

• 药理与临床 •

基于计算机辅助设计的竹节参总皂苷改善 HepG2 细胞脂质代谢的作用及机制研究

涂 浩¹, 屈素君², 段 丽¹, 熊海容¹, 何毓敏¹, 张长城¹, 袁 丁³, 刘朝奇^{1*}

1. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002

2. 荆门市第一人民医院, 湖北 荆门 448000

3. 三峡大学仁和医院, 湖北 宜昌 443001

摘要: 目的 研究竹节参总皂苷(TSPJ)改善人肝癌 HepG2 细胞脂质代谢的作用, 基于计算机辅助药物设计, 预测并验证 TSPJ 可能的作用靶点。方法 应用棕榈酸(PA)诱导 HepG2 细胞脂肪变性模型, 实验分为对照组、模型组、TSPJ (50.0、25.0、12.5 mg/L)组。5 组细胞均培养 24 h 后, 分别采用油红 O 染色和尼罗红染色定性、定量检测细胞内脂质积累情况; 采用试剂盒检测细胞内三酰甘油(TG)的含量; 采用计算机辅助药物设计预测 TSPJ 可能的作用靶点, 用免疫荧光检测相关蛋白的表达。结果 PA 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 处理细胞 24 h 可以造成 HepG2 细胞脂质积累模型, TSPJ 可以显著改善 HepG2 细胞脂质积累 ($P < 0.01$), 降低 TG 含量; 利用计算机辅助药物设计预测 TSPJ 的作用靶点可能是雌激素相关受体; 与对照组比较, 模型组雌激素 β 受体(ER β)表达水平降低, 与模型组比较, 用药组 ER β 表达水平平均升高。结论 TSPJ 可以显著改善 HepG2 细胞脂质代谢, 其作用靶点可能是 ER β 。

关键词: 竹节参总皂苷; 计算机辅助药物设计; 药物靶点; 雌激素受体; 非酒精性脂肪性肝病

中图分类号: R979.19 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)08-1835-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.08.015

Effects and mechanism research of total saponins of *Panax japonicas* improving lipid metabolism in HepG2 cells based on computer aided drug designTU Hao¹, QU Su-jun², DUAN Li¹, XIONG Hai-rong¹, HE Yu-min¹, ZHANG Chang-cheng¹, YUAN Ding³, LIU Zhao-qi¹

1. College of Medicine, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

2. Jingmen First People's Hospital, Jingmen 448000, China

3. Renhe Hospital, China Three Gorges University, Yichang 443001, China

Abstract: Objective To research the effects of total saponins of *Panax japonicas* (TSPJ) improving lipid metabolism in HepG2 cells, and to predict and verify TSPJ possible targets based on computer aided drug design. **Methods** HepG2 cells fatty degeneration model was induced with palmitic-acid (PA). The HepG2 cells were divided into five groups: the control group, the model group, the high-dose group (50 mg/L), the middle-dose group (25 mg/L), and the low-dose group (12.5 mg/L). The cells of five groups were cultured continuously for 24 h. The intracellular lipid accumulation was qualitative and quantitative detected by Oil red and Nile red staining. The content of triglyceride (TG) was detected by detection kit. TSPJ possible targets were predicted by computer. The expressions of related proteins were detected by immunofluorescence. **Results** The lipid accumulation model of HepG2 cells was successfully established for 24 h with the 100 $\mu\text{mol/L}$ concentration of PA. TSPJ can significantly improve the lipid accumulation ($P < 0.01$), and decrease the content of triglyceride (TG) of HepG2 cells. The possible target of TSPJ may be estrogen-related receptors based on computer aided drug design. Compared with the control group, the expression levels of estrogen receptor β (ER β) protein in model group were decreased. Compared with the model group, the expression level of ER β protein in high-, middle-, and low-dose group were upregulated. **Conclusion** TSPJ can significantly improve the lipid metabolism

收稿日期: 2017-10-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81673675); 三峡大学研究生科研创新基金(SDYC2016092)

作者简介: 涂 浩(1991—), 男, 在读硕士, 研究方向为分子药理学。Tel: (0717)6397179 E-mail: tuhaofirst@163.com

*通信作者 刘朝奇(1965—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为分子药理学与免疫学。Tel: (0717)6397179 E-mail: ctgulc@163.com

of HepG2 cells, and the target of TSPJ might be ER β .

