

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.05.013

不同来源肝细胞在体外降脂药物评价中药效反应的对比

张志超 李 妤 丁 琳 柳 军[△] 尚 靖[△]

(中国药科大学新药筛选中心 江苏 南京 210009)

摘要 目的:通过对比不同来源的人肝癌细胞系 HepG2 和原代大鼠肝细胞在体外降脂药物评价中药效反应,指导两种肝细胞在体外降脂药物评价中的实际应用。**方法:**用游离脂肪酸(油酸/棕榈酸,2:1)诱导 HepG2 细胞、原代大鼠肝细胞脂肪变性,并用 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯扎贝特干预,检测细胞内甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、活性氧(ROS)含量,细胞内脂滴数目,并检测细胞上清液中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性。**结果:**FFA 刺激使 HepG2 细胞和原代大鼠肝细胞脂质沉积(TG、脂滴)和氧化应激(ROS、MDA、SOD)水平上升。苯扎贝特对 HepG2 细胞 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FFA 造模组和原代大鼠肝细胞 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FFA 造模组脂质沉积和氧化应激水平改善显著;而 HepG2 细胞 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FFA 造模组和原代大鼠肝细胞 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FFA 造模组脂质沉积和氧化应激水平在苯扎贝特干预后变化不明显。**结论:**在相同 FFA 造模浓度,原代大鼠肝细胞病理特征变化更为明显;苯扎贝特对两种肝细胞在脂质沉积和氧化应激水平的作用也不完全相同。因而 HepG2 细胞和原代大鼠肝细胞在体外降脂药物评价中药效反应是不完全相同的。

关键词:HepG2 细胞;原代大鼠肝细胞;脂质沉积;氧化应激

中图分类号:Q95-3, R575.5 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)05-850-04

In-vitro Evaluation and Comparison of the Lipid-lowering Drugs Pharmacological Response on Liver Cells of Different Origin

ZHANG Zhi-chao, LI Yu, DING Lin, LIU Jun[△], SHANG Jing[△]

(Drug Screening Center, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, 210009, China)

ABSTRACT Objective: To guide the application of the two kinds of liver cells in vitro evaluation of lipid-lowering drugs through evaluate the lipid lowering effects of bezafibrate on liver cells from different origin with free fatty acids model in-vitro. **Methods:** Hepatic steatosis was induced in HepG2 cells and primary rat hepatocytes by using free fatty acids (oleic acid / palmitic acid, 2:1) model. Lipid lowering effects of bezafibrate ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were analyzed by detecting various parameters: intracellular triglyceride (TG), total cholesterol (TC) and the lipid contents within cells. Further, Reactive oxygen Species (ROS), malondialdehyde (MDA) and antioxidant enzymes (SOD) were examined as oxidative stress markers. **Results:** Hepatic steatosis (TG, lipid droplet) and Oxidative Stress (ROS, MDA, SOD) were increased with FFA treatment. Bezafibrate significantly ameliorate the hepatic steatosis and Oxidative Stress in HepG2 cells induced by $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FFA and primary rat hepatocytes induced by $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FFA model. However, bezafibrate have no significant ameliorative effect on HepG2 cells induced by $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FFA and primary rat hepatocytes induced by $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FFA model. **Conclusions:** In FFA induced hepatic steatosis model, disease pathological features are clearer in rat primary hepatocytes as compared to HepG2 cells. Moreover, pharmacological effects of bezafibrate are more significantly expressed at $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FFA induction in HepG2 and $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FFA induction in rat primary hepatocytes. In-Conclusion pharmacological activity of lipid lowering drugs may differ in response when tested on HepG2 cells and primary rat hepatocytes at least in FFA model.

Key words: HepG2 cell; Primary rat hepatocytes; Hepatic steatosis; Oxidative Stress

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R575.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)05-850-04

前言

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的,以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征,包括单

纯脂肪肝、脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、脂肪性肝纤维化和肝硬化^[1]。其发病机制尚不完全清楚,目前“二次打击学说”最被认可,脂质沉积和氧化应激分别在第一次打击和第二次打击中起着关键作用^[2],也是目前研究体外降脂药物药效评价的重要考察指标。研究有很大的局限性。动物模型能对影响因素有一定的调控,如高脂饮食诱发大鼠高脂模型^[3],广泛用于降脂药物评价。但动物模型周期长,成本高,体内代谢复杂和动物个体差异的影响。细胞模型可针对肝细胞本身进行机制研究和药物评价,并克服动物模型不足,与在体研究互补。体外模型通常用棕榈酸和油酸等饱和或不饱和脂肪酸加入培

