

研究报告

Research Report

JNK1 基因沉默对 3T3-L1 脂肪细胞高分子量脂联素表达的影响

童汪霞 唐友明 赵晓芳 刘旭东* 吴银凤 吕萍

广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁, 530011

* 通讯作者, lxdlhx@163.com

摘要 利用短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 构建慢病毒载体, 利用慢病毒感染 3T3-L1 细胞, 沉默 3T3-L1 脂肪细胞的 *JNK1* 基因, 观察其受抑制后二硫键 A 氧化还原酶样蛋白(disulfide-bond A oxidoreductase-like protein, DsbA-L)和高分子量(high molecular weight, HMW)脂联素表达的影响。建立携带 shRNA-JNK1 的慢病毒载体, 用 qPCR 和 Western blotting 从基因和蛋白水平筛选出最佳干扰效果的 shRNA-JNK1 慢病毒。利用筛选出的 shRNA-JNK1 慢病毒沉默 3T3-L1 脂肪细胞 *JNK1* 基因, 通过 Western blotting 检测 DsbA-L、HMW 脂联素的表达, 并探讨了 *JNK1* 基因沉默是否干扰了 AMPK 通路的活化。在 3T3-L1 细胞中筛选出对 *JNK1* 沉默效果最佳的 shRNA-JNK1 组, 抑制率达到 60% 以上 ($p < 0.001$)。用 shRNA-JNK1 慢病毒感染 3T3-L1 脂肪细胞, 用 Western blotting 检测, 结果 AMPK、P-AMPK、DsbA-L 和 HMW 表达明显增加 ($p < 0.001$); 在 3T3-L1 脂肪细胞中 shRNA-JNK1 慢病毒逆转了 AMPK 抑制剂 Compound C 对 AMPK、P-AMPK、DsbA-L 和 HMW 脂联素表达的抑制。3T3-L1 脂肪细胞中, 沉默 *JNK1* 基因后可促进 DsbA-L 和 HMW 脂联素的表达, 且 *JNK1* 有可能通过 AMPK 通路实现对脂联素多聚化的调控。

关键词 短发夹 RNA, 脂联素, 3T3-L1, *JNK1*, AMPK

Effect on Expression of HMW Adiponectin in 3T3-L1 Adipose Cells by Inhibiting the Expression of *JNK1* Gene

Tong Wangxia Tang Youming Zhao Xiaofang Liu Xudong* Wu Yinfeng Lv Ping

Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, 530011

* Correspondence author, lxdlhx@163.com

DOI: 10.13417/j.gab.037.002326

Abstract Lentiviral vectors were constructed by the short hairpin RNA (shRNA) and infected 3T3-L1 cells to observe the effect on expression of DsbA-L and HMW adiponectin in 3T3-L1 adipose cells by inhibiting the expression of *JNK1* gene. We built the lentiviral vector carrying shRNA-JNK1 and chose the shRNA with the highest inhibition of *JNK1* in 3T3-L1 fat cells by Real-time Quantitative PCR and Western blotting measure. The expression of DsbA-L and HMW adiponectin in 3T3-L1 fat cells was determined by Western blotting after infection with shRNA-JNK1 lentiviral, and it was also explored whether inhibiting the expression of *JNK1* gene would interfere with the activation of the AMPK pathway. The shRNA-JNK1 lentiviral with the most significant effect on silence of *JNK1* in 3T3-L1 cells was chose, and inhibition rate reached over 60% ($p < 0.001$). The expression of AMPK, P-AMPK, DsbA-L and HMW were detected by Western blotting and were significantly increased in 3T3-L1 adipocytes infected with shRNA-JNK1 lentivirus ($p < 0.001$); in 3T3-L1 adipocytes, shRNA-JNK1 lenti-

基金项目 :本研究由国家自然科学基金(81360596)、广西自然科学基金(2016GXNSFAA380251)、广西攻关项目(桂科攻1598013-5)和广西八桂学者建设专项经费共同资助

引用格式 :Tong W.X., Tang Y.M., Zhao X.F., Liu X.D., Wu Y.F., and Lv P., 2018, Effect on expression of HMW adiponectin in 3T3-L1 adipose cells by inhibiting the expression of *JNK1* gene, Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 37(5): 2326-2331 (童汪霞, 唐友明, 赵晓芳, 刘旭东, 吴银凤, 吕萍, 2018, *JNK1* 基因沉默对 3T3-L1 脂肪细胞高分子量脂联素表达的影响, 基因组学与应用生物学, 37(5): 2326-2331)

virus reversed the inhibition of AMPK inhibitors Compound C on the expression of AMPK, P-AMPK, DsbA-L and HMW adiponectin. In 3T3-L1 cells, silencing JNK1 gene could promote the expression of DsbA-L and HMW, and JNK1 may modulate high HMW adiponectin through activating AMPK pathway.

