

论著

文章编号:1000-5404(2014)07-0650-05

沉默 PKC δ 表达对 L02 肝细胞脂肪变性和内质网应激的影响

赖姝婕, 王军, 王斌, 魏艳玲, 熊吉, 李青, 李砚, 樊丽琳, 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 研究蛋白激酶 C δ 亚型 (protein kinase C δ , PKC δ) 与肝细胞脂肪变性、内质网应激的关系, 探讨其在非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 发病机制中的作用。方法 用混合脂肪酸构建人正常肝细胞 L02 脂肪变性模型, 油红 O 染色和甘油三酯 (TG) 试剂盒检测细胞脂变程度, 实时荧光定量 PCR 检测 PKC δ 、Bip、XBP-1s mRNA 表达, Western blot 检测其蛋白表达。通过 siRNA 瞬时转染技术沉默 PKC δ 在 L02 细胞中的表达后观察上述指标表达变化。结果 油酸和棕榈酸酯 2:1 混合比例能够成功诱导肝细胞脂肪变性, 与对照组单个细胞脂变面积 (14.47 ± 9.28) 和 TG 含量 (2.30 ± 0.62) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 相比, 脂肪酸 16 h 组脂变面积 (333.06 ± 42.36) 和 TG 含量 (30.86 ± 6.24) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 均显著增加 ($P < 0.05$)。脂肪酸组肝细胞 PKC δ 、Bip、XBP-1s mRNA 和蛋白表达水平较对照组显著升高 ($P < 0.05$), 具有时间依赖性。在相同脂肪酸诱导液处理的条件下, PKC δ siRNA 转染组细胞脂变程度 (30.92 ± 1.29)% 较对照组 (55.32 ± 6.58)% 明显减轻 ($P < 0.05$), 且 PKC δ siRNA 转染组 Bip、XBP-1s 的表达较对照 siRNA 转染组明显降低。结论 PKC δ 在 NASH 形成发展中发挥重要作用, 沉默 PKC δ 能够通过抑制内质网应激减轻肝细胞脂肪变性程度。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝炎; 蛋白激酶 C; 肝细胞脂肪变性; 内质网应激

[中图分类号] R322.47; R329.25; R363.21 **[文献标志码]** A

PKC δ silencing suppresses endoplasmic reticulum stress and attenuates fatty degeneration in steatotic L02 hepatocytes

Lai Shujie, Wang Jun, Wang Bin, Wei Yanling, Xiong Ji, Li Qing, Li Yan, Fan Lilin, Chen Dongfeng (Department of Gastroenterology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship of the expression of protein kinase C δ (PKC δ) with fatty degeneration and endoplasmic reticulum stress in the steatotic hepatocytes, and investigate the role of PKC δ in pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). **Methods** The steatosis model of human L02 hepatocytes was established by induction with fatty acid mixture. Triglyceride (TG) kit was used to measured lipid accumulation in the hepatocytes with Oil Red O staining. The expression of PKC δ , binding immunoglobulin protein (Bip), and spliced X-box binding protein 1 (XBP-1) at mRNA and protein levels were analyzed by real-time PCR and Western blotting respectively. After transient transfection of PKC δ siRNA was used to knock down PKC δ expression in L02 cells, the above expression was detected again. **Results** Fatty acid mixture (oleate-to-palmitate at 2:1) induced hepatic steatosis, the average LD area per cell of fatty acid 16 h group was 333.06 ± 42.36 pixels, which was apparently more than that of the control group (14.47 ± 9.28), and TG content was significantly higher than in control group (30.86 ± 6.24 vs 2.30 ± 0.62 $\mu\text{g}/\text{mg}$, $P < 0.05$). Fatty acid mixture up-regulated the expression of PKC δ , Bip and XBP-1 in a time-dependent manner ($P < 0.05$). Knock-down of PKC δ gene expression led to a reduction in both lipid accumulation [$(30.92 \pm 1.29)\%$ vs $(55.32 \pm 6.58)\%$, $P < 0.05$] and the expression of Bip and XBP-1 during fatty acid mixture-induced hepatic steatosis. **Conclusion** PKC δ may play an important role in the prognosis of NASH. Silencing the gene expression of PKC δ can reduce the degree of fatty degeneration and endoplasmic reticulum stress.

