DOI:10.16016/j.2097-0927.202401003

槲皮素通过上调脂解和脂噬途径改善肝细胞脂质蓄积

张 艳,杨依林,袁家奇,糜漫天,秦 玉 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系营养与食品安全研究中心,重庆市医学营养研究中心,重庆市营养与健康重点实验室

[**摘要**] **目的** 明确槲皮素(quercetin,QUE)通过调控脂解及脂噬途径改善肝细胞脂质蓄积的效应及作用机制。**方法** 利用棕榈酸(palmitic acid,PA)诱导人正常 HHL-5 肝细胞株(human hepatocyte cell line 5, HHL-5)建立脂肪变性肝细胞模型,使用不同浓度槲皮素(5、10、20 和 40 μmol/L)干预脂肪变性的 HHL-5 细胞 24 h,实验分为(n=3):对照组、PA 组、PA+QUE5 组、PA+QUE10 组、PA+QUE20 组、PA+QUE40 组。为明确自噬对 QUE 作用的影响,利用 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine,3-MA)阻断自噬,将 HHL-5 细胞分为(n=3):对照组、PA 组、PA+QUE40 组、3-MA 组、PA+3-MA 组和 PA+3-MA+QUE40 组。2 种不同实验分组均检测细胞内甘油三酯含量、脂滴蓄积情况、脂解和脂噬相关分子表达情况及共定位水平、自噬底物 P62 的表达水平。**结果** 与对照组比较,PA 组肝细胞的甘油三酯含量和脂质蓄积程度明显升高,脂解相关分子脂肪甘油三酯脂肪酶(adipose triglycerides lipase,ATGL)和比较基因识别因子 58(comparative gene identification-58,CGI58),以及脂噬相关分子 Ras 相关蛋白 7(Ras-related protein 7, RAB7)和微管相关蛋白 1B 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3β)的蛋白表达水平、平均荧光强度及共定位程度均明显降低,而 P62 表达增强(P<0.05)。与 PA 组相比,PA+QUE40 组的甘油三酯含量和脂质蓄积程度显著降低,脂解和脂噬相关分子的蛋白表达水平、平均荧光强度及共定位程度也明显增加,而 P62 明显降低(P<0.05)。在脂肪变性肝细胞中加入 3-MA 抑制自噬后,QUE 对脂肪变性肝细胞的脂质蓄积的改善作用以及对脂解和脂噬相关分子的调控作用基本被抵消。**结论** 槲皮素可促进脂解和脂噬途径相关分子的表达及相互作用,从而减轻脂肪变性 HHL-5 细胞内的脂质蓄积,但以上作用可被自噬阻断剂 3-MA 削弱。

[**关键词**] 槲皮素;肝脂质蓄积;脂解;脂噬
[**中图法分类号**] Q591.5; R285.5; R575.5 [**文献标志码**] A

Quercetin improves hepatic lipid accumulation by up-regulating lipolysis and lipophagy pathways

ZHANG Yan, YANG Yilin, YUAN Jiaqi, MI Mantian, QIN Yu Research Center for Nutrition and Food Safety, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Health, Chongqing Medical Nutrition Research Center, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect and mechanism of quercetin (QUE) in improving lipid accumulation in hepatocytes by regulating lipolysis and lipophagy pathway. **Methods** The human hepatocyte cell line 5 (HHL-5) was induced by palmitic acid (PA) to establish a steatogenic hepatocyte model. Quercetin at different concentrations (5, 10, 20 and 40 μmol/L) has been utilized to interfere with HHL-5 cells for 24 h, and the experiment was divided into six groups: control group, PA group, PA+QUE5 group, PA+QUE10 group, PA+QUE20 groupand PA+QUE40 group. In order to determine the influence of lipophagy on QUE effect, 3-methyladenine (3-MA) was used to block autophagy, and HHL-5 cells were

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81973037)
[**通信作者**] 秦 玉, E-mail:qinyu@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

divided into the control, PA, PA+QUE40, 3-MA, PA+3-MA and PA+3-MA+QUE40 groups. The contents of triglyceride (TG), accumulations of lipid droplets, expression of lipolysis and lipophagy related molecules, and degree of co-localization, and expression level of substrate of autophagy P62 were detected in above 2 types of experimental groups. **Results** Compared with the control group, the TG content and the lipid accumulation were significantly increased, the protein levels, average fluorescence intensities and colocalization degree of lipolysis related molecules adipose triglycerides lipase(ATGL) and comparative gene identification-58(CGI58), and lipophagy related molecules Ras-related protein 7(RAB7) and microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta (LC3β) were significantly decreased, while the expression of P62 was enhanced in HHL-5 cells in the PA group (all $P<0.05$). Compared with the PA group, the triglyceride content and the degree of lipid accumulation in the PA+QUE40 group were significantly decreased, and the protein expression level, average fluorescence intensity and co-localization degree of lipolysis and lipophagy related molecules were significantly increased, while P62 was significantly decreased ($P<0.05$). When 3-MA was added to the steatogenic hepatocytes to inhibit autophagy, the improvement effect of QUE on lipid accumulation and the regulation of lipolysis and liphagy related molecules in steatogenic hepatocytes were neutralized. **Conclusion** QUE alleviates lipid accumulation in HHL-5 cells by promoting the expression and interaction of molecules related to lipolysis and lipophagy pathways. However, these effects can be weakened by the autophagy inhibitor 3-MA.

[**Key words**] quercetin; hepatic lipid accumulation; lipolysis; lipophagy

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81973037). Corresponding author: QIN Yu, E-mail: qinyu@tmmu.edu.cn

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease,NAFLD)已成为世界性的重大公共卫生问题之一,其全球患病率从 2016 年的 25%急剧上升至 2019 年的 38%以上[1]。肝细胞内富含甘油三酯的脂滴大量蓄积是 NAFLD 的起始阶段,而脂肪分解有脂解和脂噬途径,并以脂噬为主。脂解过程中,中性脂肪酶脂肪甘油三酯脂肪酶(adipose triglycerides lipase,ATGL)与比较基因识别因子 58(comparative gene identification-58,CGI58)结合后,将甘油三酯分解为脂肪酸和甘油[2]。脂噬过程中,微管相关蛋白 1B 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3,LC3β)识别脂滴上的受体并与 ATGL 结合,在 Ras 相关蛋白 7(Ras-related protein 7,RAB7)等分子的共同作用下,促进脂滴被双层囊泡膜包裹形成自噬体,随后与溶酶体融合形成自噬溶酶体,溶酶体中的酸性脂肪酶再分解甘油三酯[3]。近年来研究发现,脂噬失衡与肝脏脂质代谢紊乱有关,而促进脂噬是解决肝脏疾病的有效方法[4]。

有研究者采用动物实验证明槲皮素(quercetin,QUE)可显著改善 NAFLD,其作用机制包括抑制促炎因子表达、抗氧化应激、改善胰岛素抵抗等[5-8]。但槲皮素对于脂质分解的调控机制还未完全阐明。现有文献报道多以脂肪变性的 HepG2 细胞为模型进行槲皮素改善肝脂质分解的研究,该细胞为肿瘤细胞,与正常的人肝细胞存在明显差异。如采用人正常肝细胞株(human hepatocyte cell line 5,HHL-5)进行研究,则能更贴近正常人体环境,可更真实地观察到槲皮素在正常人肝细胞内对肝脂质分解的影响。为明确脂解和脂噬途径在槲皮素改善 NAFLD 中的作用,本研究以脂肪变性的人正常肝细胞株 HHL-5 作为研究材料,探讨槲皮素对脂解和脂噬相关分子的表达及共定位的影响,并采用自噬阻断剂 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine,3-MA)阻断自噬过程以进一步明确槲皮素对脂噬的调控。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

