

• 药理与临床 •

大黄酸调控血管内皮细胞糖脂代谢功能的机制研究

方慧华¹, 张一恒², 皇苏州², 陆星星², 顾栩婧², 吕高虹², 陈志鹏², 吴 丽²

1. 南京中医药大学附属医院, 江苏省中医院 药学部, 江苏 南京 210004

2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

摘要:目的 探究大黄酸调控血管内皮细胞糖脂代谢功能的机制。方法 用棕榈酸干预人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs), 随后用 2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 大黄酸处理 24 h。qRT-PCR 检测脂肪酸氧化(fatty acid oxidation, FAO)及糖酵解的关键酶[肉碱棕榈酰转移酶-1A(carnitine palmitoyltransferase-1A, *CPT-1A*)、葡萄糖转运蛋白 1(glucose transporter protein 1, *GLUT1*)、6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-双磷酸酶 3(6-phosphofructose-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3, *PFKFB3*)、己糖激酶 2(hexokinase 2, *HK2*)]的表达情况; Seahorse XF96 分析仪检测 FAO 和糖酵解水平; ELISA 法检测一氧化氮(nitric oxide, NO)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)水平; Western blotting 及免疫荧光观察一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、VEGF、*CPT-1A*、*PFKFB3* 表达情况; 利用分子对接预测大黄酸的作用靶点。给予 PPAR α 抑制剂 norathyriol、FAO 抑制剂 etomoxir、糖酵解抑制剂 3PO 进行干预, 观察大黄酸调节内皮细胞糖脂代谢功能的变化。结果 棕榈酸能显著上调 HUVECs 糖脂代谢酶 *CPT-1A*、*GLUT1*、*PFKFB3*、*HK2* 的表达($P<0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 大黄酸显著上调 *CPT-1A* 的 mRNA 表达($P<0.05$), 并显著下调 *GLUT1*、*PFKFB3*、*HK2* 的 mRNA 表达($P<0.01$)。代谢表型实验发现, 大黄酸可以促进 FAO 并抑制糖酵解, 加入 PPAR α 抑制剂后上述现象发生逆转。细胞功能评价结果显示, 大黄酸能促进血管舒张因子 NO 并抑制病理性血管生成因子 VEGF 水平($P<0.05$ 、 0.01)。分子对接发现大黄酸与 PPAR α 的亲合力较高。3PO 联用大黄酸可抑制糖酵解、促进 FAO, 可以升高 eNOS、NO 水平, 降低 VEGF 水平; 大黄酸联用 etomoxir 能抑制糖酵解及 FAO, 并恢复 eNOS、NO 水平, 降低 VEGF 水平。结论 大黄酸通过激活 PPAR α 促进 FAO 并抑制糖酵解, 进而调节血管内皮细胞 NO、VEGF 表达。

关键词: 大黄酸; 血管内皮细胞; 糖酵解; 脂肪酸氧化; PPAR α

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)17-6207-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.17.011

Mechanism of rhein on regulation of glucose and lipid metabolism in vascular endothelial cellsFANG Huihua¹, ZHANG Yiheng², HUANG Suzhou², LU Xingxing², GU Xujing², LYU Gaohong², CHEN Zhipeng², WU Li²

1. Department of Pharmacy, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210004, China

2. College of pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of rhein in regulating function of glucose and lipid metabolism in vascular endothelial cells. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was used for intervention with palmitic acid, followed by treatment with 2.5, 5.0, 10.0 $\mu\text{mol/L}$ rhein for 24 h. qRT-PCR was used to detect the expressions of fatty acid oxidation (FAO) and key enzymes of glycolysis [carnitine palmitoyltransferase-1A (*CPT-1A*), glucose transporter protein 1 (*GLUT1*), 6-phosphofructose-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (*PFKFB3*) and hexokinase 2 (*HK2*)]; Seahorse XF96 analyzer was used to detect FAO and glycolysis levels; ELISA was

收稿日期: 2025-05-19

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81873287)

作者简介: 方慧华(1982—), 男, 硕士, 副主任中药师, 研究方向为中药药理学。E-mail: 18052064980@163.com

*通信作者: 吴 丽(1976—), 女, 教授, 博士生导师, 从事中药药理学研究。E-mail: wuli@njucm.edu.cn

used to detect the levels of nitric oxide (NO) and vascular endothelial growth factor (VEGF); Western blotting and immunofluorescence were used to observe the expressions of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), VEGF, CPT1-A and PFKFB3; Molecular docking was used to predict the target of rhein. After intervened with PPAR α inhibitor norathyriol, FAO inhibitor etomoxir and glycolysis inhibitor 3PO, the changes in regulation of endothelial cell glucose and lipid metabolism function by rhein was observed. **Results** Palmitic acid could significantly up-regulate the expressions of glucose and lipid metabolism enzymes (*CPT-1A*, *GLUT1*, *PFKFB3*, *HK2*) in HUVECs ($P < 0.05$, 0.01); Compared with model group, $10.0 \mu\text{mol/L}$ rhein significantly up-regulated the mRNA expression of *CPT-1A* ($P < 0.05$), and significantly down-regulated the mRNA expressions of *GLUT1*, *PFKFB3* and *HK2* ($P < 0.01$). Metabolic phenotype experiments found that rhein could promote FAO and inhibit glycolysis, and this phenomenon was reversed after the addition of PPAR α inhibitors. The results of cellular functional evaluation showed that rhein could promote vasodilator factor NO and inhibit the level of pathological angiogenic factor VEGF ($P < 0.05$, 0.01). Molecular docking revealed a high affinity between rhein and PPAR α . The combination of 3PO and rhein could inhibit glycolysis, promote FAO, increase eNOS and NO levels, and reduce VEGF level; The combination of rhein and etomoxir could inhibit glycolysis and FAO, restore eNOS and NO levels, and reduce VEGF level. **Conclusion** Rhein promotes FAO and inhibits glycolysis by activating PPAR α , thereby regulating the expressions of NO and VEGF in vascular endothelial cells.

Key words: rhein; vascular endothelial cells; glycolysis; fatty acid oxidation; PPAR α

在有氧条件下,通过氧化磷酸化产生三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)是多数细胞的主要代谢表型,而血管内皮细胞主要通过糖酵解途径供能^[1]。这一代谢表型在保障细胞 ATP 需求的同时,还满足了血管内皮细胞增殖、迁移和血管生成的需要^[2-3]。此外,脂肪酸氧化(fatty acid oxidation, FAO)对血管内皮细胞能量代谢和功能的维持同样具有重要作用,研究显示,内皮细胞的 FAO 活跃,与三羧酸循环偶联的代谢产物主要用于脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)、DNA 的合成^[4]。特殊的糖脂代谢模式为内皮细胞活动提供了充足的能量供应,是血管功能的独立调控因素^[5-6]。

近年来,关于内皮细胞在疾病发生发展中的代谢变化规律及机制研究也取得了新的突破^[7],其中最受关注的 6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-双磷酸酶(6-phosphofructose-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase, PFKFB)家族是一类双功能酶,能同时催化果糖-2,6-二磷酸的合成和水解,显著提高糖酵解速率。目前研究认为,PFKFB 在缺氧、血流剪切力增加等条件下过表达^[8],其代谢物乳酸促进了肺动脉高压^[9]、动脉粥样硬化^[10]、糖尿病^[11]的进展,以及肝癌、直肠癌、乳腺癌等疾病的病理性血管生成^[12-13],而靶向抑制内皮细胞 PFKFB 显示了良好的治疗效果^[10,14]。同时,FAO 紊乱也会影响内皮细胞的正常功能^[15-16],干预 FAO 关键酶肉碱棕榈酰转移酶-1A(carnitine palmitoyltransferase-1A, CPT-1A),可有效抑制病理性血管生成。提示调节内皮细胞糖脂代谢是抑制血管相关性疾病的有效方法。

在初步明确调节糖脂代谢的关键环节后,另一

个重要问题就是寻找作用于内皮细胞代谢关键环节的有效药物。大黄酸是来源于大黄的主要有效成分,具有抗炎、调节免疫等作用^[17-18]。课题组前期研究发现,大黄酸入血后不仅含量高且对血管病变有明显改善作用^[19]。且已有研究发现,大黄酸也可影响肠道嘌呤代谢^[20]、控制内分泌和糖脂代谢改善胰岛素抵抗^[17]。但大黄酸是否通过调节血管内皮细胞代谢治疗血管性疾病及其相关机制尚不清楚。因此,本研究以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)为研究对象,明确大黄酸能否通过调节糖脂代谢影响血管内皮细胞功能,并寻找大黄酸调控糖脂代谢的关键靶点,为治疗代谢性血管病变提供新的见解。

1 材料

1.1 细胞

HUVECs(货号 ZQ1099)购自上海中乔新舟生物科技有限公司,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养。

