

学校编码: 10384  
学号: 32320141153398

分类号密级  
UDC

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

核受体 Nur77 可以通过与 SREBP-1c 相互作用改善非  
酒精性脂肪肝中的脂质堆积

The nuclear receptor Nur77 could improve the lipid  
accumulation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)  
in cooperation with SREBP-1c

王培钰

指导教师姓名: 曾锦章教授  
专业名称: 化学生物学  
论文提交日期: 2017年4月  
论文答辩时间: 2017年5月  
学位授予日期: 2017年

答辩委员会主席:  
评阅人:

2017年 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

# 目录

摘要.....	1
<b>第一章前言</b> .....	<b>3</b>
1. 非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 概述.....	3
1.1 非酒精性脂肪肝的定义及分类.....	3
1.2 非酒精性脂肪肝的发病率.....	4
1.3 非酒精性脂肪肝的危害.....	4
1.4 非酒精性脂肪肝发生机理学说.....	5
1.5 非酒精性脂肪肝的诊断方法及特点.....	6
1.6 非酒精性脂肪肝治疗方法概述.....	7
1.7 非酒精性脂肪肝治疗的挑战.....	8
1.8 非酒精性脂肪肝中 SREBP 的研究概述.....	9
2. SREBP.....	9
2.1 SREBP 的概述.....	9
2.2 SREBP 的切割步骤.....	10
2.3 SREBP 的调控.....	11
2.4 SREBP 与核受体的研究.....	14
3. 核受体.....	16
3.1 核受体的概述.....	16
3.2 Nur77 的概述.....	18
3.3 Nur77 的生物学功能.....	19
3.4 Nur77 调控脂质代谢的研究进展.....	20
4. 立题依据和创新性.....	20
<b>第二章 材料和实验方法</b> .....	<b>22</b>
1. 材料及仪器.....	22
2. 实验方法.....	25
<b>第三章 数据与结果分析</b> .....	<b>30</b>

1. 患者的病历资料分析 .....	30
2. Nur77 在脂肪肝患者中的表达水平 .....	31
3. 非酒精性脂肪肝体外细胞模型中 Nur77 可以改善脂肪堆积 .....	33
4. 酒精性脂肪肝体内模型中 Nur77 对肝脏的保护作用 .....	35
5. 油酸诱导抑制 Nur77 呈时间和剂量依赖性 .....	37
6. Nur77 在转录水平上抑制 SREBP 的表达 .....	39
7. Nur77 调控 SREBP 的潜在机制 .....	40
<b>第四章 讨论 .....</b>	<b>43</b>
<b>第五章 结论 .....</b>	<b>45</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>46</b>
<b>致谢 .....</b>	<b>52</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# Table of Contents

<b>Abstract</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>3</b>
1. Overview of NAFLD .....	3
1.1 the Definition and Classification of NAFLD.....	3
1.2 the incidence of NAFLD.....	4
1.3 the damage of NAFLD .....	4
1.4 the theory of NAFLD.....	5
1.5 the diognise method of NAFLD.....	6
1.6 the therapeutic method of NAFLD.....	7
1.7 the challenge of NAFLD .....	8
1.8 overview of SREBP in NAFLD.....	9
2. SREBP.....	9
2.1 the overview of SREBP .....	9
2.2 incision of SREBP.....	10
2.3 regulation of SREBP.....	11
2.4 the relationship between SREBP and nuclear receptor .....	14
3. Nuclear receptor.....	16
3.1 the overview of nuclear receptor.....	16
3.2 the overview of Nur77.....	18
3.3 the biological function of Nur77.....	19
3.4 Nur77 regulates the lipid metabolism .....	20
4. the innovation of the study .....	20
<b>Chapter 2 Methods and Materials</b> .....	<b>22</b>
1.methods .....	<b>22</b>
2. materials.....	25
<b>Chapter 3 Results</b> .....	<b>30</b>
1. the analysis of pathology .....	30

2. the expression of Nur77 in NAFLD.....	31
3. Nur77 improves lipid accumulation in vivo modle .....	33
4.Nur77 imporves lipid accumulation invitro modle .....	35
5. OA decrease Nur77 in dose and time manner.....	37
6.Nur77 inhibits SREBP in transcriptional level.....	39
7. Nur77 regulates SREBP.....	40
<b>Chapter 4 Discussion .....</b>	<b>43</b>
<b>Chapter 5 Conclusion .....</b>	<b>45</b>
References .....	46
Acknowledge .....	52

