

泽泻提取物改善游离脂肪酸诱导的 HepG2 脂肪变性细胞模型的脂质代谢及氧化应激异常

谢燕^{1,2}, 李贵平^{2,3}, 段月阳^{2,3}, 李良^{2,3}, 吕耀中^{2,3}, 温建辉^{2,3}, 曹亮^{2,3}, 李旭^{2,3}, 杨昊^{2,3,4*}, 肖伟^{2,3,4}, 王振中^{1,2,3*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023
2. 中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室, 江苏 连云港 222001
3. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001
4. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203

摘要: 目的 研究泽泻提取物 (*Alisma orientale* extract, AE) 及其 3 种主要单体成分对游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 诱导的 HepG2 脂肪变性细胞模型的脂质代谢及氧化应激异常的改善作用及机制。方法 利用 FFA (油酸-棕榈酸 2:1) 建立稳定的 HepG2 脂肪变性细胞模型, CCK-8 法测定 AE、泽泻醇 A、泽泻醇 A-23-乙酸酯及泽泻醇 A-24-乙酸酯对 HepG2 细胞的安全剂量; 在 FFA 诱导同时给予 AE (25.00、12.50、6.25 mg/L)、泽泻醇 A (50.0、25.0、12.5 μmol/L)、泽泻醇 A-23-乙酸酯 (25.00、12.50、6.25 μmol/L)、泽泻醇 A-24-乙酸酯 (50.0、25.0、12.5 μmol/L) 处理 24 h, 检测细胞内脂滴的形成情况, 利用生化试剂盒测定各组细胞内三酰甘油 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 水平, DCFH-DA 检测药物对细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成的影响, 采用试剂盒检测细胞内氧化应激关键指标丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、总谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平以及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性; 采用 Western blotting 检测过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α, PPARα)、PPAR 共激活因子-1α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1α, PGC-1α)、下游脂肪酸氧化和胆固醇代谢相关蛋白及核因子红细胞 2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 (nuclear factor red blood cell 2 associated factor 2/hemeoxygenase-1, Nrf2/HO-1) 通路蛋白表达。结果 与对照组比较, HepG2 脂肪变性细胞模型细胞内 TC、TG、ROS 及 MDA 水平显著升高 ($P < 0.001$), SOD 活性及 GSH 水平降低 ($P < 0.01$ 、 0.001); 同时, 细胞中 PPARα、PGC-1α、肉碱棕榈酰转移酶 1A (carnitine palmitoyl transferase 1A, CPT1A)、酰基辅酶 A 氧化酶 1 (acyl coenzyme A oxidase 1, ACOX1)、Nrf2 及 HO-1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。与模型组比较, AE、泽泻醇 A 及泽泻醇 A-23-乙酸酯给药组细胞内脂滴、TG 和 TC 水平显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), AE、泽泻醇 A 及泽泻醇 A-24-乙酸酯给药组细胞内 ROS 及 MDA 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001), SOD 活性和 GSH 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 各给药组细胞中 PPARα、PGC-1α、CPT1A、ACOX1、细胞色素 P450 酶 7A1 (cytochrome P450 enzyme 7A1, CYP7A1)、Nrf2 及 HO-1 蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 AE、泽泻醇 A、泽泻醇 A-23-乙酸酯及泽泻醇 A-24-乙酸酯可以改善 FFA 诱导的 HepG2 脂肪变性细胞模型的脂质代谢及氧化应激异常, 其机制可能是通过调控 PPARα 和 Nrf2/HO-1 通路, 进而促进脂肪酸氧化及胆固醇代谢, 抑制氧化应激。

关键词: 泽泻; 泽泻醇 A; 泽泻醇 A-23-乙酸酯; 泽泻醇 A-24-乙酸酯; 游离脂肪酸; 非酒精性脂肪肝; 脂质代谢; 氧化应激; 过氧化物酶体增殖物激活受体 α; 核因子红细胞 2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)06-2002-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.06.022

Alisma orientale extract alleviates lipid metabolism and oxidative stress abnormalities in free fatty acid-induced HepG2 steatosis cell model

XIE Yan^{1,2}, LI Guiping^{2,3}, DUAN Yueyang^{2,3}, LI Liang^{2,3}, LYU Yaozhong^{2,3}, WEN Jianhui^{2,3}, CAO Liang^{2,3}, LI Xu^{2,3}, YANG Hao^{2,3,4}, XIAO Wei^{2,3,4}, WANG Zhenzhong^{1,2,3}

收稿日期: 2023-11-14

基金项目: 江苏省工信厅工业和信息产业转型升级专项-多组分中药研究关键技术

作者简介: 谢燕, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药学。E-mail: Xieyan9889@163.com

*通信作者: 王振中, 男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药新药研发及应用研究。E-mail: kyzywzz@163.com

杨昊, 男, 主管药师, 研究方向为中药药理及毒理研究。E-mail: redpriest2@outlook.com

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China
2. State Key Laboratory on Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture, Lianyungang 222001, China
3. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China
4. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To explore the ameliorative effect and mechanisms of *Alisma orientale* extract (AE) and its three primary components on lipid metabolism abnormalities and oxidative stress in free fatty acids (FFA)-induced HepG2 steatosis cell model. **Methods** A HepG2 steatosis cell model was established using FFA [oleic acid-palmitic acid (2 : 1)]. Safe dosages of AE, alisol A, alisol A-23-acetate, and alisol A-24-acetate for HepG2 cells were determined using CCK-8 kit. Simultaneously administering AE (25.00, 12.50, 6.25 mg/L), alisol A (50.0, 25.0, 12.5 $\mu\text{mol/L}$), alisol A-23-acetate (25.00, 12.50, 6.25 $\mu\text{mol/L}$), and alisol A-24-acetate (50.0, 25.0, 12.5 $\mu\text{mol/L}$) treatment for 24 h under FFA induction, the formation of intracellular lipid droplets was detected; Levels of triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) were assessed using biochemical kits. DCFH-DA assay was utilized to measure intracellular reactive oxygen species (ROS) generation. Malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) levels and superoxide dismutase (SOD) activity as indicators of oxidative stress, were also determined. Western blotting was employed to detect the expressions of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), PPAR coactivator-1 α (PGC-1 α), and proteins involved in fatty acid oxidation, cholesterol metabolism, and nuclear factor erythrocyte 2-associated factor 2/heme oxygenase-1 (Nrf2/HO-1) pathway. **Results** Compared with control group, HepG2 steatosis cell model exhibited significantly increased intracellular TC, TG, ROS production and MDA levels ($P < 0.001$), alongside reduced SOD activity and GSH level ($P < 0.01, 0.001$). There was also a decrease in PPAR α , PGC-1 α , carnitine palmitoyl transferase 1A (CPT1A), acyl coenzyme A oxidase 1 (ACOX1), Nrf2 and HO-1 protein expressions ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Compared with model group, AE, alisol A and alisol A-23-acetate led to a significant reduction in intracellular lipid droplets, TG, and TC levels ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); AE, alisol A and alisol A-24-acetate decreased ROS and MDA levels ($P < 0.05, 0.001$), increased SOD activity and GSH level ($P < 0.05, 0.01$). Furthermore, the expression levels of PPAR α , PGC-1 α , CPT1A, ACOX1, cytochrome P450 enzyme 7A1 (CYP7A1), Nrf2, and HO-1 proteins were significantly upregulated in each administration group ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** AE, alisol A, alisol A-23-acetate and alisol A-24-acetate effectively mitigate lipid metabolism abnormalities and oxidative stress in FFA-induced HepG2 steatosis cell model. The mechanism maybe involve modulation of PPAR α and Nrf2/HO-1 pathways, thus enhancing the fatty acid oxidation and cholesterol metabolism, and reducing oxidative stress.