Key words: total saponins of *Panax japonicas*; computer aided drug design (CADD); drug target; estrogen receptor (ER); non-alcoholic fatty liver disease (NALFD)

随着人们生活水平的提高,高脂、高糖饮食的日益普遍,以及环境因素等的影响,非酒精性脂肪性肝病(NALFD)在我国的发病率越来越高,且呈低龄化发病趋势,已经成为严重威胁人类健康的主要疾病之一^[1-2]。NAFLD是一种无过量饮酒史,以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变性为主要特征的临床病理综合征,其疾病谱包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎,进一步发展为肝硬化及肝癌。由于多种因素可以诱发NAFLD,且NAFLD的发病机制尚不是十分清楚,预防和治疗手段则更是有限,以至于目前仍缺乏针对NAFLD的有效防治措施。本课题组前期研究显示,竹节参总皂苷(total saponins of *Panax japonicas*, TSPJ)对高脂饮食、化学药品等诱导的肝损伤具有良好的改善作用^[3],其主要的活性成分是五环三萜齐墩果烷型皂苷,但其作用靶点和作用机制还有待进一步研究。本研究应用棕榈酸(PA)建立人肝癌HepG2细胞脂质积累模型,在证实TSPJ改善HepG2细胞脂质积累的确切效果的基础上,利用计算机辅助设计预测TSPJ的作用靶点并验证,从而阐述TSPJ改善细胞脂质积累的作用机制。

1 材料

1.1 细胞

HepG2细胞购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。

1.2 药品与试剂

DMEM高糖培养基(批号1791920)、小牛血清(批号1517927),美国Gibco公司;PA(货号#SLBM8964V)、油红(货号#SLBH0251V)、尼罗红(货号#BCBP8959V),Sigma公司;三酰甘油(TG)检测试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号167621);雌激素受体(ER) β 抗体(福来生物工程有限公司,批号P03372);荧光二抗(武汉科瑞有限公司);TSPJ,自制。竹节参药材从湖北省恩施椿木营竹节参种植基地采样,经三峡大学湖北省天然产物研究与利用重点实验室邹坤教授鉴定为五加科人参属植物竹节参*Panax japonicus* C. A. Mey.

1.3 仪器与设备

倒置荧光显微镜、激光共聚焦显微镜(日本尼康公司);EPLCS XL流式细胞仪(美国贝克曼库

特公司);高压灭菌锅(日本Hirayama公司);SW-4T-2F洁净工作台(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);NU-4750E型二氧化碳培养箱(NuAire公司)。

2 方法

2.1 TSPJ的制备

TSPJ按照本课题组已有方法提取分离^[4-5]。制备得到的TSPJ中含有竹节参皂苷IV 24.75 mg/g、竹节参皂苷IVa 37.94 mg/g、竹节参皂苷V 174.09 mg/g;取分离得到的TSPJ用磷酸盐缓冲液(PBS)配制成3 g/L的母液,使用时用培养基稀释至所需质量浓度。

2.2 细胞培养

HepG2细胞用含10%小牛血清的DMEM培养基,放置于37℃、5%CO₂培养箱中培养,取复苏后的5~8代对数期的细胞用于实验。

2.3 细胞分组及处理

将2 mL细胞悬液接种于6孔板中,每孔约 2×10^5 个细胞。细胞分为5组,分别为对照组(正常培养基),模型组(100 μ mol/L PA+正常培养基),TSPJ 12.5、25.0、50.0 mg/L处理组(100 μ mol/L PA+12.5、25.0、50.0 mg/L TSPJ,同时加入),加药培养24 h后的细胞进行指标检测。

2.4 油红O染色定性检测HepG2细胞脂质积累量

将各组细胞用预冷PBS清洗1次,用10%的中性甲醛固定30 min后,再用预冷的PBS清洗3次,加入稀释好的油红O染色液,置于37℃条件下染色30 min,60%异丙醇分色,用PBS清洗3次,倒置显微镜下观察。