厦门大学博硕士学位论文摘要

英文缩略词----中英文对照表

英文缩略词	英文全称	中文全称
NAFLD	Non-Alcoholic Fatty Liver Disease	非酒精性脂肪肝
NAFL	Non-Alcoholic Fatty Liver	单纯的非酒精性脂肪肝
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatitis	非酒精性脂肪肝炎
AST	Aspartate Transaminase	谷草转氨酶
ALT	Alanine aminotransferase	谷丙转氨酶
IR	Insulin Resistance	胰岛素抵抗
CT	Computed Tomography	电子计算机断层扫描
MRI	Nuclear magnetic resonance	核磁共振
FDA	the Food and Drug Administration	美国食品药品监督管理局
SREBP	Sterol-regulatory element binding proteins	胆固醇调节元件结合蛋白
ACC	Acetyl CoA carboxylase	乙酰辅酶 A 羧化酶
Fasn	fatty acid synthetase	脂肪酸合成酶
LDLr	Low-Density Lipoprotein Receptor	低密度脂蛋白受体
IRS-1	Insulin receptor substrate-1	胰岛素受体底物-1
AMPK	AMP-activated protein kinase	腺苷酸活化蛋白激酶
SRE	Sterol Regulatory Element	胆固醇调节元件
SCAP	SREBP-activating protein	SREBP 活化蛋白
Insig	insulin induced gene	胰岛素诱导基因
LXR	liver X receptor	肝 X 受体
S1P	Site 1 protease	丝氨酸磷酸酶
S2P	Site 2 protease	金属锌蛋白酶
bHLH-Zip	basic helix-loop-helixleucine zipper	碱基螺旋环螺旋锌指结构
MAPK	mitogen-activated protein kinase	促分裂原活化蛋白酶
HBV	Hepatitis B virus	乙型肝炎病毒
HCV	Hepatitis C virus	丙型肝炎病毒
PPAR	peroxisome proliferator activated receptor	过氧化物酶增殖激动剂受体



英文缩略词	英文全称	中文全称
FXR	Farnesoid X receptor	类法尼醇 X 受体
RXR	Retinoid X Receptor	维甲酸 X 受体
DBD	DNA-binding domain	DNA 结合区
LBD	ligand-binding domain	配体结合区
NGFI-B	nerve growth factor inducible-B	神经生长因子诱导基因 B

厦门大学博硕士论文摘要库

## 摘要

非酒精性脂肪肝是一直困扰我国和全世界人口的慢性疾病，发病率在 20% 左右，也就是说每 5 个中国人，就有一个是非酒精性脂肪肝的携带者。而 FDA 推荐的《非酒精性脂肪肝病诊疗指南》中，并没有明确有效的预防和治疗非酒精性脂肪肝的药物。所以，明确肝脏细胞脂质代谢的调控机制，筛选出可以改善脂质堆积的药物是迫在眉睫的。本课题通过 80 份病例的分析，试图寻找到能够调控脂质代谢中关键的转录因子 SREBP-1c 的蛋白。我们使用组织免疫的方法来检测患者肝脏穿刺样品中的 Nur77 表达量。结果发现，随着病情的加重 Nur77 表达量逐步降低，而 SREBP-1c 的含量则有显著地上调。随后，我们又建立了非酒精性脂肪肝的细胞体外和小鼠体内模型，发现 Nur77 能够在一个小时之内对环境中的脂质变化做出快速的应答，并且 Nur77 的高表达量能够在一定程度上的改善肝脏的脂质堆积。具体地，我们发现 Nur77 可以结合在 SREBP 启动子区域来抑制其 mRNA 的转录，从而抑制其下游靶基因的表达，抑制脂质合成改善脂质堆积。本课题为寻找有效防治非酒精性脂肪肝的药物，提供了一个潜在作用靶点。

关键词：非酒精性脂肪肝；孤儿核受体 Nur77；胆固醇调节元件结合蛋白

## Abstract

Nonalcoholic fatty liver is a chronic disease that has plagued our country and the world's population. The incidence rate is about 20%, which means there is one non-alcoholic fatty liver carrier every five Chinese people. Even though in FDA recommended "non-alcoholic fatty liver disease diagnosis and treatment guidelines", there is no clear and effective prevention and treatment of non-alcoholic fatty liver drugs. Therefore, it is imminent to clarify the regulatory mechanism of lipid metabolism in liver cells to screen drugs that can improve lipid accumulation. In this study, 80 cases were analyzed to try to find the protein that regulates the key transcription factor SREBP-1c in lipid metabolism. We used tissue immunization to detect Nur77 expression in the patient's liver puncture sample. The results showed that the expression of SREBP-1c was significantly up regulated with the increase of Nur77 expression. Subsequently, we established a model of non-alcoholic fatty liver cells in vitro and in vivo in mice and found that Nur77 was able to respond quickly to lipid changes in the environment within one hour and that the high expression of Nur77 could improve the lipid accumulation in the liver. Specifically, we found that Nur77 can bind to the SREBP promoter region to inhibit its mRNA transcription, thereby inhibiting its downstream target gene expression, inhibiting lipid synthesis to improve lipid accumulation. This topic provides a potential target for the prevention of non-alcoholic fatty liver drugs.

