网络出版时间:2024-02-01 15:44:19 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240201.1117.030

# ATPR 通过促进自噬缓解脂多糖诱导的小鼠急性肝损伤

束传林<sup>1</sup>,施晓蕊<sup>1</sup>,朱如梦<sup>1</sup>,周 青<sup>1</sup>,汪 渊<sup>1</sup>,王 怡<sup>2</sup>,朱华庆<sup>1</sup>

摘要 目的 研究 4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯 (AT-PR)对脂多糖(LPS)诱导 C57BL/6 小鼠急性肝损伤的影响 及相关机制。方法 6 周龄的雄性 C57BL/6 品系小鼠 15 只 随机均分为正常组、模型组和 ATPR 组。ATPR 组小鼠腹腔 注射 ATPR[15 mg/(kg · d)],正常组和模型组给予溶剂,持 续给药1周后,模型组和 ATPR 组腹腔注射 LPS(6 mg/kg), 6 h 后处死所有小鼠。检测小鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)和 谷草转氨酶(AST)含量;qPCR 检测肝脏组织白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的 mRNA 水平;苏木精 -伊红(HE)染色观察小鼠肝脏组织形态学变化:透射电子显 微镜(TEM)观察小鼠肝细胞超微结构变化;Western blot 检 测线粒体损伤相关蛋白 FUNDC1、OPA1 和自噬相关蛋白 LC3B、P62、Beclin1、ATG5的表达水平。结果 与正常组相 比,模型组小鼠血清中 ALT、AST 含量上升,肝脏组织 IL-6、 TNF-α的 mRNA 水平升高, ATPR 组逆转这一变化。HE 染 色显示正常组小鼠肝小叶结构正常,肝索呈放射状排列,无 充血和炎性细胞浸润,肝细胞边界清晰;模型组小鼠肝脏细 胞间隙增大,肝索排列发生紊乱,出现炎性细胞浸润;ATPR 组肝脏细胞间隙、肝索结构有所恢复,炎性细胞浸润较少。 TEM 显示与正常组相比,模型组小鼠肝细胞中受损线粒体 和脂滴堆积,ATPR 组小鼠肝细胞中线粒体形态和数量、脂 滴数量趋于正常。Western blot 显示与正常组相比,模型组 小鼠肝脏组织中 FUNDC1 蛋白表达增多, OPA1 蛋白表达减 少,LC3B II 和 LC3B I 的比值(LC3B II / I)下降,P62 蛋白表 达增多,Beclin1和 ATG5蛋白表达减少,ATPR 组逆转以上 变化。结论 ATPR 通过促进自噬缓解脂多糖引起的小鼠 急性肝损伤。

关键词 4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯;自噬;脂多糖 中图分类号 R 34

2023-08-10 接收

- 基金项目:国家自然科学基金(编号:82170484);安徽省重点研究与 开发项目(编号:202004b11020025);安徽高校自然科学 研究重点项目(编号:KJ2021A0247)
- 作者单位:安徽医科大学<sup>1</sup> 生物化学与分子生物学教研室、分子生物 学实验室,<sup>2</sup> 生命科学学院生物工程系,合肥 230032

作者简介:束传林,女,硕士研究生;

朱华庆,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: aydzhq @126.com;

王 怡,女,博士,讲师,责任作者,E-mail: wangyi@ ahmu. edu. cn 文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2024)02 - 0200 - 07 doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2024.02.003