HHL-5 细胞由英国格斯拉大学病毒研究中心 Arvind Patel 教授馈赠。在 37 ℃、5%CO_2的培养箱内,HHL-5 用含 10%胎牛血清、1%双抗(青-链霉素)的 DMEM 高糖培养基培养。细胞生长到对数期(细胞密度约为 80%)进行实验。

1.2 主要试剂

DMEM 高糖培养基、胎牛血清以及双抗购自美国 HyClone 公司,槲皮素和棕榈酸(palmitic acid,PA)购自美国 Sigma 公司,3-MA 购自中国 ABclonal 公司,甘油三酯(triglyceride,TG)检测试剂盒购自中国南京建成生物工程所,引物由中国生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成,RNA 提取试剂、反转录试剂盒及定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司,ATGL、RAB7、LC3β、CGI58、P62、PKA 抗体购自 ABclonal 公司。

1.3 CCK8 测定细胞活力

将 HHL-5 细胞按 4 000/孔接种到 96 孔板,采用槲皮素 0、5、10、20、40、80 μmol/L 干预 HHL-5 细胞 24 h 后,按照说明书进行 CCK8 实验。每组设立 3 个复孔。

1.4 实验分组

1.4.1 槲皮素通过调控脂解和脂噬途径改善脂肪变性肝细胞脂质蓄积实验 将 HHL-5 细胞分为(n=3):对照组、PA 组、PA+QUE5 组、PA+QUE10 组、PA+QUE20 组和 PA+QUE40 组。PA 组采用 0.2 mmol/L PA 处理 24 h,建立脂肪变性肝细胞模型;槲皮素处理组在脂肪变性建模后分别采用 5、10、20、40 μmol/L 槲皮素继续干预 24 h 。槲皮素干预浓度和时间参考 HepG2 细胞的研究[9-10],用油红 O 染色、TG 含量测定检测各组肝细胞的脂质蓄积;RT-qPCR、Western blot 和免疫荧光法检测脂解和脂噬相关分子表达和共定位。

1.4.2 抑制自噬削弱槲皮素效应实验 将 HHL-5 细胞分为(n=3):对照组、PA 组、PA+QUE40 组、3-MA 组(仅采用 2.5 mmol/L 3-MA 处理 24 h)、PA+3-MA 组(建模后用 2.5 mmol/L 3-MA 干预 24 h)和 PA+3-MA+QUE40 组(在 PA+3-MA 组干预的基础上再继续更换 40 μmol/L 槲皮素干预 24 h)。对照组、PA 组及 PA+QUE40 组处理方法同 1.4.1。油红 O 染色和 TG 含量测定评价脂质蓄积程度,RT-qPCR、Western blot 和免疫荧光法检测脂解和脂噬相关分子的表达和共定位。

1.5 油红 O 染色

将 HHL-5 细胞按 2×10^4/孔接种于 24 孔板中,按实验分组处理细胞后,清洗细胞、固定、通透、油红 O 染色,在显微镜下观察采集图像。

1.6 细胞 TG 含量测定

将 HHL-5 细胞按 3×10^5/孔接种于 6 孔板中,按实验分组处理细胞后,检测细胞内 TG 含量,结果用细胞蛋白浓度校正,单位为 mmol/g 蛋白。

1.7 RT-qPCR 检测 mRNA 表达

将 HHL-5 细胞按 3×10^5/孔接种到 6 孔板,按实验分组处理细胞后,收集细胞后分离 RNA、反转录、进行 RT-qPCR 。使用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算 mRNA 的表达。

1.8 Western blot 检测蛋白表达

按实验分组处理细胞后,收集细胞提取总蛋白,使用 8%~12% SDS-PAGE 的分离胶进行电泳,湿转、封闭,孵育一抗、二抗,显影,Image J 软件分析条带灰度值。

1.9 免疫荧光染色

将 HHL-5 细胞按 2×10^4/孔接种于 24 孔板中,按实验分组处理细胞后,清洗细胞、固定、通透、封闭,孵育一抗、二抗,DAPI 复染核,最后用防荧光淬灭封片液封片,在激光共聚焦显微镜下观察采集图像。

1.10 统计分析

使用 SPSS 25.0 软件进行数据分析,各个实验至少重复 3 次,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较使用单因素方差分析,使用 LSD 法进行组间两两比较,$P<0.05$ 表示结果存在统计学差异。应用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图。

2 结果

2.1 槲皮素促进脂肪变性 HHL-5 细胞的脂肪分解

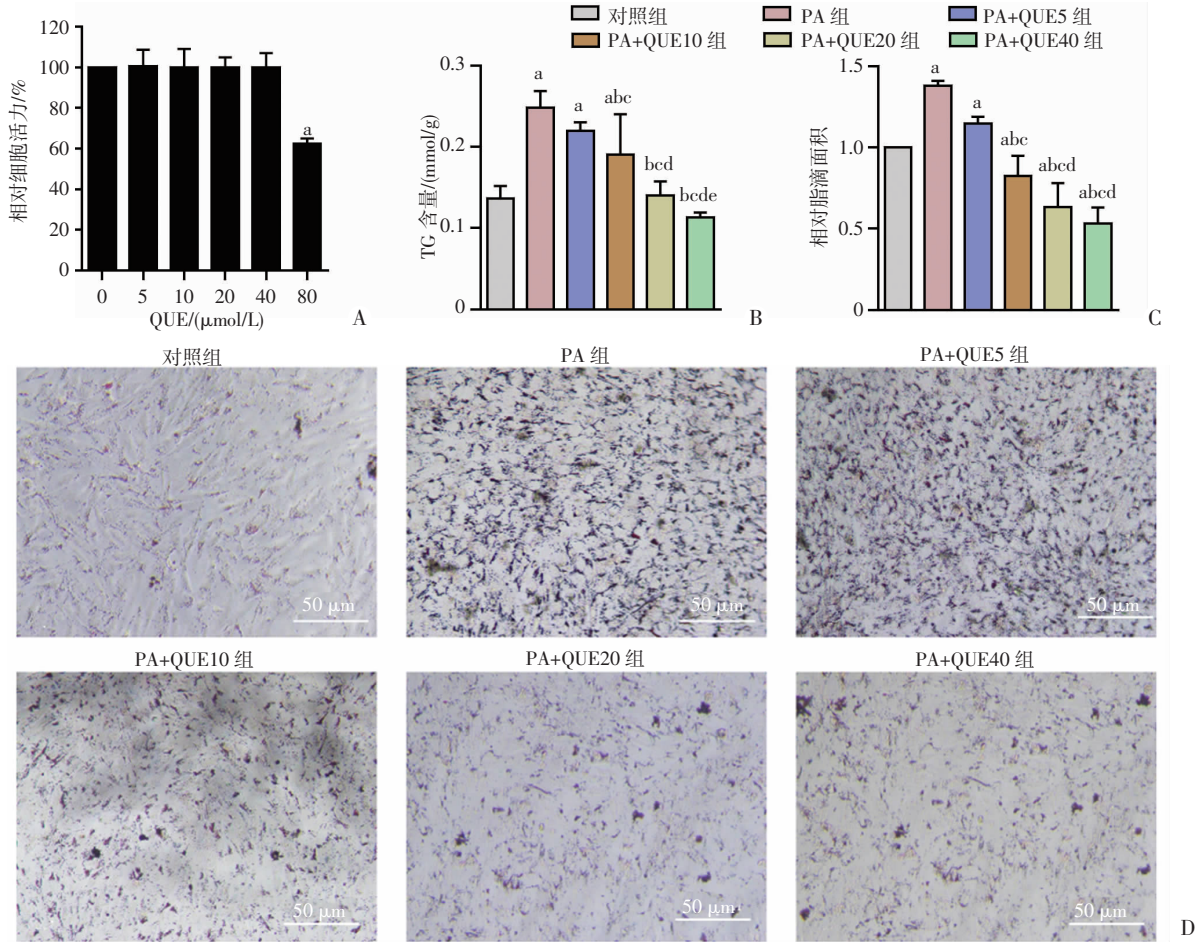
CCK8 法检测细胞活力结果显示:槲皮素浓度在 5、10、20 和 40 μmol/L 时对细胞活力均无明显影响,80 μmol/L 时可显著降低细胞活力(图 1A)。因此,后续实验中不再使用 80 μmol/L 槲皮素进行干预。

