

李丽红,李欣,李硕,等. PGC-1 α 在槲皮素通过雌激素样作用减轻 FFA 诱导肝细胞脂肪变性中的机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 47-54.

Li LH, Li X, Li S, et al. Quercetin protects against free fatty acid-induced hepatocyte steatosis by an estrogen-like effect involving PGC-1 α [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 47-54.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.007

PGC-1 α 在槲皮素通过雌激素样作用减轻 FFA 诱导肝细胞脂肪变性中的机制

李丽红^{1,2}, 李欣¹, 李硕¹, 杨艳萍¹, 郭建红^{1*}

(1.山西医科大学病理生理学教研室,肝病研究所,太原 030001;2.临汾职业技术学院医学系,山西 临汾 041000)

【摘要】 目的 探讨槲皮素(quercetin, Que)对游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)诱导肝细胞脂肪变性的雌激素样保护作用及机制。方法 CCK-8 法检测细胞活力,油红 O 染色观察脂质蓄积,雌激素以不同方式干预 HepG2 细胞,确定药物最佳干预方式为后处理方式。以后处理方式将 HepG2 细胞暴露于不同浓度的雌激素和槲皮素,确定药物最佳干预浓度。细胞随机分为 4 组:对照组(Control)、模型组(FFA)、阳性药雌激素对照组(E2)和槲皮素组(Que)。GPO-PAP 法测定甘油三酯(triglyceride, TG)含量;DCFH-DA 法检测活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)蛋白含量;实时定量 PCR(Real-time PCR)检测肝细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α)、过氧化物酶体增殖剂激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α)、肉碱棕榈酰转移酶 1 α (carnitine palmitoyl transferase 1 α , CPT1 α)和乙酰辅酶 A 羧化酶 1(acetyl-CoA carboxylase, ACOX1)mRNA 表达。结果 确定 1 μ mol/L 雌激素和 30 μ mol/L 槲皮素后处理用于后续实验。与对照组相比,模型组红色脂滴显著增多、TG 含量明显增加($P<0.001$),PGC-1 α 、PPAR α 、CPT1 α 和 ACOX1 mRNA 的表达均下降($P<0.05$),ROS 水平升高,TNF- α 蛋白含量增多($P<0.01$);与模型组相比,雌激素组和槲皮素组均可明显降低红色脂滴和 ROS 水平,雌激素组($P<0.05$)和槲皮素组($P<0.05$)均使 TG 含量降低,雌激素组($P<0.001$)和槲皮素组($P<0.01$)均使 PGC-1 α 的表达明显上调,雌激素组($P<0.001$)和槲皮素组($P<0.01$)使 TNF- α 蛋白含量均明显减少,并显著上调 PPAR α ($P<0.01$)、CPT1 α ($P<0.001$)和 ACOX1($P<0.001$)的表达水平。槲皮素组与雌激素组相比,上述指标差异均无统计学意义。结论 槲皮素通过诱导 PGC-1 α 表达,激活脂肪酸 β 氧化、减轻氧化应激以及抑制炎症反应,发挥雌激素样作用,最终改善肝细胞脂肪变性。

【关键词】 槲皮素;脂肪变性;雌激素样作用;PGC-1 α ;脂肪酸 β 氧化;氧化应激

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0047-08

Quercetin protects against free fatty acid-induced hepatocyte steatosis by an estrogen-like effect involving PGC-1 α

LI Lihong^{1,2}, LI Xin¹, LI Shuo¹, YANG Yanping¹, GUO Jianhong^{1*}

(1. Department of Pathophysiology, Institute of Hepatology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China.