Keywords Short hairpin RNA, Adiponectin, 3T3-L1, JNK1, AMPK

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是以胰岛素抵抗为特征的疾病,并且是胰岛素抵抗的早期标志。随着疾病的发展,可继发糖尿病、血管病变等危险病变(Giovanni et al., 2016; Stefano et al., 2016)。

脂联素是目前研究证实作为体内唯一一种具有保护性的细胞因子,主要具有控制肝脏脂肪合成,加速脂肪分解,加强周围组织对胰岛素的敏感性,抑制炎症因子,抗氧化应激和纤维化等作用(Zobair et al., 2016)。其以 3 种形式,即六聚体、三聚体、高分子量(HMW)形式,存在于血液中,其中起主要的活性作用的是高分子量(HMW)形式。在肥胖动物模型和脂肪细胞系的研究证实脂联素 HMW 形式的合成、修饰、分泌,主要受近几年发现的一个关键的分子伴侣 DsbA-L (二硫键 A 氧化还原酶样蛋白)调节,其可促进脂联素的多聚化。DsbA-L 在脂肪细胞内的表达,受 AMPK (AMP 依赖的蛋白激酶)通路调节,AMPK 的活化可促进 DsbA-L 的表达增加(Giovanni and Barbara, 2017)。JNK1 是胰岛素抵抗的中心环节,抑制 JNK1 的表达,可促进 DsbA-L/HMW 脂联素表达,从而有利于改善胰岛素抵抗。

我们假说 NAFLD 这种病理状态中,脂肪细胞 JNK1 对脂联素的多聚化调节,主要通过调节 AMPK 的活化,进而调节 DsbA-L 修饰的主要蛋白 HMW 脂联素而起作用。基于以上假说,我们从细胞水平的脂联素多聚化修饰角度出发,着眼于对 DsbA-L/HMW 脂联素的调节通路,研究 JNK1 对脂肪细胞 DsbA-L/HMW 脂联素的调节,为更深入的研究 NAFLD 的发病本质及治疗提供一定的基础。

1 结果与分析

1.1 shRNA-JNK1 慢病毒对 3T3-L1 脂肪细胞 JNK1 基因的抑制

经过 qPCR 检测分析,CK、NC、shRNA-1、shRNA-2、shRNA-3 和 shRNA-4 组基因的相对表达量分别为 0.79 ± 0.07 、 1.04 ± 0.04 、 0.37 ± 0.05 、 0.62 ± 0.08 、 0.64 ± 0.06 和 0.75 ± 0.05 。shRNA-1 组的 JNK1 基因的相对表达量较其他各组明显降低,对 JNK1 基因的抑制超过 60%,与其他各组相比 p 均小于 0.001 (图 1)。

1.2 JNK1 基因沉默对小鼠 3T3-L1 细胞 DsbA-L、HMW 脂联素、AMPK、P-AMPK 表达的影响

用筛选抑制效果最佳的 shRNA-1 慢病毒感染 3T3-L1 脂肪细胞后,经 Western blotting 分析,与 NC 组比较,shRNA-JNK1 组 AMPK、P-AMPK、DsbA-L 和 HMW 的表达水平明显升高,说明在细胞水平 JNK1 基因被抑制后,AMPK、P-AMPK、DsbA-L 和 HMW 脂联素的活性增强(图 2)。

1.3 JNK1 基因沉默通过活化 AMPK 信号,促进 DsbA-L 和 HMW 脂联素表达

经 AMPK 阻断剂 Compound C (终浓度 $20 \mu\text{mol/L}$) 处理细胞 24 h 后,用 Western blotting 分析,AMPK、P-AMPK、DsbA-L 和 HMW 脂联素的表达减弱,而将 Compound C 先刺激细胞 1 h 后,再加入 shRNA-JNK1 慢病毒作用 24 h 后,发现 AMPK、P-AMPK、DsbA-L 和 HMW 脂联素的表达较 NC 组及 Compound C 组

