

高浓度绿原酸对 L02 细胞脂质堆积与氧化应激损伤的影响

黎文卓, 刘亚云, 陈 勇*

湖北大学 中药生物技术省重点实验室及生物资源绿色转化协同创新中心, 湖北 武汉 430062

摘要: 目的 研究高浓度 ($>100 \mu\text{mol/L}$) 绿原酸 (CGA) 对正常及非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 状态下 L02 肝细胞脂质堆积与氧化应激的影响。方法 用 $666 \mu\text{mol/L}$ 油酸 (OA)- $333 \mu\text{mol/L}$ 棕榈酸 (PA) 处理人正常肝细胞系 L02 24 h 构建体外肝细胞 NAFLD 模型。正常及模型细胞经 CGA (0.5、1、2 mmol/L) 处理 24 h 后, 油红 O 染色检测胞内脂滴的量, 定量 PCR 及 Western blotting 检测细胞 SREBP-1C、PNPLA3 和 CYP2E1 的 mRNA 和蛋白表达量, 荧光光度法检测胞内活性氧 (ROS) 的量。结果 正常及 NAFLD 模型 L02 细胞经 CGA 处理后, 均浓度依赖性提高了胞内脂滴与 ROS 的量, 以及 SREBP-1C、PNPLA3 和 CYP2E1 的 mRNA 与蛋白表达水平。结论 高浓度 CGA (0.5、1、2 mmol/L) 处理能促进正常及 NAFLD 模型 L02 细胞的脂堆积与氧化应激损伤。

关键词: 绿原酸; L02 细胞; 脂质堆积; 氧化应激; 非酒精性脂肪肝

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)21-4471-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.21.017

Effect of chlorogenic acid at high concentration on lipid accumulation and oxidative stress injury in L02 cells

LI Wen-zhuo, LIU Ya-yun, CHEN Yong

Hubei Province Key Laboratory of Biotechnology of Chinese Traditional Medicine, Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-resources, Hubei University, Wuhan 430062, China

Abstract: Objective To investigate the effects of chlorogenic acid (CGA) at high concentration ($>100 \mu\text{mol/L}$) on the lipid accumulation and oxidative stress in L02 cells under normal and non alcoholic liver disease (NAFLD) status induced by oleic acid (OA) and palmitic acid (PA) treatment. **Methods** L02 cells were treatment by OA ($666 \mu\text{mol/L}$)-PA ($333 \mu\text{mol/L}$) for 24 h to induce intracellular steatosis. After normal and OA-PA treated cells were treated by CGA (0, 0.5, 1, and 2 mmol/L) for 24 h, the intracellular contents of lipid droplets and reactive oxygen species (ROS) were determined by Oil red staining and fluorospectrophotometry, respectively. And the mRNA and protein expression levels of SREBP-1C, PNPLA3, and CYP2E1 were detected by Real-time PCR and Western blotting, respectively. **Results** CGA treatment dose-dependently increased the levels of intracellular lipid droplets and ROS, as well as the mRNA and protein expression levels of SREBP-1C, PNPLA3, and CYP2E1 in normal and OA-PA treated L02 cells. **Conclusion** CGA treatment at high concentration can accelerate the lipid accumulation and oxidative stress injury in L02 cells under normal and NAFLD status.

Key words: chlorogenic acid; L02 cells; lipid accumulation; oxidative stress; non alcoholic liver disease

绿原酸 (chlorogenic acid, CGA) 是由咖啡酸和奎宁酸缩合而成的一个酯类化合物, 广泛分布于中药材和食物中。CGA 具有多种药理活性, 如抗菌消炎、抗氧化、糖脂代谢调控和抗肿瘤等作用。近年来 CGA 对脂代谢的调控作用成为研究热点^[1]。研究表明较低剂量的 CGA 可以改善实验动物的肥胖状况与血脂水平, 如 Zuker (fa/fa) 大鼠 iv CGA 5 mg/(kg·d) 3 周^[2], DDY 雄性小鼠 ig CGA 60

mg/(kg·d) 2 周^[3], 高脂模型金黄地鼠 ip CGA 80 mg/(kg·d) 8 周^[4], ICR 雄性小鼠喂食高脂饲料 (含质量分数 0.02% CGA) 8 周^[5], Lepr db/db 小鼠 ip CGA 250 mg/kg 2 周^[6], db/db 糖尿病小鼠 ig 咖啡奎尼酸混合物 50~200 mg/(kg·d) 3 周^[7], 高脂模型 SD 大鼠 ig CGA 20、90 mg/(kg·d) 12 周^[8]。也有研究发现较高剂量的 CGA 可以促进动物的肥胖与肝脂堆积, 如 SD 大鼠喂食高脂饲料 (含质量分数 0.2% CGA)

收稿日期: 2017-03-20

基金项目: 湖北省技术创新专项重大项目 (2016ACA140)

作者简介: 黎文卓 (1989—), 男, 研究生, 主要研究方向为分子药理学。

*通信作者 陈 勇 (1966—), 男, 博士生导师, 教授, 主要研究方向为药动学与分子药理学。Tel/Fax: (027)88663590 E-mail: 1740952455@qq.com