1.2 药品与试剂

大黄酸(批号 19361-S240901,质量分数为 95.7%)购自上海诗丹德标准技术服务有限公司;FAO 抑制剂 etomoxir(批号 11799,质量分数为 99.40%)、糖酵解抑制剂 3PO(批号 785839,质量分数为 99.85%)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferators-activated receptor α , PPAR α)抑制剂 norathyriol(批号 244269,质量分数为 99.83%)、棕榈酸(批号 524254,质量分数为 99.76%)购自美国 MedChemExpress 公司;CCK-8 检测试剂盒(批号 20240920)购自苏州新赛美生物科技有限公司;CPT-1A 抗体(批号 00171597)、内皮一氧化氮合酶

(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 抗体 (批号 00098131)、PFKFB3 抗体 (批号 00131360)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 抗体 (批号 00161541)、 β -actin 抗体 (批号 23006205) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; FAO 试剂盒 (货号 103693-100)、糖酵解试剂盒 (货号 103344-100) 购自美国 Agilent 公司; 人 *L*-乳酸 ELISA 试剂盒 (批号 20240926)、人一氧化氮 (nitric oxide, NO) ELISA 试剂盒 (批号 20241011)、人血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) ELISA 试剂盒 (批号 20241016) 购自盐城君行生物科技有限公司。

1.3 仪器

SW-CJ-1G 型双人无菌操作台 (苏州市苏杭科技器材有限公司); Leica SP8 型共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司); 1736R 型低温高速离心机 (韩国 Geen 公司); INCO108 型 CO₂ 细胞培养箱 (德国美墨尔特上海贸易有限公司); Synergy2 型酶标分光光度读板仪 (美国 BioTek 公司); 实时荧光定量 PCR 系统 (美国 Applied Biosystems 公司); 电泳仪、凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); Seahorse XF96 分析仪 (美国 Agilent 公司)。

2 方法

2.1 大黄酸溶液的制备与给药

将 1 mg 大黄酸溶于 35.2 μ L 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 制备浓度为 100 mmol/L 的大黄酸储备液。取 10 μ L 储备液, 加入 9990 μ L DMEM 培养基, 得到 100 μ mol/L 的大黄酸溶液。HUVECs 在棕榈酸溶液诱导 24 h 后, 加入 2.5、5.0、10.0 μ mol/L 大黄酸溶液干预 24 h 后检测相应指标^[21]。

2.2 norathyriol 溶液的制备与给药

将 0.1 mg norathyriol 溶于 414 μ L DMSO 得到浓度为 0.93 mmol/L 的 norathyriol 储备液。取 10 μ L 储备液, 加入 90 μ L DMEM 培养基, 得到 92.8 μ mol/L 的 norathyriol 溶液。HUVECs 在棕榈酸溶液诱导 24 h 后, 单独或和大黄酸 (10 μ mol/L) 联合干预 24 h 后检测相应指标^[22]。

2.3 3PO 溶液的制备与给药

将 1 mg 3PO 溶于 475.7 μ L DMSO 得到浓度为 10 mmol/L 的 3PO 储备液。取 2 μ L 储备液, 加入 19.998 mL DMEM 培养基, 得到 10 μ mol/L 的 3PO 溶液。HUVECs 在棕榈酸溶液诱导 24 h 后, 单独或和大黄酸 (10 μ mol/L) 联合干预 24 h 后检测相应指标^[23]。

2.4 etomoxir 溶液的制备与给药

将 1 mg etomoxir 溶于 38.2 μ L DMSO 得到浓度为

80 mmol/L 的 etomoxir 储备液。取 2 μ L 储备液, 加入 19.998 mL DMEM 培养基, 得到 80 μ mol/L 的 etomoxir 溶液。HUVECs 在棕榈酸溶液诱导 24 h 后, 单独或和大黄酸 (10 μ mol/L) 联合干预 24 h 后检测相应指标^[15]。

2.5 棕榈酸溶液的制备与给药

将 0.1 mg 棕榈酸溶于 13 μ L DMSO 得到浓度为 3 mmol/L 的棕榈酸储备液。取 10 μ L 储备液, 加入 90 μ L DMEM 培养基稀释至 300 μ mol/L。在细胞生长至 50%~60% 密度时, 加入 300 μ mol/L 的棕榈酸溶液, 诱导 24 h^[24]。

2.6 CCK-8 检测大黄酸对细胞活力的影响

细胞接种于 96 孔板中, 待细胞生长至 70%~80% 密度时, 给予不同浓度 (0、1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 μ mol/L) 大黄酸溶液孵育 24 h。加入 10% CCK-8 溶液, 孵育 30 min 后, 采用酶标仪在 450 nm 波长下检测各孔吸光度 (*A*) 值, 并计算细胞存活率。

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

2.7 qRT-PCR 检测 *CPT1-A*、*PFKFB3*、己糖激酶 2 (hexokinase 2, *HK2*)、葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter protein 1, *GLUT1*) mRNA 表达水平

收集细胞, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
<i>CPT1-A</i>	F: AGGTCGGAAGCCCATGTTGTA R: GCTGTCATGCGCTGGAAGTC
<i>PFKFB3</i>	F: ATTGAATATGCCGCTCTCC R: CACAAGATACACACATGG
<i>HK2</i>	F: TACACTCAATGACATCCGAAGTCT R: CGTCCTTATCGTCTTCAATATCC
<i>GLUT1</i>	F: AGAGTCCATCCCATCCACCA R: CCTGCCAAAGCGATTAACAA
<i>GAPDH</i>	F: GACATGCCGCCTGGAGAAAC R: AGCCCAGGATGCCCTTTATT

2.8 细胞能量代谢表型检测

将 HUVEC 以 1.5×10^5 个/孔接种在 96 孔板中, 每组 4 个复孔。细胞贴壁后, 加入大黄酸和/或抑制剂干预 24 h。分别用加入 FAO 试剂盒进行 FAO 测试, 糖酵解试剂盒进行糖酵解应激测试, 采用 Seahorse XF96 分析仪检测 FAO 和糖酵解 2 种主要的能量代谢途径。

2.9 分子对接验证大黄酸与 PPAR α 的结合情况

从 PDB 数据库 (www.rcsb.org) 获取 PPAR α 蛋白靶点的 3D 结构文件, 转换为 PDB 格式, 利用

Pymol 去除无关金属离子, 并进行去 H_2O 、加氢处理; 从 PubChem 数据库获得 PPAR α 抑制剂/激动剂的 3D 结构, 下载 SDF 文件转换成 PDB 格式。从 PubChem 数据库下载大黄酸结构, 转换成 PDB 格式, 以进行对接。利用 AutoDock Vina 进行受体-配体对接模拟计算, 统计对接结合能及结合位点。

2.10 免疫荧光检测 CPT-1A、PFKFB3、eNOS、VEGF 的表达情况

将细胞爬片置于 24 孔板中, 细胞以 1×10^5 个/孔接种。细胞贴壁后, 加入大黄酸和/或抑制剂干预 24 h。用 4% 多聚甲醛进行固定, 并使用 0.3% Triton X-100 通透处理, 滴加 5% 牛血清白蛋白, 室温封闭 1 h。滴加 100 μL 一抗稀释液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 滴加荧光二抗, 在室温下孵育 1 h。滴加 DAPI 避光孵育 7 min 染核, 加入抗荧光淬灭剂后, 在共聚焦显微镜下进行图像采集。

2.11 Western blotting 检测 CPT1-A、PFKFB3、eNOS、VEGF 的表达情况

收集细胞, 加入裂解液提取蛋白, 采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 牛血清白蛋白, 于摇床上封闭 1 h, 用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次, 加入二抗, 室温下摇床孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次后, 滴加 ECL 发光液, 并使用 Chemiscope 成像系统成像。

2.12 L-乳酸、NO 和 VEGF 水平的测定

收集细胞, 加入裂解液裂解后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 按照试剂盒说明书测定 L-乳酸、NO 和 VEGF 水平。

2.13 统计学分析

使用 Graphpad Prism 9 软件进行统计分析及作图。采用 One-way ANOVA 检验单因素变量多组间差异, 使用 Tukey 进行显著差异检验, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 大黄酸对 HUVECs FAO 和糖酵解的影响