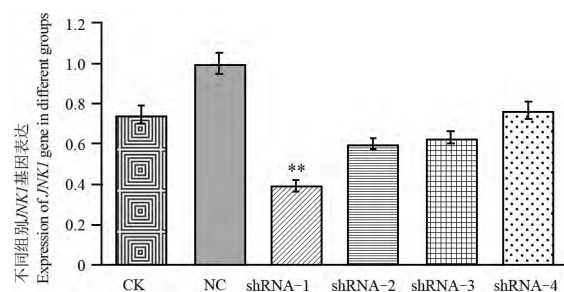


图 1 不同组别 JNK1 基因表达

注: **: 与 CK 组相比, $p < 0.01$

Figure 1 Expression of JNK1 gene in different groups

Note: **: $p < 0.01$ for the CK group vs. shRNA-1 group

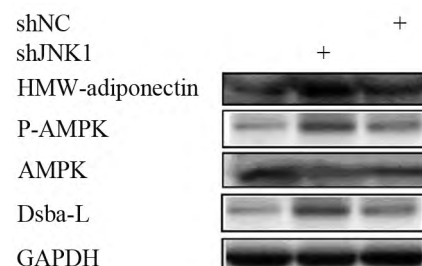


图 2 shRNA-JNK1 慢病毒对 3T3-L1 细胞 AMPK、P-AMPK、DsbA-L 和 HMW 脂联素表达的影响

Figure 2 Effect of shRNA-JNK1 lentivirus on the expression of AMPK, P-AMPK, DsbA-L and HMW adiponectin in 3T3-L1 cells

增强,说明 JNK1 的阻断可以纠正 AMPK 被阻断后引起的 DsbA-L 和 HMW 脂联素变化(图 3)。

2 讨论

随着生活水平不断提高,中国 NAFLD 的发病率呈逐年上升的趋势,然而 NAFLD 的发病机制至今仍未完全阐明(Sepideh et al., 2016)。本研究从细胞水平的脂联素多聚化修饰角度出发,着眼于对 DsbA-L/脂联素的调节通路,研究 JNK1 对脂肪细胞 DsbA-L/脂联素的调节机制。结果发现 JNK1 对脂肪细胞 DsbA-L/脂联素呈负调节作用,其对脂联素的多聚化调节,可能主要是通过 AMPK 信号通路的活化作用实现的。

HMW 脂联素是体内目前被证实的对 NAFLD 唯一有益的细胞因子,其高分子量(HMW)形式在体内起主要的活性作用。HMW 脂联素形式的合成、修饰、分泌,主要受分子伴侣 DsbA-L 的影响。我们的前期研究应用 3T3-L1 脂肪细胞和大鼠原代脂肪细胞,证实了祛湿活血中药可减少脂联素的分泌,以及能够减少脂联素在细胞内表达,特别是以 HMW 的形式(刘旭东等, 2017)。丝裂原活化蛋白激酶家族中的重要成员是 C-Jun 氨基末端激酶(JNK)信号通路,其在 NAFLD 的发生及发展过程中具有调控作用。其中动物实验研究发现炎症反应和 IR (胰岛素抵抗)的重要影响因素是 JNK1 信号通路的激活(Jorn et al., 2006)。有研究者表明 JNK1、P-JNK1 表达明显升高,则肝组织及血清的脂联素明显降低(Guo et al., 2006)。而我们的研究结果也证实,无论是通过 NAFLD 大鼠模型还是 3T3-L1 脂肪细胞, *JNK1* 基因表达减弱后, DsbA-L 和 HMW 脂联素的表达量均有明显增强,提示 JNK1 基因对 DsbA-L 和 HMW 脂联素的表达有负调节作用,说明 JNK1 可能是联系 DsbA-L 和 HMW 脂联素的纽带。

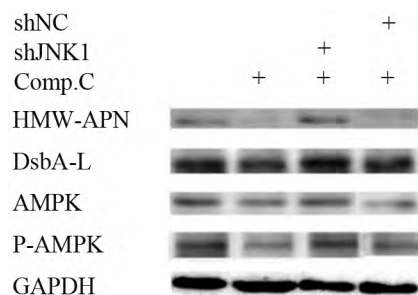


图 3 *JNK1* 基因沉默通过活化 AMPK 信号,促进 DsbA-L1 和 HMW 脂联素表达

Figure 3 Silencing *JNK1* gene can promote the expression of DsbA-L and HMW adiponectin through activating AMPK pathway

腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)级联反应是细胞内能量的开关(Lionel et al., 2017)。有学者用 Compound C (AMPK 抑制剂)处理 3T3-L1 细胞后发现,其能明显抑制 RSV (呼吸道合胞病毒)刺激的 DsbA-L 和脂联素的表达(Wang et al., 2011)。他们接着用 RNAi 抑制了 C₂C₁₂ 肌肉细胞 (表达 DsbA-L 而不表达脂联素)的 AMPK 的表达后,RSV 的刺激效应明显减少了。从而论证了 AMPK 活化是 DsbA-L 表达的促进剂,脂联素的表达是通过 DsbA-L 起作用的。本研究的结果也证实,当用 AMPK 抑制剂 Compound C 处理 3T3-L1 细胞后,AMPK、P-AMPK、DsbA-L 和 HMW 脂联素的表达均减弱,而将 Compound C 加入到 sh-JNK1 组中后,AMPK、P-AMPK、DsbA-L 和 HMW 脂联素的表达却明显增强,这向我们提示 *JNK1* 基因对 DsbA-L 和 HMW 脂联素呈负调控作用,且可能受到 AMPK 通路的调节。正如我们的前期研究一样,我们发现在 3T3-L1 脂肪细胞中采用 shRNA 直接沉默 *FoxO1* 基因后,同时伴随着 DsbA-L 和 HMW 脂联素表达的增加。而 *SIRT1*、*FoxO1*、*P53* 等基因均是 AMPK 信号通路的下游因子(Wang et al., 2011)因此,AMPK 是 JNK1 调控 HMW 脂联素的重要纽带。

我们的研究证明,在 3T3-L1 脂肪细胞中采用 shRNA 直接沉默 *JNK1* 基因,结果导致 JNK1 表达的减少,同时伴随着 AMPK、P-AMPK、DsbA-L 和 HMW 脂联素表达的增加,由此证明了脂肪细胞中 JNK1 信号通路与 MAPK 信号通路、DsbA-L 和 HMW 脂联素的表达调节均有关,且 *JNK1* 基因的沉默可以纠正 AMPK 被阻断后引起的 DsbA-L 和 HMW 脂联素的表达减弱,说明 JNK1 有可能通过 AMPK 通路实现对脂联素多聚化的调控。

3 材料与方法

3.1 主要材料和设备

慢病毒载体质粒使用 pI3.7,购自美国 Invitrogen 公司;DH5 α 感受态细胞(9057),T4 连接酶(2011),限制性内切酶 *Hpa* (164)和 *Xho* (1094)均购自 TaKaRa 公司;Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (11668-019)购自美国 Invitrogen 公司;3T3-L1 细胞购自南京科佰生物有限公司(3582F);胎牛血清 FBS (C2027050)和 DMEM (C12430-062)培养基购自美国 invitrogen 公司;Polybrene 购自 SIGMA 公司(H9268);qPCR 试剂盒 Real Master Mix 购自 TIANGEN 公司;PrimeScript RT Master Mix 购自 TaKaRa 公司(RR03 6A);JNK1 抗体购自 CST 公司(2880S);GAPDH 抗体

购自 BIOWORLD (AP0063); DsbA-L 抗体购自美国 abcam 公司 (ab92819); HMW 脂联素抗体购自美国 Bioworld 公司 (bs-0471R); P-FoxO1 购自 CST 公司 (9461S); 二抗 Goat anti-Rabbit 抗体购自联科公司 (GAR0072); shRNA 及引物等由 Invitrogen 公司合成。

主要使用的设备有:超微量高精度分光光度计 (Nanodrop ND-2000, 美国 Thermo 公司); 酶标仪 (SP-ECTRA max Plus 384, Molecular Devices 公司); 定量 PCR 仪 (CFX Connect Real-Time System 96 孔); 配套使用的分析软件为 BIO-RAD CFX Manager; 凝胶成像仪 (ChemiDoc XRS+ System, Bio-RAD 公司); 电泳系统 (Mini-Proten Tetra System, Bio-RAD 公司)。