Key words: *Alisma orientale* (Sam.) Juzep.; alisol A; alisol A-23-acetate; alisol A-24-acetate; free fatty acid; non-alcoholic fatty liver disease; lipid metabolism; oxidative stress; peroxisome proliferator-activated receptor α ; nuclear factor erythrocyte 2-associated factor 2/heme oxygenase-1 pathway

非酒精性脂肪肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种以肝细胞内脂质过度沉积为主要病理特征的代谢紊乱性疾病^[1-2]。NAFLD 的高危因素包括不良生活习惯、肥胖、糖尿病和不合理膳食结构等^[3]。近几十年来随着亚洲地区经济的快速增长和城市化推动, 导致其患病率随着饮食和生活方式的变化不断增加。据统计, 我国 NAFLD 的成人患病率为 29%, 为 4 年前患病率的 2 倍^[4]。NAFLD 的晚期形式为非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 并可进一步发展为肝纤维化、肝硬化甚至肝细胞癌。目前 NAFLD 的治疗手段仅限于生活方式的改变, 临床尚未有获批的上市治疗药物和方法^[5-6]。

NAFLD 是一种由胰岛素抵抗、脂毒性和氧化应激等多种因素共同导致的疾病, 对其所涉及的机

制尚不明确^[7]。过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α) 是调节糖脂代谢和能量代谢的关键受体^[8], 大量研究发现其与 NAFLD 疾病进展相关, NAFLD 患者肝脏中 PPAR α 蛋白表达水平和活性下降, 下降程度与疾病严重程度和内脏脂肪蓄积量显著正相关^[9], 肝脏 PPAR α 特异性敲除的模型小鼠在高脂诱导后肝脏炎症和血清中总胆固醇 (total cholesterol, TC) 含量较对照组小鼠明显增加^[10]。双重 PPAR α/γ 激动剂 Saroglitazar 在 NAFLD/NASH 受试者治疗中显示可减少肝细胞脂肪变性, 改善胰岛素抵抗和肝酶水平异常, 从而减少肝损伤^[11]。PPAR α 或是 NAFLD 治疗的潜在靶点。

当前临床上越来越多地将中医药作为补充及替代疗法对 NAFLD 进行干预^[12-13]。泽泻作为临床常

用药, 在传统中医中有着悠久的历史, 其性寒味甘, 具有利水渗湿、化浊调脂和去痰饮湿热的作⤵用^[14]。现代临床研究表明, 其对慢性代谢性疾病如高血脂、糖尿病、脂肪肝等具有一定的疗效^[15-17], 泽泻的三萜类活性成分如泽泻 A-24-乙酸酯和泽泻 B-23-乙酸酯也被发现具有抗 NAFLD 活性, 其作用机制可能部分与脂联素或核受体法尼醇 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 的激活有关^[18-19]。本课题组前期在泽泻药材中调血脂活性部位的筛选研究中发现, 泽泻醇 A、泽泻醇 A-23-乙酸酯和泽泻醇 A-24-乙酸酯是泽泻发挥调血脂作用的主要活性成分。在此基础上, 经过一系列的工艺考察和优化, 得到了以泽泻醇 A、泽泻醇 A-23-乙酸酯和泽泻醇 A-24-乙酸酯为主要成分的泽泻提取物 (*Alisma orientale* extract, AE)^[20]。本研究以游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 诱导建立 HepG2 脂肪变性细胞模型, 考察 AE 及其 3 种主要单体成分对 HepG2 脂肪变性细胞模型的改善作用及作用机制, 以期为相关新药开发奠定基础。

1 材料

1.1 细胞株

HepG2 细胞购自浙江美森细胞有限公司。

1.2 药材

泽泻由江苏康缘药业股份有限公司提供, 经连云港康济大药房连锁有限公司吴舟执业药师鉴定为泽泻科植物泽泻 *A. orientalis* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎。

1.3 药品与试剂

泽泻醇 A (质量分数 99.22%, 批号 149027)、泽泻醇 A-24-乙酸酯 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 150961) 购自美国 MCE 公司; 泽泻醇 A-23-乙酸酯 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 CF9236)、细胞色素 P450 酶 7A1 (cytochrome P450 enzyme 7A1, CYP7A1) 抗体 (批号 AC7948) 购自美国 Biorbyt 公司; 胎牛血清 (批号 2059458CP)、0.25%胰酶 (批号 2465621)、DMEM 高糖培养基 (批号 20220928) 购自美国 Gibco 公司; 即用型 PBS 片剂 (批号 J103KA7999) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 油酸钠 (批号 921V038)、棕榈酸钠 (批号 924V021)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA, 批号 1122G022)、油红 O 溶液 (批号 SLCK1135) 购自美国 Sigma 公司; 增强型 CCK-8 试剂盒 (批号 12142220230519)、增强型 BCA 蛋白检测试剂盒 (批号 20221101)、活

性 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (批号 060722220624) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 三酰甘油 (triglyceride, TG) 检测试剂盒 (批号 20211112)、TC 检测试剂盒 (批号 20211112)、总谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 检测试剂盒 (批号 20230918) 购自南京建成生物有限公司; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 1026786-4)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 1032673-1)、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 抗体 (批号 1011567-2)、重组酰基辅酶 A 氧化酶 1 (acyl coenzyme A oxidase 1, ACOX1) 抗体 (批号 1032699-13)、PPAR α 抗体 (批号 1012132-1) 购自艾博抗 (上海) 贸易有限公司; PPAR 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α , PGC-1 α) 抗体 (批号 5)、肉碱棕榈酰转移酶 1A (carnitine palmitoyl transferase 1A, CPT1A) 抗体 (批号 1)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 30) 购自美国 CST 公司; 核因子红细胞 2 相关因子 2 (nuclear factor erythrocyte 2-associated factor 2, Nrf2) 抗体 (批号 YD3883204) 购自美国 Invitrogen 公司。

1.4 仪器

MS1003S 型分析天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; 371 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Flex station 3 型多功能酶标仪 [美谷分子仪器 (上海) 有限公司]; SCIENTZ-IIID 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); Power PacTM HC 型电泳仪、Trans-blot SD 型半干转膜仪、Universal HoodII 型凝胶成像发光系统 (美国 Bio-Rad 公司); 5810R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); IX73 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 AE 的制备

将泽泻干燥块茎粉碎, 加入 80%乙醇, 加热回流 1.5 h 萃取 2 次, 滤过, 将提取物减压浓缩后加入 60%乙醇-浓硫酸混合物并回流溶液, 将溶液冷却至 4 $^{\circ}\text{C}$, 24 h 后加入 NaOH 调节 pH 值至 5~6, 加入去离子水制成含乙醇量 40%的溶液, 用 DM130 大孔吸附树脂填充色谱柱, 45%~55%乙醇洗脱, 收集洗脱液后浓缩干燥, 将样品溶于石油醚-醋酸乙酯溶剂, 浓缩并在 70%下真空干燥 72 h, 即得 AE 粉末。采用配备二极管阵列检测器的反相高效液相色谱外

标法对 AE 的 3 种主要成分含量进行测定。监测仪的波长为 235 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C。

2.2 细胞培养

HepG2 细胞用含 10%胎牛血清及 1%青霉素-链霉素溶液的高糖 DMEM 培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。

