

论 著

基础研究

抑制SLC31A1表达调节铜稳态对小鼠酒精性脂肪肝病变的影响及其机制

孙玥^{1,2}, 李三强^{1,2*}, 赵雅迪^{1,2}, 王祎丽^{2,3}, 张叶^{1,2}, 王琼婉^{1,2}, 吴菲桐^{1,2}, 杨文静^{1,2}, 段怡婷^{1,2}

¹河南科技大学基础医学与法医学院, 河南洛阳 471000; ²河南省肝病防治工程技术研究中心, 河南洛阳 471000;

³河南科技大学临床医学院, 河南洛阳 471000

[中图分类号] R575.5

[文献标志码] A

[DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1623.2026.0228

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 孙玥, 李三强, 赵雅迪, 等. 抑制SLC31A1表达调节铜稳态对小鼠酒精性脂肪肝病变的影响及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2026, 51(4): 567-575.

[收稿日期] 2025-08-06

[录用日期] 2025-11-23

[上线日期] 2026-02-28

[摘要] 目的 探究抑制溶质载体家族31成员1(SLC31A1)的表达通过调节铜稳态对小鼠酒精性脂肪肝(AFLD)病变的影响及其机制。方法 6~8周龄健康雄性C57BL/6N小鼠30只随机分为对照组、乙醇组与质粒组($n=10$)。对照组每天喂养对照液体饲料, 乙醇组和质粒组每天喂养乙醇液体饲料; 质粒组采用水流动力学方法经尾静脉注射0.2 ml SLC31A1-sgRNA质粒(2 mg/kg), 乙醇组和对照组尾静脉注射等体积生理盐水。8周末眼球取血后处死小鼠并取肝脏。采用qPCR及Western blotting检测肝组织SLC31A1 mRNA及蛋白的表达, 免疫组化(IHC)检测肝组织SLC31A1的表达, 比色法检测肝组织和血清铜含量。微板法检测肝组织超氧化物歧化酶(SOD)活性和谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)含量, 以及血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性和总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)含量。HE染色、油红O染色、过碘酸-雪夫(PAS)染色分别检测肝脏损伤、脂肪蓄积和糖原的变化情况。Western blotting检测肝组织核因子E2相关因子2(Nrf2)、细胞色素P450家族2亚家族E成员1(CYP2E1)、腺苷酸活化蛋白激酶 α 1(AMPK α 1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR- α)、核因子 κ B p65亚基(NF- κ B p65)、核因子抑制蛋白(I κ B- α)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)蛋白的表达。结果 qPCR、Western blotting和IHC检测结果显示, SLC31A1-sgRNA质粒可有效抑制SLC31A1的表达($P<0.001$)。与对照组相比, 乙醇组肝损伤评分和脂滴面积占比增高, 胶原面积占比降低; SLC31A1阳性面积占比、SLC31A1 mRNA和蛋白表达水平、肝组织和血清铜含量增加; ALT、AST活性和MDA、TC、TG含量增加, SOD活性和GSH含量降低; CYP2E1蛋白表达水平和p-JNK/JNK、p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、p-I κ B- α /I κ B- α 比值升高, Nrf2、PPAR- α 蛋白表达水平和p-AMPK α 1/AMPK α 1比值降低($P<0.05$)。与乙醇组相比, 质粒组肝损伤评分和脂滴面积占比降低, 胶原面积占比增加; SLC31A1阳性面积占比、SLC31A1 mRNA和蛋白表达水平、肝组织和血清铜含量降低; ALT、AST活性和MDA、TC、TG含量降低, SOD活性和GSH含量升高; CYP2E1蛋白表达水平和p-JNK/JNK、p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、p-I κ B- α /I κ B- α 比值降低, Nrf2、PPAR- α 蛋白表达水平和p-AMPK α 1/AMPK α 1比值升高($P<0.05$)。结论 抑制SLC31A1可能通过降低铜含量, 减轻AFLD小鼠的氧化应激损伤、脂质代谢紊乱和炎症损伤, 从而缓解乙醇诱导的脂肪肝病变。

[关键词] 酒精性脂肪肝; 溶质载体家族31成员1; 铜; 氧化应激; 脂质代谢; 炎症损伤

Effects of inhibiting SLC31A1 expression on alcoholic fatty liver disease in mice by regulating copper homeostasis and its underlying mechanisms

Sun Yue^{1,2}, Li San-Qiang^{1,2*}, Zhao Ya-Di^{1,2}, Wang Yi-Li^{2,3}, Zhang Ye^{1,2}, Wang Qiong-Wan^{1,2}, Wu Fei-Tong^{1,2}, Yang Wen-Jing^{1,2}, Duan Yi-Ting^{1,2}

¹College of Basic Medicine and Forensic Medicine, ³School of Clinical Medicine, Henan University of Science and Technology, Luoyang,

[基金项目] 河南省高等学校重点科研项目(23ZX006); 河南省中央引导地方科技发展基金项目(Z20231811030)

[作者简介] 孙玥, 硕士研究生, 主要从事肝脏损伤与修复方面的研究

[通信作者] 李三强, E-mail: sanqiangli2001@163.com

Henan 471000, China

²Henan Provincial Liver Disease Prevention Engineering Technology Research Center, Luoyang, Henan 471000, China

