# PGC-1α调控非酒精性脂肪肝病线粒体 功能的作用研究

王雪梅 王怡婷 车 悦 汪洁英 门 可

目的 探究过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1α(peroxisome proliferators - activated receptors gamma co -摘 要 activator 1α, PGC – 1α)介导线粒体功能对游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)诱导的 HepC2 非酒精性脂肪肝病模型的作用机制。 HepC2 细胞分为 4 组,即对照组、FFA 模型组(1.5mmol/L FFA 孵育 24h)、LV - PGC - 1α 干预组(PPARGC1A 慢病毒转染 方法 后,1.5mmol/L FFA 孵育 24h)和 LV - control 干预组(阴性对照慢病毒转染后,1.5mmol/L FFA 孵育 24h)。磷酸甘油氧化酶法检 测细胞内甘油三酯(triglyceride,TG),胆固醇氧化酶法检测总胆固醇(total cholesterol,TC)含量;油红 O 染色观察脂滴聚集;比色 法检测细胞中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH – PX)的活性,丙二 醛(malondialdehyde,MDA)含量;微板法检测细胞上清液天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)、丙氨酸氨基转移 酶(alanine aminotransferase, ALT)变化; ATP 试剂盒检测细胞 ATP 含量, PCR 检测 mtDNA 复制倍数; Western blot 法检测脂质分解 和线粒体生物合成相关蛋白的表达情况。结果 与对照组比较,FFA 模型组细胞内脂质蓄积显著增加,肝细胞损伤加重,氧化应 激水平升高,细胞 ATP 含量下降,mtDNA 复制倍数减少,脂质分解蛋白过氧化物酶体增殖物激活受体 α(peroxisome proliferators activatedreceptors alpha, PPARα)、肉毒碱棕榈酰转移酶 – 1 A( carnitine palmitoyltransferase – 1 A, CPT – 1 A)表达降低,线粒体生物合 成相关蛋白 PGC – 1α、核呼吸因子 1 ( nuclear respiratory factor – 1 , NRF – 1 )、线粒体转录因子 A ( mitochondrial transcription factor A,mtTFA)表达降低。与 LV - control 干预组比较,LV - PGC - 1α干预组细胞内 TG 和 TC 含量显著降低,脂滴蓄积减少,肝细胞 损伤降低,细胞氧化应激损伤减轻,细胞 ATP 含量增加,mtDNA 复制倍数增加,脂质分解和线粒体生物合成相关蛋白的表达增 PGC - 1α 过表达增强线粒体生物合成、ATP 生成、减轻氧化应激,加强脂肪酸氧化分解,降低 HepG2 细胞脂质蓄积。 加。结论 过氧化物酶体增殖物激活受体γ共激活因子1α 关键词 非酒精性脂肪肝 脂质蓄积 线粒体功能

中图分类号 R575,R58 文献标识码 A DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.09.017

**Regulation of PGC – 1α on Mitochondrial Function in Non – alcoholic Fatty Liver Disease.** WANG Xuemei, WANG Yiting, CHE Yue, et al. Department of Public Health, Xi'an Medical University College, Shaanxi 710000, China

**Abstract Objective** To investigate the mechanism of peroxisome proliferators – activated receptors gamma co – activator  $1\alpha$  (PGC –  $1\alpha$ ) related mitochondrial function in HepG2 non – alcoholic fatty liver disease cell model induced by free fatty acids (FFA). **Methods** HepG2 cells were divided into four groups: control group, FFA model group (1.5mmol/L FFA incubation for 24h), LV – PGC –  $1\alpha$  intervention group (incubate with 1.5mmol/L FFA for 24h after PPARGC1A lentivirus transfection), LV – control intervention group (incubate with 1.5mmol/L FFA for 24h after negative control lentivirus transfection). Intracellular triglyceride (TG) was detected by phosphoglycerol oxidase method, and total cholesterol (TC) was detected by cholesterol oxidase method, respectively; Oil red O staining was used to observe lipid droplet aggregation. The activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH – PX), the content of malondialdehyde (MDA) were detected by colorimetry; the content of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in cell supernatant were detected by microplate method; ATP assay kit for detecting cellular ATP content, and mtDNA replication fold was detected by PCR method; Western blot was used to detect the expression of proteins related to lipid decomposition and mitochondrial biosynthesis. **Results** Compared with the control group, the intracellular lipid accumulation in FFA model group was significantly increased, the damage of liver cells was aggravated, and the level of oxidative stress was increased, the content of ATP in cells was decreased, and mtDNA replication fold was decreased, and the expression of lipid decomposition protein peroxisome proliferators – activated receptors alpha (PPAR $\alpha$ ) and carnitine palmitoyltransferase – 1A (CPT – 1A) were decreased, and the expression of mitochondri-