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性细 菌细胞壁外壁的组成成分,是脓毒血症的主要诱因。 在临床上脓毒血症合并肝损伤是较常见的急危重症 之一,是脓毒血症导致多器官功能障碍的一种表现 形式<sup>[1]</sup>。自噬普遍发生于真核生物体内,是细胞通 过溶酶体降解自身组分,以达到维持细胞内正常生 理活动及稳态的一种细胞代谢过程。自噬小体是自 噬形成的标志性物质,内容物为线粒体、内质网、糖 原或其他细胞器及细胞质成分。细胞通过自噬将胞 内的受损细胞器及异常大分子物质包裹并运输至溶 酶体进行降解,保护肝脏细胞免受损害,维持细胞内 营养物质代谢平衡及能量供应<sup>[2]</sup>。此外,最近的研 究<sup>[3]</sup>表明,自噬的变化是各种肝脏疾病的基础,包 括脂肪肝、脂肪变性、病毒性肝炎、药物或缺血再灌 注诱导的肝损伤等。

全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)是 维生素 A 的天然代谢产物,作为一种新型抗炎药 物,在脓毒血症治疗中可以减少促炎细胞因子的产 生<sup>[4]</sup>。4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯(4-amino-2trifluoromethyl-phenyl retinate, ATPR)是以 ATRA 为 基础设计合成的新型维甲酸衍生物,表现出比 AT-RA 更好的溶解性<sup>[5]</sup>。该实验以 C57BL/6 小鼠为研 究对象,腹腔注射 LPS 造急性肝损伤模型,探究 AT-PR 缓解小鼠急性肝损伤的机制。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 15只6周龄的C57BL/6雄性小 鼠购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,于安 徽医科大学实验动物中心SPF级环境中饲养,环境 温度(20±2)℃,湿度40%~70%,12h光照12h 黑暗交替。所有实验动物的饲养与操作均符合安徽 省实验动物中心管理饲养条例[实验动物使用许可 证编号:SYXK(皖)2020-001,生产许可证编号: SCXK(苏)2018-0008,伦理批号:LLSC20210825]。 1.1.2 实验试剂 4%的戊巴比妥钠由安徽医科大 学实验动物中心提供;LPS 购自美国 Sigma 公司; ATPR 由安徽医科大学药学院合成;聚氧乙烯蓖麻 油、2.5%戊二醛固定液(电镜专用)购自上海源叶 生物科技有限公司;多聚甲醛溶液、蛋白上样缓冲液 购自北京兰杰柯科技有限公司;转氨酶检测试剂盒 购自南京建成生物工程研究所;TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂购自北京天根生化科技有限公司;逆 转录试剂盒、qPCR 试剂盒购自上海新贝生物科技 有限公司; RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂购自上海碧 云天生物技术有限公司; anti-LC3B、anti-P62、anti-Beclin1 抗体、anti-FUNDC1 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; anti-ATG5 抗体、anti-OPA1 抗体购自上海 Abmart 公司; anti-GAPDH 抗体购自 武汉三鹰生物技术有限公司:山羊抗兔 IgG-HRP、山 羊抗小鼠 IgG-HRP 购自美国 Santa Cruz 公司。

1.1.3 实验仪器 酶标仪、高速低温离心机购自美 国 Thermo Fisher Scientific 公司;正置生物显微镜购 自德国 Leica 公司;透射电子显微镜 Talos L120C G2、化学发光凝胶成像分析系统 ChemiDoc<sup>™</sup> Touch Imaging System 购自美国 Bio-Rad 公司; -80 ℃超低 温冰箱购自日本 SANYO 电器股份有限公司; pH 仪 购自上海雷磁仪器厂;磁力搅拌器购自北京中兴伟 业仪器有限公司;电泳仪、电泳槽购自北京六一仪器 厂。

### 1.2 方法

1.2.1 动物模型建立 15只C57BL/6 雄性小鼠适 应性饲养1周,体质量(22±2)g,随机分成3组:正 常组、模型组、ATPR组,每组5只。ATPR组腹腔注 射ATPR15 mg/(kg・d),正常组、模型组腹腔注射 等体积的0.9% NaCl溶液(含25%聚氧乙烯蓖麻 油),连续7d进行以上操作,第8天模型组、ATPR 组腹腔注射LPS6 mg/kg,6h后处死所有小鼠。