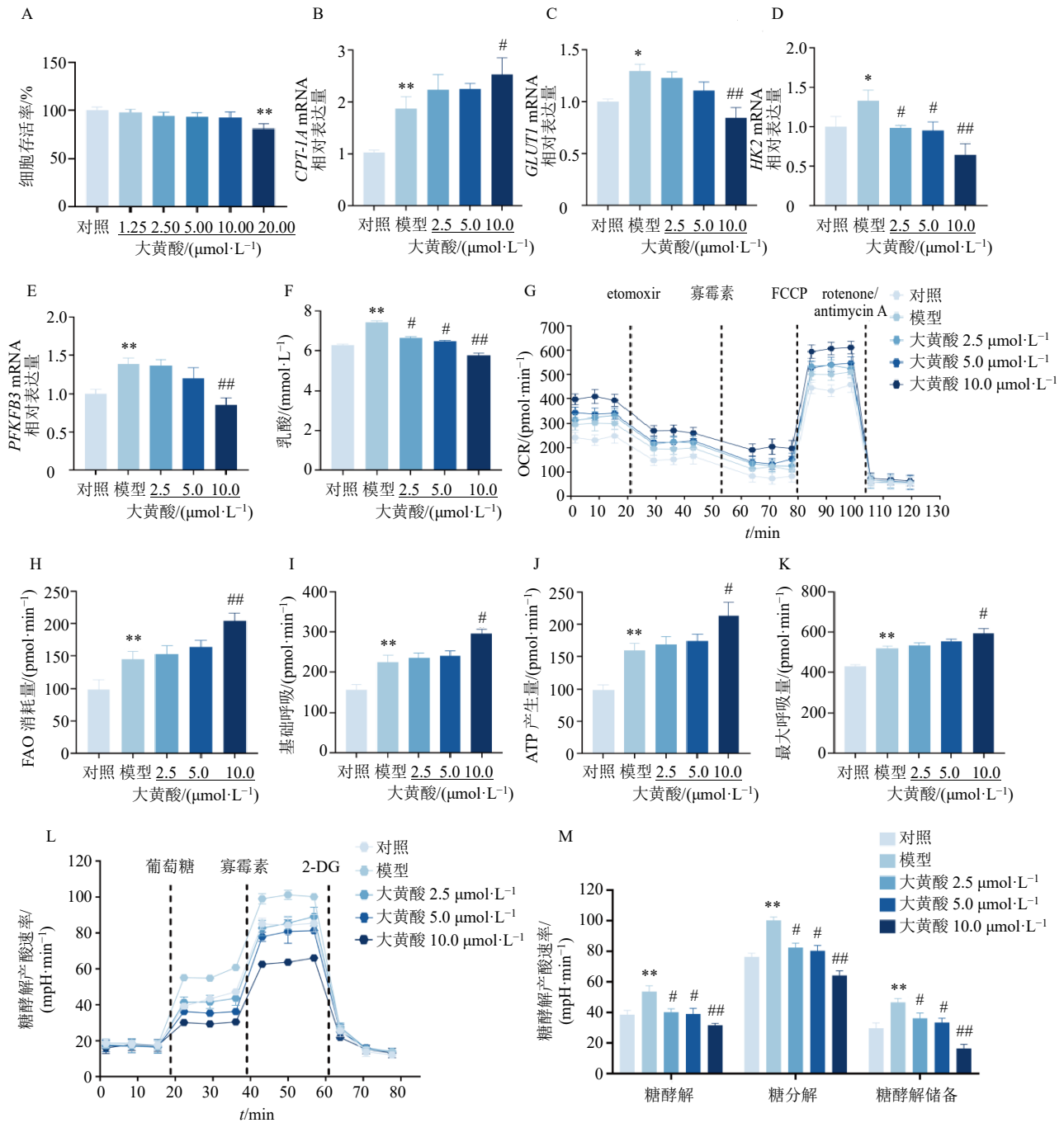
HUVECs 分别给予 1.25~20.00 $\mu\text{mol/L}$ 大黄酸处理 24 h 后, 采用 CCK-8 法测定细胞存活率, 结果如图 1-A 所示, 1.25~10.00 $\mu\text{mol/L}$ 大黄酸对细胞存活率无明显影响, 20.00 $\mu\text{mol/L}$ 大黄酸显著降低细胞存活率 ($P < 0.01$)。因此, 选择 2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 3 个剂量进行后续实验。CPT-1A 为 FAO 的限速酶, 常被用于评价 FAO 水平^[25]。通过检测 CPT-

1A 的 mRNA 表达来考察大黄酸对 HUVECs 中 FAO 的影响。结果显示, 与对照组比较, 模型组 CPT-1A 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$, 图 1-B); 与模型组比较, 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 大黄酸显著上调 CPT-1A mRNA 表达水平 ($P < 0.05$)。为了进一步考察细胞 FAO 的能力, 研究了基于棕榈酸的氧气消耗率 (oxygen consumption rate, OCR), 发现给予外源性脂肪酸能显著增加 HUVECs 中 FAO 消耗和线粒体的呼吸能力 ($P < 0.01$, 图 1-G~K), 而 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 大黄酸能进一步促进 FAO ($P < 0.05$ 、0.01)。

GLUT1、HK2、PFKFB3 均是糖酵解的关键酶, 能反映糖酵解情况。结果显示, 与对照组比较, 模型组 GLUT1、HK2、PFKFB3 的 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01, 图 1-C~E); 与模型组比较, 2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 大黄酸仅对 HK2 的 mRNA 表达水平有显著抑制作用 ($P < 0.05$), 而 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 大黄酸能显著下调 GLUT1、HK2、PFKFB3 的 mRNA 表达 ($P < 0.01$)。此外, 与模型组比较, 大黄酸呈剂量相关性地降低乳酸水平 ($P < 0.05$ 、0.01, 图 1-F)。进一步进行糖酵解功能测试, 发现大黄酸能降低细胞基础糖酵解水平、糖酵解最大值及糖酵解储备功能 ($P < 0.05$ 、0.01, 图 1-L、M), 且呈剂量相关性。上述结果显示, 促进 FAO、抑制糖酵解是大黄酸影响 HUVECs 代谢的主要特征。

3.2 大黄酸与 PPAR α 的相互作用研究

PPAR α 是细胞代谢变化的关键上游调节因子^[26], 能够上调驱动线粒体和 FAO 能力增加的基因, 包括线粒体脂质输入蛋白 [CPT-1A、CPT2、肉毒碱脂酰转移酶 (solute carrier family 25 member 20, SLC25A20)]、过氧化物酶质蛋白 [过氧化物酶体发生因子 11A (peroxisomal biogenesis factor 11A, PEX11A)、酰基辅酶 A 氧化酶 1 (acyl-CoA oxidase 1, ACOX1)] 以及糖酵解的负调节因子 [硫氧还蛋白相互作用蛋白 (thioredoxin interaction protein, TXNIP)], 从而导致 FAO 增加, 同时限制糖酵解。为明确 PPAR α 是否是大黄酸促进 FAO、抑制糖酵解的有效靶点, 利用分子对接分析大黄酸与 PPAR α 相互作用的结合能及结合残基 (表 2), 发现大黄酸与 PPAR α 的结合能为 -8.56 kcal/mol (1 kcal/mol = 4.182 kJ/mol), 仅低于 BMS687453, 而高于其他 7 种 PPAR α 激动剂。大黄酸与 PPAR α 的结合残基中 ASP466、LYS448 与绝大多数 PPAR α 激动剂重合, 且 ARG465 残基为大黄酸与 PPAR α 独有的结合残基 (图 2)。



A-CCK-8 检测不同浓度的大黄酸对细胞存活率的影响 ($n=3$)；B~E-糖脂代谢酶的 mRNA 相对表达量 ($n=3$)；F-乳酸水平 ($n=3$)；G-使用 Seahorse XF96 分析不同浓度的大黄酸对 HUVECs FAO 的影响 ($n=4$)；H-FAO 消耗量；I-基础呼吸；J-ATP 产生量；K-最大呼吸量；L-使用 Seahorse XF96 分析不同浓度的大黄酸对 HUVECs 糖酵解的影响 ($n=4$)；M-糖酵解、糖分解能力及糖酵解储备能力定量分析；与对照组比较： $*P<0.05$ $**P<0.01$ ；与模型组比较： $\#P<0.05$ $\#\#P<0.01$ ，下图同。

A-effect of different concentrations of rhein on cell survival rate detected by CCK-8 ($n=3$)；B—E-relative mRNA expression levels of glycolipid metabolism enzymes ($n=3$)；F-level of lactate ($n=3$)；G-effect of different concentrations of rhein on FAO in HUVECs analyzed by Seahorse XF96 ($n=4$)；H-FAO consumption；I-basal respiration；J-ATP production；K-maximum respiration；L-effect of different concentrations of rhein on glycolysis in HUVECs analyzed by Seahorse XF96 ($n=4$)；M-quantitative analysis of glycolysis, glycolysis capacity and glycolysis reserve capacity； $*P<0.05$ $**P<0.01$ vs control group； $\#P<0.05$ $\#\#P<0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 大黄酸对 HUVECs FAO 和糖酵解的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 1 Effect of rhein on FAO and glycolysis in HUVECs ($\bar{x} \pm s$)

表 2 PPAR α 与大黄酸及 PPAR α 激动剂的结合能及结合残基情况
Table 2 Binding energy and residues of PPAR α with rhein and agonist of PPAR α