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81900408);西安医学院博士科研项目(2020DOC08);西安医学院大学生创新创业训练 计划项目(202111840001,202211840019)

作者单位:710000 西安医学院公共卫生学院

通信作者:门可,电子信箱:menke@foxmail.com

al biosynthesis related protein PGC –  $1\alpha$ , nuclear respiratory factor – 1 (NRF – 1) and mitochondrial transcription factor A (mtTFA) were decreased. Compared with the LV – control intervention group, the contents of intracellular TG and TC were significantly decreased, the accumulation of lipid droplets was decreased, the damage of hepatocytes was decreased, the oxidative stress damage of cells was alleviated, the content of ATP in cells was increased, the mtDNA replication fold was increased, and the expression of proteins related to lipid decomposition and mitochondrial biosynthesis was increased in the LV – PGC –  $1\alpha$  intervention group. Conclusion PGC –  $1\alpha$  overexpression enhances mitochondrial biosynthesis, ATP production, reduce oxidative stress, strengthen the oxidative decomposition of fatty acids, and reduce the lipid accumulation of HepG2 cells.

Key words Non – alcoholic fatty liver disease; Lipid accumulation; Mitochondria function; PGC –  $1\alpha$ 

非酒精性脂肪肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指没有过量饮酒史, 以脂肪变性和蓄 积为主要病理特征。约 1/5 的 NAFLD 患者由于炎性 反应进展成非酒精性脂肪性肝炎, 肝纤维化发生肝硬 化甚至肝细胞癌<sup>[1]</sup>。NAFLD 的患病率是 25.24%, 胰 岛素抵抗、2 型糖尿病、肥胖等代谢性疾病也更容易 发生在 NAFLD 患者身上<sup>[2]</sup>。NAFLD 的发病机制常 见的是"二次打击"理论, 即先是脂质代谢紊乱、脂质 蓄积, 后是炎症和氧化应激加重病变<sup>[3]</sup>。NAFLD 的 细胞模型复制方法都是打破能量代谢平衡, 促进脂肪 变性和蓄积。人肝癌细胞 HepG2、人胚胎肝细胞 L02 和小鼠肝实质原代细胞都是良好的模型载体, 干预方 式常用棕榈酸和油酸按照不同的比例混合成游离脂 肪酸孵育细胞, 或者用高浓度血清干预, 还有就是葡 萄糖和胰岛素共同干预<sup>[4,5]</sup>。

线粒体是细胞内相对独立的细胞器,有双层膜结 构和独立的 DNA。线粒体通过呼吸链的氧化还原反 应,完成氧化磷酸化产生 ATP<sup>[6]</sup>。过氧化物酶体增殖 物激活受体 α (peroxisome proliferators – activatedreceptors alpha, PPARa)是一种核激素受体,参与调节 脂质分解相关酶基因的转录<sup>[7]</sup>。PPARα 的靶基因肉 毒碱棕榈酰转移酶 – 1A (carnitine palmitoyltransferase – 1A, CPT - 1A) 是催化脂肪酸氧化的关键限速酶<sup>[8]</sup>。 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1α (peroxisome proliferators - activated receptors gamma co-activator 1α, PGC - 1α) 参与调节线粒体生物合 成相关转录因子的表达,其中核呼吸因子1(nuclear respiratory factor – 1, NRF – 1)、线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, mtTFA)参与调 控线粒体 DNA 的生物合成, NRF-1 和 mtTFA 都 是 PGC – 1α 的 靶 基 因<sup>[9,10]</sup>。线 粒 体 功 能 在 NAFLD 脂质蓄积中的作用有待于进一步阐明,本 研究旨在探讨 PGC - 1α 介导线粒体功能调控肝 细胞脂质蓄积,为寻找 NAFLD 治疗新靶点提供理 论依据和参考。