4周^[9], C57BL/6 雄性小鼠喂食高脂饲料(含质量分数0.1% CGA) 12周^[10], C57BL/6 雄性小鼠喂食高脂饲料(含质量分数0.1%~0.35% CGA) 12周^[11]。此外, 体外研究结果也与体内结果基本一致, 低浓度CGA抑制细胞脂堆积, 如30 $\mu\text{mol/L}$ 的CGA处理HepG2细胞24 h^[12]及10 $\mu\text{mol/L}$ CGA处理经油酸(OA)诱导的HepG2细胞24 h^[13]; 较高浓度CGA可以诱导细胞脂肪形成, 如50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的CGA处理小鼠脂肪细胞3T3-F442A 1周^[14]。上述研究结果表明, CGA可能是通过调节腺苷酸(AMP)依赖的蛋白激酶(AMPK)的磷酸化^[6-7,14]以及过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)和肝X受体 α (LXR α)及其下游基因的表达^[4-5,8], 最终调节脂质的合成或分解。

非酒精性脂肪肝(NAFLD)是指在无过量饮酒史情况下, 肝细胞内脂肪过度沉积与变性^[15]。肝脏是脂质代谢的主要器官, 有多个基因直接参与脂代谢调控。其中固醇调节元件结合蛋白1C(SREBP-1C)可以通过调控乙酰辅酶A羧化酶(ACC)和脂肪酸合酶(FAS)来调节肝脏脂肪酸和胆固醇的合成^[16], 其上调表达可导致肝脏脂肪合成增多而引起脂肪肝^[17]。脂肪营养蛋白(PNPLA3)是NAFLD易感基因^[18], 主要在白色脂肪组织与肝脏中表达, 与肝脂含量密切相关^[19], 其表达受SREBP-1C的直接调控^[20-21]。此外, 活性氧(ROS)是引起脂质过氧化的关键。细胞色素P450 2E1(CYP 2E1)的过表达可导致肝细胞内ROS增生, 促进肝细胞脂质过氧化^[22], 引起胰岛素抵抗^[23], 进而加快肝脏从单纯性脂肪变性向非酒精性脂肪肝炎(NASH)的发展^[24]。

虽然已有文献报道低剂量CGA可以抑制脂质生成, 高剂量CGA可以促进脂质的生成, 但高剂量CGA对NAFLD状态下肝细胞脂代谢与氧化应激的影响却鲜有报道。OA和棕榈酸(PA)能诱导肝脏脂质堆积与脂变性, 常用于处理肝细胞构建体外NAFLD模型^[25]。本实验以正常人肝细胞系L02为实验材料, 利用OA+PA处理L02细胞体外模拟肝细胞NAFLD状态, 研究高浓度CGA对正常及NAFLD状态下肝细胞脂质代谢与氧化应激的影响, 为其临床应用提供参考。

1 材料

1.1 细胞与培养基

人肝细胞系L02细胞(华中科技大学同济医学院赠送), 培养于含10%胎牛血清和1%双抗(青霉

素和链霉素)的DMEM培养液, 培养箱条件为37 $^{\circ}\text{C}$ 和5% CO_2 , 当细胞汇合至85%时用0.25%胰蛋白酶将其消化并传代。

1.2 药品与试剂

CGA(质量分数 $\geq 98\%$; 武汉历鼎生物科技有限公司, 批号DR13313); DMEM培养基和胎牛血清(Gibco公司); 油红O粉末(武汉谷歌生物科技有限公司); OA(Sigma公司); PA(上海梯希爱公司); 逆转录试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒(Toyoto公司); 兔抗人SREBP-1C抗体(沈阳万类生物科技公司); 兔抗人PNPLA3抗体及CYP 2E1抗体(Abcam, 美国); 小鼠抗人 β -actin抗体、辣根过氧化物酶标记的抗小鼠和抗兔二抗(KPL, 美国); TRIzol(Invitrogen, 美国); 逆转录试剂盒、SYBR Green I Master Mix(东洋纺公司, 日本); 活性氧检测试剂盒(上海碧云天公司)。

1.3 仪器

XDS-1B倒置相差显微镜(北京佳源兴业科技有限公司); CFX Connect™ Real-Time System(BIO-RAD公司, 美国); TriStar LB 941多功能酶标仪(Berthold, 德国); DYY-6C型水平电泳槽、DYY-6C型电泳仪、DYC-40A型垂直电泳槽、DYC-40A电转仪(北京市六一仪器厂)。

2 方法

2.1 MTT法检测细胞活性

将L02细胞(约 1×10^3 个)接种至96孔板, 贴壁后分别进行如下处理: 1)对正常L02细胞活性的影响设对照组(正常培养基)、溶剂对照组(培养基中含0.3% DMSO)、不同浓度(5~4 000 $\mu\text{mol/L}$)CGA组, 各组培养24 h; 2)对NAFLD状态下L02细胞活性的影响设溶剂对照组(培养基中含0.43% DMSO、0.16%甲醇、0.48% BSA)、模型组(666 $\mu\text{mol/L}$ OA+333 $\mu\text{mol/L}$ PA)、不同浓度(5~4 000 $\mu\text{mol/L}$)CGA处理组(先用666 $\mu\text{mol/L}$ OA+333 $\mu\text{mol/L}$ PA处理24 h建模, 再用CGA处理24 h)。移去培养基, 每孔加入200 μL (0.5 mg/mL)MTT反应4 h; 吸弃MTT后, 每孔加入150 μL DMSO, 振荡6 min, 于570 nm波长处酶标仪检测各孔吸光度(A)值。计算细胞存活率。