2.5 尼罗红定量检测HepG2细胞脂质积累量

将各组细胞用预冷PBS清洗2次,0.25%胰酶消化,将收集到的细胞重悬于3 mL PBS中,清洗1次,用1 mL 4%多聚甲醛固定15 min后,用PBS清洗2次,加入1 μ g/mL的尼罗红染料500 μ L,于37℃水浴中避光染色5 min,用流式细胞仪在激发波长488 nm,发射波长550 nm处检测各组细胞荧光强度(尼罗红是一种可以与细胞内脂质结合的荧光染料,可以穿过细胞膜,荧光强度的高低可以定量反映细胞内的脂质积累情况),取各组细胞荧光强度几何中位值。

2.6 HepG2 细胞内 TG 测定

收集各组细胞,取细胞悬液于显微镜下计数后,按试剂盒说明书提供的方法检测各组细胞内 TG 水平。

2.7 TSPJ 潜在的作用靶标反向预测

首先确定 TSPJ 的化学成分结构为五环三萜齐墩果烷型皂苷的母核结构,用 Chemdraw 软件画出其结构图,并以 MDL Molfile (*.mol) 格式储存,然后将其导入到 OpenBabel 软件中,使用 convert 功能,将此文件转换成 sdf-MDL MOL format 格式文件。登录 PharmMapper 服务器,上传 sdf-MDL MOL format 格式文件,得到虚拟筛选结果。进而用 STRING 数据库检测部分靶点蛋白之间是否存在相互作用,具体步骤参考文献方法^[6]。

2.8 分子对接评价药物分子与 ER β 蛋白结合程度

从 PDB 下载 ER β 蛋白的晶体结构 (PDB ID: 5N10),运用 Surflex dock (Sybyl 8.1) 软件对蛋白结构进行处理,添加氢键,将终端质子设定为中性状态。随后添加 MMFF94 电荷 AMBER FF99 力场对蛋白质进行 1 000 次能量优化,使其达到稳定构象,加氢后的小分子添加 MMFF94 电荷和 Tripos 力场,进行 5 000 次能量优化,蛋白质和小分子的能量优化均采用共轭梯度法,使能量最终收敛于 0.05 kcal/mol。采用自动搜索的方式产生 protomol,其中设定 Threshold 值为

0.5, Bloat 值为 0。对接参数设置包括分子自得分 (self-scoring)、环柔性 (ring flexibility)、软格网处理 (soft grid treatment) 以及对接前优化 (pre-dock minimization) 和构象优化 (post-dock minimization)。其中搜索格点密度为 0.2 nm,设定 3 个起始构象,输出 20 个最终构象,取打分最高的构象为最优构象。

2.9 免疫荧光检测 ER β 的表达

用 75%乙醇冲洗盖玻片,将盖玻片置于超净台紫外灯下照射 30 min 后,铺在洁净的 6 孔板中,按照“2.3”项细胞分组的方法处理细胞,培养细胞 24 h 后,清洗、固定、破膜、封闭后,加一抗置于 4 °C 冰箱孵育过夜,用 PBS 清洗 3 次,加荧光二抗置于 37 °C 恒温箱中孵育 1 h,DAPI 染核后,用 PBS 清洗 3 次,封片后,置于激光共聚焦显微镜下观察。

2.10 统计学分析

数据用 SPSS 18.0 软件分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,采用单因素方差分析组间差异。

3 结果

3.1 TSPJ 对 HepG2 细胞脂质积累的影响

应用油红 O 染色方法观察到培养的 HepG2 细胞加入游离饱和脂肪酸后,模型组细胞有大量脂质积累,TSPJ 干预后,细胞内脂质积累明显减少,见图 1。结果表明,TSPJ 可有效减少细胞内脂质积累。

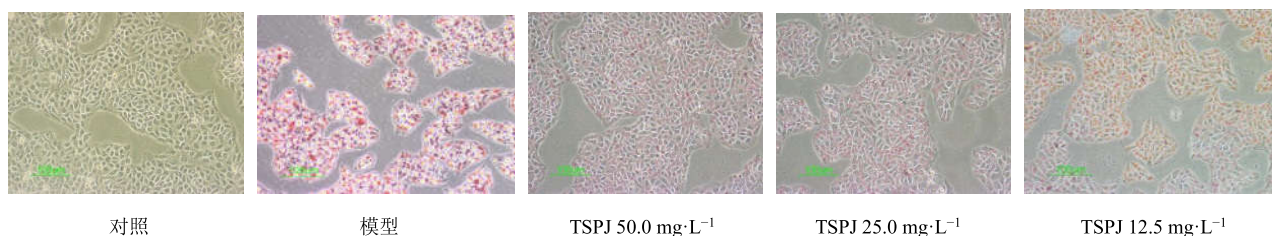


图 1 油红 O 染色检测 TSPJ 对细胞脂质积累的影响 ($\times 20$)