化合物	结合能/ (kcal·mol ⁻¹)	结合残基	化合物	结合能/ (kcal·mol ⁻¹)	结合残基
BMS687453	-8.85	ASP466、LYS448、MET467	WY-14643	-7.26	LYS448、TRY464、GLN445
大黄酸	-8.56	ASP466、LYS448、ARG465	吉非罗齐	-7.10	LYS448、GLN445
埃拉菲布拉诺	-8.47	ASP466、LYS448	沙罗格列扎	-7.10	LYS449
非诺贝特酸	-7.69	LYS448、GLN442	氯贝酸	-6.09	ASP466
非诺贝特	-7.52	ASP466、LYS448、GLN442			

1 kcal·mol⁻¹=4.182 kJ·mol⁻¹

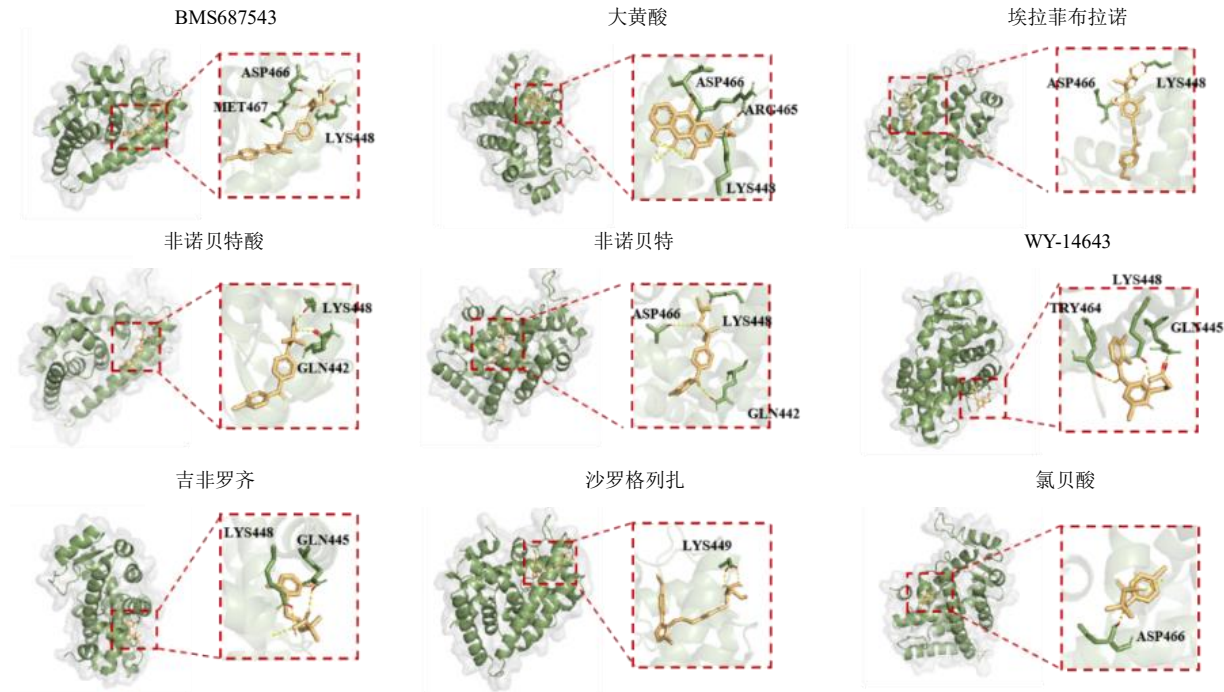


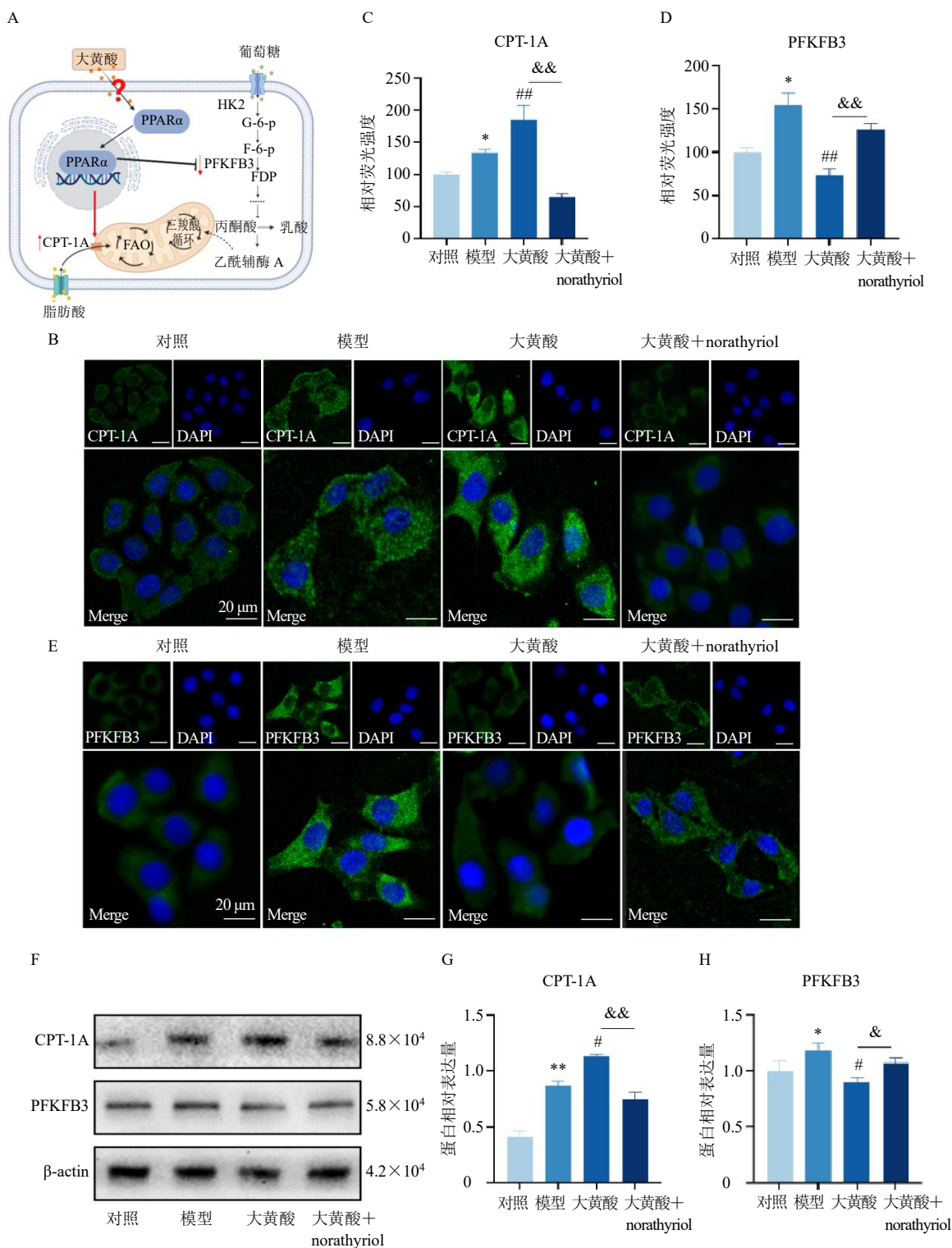
图 2 PPAR α 与大黄酸的互动情况
Fig. 2 Interaction between PPAR α and rhein

3.3 大黄酸通过激活 PPAR α 调节糖脂代谢关键酶 CPT-1A 及 PFKFB3 表达

为了验证分子对接结果的准确性，采用 PPAR α 抑制剂 norathyriol 观察大黄酸对 CPT-1A 及 PFKFB3 表达的影响（图 3-A）。免疫荧光结果显示，与模型组比较，大黄酸显著增强了 CPT-1A 的荧光强度（ $P<0.01$ ，图 3-B、C），降低了 PFKFB3 的荧光强度（ $P<0.01$ ，图 3-D、E），而 norathyriol 能显著逆转上述变化（ $P<0.01$ ）。Western blotting 结果显示，与模型组比较，大黄酸显著上调 CPT-1A 的蛋白表达（ $P<0.05$ ，图 3-F、G），显著下调 PFKFB3 的蛋白表达（ $P<0.05$ ，图 3-F、H），而 norathyriol 干预能显著抑制 CPT-1A 蛋白表达（ $P<0.01$ ），并促进 PFKFB3 蛋白表达（ $P<0.05$ ），与免疫荧光结果一致。

3.4 大黄酸通过激活 PPAR α 调节 eNOS 及 VEGF 表达

eNOS、VEGF 为血管舒张功能及病理性血管生成的代表性指标^[27]，因此通过检测 eNOS、VEGF 的表达探讨大黄酸通过调控糖脂代谢对内皮细胞功能的影响。免疫荧光结果显示，大黄酸显著增加 eNOS 的荧光强度（ $P<0.05$ ，图 4-A、B），显著降低 VEGF 的荧光强度（ $P<0.01$ ，图 4-C、D）；而加入 PPAR α 抑制剂 norathyriol 后，eNOS 的荧光强度显著降低（ $P<0.01$ ），VEGF 的荧光强度显著增加（ $P<0.01$ ）。Western blotting 结果显示，与模型组比较，大黄酸显著上调 eNOS 的蛋白表达（ $P<0.05$ ，图 4-E、F），显著下调 VEGF 的蛋白表达（ $P<0.01$ ，图 4-E、G）；给予 norathyriol 干预后，显著逆转大黄酸对 eNOS、VEGF 的调控作用（ $P<0.05$ ）。