1.2.2 动物样本获取及处理 使用 4% 的戊巴比 妥钠麻醉小鼠,眼球取血后处死小鼠,迅速取出肝脏 组织,使用锋利刀片切取长条状,在 2.5% 戊二醛固 定液里切成 1 mm<sup>3</sup> 以内小块,与 2.5% 戊二醛固定 液一起置于 4 ℃冰箱中固定;余下组织用预冷 PBS 溶液漂洗干净后分成两部分,一部分液氮急速冷冻 后置于 - 80 ℃冰箱保存待用,另一部分置于多聚甲 醛中固定后进行石蜡包埋。取出的血液 4 ℃静置 2 h 后 3 000 r/min 离心 10 min,收取血清置于 - 20 ℃ 冰箱待用。

1.2.3 谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)

和谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)检测 收取的血清严格按照试剂盒说明书步骤操作,酶

标仪读取吸光度,根据标准曲线计算转氨酶含量。 1.2.4 qPCR 称取肝脏组织加入 TRNzol 进行研磨,参考 RNA 提取试剂说明书得到总 RNA,使用分 光光度计测量纯度和含量。按照逆转录和 qPCR 试 剂盒的说明书分别进行逆转录和 qPCR,计算小鼠肝 脏组织炎症因子白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor-alpha, TNF- $\alpha$ )的相对表达水平。引物序列如下:IL-6(F: 5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAG-3', R: 5'-AGTGGTA-TAGACAGGTCTGTTGG-3');TNF- $\alpha$ (F: 5'-CCTGTA-GCCCACGTCGTAG-3', R: 5'-GGGAGTAGACAAGG-TACAACCC-3');GAPDH(F: 5'-TGGCCTTCCGTGT-TCCTAC-3', R: 5'- GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA-3')。

1.2.5 苏木精 - 伊红(HE)染色 组织蜡块切片脱 蜡后,按常规方法进行 HE 染色,使用正置显微镜拍 照并保存。

1.2.6 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察小鼠肝细胞超微结构 已固定的肝脏组织送往安徽医科大学科研实验中心,按照 TEM 生物样品制备的基本步骤制样, TEM 下观察肝 细胞超微结构,选取合适视野拍照并保存。

1.2.7 Western blot 检测蛋白表达 取出-80 ℃冰 箱保存的肝脏组织,剪取一部分称重后转入研磨器 中,每0.1g组织加入1ml RIPA裂解液(含1 mmol/L蛋白酶抑制剂),置于冰上研磨并使之充分 裂解后,14 000 r/min 离心 30 min 取上清液,采用 BCA 法测定蛋白浓度,样本加入蛋白上样缓冲液后 沸水中煮 10 min 使蛋白变性,冰上降温后分装并置 于-80 ℃冰箱待用。配制 12% SDS-PAGE 胶,按照 每个泳道蛋白总量为10 µg 上样,电泳完成后在转 移液中将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上,含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 PVDF 膜 2 h。使用 TBST 洗 涤条带3次,再使用TBS洗涤条带1次后切膜,按照 条带位置置于 Anti-LC3B(1:1000)、Anti-P62(1: 1 000), Anti-Beclin1 (1 : 1 000), Anti-ATG5 (1 : 1 000) Anti-FUNDC1 (1 : 1 000) Anti-OPA1 (1 : 1 000)、Anti-GAPDH(1:2 000)抗体中,4 ℃冰箱孵 育 12~18 h。使用 TBST 洗涤条带 3 次,再使用 TBS 洗涤条带1次,室温孵育二抗羊抗兔(1:5000)或 羊抗鼠(1:3000)2h。使用 TBST 洗涤条带 3次, 再使用 TBS 洗涤条带 1 次,使用 ECL 发光试剂显

影。使用 ImageJ 软件计算各条带灰度值, GAPDH 为内参。

**1.3 统计学处理** 实验数据使用 SPSS 20.0 软件 进行数据分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较 用单因素方差分析,以P < 0.05为差异有统计学意 义。