## 材料与方法

1. 主要试剂与材料:HepG2 人肝癌细胞株由西安 医学院病理教研室赠予;人源过表达慢病毒载体 PPARGC1A, NM\_001330751 和阴性对照病毒(LV control)购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司: 甘油三酯(triglyceride,TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过 氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH - PX)试剂盒、 肝功能指标丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、油红 O 染液均购自南京建成生物 工程研究所;实时荧光定量试剂盒购自 Life Technologies 公司; DNA 引物购自生工生物工程(上海)股份 有限公司; PPARα、CPT - 1A、PGC - 1α、NRF - 1、mt-TFA 蛋白一抗购自英国 Abcam 公司,蛋白一抗 GAP-DH 购自美国 Cell Signaling Technology 公司;蛋白二 抗试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;增强 型化学发光显影液 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;1% 磷酸酶抑 制剂购自美国 Thermo 公司;0.5% 蛋白酶抑制剂、RI-PA 缓 冲 液、BCA 蛋 白 质 分 析、粒 体 膜 电 位 检 测 C2006、活性氧检测 S0033S 购自上海碧云天生物技 术有限公司:油酸 SLB07659V、棕榈酸 SLB02406V 购 自美国 Sigma 公司。

2. 细胞转染方法:待 HepG2 生长至 50% ~ 70% 融合度,不同病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)转染慢病毒 LV – PPARGC1A(2×10<sup>8</sup>TU/ml); 阴性对照病毒 LV – control(CON238, uBI – MCS – SV40 – EGFP – IRES – puromycin, 1×10<sup>9</sup>TU/ml),加 入病毒感染增强剂 A和 P,待转染 72h 后观察转染效 果。实时荧光定量 PCR 法检测 PGC – 1 $\alpha$  过表达情 况,引物序列:上游引物:5′ – CAGAGAGTAT-GAGAAGCGAGAG – 3′,下游引物:5′ – AGCATCA-CAGGTATAACGGTAG – 3′。GAPDH 为内参基因,引物

• 80 •

3. HepG2 细胞脂肪堆积模型和分组:取油酸和棕 榈酸按照 2:1(浓度 0.66mol/L: 0.33mol/L)的比例用 DMSO 分别溶解,混合制成游离脂肪酸(free fatty acid,FFA)。10% 胎牛血清溶于 DMEM 高糖培养基, 置于 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养。分为对照组、FFA 模型 组(1.5mmol/L FFA 孵育 24h)、LV – PGC – 1 $\alpha$  干预 组(PPARGC1A 慢病毒转染后,1.5mmol/L FFA 孵育 24h)、LV – control 干预组(阴性对照慢病毒转染后, 1.5mmol/L FFA 孵育 24h)。

4. 细胞内脂质:细胞裂解液裂解细胞, BCA 法测 定蛋白质浓度, 试剂 盒测定 TC、TG 含量, 表示为 mmol/(g・prot)。油红 O 染色, 于 510nm 处测定吸 光度(A)值, 检测细胞内脂质蓄积情况。

5. 肝损伤指标和细胞内氧化应激指标:试剂盒检测细胞上清液中 AST、ALT 的含量变化。比色法检测 细胞内中 SOD 和 GSH – PX 的活性, MDA 含量。

6. 线粒体 ATP 含量和线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)复制倍数:裂解细胞测定蛋白浓度和细胞内 ATP 含量,单位为纳摩尔/克(nmol/g)。试剂盒提取细胞 DNA 并测定浓度,检测 ND1 基因代表线粒体 mtDNA 的复制倍数,GAPDH 是内部参数。配置  $20\mu$ l 反应体系进行 DNA 扩增,用  $2^{-\Delta\Delta et}$ 方法得出定量结果。ND1 引物序列:上游引物:5′-GGAGTA-ATCCAGGTCGGT-3′,下游引物:5′-TGGGTACAAT-GAGGAGTAGG-3′。GAPDH 引物序列:上游引物:5′-TCAAGAAGGTGGGAGGAGTGGGTGT-3′,下游引物:5′-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG-3′。

7. Western blot 法检测脂质分解相关蛋白、线粒 体生物合成蛋白表达:冰上裂解细胞得到蛋白上清 液,BCA 法测定蛋白质浓度,蛋白变性后 10% SDS – PAGE 分离等量的蛋白质 40 $\mu$ g 并转膜。封闭 1h,孵 育蛋白一抗于 4℃下过夜。37℃二抗体孵育 1h,ECL 显影固定。使用 Image J 软件分析 A 值,以 GAPDH 蛋白校正结果。比较 PPARα、CPT – 1、PGC – 1α、 NRF – 1 和 mtTFA 的蛋白表达。