作者简介:张志超(1987-),男,硕士,研究方向:脂代谢疾病,

E-mail:0640409@163.com

[△]通讯作者:尚靖, E-mail: shangjing2006@yahoo.com.cn

柳军, E-mail: junincpu@yahoo.com

(收稿日期:2013-07-12 接受日期:2013-08-10)

养的人肝细胞系或原代肝细胞^[4-7]。该体外模型能很好地复制非酒精性脂肪肝的主要特征。人原代肝细胞是最为理想的 NAFLD 细胞模型^[8,9],但肝脏样本的稀少极大地限制其应用,一般都用人肝癌细胞株 HepG2 进行研究。然而,NAFLD 动物模型中大鼠的脂质代谢与人因为种属差异,脂代谢有一定的差异,如血中脂蛋白组成^[10]、脂代谢相关酶 CYP7A1^[11]等。HepG2 细胞的体外模型与动物模型不能很好的互补,而原代大鼠肝细胞体外模型与小鼠动物模型因为没有种属差异,可以很好的互为补充。因此,研究 HepG2 细胞和原代大鼠肝细胞在造模和药效反应进行对比,可将人源细胞体外降脂药物评价和动物模型药效评价联系起来,有效地评价降脂药物,因而有着重要意义。

1 材料与方法

1.1 细胞株和动物

1.1.1 细胞株 人肝癌细胞株 HepG2, ATCC

1.1.2 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠, 体重 180~200 g, 浙江省实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(浙)20080033

1.2 试剂及设备

苯扎贝特、油红 O、二甲基亚砜(DMSO), Sigma 公司; 棕榈酸、油酸, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 无游离脂肪酸的牛血清白蛋白第五片断 (free fatty free Bovine Serum Albumin fraction V, BSA), Merck 公司; 胎牛血清、胰蛋白酶, Hyclone 公司; 胶原酶、DMEM 培养基、Williams'E 培养基, GIBCO 公司; DCFH-DA (2,2'-dichlorofluorescein diacetate)、BCA (bichinchoninic acid) 蛋白定量试剂盒、EGTA, 碧云天; 甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)、丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所。多通道连续光谱分光光度和荧光光度计(Safire, TECAN); 荧光倒置显微镜(Leica, Germany)。

1.3 HepG2 细胞培养

将人肝癌细胞株 HepG2 接种于含 10% 胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 四环素的高糖 DMEM 培养基中, 置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度孵育箱内培养。根据细胞生长情况, 每 2~3 天用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 进行传代培养。实验时接种于 6 孔板, 长到 70% 时开始实验。

1.4 大鼠原代肝细胞的分离及培养

大鼠原代肝细胞分离按经典的二步灌注法^[12]改良后操作, 腹腔注射 20% 乌拉坦 0.5 g/100 g 麻醉大鼠, 腹腔注射 0.1% 肝素钠 60 U/100 g, 75% 乙醇全身消毒。超净台中打开腹腔, 快速分离肝门静脉和下腔静脉, 门静脉插管, 灌注 37℃ 预热的前灌注液(含 5 mmol·L⁻¹ EGTA 的 D-Hanks 溶液, pH 7.4), 同时剪开下腔静脉, 流速 30 mL·min⁻¹, 数秒后肝脏均匀变为土黄色, 恒速灌注 5 min。改用 37℃ 预热的 0.05% 的 IV 型胶原酶 D-Hanks 溶液(pH 7.4), 流速 20 mL·min⁻¹, 8~10 min。至肝脏表面可见絮状纹路, 手指轻按塌陷不易恢复, 立即取下置于预冷的 DMEM 培养液中, 撕开肝脏轻轻抖动, 肝细胞脱落, 100 目细胞筛过滤收集。400 rpm 低温 4℃, 离心 2 min, 重复 3 次。台盼蓝染色计算细胞存活率, 大于 90% 用于实验。用青霉素和链霉素各 100 U·mL⁻¹, 胰岛素 1×10⁻⁷ mol·L⁻¹, 地塞米松 1×10⁻⁷ mol·L⁻¹, L- 甲状腺素 1×10⁻⁷ mol·L⁻¹ 的 William E 培养基^[13]调

整细胞密度 2×10⁵·mL⁻¹, 接种于胶原包被过的 6 孔板和 24 孔板, 置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度孵育箱内培养 4 h 后, 更换培养基, 洗去未贴壁细胞, 24 h 后开始实验。

