抑制性调控，使肝细胞脂代谢稳态失衡，发生脂肪变性。我们的研究结果提示MORC2可通过下调p53从而缓解肝细胞脂肪变性，这可能是NAFLD治疗的一个潜在干预靶点，值得深入研究。

参考文献：

[1] Speliotes E K, Massaro J M, Hoffmann U, *et al*. Fatty liver is associated with dyslipidemia and dysglycemia independent of visceral fat: the Framingham Heart Study [J]. Hepatology, 2010, 51(6): 1979 - 1987.

[2] Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, *et al*. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Dig Dis, 2010, 28(1): 155 - 161.

[3] Laguna J C, Alegret M, Roglans N. Simple sugar intake and hepatocellular carcinoma: epidemiological and mechanistic insight[J]. Nutrients, 2014, 6(12): 5933 - 5954.

[4] Liu Z W, Shao C R, Zhang C J, *et al*. The SET domain proteins SUVH2 and SUVH9 are required for Pol V occupancy at RNA-directed DNA methylation loci[J]. PLoS Genet, 2014, 10(1): e1003948.

[5] Inoue N, Hess K D, Moreadith R W, *et al*. New gene family defined by MORC, a nuclear protein required for mouse spermatogenesis[J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(7): 1201 - 1207.

[6] Moissiard G, Cokus S J, Cary J, *et al*. MORC family ATPases required for heterochromatin condensation and gene silencing[J]. Science, 2012, 336(6087): 1448 - 1451.

[7] Sanchez-Solana B, Li D Q, Kumar R. Cytosolic functions of MORC2 in lipogenesis and adipogenesis[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(2): 316 - 326.

[8] Lu X. Tied up in loops: positive and negative autoregulation of p53[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010, 2(5): a000984.

[9] Vousden K H, Ryan K M. p53 and metabolism[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(10): 691 - 700.

[10] Xie F, Jia L, Lin M, *et al*. ASPP2 attenuates triglycerides to protect against hepatocyte injury by reducing autophagy in a cell and mouse model of non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(1): 155 - 164.

[11] Castro R E, Ferreira D M, Afonso M B, *et al*. miR-34a/SIRT1/p53 is suppressed by ursodeoxycholic acid in the rat liver and activated by disease severity in human non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Hepatol, 2013, 58(1): 119 - 125.

[12] Tomita K, Teratani T, Suzuki T, *et al*. p53/p66Shc-mediated signaling contributes to the progression of non-alcoholic steatohepatitis in humans and mice[J]. J Hepatol, 2012, 57(4): 837 - 843.

[13] 王涛，雷增杰，王斌，等. ZCWCC1蛋白在L02肝细胞脂肪变性中的表达变化[J]. 第三军医大学学报，2015，37(2)：89 - 94.

[14] Ricchi M, Odoardi M R, Carulli L, *et al*. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(5): 830 - 840.

[15] 熊吉，王军，樊丽琳，等. Sigma-1受体在非酒精性脂肪性肝病中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报，2011，33(8)：800 - 803.

[16] Saucedo L J, Edgar B A. Filling out the Hippo pathway[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(8): 613 - 621.

[17] 王权，戚华兵，王晓凤，等. 阻断TGF-β/TGF-βRⅠ通路对ATDC5细胞增殖、分化及细胞外基质的影响[J]. 第三军医大学学报，2013，35(10)：917 - 921.

[18] Day C. Pathogenesis of steatohepatitis[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2002, 16(5): 663 - 678.

[19] Derdak Z, Villegas K A, Harb R, *et al*. Inhibition of p53 attenuates steatosis and liver injury in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Hepatol, 2013, 58(4): 785 - 791.

[20] Hock A K, Vigneron A M, Carter S, *et al*. Regulation of p53 stability and function by the deubiquitinating enzyme USP42[J]. EMBO J, 2011, 30(24): 4921 - 4930.

（**收稿**：2015-02-08；**修回**：2015-03-05）

（编辑　王　红）