8. 统计学方法:应用 SPSS 22.0 统计学软件对数 据进行统计分析。所有检测数据均符合正态分布,以 均数 ±标准差(x̄ ± s)表示。两组间数据比较采用独 立样本 t 检验检测,多组数据采用单因素方差分析 (One - way ANOVA)检测,方差齐时选用 LSD 检测, 方差不齐时选用 Tamhane's T2 检测,以 P < 0.05 为 差异有统计学意义。

### 结 果

1. 细胞转染效率: LV - PGC - 1α 干预过表达 PGC - 1α 基因,过表达效果显著(图1)。比较3 种不 同病毒感染复数 MOI = 30、MOI = 50、MOI = 100 在4 种转染条件下的转染效率,荧光倒置显微镜观察显 示,随着 MOI 的增加,慢病毒对 HepG2 的转染效率逐 步增加,并且增高程度呈线性关系,荧光强度随转染 效率增高。MOI = 100,72h 时病毒转染加入增强剂 P 后的转染效率最高,MOI = 50 接近 MOI = 100 时的转 染效率,因此选择 MOI = 50,添加增强剂 P,转染 72h 为实验终点。实时荧光定量 PCR 测定 HepG2 细胞中 PGC - 1α 的表达情况,结果显示,与 LV - control 干预 组比较,LV - PGC - 1α 干预组的 PGC - 1α 显著过表 达,详见图 2。



图 1 慢病毒转染 HepG2 细胞 72h(×100)



2. PGC - 1α 过表达对 HepG2 细胞脂质蓄积的作 用:油红 O 染色检测细胞脂质蓄积,与对照组比较, FFA 模型组的脂质蓄积显著增加;与 LV - control 干 预组比较,LV - PGC - 1α 干预组的脂质负荷显著降 低。510nm 处的 A 值组间差异显著(F = 25.431, P < 0.001),详见图 3。LV - PGC - 1α 干预显著降低细 胞内 TG 和 TC 含量,详见表 1。



## 图 3 HepG2 细胞油红 O 染色观察脂质蓄积情况(×400) 及半定量检测 510nm 处的 A 值

3. 肝细胞损伤指标:与对照组比较,FFA 模型组 细胞上清液中 ALT 和 AST 显著增高,LV – PGC – 1α 干预组的 ALT 和 AST 较 LV – control 干预组降低,详 见表 2。

表 1 HepG2 细胞内 TG 和 TC 的含量[mmol/(g·prot), $\bar{x} \pm s$ ]

组别	甘油三酯 总胆固醇		
对照组	$0.062 \pm 0.091$	$0.045 \pm 0.007$	
FFA 模型组	0.608 ± 0.077 $^{*}$	$0.081 \pm 0.007$ *	
LV – PGC – 1α 干预组	$0.513 \pm 0.079 * $ #	$0.066 \pm 0.008$ * #	
LV - control 干预组	0.668 ± 0.067 $^{*}$	0.084 ± 0.005 *	
F	108.753	40.008	
Р	< 0.001	< 0.001	

与对照组比较, \* P < 0.001; 与 LV – control 干预组比较, \* P < 0.001

表 2 细胞上清液 AST 和 ALT 变化  $(\bar{x} \pm s)$ 

组别	天冬氨酸氨基	丙氨酸氨基
	转移酶(U/L)	转移酶(U/L)
对照组	$7.85 \pm 0.63$	$5.91 \pm 0.84$
FFA 模型组	14.65 ± 1.52 ***	15.19 ± 2.22 ***
LV – PGC – 1α 干预组	$12.25 \pm 2.04$ *	11.94 ± 2.45 *** #
LV - control 干预组	14.77 ± 2.68 **	16.55 ± 2.63 ***
F	17.856	29.132
Р	< 0.001	< 0.001

与对照组比较,\*P<0.05,\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.001;与LVcontrol 干预组比较,\*P<0.01

4. 肝细胞氧化应激指标:与对照组比较,FFA 模型组细胞中的 SOD 酶活性显著降低、GSH – PX 酶活性显著降低,MDA 含量显著增加;与 LV – control 干预组比较,LV – PGC – 1α干预组的 SOD 活性增加,GSH – PX 酶活性显著升高,MDA 水平下降,提示PGC – 1α 可减轻高脂导致的氧化应激,详见表 3。