1.5 体外脂肪肝模型建立

将游离脂肪酸(OA/PA, 2:1)溶于 DMSO, 预热后加入含 1% 无游离脂肪酸的 BSA 的培养基中^[14], 终浓度分别为 1 mmol·L⁻¹ FFA 和 0.5 mmol·L⁻¹ FFA, DMSO 的终浓度为 2%, 刺激细胞 24 h 造模。

1.6 分组与处理

HepG2 细胞和大鼠原代肝细胞分别设对照组, 1 mmol·L⁻¹ FFA 组, 1 mmol·L⁻¹ FFA+100 μmol·L⁻¹ 苯扎贝特组, 0.5 mmol·L⁻¹ FFA 组, 0.5 mmol·L⁻¹ FFA+100 μmol·L⁻¹ 苯扎贝特组, 给药与造模同时, 24 h 后收集培养基, PBS 洗 3 次, 每孔加入 100 μL 裂解液, 刮取细胞, 4℃ 放置 20 min, 12000 rpm 4℃ 离心 10 min, 吸取上清用于检测 TC、TG。

1.7 观察指标

1.7.1 油红 O 染色 将 24 孔板中的培养基弃去, PBS 洗 3 遍, 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 5 min, 重复 3 次, 吸去 PBS, 每孔加 400 μL 油红 O 染液, 染色 15 min, PBS 洗涤 5 min, 重复 3 次, 吸去 PBS, 显微镜下观察拍照。

1.7.2 甘油三酯和总胆固醇的测定 细胞裂解液上清按试剂盒说明操作。

1.7.3 细胞中 ROS 含量测定 用无血清培养基 1:1000 稀释 DCFH-DA, 终浓度 10 μmol·L⁻¹, 去除细胞培养基, 每孔加入 100 μL 稀释好的 DCFH-DA, 培养箱内孵育 20 min, 无血清培养基洗涤 3 次, 用荧光酶标仪 Safire 在 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长读取荧光强度值。

1.7.4 SOD、MDA 的测定 细胞培养基按试剂盒说明书进行操作。

1.8 数据处理

数据用 GraphPad Prism 5 统计软件分析, 采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 计量资料组间比较用 t 检验, P<0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 两种细胞在 FFA 刺激和苯扎贝特干预下脂质沉积的对比

FFA 刺激 24 h 后, HepG2 细胞和原代大鼠肝细胞内的 TC 含量没有发生明显变化(图 2B), 而甘油三酯和脂滴的含量都显著上升(图 1, 图 2A), 并与 FFA 造模浓度正相关。但在相同 FFA 造模浓度下, 大鼠原代肝细胞的 TG 和脂滴升高程度都远远高于 HepG2 细胞。给予 HepG2 细胞和原代大鼠肝细胞相同浓度的苯扎贝特干预, HepG2 细胞内脂质沉积无论在 1 mmol·L⁻¹ 还是 0.5 mmol·L⁻¹ FFA 造模情况下, 脂质沉积都明显减轻。与 HepG2 细胞相对比, 原代大鼠肝细胞只在 0.5 mmol·L⁻¹ FFA 造模时, 苯扎贝特表现出降脂效应, 而用 1 mmol·L⁻¹ FFA 造模, 苯扎贝特没有表现出降脂效应。

2.2 两种细胞在 FFA 刺激和苯扎贝特干预下氧化应激的变化

FFA 刺激后, 原代大鼠肝细胞和 HepG2 细胞中 ROS 含量显著升高(图 3A), 细胞上清中 SOD 活性下降(图 3B), MDA 含量升高(图 3C), 并随着 FFA 浓度升高而变化更为明显。苯