3.2 JNK1-shRNA 慢病毒载体构建

采用 pLL3.7 慢病毒载体质粒构建 JNK1-shRNA 慢病毒载体。根据 JNK1 序列设计 shRNA, 在 3' 端引入 *Xho* 酶切位点, 5' 端引入 *Hpa* 酶切位点, 从 Invitrogen 公司合成 shRNA 片段 (表 1)。分别经过溶解、退火、水浴、酶切、连接、转化、PCR 鉴定等步骤。PCR 引物序列: F 5'-TAGGCTTGGATTCTATAAG-3', R 5'-GGAACCCTTAATATACTTCGT-3'。挑取鉴定正确的阳性菌测序, 测序引物为 U6-S: 5'-CAAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGAC-3'。详细步骤和操作方法请参考沈震等的研究报告 (沈震等, 2017)。

3.3 JNK1-shRNA 慢病毒载体包装

培养 293T 细胞, 待细胞生长至 70% 密度时即可开始转染。转染时取 10 μ g JNK1-shRNA 质粒用 500 μ L 无血清培养基稀释, 制成 DNA 稀释液, 再取 50 μ L Lipofectamine 2000 加入到 DNA 稀释液中, 15 min 后将转染复合物逐滴加入到含有细胞和培养基的平皿中。将细胞置于含 5% CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 4~6 h 后换液。48 h 收集病毒上清, 离心去除细胞碎片及其他杂质, 得到的慢病毒液 (病毒滴度为 2 \times 10⁷/mL) 即可用于后续细胞感染。

3.4 3T3-L1 细胞复苏、传代与铺板

取对数生长期的 3T3-L1 细胞接种于 10 cm 培养皿中, 置于培养箱 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱内培养; 待细胞生长成均匀单层细胞并达 90% 汇集度时传代, 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱内继续培养, 待细胞重新生长至一定密度时进行计数。计数后, 调整细胞密度按 2 \times 10⁵ cell/孔细胞接种于 6 孔板中, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱内培养 24 h。

3.5 实验分组

为筛选出最佳 JNK1 沉默效果的 shRNA, 用慢病毒感染 3T3-L1 脂肪细胞。实验分为 CK (空白 3T3-L1 细胞组)、NC (无义序列慢病毒对照组)、shRNA-1 (JNK1-shRNA-1 慢病毒组)、shRNA-2 (JNK1-shRNA-2 慢病毒组)、shRNA-3 (JNK1-shRNA-3 慢病毒组) 和 shRNA-4 (JNK1-shRNA-4 慢病毒组)。

3.6 JNK1-shRNA 慢病毒感染 3T3-L1 细胞

DMEM 完全培养基+终浓度 8 μ g/mL Polybrene 进行病毒感染前换液, 换液后按 NC 组、JNK1-shRNA 组每孔各自加入 500 μ L 病毒上清液, 轻柔混匀, 再将全部细胞置于含 5% CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 培养箱中继续孵育 24 h 后换液, 48 h 后拍照记录。

3.7 qPCR 筛选 JNK1-shRNA 感染 3T3-L1 后 JNK1 基因的表达

Trizol 法提取 3T3-L1 细胞总 RNA, 详细操作严格按照说明书进行。按 RNA 1 μ g, 5 \times PrimeScript RT Master Mix 4 μ L, RNase-free H₂O 15 μ L 配置后混匀, 37 $^{\circ}$ C 干浴 15 min, 85 $^{\circ}$ C 干浴 5 s 终止反应, cDNA 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。引物序列采用 Primer 5.0 软件设计 (表 2), 按顺序加入 96 孔 PCR 板中。qPCR 反应体系包括 2 \times SuperReal PreMix Plus 10 μ L, Forward Primer (10 μ mol/L) 0.5 μ L, Reverse Primer (10 μ mol/L) 0.5 μ L, RNase-free H₂O 4 μ L, cDNA 模板 5 μ L。反应条件: 95.0 $^{\circ}$ C 预变性 15 min, 95.0 $^{\circ}$ C 10 s, 60.0 $^{\circ}$ C 35 s, 40 个循环。CFX Connect Real-Time System 进行定量 PCR。采用 $\Delta\Delta$ Ct 计算各组基因相对表达量。