2. Department of Medicine, Linfen Vocational and Technical College, Linfen 041000)

【基金项目】 山西中医药大学“肝炎性疾病中西医结合基础研究创新团队”资助项目(2018TD-016);山西省研究生教育改革研究课题(2020YJJG136)。

【作者简介】 李丽红(1983—),女,硕士研究生,研究方向:肝病理生理与相关疾病。E-mail: 251645189@qq.com

【通信作者】 郭建红(1968—),女,教授,硕士生导师,研究方向:肝病理生理与相关疾病。E-mail: sgs7551@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the estrogen-like protective effect and mechanism of quercetin on free fatty acids (FFA)-induced hepatocyte steatosis. **Methods** Cell viability was detected by CCK-8 assay, and lipid accumulation in hepatocytes was observed by Oil Red O staining. Following administration of various estrogen intervention paradigms to HepG2 cells, the optimal drug intervention was determined to be post-treatment. HepG2 cells were exposed to different concentrations of estrogen and quercetin in a post-treatment manner to determine the optimal concentration of drug intervention. Cells were randomly divided into four groups: Control, model (FFA), positive drug estrogen control (E2), and quercetin (Que). Triglyceride (TG) levels were determined using the glycerol phosphate oxidase peroxidase (GPO-PAP) method. Reactive oxygen species (ROS) levels were detected using DCFH-DA. Protein contents of tumor necrosis factor α (TNF- α) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Expression levels of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), carnitine palmitoyl transferase 1 α (CPT1 α), and acetyl-CoA carboxylase (ACOX1) were measured by Real-time PCR. **Results** It was determined that 1 $\mu\text{mol/L}$ estrogen and 30 $\mu\text{mol/L}$ quercetin post-treatment of HepG2 cells was optimal for subsequent experiments. Compared with the control group, numbers of red lipid droplets and TG contents were significantly increased ($P < 0.001$); expression levels of PGC-1 α , PPAR α , CPT1 α and ACOX1 mRNA were significantly decreased ($P < 0.05$); ROS levels were increased; and TNF- α protein levels were significantly increased ($P < 0.01$) in the FFA group. Compared with the FFA group, both the estrogen and quercetin group displayed significantly reduced levels of red lipid droplets and ROS. Moreover, both the estrogen group ($P < 0.05$) and quercetin group ($P < 0.05$) exhibited significantly decreased TG contents, and both the estrogen group ($P < 0.001$) and quercetin group ($P < 0.01$) exhibited significantly upregulated expression of PGC-1 α . In addition, both the estrogen group ($P < 0.001$) and quercetin group ($P < 0.01$) displayed significantly decreased TNF- α protein contents and significantly upregulated expression levels of PPAR α ($P < 0.01$), CPT1 α ($P < 0.001$), and ACOX1 ($P < 0.001$). There was no significant difference in the above indicators between the quercetin group and estrogen group. **Conclusions** Quercetin exerts an estrogen-like effect by inducing expression of PGC-1 α , activating fatty acid β oxidation, reducing oxidative stress, and inhibiting inflammatory response, ultimately improving hepatic steatosis.

【Keywords】 quercetin; steatosis; estrogen-like effects; PGC-1 α ; fatty acid β oxidation; oxidative stress

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver diseases, NAFLD) 是指在没有大量饮酒或任何继发性原因的情况下, 肝出现过度的脂质蓄积, TG 是主要的脂质储存形式^[1-2]。随着超重、肥胖和糖尿病的流行, 近来, 国际专家小组将 NAFLD 重新命名为代谢相关脂肪性肝病 (metabolic dysfunction-associated fatty liver disease, MAFLD)^[3]。重要的是, 绝经后女性 NAFLD 的患病率持续增加且肝纤维化程度和/或肝癌的进展率更高^[2]。我们在前期的实验中发现小鼠去除卵巢后 24 周, 可发生肝脂肪变性, 且腹股沟皮下脂肪、腹膜后脂肪组织增多^[4]。目前, 临床针对该疾病激素替代疗法 (hormone replacement therapy, HRT) 是最直接、有效的方式, 但使用 HRT 可能会增加冠状动脉、中风等疾病风险^[5], 因此, 有必要寻求新的药物治疗绝经后女性 NAFLD。

NAFLD 的经典发病机制是“二次打击”学说, 一次打击是胰岛素抵抗致肝细胞脂质过度蓄积, 二次打击是过量的脂质引发氧化应激, 进一步导致肝细胞炎症反应, 最终加速肝细胞坏死和纤维化^[6]。随

着研究结果不断丰富, 目前“多重打击”的发病机制更盛行。虽然其涉及的致病因素广泛, 但脂质积累、氧化应激和炎症反应仍是 NAFLD 主要的发病机制^[7]。肝 PGC-1 α 在 NAFLD 发病机制起着至关重要的作用^[8], 作为一种核转录共激活因子, 它不仅可通过诱导肝 PPAR α 的表达激活脂肪酸 β 氧化以减少肝细胞脂质积累, 而且可根据能量需求控制抗氧化酶基因的表达以消除氧化应激。此外, PGC-1 α 可通过抑制 NF- κ B 降低炎症反应^[9-11]。

先前研究表明, 雌性小鼠在高脂饮食条件下可增加脂肪酸氧化基因 PPAR α 的表达。同时, 雌性小鼠一方面可上调 PGC-1 α 表达来增加抗氧化酶基因水平而减轻氧化应激损伤, 另一方面, 还可降低肝炎症因子水平的表达^[1,12]。槲皮素是一种低毒性、副作用少的天然植物化学物质, 其在改善肝脂质积累方面具有很强的潜力, 甚至被称为植物性的雌激素^[13]。然而, 槲皮素是否有类似雌激素的机制通路抵抗 NAFLD 发生, 尚不清楚。本实验以 PGC-1 α 为突破点, 基于前期的在体实验^[4], 在体外肝细胞脂肪变性模型中, 比较槲皮素和雌激素对脂肪酸

氧化基因表达、ROS 和 TNF- α 的影响,探讨其中可能涉及的类似保护作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞

人 HepG2 细胞株购自上海富衡生物科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

槲皮素(北京索莱宝科技有限公司,Q8010);雌二醇(MCE 公司, HY-B0141);油酸钠(S30245)和棕榈酸钠(S31807),均购自上海源叶生物有限公司;胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,11011-8611);DMEM 高糖培养基(SC102-01),购自赛文创新(北京)生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒(MCE 公司, HY-K0301-500T);油红 O 染色液(G1260)和苏木素染色液(G1120),均购自北京索莱宝科技有限公司;TG 测试盒(南京建成生物工程研究所,A110-1-1);BCA 蛋白定量试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,AR0146);ROS 检测试剂盒(大连美伦生物技术有限公司,MA0210);人 TNF- α ELISA 试剂盒(Bioswamp 公司, HM10001);总 RNA 提取试剂(MF034-01)、逆转录试剂盒(MF166-01)和 Real-time PCR 试剂盒(MF013-05),均购自北京聚合美生物科技有限公司。细胞培养箱、低温超速离心机 and 分光光度计(Eppendorf 公司,德国);IX71 荧光显微镜(OLYMPUS 公司,日本);全波长酶标仪(Molecular Devices 公司, SpectraMax190, 美国);普通 PCR 仪(Bio-Rad 公司, T100™ Thermal Cycler, 美国);荧光定量 PCR 仪(STRATAGENE 公司, MX3005P, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

HepG2 细胞采用 DMEM 高糖完全培养基(含 1%青霉素/链霉素和 10%胎牛血清),于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱传代培养。

1.3.2 细胞分组

细胞分为 4 组:对照组(Control)、模型组(FFA)、阳性药雌激素对照组(E2)和槲皮素组(Que)。(1)Control 组用正常培养基培养;(2)FFA 组用 1 mmol/L 混合 FFA 溶液(油酸:棕榈酸=2:1)干预 24 h;(3)以 100 nmol/L 雌激素预处理(E2/FFA)、联合处理(FFA+E2)和后处理(FFA/E2)确定药物最佳干预方式为后处理方式。E2/FFA:100 nmol/L E2 预处理 24 h+FFA 干预 24 h;FFA+E2:

100 nmol/L E2 和 FFA 同时处理 24 h;FFA/E2:FFA 干预 24 h +100 nmol/L 雌激素后处理 24 h。(4)分别以 100 nmol/L、1 μ mol/L 和 10 μ mol/L 雌激素后处理(FFA/E2 100 nmol/L、FFA/E2 1 μ mol/L 和 FFA/E2 10 μ mol/L)以及(10、20 和 30) μ mol/L 槲皮素后处理(FFA/Que10、FFA/Que20 和 FFA/Que30)确定药物最佳干预浓度。按以上分组情况加入相应的培养液培养 48 h 后检测各项指标。在细胞处理(从造模到雌激素、槲皮素干预结束)48 h 后,ROS 再行 DCFH-DA 荧光孵育 30 min 后检测,其它指标直接按相应的实验方法检测。

1.3.3 CCK-8 法检测细胞活力

HepG2 细胞以每升 8×10^7 个密度接种到 96 孔板,培养 24 h,吸出培养基,加入不同浓度的 E2 溶液 100 μ L 培养 24 h,再加入 CCK-8 试剂 10 μ L 培养 1 h,酶标仪于 450 nm 处测吸光度值。同法检测不同浓度的 Que 溶液吸光度值。

1.3.4 油红 O 染色观察脂质蓄积

细胞处理后,吸出培养基,PBS 洗涤,加入 4%多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗涤,加入油红 O 工作液染色 15 min,PBS 洗涤,加入苏木素染核 1 min,PBS 洗涤,显微镜下观察拍照。

1.3.5 GPO-PAP 法测定 TG 含量

细胞处理后,收集到 1.5 mL 离心管,每离心管加入 200 μ L 裂解液,冰上静置 40 min。裂解液直接按照 TG 测试盒说明书操作测 TG 含量,余下裂解液离心后取上清,遵循 BCA 蛋白测定试剂盒说明书测蛋白浓度以校正 TG 含量。

1.3.6 DCFH-DA 法检测 ROS 水平

细胞处理后,PBS 洗涤,加入 10 μ mol/L 的 DCFH-DA 荧光探针孵育 30 min,PBS 洗涤,荧光显微镜下观察拍照。

1.3.7 ELISA 测定 TNF- α 含量

细胞处理后,细胞培养液收集到 1.5 mL 离心管,于 4℃,1500 r/min 离心 10 min,取上清,遵循 ELISA 试剂盒说明书测 TNF- α 蛋白含量。

1.3.8 Real-time PCR 检测目的基因表达水平

细胞处理后,使用总 RNA 提取试剂提取细胞总 RNA,分光光度计测 RNA 浓度,逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA,按照 Real-time PCR 试剂盒配制 20 μ L PCR 反应体系于荧光定量 PCR 仪扩增。PCR 反应体系:Template DNA, 2 μ L;2X Realtime PCR Super mix, 10 μ L;Primer 1 (10 μ mol/L), 0.5 μ L;Primer 2 (10 μ mol/L), 0.5 μ L;DEPC 水, 7 μ L。