*Corresponding author, E-mail: sanqiangli2001@163.com

This work was supported by the Key Scientific Research Project of Henan Colleges and Universities (23ZX006), and the Henan Provincial Central Leading Local Science and Technology Development Fund Project (Z20231811030)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of inhibiting the expression of solute carrier family 31 member 1 (SLC31A1) on alcoholic fatty liver disease (AFLD) in mice by regulating copper homeostasis and its underlying mechanisms. **Methods** Thirty healthy male C57BL/6N mice aged 6–8 weeks were randomly divided into control group, ethanol group, and plasmid group ($n=10$). Control group was fed a control liquid diet daily, while ethanol and plasmid groups were fed an ethanol-containing liquid diet daily. Plasmid group was injected with 0.2 ml of SLC31A1-sgRNA plasmid (2 mg/kg) *via* the tail vein by hydrodynamic injection, and ethanol and control groups were injected with an equal volume of normal saline *via* the tail vein. At the end of the 8th week, the mice were euthanized after ocular blood collection, and liver tissue were harvested. qPCR and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression levels of SLC31A1 in liver tissue. Immunohistochemistry (IHC) was employed to detect the expression of SLC31A1 in liver tissue. Colorimetric assay was adopted to determine the copper content in liver tissue and serum. Microplate assay was used to detect the activity of superoxide dismutase (SOD), and the contents of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), total cholesterol (TC), and triglycerides (TG) in liver tissue, as well as the activity of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), and the contents of TC and TG in serum. HE staining, Oil Red O staining, and periodic acid-Schiff (PAS) staining were conducted to assess liver injury, lipid accumulation, and glycogen changes, respectively. Western blotting was used to detect the protein expression levels of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1 (CYP2E1), adenosine monophosphate-activated protein kinase alpha 1 (AMPK α 1), peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- α), nuclear factor κ B p65 subunit (NF- κ B p65), inhibitor of nuclear factor κ B alpha (I κ B- α), c-Jun N-terminal kinase (JNK), and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK). **Results** The results of qPCR, Western blotting, and IHC showed that SLC31A1-sgRNA plasmid could effectively inhibit the expression of SLC31A1 ($P<0.001$). Compared with control group, ethanol group had increased liver injury scores and lipid droplet area ratio, and decreased collagen area ratio; the SLC31A1-positive area ratio, mRNA and protein expression levels of SLC31A1, and copper content in liver tissue and serum were increased; the activities of ALT and AST, and the contents of MDA, TC, and TG were increased, while the SOD activity and GSH content were decreased; the protein expression level of CYP2E1, and the ratios of p-JNK/JNK, p-p38 MAPK/p38 MAPK, p-NF- κ B p65/NF- κ B p65, and p-I κ B- α /I κ B- α were up-regulated, whereas the protein expression levels of Nrf2 and PPAR- α , and the ratio of p-AMPK α 1/AMPK α 1 were down-regulated ($P<0.05$). Compared with ethanol group, plasmid group had decreased liver injury score and lipid droplet area ratio, and increased collagen area ratio; the SLC31A1-positive area ratio, mRNA and protein expression levels of SLC31A1, and copper content in liver tissue and serum were decreased ($P<0.001$); the activities of ALT and AST, and the contents of MDA, TC, and TG were reduced, while the SOD activity and GSH content were elevated; the protein expression levels of CYP2E1, and the ratios of p-JNK/JNK, p-p38 MAPK/p38 MAPK, p-NF- κ B p65/NF- κ B p65, and p-I κ B- α /I κ B- α were down-regulated; and the protein expression levels of Nrf2 and PPAR- α , and the ratio of p-AMPK α 1/AMPK α 1 were up-regulated ($P<0.05$). **Conclusion** Inhibition of SLC31A1 may alleviate ethanol-induced fatty liver lesions in AFLD mice by reducing copper content, thereby attenuating oxidative stress injury, lipid metabolism disorder, and inflammatory injury.

[Key words] alcoholic fatty liver disease; solute carrier family 31 member 1; copper; oxidative stress; lipid metabolism; inflammatory injury

酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver disease, AFLD)是过量摄入乙醇引起的肝脏进行性疾病,以肝细胞内脂肪变性、肝代谢紊乱为主要特征^[1]。溶质载体家族31成员1(solute carrier family 31 member 1, SLC31A1,也称为CTR1)负责细胞对铜的大部分摄取。铜是人体必不可少的重金属元素之一,也是多种酶与蛋白质构成中的重要组分^[2]。铜含量失衡可破坏细胞稳态,参与癌症、心血管疾病、结缔组织疾病等多种疾病的发生与进展,因此铜含量的稳定对人体健康至关重要^[3]。多项临床研究观察显示肝癌患者血清

和肿瘤内铜含量增加,但未见其与AFLD的相关性研究^[4-7]。因此,本研究通过成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9, CRISPR/Cas9)技术靶向抑制SLC31A1的表达,探究其调控铜稳态对乙醇诱导的小鼠脂肪肝病变的影响及其机制,以期防治AFLD提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物 30只SPF级C57BL/6N雄性小鼠(6~

8周龄, 体重20~22 g)购自浙江维通利华实验动物技术有限公司[实验动物生产许可证号: SCXK(浙)2024-0001], 饲养于(25±1)℃、12 h光暗循环环境中, 自由摄食饮水, 适应性饲养1周后开始实验。本研究获河南科技大学动物伦理委员会审批(HAUST-024-M1113002), 实验过程符合国家和单位有关实验动物的管理和使用规定。

1.2 实验试剂 SLC31A1-sgRNA质粒和菌种(南京尧舜禹生物科技有限公司), 对照液体饲料(Lieber-DeCarli, TP4030C)、乙醇液体饲料(Lieber-DeCarli, TP4030B)(南通特洛菲饲料科技有限公司), 谷草转氨酶(AST)、谷丙转移酶(ALT)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、超氧化物歧化酶(SOD)、还原性谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒(南京建成科技有限公司), 铜比色法检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司), 丙二醛(MDA)检测试剂盒、油红O染色试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司), 苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、TRIS-EDTA抗原修复液(50×) pH 9.0、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(5×)、增强化学发光法(ECL)超敏化学发光试剂盒(上海Biosharp有限公司), 过碘酸-雪夫(PAS)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司), SLC31A1免疫组化(IHC)检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司), BCA蛋白浓度测定法蛋白定量试剂盒、RIPA裂解液、三色预染蛋白分子量标准品(Marker)(上海雅酶生物医药科技有限公司), 总核糖核酸极速抽提试剂盒(上海飞捷生物技术有限公司), 实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)引物(华大基因), 8 min快速质粒小提试剂盒、蓝色通用型染料法qPCR检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司), StarScript III一管化去基因组反转录预混液(北京康润诚业生物技术有限公司), 兔抗SLC31A1多克隆抗体、兔抗c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)重组抗体、兔抗p-JNK重组抗体、兔抗p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)重组抗体、兔抗核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)重组抗体、兔抗β-肌动蛋白(β-actin)重组抗体(武汉三鹰生物技术有限公司), 鼠抗核因子κB p65亚基(nuclear factor kappa-B p65 subunit, NF-κB p65)单克隆抗体、鼠抗p-NF-κB p65单克隆抗体、兔抗κB抑制蛋白α(inhibitor of kappa B alpha, IκB-α)单克隆抗体、鼠抗p-IκB-α单克隆抗体、鼠抗p-p38 MAPK单克隆抗体(美国Santa Cruz公司), 鼠抗腺苷酸活化蛋白激酶α1(adenosine monophosphate-activated protein kinase α1, AMPKα1)单克隆抗体、鼠抗p-AMPKα1单克隆抗体、兔抗过氧化物酶体增殖物

激活受体α(peroxisome proliferator-activated receptor α, PPAR-α)多克隆抗体、鼠抗细胞色素P450家族2亚家族E成员1(cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1, CYP2E1)单克隆抗体(深圳市优品生物科技有限公司), 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗小鼠或抗兔免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)二抗(上海埃必威生物技术有限公司)。