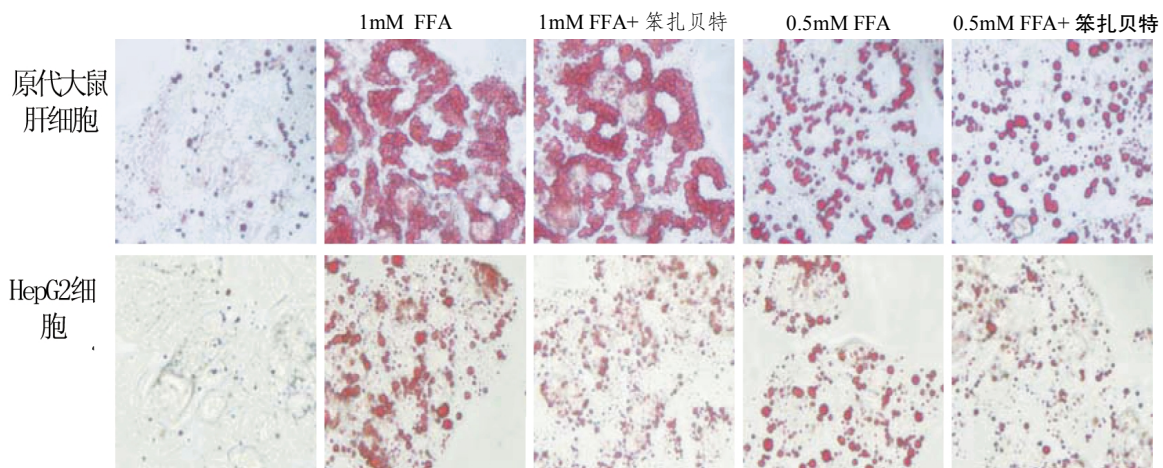


图1 HepG2 细胞和原代大鼠肝细胞在 FFA 造模和笨扎贝特干预下脂滴含量的变化(油红 O 染色× 400)

Fig.1 The effect of FFA modeling and bezafibrate intervention on lipid content in HepG2 cells and primary rat hepatocytes. (Oil Red O staining× 400)

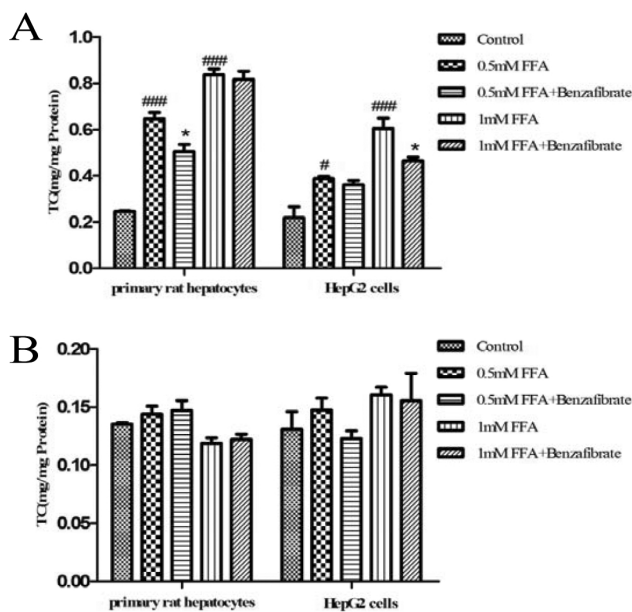


图2 FFA 刺激和笨扎贝特干预下原代大鼠肝细胞和 HepG2 细胞中 TG、TC 含量的变化:(A) FFA 刺激和笨扎贝特干预原代大鼠肝细胞和 HepG2 细胞中 TG 的影响;(B) FFA 刺激和笨扎贝特干预原代大鼠肝细胞和 HepG2 细胞中 TC 的影响

与空白组比较: # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$;与模型组比较:

* $P<0.05$, ** $P<0.01$

Fig.2 FFA stimulation and bezafibrate intervention causes alterations of TG, TC content in primary rat hepatocytes and HepG2 cells. (A) The effect of FFA stimulation and bezafibrate intervention on TG content in primary rat hepatocytes and HepG2 cells. (B) The effect of FFA stimulation and bezafibrate intervention on TC content in primary rat hepatocytes and HepG2 cells.

Compare with control group # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$; Compare with FFA group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

扎贝特干预后,降低了 0.5 mmol·L⁻¹ FFA 造模原代大鼠肝细胞中 ROS 含量,对 1 mmol·L⁻¹ FFA 组中 ROS 含量没有明显作用。相反,HepG2 细胞中 1 mmol·L⁻¹ FFA 造模组在笨扎贝特干预下,ROS 显著下降,0.5 mmol·L⁻¹ FFA 组无显著变化(图 3A)。笨扎贝特提高了 0.5 mmol·L⁻¹ FFA 造模原代大鼠肝细胞