如图 1B~D 所示,HHL-5 细胞加入 PA 后,TG 水平明显升高,细胞脂质蓄积明显,呈片状分布。与 PA 组相比,采用 10、20 和 40 μmol/L 的槲皮素干预后因 PA 诱导升高的 TG 水平明显下降,脂滴数量明显减少并呈零星分布($P<0.05$)。40 μmol/L 槲皮素干预使脂肪变性肝细胞内的 TG 水平和脂滴面积减少约 60%。

2.2 槲皮素调控脂解和脂噬相关分子的表达

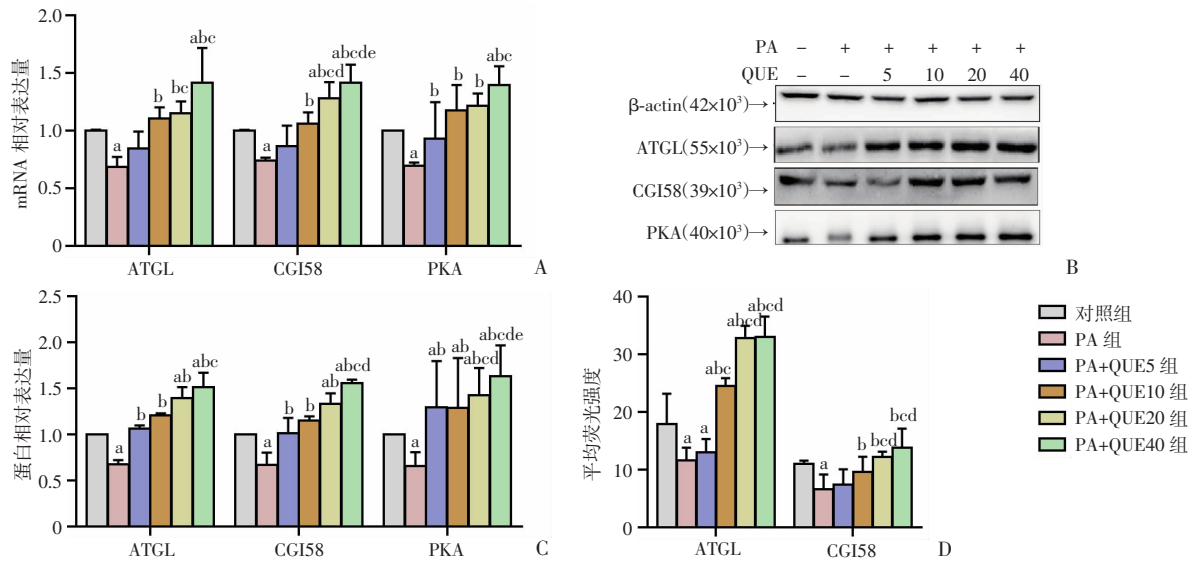
2.2.1 槲皮素干预促进脂肪变性 HHL-5 细胞的脂解相关分子的表达 与对照组比较,加入 PA 后 ATGL、CGI58 和 PKA 的 mRNA 及蛋白水平均明显下降($P<0.05$,图 2A~C)。与 PA 组相比,槲皮素干预浓度在 20 μmol/L 及以上时,脂肪变性肝细胞内的 ATGL、CGI58 和 PKA 的 mRNA 与蛋白水平显著增加($P<0.05$)。与 PA 组相比,ATGL、CGI58 和 PKA 的蛋白水平在 40 μmol/L 槲皮素干预后增加了 1 倍以上($P<0.05$)。利用荧光免疫技术对肝细胞中 ATGL 和 CGI58 进行荧光双标染色,ATGL 为绿色荧光标记,CGI58 为红色荧光标记,可更加直观地反映槲皮素对 2 种分子表达的影响。

由图 2D~E 可知,与对照组比较,PA 组的 ATGL 和 CGI58 荧光强度明显减弱。与 PA 组相比,当槲皮素干预浓度在 10 μmol/L 及以上时可明显增加脂肪变性肝细胞内 ATGL 和 CGI58 的荧光强度,其增加幅度与 Western blot 方法检测的蛋白水平相近。此外,脂肪变性肝细胞内 ATGL 和 CGI58 的共定位水平在槲皮素干预后也明显增强(图 2E)。



A:相对细胞活力;B:细胞内 TG 含量;C:油红 O 染色半定量结果;D:油红 O 染色 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 PA 组比较;c:$P<0.05$,与 PA+QUE5 组比较;d:$P<0.05$,与 PA+QUE10 组比较;e:$P<0.05$,与 PA+QUE20 组比较

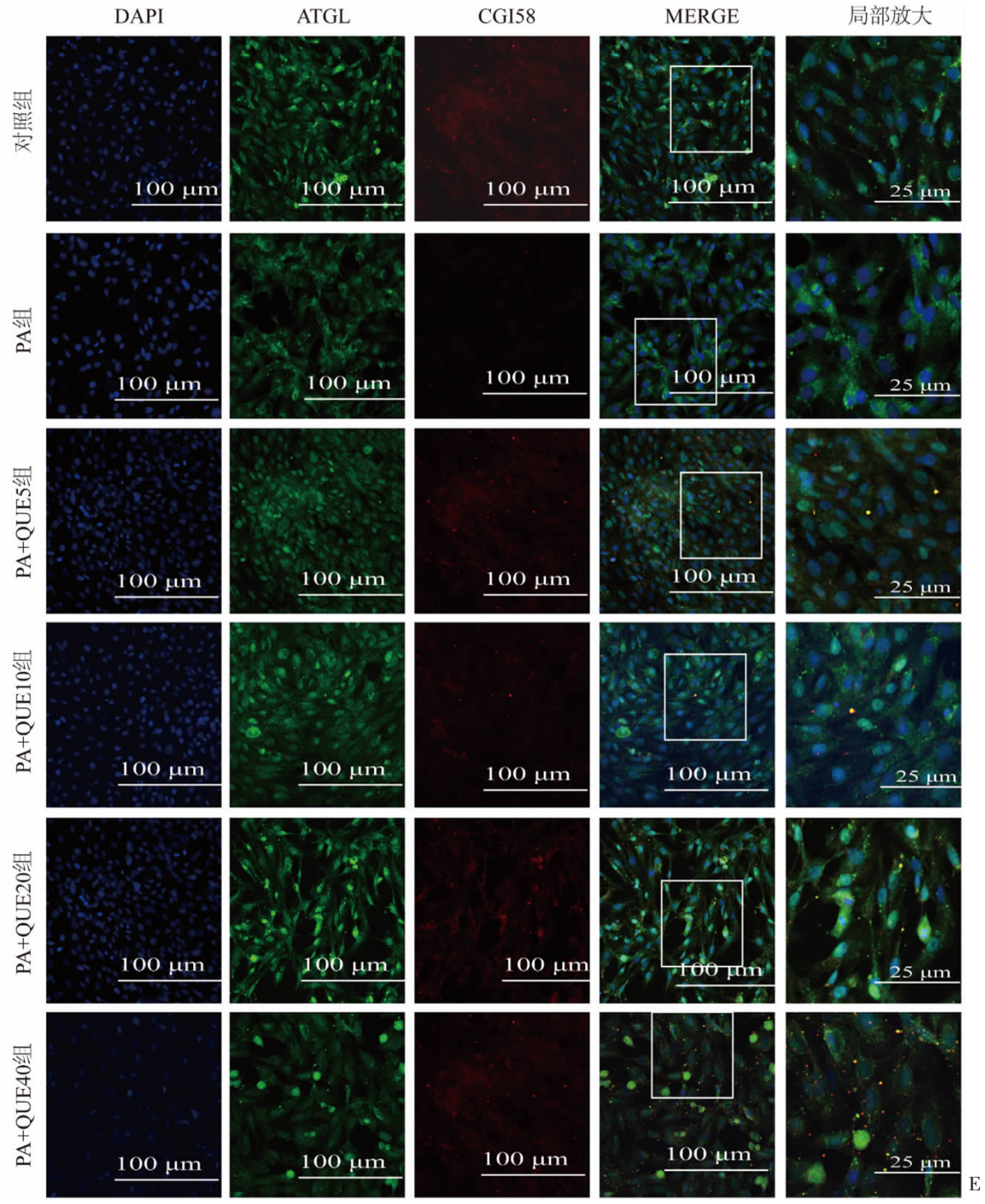
图 1 槲皮素对脂肪变性 HHL-5 肝细胞的细胞活力和脂质蓄积的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)