1.3 质粒提取和注射 吸取保存的菌液接种到含对应抗生素的LB液体培养的离心管中(比例为1:100~1:1000), 置于37℃、200~250 r/min摇床振荡过夜(12~16 h), 使菌液大量繁殖扩增。第2天对菌液进行离心(4℃、12 000 r/min、1~2 min)保留底部细菌沉淀, 严格按照质粒提取盒说明书操作进行质粒提取, 对提取的无污染质粒进行浓度检测, 生理盐水稀释质粒后注射小鼠尾静脉。

1.4 SLC31A1-sgRNA质粒 根据美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)中SLC31A1基因信息设计合成靶向突变小鼠SLC31A1基因的小向导RNA(small guide RNA, sgRNA)序列, 序列为5'-TTACTAGCAATGTT TTATGAAGG-3'。通过CRISPR/Cas9技术构建1个靶向抑制SLC31A1基因的分别同时表达sgRNA、Cas9、puro和eGFP的四合一质粒“pYSY-CMV-Cas9-U6-Scl31a1-sgRNA7-EFla-puro-EFla-eGFP”。

1.5 小鼠分组与模型构建 30只雄性C57BL/6N小鼠适应性饲养1周后, 随机分为对照组、乙醇组及质粒组, 每组10只。模型构建采用渐进式乙醇暴露: 适应液体饲料喂养3 d后进行梯度喂养, 乙醇组、质粒组乙醇液体饲料与对照液体饲料混合比例(体积比)以1:2、1:1、2:1分别喂养2 d后开始造模。对照组每天喂养对照液体饲料(脂肪35%、蛋白质18%、碳水化合物47%), 乙醇组、质粒组每天喂养乙醇液体饲料(脂肪35%、蛋白质18%、碳水化合物19%、乙醇28%), 直至8周末造模结束。质粒组小鼠通过水流动力学方法尾静脉注射0.2 ml SLC31A1-sgRNA质粒(2 mg/kg), 乙醇组和对照组小鼠尾静脉注射等体积生理盐水。

1.5.1 样本采集与处理 8周末造模结束, 小鼠禁食12 h, 眼球取血, 待凝固后4℃下4000 r/min离心20 min, 取血清。处死小鼠后迅速取肝脏, 称重取部分肝组织置于4%多聚甲醛溶液中固定(24 h后石蜡包埋), 其余肝组织通过组织匀浆机破碎后获得RNA和10%肝组织蛋白, 4℃下12 000 r/min离心10~15 min, 取上清液。

1.5.2 肝组织病理形态学检测 (1)HE染色: 石蜡切片(厚度5 μm)脱蜡至水, 苏木精染色5 min, 盐酸

乙醇分化,伊红染色3 min,脱水透明后封片,200×显微镜下观察肝小叶结构及脂肪变性程度,并参照非酒精性脂肪性肝病(NAFD)活动度积分(NAS)系统进行肝损伤评分[脂肪变性:<5%(0分)、5%~33%(1分)、34%~67%(2分)、>67%(3分);小叶炎症:无病灶(0分)、<2个病灶/视野(1分)、2~4个病灶/视野(2分)、>4个病灶/视野(3分);气泡样变:无(0分)、少见(1分)、多见(2分)]。(2)油红O染色:切片固定,油红O染液染色15 min,苏木精复染,200×显微镜下观察脂滴分布,并计算胶滴面积占比。(3)PAS染色:切片脱蜡至水,滴加氧化剂10 min,流水冲洗后,滴加Schiff染液于室温避光反应15 min,流水冲洗,最后经脱水、透明、中性树胶封片,200×显微镜下观察肝组织糖原含量的变化,并计算胶原面积占比。采用ImageJ 2.9.0软件定量分析各染色面积占比。

1.5.3 微板法检测血清ALT、AST活性 根据ALT、AST检测试剂盒说明书配制工作液,分别设置标准孔、空白孔和测定孔,室温放置15 min,采用酶标仪测定505 nm处各孔吸光度(OD)值,以绝对OD值(测定孔OD值-对照孔OD值)代入标准曲线,计算ALT、AST活性。

1.5.4 IHC检测肝组织中SLC31A1的表达 石蜡切片脱蜡至水后置于磷酸盐缓冲液(PBS)中,微波方式进行抗原修复,恢复室温后PBS清洗3 min×3次;加入适量内源性过氧化物酶室温封闭10 min, PBS洗3次;滴加SLC31A1一抗(1:100稀释),4℃孵育过夜。第2天放至室温后PBS洗3次;滴加适宜反应增强液37℃孵育20 min, PBS洗3次;滴加增强酶标山羊抗小鼠/兔IgG聚合物,37℃孵育20 min, PBS洗3次;滴加3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色液,室温孵育5 min后自来水冲洗;苏木精复染细胞核3~5 min,盐酸分化后冲洗返蓝;脱水、透明、中性树胶封片后于显微镜下观察并拍片。采用ImageJ 2.9.0软件分析SLC31A1阳性面积占比。

1.5.5 qPCR检测肝组织中SLC31A1基因的表达 小鼠肝组织样本按照总RNA提取试剂盒说明书操作提取总RNA。以总RNA为模板,按照反转录试剂盒说明书在PCR仪中进行反转录反应得到cDNA。配置qPCR反应体系(含cDNA模板、上下游引物、qPCR Mix),在荧光定量PCR仪上进行扩增,95℃预变性30 s,随后进行40个循环的扩增(95℃5 s, 60℃15 s),熔解曲线使用仪器的默认程序。扩增结束后,通过软件分析得到各样本的Ct值(荧光信号达到阈值时的循环数),采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算SLC31A1基因相对于内参基因的表达量。SLC31A1引物:上游5'-ATGAACCACACGGACGACAA-3',下游5'-CCAGCCAT

TTCTCCAGGTGT-3'; GAPDH引物:上游5'-AAGCTCATTTCTGCTATGACAA-3',下游5'-CTTACTCCTTGGAGGCCATGT-3'。

1.5.6 Western blotting检测肝组织中SLC31A1、氧化应激相关因子、脂质代谢相关因子及炎症相关因子的表达 10%的小鼠肝组织样本采用BCA法测定蛋白浓度,调整各样本蛋白浓度一致,100℃加热10 min使蛋白变性。将处理后的样本加入SDS-PAGE凝胶的上样孔中,进行电泳(恒压或恒流),使不同分子量的蛋白在凝胶中分离。电泳结束后,将凝胶中的蛋白通过电转印转移到PVDF膜上,转膜结束后用含吐温-20的磷酸盐缓冲盐水(phosphate-buffered saline with Tween® 20, PBST)洗涤3次,用5%脱脂奶粉封闭膜上的非特异性结合位点,室温封闭2 h。PBST洗涤3次,加入SLC31A1(1:1000)、氧化应激相关因子[Nrf2(1:5000)和CYP2E1(1:1000)]、脂质代谢相关因子[AMPK α 1(1:1000)、p-AMPK α 1(1:1000)和PPAR- α (1:1000)]、炎症相关因子[NF- κ B p65(1:1000)、p-NF- κ B p65(1:1000)、I κ B- α (1:1000)、p-I κ B- α (1:1000)、JNK(1:20 000)、p-JNK(1:2000)、p38(1:5000)、p-p38(1:1000)]一抗4℃孵育过夜;次日用PBST洗涤3次,加入对应HRP标记山羊抗兔IgG二抗(1:5000)室温孵育1~2 h,洗涤去除未结合的二抗。膜上滴加ECL化学发光底物,通过成像仪显影。采用ImageJ软件分析条带灰度值,以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白(β -actin)条带灰度值的比值,计算目的蛋白相对表达量。

