

基础研究

LASS2 通过诱导 mtROS 激活自噬抑制胆固醇合成改善非酒精性脂肪肝脂代谢紊乱

余荣静¹, 李小玉¹, 赵 丽¹, 凌 东², 杨 艳^{1,3}

(1. 遵义医科大学 检验医学院, 贵州 遵义 563006; 2. 遵义医科大学附属医院 普通外科, 贵州 遵义 563000; 3. 遵义医科大学附属医院 医学检验科, 贵州 遵义 563000)

[摘 要] 目的 明确人源长寿保障基因(*LASS2*)过表达或敲低在非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)中的作用,并初步探讨其分子机制。方法 采用高脂饮食(HFD)喂养 C57BL/6J 小鼠建立 NAFLD 动物模型,游离脂肪酸(FFAs)诱导小鼠原代肝细胞(MPHs)脂肪变性。通过腺病毒载体在体内外构建 *LASS2* 过表达或敲低模型,检测各组小鼠肝重、肝脏脂肪含量、血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)及肝脏 TG、TC 水平。采用 Western blot 检测胆固醇代谢及自噬通路相关蛋白表达水平;利用 MitoSOX™ Red 探针标记活细胞成像检测线粒体活性氧(mtROS)水平。结果 与对照组相比,HFD 诱导后小鼠肝重、血清 ALT、AST、TG、TC、HDL-C、LDL-C 及肝脏 TG、TC 水平均显著升高,而 *LASS2* 过表达可明显降低上述指标($P < 0.05$)。RT-qPCR 及 Western blot 结果显示,*LASS2* 过表达显著抑制 SREBP2 及 HMGCR 的 mRNA 和蛋白表达水平($P < 0.05$)。活细胞成像显示,*LASS2* 过表达诱导 mtROS 生成增加($P < 0.05$)。Western blot 结果显示,*LASS2* 过表达显著上调 LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin-1、ATG3、ATG5、ATG7 蛋白表达水平,同时下调 p62 蛋白表达($P < 0.05$)。*LASS2* 敲低则产生相反的效应。结论 *LASS2* 可能通过诱导 mtROS 生成激活自噬,进而抑制胆固醇合成,改善脂代谢紊乱,为 NAFLD 的治疗提供潜在新靶点。

[关键词] 人源长寿保障基因;非酒精性脂肪性肝病;胆固醇代谢;自噬;活性氧

[中图分类号] R575.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-8159(2026)06-0587-09

LASS2 improves lipid metabolism of non-alcoholic fatty liver disease by inducing mtROS to activate autophagy and suppress cholesterol synthesis

Yu Rongjing¹, Li Xiaoyu¹, Zhao Li¹, Ling Dong², Yang Yan^{1,3}

(1. School of Laboratory Medicine, Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou 563006, China; 2. Department of General Surgery, The Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou 563000, China; 3. Department of Laboratory Medicine, The Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou 563000, China)

[Abstract] **Objective** To determine the role of longevity assurance homolog 2(*LASS2*) overexpression or knock-down in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and to explore the underlying molecular mechanisms. **Methods** NAFLD was induced in C57BL/6J mice by feeding a high-fat diet (HFD). Mouse primary hepatocytes (MPHs) were treated with free fatty acids (FFAs) to establish steatosis, *LASS2* was overexpressed or knocked down both in vivo and in vitro using adenovirus vectors. Liver weight, hepatic fat content, and serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), as well as hepatic TG and TC levels were measured in each group. Western blot was used to detect protein levels related to cholesterol metabolism and the autophagic pathway. Imaging of live cells labelled with the MitoSOX™ Red probe to detect levels of mitochondrial reactive oxygen species (mtROS). **Results** Compared with controls, HFD-fed mice showed significant increases in liver weight, and serum levels of ALT, AST, TG, TC, HDL-C,

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(NO:81960494)。

[通信作者] 杨艳,女,博士,主任技师,硕士生导师,研究方向:肿瘤代谢、糖脂代谢,E-mail:yanyangzmu@163.com。

and LDL-C, as well as hepatic TG and TC levels ($P < 0.05$). Overexpression of *LASS2* markedly reduced all these parameters ($P < 0.05$). RT-qPCR and Western blot revealed that *LASS2* overexpression strongly suppressed SREBP2 and HMGCR at both mRNA and protein levels ($P < 0.05$). Live-cell imaging showed that *LASS2* overexpression increased mtROS production ($P < 0.05$). Western blot further demonstrated that *LASS2* overexpression raised the LC3-II/LC3-I ratio and the protein levels of Beclin-1, ATG3, ATG5, and ATG7, while decreasing p62 expression ($P < 0.05$). Knockdown of *LASS2* produced the opposite effects. **Conclusion** *LASS2* may activate autophagy by promoting mtROS production, thereby suppressing cholesterol synthesis and improving lipid metabolism disorders. These findings suggest *LASS2* as a potential new therapeutic target for NAFLD.

[**Key words**] longevity assurance homolog 2; non-alcoholic fatty liver disease; cholesterol metabolism; autophagy; reactive oxygen species

近年来,随着社会发展和人们生活方式的改变,非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)患病率持续上升,目前全球患病率约为25%。该病以肝脏游离胆固醇积累为特征^[1],需排除其他导致肝脏脂肪变性的病因,如病毒性脂肪性肝炎、自身免疫性肝炎和药物诱发的肝损伤等^[2]。NAFLD 涵盖了一系列肝脏病变,如良性脂肪变和非酒精性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH),后者可进展为肝硬化和肝细胞癌^[3],这意味着该疾病存在潜在的进行性。此外,NAFLD 不仅累及肝脏,还与乳腺癌及2型糖尿病等疾病的患病风险增加相关^[4-5],造成了巨大的社会和经济负担。

研究表明,NAFLD 是一种多因素参与的慢性疾病,其发病机制与肝脏甘油三酯聚积、炎症细胞因子、线粒体功能障碍、代谢紊乱、胰岛素抵抗以及肠道菌群失调有关^[6-8],但仍未完全阐明。脂质代谢紊乱被认为是 NAFLD 发生的核心驱动环节^[9],肥胖、胰岛素抵抗、糖尿病和血脂异常都是其危险因素^[10],其中胆固醇稳态对维持脂代谢稳态至关重要,在 NAFLD 发病中发挥着关键作用。然而,NAFLD 病因治疗存在一定的局限性,且治疗费用高昂,逆转周期较长,已经成为影响患者生活质量的全球性疾病^[11]。值得关注的是,如果在疾病早期及时干预,可有效阻止 NAFLD 向肝硬化甚至肝癌进展,同时降低治疗成本,缩短疾病周期。因此,深入了解胆固醇的调控机制,对于寻找 NAFLD 的有效治疗靶点具有重要意义。