#### 2 结果

**2.1 ATPR 对 LPS 损伤的小鼠血清 ALT 和 AST 的影响** 与正常组比较,模型组 ALT 和 AST 水平上升,差异有统计学意义(*P* < 0.01);与模型组比较, ATPR 组 ALT 和 AST 水平下降,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。见表1。

2.2 ATPR 对 LPS 损伤的小鼠肝脏组织炎症因子 IL-6 和 TNF-α mRNA 相对表达水平的影响 与正 常组比较,模型组炎症因子 IL-6、TNF-α mRNA 相对 表达水平明显上升,差异有统计学意义(*P* < 0.01); 与模型组比较, ATPR 组 IL-6、TNF-α mRNA 相对表 达水平明显下降, 差异有统计学意义(*P* < 0.01)。 见图 1。

表1 ATPR 对 LPS 损伤的小鼠血清 ALT 和 AST 的 影响 $(n = 5, \bar{x} \pm s, U/L)$ 

组别	ALT	AST
正常	11.58 ±1.52	66.53 ±7.75
模型	64.44 ± 6.20 * *	231.50 ± 6.89 * *
ATPR	$22.64 \pm 2.66^{\#}$	$109.10 \pm 6.05^{\#}$
F 值	244.10	763.40

与正常组比较:\*\*P<0.01;与模型组比较:#P<0.01

2.3 HE 染色结果 正常组小鼠肝小叶结构正常, 肝索呈放射状排列,无充血和炎性细胞浸润,肝细胞 边界清晰;模型组小鼠肝脏细胞间隙增大,肝索排列 发生紊乱,出现炎性细胞浸润;ATPR 组肝脏细胞间 隙、肝索结构有所恢复,炎性细胞浸润较少。见图2。



1:正常组;2:模型组;3:ATPR 组;与正常组比较:\*\*P<0.01;与模型组比较:#\*P<0.01



图 2 光学显微镜下小鼠肝脏 HE 染色结果

2.4 TEM 观察小鼠肝脏细胞超微结构 与正常组 比较,模型组小鼠肝细胞中线粒体出现嵴减少或消 失和膜不完整的现象,受损线粒体数量明显增多,脂 滴数量增多;ATPR 组小鼠肝细胞中线粒体形态和 数量、脂滴数量趋于正常。见图3。

2.5 ATPR 对 LPS 损伤小鼠肝脏线粒体损伤相关

**蛋白表达水平的影响** Western blot 结果显示,与正常组比较,模型组小鼠肝脏组织 FUNDC1 蛋白表达 增多(*P* < 0.01), OPA1 蛋白表达减少(*P* < 0.01); 与模型组比较, ATPR 组小鼠肝脏组织 FUNDC1 蛋 白表达减少(*P* < 0.01), OPA1 蛋白表达增多(*P* < 0.01)。见图 4。



图 3 TEM 下小鼠肝脏细胞超微结构(图中箭头示自噬小体)



0.01)。见图5。

ATRA 是维生素 A 在体内的活性代谢产物,具

有多种生物学功能,如降低关键炎症信号蛋白磷酸 化水平<sup>[4]</sup>,转录调节一些参与介导人体典型抗氧化

反应基因的表达水平<sup>[6]</sup>。ATRA 在临床上主要用于

治疗急性早幼粒细胞白血病, ATPR是以ATRA为

3 讨论

**2.6 ATPR 对 LPS 损伤小鼠肝脏自噬相关蛋白表 达水平的影响** Western blot 结果显示,与正常组比 较,模型组小鼠肝脏组织 LC3B II 和 LC3B I 的比值 (LC3B II / LC3B I )减小(*P* < 0.01), P62 蛋白表达 增多(*P* < 0.01), Beclin1 和 ATG5 蛋白表达减少(*P* < 0.01); 与模型组比较, ATPR 组小鼠肝脏组织 LC3B II / LC3B I 增大(*P* < 0.01), P62 蛋白表达减 少(*P* < 0.01), Beclin1 和 ATG5 蛋白表达减