PCR 反应条件:预变性 95℃,30 s,1 个循环;PCR 反应 95℃,15 s,60℃,15 s,72℃,30 s,40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。引物序列见表 1。

1.3.9 图像采集与制图

采用 OLYMPUS 光学显微照相系统采集油红 O 染色和免疫荧光染色,使用 GraphPad Prism 6.0 软件绘制统计图。

1.4 统计学方法

数据使用 SPSS 23.0 进行统计分析,实验数据均用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P<0.05$ 表示组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 确定药物最佳干预方式与最佳干预浓度

CCK-8 结果表明,0~10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的雌激素与 0~30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的槲皮素均不会损害细胞活力,其中 100 nmol/L 雌激素细胞活力最高($P<$

0.0001),见图 1,所以选择 100 nmol/L 雌激素确定药物最佳干预方式。与 FFA 组相比,药物后处理方式红色脂滴最少(图 2A),因此以后处理方式确定药物最佳干预浓度。与 FFA 组相比,1 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 雌激素后处理红色脂滴均明显减少(图 2B),结合 1 $\mu\text{mol/L}$ 雌激素使细胞活力明显提高($P<0.001$)。因而,采用 1 $\mu\text{mol/L}$ 雌激素后处理用于后续实验。与 FFA 组相比,30 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素后处理红色脂滴最少(图 2C)。因而,采用 30 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素后处理用于后续实验。

2.2 槲皮素改善 HepG2 细胞脂肪变性

采用油红 O 染色观察肝细胞脂质蓄积。与对照组相比,模型组红色脂滴显著增多;而与模型组相比,雌激素组和槲皮素组均使红色脂滴明显减少,见图 3。

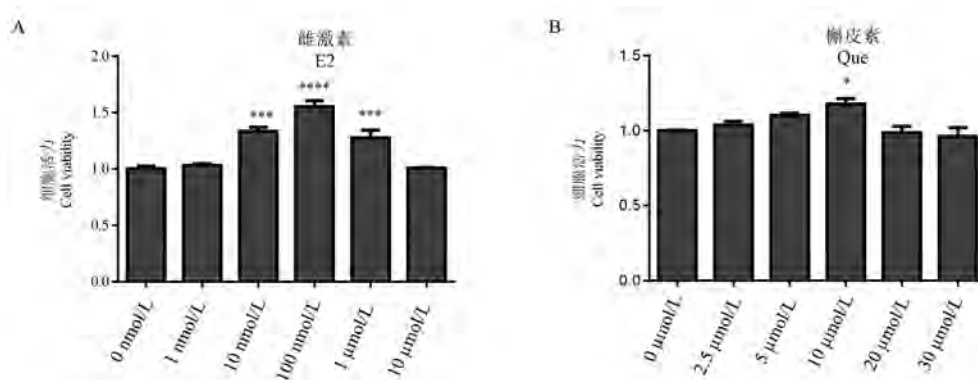
2.3 槲皮素降低 HepG2 细胞 TG 含量

肝细胞 TG 含量可反映肝细胞脂质积累的程度。与对照组相比,模型组肝细胞 TG 含量明显增加($P<0.001$);而与模型组相比,雌激素组($P<$

表 1 实时定量 PCR 的引物序列

Table 1 Primer sequence for Real-time PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	产物长度(bp) Product length
GAPDH	F:GCACCGTCAAGGCTGAGAAC R:TGGTGAAGACGCCAGTGGA	138
PGC-1 α	F:CACTCCTCCTCATAAAGCCAAC R:GGACTTGCTGAGTTGTGCATA	190
PPAR α	F:GATATGGAGACACTGTGTATGGCTGAG R:ACCTCCGCCTCCTGTCTCTGG	83
CPT1 α	F:TCTACCATGATGGGCGGCTGCT R:CGTCTGGGCTCGTGCGACATT	663
ACOX1	F:ACTCGCAGCCAGCGTTATG R:AGGTCAGCGATGCCAAAC	84



注:与 0 nmol/L 雌激素组比, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$;与 0 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素组比, * $P<0.05$ 。

图 1 不同浓度雌激素和槲皮素处理 HepG2 细胞的细胞活力

Note. Compared with the 0 nmol/L E2 group, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. Compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ Que group, * $P<0.05$.