[Key words] non-alcoholic steatohepatitis; protein kinase C δ ; steatotic hepatocyte; endoplasmic reticulum stress

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

[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.20140124.1021.001.html> (2014-01-24)

非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)是非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)进展过程中最重要的阶段,可进一步发展成肝硬化、肝衰竭甚至肝细胞肝癌等终末期肝病。关于NASH的发病机制目前广泛接受的理论是“二次打击”学说,脂肪酸和三酰甘油在肝脏沉积造成“第一次打击”,“第二次打击”则导致了肝细胞损伤、炎症和纤维化,即NASH的发生^[1]。在蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)家族中,对甘油二酯的粘有最高亲和力的是新型PKC(novel PKCs, nPKC),其中亚型PKC δ 的调控机制及其在肝脏胰岛素抵抗、葡萄糖不耐受等代谢综合征中的研究十分广泛^[2-3]。结合免疫球蛋白(binding immunoglobulin protein, Bip),又称GRP78或HspA5,是位于内质网的重要分子伴侣,被认为是内质网应激标志性蛋白^[4]。转录因子(spliced X-box binding protein 1, XBP-1s)不仅可以与内质网应激反应元件(endoplasmic reticulum stress response element, ERSE)结合诱导Bip、CHOP基因的转录活性,而且能够诱导内质网降解增强因子 α 甘露糖苷酶样蛋白(ER degradation-enhancing-mannosidase-like protein, EDEM)基因的转录^[5-6],其表达上调被认为是内质网应激的标志之一。本研究采用油酸、棕榈酸酯(2:1)混合比例构建肝细胞株L02脂肪变性模型,利用RT-PCR和Western blot等方法观察上述蛋白在脂肪酸诱导肝细胞脂肪变性进程中的表达变化。通过siRNA瞬时转染对PKC δ 基因表达进行干扰,研究PKC δ 对内质网应激标志蛋白Bip、XBP-1s的影响,分析其对ERS效应的作用,初步探讨PKC δ 与肝细胞脂肪变性、内质网应激的关系,为阻止非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver, NAFL)向NASH的演进提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和细胞

DMEM培养基和胎牛血清购自HyClone公司,油红O、油酸和棕榈酸酯购自Sigma公司,LipofectamineTM2000购自Invitrogen公司,兔抗磷酸化PKC δ 、PKC δ 、Bip多克隆抗体均购自Cell Signal Technology公司,兔抗XBP-1s多克隆抗体购自Abcam公司,定量PCR反应试剂盒购自TaKaRa公司,PCR引物由上海百利格公司合成,siRNA由广州锐博公司合成。人正常肝细胞株L02由大坪医院野战外科研究所提供。

1.2 细胞培养及分组

人正常肝细胞株L02培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基(含双抗:青霉素0.1 g/L,链霉素0.1 g/L),置于37℃含5% CO₂的温箱中培养,实验分对照组和脂肪酸组。对照组给予含1% BSA的DMEM培养基培养,脂肪酸组给予0.5 mmol/L长链游离脂肪酸(long-chain fatty acids, LCFA),油酸/棕榈酸酯,2:1^[7]。

1.3 油红O染色检测细胞内脂滴含量

将14 mm × 14 mm大小的细胞爬片预先放置于12孔板内,取对数生长期的L02以1 × 10⁵/孔接种24孔板,细胞贴壁后按实验分组开始干预。PBS漂洗2次,10%多聚甲醛室温固定,油红O染色,苏木精细胞核复染,显微镜下观察细胞内红色脂滴含量并采集图像。细胞计数方法:以胞浆着色呈橘红色者为阳性细胞,分别在培养孔3、6、9、12位点随机选取4个区域进行细胞计数并取均值,每个区域计数约300个细胞,计算染色阳性细胞数占总细胞数的百分比(阳性率)。

1.4 检测细胞内甘油三酯(TG)含量

1 × 10⁵/mL细胞接种,细胞贴壁后按实验分组开始干预,细胞裂解液收集总蛋白并用BCA法检测蛋白浓度,反复冻融裂解细胞,12 000 r/min离心10 min,取上清检测TG的含量,按试剂盒说明进行操作,计算每毫克蛋白所对应的TG含量(μ g/mg)。