A В 2 3 2 3 ku ku LC3B I 60 62 P62 LC3BII 14 GAPDH 36 GAPDH 36 1.5 2.0 1.5 LC3B II /LC3B I 1.0 P62/GAPDH 1.0 0.5 0.5 0 0 1 2 3 1 2 3 С D 2 1 3 1 2 3 ku ku 60 ATG5 55 Beclin1 GAPDH 36 36 GAPDH 1.5 1.5 Beclin1/GAPDH 1.0 ATG5/GAPDH 0.5 1.0 ## 0.5 0 0 2 1 3 1 2 3 图 5 ATPR 对 LPS 损伤小鼠肝脏组织自噬相关蛋白表达水平的影响 A;LC3B Ⅱ/LC3B Ⅰ;B:P62;C;Beclin1;D:ATG5;1:正常组;2:模型组;3:ATPR 组;与正常组比较:\*\*P<0.01;与模型组比较:#P<0.01

基础设计合成的衍生物,在多种肿瘤细胞中被证明 具有优于 ATRA 的高效抗肿瘤活性<sup>[7]</sup>。本研究中, LPS 刺激后,小鼠血清中 ALT 和 AST 水平上升,肝 脏组织炎症因子 IL-6 和 TNF-α mRNA 相对表达水 平上升,肝脏细胞间隙增大,肝索排列发生紊乱,出 现炎性细胞浸润, ATPR 可以缓解以上 LPS 造成的 小鼠肝脏损伤。肝脏具有强大的代谢和解毒等功 能,线粒体结构和功能的改变将导致肝脏损伤。 FUNDC1 是一种位于线粒体外膜的线粒体自噬受 体,通过LIR 基因序列招募 LC3B,在哺乳动物细胞 中启动线粒体自噬。OPA1 是一种定位于线粒体内 膜和膜间隙的 GTP 酶,在线粒体内膜的融合和分裂 中发挥重要作用,维持线粒体嵴结构<sup>[8]</sup>。本研究 中,LPS 刺激后,小鼠肝脏组织 FUNDC1 蛋白表达增 多,OPA1 蛋白表达减少,肝细胞内线粒体出现嵴减 少或消失和膜不完整的现象, ATPR 预处理后小鼠 肝细胞中线粒体形态和结构趋于正常。有研究<sup>[9]</sup> 显示泛素特异性蛋白水解酶 19 通过自噬调控 NL-RP3 功能抑制炎症和促进 M2 样巨噬细胞极化,本

实验以 C57BL/6 小鼠为实验对象, ATPR 预处理后 腹腔注射 LPS, 探究 ATPR 是否通过影响自噬水平 发挥治疗作用。

自噬对细胞生长、存活和稳态是必不可少的,包 括自噬的起始、隔离膜和自噬小体的形成、自噬溶酶 体的形成、溶酶体降解内容物4个阶段。自噬可分 为巨自噬、微自噬以及分子伴侣介导的自噬,一般所 说的自噬是指巨自噬,通过形成具有双层膜结构的 自噬小体包裹胞内物质,包括线粒体自噬、脂自噬、 过氧化物酶体自噬及核糖体自噬等<sup>[10]</sup>。自噬发生 过程中可以检测 3 个关键蛋白,分别是 LC3B、P62 和 Beclin1。LC3B 蛋白合成后, C 末端水解掉一段 多肽,产生胞质分布的 LC3BI;自噬过程中,LC3BI 在一系列酶促作用下向 LC3BII 转变,并结合在自噬 小体膜上,LC3BII与LC3BI的比值大小可用来评估 自噬水平的高低<sup>[11]</sup>。P62 与泛素化蛋白结合,再与 LC3B II 蛋白结合形成复合物,并最终在溶酶体内降 解,在自噬过程中 P62 会不断被消耗<sup>[12]</sup>。Beclin1 与Ⅲ型磷脂酰肌醇三磷酸激酶结合后作为自噬的正 向调节因子,在自噬的启动阶段发挥重要作用[13]。 自噬的整个过程受到不同的自噬相关基因(autophagy-related gene, ATG)的调控, ATG5 参与了自噬小 体的扩张过程<sup>[14]</sup>。