Figure 1 Cell viability of HepG2 cells treated with different concentrations of estrogen and quercetin

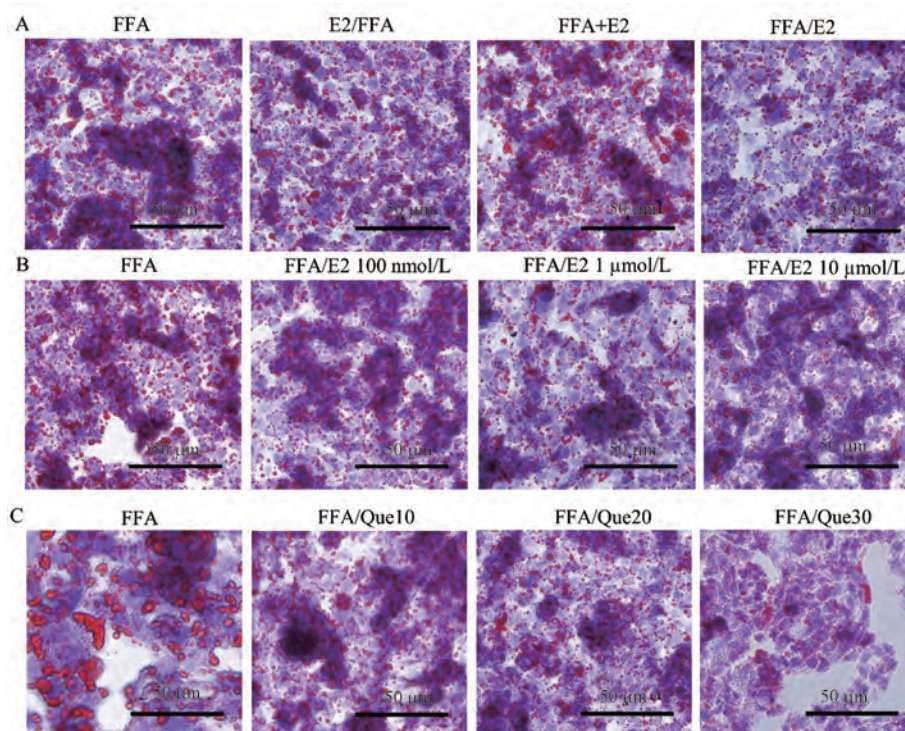
0.05) 和槲皮素组 ($P < 0.05$) 使肝细胞 TG 含量均降低了; 槲皮素组与雌激素组相比差异无统计学意义, 见图 4。

2.4 槲皮素上调 HepG2 细胞 PGC-1 α 表达

PGC-1 α 在调节脂肪酸 β 氧化功能、氧化应激和炎症反应方面起着关键作用, 采用 Real-time PCR 检测 PGC-1 α mRNA 表达。与对照组相比, 模型组 PGC-1 α mRNA 的表达下降 ($P < 0.05$); 而与模型组相比, 雌激素组 ($P < 0.001$) 和槲皮素组 ($P < 0.01$) 使 PGC-1 α 的表达均明显上调; 槲皮素组与雌激素组相比差异无统计学意义, 见图 5。

2.5 槲皮素激活 HepG2 细胞脂肪酸 β 氧化功能

PPAR α 是脂肪酸氧化代谢的主要调节因子, 其下游靶基因 CPT1 α 和 ACOX1 分别可反映线粒体和过氧化物酶体脂肪酸 β 氧化功能, 采用 Real-time PCR 检测 PPAR α 、CPT1 α 和 ACOX1 mRNA 表达。与对照组相比, 模型组 PPAR α 、CPT1 α 和 ACOX1 mRNA 的表达均下降 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 雌激素组和槲皮素组均可使 PPAR α ($P < 0.01$)、CPT1 α ($P < 0.001$) 和 ACOX1 ($P < 0.001$) 的表达显著上调; 槲皮素组与雌激素组相比差异无统计学意义, 见图 6。



注: A, 不同处理的雌激素对 HepG2 细胞脂滴的影响; B, 不同浓度的雌激素对 HepG2 细胞脂滴的影响; C, 不同浓度的槲皮素对 HepG2 细胞脂滴的影响。

图 2 雌激素和槲皮素对 HepG2 细胞脂滴的影响

Note. A, Effect of different treatments of estrogen on lipid droplets in HepG2 cells. B, Effect of different concentrations of estrogen on lipid droplets in HepG2 cells. C, Effect of different concentrations of quercetin on lipid droplets in HepG2 cells.

Figure 2 Effect of estrogen and quercetin on lipid droplets in HepG2 cells

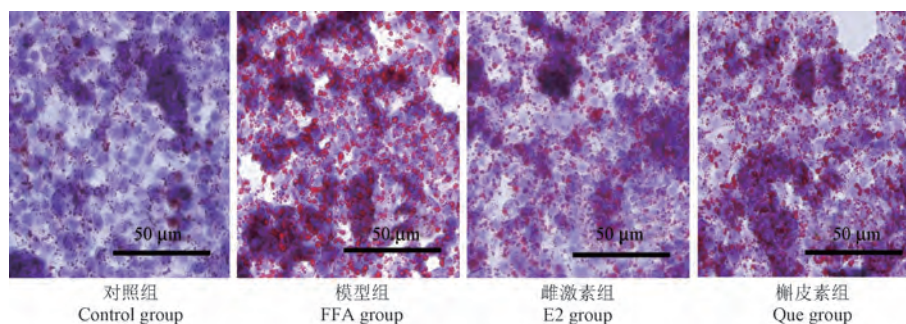


图 3 油红 O 染色 HepG2 细胞脂滴变化

Figure 3 Lipid droplet changes in HepG2 cells by oil red O staining

2.6 槲皮素减轻 HepG2 细胞氧化应激

细胞内 ROS 水平可反映细胞的氧化应激程度,DCFH-DA 孵育后采用荧光显微镜观察肝细胞 ROS 荧光强度变化。与对照组相比,模型组 ROS 绿色荧光信号明显增强;而与模型组相比,雌激素组和槲皮素组 ROS 绿色荧光信号均减弱,见图 7。