Fig. 1 Effect of TSPJ on HepG2 cells lipid accumulation by oil red O staining ($\times 20$)

进一步应用尼罗红染色,流式细胞术检测脂质沉积,结果表明模型组细胞荧光强度较对照组显著升高 ($P < 0.01$),TSPJ 组随着药物质量浓度的增加,荧光强度逐渐减弱。表明 TSPJ 可以有效改善 HepG2 细胞脂质代谢,并有一定的浓度依赖性,见表 1。

另外应用 TG 检测试剂盒测定,结果发现与对照组比较,模型组细胞中 TG 水平显著升高 ($P < 0.01$),TSPJ 组随着药物质量浓度的增加,TG 积累量逐渐降低,表明 TSPJ 可降低细胞内 TG 的积累。结果见图 2。

3.2 生物信息学分析 TSPJ 分子靶点

应用计算机靶标反向预测,PharmMapper 返回

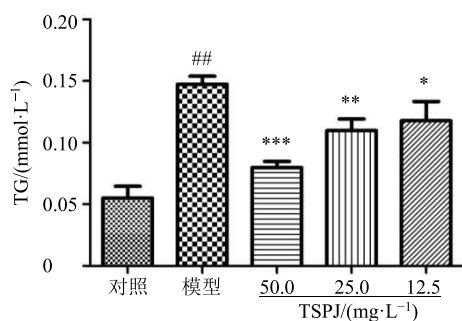
表 1 TSPJ 对 HepG2 细胞脂质积累的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of TSPJ on HepG2 cells lipid accumulation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	荧光强度
对照	—	1 780.0 $\pm$ 123.3
模型	—	6 065.0 $\pm$ 71.4 ^{##}
TSPJ	50.0	2 268.0 $\pm$ 136.1 ^{**}
	25.0	2 713.0 $\pm$ 159.1 ^{**}
	12.5	3 551.0 $\pm$ 153.0 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

图 2 TSPJ 对 HepG2 细胞 TG 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of TSPJ on TG level in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

了 TSPJ 的 300 个潜在的作用靶标, 以 fit score 排序, 通过分析、归纳, 列出了与 NAFLD 相联系的 8 个潜在作用靶标, 结果见表 2。进而应用 STRING 数据库检测 8 个靶点蛋白之间是否存在相互作用, 结果见图 3, 分析打分见表 3。TSPJ 中选定参与分子对接的化合物为竹节参皂苷 IV、竹节参皂苷 IVa、竹节参皂苷 V (相对分子质量分别为 794.97、927.08、957.11)。

3.3 分子对接结果

ER β 蛋白 (PDB ID: 5N10) 主要由 A、B 两条 α 螺旋肽链以及数条短肽聚合而成。在主链 A、B 链中间有一个疏水空腔, 药物分子与 ER β 蛋白在空腔中结合。其中 A 链中的缬氨酸 V53、甘氨酸 G55、丙氨酸 A56 与 B 链中的丙氨酸 A18*、谷氨酸 E19*、精氨酸 R20* 的烷基侧链以及酪氨酸 Y21* 苯环骨架构成一个通道, 药物分子被嵌合于通道中。结果见图 4。

3.4 TSPJ 调控 ER β 表达

免疫荧光结果显示, 与对照组比较, 模型组 ER β 表达量明显降低, TSPJ 干预后, ER β 表达量明显升

表 2 TSPJ 潜在的作用靶标

Table 2 Virtual screening potential targets of TSPJ

编号	fit score	靶标名称
1	5.736	estrogen-related receptor gamma
2	5.714	estrogen receptor
3	3.334	liver carboxylesterase 1
4	3.283	tyrosine-protein kinase JAK3
5	3.263	glucocorticoid receptor
6	3.109	caspase-3
7	2.995	fatty acid-binding protein, brain
8	2.936	peroxisome proliferator-activated receptor