有研究<sup>[15]</sup>发现, LPS 降低 AMPK 的磷酸化, 增加 mTOR 的磷酸化, 导致自噬被抑制, 同时自噬抑

制会导致去极化线粒体的积聚。本研究中,LPS 组 小鼠肝细胞中脂滴数量增多,受损线粒体堆积,肝组 织 LC3B II 和 LC3B I 的比值减小,P62 蛋白表达增 多,Beclin1 和 ATG5 蛋白表达减少,这表明 LPS 所 致小鼠肝损伤与肝组织自噬水平密切相关。ATPR 预处理后小鼠肝组织 FUNDC1 蛋白表达减少,OPA1 蛋白表达增多,肝细胞内线粒体形态和数量趋于正 常,脂滴数量减少,且自噬小体数量增多,肝组织 LC3B II 和 LC3B I 的比值增大,P62 蛋白表达减少, Beclin1 和 ATG5 蛋白表达增多。以上结果表明 AT-PR 可能是通过改善肝损伤小鼠的肝脏自噬水平起 到保护肝脏的作用,但 ATPR 如何影响自噬水平的 分子机制尚不清楚,还有待今后进一步研究。

综上所述, ATPR 对 LPS 诱导的小鼠急性肝损 伤具有保护作用,其机制可能与促进细胞自噬有关, 这些结果表明 ATPR 作为药物对治疗 LPS 造成的肝 脏损伤有一定的潜力。

## 参考文献

- Sun J, Zhang J, Wang X, et al. Gut-liver crosstalk in sepsis-induced liver injury[J]. Crit Care, 2020, 24(1):614.
- [2] Zhao Y, Cai H, Zhou P, et al. Protective effect of ulinastatin on hepatic ischemia reperfusion injury through autophagy activation in Chang liver cells[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(9): 14960 – 70.
- [3] Klionsky D J, Petroni G, Amaravadi R K, et al. Autophagy in major human diseases[J]. EMBO J, 2021, 40(19): e108863.
- [4] Dolin H H, Franco J H, Chen X, et al. Retinoic acid-induced regulation of inflammatory pathways is a potential sepsis treatment
  [J]. Infect Immun, 2023, 91(4): e0045722.
- [5] Li Y, Li G, Wang K, et al. Autophagy contributes to 4-Amino-2-Trifluoromethyl-Phenyl Retinate-induced differentiation in human acute promyelocytic leukemia NB4 cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2017, 319: 1-11.
- [6] Blaner W S, Shmarakov I O, Traber M G. Vitamin A and vitamin E: will the real antioxidant please stand up[J]. Annu Rev Nutr, 2021,41: 105 - 31.
- [7] Du Y, Bao J, Zhang M, et al. Targeting ferroptosis contributes to ATPR-induced AML differentiation via ROS-autophagy-lysosomal pathway[J]. Gene, 2020,755:144889.
- [8] Chen M, Chen Z, Wang Y, et al. Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy[J]. Autophagy, 2016, 12(4):689-702.
- [9] Liu T, Wang L, Liang P, et al. USP19 suppresses inflammation and promotes M2-like macrophage polarization by manipulating NLRP3 function via autophagy[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18 (10): 2431-42.
- [10] Frankel L B, Lubas M, Lund A H. Emerging connections between RNA and autophagy[J]. Autophagy, 2017, 13(1): 3-23.