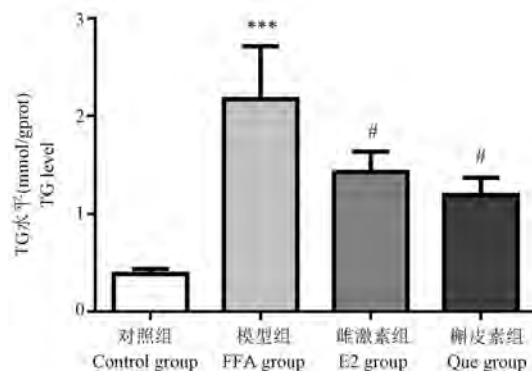
2.7 槲皮素抑制 HepG2 细胞炎症反应

TNF- α 是 NAFLD 发生发展中主要的炎症因子,采用 ELISA 检测 TNF- α 蛋白含量。与对照组相比,模型组肝细胞 TNF- α 蛋白含量增多 ($P < 0.01$);而与模型组相比,雌激素组 ($P < 0.001$) 和槲皮素组 ($P < 0.01$) 均使肝细胞 TNF- α 蛋白含量明显减少;槲皮素组与雌激素组相比差异无统计学意义,见图 8。

3 讨论

单纯性肝脂肪变性可发展为非酒精性脂肪性肝炎,显著增加了肝纤维化和肝硬化风险,甚至发展为肝细胞癌^[14]。PGC-1 α 的表达异常与 NAFLD 发生发展密切相关。研究报道,患者肝 PGC-1 α 的低表达可促进 NAFLD 发生发展^[15];PGC-1 α 基因敲除小鼠在短期饥饿后易发生肝脂肪变性^[16]。本实验显示,模型组 PGC-1 α 的表达下降,出现脂质积累和脂肪变性,表明 PGC-1 α 低表达促使肝细胞脂肪变性的发生发展。槲皮素与阳性药雌激素的作用类似,可上调 PGC-1 α 的表达,减轻肝细胞脂质积累和脂肪变性,初步验证了槲皮素的雌激素样肝保护作用。PGC-1 α 的表达上调不仅与槲皮素改善肝细胞脂肪变性有关,并且与激活脂肪酸 β 氧化、减轻氧化应激以及抑制炎症反应有关。

体内脂肪酸主要通过脂肪酸 β 氧化清除,肝是脂肪酸 β 氧化最活跃的组织之一。如果脂肪酸 β 氧化障碍则使肝游离脂肪酸积聚和脂肪生成增加,促使 NAFLD 的形成。因此,激活脂肪酸 β 氧化功能是阻止 NAFLD 发生的关键。肝中大量表达 PPAR α ,作为一种配体激活转录因子,能有效诱导线粒体和过氧化物酶体脂肪酸 β 氧化途径的基因表达^[17]。CPT1 α 是线粒体脂肪酸 β 氧化的关键酶,它是一个完整的线粒体外膜蛋白,可促进脂肪酸进入线粒体进行 β 氧化^[18-19],但线粒体缺乏极长链脂肪酸(very long-chain fatty acids, VLCFAs)氧化所需的酶。ACOX1 是 VLCFAs 在过氧化物酶体 β

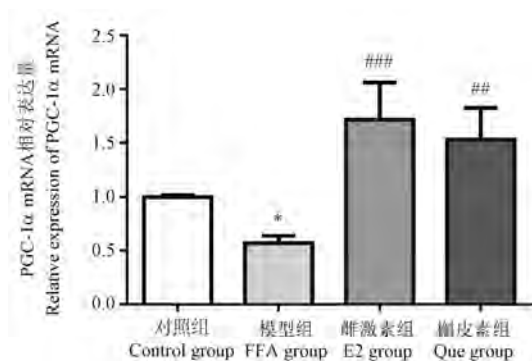


注:与对照组相比,*** $P < 0.001$;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

图 4 HepG2 细胞 TG 含量

Note. Compared with the control group, *** $P < 0.001$. Compared with the FFA group, # $P < 0.05$.