**Key Words:** Non-Alcoholic Fatty Liver Disease; Nur77; SREBP

## 第一章前言

### 1. 非酒精性脂肪肝（NAFLD）概述

#### 1.1 非酒精性脂肪肝的定义及分类

非酒精性脂肪肝（Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD）是指排除酒精和其他已明确的致肝脏损伤等原因，如：肝损伤性药物等，而引起的肝细胞内脂肪过度堆积，并导致肝损伤的一类代谢综合症。2012年，一篇发表在《肝脏病学（Hepatology）》<sup>[1]</sup>的“美国医学指导方针”明确了非酒精性脂肪肝的两个必须要素：1，在肝脏中的影像学和病理切片中，可以观察到有超过5%的肝脏细胞发生了脂肪变性；2，引起脂肪变性的原因不是因为曾有过酒精和肝损伤性药物的摄入。通常，非酒精性脂肪肝不是一个单一的疾病，其患者总是同时出现其他代谢性疾病，如：肥胖、二型糖尿病、冠心病、高血压等<sup>[2]</sup>。

非酒精性脂肪肝的定义较为广泛，其中主要包括三个阶段：单纯性脂肪肝（NAFL）、非酒精性脂肪肝炎（NASH）和非酒精性脂肪肝炎相关肝硬化（Cirrhosis）<sup>[3]</sup>。

单纯性脂肪肝（NAFL）是指肝细胞有超过5%的细胞发生了脂肪变性，并不伴有其他组织学改变，而病灶部位通常在肝小叶。根据肝细胞内堆积的脂滴大小可以分为大泡性、小泡性以及混合型脂肪肝。根据脂肪变性的肝细胞量占总肝细胞数目的比值，可以将单纯性脂肪肝分为四度即F0-4期：F0度有小于5%的肝细胞发生脂肪变性；F1度有5-30%的肝细胞发生脂肪变性；F2度则有30-50%；F4就有50-75%。

而非酒精性脂肪肝炎（NASH）不仅仅指肝细胞发生了脂肪堆积，而且已经伴有炎症。炎症部位通常发生在肝小叶，并常伴有白细胞浸润，同时肝脏细胞会出现气球样变、糖生核和窦周纤维化等病变。炎症程度可以分为三个等级：G0轻度；G1中度；G2重度。但是，非酒精性脂肪肝炎患者的肝脏仍然保持着一定的形态和功能。

到了第三个阶段，也就是肝炎相关肝硬化期，肝小叶的生理结构完全损毁，大量的假小叶形成和大范围的纤维化造成了肝脏整体的小结节性肝硬化。非酒精性脂肪肝炎相关肝硬化又可以分为代偿期和失代偿期。代偿期的肝脏仍然能够发挥肝脏部分的代谢功能仅仅会出现轻度异常，临床表现与非酒精性脂肪肝炎类似；而当病情发展为失代偿期，肝脏代谢功能开始出现紊乱，指征肝脏功能的谷草转氨酶（AST）和谷丙转氨酶（ALT）均大幅升高并出现不同程度的氨基酸和电解质代谢紊乱。严重者会出现腹水并发上消化道出血，并有向肝癌发展的趋势<sup>[4]</sup>。

## 1.2 非酒精性脂肪肝的发病率

非酒精性脂肪肝是困扰着全世界的慢性代谢性疾病。2016年《Metabolism（代谢）》<sup>[5]</sup>杂志公布了非酒精性脂肪肝流行病学的最新患病大数据。具体地，在北美地区患有非酒精性脂肪肝的人数大约是总人数的27%-34%，其中，西班牙籍的北美人患病率最高，概率为45%；而非洲籍的美国人最低也达到了24%。另外，已经有3-5%的北美人口已经从单纯的脂肪肝（NAFL）发展到了非酒精性脂肪肝炎（NASH）。非酒精性脂肪肝在欧洲人口的患病率也达到了25%，也就是说每四个欧洲人里就有一个人患有非酒精性脂肪肝。该疾病在欧洲人口的发病率也存在着地域差异性，其中，仅有8%的保加利亚人患有非酒精性脂肪肝，而希腊却又接近45%人口患有非酒精性脂肪肝。在亚洲，已被统计在内的非酒精性脂肪肝患者占亚洲总人口的15-20%，并且城市区域的疾病发病率远远高出农村地区。具体地，在中国2016年最新公布的非酒精性脂肪肝发病率为20%，也就是说每五个中国人就有一位非酒精性脂肪肝患者，其中香港和台湾地区的发病率为27%。而日本的发病率为15%，韩国为16-22%，印度则为8-30%。