表 3 HepG2 细胞内氧化应激指标 $(x \pm s)$ 

组别	超氧化物 歧化酶[U/	谷胱甘肽过氧化 物酶[U/	丙二醛 [ nmol/
	$(mg \cdot prot)$ ]	$(mg \cdot prot)$ ]	$(mg \cdot prot)]$
对照组	$60.50 \pm 6.06$	113.37 ± 17.97	$2.72 \pm 0.77$
FFA 模型组	30.17 ±4.88 **	63.53 ± 8.36 **	$4.05 \pm 0.56$ **
LV – PGC – 1α 干预组	42.50 ± 6.53 **	# 79.25 ± 6.82 **	$#3.01 \pm 0.28$ #
LV - control 干预组	34.67 ±7.42 **	63.54 ± 9.69 **	$3.90 \pm 0.93$ *
F	27.114	24.844	5.625
Р	< 0.001	< 0.001	0.006

与对照组比较,\*P<0.01,\*\*P<0.001;与 LV - control 干预组比较,\*P<0.05

5. PGC - 1α 过表达对 HepG2 细胞 ATP 含量的 影响: 检测细胞 ATP 含量, 组间差异显著(F = 21.675, P < 0.001)。与对照组比较, FFA 模型组的 ATP 含量显著降低( $3.80 \pm 0.42 \mu mol/g$  vs  $8.08 \pm 0.89 \mu mol/g$ , P < 0.001);与 LV - control 干预组比较, LV - PGC - 1α 干预组的 ATP 含量增加( $5.30 \pm$ 



图 4 HepG2 细胞线粒体 ATP 含量

6. PGC – 1α 过表达对 HepG2 细胞 mtDNA 复制 数作用:结果显示,mtDNA 复制数组间差异显著(F =13.780,P < 0.001), FFA 干预降低细胞的 mtDNA 复 制倍数。与对照组比较、FFA 模型组的 mtDNA 复制数 显著降低;与 LV – control 干预组比较,LV – PGC – 1α 干预组的 mtDNA 复制数增加,详见图 5。



·iΎ

图 5 HepG2 细胞 mtDNA 拷贝数变化

7. Western blot 法检测脂质氧化相关因子、线粒体生物合成因子的蛋白表达:与对照组比较,FFA 模型组的脂质氧化相关因子 PPARα和 CPT - 1A的表达显著下调、线粒体生物合成相关因子 PGC - 1α、 NRF - 1、mtTFA的表达下降。与LV - control 干预组比较,LV - PGC - 1α干预组 PPARα显著上调,PGC - 1α、NRF - 1、mtTFA的表达显著增加,详见图6、表4。 PGC - 1α过表达通过增加线粒体的生物合成,促进脂质氧化分解来减轻 FFA 引起 HepG2 细胞的脂质蓄积。

表 4 各组细胞脂质分解相关因子、线粒体生物合成因子的蛋白表达(x ± s)

组别	PPARα	CPT – 1 A	PGC – 1 a	NRF – 1	mtTFA
对照组	$1.04 \pm 0.26$	$1.03 \pm 0.22$	$1.01 \pm 0.21$	$1.00 \pm 0.28$	$1.03 \pm 0.27$
FFA 模型组	$0.63 \pm 0.09$ **	$0.54 \pm 0.08$ **	$0.61 \pm 0.03$ **	$0.60 \pm 0.16$ *	$0.81 \pm 0.13$
LV – PGC – 1α 干预组	$0.81 \pm 0.11$ * #	$0.67 \pm 0.16$ **	$1.77 \pm 0.24$ *** ###	1.36 ± 0.35 * ###	1.39 ± 0.29 * ##
LV - control 干预组	$0.59 \pm 0.08$ ***	$0.52 \pm 0.09$ ***	$0.56 \pm 0.11$ **	$0.58 \pm 0.10$ *	$0.80 \pm 0.12$
F	8.836	9.912	53.549	11.543	6.472
Р	0.001	0.001	< 0.001	< 0.001	0.007

与对照组比较,\*P<0.05,\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.001;与LV-control 干预组比较,\*P<0.05,\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.001