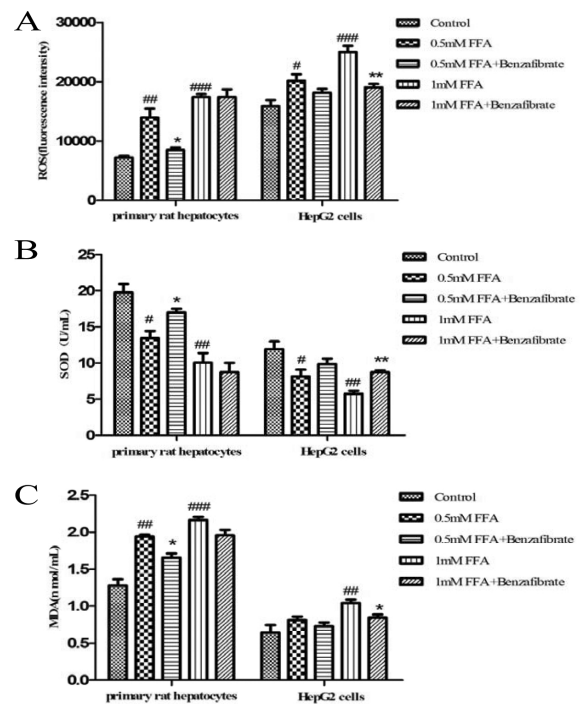


图3 FFA 刺激和笨扎贝特干预下原代大鼠肝细胞和 HepG2 细胞中氧化应激的变化:(A) 原代大鼠肝细胞和 HepG2 细胞内 ROS 含量的变化;(B) 原代大鼠肝细胞和 HepG2 细胞上清中 SOD 活性变化;(C) 原代大鼠肝细胞和 HepG2 细胞上清中 MDA 含量变化

与空白组比较: # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$;与模型组比较:

* $P<0.05$, ** $P<0.01$

Fig.3 FFA stimulation and bezafibrate intervention induce changes in oxidative stress in primary rat hepatocytes and HepG2 cells; (A) Changes of ROS content in primary rat hepatocytes and HepG2 cells; (B) Alterations of SOD activity in primary rat hepatocytes and HepG2 cells; (C) Changes in MDA content in the supernatant of primary rat hepatocytes and HepG2 cells.

Compare with control group # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$; Compare with FFA group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

上清中 SOD 活性,对 1 mmol·L⁻¹ FFA 组无明显影响。笨扎贝特对 HepG2 细胞有明显上升的是 1 mmol·L⁻¹ FFA 造模,对 0.5 mmol·L⁻¹ FFA 造模的 HepG2 细胞不显著(图 3B)。笨扎贝特对

MDA 的影响与 ROS 相似,分别降低了 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FFA 造模的原代大鼠肝细胞和 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FFA 造模的 HepG2 细胞,而对 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FFA 造模的原代大鼠肝细胞和 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FFA 造模的 HepG2 细胞无明显影响(图 3C)。相同 FFA 造模浓度下,原代大鼠肝细胞在 ROS 和 MDA 含量升高比 HepG2 细胞的更为显著,SOD 的下降程度基本相同。

3 讨论

NAFLD 的发病与体内脂肪酸的代谢异常密切相关,脂肪肝病人血中脂肪酸含量明显高于正常人^[15],胰岛素抵抗时,脂肪组织脂解增加,释放游离脂肪酸入血,肝脏摄取脂肪酸增多,当超出肝脏利用能力时,多余的脂肪酸合成甘油三酯沉积在肝细胞中,最终形成脂肪肝^[16]。FFA 摄入增加也导致肝细胞内线粒体氧化饱和,过氧化物酶体 β 氧化和微粒体 ω 氧化增加,产生了大量具有反应活性和细胞毒性的活性氧簇(ROS)^[17]。消耗细胞内的抗氧化物质,当 ROS 超出机体清除能力时,ROS 会损伤细胞线粒体功能,导致能量代谢障碍,影响抗氧化物质 SOD、GSH 的生成,同时细胞内脂质发生过氧化,产生脂质过氧化物 MDA 等^[18]。