1.5.7 比色法检测肝组织和血清铜含量 按照说明书配制显色剂工作液,标准品和样品分别取15 μ l加入96孔板中,每孔加入250 μ l显色液37℃孵育5 min,采用酶标仪测定580 nm处各孔OD值,计算铜含量。

1.5.8 微板法检测肝组织SOD活性、GSH和MDA含量 根据说明书配制工作液,分别设置标准孔、空白孔和测定孔。SOD活性:37℃孵育20 min,采用酶标仪测定450 nm处各孔OD值。GSH含量:静置5 min,采用酶标仪测定405 nm处各孔OD值。MDA含量:采用酶标仪测定532 nm处各孔OD值。计算SOD活性、GSH和MDA含量。

1.5.9 微板法检测肝组织和血清TG、TC含量 设置标准孔、空白孔和测定孔,每孔取15 μ l于96孔板中,每孔加入250 μ l显色液,采用酶标仪测定532 nm处各孔OD值,计算TG、TC含量。

1.6 统计学处理 采用GraphPad Prism 9.5.0软件进行统计分析。所有数据经Shapiro-Wilk检验符合正态分布,经Levene检验符合方差齐性,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采

用Tukey's HSD 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AFLD 小鼠模型构建 HE、油红 O 及 PAS 染色结果显示, 对照组小鼠肝小叶结构清晰完整, 肝细胞索排列整齐, 胞质饱满, 未见明显的脂肪空泡或炎症细胞浸润, 仅可见零星、微量的红色脂滴, 肝细胞内富含丰富的糖原; 乙醇组小鼠肝小叶结构紊乱, 肝细胞索排列不规则, 肝窦挤压结构不清晰, 胞质内可见大小不一的脂肪空泡和大量脂滴, 肝损伤评分和脂滴面积占比较对照组明显升高, 胶原面积占比较对照组明显降低($P<0.01$ 或 $P<0.001$); 质粒组小鼠肝细胞索排列较整齐, 脂肪空泡减少, 肝损伤评分和脂滴面积占比较乙醇组明显降低, 胶原面积占比较乙醇组明显升高($P<0.01$ 或 $P<0.001$)(图 1A)。与对照组比较, 乙醇组小鼠血清 ALT 和 AST 活性明显升高($P<0.001$); 与

乙醇组比较, 质粒组小鼠血清 ALT 和 AST 活性明显降低($P<0.001$), 但与对照组活性接近($P>0.05$, 图 1B), 提示 AFLD 小鼠模型构建成功。

2.2 AFLD 小鼠肝组织 SLC31A1 表达和铜含量变化 IHC 检测结果显示, 与对照组比较, 乙醇组小鼠肝组织中 SLC31A1 阳性面积占比明显升高($P<0.001$); 与乙醇组比较, 质粒组小鼠肝组织中 SLC31A1 阳性面积占比明显降低($P<0.001$, 图 2A)。qPCR 和 Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, 乙醇组小鼠肝组织 SLC31A1 mRNA 和蛋白表达水平明显升高($P<0.001$); 与乙醇组比较, 质粒组小鼠肝组织 SLC31A1 mRNA 和蛋白表达水平明显降低($P<0.001$, 图 2B), 提示质粒有效抑制了 SLC31A1 的表达。

与对照组比较, 乙醇组小鼠肝组织和血清铜含量明显增加($P<0.001$); 与乙醇组比较, 质粒组小鼠肝组织和血清铜含量明显降低($P<0.001$, 图 2C)。