2.3 HepG2 脂肪变性细胞模型建立

取对数生长期的 HepG2 细胞, 以 2×10^5 /孔接种于 6 孔板, 细胞贴壁后, 加入不同浓度的 FFA (油酸-棕榈酸 2:1) 造模剂 1 mL, 对照组加入 1 mL DMEM 完全培养基继续培养, 37 °C 培养箱孵育 24 h 后, 油红染色评估细胞内脂质蓄积量。

2.4 CCK-8 法检测 FFA、AE 及其主要单体成分对 HepG2 细胞活力的影响

取对数生长期的 HepG2 细胞, 以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板, 细胞贴壁后加入含 FFA (0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 mmol/L)、AE (0.781、1.563、3.125、6.250、12.500、50.000、100.000 mg/L)、泽泻醇 A (0.781、1.563、3.125、6.250、12.500、50.000、100.000 μmol/L)、泽泻醇 A-23-乙酸酯(0.781、1.563、3.125、6.250、12.500、50.000、100.000 μmol/L)、泽泻醇 A-24-乙酸酯 (0.781、1.563、3.125、6.250、12.500、50.000、100.000 μmol/L) 的 DMEM 完全培养基, 另设置对照组 (不含药物) 和空白组 (不接种细胞不含药物)。每组 3 个复孔, 孵育 24 h, 每孔加入 10 μL 的 CCK8 试剂, 孵育 2 h 后于 450 nm 处检测吸光度 (*A*) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.5 细胞内 TC、TG 含量测定

按“2.3”项方法诱导 HepG2 脂肪变性细胞模型。在诱导同时加入 AE (25.00、12.50、6.25 mg/L)、泽泻醇 A (50.0、25.0、12.5 μmol/L)、泽泻醇 A-23-乙酸酯 (25.00、12.50、6.25 μmol/L)、泽泻醇 A-24-乙酸酯 (50.0、25.0、12.5 μmol/L) 对细胞进行干预, 另设置不含药物的对照组, 孵育 24 h 后, 按照试剂盒说明书检测各组细胞内 TC、TG 含量。

2.6 细胞油红 O 染色

按照“2.5”项方法对细胞进行给药, 孵育完成后, 弃去培养基, 用冷 PBS 清洗 2 次; 弃去 PBS, 加入 4%多聚甲醛, 室温固定 30 min; 弃去多聚甲醛, 用 ddH₂O 润洗 3 次, 加入 60%异丙醇静置 1~2 min; 弃去异丙醇, 每孔加入 2 mL 油红工作液,

避光染色 20 min; 弃去染液, ddH₂O 清洗至水颜色变透明。加入少量 ddH₂O 后置于倒置显微镜下拍照, 随机选取 3 个视野, 用 Image J 软件对脂滴面积进行统计。

2.7 细胞内 ROS 水平测定

按照“2.5”项方法对细胞进行处理, 孵育完成后, 弃去培养基, PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 1 ml DCFH-DA 探针溶液, 37 °C 避光孵育 20 min, 无血清 DMEM 培养基洗涤 3 次, 荧光显微镜下观察染色情况并拍照, 随机选取 5 个视野, 用 Image J 软件对荧光强度进行统计。

2.8 细胞内 MDA、GSH 含量及 SOD 活性测定

按照“2.5”项方法对细胞进行给药, 孵育完成后, 按照试剂盒说明书对细胞内 MDA、GSH 含量及 SOD 活性进行检测。

2.9 Western blotting 检测 PPAR α 、PGC-1 α 、CPT1 α 、ACOX1 及 CYP7A1 蛋白表达

按照“2.5”项方法对细胞进行给药, 孵育完成后, 冷 PBS 洗 2 次, 弃去 PBS, 每孔加入 RIPA 裂解液 100 μL, 冰上裂解 20 min, 收集细胞总蛋白, 4 °C、14 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。蛋白样品经 4%~20%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, TBST 洗涤 3 次, 5%脱脂牛奶封闭 2 h, 分别加入 β -Tubulin (1:1 000)、PPAR α (1:1 000)、PGC-1 α (1:1 000)、CPT1 α (1:1 000)、ACOX1 (1:1 000)、CYP7A1 (1:1 000)、Nrf2 (1:1 000) 及 HO-1 (1:1 000) 抗体, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 二抗 (1:10 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 加入 ECL 显影液, 于 Chemi Doc XRS 系统显影并拍照, Image J 软件统计灰度值。

2.10 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism 软件对数据进行分析, 组间差异选择单因素方差分析。

3 结果

3.1 AE 的质控

如图 1 所示, 经测定 AE 粉末中泽泻醇 A、泽泻醇 A-24-乙酸酯和泽泻醇 A-23-乙酸酯 3 种活性化合物的总质量分数为 85.83%。

3.2 不同剂量 FFA 对 HepG2 细胞脂质蓄积的影响

如图 2 所示, 对照组几乎观察不到明显的红色脂滴, 随着造模剂浓度从 0.5 mmol/L 升高至 1.5 mmol/L, 红色脂滴的数量逐渐增加, 且融合形成大

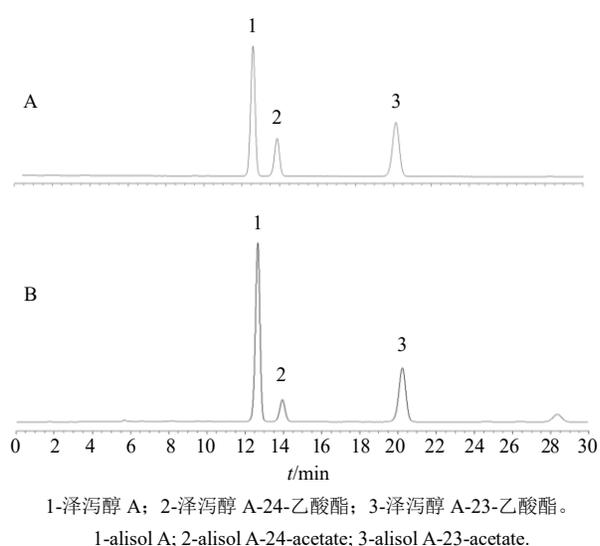


图 1 AE (A) 及对对照品溶液 (B) 的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC of AE (A) and reference substances solution (B)

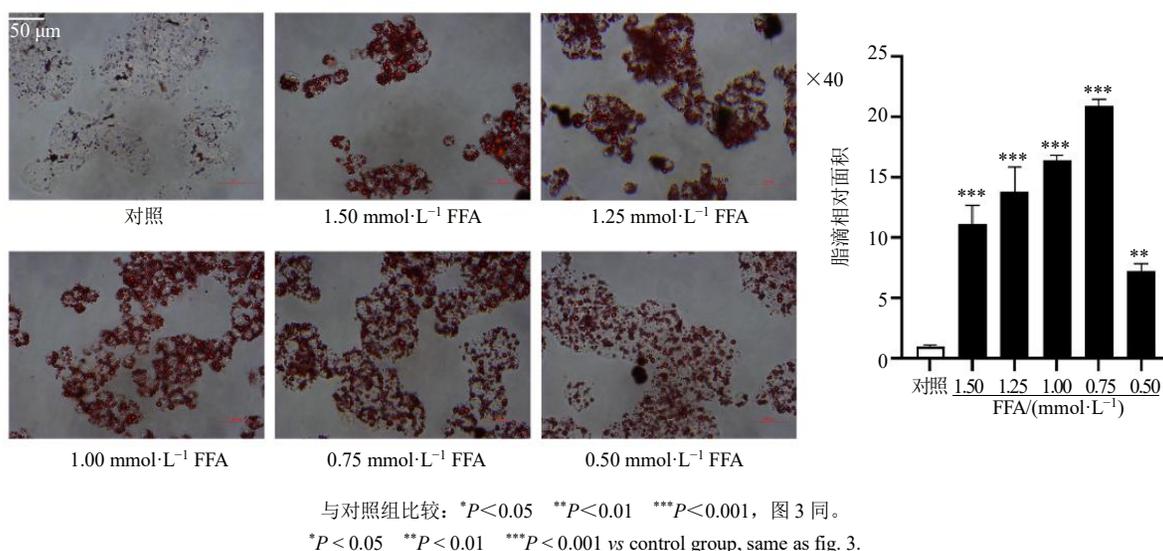


图 2 不同剂量 FFA 对 HepG2 细胞脂质蓄积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Effects of different doses of FFA on lipid accumulation in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 AE 及其单体化合物对 HepG2 细胞内 TC、TG 含量的影响