本实验采取 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FFA 刺激 HepG2 细胞和原代大鼠肝细胞造成脂肪变性模型,脂滴和甘油三酯都显著升高,胆固醇没有显著变化,两种细胞由于甘油三酯在肝细胞中过度沉积都产生了明显的脂肪变性。肝细胞内 ROS 增多,细胞上清中 MDA 含量上升,SOD 活性下降,说明两种细胞都产生了氧化应激。虽然两种细胞都成功建立了 NAFLD 体外细胞模型,但相同 FFA 浓度下,原代大鼠肝细胞脂质沉积和氧化应激水平都比 HepG2 细胞脂质沉积更为严重。给予相同浓度的苯扎贝特,考察对原代大鼠肝细胞和 HepG2 细胞脂质沉积和氧化应激水平的药物效应是否相同,结果发现,两种细胞在相同浓度 FFA 造模时,相同浓度药物的药效反应不同。考虑到苯扎贝特的降脂效应是通过激活 PPAR α 受体促进脂肪酸氧化实现的^[19],与细胞线粒体氧化功能是否正常有密切联系。当 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FFA 刺激原代大鼠肝细胞,脂肪变性和氧化应激程度最为严重,可能产生脂毒性,影响了细胞线粒体正常氧化功能,因而苯扎贝特并没有表现出降脂效应。 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FFA 作用于 HepG2 细胞不会产生明显细胞毒性^[4,20], $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FFA 则可能是因为癌细胞代谢速率快,模型不够明显,所以苯扎贝特降脂效应不显著。因此,在用细胞模型体外评价降脂药物时,应关注细胞正常的脂肪酸氧化功能是否正常。合适的造模浓度应该是使细胞脂质沉积明显,同时细胞毒性较小。

参考文献(References)

- [1] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14: 161-163
Group of Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease, Branch Association of Hepatology, Chinese Medical Association. Nonalcoholic fatty liver disease treatment guidelines [J]. Chinese journal of hepatology, 2006, 14: 161-163
- [2] Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? [J]. Gastroenterology, 1998, 114: 842-845
- [3] Hatsugai K, Ohkohchi N, Fukumori T, et al. Mechanism of primary graft non-function in a rat model for fatty liver transplantation [J]. Transplant international, 2011, 13(S1): S583-S590
- [4] Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martí nez-Romero A, et al. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis [J]. Chem Biol Interact 2007, 165: 106 - 116
- [5] Donato M T, Lahoz A, Jimenez N, et al. Potential impact of steatosis on cytochrome P450 enzymes of human hepatocytes isolated from fatty liver grafts[J]. Drug metabolism and disposition, 2006, 34(9): 1556-1562
- [6] Fujimoto Y, Onoduka J, Homma KJ, et al. Long-chain fatty acids induce lipid droplet formation in a cultured human hepatocyte in a manner dependent of Acyl-CoA synthetase[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2006, 29(11): 2174-2180
- [7] Fujimoto Y, Onoduka J, Homma KJ, et al. Long-chain fatty acids induce lipid droplet formation in a cultured human hepatocyte in a manner dependent of Acyl-CoA synthetase[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2006, 29(11): 2174-2180
- [8] Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, et al. Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism [J]. Current drug metabolism, 2003, 4(4): 292-312
- [9] Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, et al. Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man [J]. Current drug metabolism, 2004, 5(5): 443-462
- [10] Fernandez ML, Volek JS. Guinea pigs: a suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation [J]. Nutr Metab (Lond), 2006, 3: 17-21
- [11] Goodwin B, Watson MA, Kim H, et al. Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor- α [J]. Molecular Endocrinology, 2003, 17(3): 386-394
- [12] Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells [J]. Methods cell biol, 1976, 13(1): 29-83
- [13] Zhou H, Gurley EC, Jarujaron S, et al. HIV protease inhibitors activate the unfolded protein response and disrupt lipid metabolism in primary hepatocytes [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006; 291:G1071-1080
- [14] Wu X, Zhang L, Gurley E, et al. Prevention of free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity by 18β -glycyrrhetic acid through lysosomal and mitochondrial pathways [J]. Hepatology, 2008, 47(6): 1905-1915
- [15] Nehra V, Angulo P, Buchman AL, et al. Nutritional and metabolic considerations in the etiology of nonalcoholic steatohepatitis[J]. Digestive diseases and sciences, 2001, 46(11): 2347-2352
- [16] Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury[J]. Journal of Clinical Investigation, 2004, 114: 147-152
- [17] Jump DB, Botolin D, Wang Y, et al. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription [J]. The Journal of nutrition, 2005, 135(11): 2503-2506
- [18] Younossi ZM. Review article: current management of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis [J]. Alimentary pharmacology & therapeutics, 2008, 28(1): 2-12
- [19] Nakajima T, Tanaka N, Kanbe H, et al. Bezafibrate at clinically relevant doses decreases serum/liver triglycerides via down-regulation of sterol regulatory element-binding protein-1c in mice: a novel peroxisome proliferator-activated receptor α -independent mechanism [J]. Molecular pharmacology, 2009, 75(4): 782-792
- [20] Yao HR, Liu J, Plumeri D, et al. Lipotoxicity in HepG2 cells triggered by free fatty acids[J]. American journal of translational research, 2011, 3(3): 284