1.5 PKC δ siRNA转染L02细胞

转染前1 d 2 × 10⁵细胞接种于12孔板中,使用不含抗生素的培养液培养,待细胞达到50% ~ 70%融合后,按照Lipofectamine2000说明书进行操作,4 ~ 6 h后更换新鲜培养液继续培养。细胞转染后24 h荧光显微镜下观察转染效率,利用RT-PCR及Western blot筛选干扰效率最大的siRNA片段进行后续实验。干扰实验分为对照siRNA转染组(negative control siRNA),对照siRNA脂肪酸组(NC siRNA + FA),PKC δ siRNA转染组(PKC δ siRNA),PKC δ siRNA脂肪酸组(PKC δ siRNA + FA)。

1.6 RT-PCR检测PKC δ 、Bip、XBP-1 mRNA表达

Trizol法提取各组细胞总RNA,紫外分光光度计测定纯度并定量。按照反转录试剂盒说明进行逆转录反应。荧光定量PCR反应体系为20 μ L,1 μ L反转录产物,MaximaTM SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 10 μ L,上下游引物各0.5 μ L,扩增数为:95℃ 1 min → (95℃ 5 s, 55℃ 20 s, 72℃ 15 s),进行40个循环。

1.7 Western blot检测相关蛋白表达

用预冷PBS洗涤细胞3次,RIPA裂解液裂解细胞(冰上操作),BCA法测定蛋白浓度。将蛋白提取液进行SDS-PAGE电泳,电泳分离的蛋白电转至PVDF膜。8%脱脂牛奶封闭1 h,分别加入抗PKC δ 、p-PKC δ 、Bip、 β -actin抗体(1:1 000)、XBP-1s抗体(1:10 000),4℃孵育过夜,TBST洗涤5次,加入相应HRP标记二抗(1:10 000),37℃孵育1 h。TBST洗涤3次,化学发光试剂显色,暗室X线胶片曝光。

1.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 18.0统计软件,多个样本均数的比较采用单因素方差分析,两个样本均数的比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 油酸/棕榈酸酯(2:1)体外诱导成功建立L02细胞脂肪变性模型

油红O染色:对照组仅见少量阳性橘红色脂滴;脂肪酸组

橘红色脂滴明显增多,且随培养时间的延长更为明显,并伴有不同程度的脂滴融合现象(图1)。ImageJ2X 图像分析提示 L02 细胞单个细胞脂变面积分别为对照组(14.47 ± 9.28)、脂肪酸 2 h 组(24.63 ± 15.57)、4 h 组(50.76 ± 17.00)、8 h 组(131.07 ± 32.85)、16 h 组(333.06 ± 42.36),与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

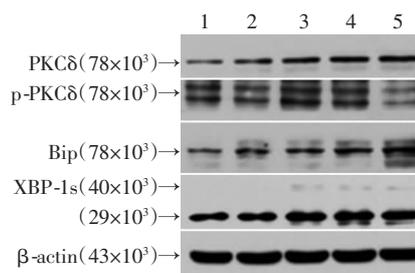
TG 含量:经油酸、棕榈酸酯诱导处理后,L02 细胞内 TG 含量随培养时间的延长而升高。与对照组(2.30 ± 0.62) μg/mg 相比,脂肪酸 2、4、8、16 h 组细胞内 TG 含量均明显增加,分别为(5.29 ± 1.61)、(10.03 ± 1.92)、(21.56 ± 3.79)、(30.86 ± 6.24) μg/mg,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 混合脂肪酸对 ERS 标志蛋白 Bip、XBP-1s 及 PKCδ mRNA 水平表达的影响

RT-PCR 结果显示:相比对照组,脂肪酸组的 L02 细胞明显促进 Bip、XBP-1s 及 PKCδ 基因的表达,且具有时间依赖效应,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 混合脂肪酸对 Bip、XBP-1s 及 PKCδ 蛋白水平表达的影响

在 L02 细胞中,脂肪酸组 Bip、PKCδ 蛋白的表达均较对照组增高,且呈时间依赖效应。利用 PKCδ 充分激活所必需的磷酸化位点 Thr-505 检测 PKCδ 激活状态,与对照组相比,混合脂肪酸刺激 L02 肝细胞早期阶段,PKCδ 磷酸化表达明显升高,以 4 h 组最为显著,晚期出现下降趋势。XBP-1s 表达也随脂肪酸作用时间的延长而增加,4、8 h 组较对照组增加最为显著。见图 3。