线粒体作为物质和能量代谢的核心,在肝脏中含量极为丰富,占肝脏体积的13%~20%,同时也是 mtROS 产生的主要部位^[12]。mtROS 作为信号分子,能够调节多个信号通路,包括自噬。自噬是一种在所有真核生物中保守的细胞过程,负责降解功能失调的细胞器或大分子胞质分子^[13]。越来越多的研究证明,自噬在脂质代谢中发挥着关键作

用,其通过促进储存的胆固醇外排清除脂滴及调节胆固醇代谢^[14-15],从而维持脂代谢稳态。

人源长寿保障基因2(longevity assurance homolog 2, *LASS2*)是神经酰胺合成酶家族成员之一,主要催化超长链神经酰胺的合成。神经酰胺作为重要的脂质信号分子,参与细胞生长、分化、衰老和凋亡等过程。*LASS2* 主要在肝脏中表达。有研究报道,敲除 *LASS2* 能够改善 HFD 诱导的小鼠肝脂肪变性^[16];而 Raichur 等^[17]报道 *LASS2* 单倍体不足可增加饮食诱导的脂肪性肝炎的易感性。由此可见,*LASS2* 在 NAFLD 中的功能具有复杂性,其机制有待进一步阐明。本研究在 NAFLD 动物及细胞模型中对 *LASS2* 进行过表达和敲低,结果显示,过表达 *LASS2* 可改善肝脂肪变性,而敲低 *LASS2* 加重肝脂肪变性,其作用机制可能与“mtROS-自噬-胆固醇代谢”信号轴有关。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 小鼠原代肝细胞(MPHs)从健康 C57BL/6J 雄性小鼠分离、培养获得。

1.1.2 实验动物 6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠购自北京华阜康生物科技有限公司。动物实验经遵义医科大学实验动物福利伦理委员会审查批准(NO:伦审[2019]2-230),所有操作均严格遵循准则要求。

1.1.3 主要试剂及耗材 45% 高脂饲料(江苏美迪森生物医药有限公司);普食饲料(江苏省协同医药生物工程有限责任公司);96 孔板及 T25(美国 Costar 公司);无菌针头式过滤器(无锡 NEST 生物科技有限公司);乙酸(上海麦克林生化科技有限公司);200 目的细胞网筛(美国 BD 公司);DMEM/F-12 基础培养基(美国 Sigma 公司);胎牛血清(澳大利亚 AusGeneX 公司);胶原蛋白 I、改良 HE 染色试剂盒、DEPC 水及青链霉素混合液

(北京索莱宝科技有限公司); QPCR 引物(大连宝生物工程有限公司); MitoSOX™ Red probe(美国 Invitrogen 公司); Hoechst 33342 活细胞染色液(上海碧云天生物技术有限公司); PrimeScript™ RT reagent Kit; TB Green® Premix Ex Taq™ II 及 RNAiso Plus(北京宝日医生物技术有限公司); PAGE 凝胶速制备试剂盒; 抗体稀释液及蛋白上样缓冲液(上海雅酶生物科技有限公司); PVDF 膜(美国 Millipore 公司); LASS2 多克隆抗体及 p62 单克隆抗体(英国 Abcam 公司); GAPDH 单克隆抗体(杭州华安生物技术有限公司); Beclin-1 单克隆抗体; LC3A/B 单克隆抗体; Atg5 单克隆抗体; Atg3 单克隆抗体及 Atg7 单克隆抗体(美国 CST 公司); 总胆固醇(total cholesterol, TC) 含量检测试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 测定试剂盒、总胆固醇测定试剂盒、甘油三酯(triglyceride, TG) 测定试剂盒、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT) 检测试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 测定试剂盒及天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST) 检测试剂盒(美国 Beckman 公司); TG 及 TC 含量检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物实验造模及分组 6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠共 30 只, 适应性喂养 1 周后随机分成 5 组: 普食组(ChD)和高脂喂养 4 组(HFD1 ~ HFD4)。所有小鼠喂养 16 周, 定期称体质量。高脂喂养的 4 组小鼠在 16 周后分别尾静脉注射不同的 AAV-TBG 病毒: HFD1 组注射 AAV-TBG-GFP, 记为 HFD-Vector 组; HFD2 组注射 AAV-TBG-LASS2-GFP, 记为 HFD-mLASS2 组; HFD3 组注射 AAV-TBG-sh-control, 记为 HFD-sh NC 组; HFD4 组注射 AAV-TBG-sh mLASS2, 记为 HFD-sh mLASS2 组。注射 4 周后处死小鼠, 取血清和肝组织进行后续实验。

1.2.2 MPHs 细胞实验造模及分组 取 8 周龄 C57BL/6J 小鼠, 麻醉后开腹, 经导管针灌注灌注液后将肝脏剪下, 撕碎后过筛, 4 ℃ 下 50 × g 离心纯化细胞。台盼蓝染色计数后, 按 3.0 × 10⁵ 个细胞/mL 的密度接种到包被了鼠尾胶原蛋白 I 的培养板上。1 h 后换液, 接着再培养 4 h。使用 CK-18 抗体对 MPHs 细胞进行鉴定, 阳性细胞呈棕黄色或棕褐色, 纯度在 95% 以上即为分离成功。

MPHs 细胞采用 240 μmol/L FFAs(油酸: 棕榈酸 = 2:1) 处理 24 h 诱导脂肪变性, 各组分别加入

polybrene 置于培养箱孵育 20 ~ 25 min 后加入病毒, 6 h 后更换新鲜培养基继续培养至 48(过表达)或 72 h(敲低), 提取 RNA 或蛋白, RT-qPCR 和 Western blot 验证感染效率。实验分组情况如下: 阴性对照组(NC 组)、过表达空载组(Adv-GFP, Vector 组)、LASS2 过表达组(Adv-mLASS2-GFP, LASS2-OE 组)、敲低空载组(Adv-sh control, sh-NC 组)、LASS2 敲低组(Adv-shLASS2, sh-LASS2 组)共 5 组。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR) 采用 Trizol 提取试剂盒抽提肝组织总 RNA、定量并使用 PrimeScript™ RT reagent Kit(Perfect Real Time) 试剂盒逆转录, 采用 SYBR Green 法进行 RT-qPCR 反应, 引物序列如表 1 所示。