- [11] 梅 静,喇宏玲,徐桂萍. 自噬激活在抑制丙泊酚诱导的神经 元凋亡中的作用[J]. 安徽医科大学学报,2022,57(10): 1552-8.
- [12] Liu W J, Ye L, Huang W F, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiqutin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation[J]. Cell Mol Biol Lett, 2016,21:29.
- [13] Zhang C, Liang R, Gan X, et al. MicroRNA-384-5p/Beclin-1 as potential indicators for epigallocatechin gallate against cardiomyocytes ischemia reperfusion injury by inhibiting autophagy via

PI3K/Akt pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13: 3607 – 23.

- [14] Zheng W, Xie W, Yin D, et al. ATG5 and ATG7 induced autophagy interplays with UPR via PERK signaling[J]. Cell Commun Signal, 2019, 17(1): 42.
- [15] Dou X, Yan D, Liu S, et al. Thymol alleviates LPS-induced liver inflammation and apoptosis by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and the AMPK-mTOR-autophagy pathway[J]. Nutrients, 2022, 14(14): 2809.

# ATPR alleviates lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice by promoting autophagy

Shu Chuanlin<sup>1</sup>, Shi Xiaorui<sup>1</sup>, Zhu Rumeng<sup>1</sup>, Zhou Qing<sup>1</sup>, Wang Yuan<sup>1</sup>, Wang Yi<sup>2</sup>, Zhu Huaqing<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Biochemistry and Laboratory of Molecular Biology, <sup>2</sup>Dept of Bioengineering, College of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of 4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinate (ATPR) on acute liver injury induced by lipopolysaccharide (LPS) in C57BL/6 mice and its related mechanism. Methods Fifteen 6week-old male C57BL/6 strain mice were randomly divided into normal group, model group and ATPR group, with 5 mice in each group. Mice in the ATPR group were intraperitoneally injected with ATPR (15 mg/kg  $\cdot$  d), and normal group and model group were given solvent. After continuous administration for one week, model group and ATPR group were intraperitoneally injected with LPS (6 mg/kg), and all mice were sacrificed 6 hours later. The contents of Alanine aminotransferase (ALT) and Aspartate aminotransferase (AST) in serum of mice were detected. The mRNA levels of Interleukin-6 (IL-6) and Tumor necrosis factor- alpha (TNF- $\alpha$ ) were detected by qPCR. Hematoxylin-eosin (H&E) staining was used to observe the histopathological changes of liver in mice. The ultrastructural changes of mouse hepatocytes were observed by Transmission electron microscope (TEM). The expression levels of mitochondrial damage-related proteins FUNDC1 and OPA1 and autophagy related proteins LC3B. P62, Beclin1 and ATG5 were detected by Western blot. Results Compared with the normal group, the content of ALT and AST in serum and the mRNA levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in liver tissue increased in the model group, and the changes were reversed in the ATPR group. H&E staining showed that the hepatic lobule structure was normal in the normal group, the hepatic cords were arranged radially, there was no hyperemia and inflammatory cell infiltration, and the hepatocyte boundary was clear. In the model group, the intercellular space of liver was enlarged, the arrangement of hepatic cords was disordered, and inflammatory cells infiltrated. In the ATPR group, the intercellular space of liver and the structure of hepatic cords were restored, and the inflammatory cell infiltration was less. TEM showed that the damaged mitochondria and lipid droplet accumulation in the hepatocytes of mice in the model group were compared with that in the normal group, and the morphology and quantity of mitochondria and lipid droplet in the hepatocytes of mice in the ATPR group tended to be normal. Western blot showed that compared with the normal group, the expression of FUNDC1 protein in the liver tissues of mice in the model group increased, the expression of OPA1 protein decreased, the ratio of LC3B I to LC3B I decreased, the expression of P62 protein increased, the expression of Beclin1 and ATG5 protein decreased, and the above changes were reversed in the ATPR group. Conclusion ATPR alleviates acute liver injury induced by lipopolysaccharide in mice by promoting autophagy.

Key words 4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinate; autophagy; lipopolysaccharide