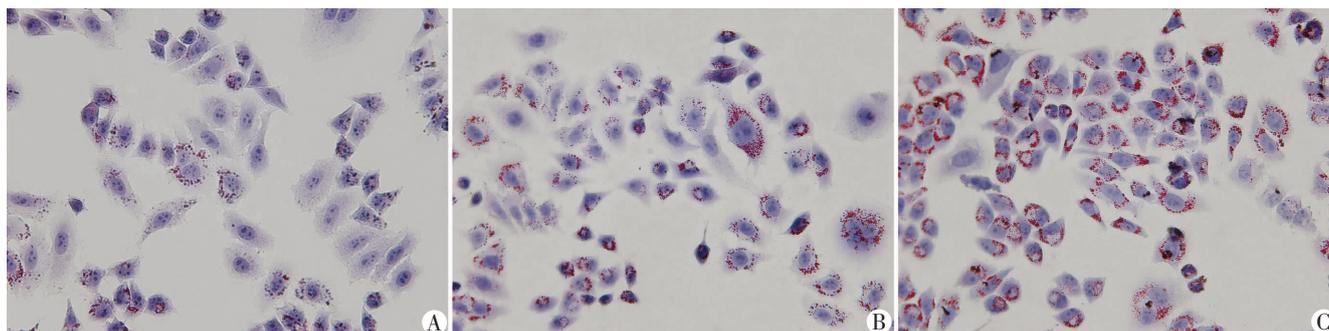


1: 对照组;2~5: 分别为 2、4、8、16 h 脂肪酸组

图 3 Western blot 检测各组混合脂肪酸刺激 L02 肝细胞不同时间后 PKCδ、Bip、XBP-1s 蛋白的表达

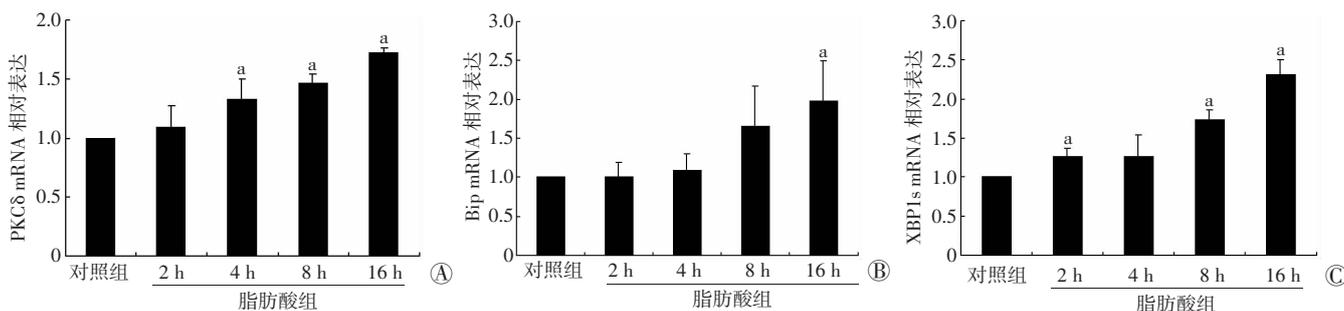
2.4 沉默 PKCδ 表达对 L02 细胞 Bip、XBP-1s 的影响

RT-PCR 法检测转染后细胞中 PKCδ 的表达,结果显示,以对照组和脂肪酸组 2 组为参照,PKCδ siRNA 转染组细胞 PKCδ mRNA 表达水平均较对照 siRNA 转染组显著降低($P < 0.05$)。Western blot 检测转染后 PKCδ 蛋白的表达,结果显示,与对照组相比,PKCδ siRNA 能下调 L02 细胞中 PKCδ 蛋白的表达。混合脂肪酸刺激细胞 8 h 后检测 2 组细胞 Bip、XBP-1s 的表达变化,发现在 PKCδ siRNA 转染组细胞中,加入脂肪酸培养 8 h 后 Bip 表达虽然仍有升高,但程度明显低于对照组。虽然脂肪酸组 XBP-1s 在 mRNA 水平上的表达较对照组均有升高,但在 PKCδ siRNA 转染组其升高程度明显低于对照 siRNA 转染组。在蛋白水平上 PKCδ siRNA 转染组表达均低于对照组,而加入脂肪酸培养 8 h 与不加脂肪酸无明显差异,可能与翻译后的修饰时间延长有关。这些结果提示下调 PKCδ 不仅能够降低 Bip、XBP-1s 基础表达水平,而且能够明显抑制其在肝细胞脂肪变性演进过程中的表达。见图 4、5。



A: 对照组;B: 脂肪酸 8 h 组;C: 脂肪酸 16 h 组

图 1 油红 O 染色观察各组 L02 细胞内脂滴含量变化 (×200)