细胞存活率=给药组A值/对照组A值(或溶剂对照组A值)

2.2 油红O染色观察细胞脂质堆积

将L02细胞(约 2×10^5 个)接种至6孔板, 贴壁培养后进行如下给药处理: 1)对正常L02细胞

的影响设溶剂对照组（培养基中含 0.3% DMSO）、不同浓度（0.5、1.0、2.0 mmol/L）CGA 组，各组给药后培养 24 h；2）对 NAFLD 状态下 L02 细胞的影响设溶剂对照组（培养基中含 0.43% DMSO、0.16% 甲醇、0.48% BSA）、模型组（666 $\mu\text{mol/L}$ OA+333 $\mu\text{mol/L}$ PA）、不同浓度（0.5、1.0、2.0 mmol/L）CGA 处理组（先用 666 $\mu\text{mol/L}$ OA+333 $\mu\text{mol/L}$ PA 处理 24 h 建模，再用 CGA 处理 24 h）。PBS 清洗 3 次、4%多聚甲醛溶液固定 30 min、60%异丙醇润洗 10 s 后，加入油红 O 染色液染色 30 min，再经 60%异丙醇漂洗及 PBS 漂洗后，在倒置显微镜下观察并拍照。

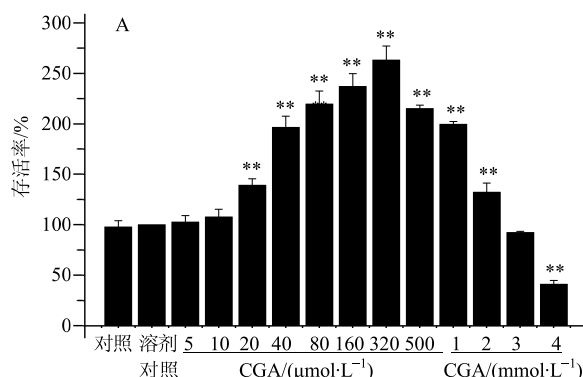
2.3 荧光定量 PCR 检测 SREBP-1C、PNPLA3 和 CYP2E1 mRNA 表达

细胞分组、给药及处理同“2.2”项，药物作用 24 h 后，用 TRIzol 法提取细胞总 RNA，取 3 μg RNA 于 20 μL 逆转录体系中逆转录为 cDNA 作为模版，用 SYBR Green I 进行荧光标记检测细胞内 SREBP-1C、PNPLA3 和 CYP2E1 的 mRNA 表达量。所用引物序列见表 1。 β -actin 为内参，各基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

表 1 定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used for real-time quantitative PCR

基因	序列 (5'→3')
β -actin	正向引物 TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA
	反向引物 CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG
PNPLA3	正向引物 CTGTACCCTGCCTGTGGAAT
	反向引物 TCGAGTGAACACCTGTGAGG
SREBP-1C	正向引物 CGACATCGAAGACATGCTTCAG
	反向引物 GGAAGGCTTCAAGAGAGGAGC
CYP2E1	正向引物 GGGGACATTCTGTGTTCCAG
	反向引物 CAAGTAGAGTGCCAGGCAAGG



2.4 细胞内 ROS 的测定

细胞分组、给药及处理同“2.2”项，药物作用 24 h 后，再与用无血清培养基稀释的 DCFH-DA 探针（终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ ）于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。用无血清培养基洗涤 3 次后用 100 μL PBS (pH 7.4) 重悬细胞，用荧光酶标仪检测每孔荧光值（激发波长 485 nm、发射波长 535 nm）。

2.5 Western blotting 法检测 SREBP-1C、PNPLA3 和 CYP2E1 蛋白表达

细胞分组、给药及处理同“2.2”项，药物作用 24 h 后，用含有 1% PMSF 和 cocktail 的 RIPA 裂解液处理细胞得到总蛋白。取 20~70 μg 目标蛋白（SREBP-1C、PNPLA3、CYP2E1）及内标蛋白（ β -actin）经 SDS-PAGE（5%浓缩胶-10%分离胶）分离并转移到 PVDF 膜上，室温封闭 2 h、4 $^{\circ}\text{C}$ 一抗（稀释比例 1:1 000）孵育过夜、室温二抗（稀释比例 1:5 000）孵育 1 h 后，用 ECL 化学发光液显色，在暗室中曝光。用 Image J (NIH) 软件进行蛋白印迹图灰度扫描。