如图 4 所示,与对照组比较,模型组细胞内 TC、TG 水平均显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, AE (25 mg/L)、泽泻醇 A (50、25 μmol/L)、泽泻醇 A-23-乙酸酯 (25.0、12.5 μmol/L) 和泽泻醇 A-24-乙酸酯 (50 μmol/L) 给药组细胞内 TC 水平均显著降低 ($P < 0.05、0.01、0.001$), AE (25 mg/L)、泽泻醇 A (50、25 μmol/L) 和泽泻醇 A-23-乙酸酯 (25 μmol/L) 给药组细胞内 TG 水平显著降低 ($P < 0.05、0.001$)。

滴脂滴。利用 Image J 软件进行定量分析并通过 GraphPad 软件进行组间差异比较后发现,与对照组比较,各剂量 FFA 诱导后的脂滴量均具有显著差异 ($P < 0.01、0.001$)。

3.3 FFA、AE 及其单体化合物对 HepG2 细胞活力的影响

如图 3 所示,与对照组比较, FFA、AE、泽泻醇 A、泽泻醇 A-23-乙酸酯和泽泻醇 A-24-乙酸酯分别在 0.75 mmol/L、25 mg/L、50 μmol/L、25 μmol/L 和 50 μmol/L 及以下浓度对细胞活力无明显影响,结合“3.2”项的实验结果,选择 0.75mmol/L 的 FFA 作为造模剂量, AE (25.00、12.50、6.25mg/L)、泽泻醇 A (50、25、12.50 μmol/L)、泽泻醇 A-23-乙酸酯 (25.00、12.50、6.25μmol/L) 和泽泻醇 A-24-乙酸酯 (50.0、25.0、12.5 μmol/L) 作为给药剂量进行后续实验。

3.5 AE 及其单体化合物对 HepG2 细胞脂质蓄积的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组 HepG2 细胞中出现大量红色脂滴 ($P < 0.001$),表明模型构建成功。与模型组比较,各给药组细胞内红色脂滴含量均降低,且 AE (25 mg/L)、泽泻醇 A (50、25 μmol/L) 和泽泻醇 A-23-乙酸酯 (25.0、12.5 μmol/L) 给药组细胞中脂滴含量与模型组存在显著性差异 ($P < 0.01、0.001$)。结合“3.4”项结果,后续实验选用给药剂量为 AE(25 mg/L)、泽泻醇 A(25 μmol/L)、泽泻醇 A-23-乙酸酯 (12.5 μmol/L) 及泽泻醇 A-24-

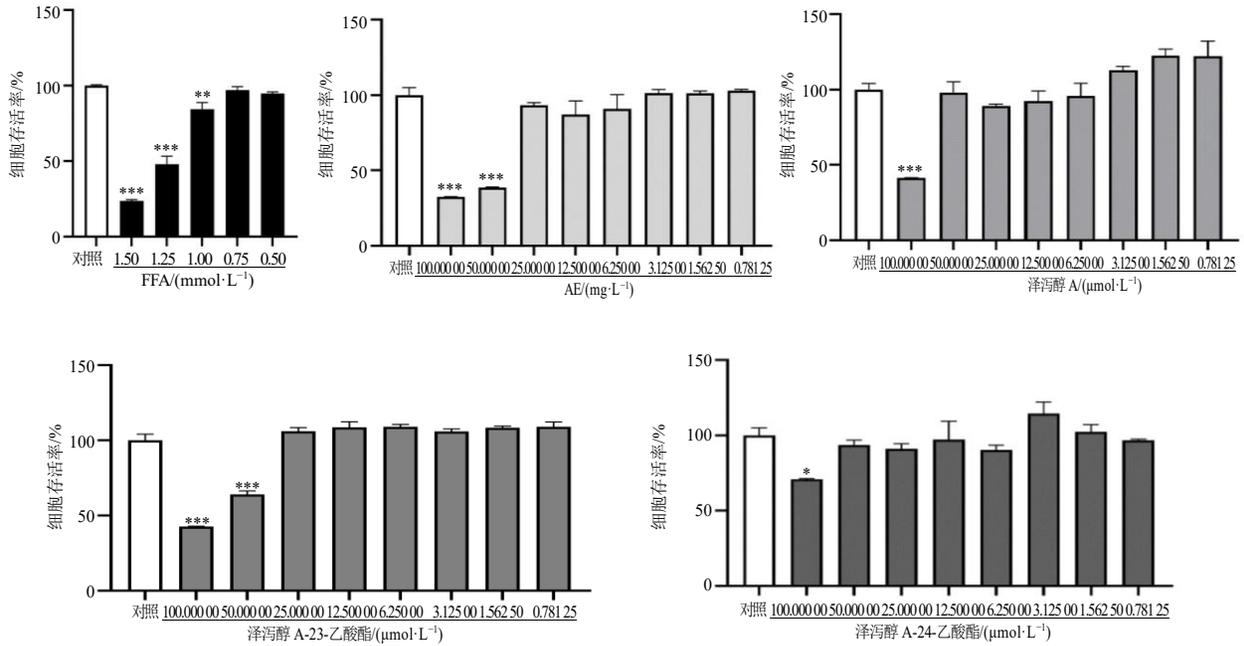
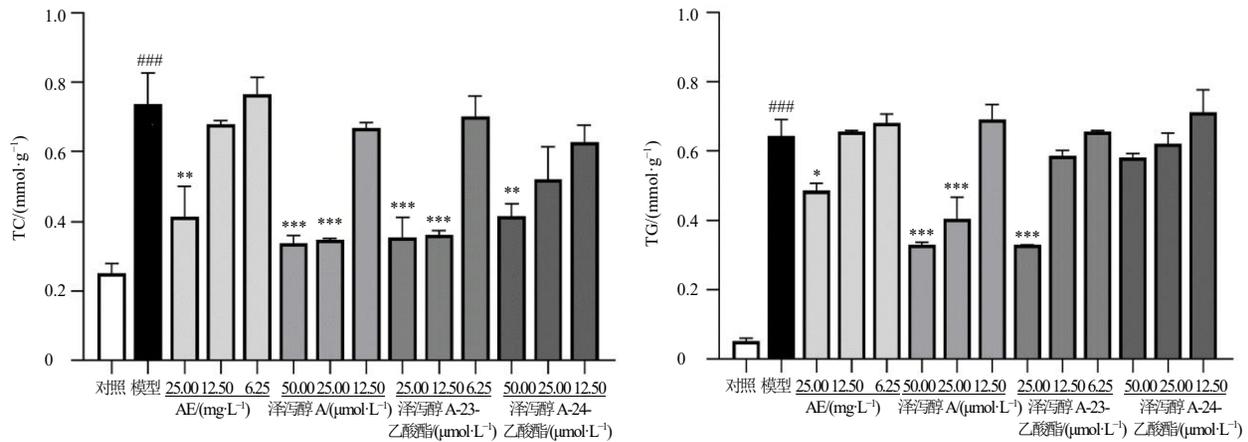