A: PKCδ mRNA 相对表达;B: Bip mRNA 相对表达;C: XBP-1s mRNA 相对表达;a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图 2 Real-time PCR 检测混合脂肪酸刺激 L02 肝细胞不同时间后 PKCδ、Bip、XBP-1s mRNA 的表达

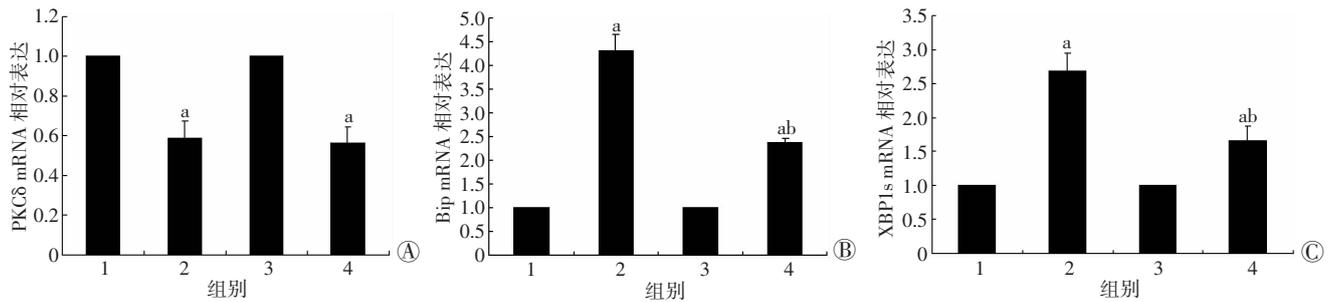
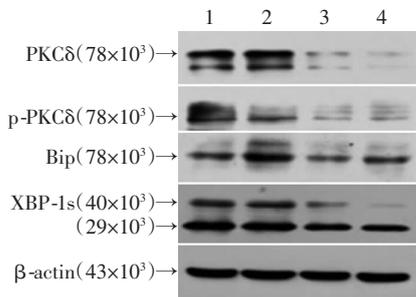


图4 Real-time PCR检测沉默PKCδ对L02肝细胞中Bip、XBP-1s mRNA表达水平的影响
A: PKCδ mRNA 相对表达; 1: 对照 siRNA 转染组; 2: PKCδ siRNA 转染组; 3: 对照 siRNA 脂肪酸组; 4: PKCδ siRNA 脂肪酸组; a: $P < 0.05$, 与对照 siRNA 转染组比较; B: Bip mRNA 相对表达; 1: 对照 siRNA 转染组; 2: 对照 siRNA 脂肪酸组; 3: PKCδ siRNA 转染组; 4: PKCδ siRNA 脂肪酸组; a: $P < 0.05$, 与对照 siRNA 转染组比较; b: $P < 0.05$, 与对照 siRNA 脂肪酸组比较; C: XBP-1s mRNA 相对表达; 1: 对照 siRNA 转染组; 2: 对照 siRNA 脂肪酸组; 3: PKCδ siRNA 转染组; 4: PKCδ siRNA 脂肪酸组; a: $P < 0.05$, 与对照 siRNA 转染组比较; b: $P < 0.05$, 与对照 siRNA 脂肪酸组比较

图4 Real-time PCR检测沉默PKCδ对L02肝细胞中Bip、XBP-1s mRNA表达水平的影响

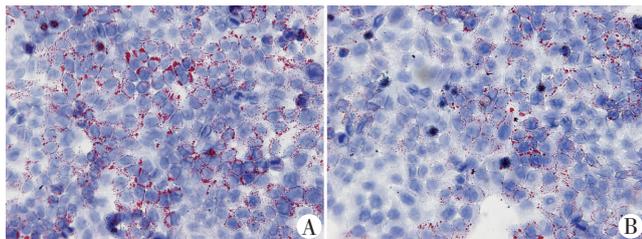


1: 对照 siRNA 组; 2: 对照 siRNA 脂肪酸 8 h 组; 3: PKCδ siRNA 组; 4: PKCδ siRNA 脂肪酸 8 h 组

图5 Western blot检测沉默PKCδ对L02肝细胞中Bip、XBP-1s蛋白表达水平的影响

2.5 L02 肝细胞油红 O 染色阳性细胞率

油红 O 染色结果显示脂肪酸处理 L02 细胞对照 siRNA 转染组和 PKCδ siRNA 转染组染色阳性率分别为 0 h (10.6 ± 1.11)%、(4.57 ± 2.67)%, 2 h (23 ± 1.25)%、(13.94 ± 1.44)%, 4 h (26.6 ± 1.69)%、(18.94 ± 1.3)%, 8 h (43.51 ± 7.85)%、(24.42 ± 1.91)%, 16 h (55.32 ± 6.58)%、(30.92 ± 1.29)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 6。