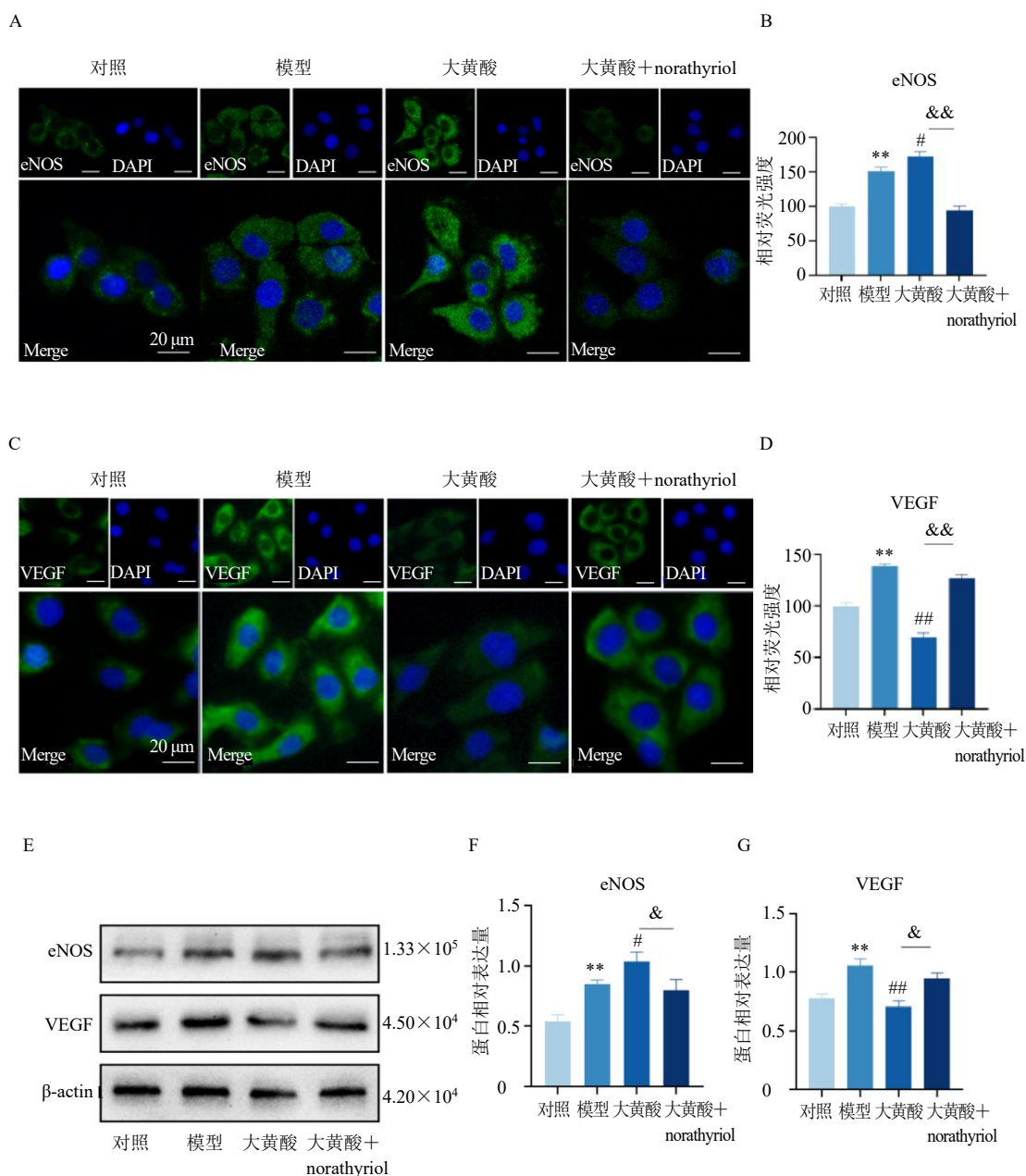


A-大黄酸调控糖脂代谢机制图; B、C-免疫荧光检测 CPT-1A 的表达 ($\times 40$, $n=3$); D、E-免疫荧光检测 PFKFB3 的表达 ($\times 40$, $n=3$); F~H-Western blotting 检测 CPT-1A、PFKFB3 蛋白表达 ($n=3$); $P<0.05$ & $P<0.01$, 下图同。

A-mechanism diagram of rhein in regulating glycolipid metabolism; B, C-CPT-1A expression detected by immunofluorescence ($\times 40$, $n=3$); D, E-PFKFB3 expression detected by immunofluorescence ($\times 40$, $n=3$); F-H-CPT-1A and PFKFB3 protein expressions detected by Western blotting ($n=3$); $P<0.05$ & $P<0.01$, same as below figures.

图 3 干预关键靶点 PPARα 后 HUVECs 中 CPT-1A 及 PFKFB3 的表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Expressions of CPT-1A and PFKFB3 in HUVECs after intervention of key target PPARα ($\bar{x} \pm s$)



A、B-免疫荧光检测 eNOS 的表达 ($\times 40$, $n=3$); C、D-免疫荧光检测 VEGF 的表达 ($\times 40$, $n=3$); E~G-Western blotting 检测 eNOS、VEGF 蛋白表达 ($n=3$)。

A, B-eNOS expression detected by immunofluorescence ($\times 40$, $n=3$); C, D-VEGF expression detected by immunofluorescence ($\times 40$, $n=3$); E~G-eNOS and VEGF protein expressions detected by Western blotting ($n=3$).

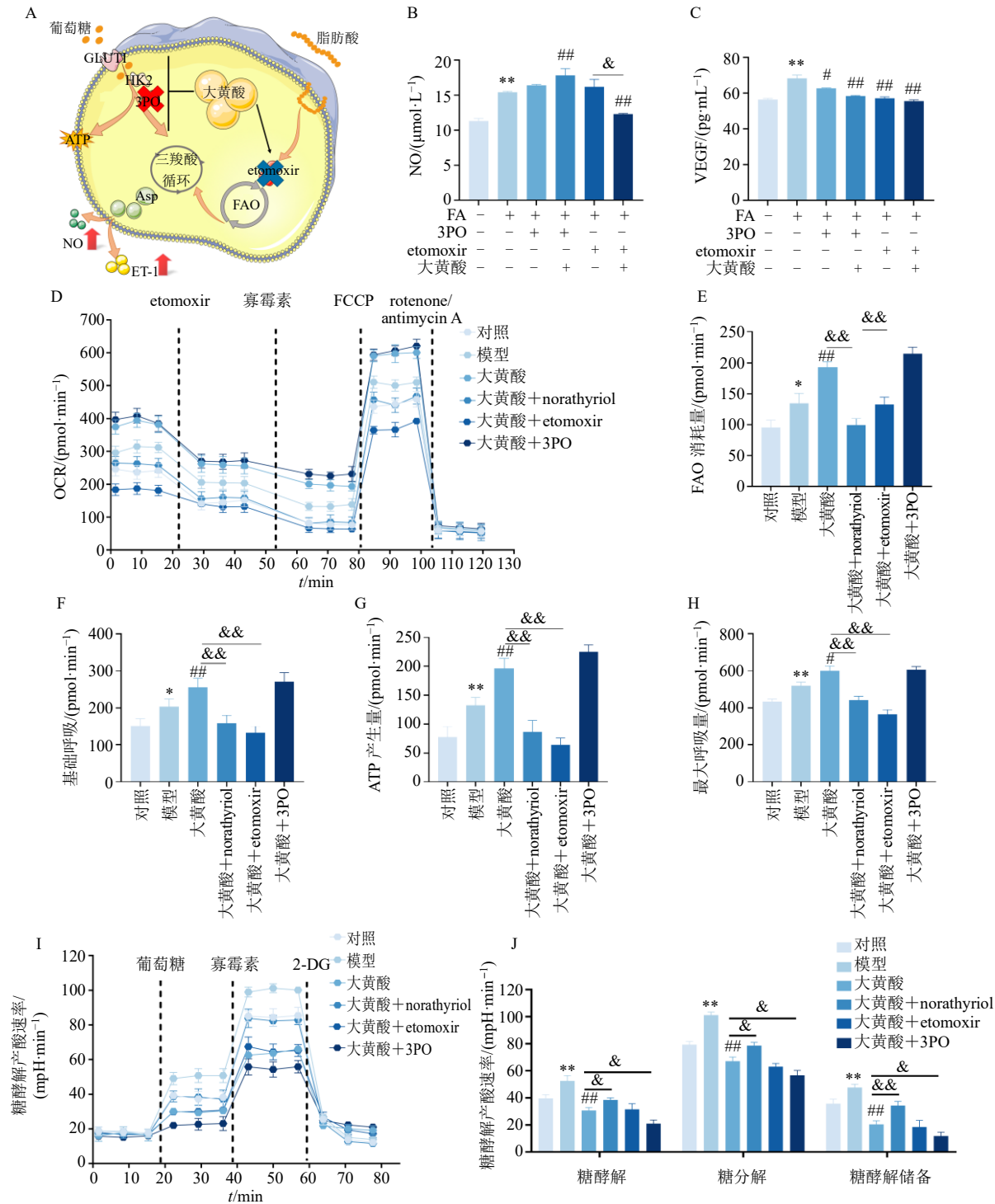
图 4 干预关键靶点 PPAR α 后 HUVECs 中 eNOS 及 VEGF 的表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 4 Expressions of eNOS and VEGF in HUVECs after intervention of key target PPAR α ($\bar{x} \pm s$)