图3 FFA、AE、泽泻醇 A、泽泻醇 A-23-乙酸酯、泽泻醇 A-24-乙酸酯对 HepG2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of FFA, AE, alisol A, alisol A-23-acetate, alisol A-24-acetate on survival rate of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



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

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图4 AE、泽泻醇 A、泽泻醇 A-23-乙酸酯、泽泻醇 A-24-乙酸酯对 HepG2 细胞内 TC、TG 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of AE, alisol A, alisol A-23-acetate, alisol A-24-acetate on TC and TG contents in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

乙酸酯 (50 $\mu\text{mol/L}$)。

3.6 AE 及其单体化合物对 HepG2 细胞内 ROS 水平的影响

如图 6 所示,与对照组比较,模型组细胞中 ROS 水平显著升高 ($P < 0.001$);与模型组比较,AE、泽泻醇 A 及泽泻醇 A-24-乙酸酯给药组细胞内 ROS 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.001$),泽泻醇 A-23-乙酸酯给药组细胞内 ROS 水平也出现降低,但与模型组相

比无统计学意义。

3.7 AE 及其单体化合物对 HepG2 细胞内 MDA、GSH 水平及 SOD 活性的影响

如图 7 所示,与对照组比较,模型组细胞内 MDA 水平显著升高 ($P < 0.001$),SOD 活性及 GSH 水平均显著降低 ($P < 0.01, 0.001$);与模型组比较,各给药组细胞内 MDA 水平均显著下降 ($P < 0.001$),AE、泽泻醇 A 给药组细胞内 SOD 活性均显著升高

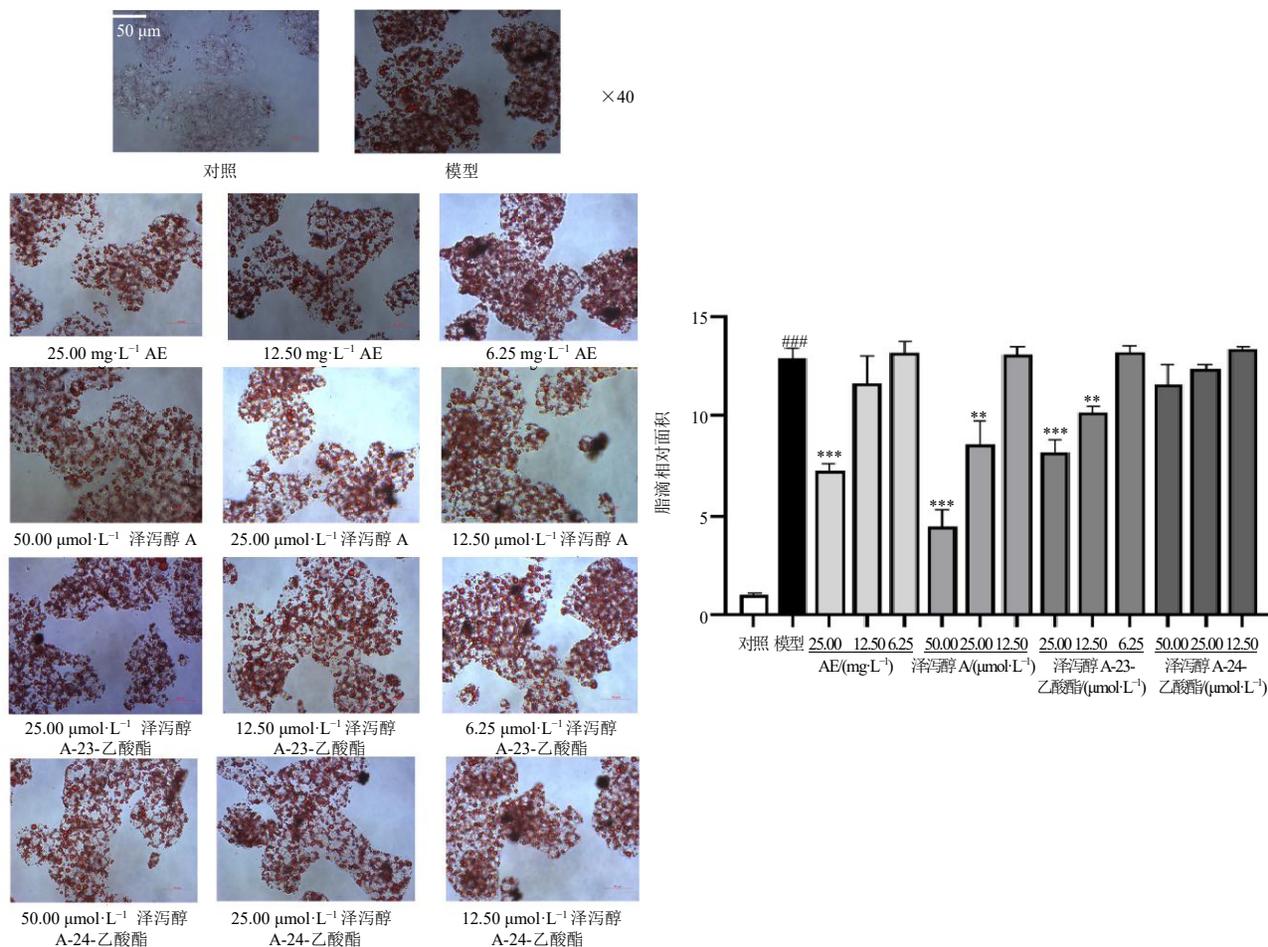


图 5 AE、泽泻醇 A、泽泻醇 A-23-乙酸酯、泽泻醇 A-24-乙酸酯对 HepG2 细胞脂滴蓄积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of AE, alisol A, alisol A-23-acetate, alisol A-24-acetate on lipid accumulation in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

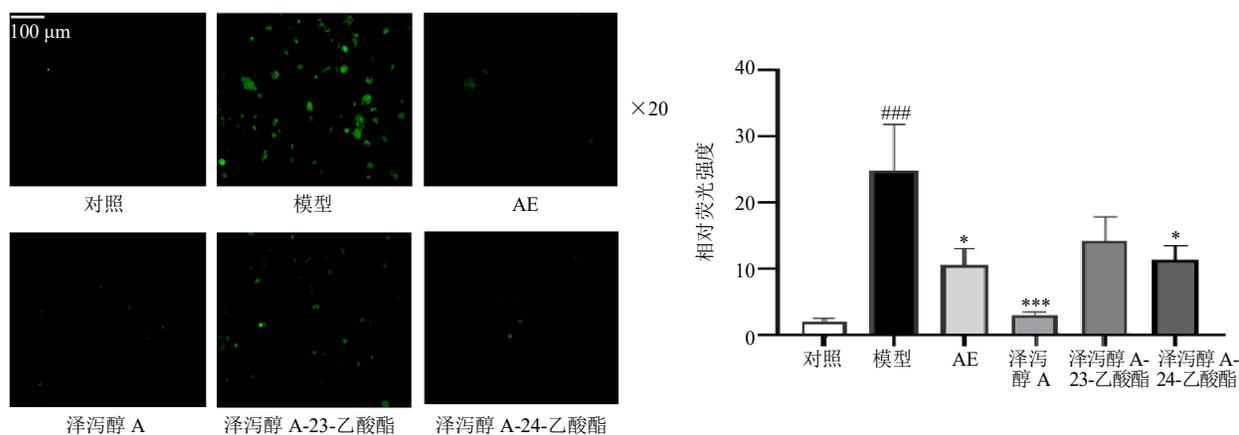


图 6 AE、泽泻醇 A、泽泻醇 A-23-乙酸酯、泽泻醇 A-24-乙酸酯对 HepG2 细胞内 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of AE, alisol A, alisol A-23-acetate, alisol A-24-acetate on ROS level in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