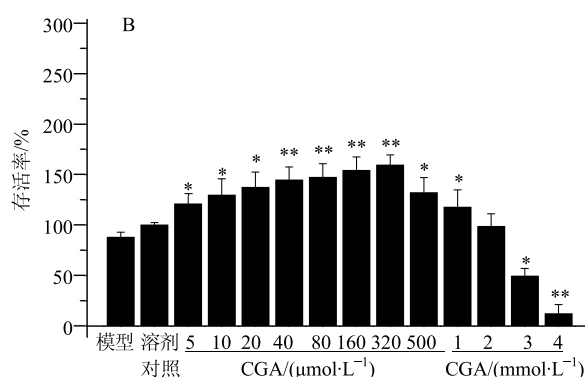
2.6 数据处理

实验数据来自 3 次独立重复实验，以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析，组间数据两两比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 对 L02 细胞活性的影响

图 1 结果表明，对正常 L02 细胞以及 OA+PA 处理的 L02 细胞，CGA 在 20 $\mu\text{mol/L}$ ~2 mmol/L 时对细胞活性具有促进作用，CGA 浓度高于 3 mmol/L 时对细胞活性具有明显抑制作用。因此，选择 0.5、1、2 mmol/L 作为后续实验 CGA 的给药浓度。



与对照组或溶剂对照组比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ ，图 2 同
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group or solvent control group, same as Fig. 2

图 1 CGA 对正常 (A) 及 OA+PA 处理 (B) L02 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 1 Effect of CGA on cell viability of normal (A) and OA + PA treated (B) L02 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.2 对 L02 细胞脂质堆积及相关基因表达的影响

3.2.1 对正常 L02 细胞的影响 正常 L02 细胞经 CGA (0.5、1、2 mmol/L) 处理 24 h 后, 细胞内脂滴随给药浓度增加有轻微增加(图 2-A), SREBP-1C 和 PNPLA3 mRNA(图 2-B)与蛋白表达量(图 2-C)亦有一定上调趋势, 与油红 O 染色的结果一致, 说明高浓度 CGA 处理会促进肝细胞的脂质堆积。

3.2.2 对 OA+PA 处理的 L02 细胞的影响 L02 细胞经 OA+PA 预处理 24 h、再经 CGA 处理 24 h 后, 模型组细胞内脂滴数明显增加, 再经 CGA 处理后胞内脂滴随 CGA 给药浓度的增加有轻微增加(图 3-A)。同时, 随着 CGA 给药浓度的增加, 胞内 SREBP-1C

和 PNPLA3 的 mRNA(图 3-B)及蛋白(图 3-C)表达量的上调趋势也与油红 O 染色结果一致, 说明高浓度 CGA 能进一步促进脂变性肝细胞的脂堆积。

3.3 对 L02 细胞氧化应激的影响

3.3.1 对 L02 细胞内 ROS 水平的影响 正常 L02 细胞经 CGA 处理 24 h 后, 胞内 ROS 水平呈浓度依赖性升高, 当 CGA 浓度为 2 mmol/L 时胞内 ROS 的量是溶剂对照组的 2.1 倍(图 4-A)。OA+PA 处理 L02 细胞 24 h 后胞内 ROS 的量明显增加; 与 CGA 联合处理 L02 细胞 24 h 后, 胞内 ROS 的量亦呈浓度依赖性升高, 当 CGA 浓度为 2 mmol/L 时细胞内 ROS 的量是模型组的 1.4 倍(图 4-B)。