表 1 RT-qPCR 引物序列

引物名称	方向	引物序列
LASS2	正向	5'-CATCGTTTTCATCATCACTCG-3'
	反向	5'-TCACTGCGTTCATCTTCTATC-3'
GAPDH	正向	5'-GTGTTCTACCCCAATGTGT-3'
	反向	5'-ATTGTCATACCAGGAATGAGCTT-3'
SREBP2	正向	5'-TGAAGACTTACTCATGGGAC-3'
	反向	5'-CGCAGCTTGTGATTGACCT-3'
HMGCR	正向	5'-TCGTTAGCACTGGTCCAGGAA-3'
	反向	5'-GGCTCCATCATTTGGCTCTGTA-3'

1.2.4 Western blot 提取肝细胞及肝组织总蛋白, 经定量、变性、冷却后, 进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后转膜, 用脱脂奶粉室温封闭 PVDF 膜 2 h, 随后使用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。加入一抗后 4 ℃ 孵育过夜(稀释比例参照厂家说明书)。次日, 用 TBST 洗去一抗, 洗涤 3 次, 每次 10 min, 接着加入二抗, 室温孵育 2 h(稀释比例参照厂家说明书), TBST 充分洗涤后显影。

1.2.5 血清生化指标测定 各组小鼠禁食空腹后经眼眶取血, 立即分离血清, 使用全自动生化分析仪(型号 AU5821)对生化指标 ALT、AST、TG、TC、HDL-C、LDL-C 进行检测。其中, TG 采用甘油磷酸氧化酶-过氧化物酶(GPO-POD)法, TC 采用酶法, HDL-C 及 LDL-C 均采用直接法检测, ALT 和 AST 分别采用乳酸脱氢酶法和苹果酸脱氢酶法测定。

1.2.6 活细胞成像 收集经病毒感染 48 或 72 h 后的 MPHs 细胞, HBSS 缓冲液洗涤 2 次, 加入 MitoSOX™ Red 工作液于 37 ℃ 细胞培养箱避光孵育 20 min。孵育结束后使用 HBSS 缓冲液洗涤细胞, 按照 Hoechst 33342 与培养基比例为 1:100 的比例配制 Hoechst 33342 工作液, 加入 Hoechst 33342 工作液对细胞核进行复染, 5 ~ 10 min 后用 HBSS 缓冲液洗涤

细胞 3 次,于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.2.7 HE 染色 取小鼠肝脏组织固定后进行常规石蜡包埋、切片。石蜡切片经二甲苯 I、II 各脱蜡 10 min,接着放入无水乙醇 I、II 中各 5 min,梯度乙醇(95%、80%、70%)各浸泡 5 min,蒸馏水冲洗 5 min。苏木素染色 6 min,水洗 10 s;分化液处理 5 s 后水洗;接着放入返蓝液返蓝 30 s 后水洗;伊红染色 2 min,水洗 5 s;随后依次经 95% 乙醇 I、II 各 5 min,无水乙醇 I、II 各 5 min,二甲苯 I、II 各 5 min 脱水,自然晾干后中性树胶封片,显微镜下观察并拍照。

1.2.8 肝脏组织 TG 测定 称取 100 mg 小鼠肝脏组织,加入 1 mL 预冷的正庚烷与异丙醇混合试剂(1:1,V/V)进行冰浴匀浆,在 4 °C 条件下 $8\,000\times g$ 离心 10 min 后取上清进行后续实验。按照试剂盒说明书配制反应体系,反应完成后于 420 nm 波长处测定吸光度。以 BCA 法对蛋白含量进行测定并计算每克肝脏组织蛋白中 TG 含量。

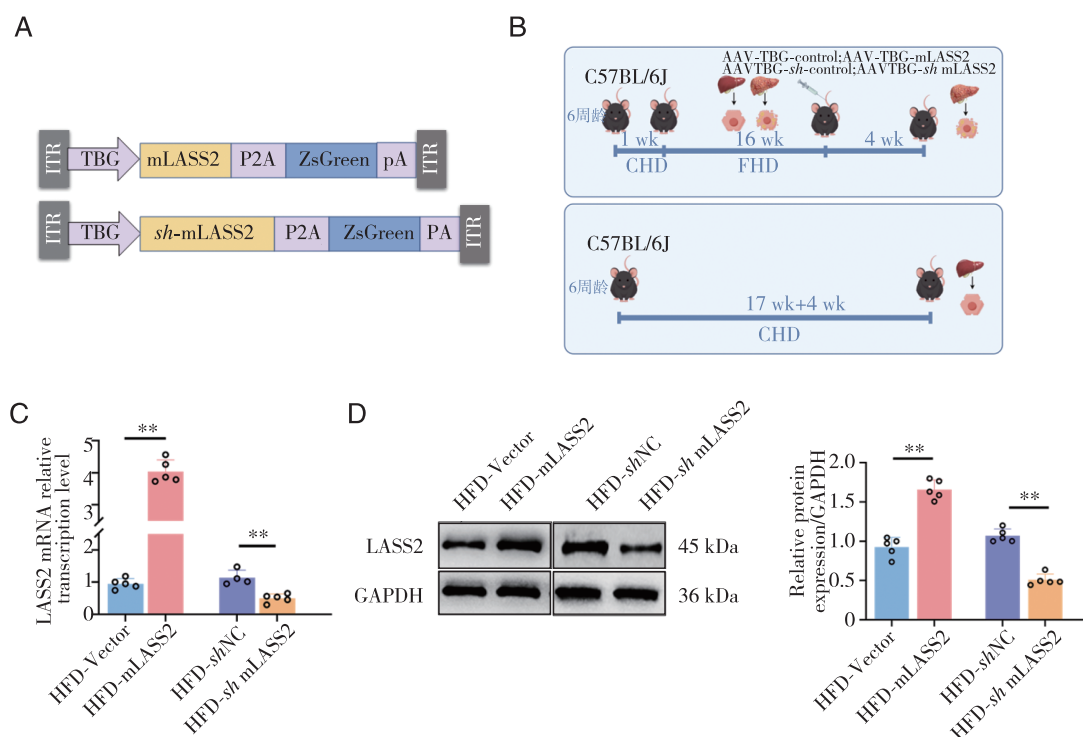
1.2.9 肝脏组织 TC 测定 称取 100 mg 小鼠肝脏组织,加入 1 mL 异丙醇进行冰浴匀浆,在 4 °C 条件下 $10\,000\times g$ 离心 10 min 后取上清进行后续实验。按照试剂盒说明书配制反应体系,反应完成后于 500 nm 波长处测定吸光度。以 BCA 法对蛋白含量