($P < 0.05$), AE、泽泻醇 A 及泽泻醇 A-24-乙酸酯给药组细胞内 GSH 水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.8 AE 及其单体化合物对细胞内脂质氧化及胆固醇代谢相关蛋白表达的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组细胞中

PPAR α 、PGC-1 α 、CPT1A 及 ACOX1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); 与模型组比较, AE、泽泻醇 A 及泽泻醇 A-23-乙酸酯给药组细胞中 PPAR α 、PGC-1 α 及 ACOX1 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 泽泻醇 A 及泽泻醇 A-

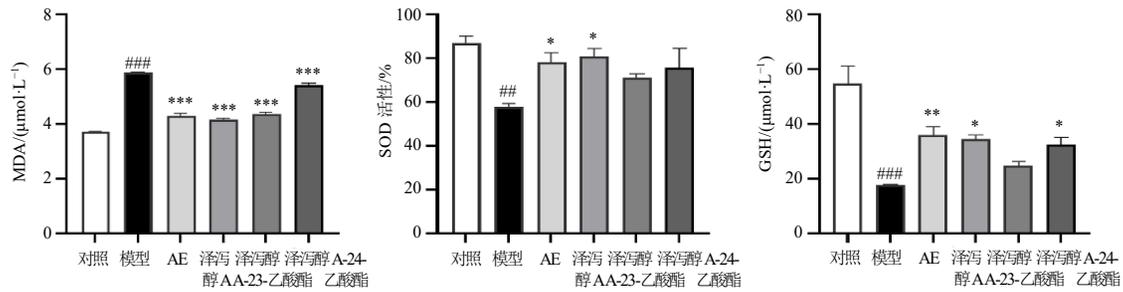
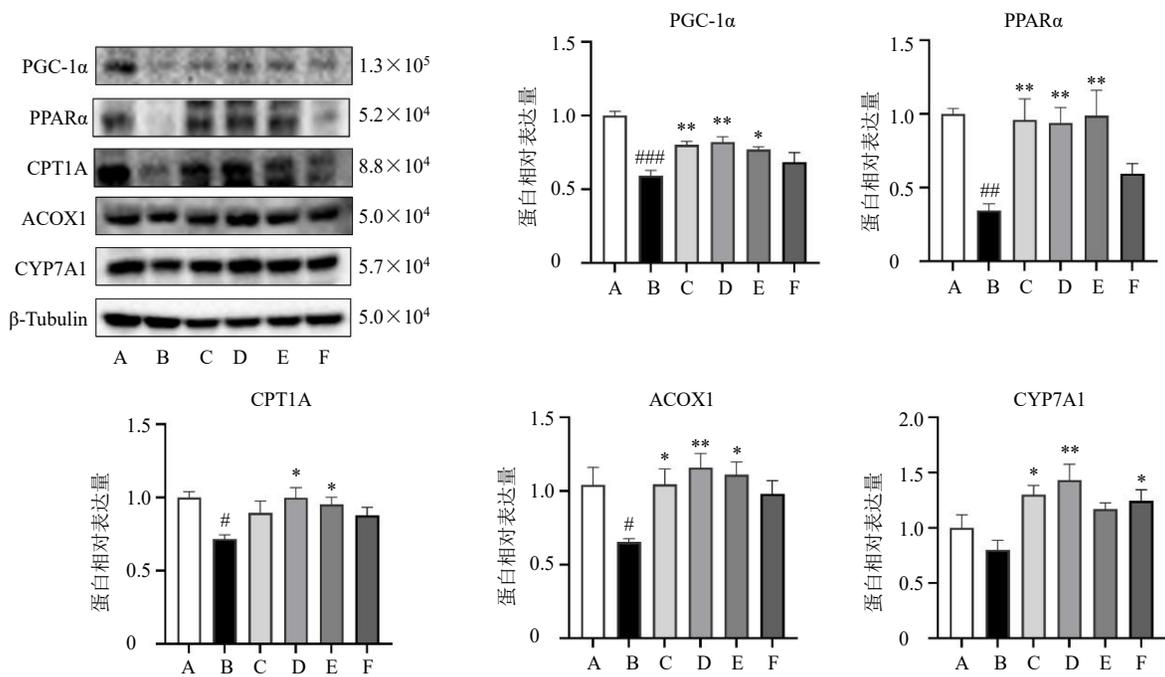


图 7 AE、泽泻醇 A、泽泻醇 A-23-乙酸酯、泽泻醇 A-24-乙酸酯对 HepG2 细胞内 MDA、GSH 水平及 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of AE, alisol A, alisol A-23-acetate, alisol A-24-acetate on MDA, GSH levels and SOD activity in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-对照组; B-模型组; C-AE 组; D-泽泻醇 A 组; E-泽泻醇 A-23-乙酸酯组; F-泽泻醇 A-24-乙酸酯组, 图 9 同。

A-control group; B-model group; C-AE group; D-alisol A group; E-alisol A-23-acetate group; F-alisol A-24-acetate group, same as fig. 9.

图 8 AE、泽泻醇 A、泽泻醇 A-23-乙酸酯、泽泻醇 A-24-乙酸酯对 HepG2 细胞中 PGC-1α、PPARα、CPT1A、ACOX1 及 CYP7A1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effects of AE, alisol A, alisol A-23-acetate, alisol A-24-acetate on PGC-1α, PPARα, CPT1A, ACOX1 and CYP7A1 protein expressions in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

23-乙酸酯给药组细胞中 CPT1A 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), AE、泽泻醇 A 及泽泻醇 A-24-乙酸酯给药组细胞中 CYP7A1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.9 AE 及其单体化合物对细胞内氧化应激相关通路 Nrf2/HO-1 蛋白表达的影响

如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组细胞中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 各给药组细胞中 Nrf2、HO-1

蛋白表达水平均呈上升趋势, 其中 AE 及泽泻醇 A 给药组 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达均显著上调 ($P < 0.05, 0.01$)。

4 讨论

NAFLD 是一种由脂质代谢失衡、胰岛素抵抗和氧化应激异常等多因素相结合导致的复杂性肝病, 现已成为慢性肝病的主要原因^[21]。现代研究发现泽泻提取物能改善 NAFLD 的中医病机, 有效调节肝脏的糖脂代谢, 控制氧化应激、炎症和纤维化