A:mRNA 表达水平;B:蛋白表达水平;C:蛋白半定量表达结果;D:平均荧光强度统计分析 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 PA 组比较;c:$P<0.05$,与 PA+QUE5 组比较;d:$P<0.05$,与 PA+QUE10 组比较;e:$P<0.05$,与 PA+QUE20 组比较

图 2 槲皮素对脂肪变性 HHL-5 肝细胞 PKA、ATGL 和 CGI58 表达的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

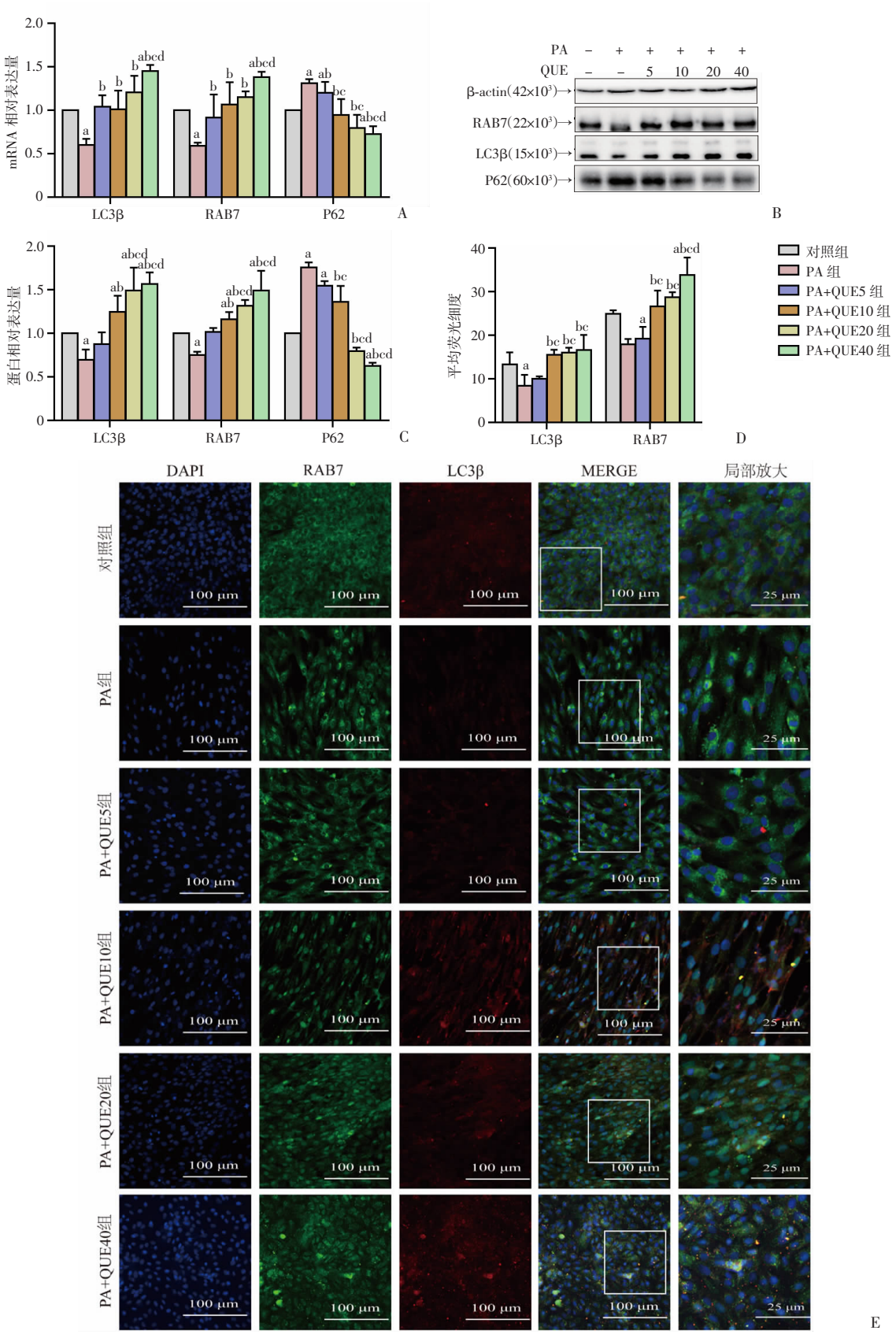
(图 2E 续下页)



E:激光共聚焦显微镜下观察荧光强度及共定位情况

续图 2 槲皮素对脂肪变性 HHL-5 肝细胞 PKA、ATGL 和 CGI58 表达的影响 ($n=3, \bar{x}\pm s$)

2.2.2 槲皮素干预促进脂肪变性 HHL-5 细胞的脂噬相关分子的表达 HHL-5 细胞在 PA 干预后,RAB7、LC3β 的 mRNA 与蛋白水平均下降,而 P62 则明显上升(图 3A~C)。与 PA 组相比,10、20 和 40 μmol/L 槲皮素干预脂肪变性肝细胞后,RAB7、LC3β 的 mRNA 与蛋白水平升高了 50%以上,在 40 μmol/L 时升高更为显著($P<0.05$),P62 则降低了 40%。细胞免疫荧光结果显示:脂肪变性肝细胞内降低的 RAB7(绿色荧光)和 LC3β(红色荧光)水平在 10 μmol/L 及以上浓度的槲皮素干预后,其荧光强度显著升高(图 3D~E)。此外,10、20 和 40 μmol/L 槲皮素干预组的脂肪变性肝细胞内黄色荧光区域增强,也表明了 RAB7 和 LC3β 的共定位程度增加(图 3E)。



A:mRNA 表达水平;B:蛋白表达水平;C:蛋白半定量表达结果;D:统计分析平均荧光强度结果;E:激光共聚焦显微镜下观察荧光强度及共定位情况 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 PA 组比较;c:$P<0.05$,与 PA+QUE5 组比较; d: $P<0.05$,与 PA+QUE10 组比较

图 3 槲皮素干预对脂肪变性 HHL-5 细胞脂噬相关分子的影响 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