进行测定并计算每克肝脏组织蛋白中 TC 含量。

1.3 统计学分析 运用 SPSS 29.0、GraphPad Prism、Figdraw 对数据进行分析与作图,服从正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较选取独立样本 t 检验;多组比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),若组间差异具有统计学意义,则进一步采用 Bonferroni 法进行两两比较。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LASS2 敲低及过表达动物实验模型的构建与验证 HFD 喂养小鼠分别经尾静脉注射 AAV-TBG-sh-control、AAV-TBG-sh mLASS2、AAV-TBG-GFP、AAV-TBG-mLASS2-GFP 重组 AAV-TBG 表达载体(图 1A),4 周后收集肝脏组织(图 1B)。采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测肝组织 LASS2 表达水平,结果显示,与 HFD-Vector 组相比,HFD-mLASS2 组 LASS2 mRNA 和蛋白水平均显著升高;与 HFD-shNC 组相比,HFD-shLASS2 组 LASS2 mRNA 和蛋白水平均显著降低($P<0.01$,图 1C、D),提示 HFD 诱导小鼠 LASS2 敲低及过表达动物实验模型构建成功。

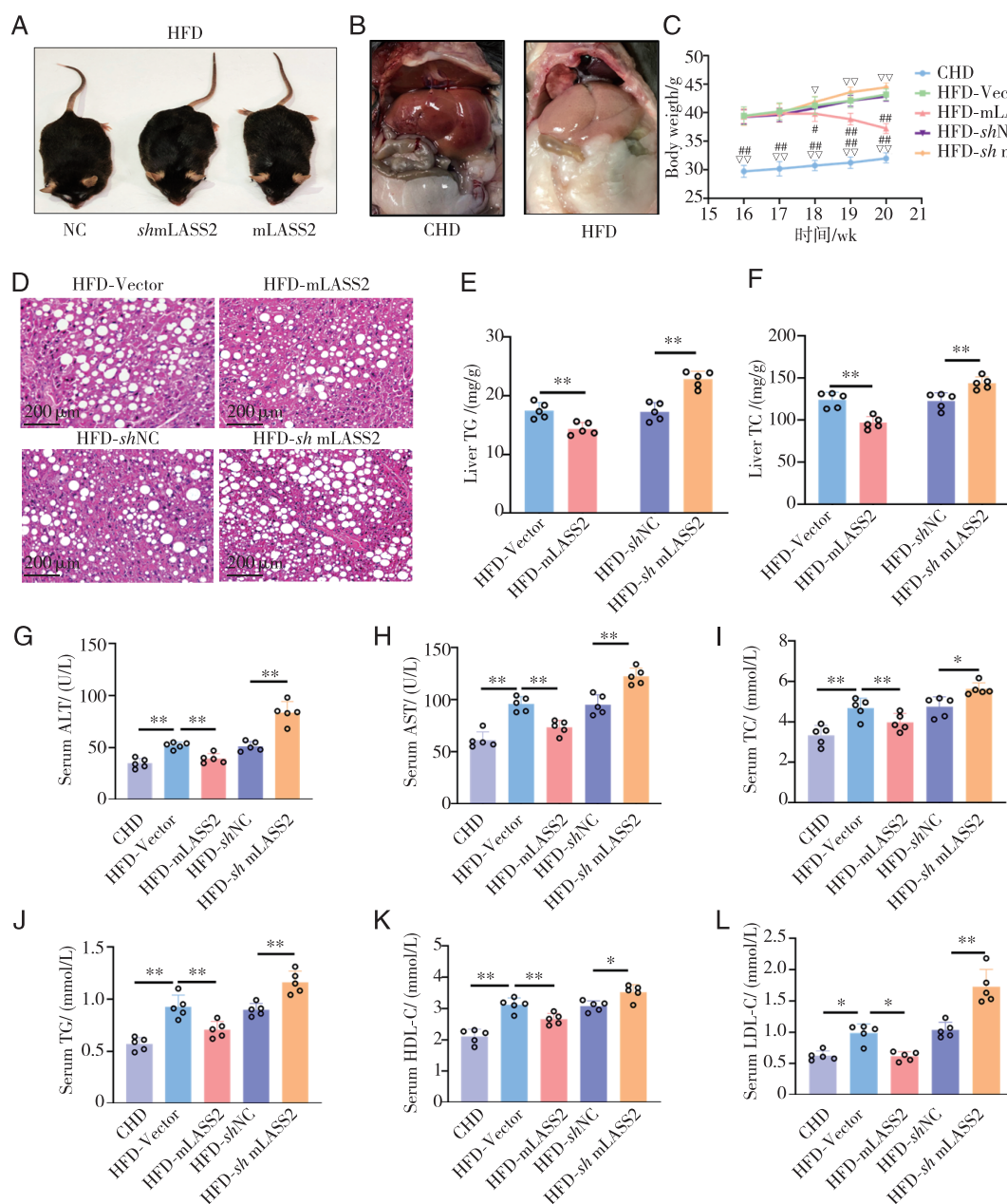


A: AAV-TBG 重组表达载体; B: 动物造模时程; C: 各组小鼠 LASS2 mRNA 相对表达水平; D: 各组小鼠 LASS2 蛋白表达水平; **: $P<0.01$ 。

图 1 HFD 喂养小鼠体内 LASS2 敲低及过表达模型的构建与验证

2.2 *LASS2* 表达水平影响 HFD 诱导的小鼠脂肪肝变性 为了验证 *LASS2* 在高脂饮食诱导的小鼠脂肪代谢紊乱中的作用,本研究进行了组织学观察及血清生化分析。图 2A 及图 2B 展示各组小鼠体型及肝脏外观变化,图 2C 显示小鼠体质量变化。肝组织 HE 染色显示,HFD 组小鼠肝细胞脂肪变性明显,胞内出现大量大小不等的空泡,伴有炎性细胞浸润,HFD-m*LASS2* 组脂肪变性程度相对减轻,而 HFD-sh*LASS2* 组则进一步加重(图 2D)。使用

酶法检测小鼠肝脏 TG 及 TC 含量结果显示,过表达 *LASS2* 使小鼠肝脏 TG 及 TC 含量显著降低,敲低 *LASS2* 则得到相反的结果(图 2E、F, $P < 0.01$)。全自动生化分析仪检测小鼠血清生化指标结果显示,HFD 组小鼠 ALT、AST、TG、TC、HDL-C 和 LDL-C 均高于 CHD 组小鼠($P < 0.05$)。与 HFD-Vector 组比较,HFD-m*LASS2* 组上述指标均下降,而 HFD-sh*LASS2* 组较 HFD-shNC 组则进一步增加(图 2G ~ L, $P < 0.05$)。