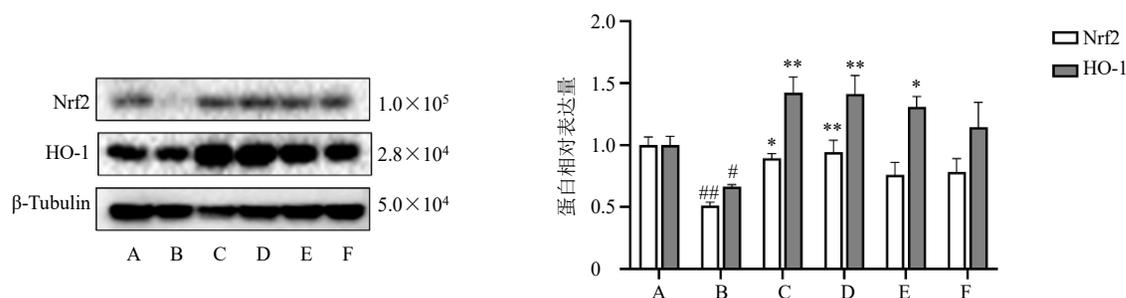


图9 AE、泽泻醇 A、泽泻醇 A-23-乙酸酯、泽泻醇 A-24-乙酸酯对 HepG2 细胞中 Nrf2/HO-1 蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effects of AE, alisol A, alisol A-23-acetate, alisol A-24-acetate on Nrf2/HO-1 protein expressions in HepG2 cells
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

等肝损伤^[22-23]。本研究使用的 AE 的主要单体成分为泽泻醇 A、泽泻醇 A-23-乙酸酯和泽泻醇 A-24-乙酸酯。泽泻醇 A 可通过提高脂蛋白脂酶活性从而降低高脂血症患者血浆中 TG、TC 水平^[24]。泽泻醇 A-23-乙酸酯能刺激将 TC 转化为胆汁酸的关键蛋白 CYP7A1 的转录，有助于改善高脂血症和肝脏脂肪变性^[25]。泽泻醇 A-24-乙酸酯降低了 NASH 小鼠模型肝组织中 ROS 水平，通过刺激小鼠肝脏和人肝星状细胞的自噬，从而抑制氧化应激来改善 NASH^[19]。以上研究结果进一步证明了 AE 中的泽泻醇 A 及其衍生物可能是发挥抗 NAFLD 作用的主要活性成分。FFA 是由棕榈酸和油酸组成的一种常用的肝脂肪变性造模剂，利用过量的棕榈酸或 FFA 刺激 HepG2 细胞后，细胞脂毒性增加，细胞脂质氧化相关蛋白 PPAR α 及 ACOX1 等表达水平降低，HepG2 细胞会出现严重的脂质蓄积并通常伴随着显著的氧化应激异常^[26-28]。因此本实验通过 0.75 mmol/L FFA 诱导来构建稳定的 HepG2 脂肪变性细胞模型，用于评价 AE 及其主要单体化合物的药效和作用机制。

肝脏作为重要的代谢器官，在脂质的消化、吸收、运输、代谢和合成中起着不可或缺的作用^[29]。在生理条件下，肝脏摄取的脂肪酸通常被转运至线粒体或过氧化物酶体进行 β 氧化为机体供能，仅一小部分脂肪酸转化为 TG。因此肝脏的 TG 储存量通常极少^[30]。同时，肝脏可通过 CYP7A1 等关键酶将 TC 转化为胆汁酸，防止 TC 及毒性代谢物的累积，维持体内的脂质代谢平衡^[31]。当机体长期处于高脂水平下时，肝脏脂质代谢平衡失调，氧化途径受损，TG、TC 在肝细胞内大量蓄积，从而导致 NAFLD 的发生^[32]。本研究发现，利用造模剂 FFA 刺激 HepG2 细胞后，细胞内出现大量脂滴，TC、TG 含

量显著上升。与模型组相比，AE、泽泻醇 A、泽泻醇 A-23-乙酸酯和泽泻醇 A-24-乙酸酯可不同程度地抑制细胞内脂滴数量，并明显降低 TC、TG 水平，表明 AE 可以改善 FFA 造成 HepG2 脂肪变细胞模型的脂质蓄积。

PPARs，是配体激活转录因子的核受体超家族，由 3 种亚型组成，其中 PPAR α 主要存在于肝脏中，可在共激活因子 PGC1 α 协同下调节胆固醇和脂肪酸代谢^[33]。PPAR α 可以减少肝脏中富含 TG 的脂质胆固醇以及 TG 的积累，通过影响下游脂肪酸氧化基因和胆固醇代谢基等，调节脂肪酸运输，促进 β -氧化和胆固醇分解^[34]。脂肪酸 β -氧化主要发生于线粒体，肝细胞脂肪酸活化成脂酰辅酶 A 后通过 CPT1A 转运至线粒体中进行氧化^[35]，是体内脂肪酸氧化的主要方式之一，由于线粒体缺乏氧化极长链脂肪酸的能力，这些脂肪酸会优先通过过氧化物酶体 β -氧化进行代谢，此途径中的限速酶是 ACOX1^[36]。此外，已有研究证实 NAFLD 患者血清中的 TC 比率与其病理评分显著正相关，将胆固醇转化为胆汁酸，可以防止胆固醇及其毒性代谢物的积累，是肝细胞中胆固醇清除的重要途径，而 PPAR α 参与胆固醇代谢过程中的关键酶 CYP7A1 的调节^[37]。本研究发现，与模型组比较，AE 及其单体成分给药组细胞内 PPAR α 、PGC1 α 、CPT1A、ACOX1 及 CYP7A1 蛋白表达上调，提示 AE 可能通过影响 PPAR α 通路改善 HepG2 脂肪变性细胞的脂质代谢失衡。

当过量 FFA 诱导 HepG2 细胞发生脂肪变性时，肝细胞内脂滴蓄积，脂质 β 氧化增加了呼吸链电子，导致过量 ROS 生成^[38-39]。过量 ROS 会诱导 DNA 氧化损伤和各种细胞毒性相关蛋白的异常表达，毒性

代谢产物MDA大量蓄积,抗氧化因子SOD和GSH活性降低,从而造成肝细胞线粒体功能损伤,进一步加重肝细胞脂肪变性^[40-41]。本研究发现AE、泽泻醇A和泽泻醇A-24-乙酸酯具有良好的抗氧化能力,显著降低ROS和MDA的水平,同时提高SOD活性和GSH水平,提示AE通过提高抗氧化水平抑制FFA引起的氧化应激异常,从而缓解脂肪变性。

细胞氧化应激的主调控蛋白为Nrf2,生理条件下,其与Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白(Kelch-like epichlorohydrin-related proteins, Keap1)结合,在胞质中处于非活性状态。当细胞被ROS刺激后,Nrf2从聚合体解偶联并转运到细胞核,与Maf蛋白形成异二聚体后与核内抗氧化反应元件(antioxidant reaction elements, AREs)结合,启动后续转录过程,激活下游靶基因,抗氧化应激,减少肝损伤^[27,42]。为了确定Nrf2是否参与了AE改善HepG2脂肪变性细胞模型氧化应激异常,本研究检测了Nrf2/HO-1通路的蛋白表达情况,结果表明AE及其单体化合物中的泽泻醇A显著恢复了由于过量FFA导致的Nrf2/HO-1蛋白表达的病理性降低,这表明AE可能通过激活Nrf2/HO-1通路来改善氧化应激异常,泽泻醇A和泽泻醇A-24-乙酸酯可能是AE发挥抗氧化能力的主要活性成分。已有研究表明PPAR α 激动剂可以通过上调PPAR α 蛋白表达刺激Nrf2易位到细胞核中,促进其与ARE的结合以及AREs下游抗氧化蛋白HO-1的转录起始,从而减轻氧化应激损伤^[43]。因此,推测AE可能是通过调节PPAR α 蛋白表达,从而激活Nrf2/HO-1通路,相关机制值得进一步研究。

综上,AE及其单体化合物可能通过调节PPAR α 通路来促进脂肪酸氧化和胆固醇清除,减少肝细胞内的脂质蓄积,同时激活Nrf2/HO-1通路,抑制氧化应激,最终改善HepG2细胞脂肪变性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Powell E E, Wong V W S, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Lancet*, 2021, 397(10290): 2212-2224.
 [2] Ding M N, Zhou F, Li Y J, et al. *Cassiae Semen* improves non-alcoholic fatty liver disease through autophagy-related pathway [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(3): 421-429.
 [3] Castera L, Friedrich-Rust M, Loomba R. Noninvasive assessment of liver disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(5): 1264-1281.