## 讨 论

NAFLD 病理表现为脂质异常积聚在肝细胞,其 中棕榈酸和油酸是人体内普遍的饱和脂肪酸和单不 饱和脂肪酸<sup>[11,12]</sup>。多项机制研究表明,FFA 和 TG 造 成的肝脏脂毒性与 NAFLD 严重程度密切相关。FFA 激发内质网应激、线粒体应激,通过激活氧化应激相 关信号通路以及炎性信号通路,诱导脂质代谢紊乱、 炎性反应和凋亡<sup>[13,14]</sup>。本研究用 FFA 诱导 HepG2 细胞造成 NAFLD 模型,LV – PGC – 1α 干预后观察其 对脂质蓄积的作用。结果表明,PGC – 1α 过表达,细 胞内 TG 和 TC 含量显著降低,脂滴蓄积减少,AST 和 ALT 水平降低,氧化应激指标下降,细胞 ATP 含量增加,mtDNA 复制倍数增加,脂质氧化和线粒体生物合成相关蛋白的表达增加。即 PGC -1α 通过增强线粒体生物合成、ATP 生成、加强脂肪酸氧化分解,降低HepG2 细胞脂质蓄积。

NAFLD 患者肝脏以 TG 的形式堆积脂肪,而 TG 主要来源于 FFA 等的酯化作用<sup>[15]</sup>。核激素受体包 括调节脂质代谢的遗传网络的配体激活的转录因子, 包括 PPARα,固醇调节元件结合蛋白等<sup>[16,17]</sup>。核激 素受体不仅能作为转录因子调节基因表达,还可以结 合脂质分子作为细胞内受体。固醇调节元件结合蛋 ・论 着



图 6 脂质分解相关因子、线粒体生物合成因子的蛋白表达

白 - 1c 主要控制脂肪酸生物合成基因, PPARα 参与 调节脂肪酸的氧化, CPT - 1 是催化脂肪酸氧化的关 键限速酶, 促进脂肪酸分解。肝脏脂质的分解途径有 脂肪酸氧化, 以极低密度脂蛋白将 TG 运出肝脏<sup>[18]</sup>。 脂代谢吸收、合成和分解过程中的任何一个环节异 常, 都可能导致肝脏脂质过度蓄积。本研究结果显 示, PGC - 1α 过表达后, 脂质分解相关基因 PPARα 和 CPT - 1 上调。

NAFLD 病理情况下,TG 分解时脂肪酸 β 氧化作 用加强。线粒体氧化磷酸化过程中会产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS),适量的 ROS 被机体的 抗氧化系统清除,但是过量的 ROS 引起细胞的氧化 应激<sup>[19]</sup>。mtDNA 是独立的双链 DNA,因为缺乏 DNA 修复酶,更容易受到 ROS 的攻击<sup>[20]</sup>。线粒体既是 ROS 的主要来源,也是 ROS 攻击的主要靶标。首先, ROS 攻击 mtDNA 发生氧化损伤,氧化应激通过形成 氧自由基破坏细胞蛋白质和核酸分子(DNA/RNA) 的结构与功能。8-羟基脱氧鸟嘌呤核苷是 mtDNA 损伤的一种分子标志物<sup>[21]</sup>。氧化应激加速细胞膜脂 质过氧化,期间伴随着 MDA 的含量增加,抗氧化酶 SOD 和 GSH - PX 经过消耗其活性降低<sup>[22,23]</sup>。其次, 线粒体 PGC - 1α 调控 mtDNA 的生物合成,表现为其 靶基因下调后,mtDNA 的拷贝数减少,氧化磷酸化速 率减慢,使得 ATP 含量下降<sup>[24]</sup>。

本研究中 PGC - 1α 过表达减轻脂质氧化应激, 线粒体生物合成增加,ATP 含量上调,脂质氧化分解 增强,降低肝细胞的脂质蓄积<sup>[25]</sup>。先前研究证实,在 PGC - 1α 基因缺乏小鼠的主动脉中 NRF - 1 和 mtTFA 蛋白表达下降,加速小鼠主动脉血管的老化,这 与本研究结果一致<sup>[26,27]</sup>。

综上所述, FFA 诱导 HepG2 细胞形成过量的 TG,造成脂质蓄积,引起细胞氧化应激和线粒体功能 障碍,脂质氧化速率减缓。本研究进一步明确, PGC - 1α过表达促进脂质分解相关因子 PPARα 和 CPT - 1上调,线粒体生物合成因子 NRF - 1、mtTFA 的表达显著增加,增强肝细胞线粒体的β氧化,降低 肝脏的氧化应激损伤和脂质蓄积,为非酒精性脂肪肝 病的治疗找到新的作用靶点提供了思路和参考依据。