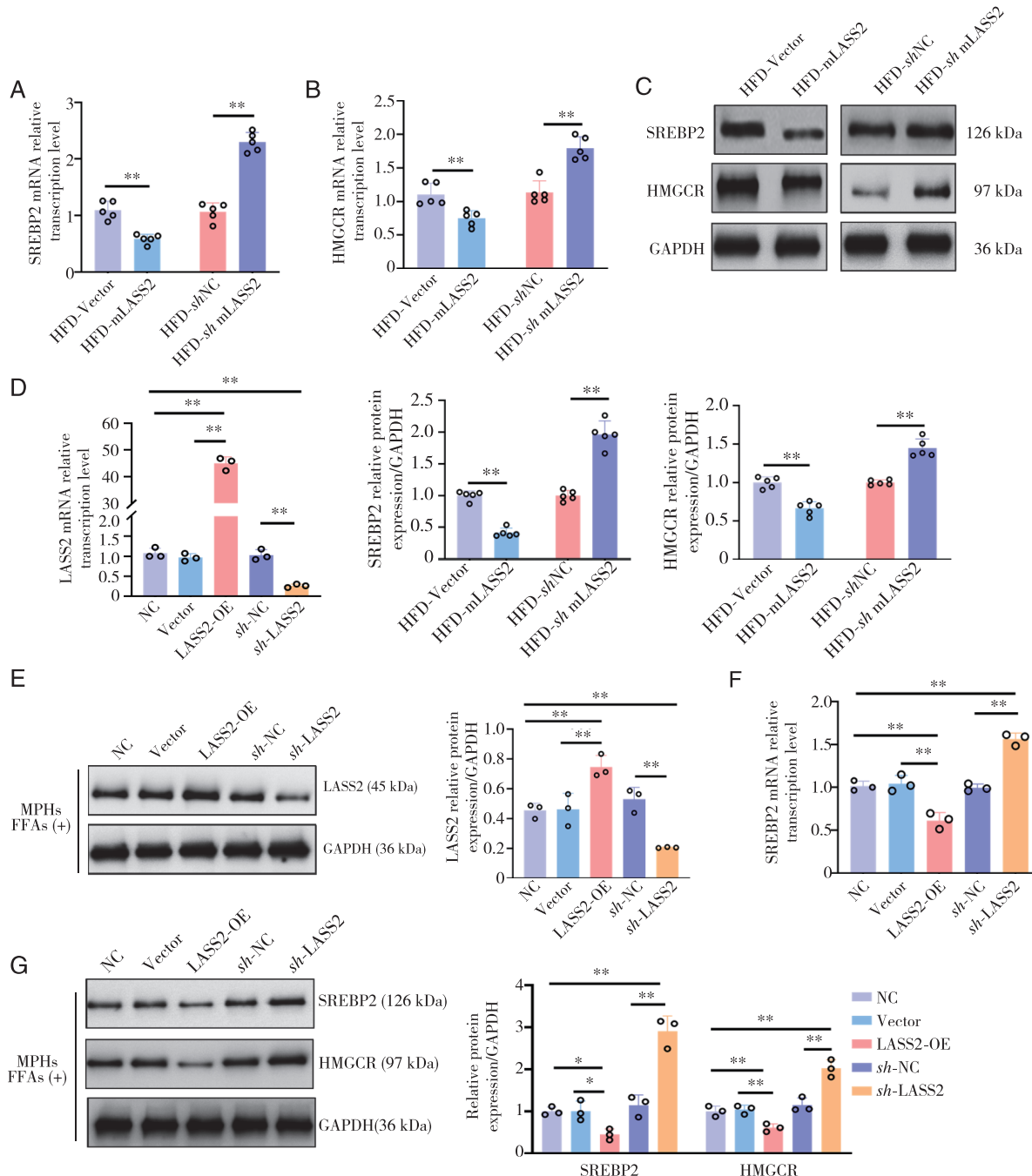


A: 高脂饮食诱导小鼠(左)、高脂饮食诱导小鼠肝脏特异性过表达 *LASS2*(中)、高脂饮食诱导小鼠肝脏特异性敲低 *LASS2*; B: 高脂饮食诱导小鼠肝脏外观; C: 各组小鼠体质量变化; D: 小鼠肝组织 HE 染色; E、F: 小鼠肝脏 TG、TC 含量; G ~ L: 血清中 ALT、AST、TC、TG、HDL-C、LDL-C 含量; *、**、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$; #、##: 与 HFD-Vector 组比较, $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$; ▽、▽▽: 与 HFD-shNC 组比较, $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 。

图 2 HFD 喂养小鼠体内 *LASS2* 敲低及过表达对小鼠脂肪变性的影响

2.3 LASS2 负向调控 HFD 及 FFAs 诱导的胆固醇相关基因及蛋白的表达 为进一步确认 LASS2 在 NAFLD 中的功能,采用 HFD 诱导的小鼠模型及 FFAs 诱导的 MPHs 细胞模型,在体内外水平检测了 LASS2 过表达或敲低对胆固醇代谢相关通路的影响。RT-qPCR 及 Western blot 结果显示,与对照组相比,过表达 LASS2 可显著降低 HFD 诱导小鼠体内 SREBP2 及 HMGCR mRNA 及蛋白表达水平

(图 3A~C, $P < 0.001$)。随后,构建了 LASS2 体外过表达及敲低模型,RT-qPCR 及 Western blot 结果显示模型构建成功(图 3D、E, $P < 0.01$)。与此同时,胆固醇合成相关蛋白 SREBP2 及 HMGCR 表达水平在 LASS2 过表达组中明显下调,而在 LASS2 敲低组中显著上调,敲低 LASS2 则得到相反的结果(图 3F、G, $P < 0.05$)。以上结果表明,LASS2 可通过抑制胆固醇合成进而改善脂代谢紊乱。



A、B: HFD 诱导小鼠肝脏组织 SREBP2 及 HMGCR mRNA 表达水平; C: HFD 诱导小鼠肝脏组织 SREBP2 及 HMGCR 蛋白表达水平; D、E: MPHs 细胞 LASS2 mRNA 及蛋白表达水平; F: MPHs 细胞 SREBP2 mRNA 表达水平; G: MPHs 细胞 SREBP2 及 HMGCR 蛋白表达水平; *、**: $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 。

图 3 LASS2 在胆固醇代谢中的作用

2.4 过表达 *LASS2* 诱导 mtROS 生成 本课题组前期研究发现, *LASS2* 与 *NDUFS2* 存在互作, 而 *NDUFS2* 是 mtROS 生成主要部位—线粒体上复合物 I 的关键亚基。为探究 *LASS2* 调控胆固醇相关基因

及蛋白表达的机制, 采用 MitoSOX™ Red 探针标记活细胞成像检测 mtROS 水平, 结果显示 *LASS2* 过表达诱导 FFAs 处理的 MPHs 细胞中 mtROS 生成, *LASS2* 敲低则抑制 mtROS 生成(图 4, $P < 0.05$)。