[4] Fan J G, Kim S U, Wong V W S. New trends on obesity and NAFLD in Asia [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(4): 862-873.
 [5] Huang D Q, Mathurin P, Cortez-Pinto H, et al. Global epidemiology of alcohol-associated cirrhosis and HCC: Trends, projections and risk factors [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20(1): 37-49.
 [6] Huang D Q, Terrault N A, Tacke F, et al. Global epidemiology of cirrhosis-aetiology, trends and predictions [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20(6): 388-398.
 [7] Nassir F. NAFLD: Mechanisms, treatments, and biomarkers [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(6): 824.
 [8] 方伟进, 樊志强, 龚慧, 等. 酸性鞘磷脂酶对非酒精性脂肪肝病的作用及PPAR α -PGC-1 α 通路的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(1): 57-65.
 [9] Francque S, Verrijken A, Caron S, et al. PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis [J]. *J Hepatol*, 2015, 63(1): 164-173.
 [10] Badmus O O, Kipp Z A, Bates E A, et al. Loss of hepatic PPAR α in mice causes hypertension and cardiovascular disease [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2023, 325(1): R81-R95.
 [11] Gawrieh S, Noureddin M, Loo N, et al. Saroglitazar, a PPAR- α/γ agonist, for treatment of NAFLD: A randomized controlled double-blind phase 2 trial [J]. *Hepatology*, 2021, 74(4): 1809-1824.
 [12] 李云, 刘天宇, 袁恒杰, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨甘草防治非酒精性脂肪肝及肥胖的作用机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(15): 4882-4894.
 [13] 隆晓荣, 袁宁, 陶然, 等. 中医药治疗非酒精性脂肪性肝病的研究进展 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2023, 33(9): 860-864.
 [14] 韩雪. 丹参、泽泻对非酒精性脂肪肝大鼠的防治作用及其机制研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012.
 [15] 蒋元焯, 敬梦辉, 陆娟, 等. 泽泻汤联合多烯磷脂胆碱治疗非酒精性脂肪肝痰湿内阻证的临床研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(27): 2969-2971.
 [16] 龚杰, 丁岩, 干仲元, 等. 泽泻提取物对大鼠非酒精性脂肪肝的治疗作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(7): 68-76.
 [17] 周熠, 那立欣. 基于网络药理学的泽泻治疗2型糖尿病作用机制研究 [J]. *中国医药科学*, 2022, 12(1): 197-200.
 [18] Luan Z L, Huo X K, Dong P P, et al. Highly potent non-steroidal FXR agonists protostane-type triterpenoids: Structure-activity relationship and mechanism [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 182: 111652.
 [19] Wu C Q, Jing M H, Yang L J, et al. Alisol A 24-acetate ameliorates nonalcoholic steatohepatitis by inhibiting

- oxidative stress and stimulating autophagy through the AMPK/mTOR pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 291: 111-119.
- [20] 侯惠民, 程志红. 含泽泻醇 A 的组合物及其在医药上的应用: 中国, CN103054877A [P]. 2013-04-24.
- [21] Cotter T G, Rinella M. Nonalcoholic fatty liver disease 2020: The state of the disease [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(7): 1851-1864.
- [22] 王双双, 姜恒丽, 刘焯, 等. 经典名方泽泻汤的处方考证及历史沿革分析 [J]. *中医药学报*, 2023, 51(9): 91-96.
- [23] Choi E, Jang E, Lee J H. Pharmacological activities of *Alisma orientale* against nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome: Literature review [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 2943162.
- [24] Xu F, Lu C, Wu Q N, *et al.* Studies on the lipid-regulating mechanism of alisol-based compounds on lipoprotein lipase [J]. *Bioorg Chem*, 2018, 80: 347-360.
- [25] Lin H R. Triterpenes from *Alisma orientalis* act as farnesoid X receptor agonists [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(14): 4787-4792.
- [26] 阿曼古丽·艾则孜, 马红梅, 兰卫. 洋甘菊总黄酮对 HepG2 细胞脂质沉积的改善作用研究 [J]. *中国药房*, 2022, 33(11): 1306-1312.
- [27] 浦绍敏. 马家柚籽油组成特性及缓解 HepG2 细胞脂质积累与氧化应激的研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2023.
- [28] 田晓丹, 金晨, 陈志, 等. 石榴花对棕榈酸诱导的 HepG2 细胞脂质沉积的改善作用及机制研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(8): 2462-2470.
- [29] Yilmaz Y. Review article: Is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions? [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2012, 36(9): 815-823.
- [30] Cheema S K, Agellon L B. The murine and human cholesterol 7 α -hydroxylase gene promoters are differentially responsive to regulation by fatty acids mediated via peroxisome proliferator-activated receptor alpha [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(17): 12530-12536.
- [31] Ikonen E, Olkkonen V M. Intracellular cholesterol trafficking [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2023, 15(8): a041404.
- [32] Chávez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, *et al.* Bile acid control of metabolism and inflammation in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(7): 1679-1694.e3.
- [33] Browning J D, Horton J D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(2): 147-152.
- [34] 查杨, 张丰, 周洁, 等. 柠檬苦素抑制凋亡、促进自噬并通过 PPAR α 促进脂肪酸氧化代谢改善非酒精性脂肪性肝病 [J]. *药科学报*, 2023, 58(8): 2402-2414.
- [35] 张琦, 赵秋宇, 隋国媛, 等. 健脾化痰祛痰法对 ApoA-I/AMPK/CPT1A 信号通路介导的脂肪酸 β 氧化改善血脂异常的调控作用及其机制 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2022, 48(6): 1395-1402.
- [36] Harano Y, Yasui K, Toyama T, *et al.* Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, reduces hepatic steatosis and lipid peroxidation in fatty liver Shionogi mice with hereditary fatty liver [J]. *Liver Int*, 2006, 26(5): 613-620.
- [37] 李艳, 李子雯, 李利民, 等. 桑辛素通过调节胆固醇代谢改善油酸诱导的 HepG2 细胞脂质蓄积 [J/OL]. *辽宁中医杂志*, 2023: 1-12. (2023-03-06). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1128.R.20230303.1631.054.html>.
- [38] Li X Y, Wang T X, Huang X M, *et al.* Targeting ferroptosis alleviates methionine-choline deficient (MCD)-diet induced NASH by suppressing liver lipotoxicity [J]. *Liver Int*, 2020, 40(6): 1378-1394.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] Boland M L, Oldham S, Boland B B, *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis severity is defined by a failure in compensatory antioxidant capacity in the setting of mitochondrial dysfunction [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(16): 1748-1765.
- [42] 黄荣. miR-34b/miR-23a 靶向 Keap1/ULK1 调控脑缺血再灌注氧化损伤的机制研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2019.
- [43] Zhang H, Xiang D, Liu X, *et al.* PPAR α agonist relieves spinal cord injury in rats by activating Nrf2/HO-1 via the Raf-1/MEK/ERK pathway [J]. *Aging*, 2021, 13(22): 24640-24654.

[责任编辑 李亚楠]