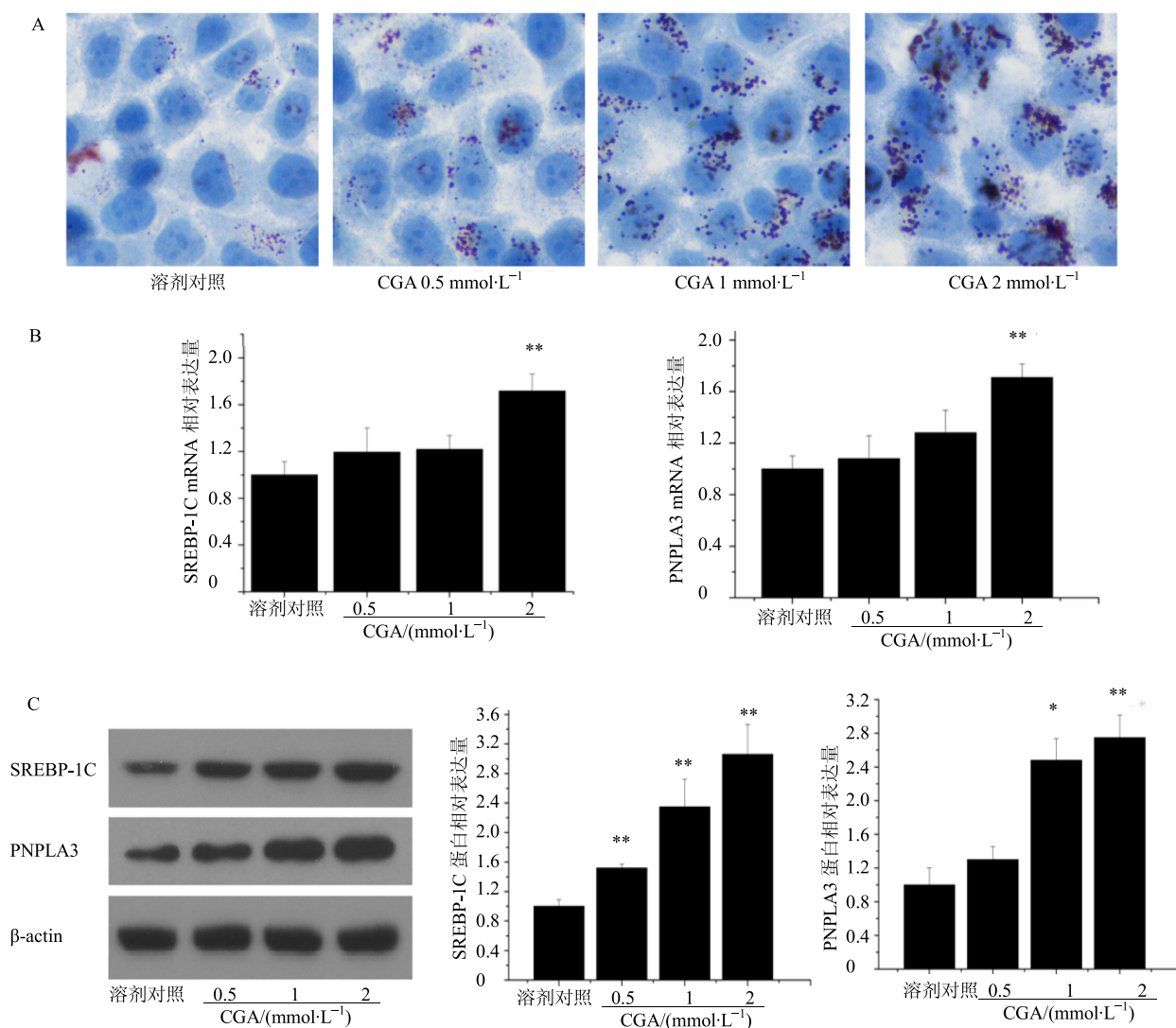


图 2 CGA 对正常 L02 细胞的脂质堆积 (A, 油红 O 染色, $\times 400$) 及 SREBP-1C、PNPLA3 mRNA (B) 与蛋白 (C) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of CGA on lipid accumulation (A), expression of mRNA (B) and protein (C) of SREBP-1C and PNPLA3 in normal L02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