本研究也存在一定局限性,如仅探讨了 NAFLD 病变中线粒体生物合成相关的因子和肝脏脂质氧化 分解相关的基因的表达,有待于全面系统探讨肝脏脂 质合成和代谢的其他转录因子的表达情况。肝脏作 为人体脂质代谢的核心器官,通过调节 TG 和 TC 的 代谢,影响作用于循环系统的的脂质水平,深入探讨 肝脏线粒体对于脂质的调节机制,对于预防和治疗高 脂血症、动脉粥样硬化等疾病具有重要的参考价值。

#### 参考文献

- 1 Lazarus JV, Mark HE, Villota Rivas M, et al. The global NAFLD policy review and preparedness index: are countries ready to address this silent public health challenge? [J]. J Hepatol, 2022, 76: 771 – 780
- 2 Paik JM, Kabbara K, Eberly KE, et al. Global burden of NAFLD and chronic liver disease among adolescents and young adults [J]. Hepatology, 2022, 75: 1204 - 1217
- 3 Speliotes EK, George J. Metabolic and genetic contributions to NAFLD: Really distinct and homogeneous? [J]. J Hepatol, 2022, 76: 498-500
- 4 Lu Z, Sun GF, Pan XA, et al. BCATc inhibitor 2 ameliorated mitochondrial dysfunction and apoptosis in oleic acid – induced non – alcoholic fatty liver disease model [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1025551
- 5 林楚曼,方俊博,向倩如,等. Exendin 4 通过促进自噬减少 非酒精性脂肪性肝病细胞模型的脂质沉积[J].南方医科大学学 报,2021,41(7):1073-1078
- 6 Liu Y, Wang S, Zhang X, et al. The regulation and characterization of mitochondrial – derived methylmalonic acid in mitochondrial dysfunction and oxidative stress: from basic research to clinical practice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022; 7043883
- 7 Scorletti E, Carr RM. A new perspective on NAFLD: focusing on lipid droplets[J]. J Hepatol, 2022, 76: 934 - 945
- 8 李蒙蒙, 贾岩, 王飞虾, 等. 线粒体功能障碍与慢性肝病[J]. 生理科学进展, 2018, 49(2): 81-86
- 9 He L, Li Y, Zhang D, et al. Dapagliflozin improves endothelial cell dysfunction by regulating mitochondrial production via the SIRT1/ PGC -1α pathway in obese mice [J]. BiochemBiophys Res Commun, 2022, 615: 123 - 130

• 84 •

- 16 Adachi K, Sugiyama T, Yamaguchi Y, et al. Gut microbiota disorders cause type 2diabetes mellitus and homeostatic disturbances in gut – related metabolism in Japanese subjects [J]. J Clin Biochem Nutr, 2019, 64(3): 231 – 238
- 17 Mariño E, Richards JL, McLeod KH, et al. Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1diabetes[J]. Nat Immunol, 2017, 18(5): 552-562
- 18 Pingitore A, Chambers ES, Hill T, et al. The diet derived short chain fatty acid propionate improves beta – cell function in humans and stimulates insulin secretion from human islets in vitro[J]. Diabetes Obes Metab, 2017, 19(2): 257 – 265
- 19 Baeeri M, Rahimifard M, Daghighi SM, et al. Cannabinoids as anti - ROS in aged pancreatic islet cells [J]. Life Sci, 2020, 256: 117969
- 20 Sha W, Hu F, Bu S. Mitochondrial dysfunction and pancreatic islet  $\beta$  cell failure (Review) [J]. Exp Ther Med, 2020, 20(6): 266
- 21 Sidarala V, Pearson GL, Parekh VS, et al. Mitophagy protects  $\beta$  cells from inflammatory damage in diabetes [J]. JCI Insight, 2020, 5

(上接第84页)