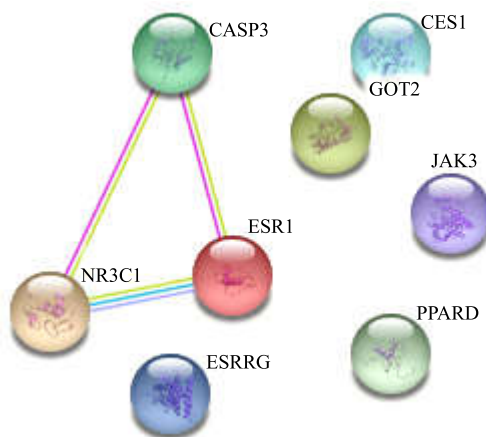


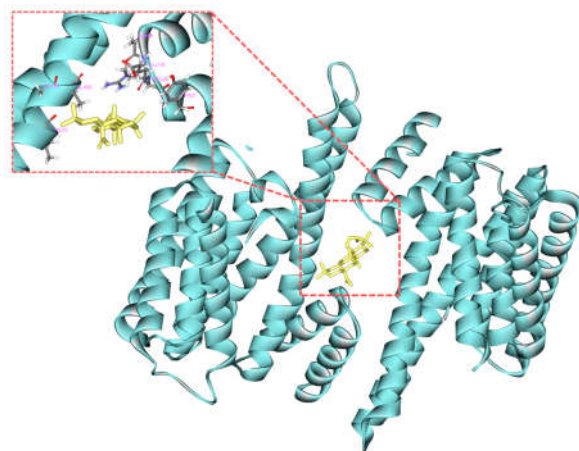
图 3 蛋白相互作用的分子网络 (evidence 模式)

Fig. 3 Interactive molecular networks of proteins (evidence model)

表 3 蛋白相互作用得分

Table 3 Browse interactions in tabular form

节点 1	节点 2	得分
ESR1	CASP3	0.634
NR3C1	CASP3	0.444
NR3C1	ESR1	0.924



蓝色表示 ER β 结构 黄色表示药物小分子
the structure of ER β (blue) the structure of drug (yellow)

图 4 蛋白和药物小分子的结合

Fig. 4 Binding site residues interactions of structure of ER β and drug

高, TSPJ 50 mg/L 效果明显。结果见图 5。

4 讨论

竹节参系五加科人参属植物, 其药效兼具北药人参和南药三七的作用, 是我国西南地区民间常用中草药, 在土家族、苗族被誉为“草药之王”。现代药理研究及本课题组研究表明竹节参具有抗炎、抗

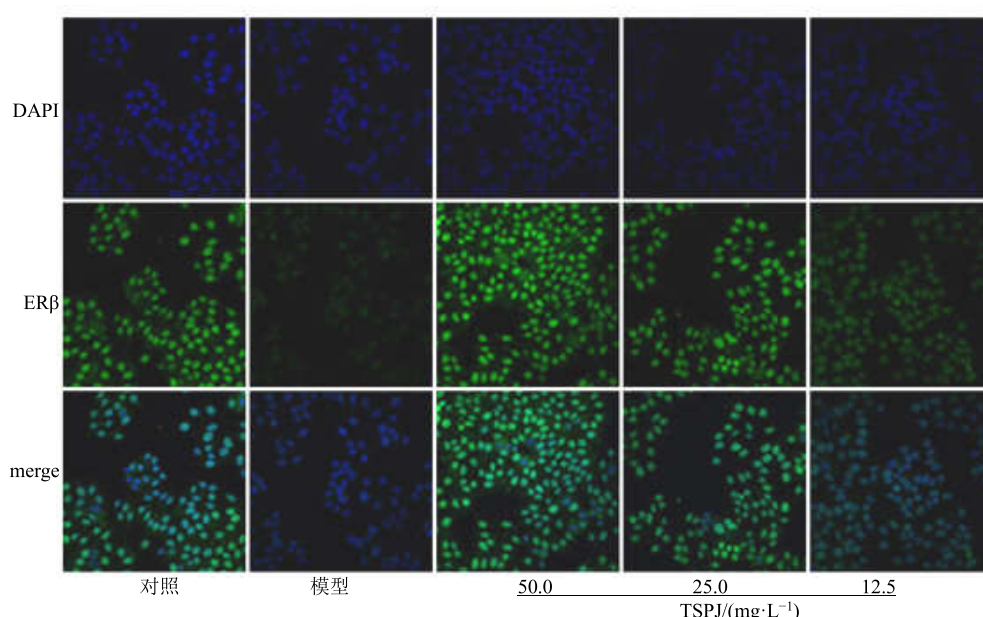


图 5 免疫荧光检测 TSPJ 对 ERβ 蛋白表达的影响 (×20)