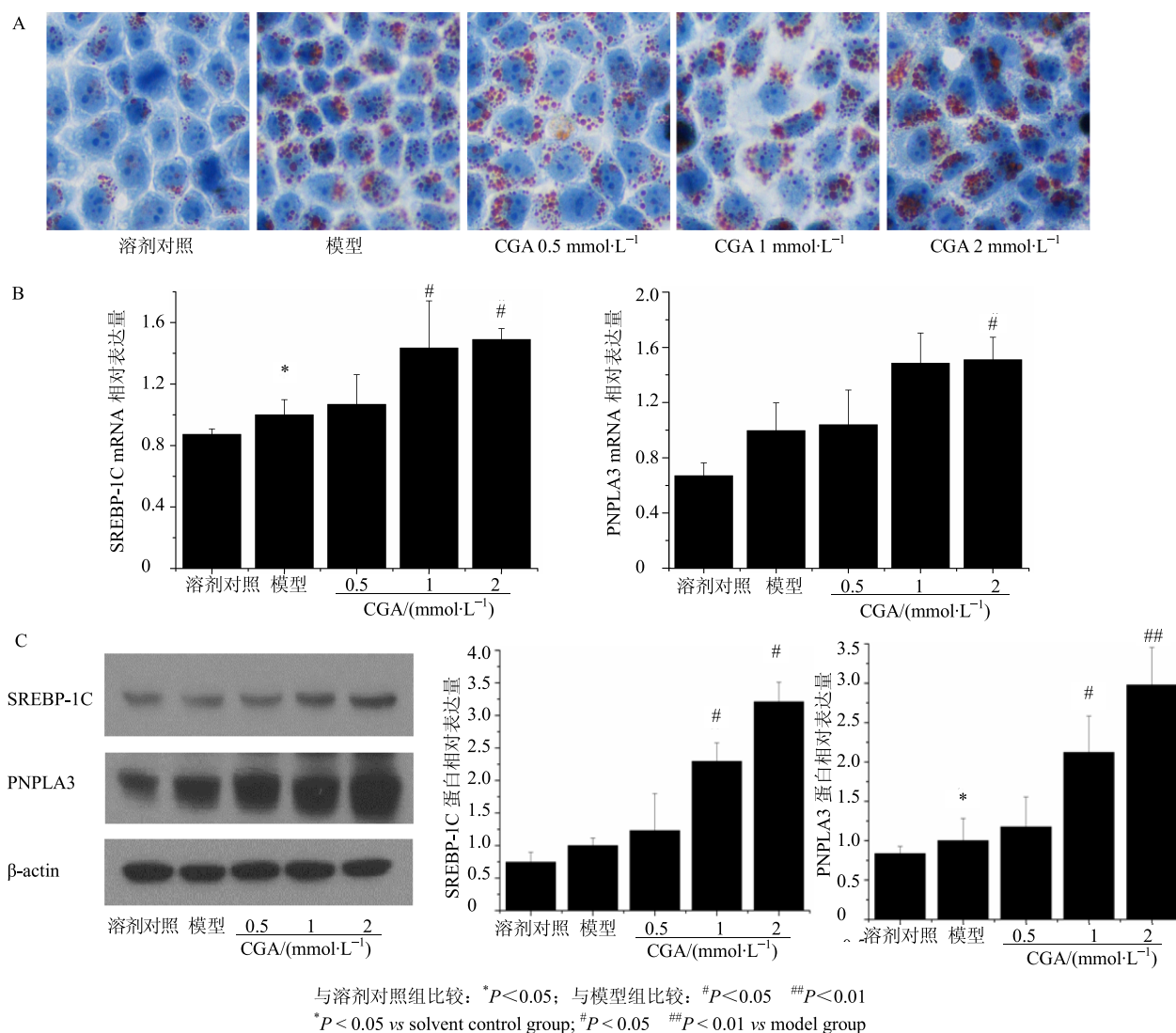


图 3 CGA 对 OA+PA 处理的 L02 细胞脂质堆积 (A, 油红 O 染色, $\times 400$) 及 SREBP-1C、PNPLA3 mRNA (B) 与蛋白 (C) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of CGA on lipid accumulation (A), expression of mRNA (B) and protein (C) of SREBP-1C and PNPLA3 in OA+PA treated L02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

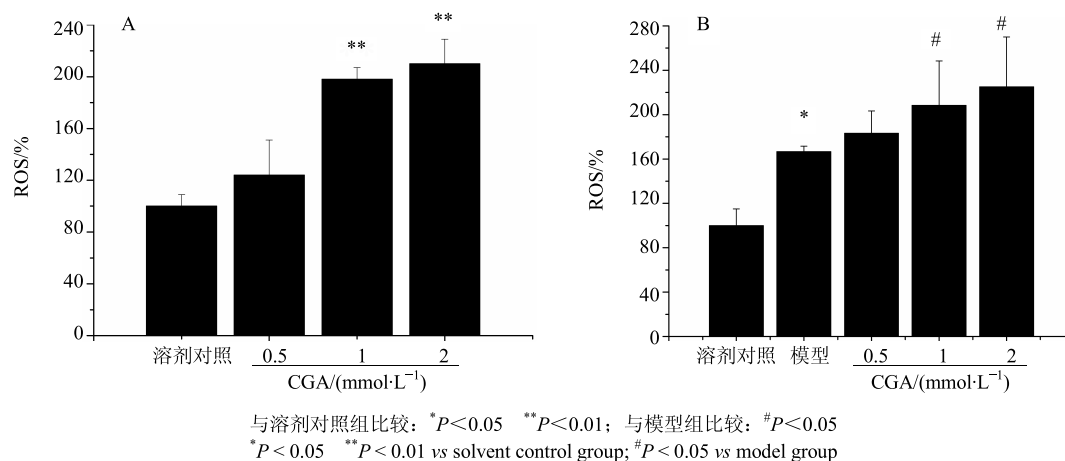


图 4 CGA 对正常 (A) 及 OA+PA 处理 (B) L02 细胞内 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of CGA on ROS content in normal (A) and OA + PA treated (B) L02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3.2 对 L02 细胞内 CYP2E1 mRNA 及蛋白表达的影响 CGA 处理 24 h 后浓度依赖性促进了 L02 细胞的 CYP2E1 mRNA 及蛋白表达量 (图 5-A)。OA+PA 处

理 24 h 明显促进了 L02 细胞的 CYP 2E1 mRNA 及蛋白表达量, 与 CGA 联合处理 24 h 后进一步浓度依赖性提高了 CYP2E1 的 mRNA 及蛋白表达量 (图 5-B)。