A: 对照 siRNA 脂肪酸 16 h 组; B: PKCδ siRNA 脂肪酸 16 h 组

图6 油红 O 染色观察各组 L02 肝细胞阳性细胞率变化 (×200)

3 讨论

肝细胞含有丰富的内质网,它是蛋白质合成、折叠、修饰以及转运的主要场所,多种因素诸如低氧、高

血糖、化学毒物等会使内质网腔内稳态失衡,导致未折叠蛋白在内质网腔内蓄积,从而诱发内质网应激。为维持内质网的稳态,需启动未折叠蛋白反应通过降低蛋白质的合成、恢复未折叠蛋白的正确构象以及启动内质网相关降解,从而减轻未折叠蛋白在内质网腔内的过载。如果上述应答仍不能使内质网恢复稳态,则会进一步加重未折叠蛋白在内质网腔内的过度堆积,使内质网应激持续存在,从而促发凋亡途径,导致对肝细胞的损害^[8]。此外,肝细胞内质网应激的持续存在还可启动固醇调节级联反应,增强 FAS 等成脂相关基因的转录,促进甘油三酯的合成和异常堆积,促进脂肪性肝病变进一步发展^[9]。

本研究证明,不饱和脂肪酸和饱和脂肪酸混合诱导 L02 肝细胞脂肪变性程度具有时间依赖性。在肝细胞脂肪变性过程中,PKCδ 及其磷酸化、Bip、XBP-1s 表达增加,通过 siRNA 瞬时转染技术沉默 PKCδ 表达能够有效抑制混合脂肪酸诱导内质网应激标志蛋白 Bip 和 XBP-1s 的表达,一定程度减轻肝细胞脂肪变性。许多学者认为肝细胞脂质过载是发生肝细胞脂肪变性的基础,并与内质网应激密切相关,两者相互作用导致 NASH 的发生。PKC 家族参与代谢和心血管疾病,但不同成员的作用不同。PKCδ 主要在肝脏组织中发挥作用,参与细胞凋亡调控,激活多种蛋白激酶级联启动细胞凋亡信号^[10-12]。大量研究证实 PKCδ 激活与糖尿病相关疾病发病机制密切相关,包括视网膜周细胞凋亡、FFA 诱导胰岛素抵抗等^[13]。研究发现,将编码 PKCδ 的 Prkcd 基因经整体或者肝特异性敲除后,小鼠肝脏胰岛素敏感性得到明显改善^[14]。与高脂饮食饲养野生型同窝对照小鼠相比较,Prkcd^{-/-} 小鼠肝脏和血浆甘油三酯水平及附睾脂肪组织都减少^[15]。我们

的研究结果也显示,通过混合脂肪酸刺激诱导肝细胞脂肪变性能刺激 PKC δ 的表达和活化,提示在混合脂肪酸致肝细胞脂肪变性和肝功能失调过程中,PKC δ 起着重要的作用。

目前学者们认为,内质网应激在肝细胞脂肪变性向脂肪性肝炎的进程十分重要^[16-17]。但肝细胞脂肪变是如何通过 ERS 进展为 NASH,其内在机制仍尚不明确。在本研究结果中,饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸混合比例能够诱导肝 L02 细胞脂肪变性,导致未折叠蛋白在内质网腔内的蓄积,从而诱发 ERS。在肝细胞脂肪变过程中,脂质过载诱发了 PKC δ 的活化,并随作用时间的延长促进作用更明显,而降低 PKC δ 的表达后,L02 细胞脂变程度明显下降,说明 PKC δ 的有效表达促进肝细胞脂肪变性程度。我们的研究结果也显示混合脂肪酸诱导 L02 细胞脂肪变性后,内质网应激标志蛋白 Bip 及其相关蛋白 XBP-1s 表达明显升高,而 PKC δ 沉默组 Bip、XBP-1s 表达下降,说明降低 PKC δ 的表达能够有效抑制内质网应激。综上所述,我们为肝细胞单纯脂肪变性向 NASH 演进的内在机制提供一个新思路:因脂质过载激活的 PKC δ 很可能通过某一信号通路调节改变内质网应激的程度,从而抑制内质网相关降解(ER-associated degradation, ERAD)的正常启动,导致未折叠蛋白在内质网内堆积,进而触发 ERS 的持续存在,最终将导致 NASH 的发生。