- 10 Silva J, Spatz MH, Folk C, et al. Dihydromyricetin improves mitochondrial outcomes in the liver of alcohol – fed mice via the AMPK/ Sirt – 1/PGC – 1α signaling axis[J]. Alcohol, 2021, 91: 1-9
- 11 Trauner M, Fuchs CD. Novel therapeutic targets for cholestatic and fatty liver disease[J]. Gut, 2022, 71: 194 - 209
- 12 Kanwal F, Shubrook JH, Adams LA, et al. Clinical care pathway for the risk stratification and management of patients with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Gastroenterology, 2021, 161: 1657 - 1669
- 13 Li YF, Xu JY, Lu YT, et al. DRAK2 aggravates nonalcoholic fatty liver disease progression through SRSF6 – associated RNA alternative splicing[J]. Cell Metab, 2021, 33: 2004 – 2020,e9
- 14 Du DY, Liu C, Qin MY, et al. Metabolic dysregulation and emerging therapeutical targets for hepatocellular carcinoma[J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12: 558 - 580
- 15 Byrnes K, Blessinger S, Bailey NT, et al. Therapeutic regulation of autophagy in hepatic metabolism [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12: 33-49
- 16 Luo YX, Guo JB, Jia WX, et al. TNF like ligand 1 aberrance aggravates nonalcoholic steatohepatitis via M1 macrophage polarization [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 3877617
- 17 Zeng H, Qin H, Liao M, et al. CD36 promotes de novo lipogenesis in hepatocytes through INSIG2 – dependent SREBP1 processing[J]. Mol Metab, 2022, 57: 101428
- 18 Govaere O, Petersen SK, Martinez Lopez N, et al. Macrophage scavenger receptor 1 mediates lipid - induced inflammation in non - alcoholic fatty liver disease[J]. J Hepatol, 2022, 76: 1001 - 1012
- 19 O'Brien KA, McNally BD, Sowton AP, et al. Enhanced hepatic respiratory capacity and altered lipid metabolism support metabolic homeostasis during short - term hypoxic stress [J]. BMC Biol, 2021, 19: 265

(24): e141138

- 22 Pearson GL, Gingerich MA, Walker EM, et al. A selective look at autophagy in pancreatic β - cells [J]. Diabetes, 2021, 70 (6): 1229 - 1241
- 23 Lee YH, Kim J, Park K, et al. β cell autophagy: mechanism and role in β – cell dysfunction [J]. Mol Metab, 2019, 27S (Suppl): S92 – S103
- 24 Yang S, Xia C, Li S, et al. Defective mitophagy driven by dysregulation of rheb and KIF5B contributes to mitochondrial reactive oxygen species (ROS) - induced nod - like receptor 3 (NLRP3) dependent proinflammatory response and aggravates lipotoxicity[J]. Redox Biol, 2014, 3: 63 - 71
- 25 Guo T, Liu T, Sun Y, et al. Sonodynamic therapy inhibits palmitate induced beta cell dysfunction via PINK1/Parkin – dependent mitophagy[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6): 457

(收稿日期: 2022-07-28) (修回日期: 2022-09-29)

- 20 Bi YK, Guo XJ, Zhang MQ, et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cell improves diabetes – associated fatty liver via mitochondria transformation in mice[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12: 602
- 21 Broome S C, PhamT, Braakhuis AJ, et al. MitoQ supplementation augments acute exercise – induced increases in muscle PGC1α mRNA and improves training – induced increases in peak power independent of mitochondrial content and function in untrained middle – aged men [J]. Redox Biol, 2022, 53: 102341
- 22 Fernández Vizarra E, Callegari S, Garrabou G, et al. Editorial: mitochondrial OXPHOS system: emerging concepts and technologies and role in disease[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 924272
- 23 Lurette O, Guedouari H, Morris JL, et al. Mitochondrial matrix localized Src kinase regulates mitochondrial morphology [J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79: 327
- Zhao TT, Gu JL, Zhang HX, et al. Sodium butyrate modulated mitochondrial function in high - Insulin induced HepG2 cell dysfunction
  [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 1904609
- 25 He F, Jin JQ, Qin QQ, et al. Resistin regulates fatty acid B oxidation by suppressing expression of peroxisome proliferator activator receptor gamma – coactivator 1α (PGC – 1α) [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46: 2165 – 2172
- 26 Han H, Guo Y, Li XY, et al. αPlant sterol ester of linolenic acid attenuates nonalcoholic fatty liver disease by rescuing the adaption to endoplasmic reticulum stress and enhancing mitochondrial biogenesis [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019; 8294141
- 27 Khan SA, Sathyanarayan A, Mashek MT, et al. ATGL catalyzed lipolysis regulates SIRT1 to control PGC 1α/PPAR α signaling[J]. Diabetes, 2015, 64: 418 426

(收稿日期:2022-12-02) (修回日期:2022-12-28)