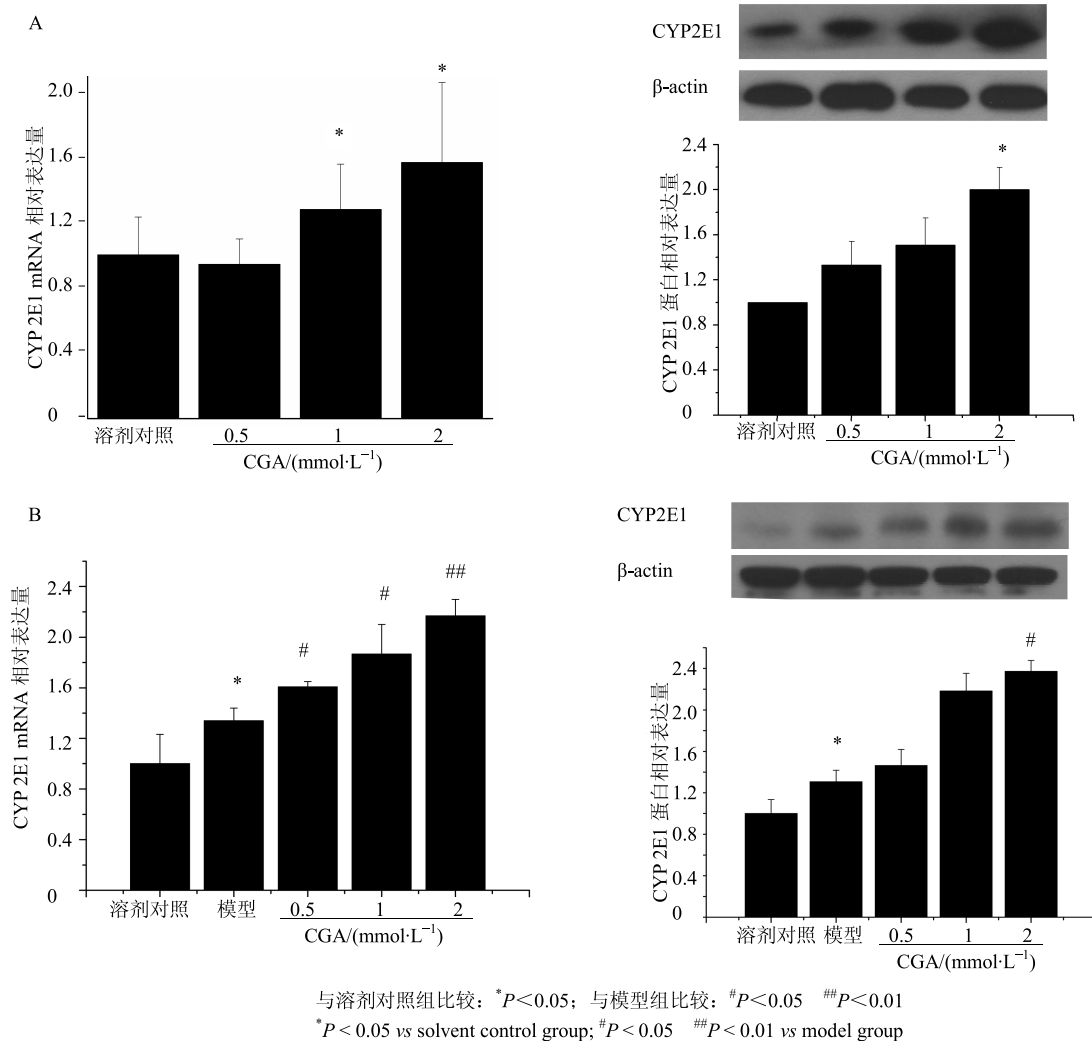


图 5 CGA 对正常 (A) 及 OA+PA 处理 (B) L02 细胞 CYP 2E1 mRNA 及蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of CGA on mRNA and protein expression of CYP2E1 in normal (A) and OA + PA treated (B) L02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

作为世界范围内消耗最多的饮品之一, 咖啡对健康的影响备受关注。有研究表明咖啡能降低 II 型糖尿病发病风险, 也有调查显示过量饮用咖啡会导致人体肥胖与血脂升高^[26]。CGA 是咖啡豆中量最高的多酚类化合物, 研究表明低浓度 CGA ($\leq 100 \mu\text{mol/L}$) 可以改善肥胖和糖尿病小鼠的脂代谢紊乱^[2-8], 高浓度的 CGA 反而会促进模型动物的脂堆积现象^[9-11]。上述文献结果提示 CGA 对脂代谢的调控可能存在一个临界剂量, 低于临界剂量 CGA 抑制脂堆积, 高于临界剂量 CGA 促进脂堆积。

肝细胞脂堆积与胰岛素抵抗是 NAFLD 的基本

特征。本实验结果显示高浓度 CGA 明显促进了正常及脂变性 L02 细胞内的脂滴生成。SREBP-1C 是脂肪酸合成的关键调控基因^[17], PNPLA3 亦是 NAFLD 发生的敏感基因, 在 NAFLD 状态下肝细胞内 SREBP-1C 及 PNPLA3 的表达均显著升高^[18-21]。本研究发现用高浓度 CGA 处理正常及脂变性 L02 细胞, 均能明显诱导细胞中 SREBP-1C 和 PNPLA3 的 mRNA 和蛋白表达, 其中对 SREBP-1C mRNA 表达的诱导作用比较明显, 对 PNPLA3 蛋白表达的诱导作用比较明显。研究结果表明高浓度 CGA 可能通过促进脂代谢关键因子 SREBP-1C 和 PNPLA3 的表达进而促进肝细胞的脂堆积与脂变性。

脂质过氧化是促发 NASH 形成的重要因素, 肝脏 CYP2E1 过表达与胞内 ROS 增生有密切联系^[24]。CYP2E1 介导多不饱和脂肪酸代谢, 催化亚油酸和花生四烯酸生产 ω -羟基脂肪酸, ω -羟基脂肪酸进一步催化生成二羧基脂肪酸, 当二羧基脂肪酸浓度达到一定程度时, 导致肝细胞毒性与损伤。在肥胖症和 NASH 患者肝脏中 CYP2E1 的表达量与活性显著增加^[22-23]。过表达 CYP2E1 导致肝细胞内 ROS 的量增加, 加剧肝细胞脂质过氧化, 引起胰岛素抵抗, 进而加快肝脏从单纯性脂肪变性向 NASH 发展^[24]。本研究发现高浓度 CGA 可明显促进正常及脂堆积与脂变性 L02 细胞中 CYP2E1 的 mRNA 及蛋白表达水平, 提示肝脏在高剂量 CGA 暴露情况下, 可加剧肝细胞的脂质过氧化与胰岛素抵抗。