Fig. 5 Effect of TSPJ on expressions of ERβ in cells by immunofluorescence (×20)

氧化、改善糖脂代谢等药理作用^[7-9]。本课题组前期研究表明 TSPJ 主要的活性成分是五环三萜齐墩果烷型皂苷，至今还未找到其治疗疾病的明确靶点。因此找到 TSPJ 的作用靶点，阐明其治疗疾病的机制意义重大。而计算机辅助药物设计 (computer aided drug design, CADD) 是一种方便快捷的方式。CADD 主要是以计算机为工具，根据配体-受体相互作用的原理，通过各种理论计算方法以及分子构象模拟技术，再根据数据库中收录的大量活性化合物构效关系的数据，预测出具有药效的先导化合物。在研究传统中药的过程中，CADD 是优化开发新中药处方以及发现先导化合物的重要手段^[10]。运用反向分子对接 (INDOCK) 相似度搜索，可快速预测出中药有效成分的作用靶点，有助于科学合理地解释传统中药的作用机制。运用 CADD 不仅可以减少药物靶点筛选的盲目性，节约研发时间，加快研究进程，还可节约研究成本^[11]。本研究中用到的 PharmMapper 是上海药物研究所刘晓峰博士建立的以活性小分子为探针、可快速搜寻潜在的药物靶标以及预测化合物生物活性的“反向药效团匹配方法”，该团队建立了相应的公共网络服务器^[12]。PharmMapper 返回的预测作用靶点，一部分和文献中报道的竹节参的药理作用相吻合，另一部分相关研究较少，可作为深入探讨竹节参作用的分子机制研究的线索。STRING 数据库可分析一些蛋白之间

的相互作用关系^[13]，经 STRING 数据库分析了 PharmMapper 返回的预测靶点蛋白，得到了蛋白相互作用网络图，结果表明仅 estrogen receptor、Caspase-3、glucocorticoid receptor 蛋白间可以相互作用，而 estrogen receptor、glucocorticoid receptor、Caspase-3 介导的凋亡均与 NAFLD 的发生发展密切相关，其具体的调节机制还有待进一步研究。本研究着重研究了通过 PharmMapper 返回的 TSPJ 可能性最大的作用靶点雌激素相关受体 ERβ。

雌激素是一类重要的性激素，主要由卵巢分泌，广泛作用于机体的各个器官，参与众多机体功能调节^[14]。雌激素不仅在生殖及性腺发育等发面有至关重要的作用，还与肝脏里的糖脂代谢有关。多项大规模流行病学研究发现，NAFLD 的患病率存在性别差异，男性比女性更易发生 NAFLD。然而在女性绝经期之后，这种性别分布发生逆转，女性更易发生 NAFLD。并且，女性绝经期后 NAFLD 的患病率明显高于绝经期前^[15]。这表明雌激素与 NAFLD 的发生发展密切相关，而雌激素的生物学功能是通过与其具有高度亲和力的 ER 实现的^[16]。ER 分为经典的核受体和近年来发现的膜受体，经典的核受体主要有 ERα 和 ERβ，膜受体主要是 GPR30^[17]。研究表明^[18-19]，ERα 和 ERβ 可调节与细胞增殖、凋亡和能量代谢有关的基因表达，GPR30 在调节能量平衡和肥胖的形成中发挥着重要作用。在对 ERβ 的研

究中发现^[20],在高脂饮食条件下喂养的 Wistar 大鼠,切除卵巢后,给予 ER β 选择性激动剂,脂肪组织内脂肪酸合成酶(FAS)、固醇调节元件结合蛋白 1c(SREBP-1c)等基因的表达水平显著降低,从而表明 ER β 可以抑制脂质的合成。本研究也发现,在棕榈酸诱导的脂质积累细胞中,ER β 的表达水平明显降低,TSPJ 处理后,ER β 的表达水平明显升高,细胞内的脂质积累量和 TG 的含量明显减少,从而改善 NAFLD。