2.3　抑制自噬对槲皮素促进肝细胞脂肪分解的影响

研究采用自噬阻断剂 3-MA 干预脂肪变性肝细胞 24 h 后再进行槲皮素干预,以验证槲皮素对脂肪变性肝细胞的脂噬调控作用。如图 4 所示,与 PA 组相比,3-MA 处理后脂肪变性肝细胞内 TG 水平和脂滴蓄积程度进一步升高($P<0.05$)。再给予 40 μmol/L 槲皮素干预后,脂肪变性肝细胞内的 TG 水平与脂滴面积均没有明显减少,且脂质蓄积程度高于 PA+QUE40 组 2 倍以上。结果表明槲皮素抑制 PA 诱导的 HHL-5 细胞脂肪变性的作用在加入 3-MA 阻断自噬后几乎完全消除了。

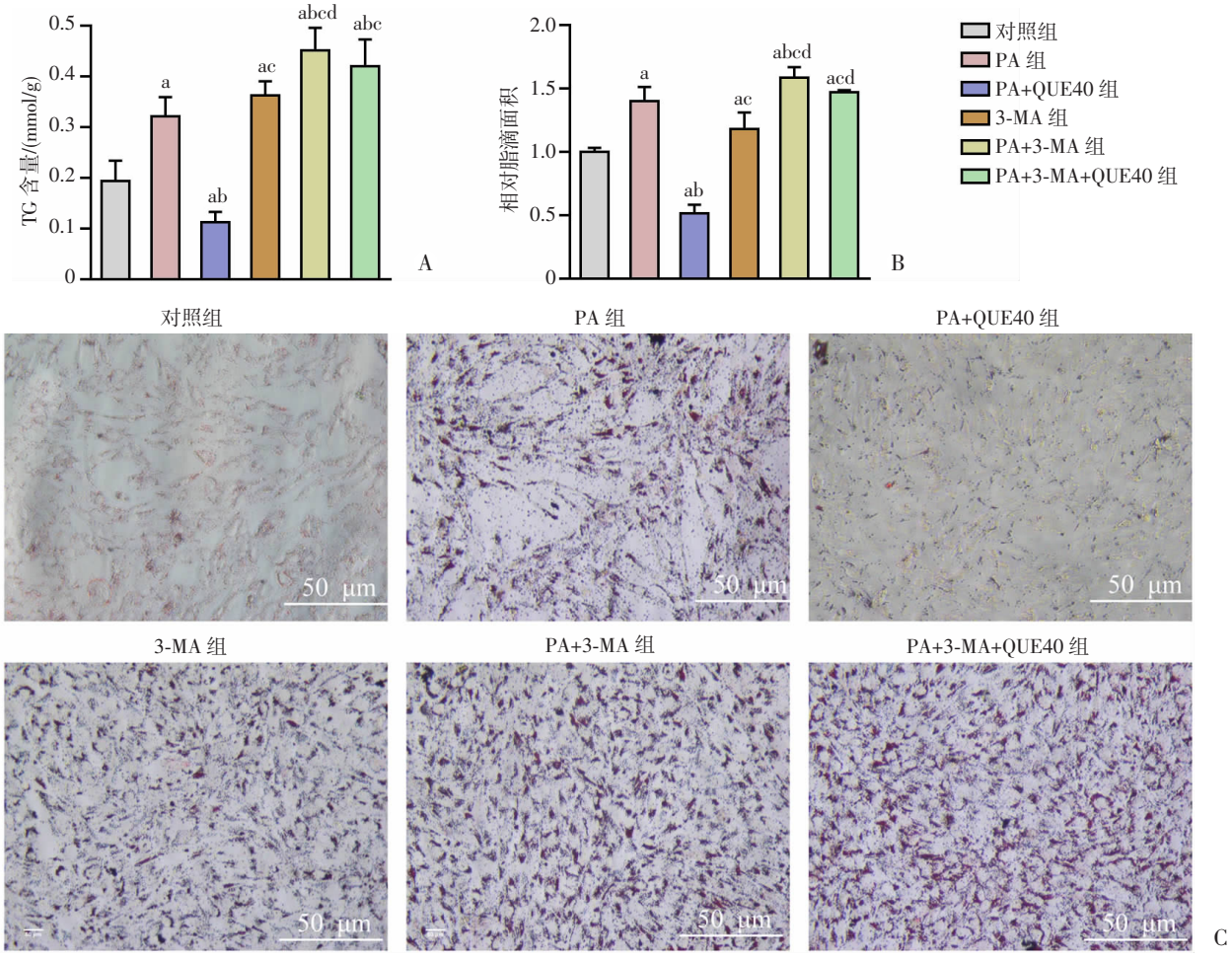
2.4　抑制自噬对槲皮素上调肝细胞脂解和脂噬相关分子表达的影响

2.4.1　抑制自噬对槲皮素上调肝细胞脂解相关分子表达的影响

给予 3-MA 后的脂肪变性肝细胞,再给予槲皮素干预并不能升高细胞内的脂解相关分子 PKA、ATGL 和 CGI58 的 mRNA、蛋白表达和荧光强度(图 5)。结果表明,加入 3-MA 后,槲皮素对肝细胞的脂解分子的上调作用变得很微弱。