3.8 Western blotting 检测 JNK1-shRNA 感染 3T3-L1 细胞后 DsbA-L、HMW 脂联素、AMPK、P-AMPK 的表达

为了明确 JNK1 对 DsbA-L 和脂联素的影响是否与 AMPK 的活化有关, 我们用 AMPK 阻断剂 Compound C, 用 Western blotting 观察是否阻断 JNK1 表达可纠正 AMPK 被阻断后引起的 DsbA-L 和 HMW 脂联素的表达。3T3-L1 细胞慢病毒感染 24 h 后提取细胞总蛋白, BCA 法蛋白定量, 通过标准曲线计算蛋白浓度, 取蛋白进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 转移蛋白至 PVDF 膜, 将 PVDF 膜浸入 5% 脱脂牛奶封闭液室温封闭过夜后加入一抗, 室温孵育 2 h, 用 1 \times TBST 缓冲液清洗 3 次后加入二抗, 于室温孵育 1 h, 然后用 1 \times TBST 缓冲液清洗 3 次后将 PVDF 膜于保鲜膜上,

表 1 shRNA-JNK1 序列

Table 1 shRNA-JNK1 sequence

名称	序列
Names	Sequences
NC-F	5'-TTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGAGAAATTTTTTC-3'
NC-R	5'-TCGAGAAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCTTGAACGTGACACGTTCCGAGAAAA-3'
JNK1-shRNA-1-F	5'-TGCAGAAGCAAACGTGACAACATTCAAGAGATGTTGTCACGTTTGCTTCTGCTTTTTTC-3'
JNK1-shRNA-1-R	5'-TCGAGAAAAAAGCAGAAGCAAACGTGCAACATCTCTTGAATGTTGTCACGTTTGCTTCTGCA-3'
JNK1-shRNA-2-F	5'-TGTCTGAATTCATGAAGAATTCAGAGATTCTTCATGAATTCAGGACTTTTTTC-3'
JNK1-shRNA-2-R	5'-TCGAGAAAAAAGTCCTGAATTCATGAAGAATCTCTTGAATTCATGAATTCAGGACA-3'
JNK1-shRNA-3-F	5'-TGGGACTTAAAGCCTAGTAATTCAGAGATTACTAGGCTTTAAGTCCCTTTTTTC-3'
JNK1-shRNA-3-R	5'-TCGAGAAAAAAGGGACTTAAAGCCTAGTAATCTCTTGAATTCATGAATTCAGGCTTAAAGTCCCA-3'
JNK1-shRNA-4-F	5'-TGGTGCATTATGGGAGAAATTTCAAGAGAATTTCTCCATAATGCACCTTTTTTC-3'
JNK1-shRNA-4-R	5'-TCGAGAAAAAAGGTGCATTATGGGAGAAATTTCTCTTGAATTTCTCCATAATGCACCA-3'

表 2 基因名称与引物序列

Table 2 Gene names and primer sequences

引物名称	引物序列
Primer names	Primer sequences
Mus Actin Forward	GGCTGTATCCCCTCCATCG
Mus Actin Reverse	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
Mus JNK1 Forward	ATGTCTACCTTCTCTATCAA
Mus JNK1 Reverse	GCTTTAAGTCCCGATGAAT

加适量 ECL 试剂盒的混合液在膜的表面,进行曝光显影。QUANTITY One4. 5.0 分析软件测定各组蛋白的表达量及内参蛋白 GAPDH 的 OD 值,以相对积分光密度 OD 值进行比较,每组实验重复 3 次。

3.9 统计学处理

用 SPSS 13.0 进行统计分析,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异用 *t* 检验分析, *p* 小于 0.05 认为有统计学差异。

作者贡献

刘旭东、童汪霞是本研究的实验设计和实验研究的执行人,童汪霞、唐友明及赵晓芳完成数据分析,论文初稿的写作;吴银凤、吕萍参与实验操作,试验结果分析;刘旭东是项目的构思者及负责人,指导实验设计,数据分析,论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金(81360596)、广西自然科学基金(2016GXNSFAA380251)、广西攻关项目(桂科攻 1598013-5)和广西八桂学者建设专项经费共同资助。