综上所述,本研究证实了 TSPJ 改善 HepG2 细胞脂质积累的确切效果,进而利用计算机预测 TSPJ 的作用靶点并验证,初步阐述了 TSPJ 改善细胞脂质积累的作用机制。本研究为 TSPJ 的开发应用以及 NAFLD 的防治提供了一定的思路。

参考文献

- [1] Li Z, Xue J, Chen P, *et al.* Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in mainland of China: A meta-analysis of published studies [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 29(1): 42-51.
- [2] Loomba R, Sanyal A J. The global NAFLD epidemic [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(11): 686-690.
- [3] 覃玉娥, 刘朝奇, 张长城, 等. 竹节参总皂苷对四氯化碳诱导小鼠肝损伤的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(10): 47-49.
- [4] 袁 丁, 刘朝奇, 何毓敏, 等. 一种竹节参总皂苷及其制备方法与其用途: 中国, CN103655654A [P]. 2014-03-26.
- [5] 何春喜, 张长城, 袁 丁, 等. 竹节参总皂苷的大孔吸附树脂纯化与离子交换树脂脱色工艺研究 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1146-1152.
- [6] 王君芳, 王佳琦, 毕庆伟, 等. 神经嵴细胞发育分子调控网络的生物信息学分析 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(24): 3621-3627.
- [7] Wei N, Liu Z, Yuan D, *et al.* Protective effect of saponins extract from *Panax japonicus* on myocardial infarction: involvement of NF- κ B, Sirt1 and mitogen-activated protein kinase signalling pathways and inhibition of inflammation [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2014, 66(11): 1641-1651.
- [8] 袁 琴, 袁 丁, 刘朝奇, 等. 竹节参齐墩果烷皂苷对 RAW264. 7 巨噬细胞 SIRT1 活性影响及抗炎作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(3): 349-354.
- [9] 邓丽丽, 王佳文, 袁 丁, 等. 竹节参总皂苷通过 NLRP1 和 NLRP3 炎症小体途径减轻衰老大鼠神经细胞凋亡的作用研究 [J]. 中草药, 2017, 48(23): 4941-4945.
- [10] 乔连生, 张燕玲. 计算机辅助药物设计在天然产物多靶点药物研发中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 1951-1955.
- [11] Liu X, Zhu F, Ma X H, *et al.* Predicting targeted polypharmacology for drug repositioning and multi-target drug discovery [J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20(13): 1646-1661.
- [12] 宋静林, 相玉红, 张卓勇, 等. 药物 SAHA 的潜在靶标预测及分子对接研究 [J]. 计算机与应用化学, 2013, 30(1): 97-101.
- [13] Von M C, Jensen L J, Snel B, *et al.* STRING: Known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms [J]. *Nucl Acids Res*, 2005, 33: 433-437.
- [14] Zetterberg M, Celojovic D. Gender and cataract--the role of estrogen [J]. *Curr Eye Res*, 2015, 40(2): 176-190.
- [15] Won B Y, Park K C, Lee S H, *et al.* Sex difference in the association between serum homocysteine level and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Kor J Family Med*, 2016, 37(4): 242-247.
- [16] Besse-Patin A, L  veill   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.
- [17] Liu M, Zhang W, Li X, *et al.* Impact of age and sex on the development of atherosclerosis and expression of the related genes in apoE deficient mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 469(3): 456-462.
- [18] Jonsson P, Katchy A, Williams C. Support of a bi-faceted role of estrogen receptor β (ER β) in ER α -positive breast cancer cells [J]. *Endocrine-related Cancer*, 2014, 21(2): 143-160.
- [19] Nilsson B O, Olde B, Leebundberg L M. G protein-coupled oestrogen receptor 1 (GPER1)/GPR30: A new player in cardiovascular and metabolic oestrogenic signalling [J]. *Brit J Pharmacol*, 2011, 163(6): 1131-1139.
- [20] Weigt C, Hertrampf T, Kluxen F M, *et al.* Molecular effects of ER alpha-and beta-selective agonists on regulation of energy homeostasis in obese female Wistar rats [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 377(2): 147-158.