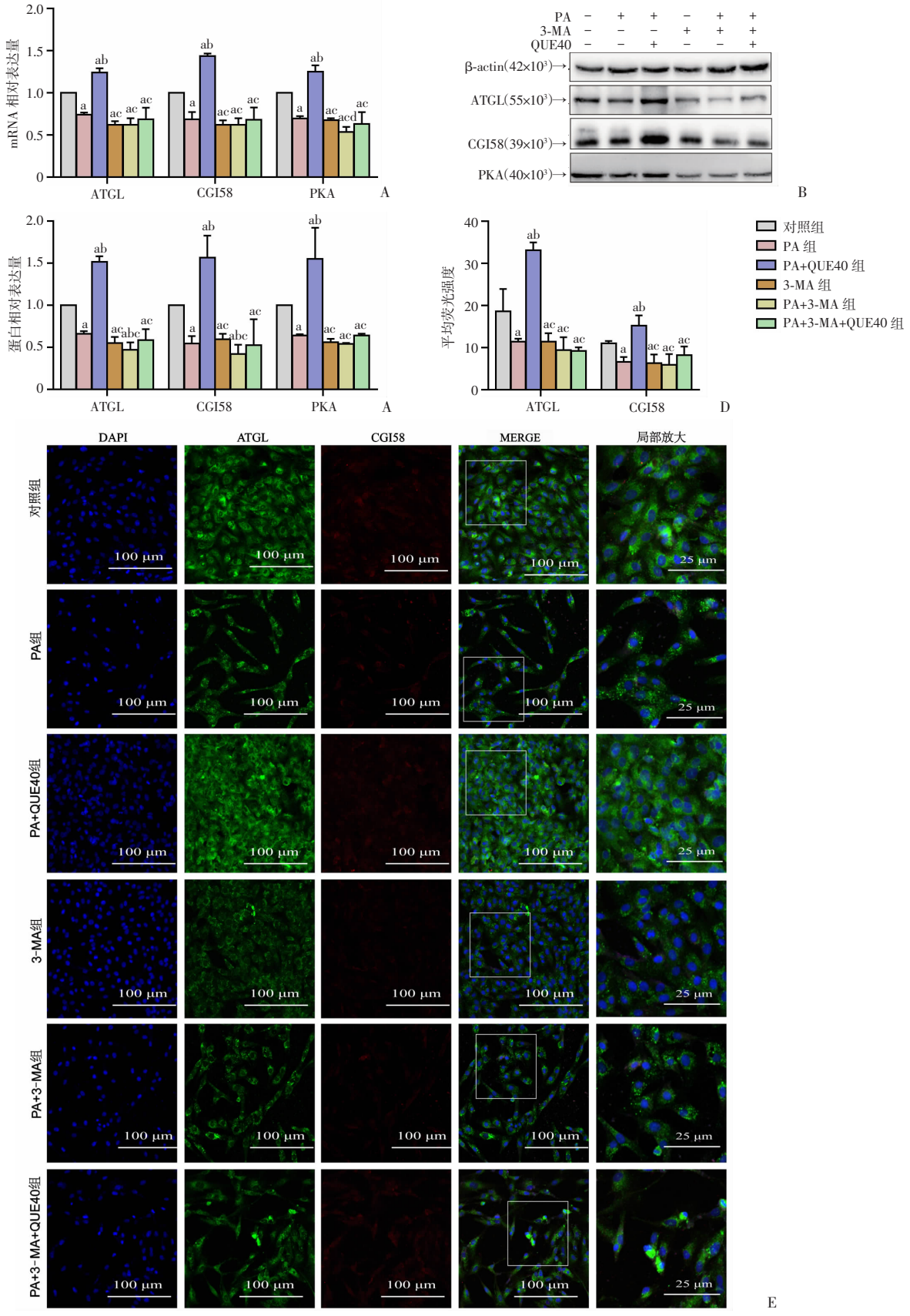
2.4.2　抑制自噬影响槲皮素对肝细胞脂噬相关分子表达的调控

如图 6 所示,与 PA 组或 PA+3-MA 组相比,PA+3-MA+QUE40 组脂噬相关分子 RAB7、LC3β 和 P62 的 mRNA、蛋白表达和荧光强度都没有明显影响($P>0.05$)。结果表明,槲皮素对脂噬相关分子的调控作用在加入 3-MA 后被明显削弱了。



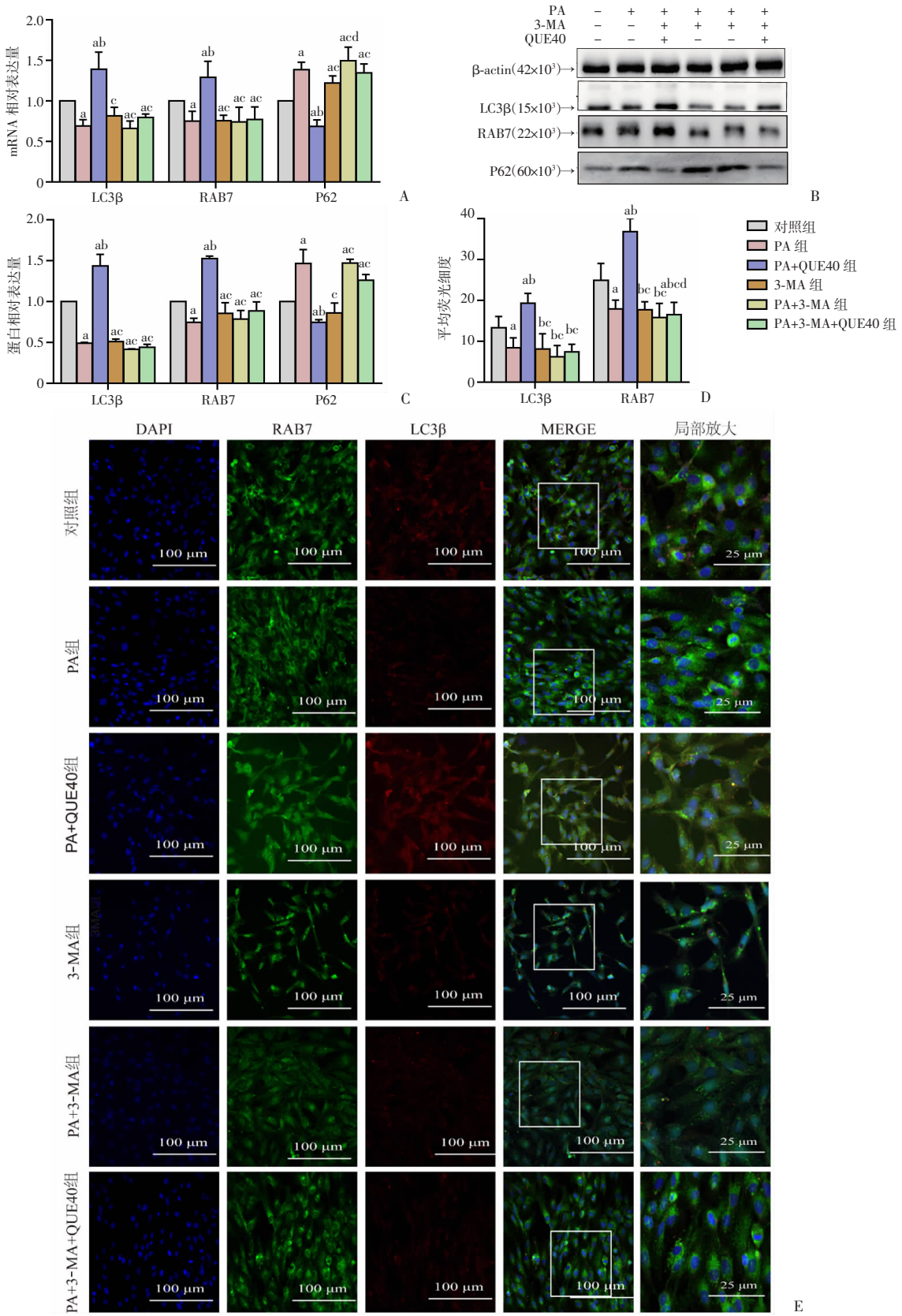
A:TG 含量;B:油红 O 染色半定量结果;C:油红 O 染色　a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 PA 组比较;c:$P<0.05$,与 PA+QUE40 组比较;d:$P<0.05$,与 3-MA 组比较

图 4　3-MA 对槲皮素改善脂肪变性 HHL-5 脂肪分解的影响　($n=3,\bar{x}\pm s$)



A:mRNA 表达水平;B:蛋白表达水平;C:蛋白半定量表达结果;D:统计分析平均荧光强度结果;E:激光共聚焦显微镜下观察荧光强度及共定位情况 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 PA 组比较;c:$P<0.05$,与 PA+QUE40 组比较; d: $P<0.05$,与 3-MA 组比较

图 5 3-MA 对槲皮素上调脂肪变性 HHL-5 肝细胞脂解相关分子表达的影响 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



A:mRNA 表达水平;B:蛋白表达水平;C:蛋白半定量表达结果;D:统计分析平均荧光强度结果;E:激光共聚焦显微镜下观察荧光强度及共定位情况 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 PA 组比较;c:$P<0.05$,与 PA+QUE40 组比较;d:$P<0.05$,与 3-MA 组比较

图 6 3-MA 对槲皮素上调脂肪变性 HHL-5 肝细胞脂噬相关分子表达的影响 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

3 讨论

3.1 槲皮素有效改善脂肪变性肝细胞的脂质蓄积

脂质代谢异常造成的肝脂肪变性是最常见的肝脏病变,可增加脂肪性肝炎和肝硬化的发生风险。本研究发现,槲皮素可以显著降低脂肪变性肝细胞内的 TG 水平和脂质蓄积程度,有效减轻肝细胞的脂肪变性。本研究结果与槲皮素在其他细胞的研究结果一致。有研究表明,槲皮素干预可以减轻 3T3-L1 脂肪细胞、人骨骼肌细胞、脂肪变性 HepG2 细胞和 AML12 肝细胞(小鼠来源正常肝细胞)的脂质蓄积[11-14]。与以往研究不同,本研究在人来源的正常肝细胞 HHL-5 细胞中进一步证实了槲皮素对脂肪变性肝细胞脂肪蓄积的改善作用。