## 1.3 非酒精性脂肪肝的危害

因为肝脏是我们身体中较为沉默的器官，神经丛分布稀疏，所以非酒精性脂肪肝患者多无自觉症状，仅有轻度的匮乏感，易劳累，食欲不振，容易嗝气，肝区腹部常有饱胀感等症状。在现实生活中，大部分的非酒精性脂肪肝病携带者，在得知自己病情后并不采取任何治疗。他们认为该病并不影响他们的生活质量，

于是就抱着一种不以为然的态度。虽然单纯的脂肪肝的确不会给患者带来严重的疼痛感，但是一旦病情加重由单纯的脂肪肝演变成肝硬化或者是恶性肝癌，病情则难以控制，严重者会导致死亡。

一直以来，无论是在医学界还是分子生物学届，都很难明确非酒精性脂肪肝是否一定会发展为肝硬化，是否一定会导致恶性肝癌。但是，最近的研究改变了我们的观念。2016年3月，美国国家癌症研究所（National Cancer Institute）在《自然（Nature）》杂志发表了他们最新的研究成果<sup>[6]</sup>。该文章详细地阐述了非酒精性脂肪肝发展成为恶性肝癌的分子机制，并且明确了非酒精性脂肪肝患者患有肝癌的可能性比正常人大大增高。具体地，由于非酒精性脂肪肝患者的肝脏中有大量的脂质堆积（包括亚麻酸等一类的不饱和脂肪酸），引起线粒体高水平的氧化应激，产生很多具有线粒体破坏性的活性氧，从而导致线粒体损伤。这让富集在线粒体的 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞大量缺失，造成肝脏免疫系统缺陷。CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞恰好是监控癌症发生发展及迁移的重要免疫细胞。所以，非酒精性脂肪肝会导致肝脏细胞选择性地丢失 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞，大大提升了肝癌发生的可能。另外，Brad 等人的数据<sup>[7]</sup>也表明非酒精性脂肪肝患者中已经有 9-20% 发展成为了恶性肝癌，而肝癌是全球死亡率最高的疾病。

另外，肝脏是全身代谢的重要器官，脂肪肝的出现和程度加深可能会引起与其他代谢性疾病，例如：肥胖、冠心病、高血压、高血脂以及二型糖尿病等<sup>[8]</sup>。但是，这些疾病间的错综复杂的关系仍然不明确。以上充分说明，非酒精性脂肪肝需要得到广大科研工作者和医生们的关注。如何能够及时地有效地改善脂质在肝脏的堆积，控制病情进一步发展，将是本课题研究的方向。

#### 1.4 非酒精性脂肪肝发生机理学说

目前，非酒精性脂肪肝发生发展的机理学说并不统一，还没有一个明确的结论，其主要分为原发性学说和继发性学说<sup>[9]</sup>。原发性非酒精性脂肪肝是指患者本身携带有遗传易感基因、发生胰岛素抵抗或者患有代谢综合症。其中已报道的易感基因包括：PNPLA3<sup>[10]</sup>、PEMT<sup>[11]</sup>和 SREBP<sup>[12]</sup>等。携带有易感基因的人群，患有非酒精性脂肪肝的概率较高。此外，胰岛素抵抗（Insulin Resistance, IR）也

是原发性脂肪肝的诱因<sup>[13]</sup>。当机体中出现胰岛素抵抗，细胞对糖的摄取和利用能力显著降低，只能动员外周脂肪来提供能量，结果造成大量的外周皮下脂肪堆积在肝脏，引起脂肪肝。机体本身的脂质代谢紊乱也会引起原发性脂肪肝<sup>[14]</sup>。正常情况下，食物中的油脂从小肠吸收后首先经过肝门静脉丛，然后在肝脏内进行加工包装成脂蛋白入血进行转运。当人们大量食用高脂高糖食物时，则会有大量的脂质物进入肝脏，那些没能够及时转运到外周组织的脂质物则堆积在肝脏。长时间的积累就会产生非酒精性脂肪肝，同时会引起肥胖、糖尿病、高脂血症等代谢综合征。