3.5 大黄酸调控 HUVECs 糖脂代谢及功能的相关性研究

为进一步探讨大黄酸影响糖脂代谢与调节血管活性分子表达之间的关系,分别给予糖酵解抑制剂 3PO 和 FAO 抑制剂 etomoxir 进行干预(图 5-A)。结果显示,与对照组比较,模型组 NO、VEGF 水平显

著升高 ($P<0.01$, 图 5-B、C);与模型组比较,3PO 联用大黄酸显著升高 NO 水平 ($P<0.01$),并显著降低 VEGF 水平 ($P<0.01$);etomoxir 联用大黄酸可显著降低 NO 水平 ($P<0.01$),且其效果优于单用大黄酸 ($P<0.05$);etomoxir 单独或联用大黄酸均能显著降低 VEGF 水平 ($P<0.01$),但二者作用无明显区别。



A-内皮细胞代谢机制示意图; B、C-ELISA 检测 NO 及 VEGF 水平 ($n=6$); D-使用 Seahorse XF96 分析加入不同抑制剂后大黄酸对 HUVECs FAO 的影响 ($n=4$); E-FAO 消耗量; F-基础呼吸; G-ATP 产生量; H-最大呼吸量; I-使用 Seahorse XF96 分析加入不同抑制剂后大黄酸对 HUVECs 糖酵解的影响 ($n=4$); J-糖酵解、糖分解能力及糖酵解储备能力定量分析。

A-schematic diagram of endothelial cell metabolism mechanism; B, C-NO and VEGF levels detected by ELISA ($n=6$). D-effect of rhein on FAO of HUVECs after adding different inhibitors analyzed by Seahorse XF96 ($n=4$); E-FAO consumption; F-basal respiration; G-ATP production; H-maximum respiration; I-effect of rhein on glycolysis of HUVECs after adding different inhibitors analyzed by Seahorse XF96 ($n=4$); J-quantitative analysis of glycolysis, glycolysis capacity and glycolysis reserve capacity.

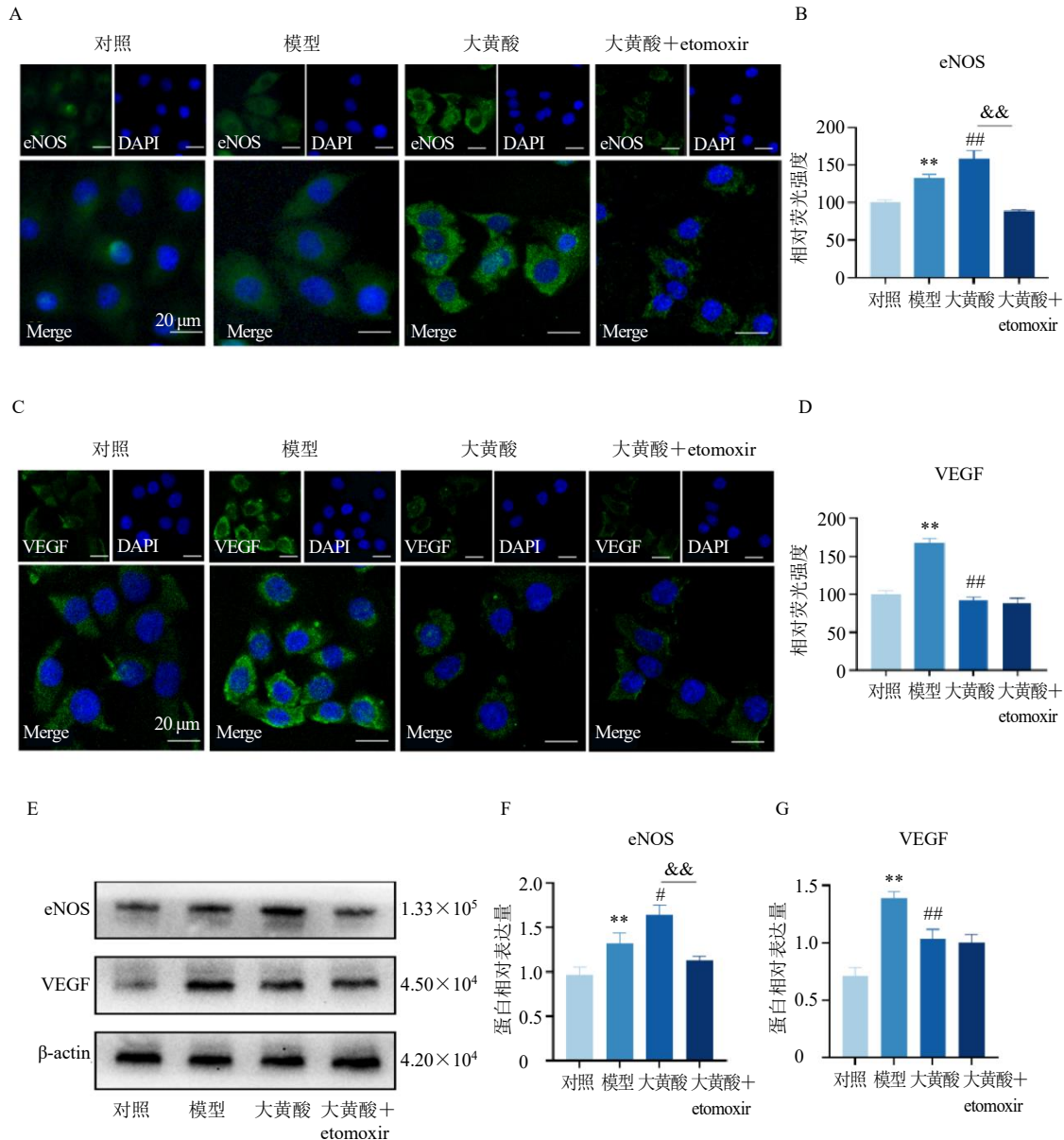
图 5 大黄酸调控 HUVECs 糖脂代谢及功能的相关性研究 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 5 Correlation study on regulation of glucose and lipid metabolism and function of HUVECs by rhein ($\bar{x} \pm s$)

通过检测细胞能量代谢表型,发现 norathyriol 显著逆转大黄酸促进 FAO、抑制糖酵解的作用 ($P<0.05$ 、 0.01 ,图 5-D~J),etomoxir 显著逆转大黄酸促进 FAO 的作用 ($P<0.01$);与单用大黄酸相比,3PO 联用大黄酸对 FAO 的作用没有明显变化,但对糖酵解表现出显著的抑制作用 ($P<0.05$)。上述结果提示,血管舒张因子 NO 的合成及分泌主要受 FAO 的影响,而 VEGF 的调节可受糖酵解与 FAO 的双重影响。

3.6 抑制 FAO 关键酶后大黄酸对 eNOS 及 VEGF 表达的影响

为了进一步阐明大黄酸调控 HUVECs 糖脂代谢与病理性血管生成及血管舒张之间的关系,考察了加入 etomoxir 后 HUVECs 中 eNOS 及 VEGF 的表达情况。免疫荧光结果显示,与模型组比较,大黄酸组 eNOS 的荧光强度显著增加 ($P<0.01$,图 6-A、B),加入 etomoxir 后 eNOS 荧光强度显著减弱



A、B-免疫荧光检测 eNOS 的表达 ($\times 40$, $n=3$); C、D-免疫荧光检测 VEGF 的表达 ($\times 40$, $n=3$); E~G-Western blotting 检测 eNOS、VEGF 蛋白表达 ($n=3$)。

A、B-eNOS expression detected by immunofluorescence ($\times 40$, $n=3$); C、D-VEGF expression detected by immunofluorescence ($\times 40$, $n=3$); E~G-eNOS and VEGF protein expressions detected by Western blotting ($n=3$).