参考文献

- [1] Meng S, Cao J, Feng Q, *et al.* Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: A review [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, doi: 10.1155/2013/801457.
- [2] Rodriguez D S D, Hadley M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats [J]. *J Nutr Biochem*, 2002, 13(12): 717-726.
- [3] Shimoda H, Seki E, Aitani M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2006, doi: 10.1186/1472-6882-6-9.
- [4] Li S, Chang C, Ma F, *et al.* Modulating effects of chlorogenic acid on lipids and glucose metabolism and expression of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor- α in Golden Hamsters fed on high fat diet [J]. *Biomed Environ Sci*, 2009, 22(2): 122-129.
- [5] Cho A, Jeon S, Kim M, *et al.* Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(3): 937-943.
- [6] Ong K W, Hsu A, Tan B K H. Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(9): 1341-1351.
- [7] Wu C, Zhang X, Zhang X, *et al.* The caffeoylquinic acid-rich Pandanus tectorius fruit extract increases insulin sensitivity and regulates hepatic glucose and lipid metabolism in diabetic db/db mice [J]. *J Nutr Biochem*, 2014, 25(4): 412-419.
- [8] Huang K, Liang X, Zhong Y, *et al.* 5-Caffeoylquinic acid decreases diet-induced obesity in rats by modulating PPAR α and LXR α transcription [J]. *J Sci Food Agric*, 2015, 95(9): 1903-1910.
- [9] Frank J, Kamal-Eldin A, Razdan A, *et al.* The dietary hydroxycinnamate caffeic acid and its conjugate chlorogenic acid increase vitamin E and cholesterol concentrations in Sprague-Dawley rats [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(9): 2526-2531.
- [10] Mubarak A, Hodgson J M, Considine M J, *et al.* Supplementation of a high-fat diet with chlorogenic acid is associated with insulin resistance and hepatic lipid accumulation in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(18): 4371-4378.
- [11] Li Kwok Cheong J D, Croft K D, Henry P D, *et al.* Green coffee polyphenols do not attenuate features of the metabolic syndrome and improve endothelial function in mice fed a high fat diet [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 559: 46-52.
- [12] Hao S, Xiao Y, Lin Y, *et al.* Chlorogenic acid-enriched extract from Eucommia ulmoides leaves inhibits hepatic lipid accumulation through regulation of cholesterol metabolism in HepG2 cells [J]. *Pharm Biol*, 2015, 54(2): 251-259.
- [13] 吴崇明, 栾红, 王帅, 等. 露兜箬来源咖啡酰奎宁酸抑制 HepG2 肝细胞脂质积聚并调节脂代谢相关基因的表达 [J]. *药学报*, 2015, 50(3): 278-283.
- [14] Alonso-Castro A J, Miranda-Torres A C, González-Chávez M M, *et al.* Cecropia obtusifolia Bertol and its active compound, chlorogenic acid, stimulate 2-NBD glucose uptake in both insulin-sensitive and insulin-resistant 3T3 adipocytes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 120(3): 458-464.
- [15] Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, *et al.* Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Dig Dis*, 2010, 28: 155-161.
- [16] Dentin R, Pegorier J P, Benhamed F, *et al.* Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 20314-20326.
- [17] Ahmed MH, Byrne CD. Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Drug Discov Today*, 2007, 12(17/18): 740-747.
- [18] Romeo S, Kozlitina J, Xing C, *et al.* Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Nat Genet*, 2008, 40: 1461-1465.
- [19] Romeo S, Sentinelli F, Dash S, *et al.* Morbid obesity exposes the association between PNPLA3 I148M

- (rs738409) and indices of hepatic injury in individuals of European descent [J]. *Int J Obes*, 2009, 34: 190-194.
- [20] Dubuquoy C, Robichon C, Lasnier F, *et al.* Distinct regulation of adiponutrin/PNPLA3 gene expression by the transcription factors ChREBP and SREBP1c in mouse and human hepatocytes [J]. *J Hepatol*, 2011, 55(1): 145-153.
- [21] Zhong D, Huang G, Zhang Y, *et al.* MicroRNA-1 and microRNA-206 suppress LXR α -induced lipogenesis in hepatocytes [J]. *Cellular Signalling*, 2013, 25: 1429-1437.
- [22] Aubert J, Begriche K, Knockaert L, *et al.* Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2011, 35(10): 630-637.
- [23] Chtioui H, Semela D, Ledermann M, *et al.* Expression and activity of the cytochrome P450 2E1 in patients with nonalcoholic steatosis and steatohepatitis [J]. *Liver Int*, 2007, 27(6): 764-771.
- [24] Leung T M, Nieto N. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Hepatol*, 2013, 58(2): 395-398.
- [25] Cui W, Chen S L, Hu K Q. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells [J]. *Am J Transl Res*, 2010, 2: 95-104.
- [26] Crozier T, Stalmach A, Lean M, *et al.* Espresso coffees, caffeine and chlorogenic acid intake: Potential health implications [J]. *Food Funct*, 2012, 3(1): 30-33.