Figure 4 TG content of HepG2 cells

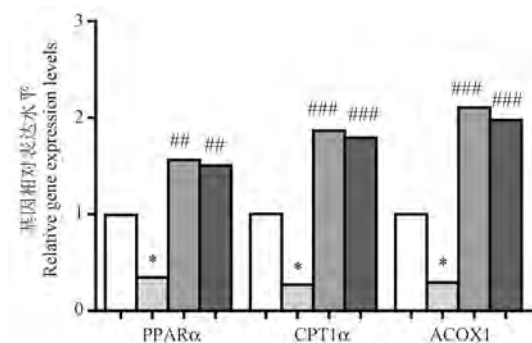


注:与对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

图 5 HepG2 细胞中 PGC-1 α mRNA 表达水平

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the FFA group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 5 PGC-1 α mRNA expression level in HepG2 cells



注:与对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

图 6 HepG2 细胞中脂肪酸 β 氧化基因相对表达水平

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the FFA group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 6 Relative expression levels of fatty acid β oxidation genes in HepG2 cells

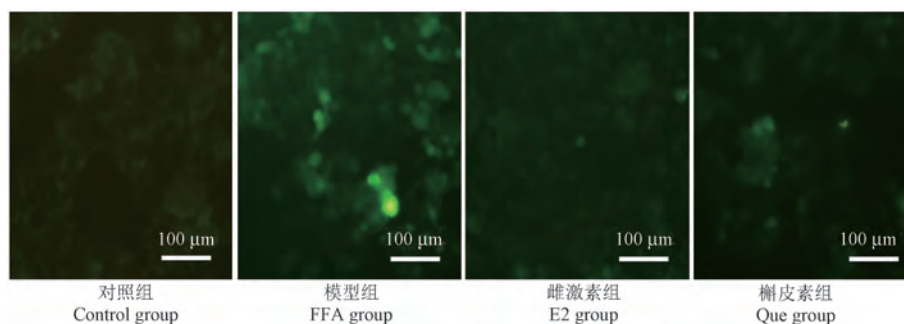
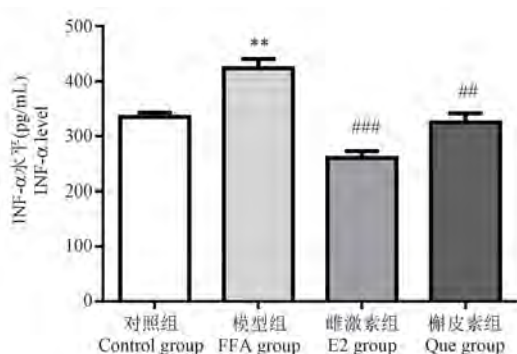


图 7 DCFH-DA 染色 HepG2 细胞 ROS 水平

Figure 7 ROS level of HepG2 cells by DCFH-DA staining



注:与对照组相比, ** $P < 0.01$;与模型组相比, ### $P < 0.001$,
$P < 0.01$ 。

图 8 HepG2 细胞 TNF- α 水平

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$. Compared with the FFA group, ### $P < 0.001$, ## $P < 0.01$.

Figure 8 TNF- α level in HepG2 cells

氧化中的限速酶, VLCFAs 被氧化成中链或长链脂肪酸,随后被输出到线粒体再进一步氧化^[18,20],因此,过氧化物酶体在脂肪酸 β 氧化中也起着重要作用。大鼠高脂饮食喂养后,脂肪酸 β 氧化基因 CPT1 α 和 ACOX1 表达降低,诱导了肝脂质积累^[18]。此外, NASH 患者肝中 PPAR α 的表达降低^[17,20]。本研究发现,模型组 PPAR α 、CPT1 α 和 ACOX1 的表达均下降,表明 PPAR α 及下游靶基因 CPT1 α 和 ACOX1 的低表达与肝脂质积累有关。雌激素干预后,PPAR α 、CPT1 α 和 ACOX1 的表达均明显上调,激活了脂肪酸 β 氧化功能,从而改善肝细胞脂肪变性。欣喜的是,槲皮素干预后出现了雌激素类似的结果,再次验证了它的雌激素样肝保护作用。

氧化应激在 NAFLD 发生发展中扮演着重要的决定因素^[21]。NAFLD 的主要病理特征是大量游离脂肪酸堆积在肝细胞,线粒体脂肪酸 β 氧化增加呼吸链电子产生过量 ROS,引发氧化应激,致肝细胞损伤。线粒体过量 ROS 氧化细胞质和线粒体不饱

和脂肪酸产生脂质过氧化产物,损伤线粒体功能,加重肝脂肪变性。同时,线粒体过量 ROS 激活肝细胞或 Kupffer 细胞产生炎症因子,引起肝炎性反应^[22-23]。本实验发现,模型组 ROS 和炎症因子 TNF- α 水平升高,这些变化与 PGC-1 α 的表达下降同时发生,表明脂肪酸超载时 PGC-1 α 的表达下降与氧化应激和炎症反应有关。与阳性药雌激素结果一致,槲皮素抑制 ROS 和 TNF- α 生成,减轻了氧化应激和炎症反应,进一步证明槲皮素发挥了雌激素样肝保护作用。本研究还存在局限性,FFA 培养的 HepG2 细胞虽显示出脂质沉积、氧化应激和炎症反应等方面特征,但 HepG2 细胞株与生理条件下肝细胞存在差异,还需谨慎考虑其是否能完全模拟 NAFLD 的所有特征。因此,后续实验将会研究原代小鼠肝细胞以确认更接近临床的数据。鉴于细胞实验不能完全模拟在体的环境因素,未来将会进行在体实验进一步验证槲皮素对绝经后女性 NAFLD 的影响及作用机制。