参考文献

- Giovanni S., and Barbara B., 2017, JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response, *Mol. Metab.*, 6(2): 174-184
- Giovanni T., Christopher D.B., Amedeo L., Giacomo Z., and Corrado B., 2016, Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: a meta-analysis, *J. Hepatol.*, 65(3): 589-600
- Guo T., Woo S.L., Guo X., Li H.G., Zheng J., Botchlett R., Liu M., Pei Y., Xu H., Cai Y.L., Zeng T.S., Chen L.L., Li X.D., Li Q.F., Xiao X.Q., Huo Y.Q., and Wu C.D., 2016, Berberine ameliorates hepatic steatosis and suppresses liver and adipose tissue inflammation in mice with diet-induced obesity, *Sci. Rep.*, 3: 512-516
- Jörn M.S., Rajat S., Yongjun W., Jay H.L., Raina M.R., Philipp E.S., and Mark J.C., 2006, JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice, *Hepatology*, 43(1): 163-172
- Lionel C., Mohamed A., Cendrine R., Christine S., Jean-Christophe S., Corinne L., François R.J., and Luc P., 2017, AMPK activation caused by reduced liver lactate metabolism protects against hepatic steatosis in MCT1 haploinsufficient mice, *Mol. Metab.*, 6(12): 1625-1633
- Liu X.D., Liang Z., and Zhao X.F., 2017, Effects of qushi huoxue decoction on expression of polymerized adiponectin in adipocytes, *Liaoning Zhongyi Zazhi (Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine)*, 44(10): 2135-2137 (刘旭东, 梁真, 赵晓芳, 2017, 祛湿活血方对脂肪细胞多聚化脂联素表达的影响, *辽宁中医杂志*, 44(10): 2135-2137)
- Sepideh R., Sedigheh A., Gholamreza A., and Amirhossein S., 2016, Treatment of non-alcoholic fatty liver disease with curcumin: a randomized placebo-controlled trial, *Phytother. Res.*, 30(9): 1540-1548
- Shen Z., Liu X.D., and Zhao X.F., 2017, Silencing *FoxO1* expressi

on promotes expression of high molecular weight adiponectin in 3T3-L1 cells, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* (World Chinese Journal of Digestology), 25(1): 56-63 (沈震, 刘旭东, 赵晓芳, 刘钢涛, 2017, 3T3-L1 细胞中 *FoxO1* 基因沉默对高分子量脂联素表达的影响, *世界华人消化杂志*, 25(1): 56-63)

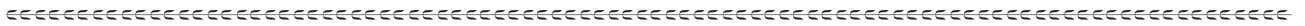
Stefano B., Fabio N., Dante R., and Amedeo L., 2016, The independent predictors of non-alcoholic steatohepatitis and its individual histological features, *Hepatol. Res.*, 46(11): 1074 -1087

Wang A.P., Liu M.L., Liu X.L., Dong L.Q., Glickman R.D., Slaga T.J., Zhou Z.G., and Liu F., 2011, Up-regulation of adiponectin by resveratrol: the essential roles of the Akt/FOXO1 and AMPK signaling pathways and DsbA-L, *J. Bi-*

ol. Chem., 286(1): 60-66

Wang Y.Q., Huang Y., Lam K.S.L., Li Y.M., Wong W.T., Ye H. Y., Lau C.W., Vanhoutte P.M., and Xu A., 2009, Berberine prevents hyperglycemia-induced endothelial injury and enhances vasodilatation via adenosine monophosphate-activated protein kinase and endothelial nitric oxide synthase, *Cardiovasc Res.*, 82(3): 484-492

Zobair M.Y., Deirdre B., Robert B., Linda H., Maria S., Youssef Y., Andrei R., Sharon H., and Rachel B., 2016, The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe, *Hepatology*, 64(5): 1577-1586



Legume Genomics and Genetics (LGG)

ISSN 1925-1580



Legume Genomics and Genetics
Legume, a major crop for human, animal feed and forage



2018
Vol.9

<http://lgg.biopublisher.ca>

Legume Genomics and Genetics (ISSN 1925-1580) is an open access and peer-reviewed journal that publishes original research papers in the fields of genomics and genetics of legume plants, which is committed to publishing grain/forage legume studies, as well as research on model legume plants such as *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. The aims are to feature innovative research findings in the basic and applied fields of legume biology. Topics include (but are not limited to) genome structure, genome-scale analysis, comparative and functional genomics, proteomics and epigenomics, gene discovery and function, gene expression and evolution, as well as legume genetics from the molecular level to whole plant level.

Email: edit@lgg.biopublisher.ca

Web: <http://lgg.biopublisher.ca>