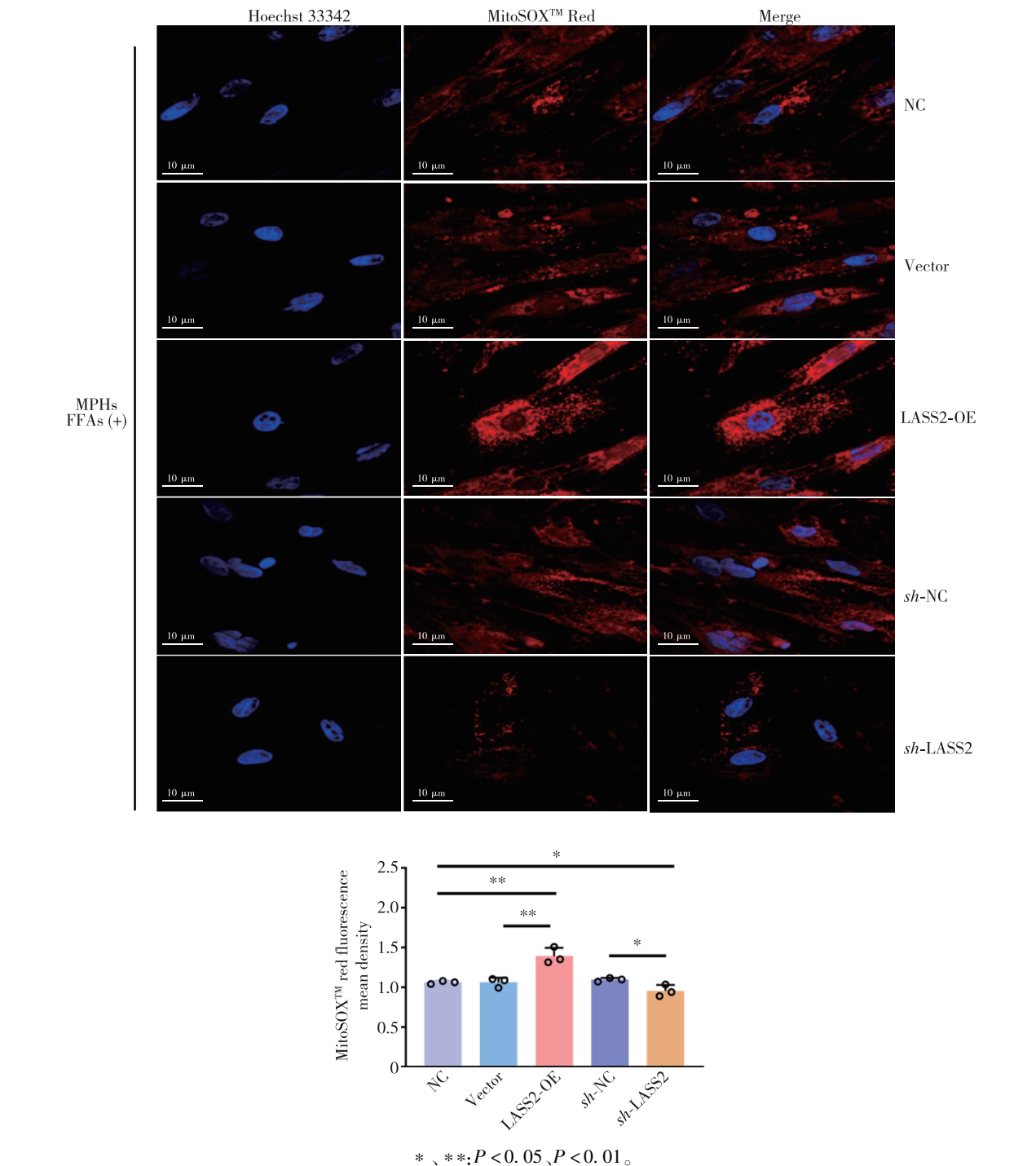


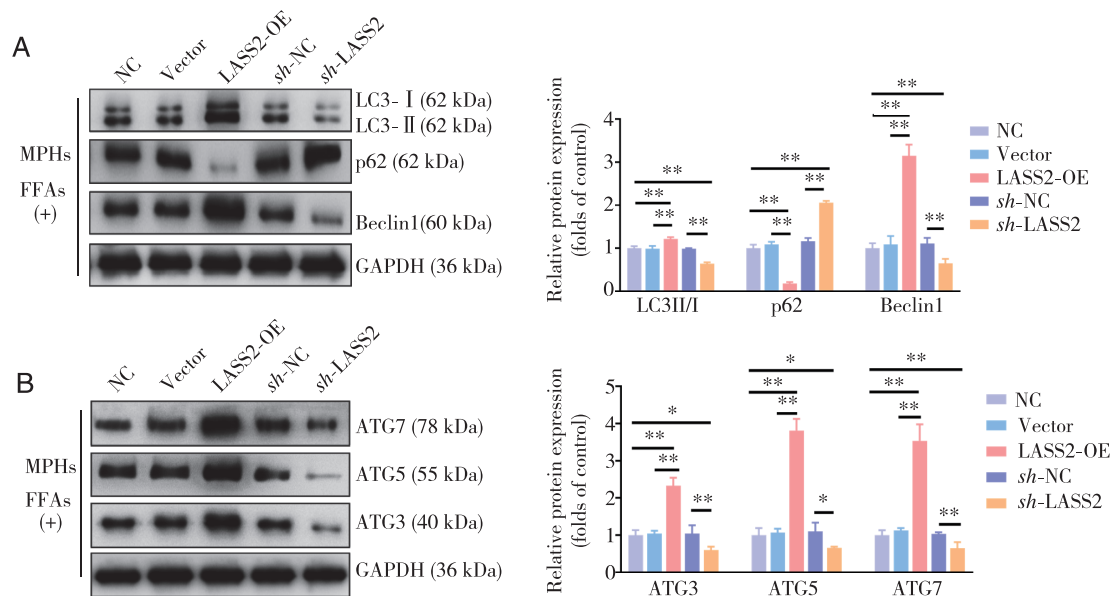
图 4 MitoSOX™ Red 检测线粒体 ROS 水平

2.5 *LASS2* 过表达通过激活自噬调控胆固醇代谢 为探究 *LASS2* 诱导的 mtROS 生成增加是否影响自噬通路, 在 FFAs 诱导的 MPHs 细胞中检测了自

噬标志物。结果显示, 过表达 *LASS2* 使 LC3 II/LC3 I 比值和 Beclin1 表达上调, p62 表达下调(图 5A, $P < 0.01$); 同时, 显著增加 ATG3、ATG5 和 ATG7