综上所述,在脂肪酸超载的条件下,PGC-1 α 表达下降在肝细胞脂质积累方面起着重要作用,并且与脂肪酸 β 氧化功能障碍、氧化应激以及炎症反应密切相关。槲皮素可诱导 PGC-1 α 表达,激活脂肪酸 β 氧化、减轻氧化应激以及抑制炎症反应,最终改善肝细胞脂肪变性。这些结果与雌激素的作用高度一致,提示槲皮素发挥了雌激素样肝保护作用。

参考文献:

- [1] Galmés-Pascual BM, Martínez-Cignoni MR, Morán-Costoya A, et al. 17 β -estradiol ameliorates lipotoxicity-induced hepatic mitochondrial oxidative stress and insulin resistance [J]. Free Radic Biol Med, 2020, 150: 148-160.
- [2] Lee C, Kim J, Jung Y. Potential therapeutic application of estrogen in gender disparity of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis [J]. Cells, 2019, 8(10): 1259.
- [3] Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, et al. A new definition for

- metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: an international expert consensus statement [J]. *J Hepatol*, 2020, 73(1): 202–209.
- [4] 卜浩林, 李丽红, 李欣, 等. 长期高蛋白饮食对 OVX 小鼠肝脂肪变性和脂肪堆积的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(11): 69–75.
- [5] Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the women's health initiative randomized controlled trial [J]. *JAMA*, 2002, 288(3): 321–333.
- [6] Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(4): 842–845.
- [7] Fang YL, Chen H, Wang CL, et al. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: from "two hit theory" to "multiple hit model" [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(27): 2974–2983.
- [8] Ahrens M, Ammerpohl O, von Schönfels W, et al. DNA methylation analysis in nonalcoholic fatty liver disease suggests distinct disease-specific and remodeling signatures after bariatric surgery [J]. *Cell Metab*, 2013, 18(2): 296–302.
- [9] Morris EM, Meers GME, Booth FW, et al. PGC-1 α overexpression results in increased hepatic fatty acid oxidation with reduced triacylglycerol accumulation and secretion [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 303(8): G979–G992.
- [10] Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, et al. PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 66(3): 562–573.
- [11] Pérez S, Rius-Pérez S, Finamor I, et al. Obesity causes PGC-1 α deficiency in the pancreas leading to marked IL-6 upregulation via NF- κ B in acute pancreatitis [J]. *J Pathol*, 2019, 247(1): 48–59.
- [12] Besse-Patin A, Léveillé M, Oropeza D, et al. Estrogen signals through peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α to reduce oxidative damage associated with diet-induced fatty liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(1): 243–256.
- [13] Hur HJ, Jeong YH, Lee SH, et al. Quercitrin ameliorates hyperlipidemia and hepatic steatosis in ovariectomized mice [J]. *Life (Basel)*, 2020, 10(10): 243.
- [14] Ye Q, Zou B, Yeo YH, et al. Global prevalence, incidence, and outcomes of non-obese or lean non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5(8): 739–752.
- [15] Yoneda M, Hotta K, Nozaki Y, et al. Association between PPARGC1A polymorphisms and the occurrence of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *BMC Gastroenterol*, 2008, 8: 27.
- [16] Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, et al. PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis [J]. *PLoS Biol*, 2005, 3(4): e101.
- [17] Kersten S, Stienstra R. The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver [J]. *Biochimie*, 2017, 136: 75–84.
- [18] Svegliati-Baroni G, Saccomanno S, Rychlicki C, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor activation stimulates hepatic lipid oxidation and restores hepatic signalling alteration induced by a high-fat diet in nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Liver Int*, 2011, 31(9): 1285–1297.
- [19] Tan Z, Xiao L, Tang M, et al. Targeting CPT1A-mediated fatty acid oxidation sensitizes nasopharyngeal carcinoma to radiation therapy [J]. *Theranostics*, 2018, 8(9): 2329–2347.
- [20] Griffin EN, Ackerman SL. Lipid metabolism and axon degeneration: an ACOX1 balancing act [J]. *Neuron*, 2020, 106(4): 551–553.
- [21] Rodrigues G, Moreira AJ, Bona S, et al. Simvastatin reduces hepatic oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic steatohepatitis experimental model [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 3201873.
- [22] Pessayre D, Fromenty B. NASH: a mitochondrial disease [J]. *J Hepatol*, 2005, 42(6): 928–940.
- [23] 周帆, 彭君伟, 范伏岗, 等. 自噬与氧化应激在非酒精性脂肪性肝病发病机制中的关系 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34(8): 1805–1808.

[收稿日期] 2022-01-14