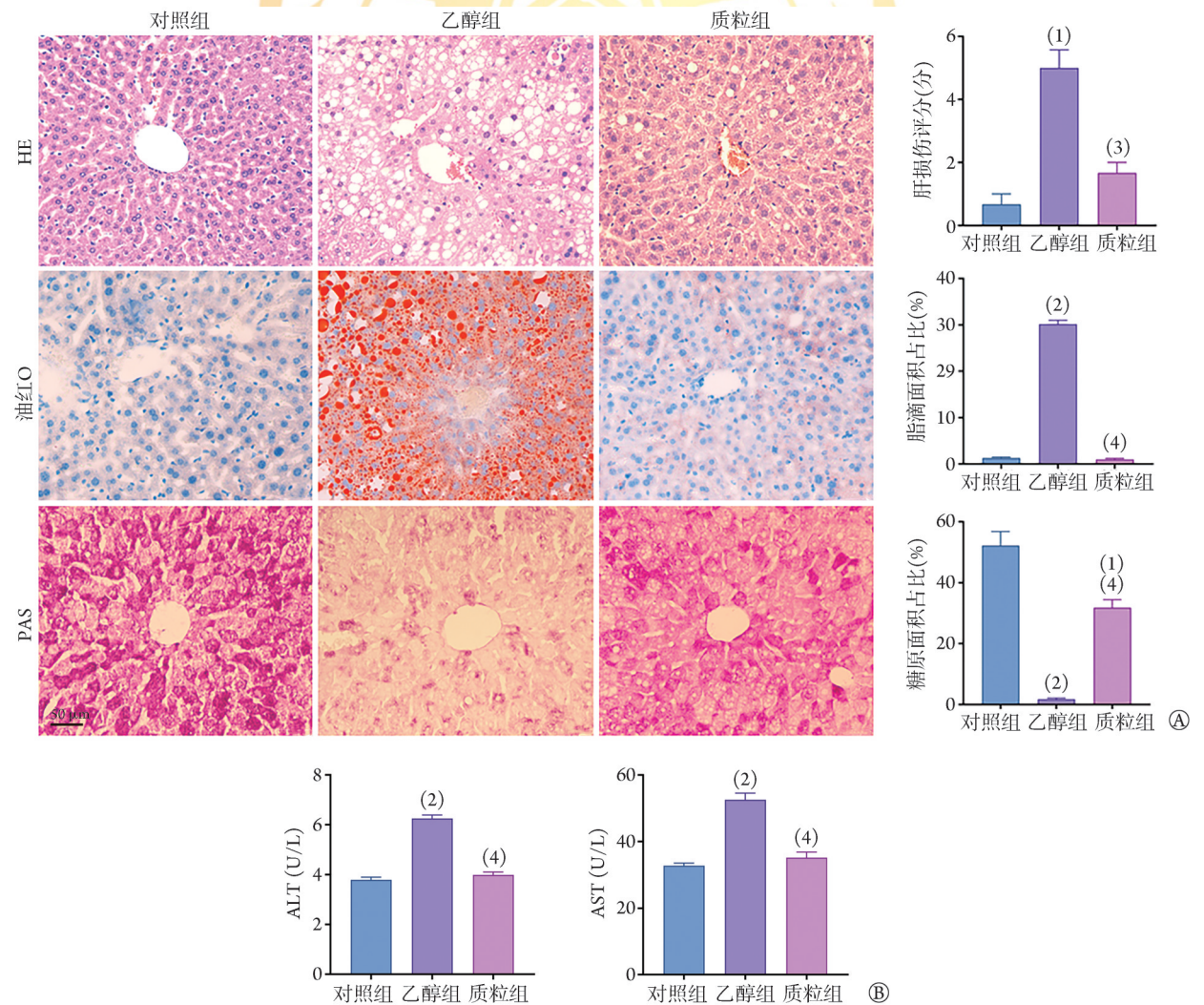


图 1 AFLD 小鼠模型构建的鉴定结果

Fig.1 Identification results of AFLD mouse model construction

A. 各组小鼠肝组织 HE、油红 O 及 PAS 染色及统计图; B. 各组小鼠血清 ALT 和 AST 活性。与对照组相比, (1) $P<0.01$, (2) $P<0.001$; 与乙醇组相比, (3) $P<0.01$, (4) $P<0.001$ 。AFLD. 酒精性脂肪肝; HE. 苏木精-伊红; PAS. 过碘酸-雪夫; AST. 谷草转氨酶; ALT. 谷丙转氨酶

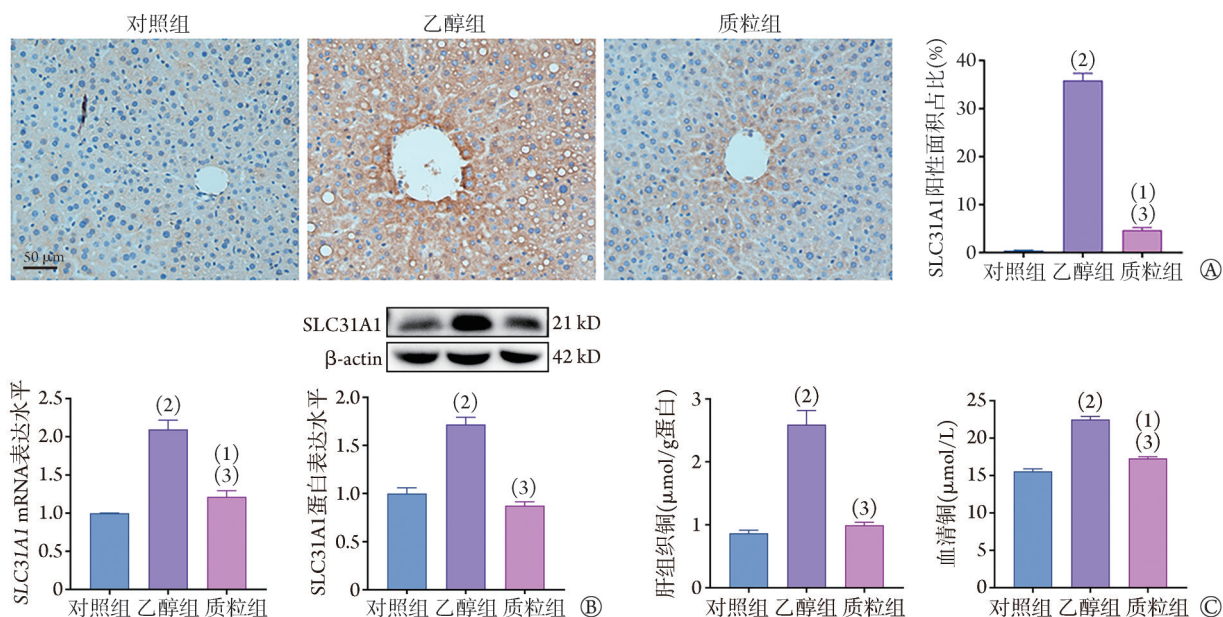


图2 AFLD小鼠肝组织SLC31A1表达和铜含量变化

Fig.2 Changes in SLC31A1 expression and copper content in hepatic tissue of AFLD mice

A. SLC31A1 阳性面积占比; B. SLC31A1 mRNA和蛋白表达水平; C. 小鼠肝组织和血清铜含量。与对照组相比, (1) $P<0.05$, (2) $P<0.001$; 与乙醇组相比, (3) $P<0.001$ 。AFLD: 酒精性脂肪肝; SLC31A1: 溶质载体家族31成员1

2.3 抑制 SLC31A1 表达对 AFLD 小鼠氧化应激的影响

与对照组比较, 乙醇组小鼠肝组织 SOD 活性、GSH 含量明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.001$), 而 MDA 含量明显增加($P<0.01$); 与乙醇组比较, 质粒组小鼠肝组织 SOD 活性、GSH 含量明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.001$), 而 MDA 含量明显降低($P<0.01$, 图 3A), 恢复至正常水平。

Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, 乙醇组小鼠肝组织 Nrf2 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$), 而 CYP2E1 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$); 与乙醇组相比, 质粒组小鼠肝组织 Nrf2 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$), 而 CYP2E1 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$, 图 3B)。