的蛋白水平(图 5B, $P < 0.05$);敲低 *LASS2* 则呈现出完全相反的效应。以上结果提示, *LASS2* 可能通

过促进 mtROS 生成激活自噬,进而影响胆固醇代谢改善 NAFLD。



A: FFAs 处理下 *LASS2* 对 MPHs 细胞中 LC3、p62 及 Beclin1 蛋白表达水平的影响; B: FFAs 处理下 *LASS2* 对 MPHs 细胞中 ATG3、ATG5 及 ATG7 蛋白表达水平的影响; *, **: $P < 0.05$, $P < 0.01$ 。

图 5 *LASS2* 对自噬相关通路蛋白表达的影响

3 讨论

NAFLD 是导致肝脏相关发病和死亡的常见原因,同时与多种疾病的发病率和死亡率相关。NAFLD 的本质是肝脏脂质代谢的稳态失衡^[18-20],尽管目前已有大量研究表明该疾病与 2 型糖尿病和肥胖、炎症发生、线粒体功能障碍以及氧化应激之间存在复杂的关联,但临床上仍缺乏有效的靶向治疗药物。近年来,脂质代谢紊乱的调控机制已成为 NAFLD 研究的重点,寻找调控脂质代谢的关键分子对该病的防治具有重要意义。*LASS2* 作为神经酰胺合成途径的关键酶,主要参与长链神经酰胺的合成,且与脂代谢相关^[21],但其在 HFD 诱导的肝脂肪变性中的具体作用及机制尚不明确。因此,本研究以 *LASS2* 为中心展开系列实验,探讨其在肝脏脂代谢中的作用及机制,为 NAFLD 的治疗提供实验依据。

本研究采用 HFD 喂养小鼠,通过尾静脉注射 AAV-TBG 病毒的方式构建 *LASS2* 过表达和敲低动物模型,4 周后处死小鼠,收集肝脏组织及血清进行后续实验。首先通过 RT-qPCR 及 Western blot 验证 *LASS2* 过表达及敲低模型构建成功。由于 AAV-TBG 载体能够特异性靶向肝脏,该模型可确

保 *LASS2* 在小鼠肝脏中特异性表达,避免其他组织的干扰,提高了实验的可靠性。在此基础上,通过 HE 染色、小鼠血清及肝脏组织生化指标探讨 *LASS2* 在 HFD 诱导的小鼠肝脏脂肪变性中的作用。小鼠肝脏 HE 染色及 TG、TC 结果显示,与 HFD-Vector 组小鼠相比, HFD-m*LASS2* 组小鼠脂肪变性程度明显减弱,而 HFD-sh*LASS2* 组则进一步加重,提示 *LASS2* 过表达可改善 HFD 诱导的肝脏脂肪变性,敲低则加剧了该病理过程。血清生化指标结果显示,与 CHD 组小鼠相比, HFD 组小鼠血清 ALT、AST、TG、TC、HDL-C 及 LDL-C 均明显升高,说明 HFD 成功诱导小鼠肝损伤以及脂质代谢紊乱;与 HFD-Vector 组相比, HFD-m*LASS2* 组上述指标均显著下降,而 HFD-sh*LASS2* 组较 HFD-shNC 则进一步上升,提示 *LASS2* 过表达能够缓解肝脏脂肪变性,改善肝功能,敲低则进一步加重肝脂肪变性及肝损伤。

为了进一步明确 *LASS2* 在脂代谢调控中的作用,本研究采用 FFAs 诱导 MPHs 细胞构建体外模型,在体内外探究 *LASS2* 过表达和敲低对胆固醇代谢相关 mRNA 及蛋白表达水平的影响。结果显示,与对照组相比,过表达 *LASS2* 显著下调胆固醇代谢相关蛋白 SREBP2 和 HMGCR mRNA 及蛋白

表达水平。上述指标在 LASS2 敲低组中则产生相反的效应。SREBP2 是调节胆固醇稳态的重要转录因子, *HMGC*R 作为 SREBP2 下游靶基因, 是胆固醇合成过程中的限速酶^[22]。以上结果表明, LASS2 通过抑制胆固醇合成, 进而减少脂质在肝脏中的蓄积。

本研究检测了 mtROS 水平, 发现 LASS2 过表达可显著增加其生成。传统上, 高水平 mtROS 被认为通过氧化应激加剧 NAFLD 进展, 然而越来越多的研究表明, mtROS 具有双重作用: 过量 mtROS 导致慢性炎症和损伤, 而一定水平的 mtROS 可作为信号分子参与细胞稳态的维持^[23]。ROS 在多条信号通路中发挥重要作用, 且是自噬的上游触发因素^[24]。进一步研究发现, LASS2 过表达使 LC3 II/LC3 I 比值及 Beclin 1 表达上调, p62 表达下调。同时, LASS2 过表达使 ATG3、ATG5 及 ATG7 表达水平升高, ATG 蛋白是自噬体形成过程中的关键分子^[25], 进一步证明 LASS2 过表达激活自噬相关通路。自噬已被报道参与调节脂代谢的多个方面, 包括脂质吸收、消化、分解、生物合成和过氧化^[26], 并可负调控 SREBP2 活性^[15], 与本研究观察到的胆固醇合成抑制表型一致。以上结果提示, LASS2 可能通过诱导适度 mtROS 生成, 激活自噬, 调节胆固醇代谢, 改善 NAFLD。

综上所述, 本研究将 LASS2、mtROS、自噬及胆固醇合成整合到一个完整的信号轴中, 从而初步揭示 LASS2 可能通过诱导 mtROS 增加激活自噬, 进而抑制 SREBP2 及 *HMGC*R 表达水平, 维持胆固醇代谢稳态, 为 NAFLD 的临床治疗提供新的靶点及研究方向。然而, 本研究也存在一些局限性, 目前仅初步讨论了 LASS2 改善脂代谢紊乱的可能机制, 后续将通过靶向 mtROS 清除试剂或自噬抑制剂进行回复实验, 进一步阐明 LASS2 通过“mtROS-自噬-胆固醇代谢”轴改善 NAFLD 的完整机制。

[参考文献]