3.2 槲皮素通过升高脂肪变性肝细胞的脂解水平改善脂质蓄积

对脂质分解机制的进一步研究发现,槲皮素可以显著促进脂解相关分子 ATGL 和 CGI58 的 mRNA 和蛋白表达水平,以及二者在细胞内的共定位水平。ATGL 是脂肪和非脂肪组织中水解 TG 反应的限速酶,而 CGI58 是调节 ATGL 活性的关键因子[15]。CGI58 与 ATGL 结合后,可使其脂肪酶活性升高 20 倍。以往研究发现槲皮素改善肝细胞脂肪蓄积的机制主要包括抑制从头脂肪酸合成等[13],而对槲皮素如何影响脂解的研究较少。仅少数研究发现,槲皮素可以促进间充质肝细胞和小鼠基质细胞的 ATGL 的 mRNA 表达,上调 3T3-L1 脂肪细胞中的 ATGL 蛋白表达水平[16-18]。不同于以往研究,本研究发现槲皮素在脂肪变性肝细胞不仅可以增加脂解分子 ATGL 的 mRNA 和蛋白表达水平,还可以上调其辅因子 CGI58 的 mRNA 和蛋白表达水平以及二者的共定位水平,有可能增强其相互作用。

3.3 槲皮素通过升高脂肪变性肝细胞的脂噬水平改善脂质蓄积

脂解和脂噬的调控是紧密交织在一起的。脂噬和脂解是串联途径,脂解位于脂噬的上游,分别作用于直径大于 1 μmol/L 的脂滴和小脂滴[15]。肝内分解脂质的方式以脂噬为主。对于脂噬的研究发现,槲皮素可升高脂肪变性肝细胞中 LC3β 和 RAB7 的表达水平以及共定位水平。LC3β 在自噬体与溶酶体融合之前都位于自噬体膜上,融合后在自噬体中降解,该分子的表达量反映了自噬的水平。RAB7 作为囊泡运输的调节因子,参与了脂噬、细胞凋亡、线粒体自噬等[19]。本研究通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测发现了槲皮素显著上调了 LC3β 和 RAB7 的 mRNA 和蛋白表达水平。但因 LC3β 未被降解而沉积于细胞内时也会在 Western blot 实验中大量表达,本研究又进行了细胞免疫荧光实验标记 LC3β 和 RAB7 发现二者的表达和共定位都增强,表明了槲皮素确实促进了脂噬。另外本研究也检测了自噬底物 P62 的表达水平。P62 与 LC3 有相互关联的结构域,在自噬活跃后被大量清除,因而 P62 减少也成为自噬活跃的标志[20]。本研究发现槲皮素可以明显降低 P62 的表达,也进一步证实了槲皮素可以促进脂噬。该研究结果与其他研究结果一致[12, 21]。在 AML12 肝细胞中,对脂滴和溶酶体直接染色发现槲皮素可以增加二者的共定位以促进脂噬。槲皮素还可以促进高脂或酒精诱导的脂肪变性 HepG2 细胞中 LC3β 的表达,同时增加自噬小体的形成,减少 P62 表达[21]。本研究首次在人来源的正常肝细胞中发现了槲皮素可以消除高脂诱导的脂噬降低。

3.4 自噬在槲皮素调控脂肪变性肝细胞的脂解和脂噬中的重要性

脂解和脂噬的关系密切。脂解途径的顺利进行需要脂噬途径分子 LC3 等的参与,自噬相关分子的活化受到抑制后会失去对脂质分解的调控,扰乱中性脂解信号通路,不能维持脂滴的稳态,脂毒性会进一步积累。脂滴被中性脂解酶脂解前需要由分子伴侣介导的自噬将覆盖在脂滴表面的围脂滴蛋白 2(Perilipin 2, Plin2)移除,暴露出脂滴成分 CGI58 后,ATGL 再与 CGI58 结合进行脂滴分解[22-24]。本研究中使用 3-MA 抑制 LC3 后,肝细胞内自噬受到抑制而不能移除脂滴表面的 Plin2,影响了 ATGL 和 CGI58 的结合,这一点也在细胞免疫荧光检测的 ATGL 和 CGI58 的共定位水平减弱得到了证实。此外,ATGL 含有与 LC3 直接相互作用的基序,该基序发生突变后不能与 LC3 相互作用,则会消除 ATGL 驱动的脂解作用[25]。本研究中使用 3-MA 抑制 LC3 后,也会抑制了 LC3 与 ATGL 的相互作用,最终抑制了脂解。另一方面,脂解分子 ATGL 对于脂噬的正常运转也至关重要。研究表明,LC3 识别脂滴上的受体后,再与 ATGL 结合后可以促进自噬溶酶体的形成,从而促进脂噬;而抑制 ATGL 则导致脂噬受到抑制[3]。由于脂解和脂噬途径存在交联,因此本研究中采用了自噬抑制剂 3-MA 处理脂肪变性肝细胞后,不仅是脂噬途径被阻断,脂解途径也受到了显著抑制,最终导致了槲皮素减轻肝细胞脂质蓄积的作用被大幅度削弱。

脂解和脂噬的相互调控非常密切,槲皮素可以通过调控这 2 个途径减轻脂质蓄积。自噬由 2 种关键激酶诱导,即雷帕霉素激酶(mechanistic target of

rapamycin kinase,mTOR)复合物 1 和单磷酸腺苷活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase,AMPK)。研究表明,在草鱼肝细胞,槲皮素可以通过调控 AMPK/mTOR 从而促进线粒体自噬[26]。其他研究还发现槲皮素可以下调 mTOR 信号通路,继而调控胆固醇-胆汁酸转化以维持胆固醇稳态,改善 NAFLD[27]。槲皮素是否在人正常肝细胞株也可以抑制 mTOR 信号通路,从而促进脂噬,还需要进一步研究。此外,ATGL 对脂解和脂噬的调控需要激活沉默调节蛋白 1(sirtuin,Sirt1)[3]。而槲皮素可以激活 Sirt1 发挥多种生理功能[28],如槲皮素可以通过激活 Sirt1 抑制线粒体氧化和自噬,从而抑制细胞凋亡[29]。我们推测槲皮素对肝细胞脂解和脂噬的调控与其激活 Sirt1 相关,也还需要进一步证实。

综上所述,槲皮素通过上调脂解相关分子 ATGL 和 CGI58 的表达和共定位,及脂噬相关分子 LC3β 和 RAB7 的表达和共定位,减少自噬底物 P62 的水平,从而促进脂解和脂噬,最终减轻了人脂肪变性肝细胞的脂质蓄积。而抑制脂噬途径则会削弱槲皮素对脂解和脂噬的调控,从而基本阻断槲皮素改善脂噬蓄积的作用。本研究将为槲皮素用于非酒精性脂肪肝的膳食防治提供理论依据。

参考文献:

[1] YOUNOSSI Z M, GOLABI P, PAIK J M, *et al*. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review [J]. Hepatology, 2023, 77(4): 1335-1347. DOI: 10.1097/HEP.0000000000000004.

[2] CHO C H, PATEL S, RAJBHANDARI P. Adipose tissue lipid metabolism: lipolysis[J]. Curr Opin Genet Dev, 2023, 83: 102114. DOI: 10.1016/j.gde.2023.102114.