图 6 抑制 FAO 关键酶后 HUVECs 中 eNOS 及 VEGF 的表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

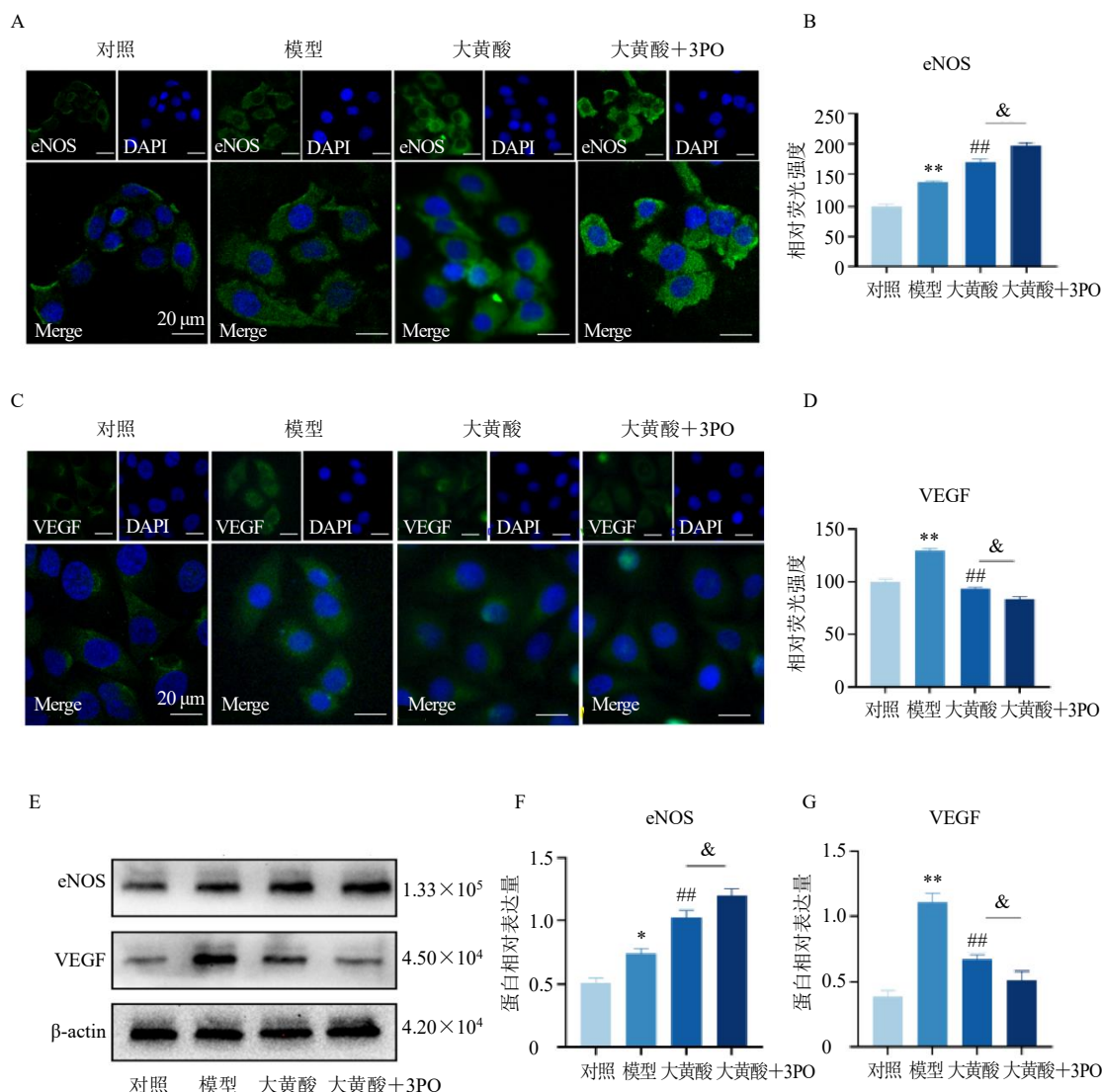
Fig. 6 Expressions of eNOS and VEGF in HUVECs after inhibition of key enzymes of FAO ($\bar{x} \pm s$)

($P < 0.01$)。与模型组比较,大黄酸组 VEGF 的荧光强度显著减弱 ($P < 0.01$, 图 6-C、D),加入 etomoxir 后 VEGF 荧光强度没有明显变化。Western blotting 结果(图 6-E~G)进一步证实,与单用大黄酸相比,大黄酸联用 etomoxir 显著抑制 eNOS 的表达 ($P < 0.01$),而对 VEGF 的表达无明显影响。

3.7 抑制糖酵解关键酶后大黄酸对 eNOS 及 VEGF 表达的影响

进一步考察了糖酵解关键酶 PFKFB3 抑制剂 3PO 对 HUVECs 中 eNOS 及 VEGF 的表达情况。

免疫荧光结果显示,与模型组比较,大黄酸组 eNOS 的荧光强度显著增加 ($P < 0.01$, 图 7-A、B),加入 3PO 后 eNOS 荧光强度进一步增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较,大黄酸组 VEGF 的荧光强度显著减弱 ($P < 0.01$, 图 7-C、D),加入 3PO 后 VEGF 荧光强度进一步减弱 ($P < 0.05$)。Western blotting 结果(图 7-E~G)显示,与单用大黄酸相比,大黄酸联用 3PO 显著促进 eNOS 的表达 ($P < 0.05$),显著抑制 VEGF 的表达 ($P < 0.05$)。表明在大黄酸和 3PO 双重抑制糖酵解后,可促进 eNOS 表达,并抑制 VEGF 表达。



A、B-免疫荧光检测 eNOS 的表达 ($\times 40$, $n=3$); C、D-免疫荧光检测 VEGF 的表达 ($\times 40$, $n=3$); E~G-Western blotting 检测 eNOS、VEGF 蛋白表达 ($n=3$)。

A、B-eNOS expression detected by immunofluorescence ($\times 40$, $n=3$); C、D-VEGF expression detected by immunofluorescence ($\times 40$, $n=3$); E~G-eNOS and VEGF protein expressions detected by Western blotting ($n=3$)。

图 7 抑制糖酵解关键酶后 HUVECs 中 eNOS 及 VEGF 的表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 7 Expressions of eNOS and VEGF in HUVECs after inhibition of key enzymes of glycolysis ($\bar{x} \pm s$)

4 讨论

内皮细胞糖脂代谢的正常运转不仅维持细胞生长、控制迁移和调节血管新生的必要因素^[28], 还可通过细胞-细胞、细胞-基质间的通讯影响相邻细胞及周围组织微环境^[29-31]。糖脂代谢异常在糖尿病、动脉粥样硬化、纤维化疾病、癌症等众多疾病中均有发现, 可以说从一定程度上也促成了上述疾病的发生发展^[32]。如肝癌作为富血管肿瘤, 其代偿性机制导致的大血管病变与微血管生成是一大治疗难点。在病理性血管生成的过程中, 血管舒缩因子[NO、内皮缩血管肽-1 (endothelin-1, ET-1)、血栓素 A₂ (thromboxane A₂, TXA₂) 等]失调导致的内皮细胞功能障碍、糖脂代谢异常均推动了肝癌恶化。近年来, 也有研究发现, MK/整合素信号通路^[33]、RhoA/ROCK^[34]等机械力学信号通路直接或间接参与了血管病变, 可能与 CD36/PPAR/CPT-1^[35]、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)^[36]等经典的代谢相关通路形成串扰。因此, 深入研究内皮细胞代谢异常, 寻找生化与机械力学偶联机制的新调控点是未来研究的热点, 不仅可为开发抗异常血管生成药物提供基础, 还可以为各种血管相关疾病的诊断和治疗提供有益帮助。

在本研究中, 首先构建了棕榈酸诱导的代谢应激模型, 使 HUVECs 呈现出糖脂代谢的共激活状态, 这可能由于长链脂肪酸一方面激活了线粒体 β -氧化^[37], 另一方面低浓度的棕榈酸可能模拟生理性脂肪酸信号, 通过 G 蛋白偶联受体 40 (G protein-coupled receptor 40, GPR40)/游离脂肪酸受体 1 (free fatty acid receptor 1, FFAR1) 等受体激活 PI3K/Akt, 促进了葡萄糖摄取^[38]。随后给予不同浓度的大黄酸干预, 发现 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 大黄酸在促进 FAO 的同时抑制糖酵解, 这种特殊调节方式可能与 PPAR α 的作用一致。PPAR α 激活可上调 CPT-1A 等线粒体 β -氧化关键酶, 但会降低胰岛素受体底物敏感性, 阻碍 PI3K/Akt 信号传导, 减少 GLUT 膜转位和葡萄糖摄取^[39]。为探究 PPAR α 是否是大黄酸作用的靶点, 利用分子对接方法将大黄酸和 8 种已知的 PPAR α 激动剂与 PPAR α 进行结合能和结合残基的分析, 证实了大黄酸与 PPAR α 结合的可能性。免疫荧光和 Western blotting 结果证实, 抑制 PPAR α 能逆转大黄酸促进 FAO 并抑制糖酵解的作用。同时发现, 抑制 PPAR α 后能够逆转大黄酸促进 NO、抑制 VEGF 表