- [1] Konings M, Baumgartner S, Mensink R P, et al. Investigating microRNAs to explain the link between cholesterol metabolism and NAFLD in humans: a systematic review [J]. *Nutrients*, 2022, 14(23):4946.
- [2] Fan J, Li N, Lu Y, et al. Identification of key genes in membranous nephropathy and non-alcoholic fatty liver disease by bioinformatics and machine learning [J]. *Front Immunol*, 2025, 16:1564288.
- [3] Du M, Yang H, Niu J, et al. Umbilical cord-mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles target the liver to improve neurovascular health in type 2 diabetes with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Extracell Vesicles*, 2025, 14(7):e70125.
- [4] Li C, Lu Y, Li Y, et al. Liver-breast communication of adipocyte-oriented exosomes drives primary mammary cancer progression [J]. *Cell Metab*, 2025, 37(12):2402-2422.
- [5] Bao S, Jin Q, Wang T, et al. Predicting the risk of lean non-alcoholic fatty liver disease based on interpretable machine models in a Chinese T2DM population [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2025, 16:1626203.
- [6] Wang S, Jia Q, Liu X, et al. Hyperoside modulates bile acid and fatty acid metabolism, presenting a potentially promising treatment for non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Adv Res*, 2026, 80:759-773.
- [7] Zambrano-Vásquez O R, Cortés-Camacho F, Castañeda-Sánchez J I, et al. Update in non-alcoholic fatty liver disease management: role of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors [J]. *Life Sci*, 2025, 372:123638.
- [8] Bian S, Zhu S, Lu J, et al. Targeting gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): pathogenesis and therapeutic insights: a review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 330(Pt 3):147995.
- [9] Chen H, Meng G, Yang A. Laminin $\gamma 2$ accelerates non-alcoholic fatty liver disease progression by enhancing lipid accumulation and fibrogenesis in hepatocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2025, 777:152266.
- [10] Afonso-Alí A, Dicroce-Giacobini J, Teixido-Trujillo S, et al. Role of obesity and estrogen deficiency in non-alcoholic fatty liver disease: insights from a mouse model [J]. *Mol Med Rep*, 2025, 32(4):264.
- [11] Liu W, Sun M, Zhang H, et al. Targeting regulation of lipid metabolism with polysaccharide of traditional Chinese medicine for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 306(Pt 3):141660.
- [12] Xu W, Hu Z, Zhang J, et al. Cross-talk between autophagy and ferroptosis contributes to the liver injury induced by fluoride via the mtROS-dependent pathway [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 250:114490.
- [13] Dan Dunn J, Alvarez L A, Zhang X, et al. Reactive oxygen species and mitochondria: a nexus of cellular homeostasis [J]. *Redox Biol*, 2015, 6:472-485.
- [14] Robichaud S, Rasheed A, Pietrangelo A, et al. Autophagy is differentially regulated in leukocyte and nonleukocyte foam cells during atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2022, 130(6):831-847.

(下转第 604 页)

- ectal cancer proliferation through PKM2 interaction and MAPK signaling pathway[J]. *Front Oncol*, 2023,13: 1166444.
- [12] Zhao L, Sun X, Hou C, et al. CPNE7 promotes colorectal tumorigenesis by interacting with NONO to initiate ZFP42 transcription[J]. *Cell Death Dis*, 2024,15(12): 896.
- [13] 陈谱,张敏,赵曼. 2 型糖尿病患者血清抗核抗体的检测及临床意义[J]. *遵义医科大学学报*, 2021,44(4): 504-507.
- [14] 蒙光雪,马洪,廖德仲. 可变剪接在基因转录中的作用机制及其在头颈部鳞状细胞癌中的研究进展[J]. *新医学*, 2023,54(3): 172-176.
- [15] Ryan M, Wong W C, Brown R, et al. TCGASpliceSeq a compendium of alternative mRNA splicing in cancer[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016,44(D1): D1018-D1022.
- [16] Tang Z, Kang B, Li C, et al. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019,47(W1): W556-W560.
- [17] Chandrashekar D S, Karthikeyan S K, Korla P K, et al. UALCAN: an update to the integrated cancer data analysis platform[J]. *Neoplasia*, 2022,25: 18-27.
- [18] Ji X, Sun T, Xie S, et al. Upregulation of CPNE7 in mesenchymal stromal cells promotes oral squamous cell carcinoma metastasis through the NF-kappaB pathway[J]. *Cell Death Discov*, 2021,7(1): 294.
- [19] 宋煜,李海涛,邵敏,等. 蛋白质二硫键异构酶 a3 的表达纯化、活性测定与小分子抑制剂的筛选[J]. *遵义医科大学学报*, 2022,45(6): 775-781.
- [收稿 2026-03-17;修回 2026-04-29]
(编辑:陈 婷)
-
- (上接第 595 页)
- [15] Eid W, Dauner K, Courtney K C, et al. mTORC1 activates SREBP-2 by suppressing cholesterol trafficking to lysosomes in mammalian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017,114(30): 7999-8004.
- [16] Fan S, Wang Y, Wang C, et al. Hepatocyte-specific deletion of LASS2 protects against diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018,120:330-341.
- [17] Raichur S, Wang S T, Chan P W, et al. CerS2 haploinsufficiency inhibits β -oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance[J]. *Cell Metab*, 2014,20(4): 687-695.
- [18] Clayton-Chubb D, Kemp W, Majeed A, et al. Understanding NAFLD: from case identification to interventions, outcomes, and future perspectives[J]. *Nutrients*, 2023,15(3): 687.
- [19] Xie R, Liu M. Relationship between non-alcoholic fatty liver disease and degree of hepatic steatosis and bone mineral density[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13:857110.
- [20] Manikat R, Nguyen M H. Nonalcoholic fatty liver disease and non-liver comorbidities[J]. *Clin Mol Hepatol*, 2023, 29(Suppl): s86-s102.
- [21] Bauer R, Voelzmann A, Breiden B, et al. Schlank, a member of the ceramide synthase family controls growth and body fat in *Drosophila*[J]. *EMBO J*, 2009,28(23): 3706-3716.
- [22] Meng C, Zhou L, Huang L, et al. Chlorogenic acid regulates the expression of NPC1L1 and HMGCR through PXR and SREBP2 signaling pathways and their interactions with HSP90 to maintain cholesterol homeostasis[J]. *Phytomedicine*, 2024,123:155271.
- [23] Weinberg S E, Chandel N S. Mitochondria reactive oxygen species signaling-dependent immune responses in macrophages and T cells[J]. *Immunity*, 2025,58(8): 1904-1921.
- [24] Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs[J]. *Cell Death Differ*, 2015,22(3): 377-388.
- [25] Yang B, Shen M, Lu C, et al. RNF144A inhibits autophagy by targeting BECN1 for degradation during *L. monocytogenes* infection[J]. *Autophagy*, 2025,21(4): 789-806.
- [26] Yang Y, Liu X, Yang D, et al. Interplay of CD36, autophagy, and lipid metabolism: insights into cancer progression[J]. *Metabolism*, 2024,155:155905.
- [收稿 2026-04-13;修回 2026-05-19]
(编辑:陈 婷)