[3] SATHYANARAYAN A, MASHEK M T, MASHEK D G. ATGL promotes autophagy/lipophagy via SIRT1 to control hepatic lipid droplet catabolism[J]. Cell Rep, 2017, 19(1): 1-9. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.03.026.

[4] FENG S, SUN Z A, JIA X, *et al*. Lipophagy: molecular mechanisms and implications in hepatic lipid metabolism[J]. Front Biosci, 2023, 28(1): 6. DOI: 10.31083/j.fbl2801006.

[5] KOBORI M, MASUMOTO S, AKIMOTO Y, *et al*. Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice[J]. Mol Nutr Food Res, 2011, 55(4): 530-540. DOI: 10.1002/mnfr.201000392.

[6] ZHU X H, XIONG T, LIU P Y, *et al*. Quercetin ameliorates HFD-induced NAFLD by promoting hepatic VLDL assembly and lipophagy via the IRE1a/XBP1s pathway[J]. Food Chem Toxicol, 2018, 114: 52-60. DOI: 10.1016/j.fct.2018.02.019.

[7] PORRAS D, NISTAL E, MARTÍNEZ-FLÓREZ S, *et al*. Functional interactions between gut microbiota transplantation, quercetin, and high-fat diet determine non-alcoholic fatty liver disease development in germ-free mice [J]. Mol Nutr Food Res, 2019, 63(8): e1800930. DOI: 10.1002/mnfr.201800930.

[8] ZHANG M, XIE Z K, GAO W N, *et al*. Quercetin regulates hepatic cholesterol metabolism by promoting cholesterol-to-bile acid conversion and cholesterol efflux in rats[J]. Nutr Res, 2016, 36(3): 271-279. DOI: 10.1016/j.nutres.2015.11.019.

[9] MOMCHILOVA A, NIKOLAEV G, PANKOV S, *et al*. Effect of quercetin and fingolimod, alone or in combination, on the sphingolipid metabolism in HepG2 cells[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(22): 13916. DOI: 10.3390/ijms232213916.

[10] GUAN H, ZHANG W Y, LIU H, *et al*. Quercetin induces apoptosis in HepG2 cells *via* directly interacting with YY1 to disrupt YY1-p53 interaction[J]. Metabolites, 2023, 13(2): 229. DOI: 10.3390/metabo13020229.

[11] MOON J, DO H J, KIM O Y, *et al*. Antiobesity effects of quercetin-rich onion peel extract on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and the adipogenesis in high fat-fed rats[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 58: 347-354. DOI: 10.1016/j.fct.2013.05.006.

[12] OHMAE S, AKAZAWA S, TAKAHASHI T, *et al*. Quercetin attenuates adipogenesis and fibrosis in human skeletal muscle[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 615: 24-30. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.05.033.

[13] GNONI A, DI CHIARA STANCA B, GIANNOTTI L, *et al*. Quercetin reduces lipid accumulation in a cell model of NAFLD by inhibiting *de novo* fatty acid synthesis through the acetyl-CoA carboxylase 1/AMPK/PP2A axis[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1044. DOI: 10.3390/ijms23031044.

[14] FUKAYA M, SATO Y, KONDO S, *et al*. Quercetin enhances fatty acid β-oxidation by inducing lipophagy in AML12 hepatocytes[J]. Heliyon, 2021, 7(6): e07324. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e07324.

[15] SCHOTT M B, WELLER S G, SCHULZE R J, *et al*. Lipid droplet size directs lipolysis and lipophagy catabolism in hepatocytes[J]. J Cell Biol, 2019, 218(10): 3320-3335. DOI: 10.1083/jcb.201803153.

[16] WANG Z Y, XUE C Y, WANG X, *et al*. Quercetin 3-O-glucuronide-rich lotus leaf extract promotes a Brown-fat-phenotype in $C_3H_{10}T_{1/2}$ mesenchymal stem cells[J]. Food Res Int, 2023, 163: 112198. DOI: 10.1016/j.foodres.

2022.112198.

[17] KONG L, ZHANG W K, LIU S S, *et al*. Quercetin, engelitin and caffeic acid of *Smilax* China L. polyphenols, stimulate 3T3-L1 adipocytes to brown-like adipocytes via β3-AR/AMPK signaling pathway[J]. Plant Foods Hum Nutr, 2022, 77(4): 529-537. DOI: 10.1007/s11130-022-00996-x.

[18] SEO Y S, KANG O H, KIM S B, *et al*. Quercetin prevents adipogenesis by regulation of transcriptional factors and lipases in OP9 cells[J]. Int J Mol Med, 2015, 35(6): 1779-1785. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2185.

[19] BABA T, TOTH D J, SENGUPTA N, *et al*. Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate controls Rab7 and PLEKHM1 membrane cycling during autophagosome-lysosome fusion[J]. EMBO J, 2019, 38(8): e100312. DOI: 10.15252/embj.2018100312.

[20] KRAFT C, PETER M, HOFMANN K. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(9): 836-841. DOI: 10.1038/ncb0910-836.

[21] LIN H K, GUO X P, LIU J J, *et al*. Improving lipophagy by restoring Rab7 cycle: protective effects of quercetin on ethanol-induced liver steatosis[J]. Nutrients, 2022, 14(3): 658. DOI: 10.3390/nu14030658.

[22] KAUSHIK S, CUERVO A M. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis[J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(6): 759-770. DOI: 10.1038/ncb3166.

[23] GUO Y, MAH E, BRUNO R S. Quercetin bioavailability is associated with inadequate plasma vitamin C status and greater plasma endotoxin in adults[J]. Nutrition, 2014, 30(11/12): 1279-1286. DOI: 10.1016/j.nut.2014.03.032.

[24] KAUSHIK S, CUERVO A M. AMPK-dependent phosphorylation of lipid droplet protein PLIN2 triggers its degradation by CMA[J]. Autophagy, 2016, 12(2): 432-438. DOI: 10.1080/15548627.2015.1124226.

[25] MARTINEZ-LOPEZ N, GARCIA-MACIA M, SAHU S, *et al*. Autophagy in the CNS and periphery coordinate lipophagy and lipolysis in the brown adipose tissue and liver[J]. Cell Metab, 2016, 23(1): 113-127. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.10.008.

[26] LUO D L, CHEN S S, WANG X X, *et al*. Unraveling the mechanism of quercetin alleviating perfluorooctane sulfonate-induced apoptosis in grass carp (*Ctenopharyngodon* idellus) hepatocytes: AMPK/mTOR-mediated mitophagy[J]. Aquat Toxicol, 2023, 265: 106769. DOI: 10.1016/j.aquatox.2023.106769.

[27] YANG T T, WANG Y Y, CAO X Y, *et al*. Targeting mTOR/YY1 signaling pathway by quercetin through CYP7A1-mediated cholesterol-to-bile acids conversion alleviated type 2 diabetes mellitus induced hepatic lipid accumulation[J]. Phytomedicine, 2023, 113: 154703. DOI: 10.1016/j.phymed.2023.154703.

[28] UNGURIANU A, ZANFIRESCU A, MARGINĂ D. Exploring the therapeutic potential of quercetin: a focus on its sirtuin-mediated benefits[J]. Phytother Res, 2024, 38(5): 2361-2387. DOI: 10.1002/ptr.8168.

[29] WAN Q Z, TANG L S, JIN K L, *et al*. Quercetin and tanshinone prevent mitochondria from oxidation and autophagy to inhibit KGN cell apoptosis through the SIRT1/SIRT3-FOXO3a axis[J]. Cell Mol Biol, 2024, 70(2): 257-263. DOI: 10.14715/cmb/2024.70.2.36.

(收稿:2024-01-02;修回:2024-06-29)

(编辑 邓强庭)