2.4 抑制 SLC31A1 表达对 AFLD 小鼠脂质代谢的

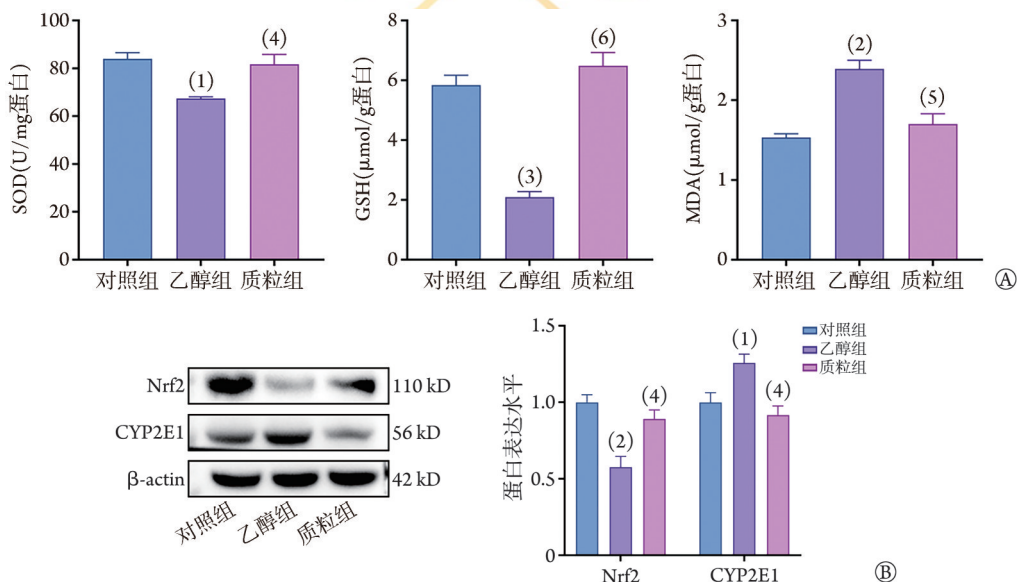


图3 抑制 SLC31A1 表达对 AFLD 小鼠氧化应激的影响

Fig.3 Effects of SLC31A1 expression suppression on oxidative stress in AFLD mice

A. 小鼠肝组织 SOD 活性、GSH 和 MDA 含量; B. 小鼠肝组织 Nrf2、CYP2E1 蛋白表达水平 (Western blotting 检测)。与对照组相比, (1) $P<0.05$, (2) $P<0.01$, (3) $P<0.001$; 与乙醇组相比, (4) $P<0.05$, (5) $P<0.01$, (6) $P<0.001$ 。AFLD: 酒精性脂肪肝; SLC31A1: 溶质载体家族31成员1; SOD: 超氧化物歧化酶; GSH: 谷胱甘肽; MDA: 丙二醛; Nrf2: 核因子 E2 相关因子 2; CYP2E1: 细胞色素 P450 家族 2 亚家族 E 成员 1

影响 与对照组比较,乙醇组小鼠肝组织和血清 TC、TG 含量明显增加($P<0.01$ 或 $P<0.001$);与乙醇组比较,质粒组小鼠肝组织和血清 TC、TG 含量明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$,图 4A)。

Western blotting 检测结果显示,与对照组比较,乙醇组小鼠肝组织 p-AMPK- α 1/AMPK- α 1 比值、PPAR- α 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$);与乙醇组比较,质粒组 p-AMPK- α 1/AMPK- α 1 比值、PPAR- α 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图 4B)。

2.5 抑制 SLC31A1 表达对 AFLD 小鼠肝组织中 MAPK、NF- κ B 信号通路蛋白表达的影响 Western blotting 检测结果显示,与对照组比较,乙醇组小鼠肝组织 p-JNK/JNK、p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、p-I κ B- α /I κ B- α 比值明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.001$);与乙醇组比较,质粒组 p-JNK/JNK、p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、p-I κ B- α /I κ B- α 比值明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$,图 5)。

3 讨 论

肝脏是乙醇代谢的主要器官,长期过量饮酒可导致肝损伤,引发 AFLD^[8];该疾病的主要特征为肝细胞内 TG 与 TC 过度积累^[9]。本研究结果显示(图 1、4),AFLD 模型(乙醇组)小鼠肝组织损伤加重,脂滴面积占比及 TG、TC 含量增加,同时 p-AMPK- α 1/AMPK- α 1 比值、PPAR- α 蛋白表达水平

下降,这些变化共同印证,该模型的病理生理特征在于肝脏脂质代谢紊乱与异常蓄积。酒精性肝病可分为 4 个阶段:AFLD、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化、肝硬化^[10],其中 AFLD 是酒精性肝病的早期反应,也是酒精性肝病进行性发展为脂肪性肝炎、肝纤维化、肝硬化甚至肝癌的关键病理前提^[11-12]。目前 AFLD 的治疗方法涵盖戒酒、营养支持、药物干预及肝移植等,这些手段虽能发挥一定效果,但受治疗周期长、费用高昂及发病机制复杂等因素限制,有效疗法的研发进展受到限制。基于此,探寻可用于 AFLD 治疗的靶点具有重要意义。

SLC31A1 负责细胞对铜的大部分摄取,这种同源三聚体 N-和 O-糖基化蛋白位于质膜上,其较大的细胞外结构域富含与铜结合的氨基酸(组氨酸和甲硫氨酸),被认为可引导铜流向位于三聚体中心的跨膜通道^[13]。铜作为人体必不可少的重金属元素,是多种酶与蛋白质的重要组分。机体内适量的铜对于能量代谢、自由基的清除、免疫系统的正常发育和维持具有不可忽视的正向调控作用^[14]。本研究结果显示(图 2),乙醇组小鼠肝组织中 SLC31A1 表达升高,继而引起铜含量升高,而抑制 SLC31A1 的表达后铜含量明显下降。有研究表明,肝脏疾病、神经障碍、心血管疾病、动脉硬化等疾病的发生与铜诱导机体产生的氧化应激有关^[15]。氧化应激是推动 AFLD 发展的关键因素,乙醇可经氧化与非氧化两种途径进行代谢,其中氧化途径占据主导地位。参与乙醇解