这些数据表明,在肝细胞内脂质蓄积过载诱导 ERS 发生过程中,PKC δ 能够调节内质网应激标志蛋白 Bip 及相关蛋白 XBP-1s 的表达。因此,PKC δ 在肝细胞脂肪变性致内质网应激过程中起着重要的作用,是肝细胞脂肪变性及内质网应激的促进因素,进一步支持 PKC δ 在 NASH 发生发展中起重要作用。本研究为 PKC δ 可能是 NASH 发生过程中联系肝细胞脂质过载和内质网应激的关键点提供了一定的借鉴作用,但它是否是 NASH 发生机制“一次打击”和“二次打击”的连接点,值得进一步研究。下一步计划开展 PKC δ 是通过何种环节诱导 ERS 的持续存在,为全面揭示 PKC δ 在 NASH 中的应用价值提供实验依据。

参考文献:

[1] Tuyama A C, Chang C Y. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. *J Diabetes*, 2012, 4(3): 266-280.
[2] Bezy O, Tran T T, Pihlajamaki J, et al. PKCdelta regulates hepatic insulin sensitivity and hepatosteatosis in mice and humans[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(6): 2504-2517.
[3] Yang F, Cai W, Yang K, et al. PKCdelta knockdown inhibits free fat-

ty acid induction of endothelial cell apoptosis [J]. *Cell Biochem Funct*, 2013, 31(5): 380-384.
[4] 曹洁, 杨朝霞, 沈薇, 等. 内质网应激在软脂酸钠诱导的脂肪变性 L02 肝细胞凋亡中的作用[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(18): 1935-1938.
[5] Hu F, Yu X, Wang H, et al. ER stress and its regulator X-box-binding protein-1 enhance polyIC-induced innate immune response in dendritic cells[J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(4): 1086-1097.
[6] Niederreiter L, Fritz T M, Adolph T E, et al. ER stress transcription factor Xbp1 suppresses intestinal tumorigenesis and directs intestinal stem cells[J]. *J Exp Med*, 2013, 210(10): 2041-2056.
[7] Hulver M W, Berggren J R, Carper M J, et al. Elevated stearoyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans[J]. *Cell Metab*, 2005, 2(4): 251-261.
[8] Gentile C L, Frye M, Pagliassotti M J. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(2): 505-521.
[9] Perfield J W 2nd, Ortinau L C, Pickering R T, et al. Altered hepatic lipid metabolism contributes to nonalcoholic fatty liver disease in leptin-deficient Ob/Ob mice[J]. *J Obes*, 2013, 2013: 296537.
[10] Emoto Y, Manome Y, Meinhardt G, et al. Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells[J]. *EMBO J*, 1995, 14(24): 6148-6156.
[11] Freeley M, Kelleher D, Long A. Regulation of Protein Kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites[J]. *Cell Signal*, 2011, 23(5): 753-762.
[12] Kim Y A, Kim M Y, Jung Y S. Glutathione Depletion by L-Buthionine-S, R-Sulfoximine Induces Apoptosis of Cardiomyocytes through Activation of PKC-delta[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2013, 21(5): 358-363.
[13] Brutman-Barazani T, Horovitz-Fried M, Aga-Mizrachi S, et al. Protein kinase Cdelta but not PKCalpha is involved in insulin-induced glucose metabolism in hepatocytes[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(6): 2064-2076.
[14] Almind K, Kahn C R. Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice[J]. *Diabetes*, 2004, 53(12): 3274-3285.
[15] Frangioudakis G, Burchfield J G, Narasimhan S, et al. Diverse roles for protein kinase C delta and protein kinase C epsilon in the generation of high-fat-diet-induced glucose intolerance in mice: regulation of lipogenesis by protein kinase C delta [J]. *Diabetologia*, 2009, 52(12): 2616-2620.
[16] 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.
[17] Musso G, Gambino R, Cassader M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Prog Lipid Res*, 2013, 52(1): 175-191.

(收稿:2013-12-17;修回:2014-01-04)

(编辑 王红)