而继发性学说<sup>[14]</sup>则是把病因归为一些外界因素，例如：营养不良，减肥或者手术后体重急剧下降导致全身的脂肪动员堆积在肝脏，还有激素类药物的不良使用和工业毒物中毒等，这些因素所致脂肪肝则均属于继发性非酒精性脂肪性肝病范畴。

### 1.5 非酒精性脂肪肝的诊断方法及特点

目前，在中国非酒精性脂肪肝的诊断的“金标准”是肝脏活体检测穿刺（Iecoris biopsy）<sup>[15]</sup>。医生们可以直接通过染色观察病理切片，来判断患者肝脏内脂肪堆积程度、是否有炎症和是否发生纤维化，以便确定下一步治疗方案。活体穿刺技术在国内比较成熟，而且准确度高，是临床上常用的诊断方法。但是，肝穿刺活检给患者带来的创伤较大，病人的顺应性较差，一般病情较轻的患者难以接收这样的诊断。而且活检穿刺容易受到抽样误差的干扰，检测面积仅有针头大小，得到的样品仅能代表取样部位的情况，不能对整个肝脏情况有一个整体的判断。

B超（B-scan ultrasonography）是目前国内使用最多的诊断方法，已被列入常规检查内容，对弥漫性脂肪肝的诊断敏感性较高，价格便宜，操作较为方便，是容易被患者接收的无创诊断。但是，B超所能够提供的信息仅仅是脂肪堆积程度，并不能判断是否有炎症是否发生纤维化。而且，只有当肝细胞内脂肪比重超过30%时，才能够检测出，所以B超在脂肪肝早期诊断中可能会出现偏差。另外，对于同一个B超图谱不同的诊断者可能会给出不一样的结果，造成诊断结

果不准确<sup>[15]</sup>。

CT (Computed Tomography) 和核磁共振 (Nuclear magnetic resonance) 对脂肪肝的特异性识别要高于 B 超, 并且能够判断肝脏是否发生纤维化<sup>[16]</sup>。但是, 这两种检测的价格较高, 不能给予准确的是否发生炎症的信息。

近来, 脂肪肝无创检测 Fibro Scan 和 Fibro Touch 已被引进到国内, 该仪器通过使用“瞬时弹性检测技术”来测定肝脏硬度, 得以评估肝脏脂肪变和纤维化的程度。该检测使用受控衰减参数 (CAP) 作为量化标准, 并将肝脏的硬度值分为 4 个等级 F0-4。F0-1 是没有发生纤维化, F4 是已经有严重的纤维化。该诊断方法检测面积比肝活检超出了接近 100 倍, 是对整个肝脏的扫描, 价格相对于核磁和 CT 更合理, 该检测技术仍然在推广阶段, 进入国内市场不久, 并没有普及使用<sup>[17]</sup>。

## 1.6 非酒精性脂肪肝治疗方法概述

根据《非酒精性脂肪肝病诊疗指南 (2010 年修订版)》<sup>[18]</sup>所推荐的非酒精性脂肪肝治疗方案是首先要判断患者处于脂肪肝的什么阶段, 不同阶段所应采用的治疗不一样的方案。诊断分别从临床诊断 (即患者的饮酒史病史年龄体重等方面)、病理学诊断 (采用病理切片染色分析)、影像学诊断 (B 超和 CT) 和代谢综合征 (生理指标如: ALT、AST、血浆甘油三酯等指标) 这四个方面作为诊断标准, 并将患者准确分型。

首先, 对于单纯脂肪肝患者, 《诊疗指南》的第一条推荐治疗就是纠正日常生活习惯, 如减少高糖高脂饮食的摄入, 合理膳食, 增加有氧运动。指南建议非酒精性脂肪肝患者每周至少运动 4 次, 每周累计运动时间要超过 150 分钟。肥胖者还需每日减少热量摄取 2092-4284KJ (500-1000 大卡)。如果能够控制体脂量, 减少腰围, 降低脂肪在腰腹部的堆积将会对脂肪肝的病情有显著的改善。另一方面, 改善胰岛素抵抗 (IR) 纠正代谢紊乱也是治疗脂肪肝的主要手段。当患者没有明显的肝损伤时, 他们则可以通过合理地安全地使用药物来改善病情, 如: 血管紧张素受体阻滞剂 (Angiotensinreceptorblockers, ARBs)、胰岛素增敏剂 (二甲双胍 Metformin、比格列酮 Pioglitazone、罗格列酮 Rosiglitazone Hydrochloride)



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库