达的作用。为了进一步明确大黄酸与 PPAR α 调节糖脂代谢的潜在机制, 分别抑制下游 FAO 和糖酵解后观察 eNOS 及 VEGF 的表达, 发现抑制 FAO 会降低血管内皮细胞 eNOS 和 VEGF 的表达; 单独抑制糖酵解后, 血管内皮细胞 eNOS 表达升高, 而 VEGF 表达下降。上述结果证明, 大黄酸可通过 PPAR α 促进 FAO 影响血管内皮细胞 eNOS 与 VEGF 表达。同时, 大黄酸通过激活 PPAR α 抑制细胞糖酵解, 进一步减少了 VEGF 表达, 从而抑制病理性血管生成。本研究揭示了大黄酸调节血管内皮细胞糖脂代谢的作用机制, 明确了大黄酸调节血管内皮细胞糖脂代谢的关键靶点, 为大黄酸更好地应用于富血管疾病的治疗提供了理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hasan S S, Fischer A. The endothelium: An active regulator of lipid and glucose homeostasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2021, 31(1): 37-49.
- [2] Smolders V F, Zodda E, Quax P H A, *et al*. Metabolic alterations in cardiopulmonary vascular dysfunction [J]. *Front Mol Biosci*, 2019, 5: 120.
- [3] Wu W Z, Bai Y P. Endothelial GLUTs and vascular biology [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 158: 114151.
- [4] Schoors S, Bruning U, Missiaen R, *et al*. Fatty acid carbon is essential for dNTP synthesis in endothelial cells [J]. *Nature*, 2015, 520(7546): 192-197.
- [5] Eelen G, de Zeeuw P, Simons M, *et al*. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature [J]. *Circ Res*, 2015, 116(7): 1231-1244.
- [6] Li M, Zhang X, Wang M M, *et al*. Activation of Piezo1 contributes to matrix stiffness-induced angiogenesis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Commun*, 2022, 42(11): 1162-1184.
- [7] Jászai J, Schmidt M H H. Trends and challenges in tumor anti-angiogenic therapies [J]. *Cells*, 2019, 8(9): 1102.
- [8] Kwon H J, Hahn K R, Moon S M, *et al*. PFKFB3 ameliorates ischemia-induced neuronal damage by reducing reactive oxygen species and inhibiting nuclear translocation of Cdk5 [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 24694.
- [9] Cao Y P, Zhang X Y, Wang L N, *et al*. PFKFB3-mediated endothelial glycolysis promotes pulmonary hypertension [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(27): 13394-13403.
- [10] Schnitzler J G, Hoogeveen R M, Ali L, *et al*. Atherogenic lipoprotein(a) increases vascular glycolysis, thereby facilitating inflammation and leukocyte extravasation [J]. *Circ Res*, 2020, 126(10): 1346-1359.
- [11] Güzel S, Yalçın A, Gürpınar Y, *et al*. Expression of Pfkfb isoenzymes during *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells [J]. *Turk J Med Sci*, 2023, 53(6): 1565-1573.

- [12] Kotowski K, Rosik J, Machaj F, *et al.* Role of PFKFB3 and PFKFB4 in cancer: Genetic basis, impact on disease development/progression, and potential as therapeutic targets [J]. *Cancers*, 2021, 13(4): 909.
- [13] De Oliveira T, Goldhardt T, Edelmann M, *et al.* Effects of the novel PFKFB3 inhibitor KAN0438757 on colorectal cancer cells and its systemic toxicity evaluation *in vivo* [J]. *Cancers*, 2021, 13(5): 1011.
- [14] Hu H J, Asweto C O, Wu J, *et al.* Gene expression profiles and bioinformatics analysis of human umbilical vein endothelial cells exposed to PM_{2.5} [J]. *Chemosphere*, 2017, 183: 589-598.
- [15] Lin T, Yang W Q, Luo W W, *et al.* Disturbance of fatty acid metabolism promoted vascular endothelial cell senescence via acetyl-CoA-induced protein acetylation modification [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 1198607.
- [16] Eelen G, de Zeeuw P, Treps L, *et al.* Endothelial cell metabolism [J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(1): 3-58.
- [17] Deng T, Du J, Yin Y, *et al.* Rhein for treating diabetes mellitus: A pharmacological and mechanistic overview [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1106260.
- [18] 韩思琪, 哈伟, 师彦平. 大黄及其有效成分抗炎作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(1): 303-316.
- [19] Fu C K, Zhang Y H, Xi W J, *et al.* Dahuang Zhechong pill attenuates hepatic sinusoidal capillarization in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma rat model via the MK/integrin signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 308: 116191.
- [20] Wu J W, Wei Z H, Cheng P, *et al.* Rhein modulates host purine metabolism in intestine through gut microbiota and ameliorates experimental colitis [J]. *Theranostics*, 2020, 10(23): 10665-10679.
- [21] Zhong X F, Huang G D, Luo T, *et al.* Protective effect of rhein against oxidative stress-related endothelial cell injury [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(5): 1261-1266.
- [22] Wilkinson A S, Monteith G R, Nicholas Shaw P, *et al.* Effects of the mango components mangiferin and quercetin and the putative mangiferin metabolite norathyriol on the transactivation of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(9): 3037-3042.
- [23] Horváthová J, Moravčík R, Boháč A, *et al.* Synergic effects of inhibition of glycolysis and multikinase receptor signalling on proliferation and migration of endothelial cells [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2019, 38(2): 157-163.
- [24] Wang M Y, Liu F, Fang B B, *et al.* Proteome-scale profiling reveals MAFF and MAFG as two novel key transcription factors involved in palmitic acid-induced umbilical vein endothelial cell apoptosis [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2021, 21(1): 448.
- [25] Donde H, Ghare S, Joshi-Barve S, *et al.* Tributyrin inhibits ethanol-induced epigenetic repression of CPT-1A and attenuates hepatic steatosis and injury [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2020, 9(4): 569-585.
- [26] Szántó M, Gupte R, Lee Kraus W, *et al.* PARPs in lipid metabolism and related diseases [J]. *Prog Lipid Res*, 2021, 84: 101117.
- [27] Wang D, Li H C, Zeng T X, *et al.* Exosome-transmitted ANGPTL1 suppresses angiogenesis in glioblastoma by inhibiting the VEGFA/VEGFR2/Akt/ENOS pathway [J]. *J Neuroimmunol*, 2024, 387: 578266.
- [28] Zecchin A, Borgers G, Carmeliet P. Endothelial cells and cancer cells: Metabolic partners in crime? [J]. *Curr Opin Hematol*, 2015, 22(3): 234-242.
- [29] Gao N, Xiao L H, Tao Z, *et al.* Preliminary research of main components of DII4/Notch-VEGF signaling pathway under high-glucose stimulation *in vitro* [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2022, 15: 1165-1171.
- [30] Rayner M L D, Healy J, Phillips J B. Repurposing small molecules to target PPAR- γ as new therapies for peripheral nerve injuries [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(9): 1301.
- [31] Dou F F, Wu B L, Chen J L, *et al.* PPAR α targeting GDF11 inhibits vascular endothelial cell senescence in an atherosclerosis model [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 2045259.
- [32] Rolver M G, Holland L K K, Ponniah M, *et al.* Chronic acidosis rewires cancer cell metabolism through PPAR α signaling [J]. *Int J Cancer*, 2023, 152(8): 1668-1684.
- [33] Wu L, Chen H L, Fu C K, *et al.* Midkine mediates dysfunction of liver sinusoidal endothelial cells through integrin $\alpha 4$ and $\alpha 6$ [J]. *Vascul Pharmacol*, 2022, 147: 107113.
- [34] Zhang Y H, Xing M L, Meng F S, *et al.* The mechanical mechanism of angiotensin II induced activation of hepatic stellate cells promoting portal hypertension [J]. *Eur J Cell Biol*, 2024, 103(2): 151427.
- [35] Boyer-Diaz Z, Aristu-Zabalza P, Andrés-Rozas M, *et al.* Pan-PPAR agonist lanifibranor improves portal hypertension and hepatic fibrosis in experimental advanced chronic liver disease [J]. *J Hepatol*, 2021, 74(5): 1188-1199.
- [36] Paskeh M D A, Ghadyani F, Hashemi M, *et al.* Biological impact and therapeutic perspective of targeting PI3K/Akt signaling in hepatocellular carcinoma: Promises and Challenges [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 187: 106553.
- [37] Panov A V. The structure of the cardiac mitochondria respirasome is adapted for the β -oxidation of fatty acids [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(4): 2410.
- [38] Bu L, Zhang Z K, Chen J W, *et al.* High-fat diet promotes liver tumorigenesis via palmitoylation and activation of AKT [J]. *Gut*, 2024, 73(7): 1156-1168.
- [39] 王冠梁, 刘甲寒, 李迪, 等. 熊果酸通过 PPAR α / γ 改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型糖代谢的机制 [J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(4): 24-29.

[责任编辑 李亚楠]