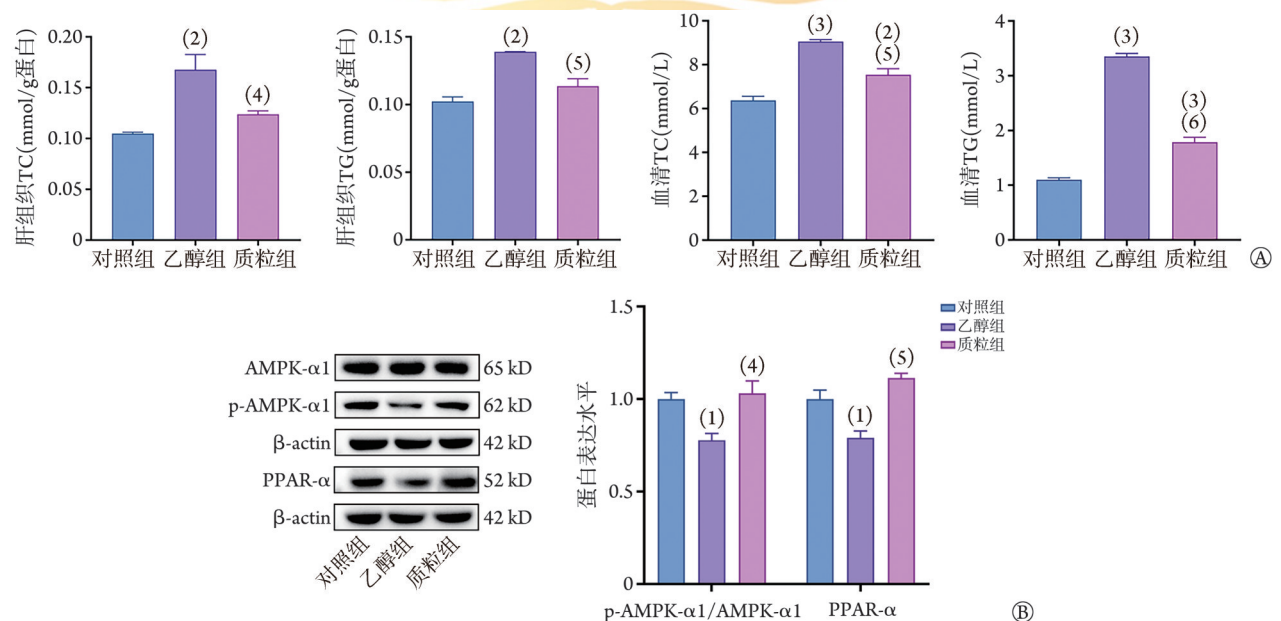


图 4 抑制 SLC31A1 表达对 AFLD 小鼠脂质代谢的影响

Fig.4 Effects of SLC31A1 expression suppression on lipid metabolism in AFLD mice

A. 小鼠肝组织和血清 TC、TG 含量; B. 小鼠肝组织 p-AMPK- α 1、AMPK- α 1、PPAR- α 蛋白表达水平(Western blotting 检测)。与对照组相比, (1) $P<0.05$, (2) $P<0.01$, (3) $P<0.001$; 与乙醇组相比, (4) $P<0.05$, (5) $P<0.01$, (6) $P<0.001$ 。AFLD. 酒精性脂肪肝; SLC31A1. 溶质载体家族 31 成员 1; TC. 总胆固醇; TG. 甘油三酯; AMPK α 1. 腺苷酸活化蛋白激酶 α 1; PPAR- α . 过氧化物酶体增殖物激活受体 α

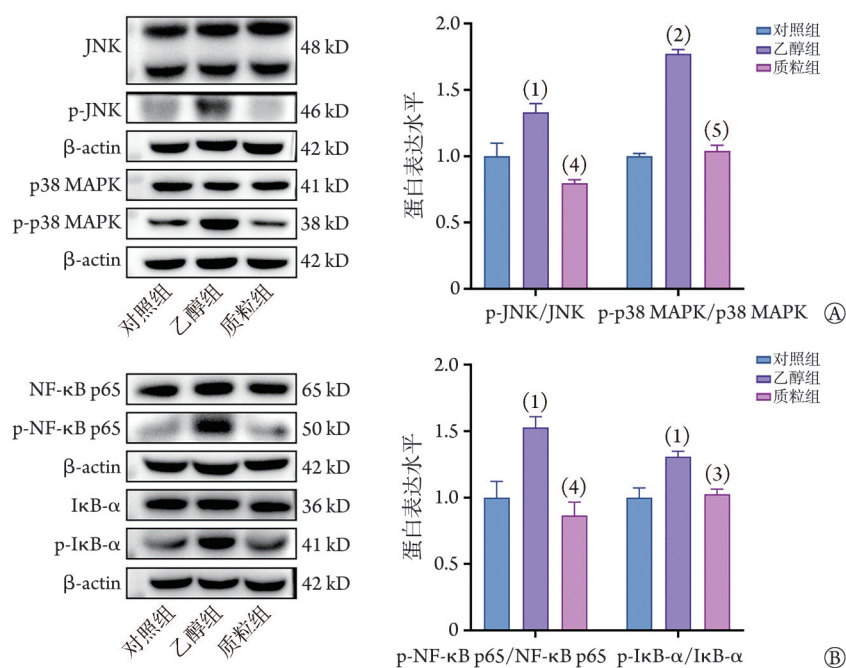


图5 抑制SLC31A1表达对AFLD小鼠肝组织MAPK、NF-κB信号通路蛋白表达的影响

Fig.5 Effects of SLC31A1 expression suppression on MAPK and NF-κB signaling pathway protein expression in liver tissue of AFLD mice

A. 小鼠肝组织中MAPK信号通路蛋白的表达; B. 小鼠肝组织中NF-κB信号通路蛋白的表达。与对照组相比, (1) $P<0.05$, (2) $P<0.001$; 与乙醇组相比, (3) $P<0.05$, (4) $P<0.01$, (5) $P<0.001$ 。AFLD. 酒精性脂肪肝; SLC31A1. 溶质载体家族31成员1; JNK. 应激活化蛋白激酶; p38 MAPK. p38丝裂原活化蛋白激酶; NF-κB p65. 核因子κB p65; IκB-α. 核因子抑制蛋白

毒的关键肝酶为乙醇脱氢酶(ADH)、乙醛脱氢酶(ALDH)和CYP2E1, 其中ADH和ALDH被急性饮酒激活, 而慢性饮酒可增强CYP2E1的活性^[16]。这些酶促反应过程会引发3个主要的毒性效应: (1)乙醛积累; (2)烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)/NAD⁺比值升高; (3)活性氧(ROS)过量生成。这些毒性因素共同导致PPAR-α表达降低。其最终结果是, 肝脏脂肪酸输出与氧化机制受损, 而脂肪合成途径增强, 从而在肝细胞中形成微泡性或小泡性脂质蓄积^[17]。本研究结果显示(图3), 与对照组相比, 乙醇组小鼠肝脏抗氧化防御系统显著削弱, 表现为SOD活性与GSH含量均明显降低。同时, 脂质过氧化损伤与毒性代谢加剧, 表现为MDA含量与CYP2E1蛋白表达水平明显升高。此外, 介导抗氧化反应的关键转录因子Nrf2、脂代谢蛋白p-AMPK-α1/AMPK-α1比值及PPAR-α的表达也受到抑制; 而在SLC31A1被抑制后, 氧化损伤得到显著缓解, 具体表现为: SOD活性增强、GSH含量升高, Nrf2、p-AMPK-α1/AMPK-α1比值及PPAR-α蛋白表达水平升高, MDA含量与CYP2E1蛋白表达水平下降。这一结果提示, 抑制SLC31A1可增强肝细胞的抗氧化能力, 减轻脂质过氧化损伤, 其作用可能与改善线粒体功能(如减轻脂滴对线粒体的物理性损害)有关。

MAPK广泛分布于哺乳动物细胞的细胞质中, 参与调控细胞从生长到死亡整个生命周期的生物学

反应^[18-19]。其中, JNK、p38 MAPK及细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)是研究较多的3个亚族。JNK通路主要响应细胞应激信号, 并参与调控细胞凋亡过程。而p38 MAPK则可被炎症因子、氧化应激、内毒素等多种刺激激活, 在细胞增殖、分化及炎症反应中发挥关键调节作用。研究表明, 基因表达的多样性所产生的复杂生物学效应, 与p38 MAPK信号通路的活性密切相关^[20-21]。本研究结果显示(图5A), SLC31A1被抑制后, p-JNK与p-p38 MAPK蛋白表达水平明显下降。此外, 除MAPK通路可调控炎症反应外, NF-κB通路同样参与这一调控过程。综上, 这些结果提示, 抑制SLC31A1可能通过协同下调p38 MAPK与JNK的磷酸化水平, 进而减轻酒精性肝损伤中的炎症与应激反应。

NF-κB p65在细胞应对炎症反应、损伤、应激等过程中发挥重要作用^[22], 乙醇代谢产物能够激活NF-κB通路并诱发炎症。本研究观察到(图5B), SLC31A1被抑制后p-NF-κB p65和p-IκB-α蛋白表达水平降低, 提示SLC31A1可能通过调控NF-κB通路参与炎症反应过程, 其缺失可阻断炎症的级联放大效应。

综上所述, 本研究结果表明, 抑制SLC31A1的表达可能通过降低铜含量、减轻炎症反应、增强抗氧化能力及改善脂质代谢紊乱等多重途径, 有效减轻乙醇诱导的小鼠酒精性肝损伤, 提示SLC31A1有

望成为AFLD靶向治疗的潜在靶点。本研究的优势在于,系统阐明了SLC31A1在AFLD中通过调控铜稳态影响多通路的作用机制,并采用CRISPR/Cas9技术进行靶向干预。然而,本研究也存在一定局限性:如未设置“质粒+对照饲料”组,未能完全排除质粒的非特异性影响;样本量参考实验室前期实验及同类研究设计,未进行前瞻性功效分析。此外,当前机制研究主要基于蛋白水平,后续需在细胞模型中进一步明确其上游调控与下游信号传导的具体分子事件。

【参考文献】

- [1] 裴璐华,田璐璐,胡文博,等.药食同源类方药防治酒精性脂肪肝的用药规律分析[J].浙江临床医学,2024,26(6):803-806.
- [2] 杨昊若,寇秋爱,任军华,等.基于SLC31A1/FDX1通路探讨槲皮素抑制铜死亡缓解类风湿性关节炎大鼠的作用及机制[J].中国实验方剂学杂志,2025,31(1):121-130.
- [3] Esfahani M, Mehri F. Homeostatic changes of trace elements in diazinon toxicity in rat model: the beneficial role of resveratrol[J]. Toxicol Rep, 2024, 13: 101719.
- [4] Davis CI, Gu X, Kiefer RM, et al. Altered copper homeostasis underlies sensitivity of hepatocellular carcinoma to copper chelation[J]. Metallomics, 2020, 12(12): 1995-2008.
- [5] 邱明,李登清,彭蔚.肝癌患者血清铜、锌与IL-8水平变化及其相关性[J].肿瘤,2006,26(5):493-494.
- [6] 涂宗键,王柱红,罗鹏,等.微量元素铜在肝癌及癌前病变大鼠血清中的变化及意义[J].环境与健康杂志,2025.
- [7] 张萌,石萌,南欣睿,等.高铜通过转录水平上调LC3表达诱导肝癌HepG2细胞自噬的研究[J].中华肿瘤防治杂志,2022,29(24):1734-1740.
- [8] Lin TA, Ke BJ, Cheng SC, et al. Red quinoa bran extract prevented alcoholic fatty liver disease via increasing antioxidative system and repressing fatty acid synthesis factors in mice fed alcohol liquid diet[J]. Molecules, 2021, 26(22): 6973.
- [9] Li J, Zhou Z, Zhou Q. Kaempferol inhibits lipid accumulation in alcoholic fatty liver disease through PRMT-1-mediated arginine methylation of SCD1[J]. J Antibiot (Tokyo), 2025, 78(11): 686-696.
- [10] Singal AK, Bataller R, Ahn J, et al ACG clinical guideline: alcoholic liver disease[J]. Am J Gastroenterol, 2018, 113(2): 175-194.
- [11] Chen X, Ward SC, Cederbaum AI, et al. Alcoholic fatty liver is enhanced in CYP2A5 knockout mice: the role of the PPAR α -FGF21 axis[J]. Toxicology, 2017, 379: 12-21.
- [12] Dukić M, Radonjić T, Jovanović I, et al. Alcohol, inflammation, and microbiota in alcoholic liver disease[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 3735.
- [13] Pope CR, Flores AG, Kaplan JH, et al. Structure and function of copper uptake transporters[J]. Curr Top Membr, 2012, 69: 97-112.
- [14] 吴柳燕,康振龙,乔娜,等.铜离子在诱导鸡原代肝细胞凋亡方面及其对Drp1基因表达水平的影响[J].中国兽医科,2018,48(7):918-23.
- [15] Marahrens H, von Dörnberg K, Molnár V, et al. Copper intoxication in South American camelids-review of the literature and first report of a case in a Vicuña (Vicugna vicugna) [J]. Biol Trace Elem Res, 2024, 202(12): 5453-5464.
- [16] Salete-Granado D, Carbonell C, Puertas-Miranda D, et al. Autophagy, oxidative stress, and alcoholic liver disease: a systematic review and potential clinical applications[J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(7): 1425.
- [17] Tan HK, Yates E, Lilly K, et al. Oxidative stress in alcohol-related liver disease[J]. World J Hepatol, 2020, 12(7): 332-349.
- [18] 唐朝,曹妍群,陈超亮,等.红景天苷调节MAPK/ERK/mTOR信号通路对OGD/R诱导的海马神经元自噬和凋亡的影响[J].解放军医学杂志,2025,50(8):1008-1014.
- [19] 刘力维,申传安.烧伤对中枢神经系统的影响[J].中华烧伤与创面修复杂志,2025,41(9):901.
- [20] Maik-Rachline G, Lifshits L, Seger R. Nuclear P38: roles in physiological and pathological processes and regulation of nuclear translocation[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(17): 6102.
- [21] Obergasteiger J, Frapporti G, Pramstaller PP, et al. A new hypothesis for Parkinson's disease pathogenesis: GTPase-p38 MAPK signaling and autophagy as convergence points of etiology and genomics[J]. Mol Neurodegener, 2018, 13(1): 40.
- [22] 高峰,于喜微,李晨辰.蛇床子素通过NF- κ B信号通路调控退变髓核细胞的细胞外基质表达、炎症反应及凋亡[J].中华中医药学刊,2024,42(3):142-146.

(责任编辑:纪方方)