

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.01.004

小檗碱抑制游离脂肪酸诱导小鼠肝实质细胞脂肪变性*

赵娜^{1,2,3} 徐会^{2,3} 王赫^{2,3} 王钧毅^{2,3} 齐社宁^{1△} 杨俊涛^{2,3△}

(1 兰州大学基础医学院 甘肃 兰州 730030; 2 蛋白质组学国家重点实验室 北京蛋白质组研究中心 国家蛋白质科学中心(北京) 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京 102206; 3 蛋白质药物国家工程研究中心 北京 102206)

摘要 目的:探讨小檗碱(Berberine)对游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs)诱导的小鼠肝实质细胞脂肪变性的影响。**方法:**胶原酶灌注分离 BALB/c 小鼠原代肝实质细胞并体外培养。分对照组, 高脂组, 高脂加小檗碱处理组。体外测定细胞内甘油三酯的含量。利用油红染色观察细胞的脂肪样变性。通过 Western 印迹法检测肝实质细胞内 MAPK 相关信号通路磷酸化的变化。实时定量 PCR 检测肝实质细胞中与脂肪化密切相关的 miR-122 的表达和相关靶基因的表达改变。**结果:**与高脂组比较, 小檗碱处理组肝实质细胞内甘油三酯含量降低, 脂肪颗粒减少, 脂肪变性明显改善, 并具有明显的剂量效应, 小檗碱能够抑制 FFAs 诱导的 JNK 通路磷酸化。Q-PCR 结果表明小檗碱能够促进肝实质细胞内 miR-122 的表达, 并降低脂肪化相关基因 Dgat2 的表达。**结论:**小檗碱能够显著改善高脂诱发的肝脂肪变性, 抑制 JNK 通路磷酸化, 其机制可能同 miR-122 通路相关。

关键词:小檗碱; 游离脂肪酸; 肝实质细胞; 脂肪变性

中图分类号: R-332; R575.5 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2015)01-14-04

Berberine Inhibits the Steatosis of Parenchymal Hepacyto Induced by FFAs*

ZHAO Na^{1,2,3}, XU Hu^{2,3}, WANG He^{2,3}, WANG Jun-yi^{2,3}, QI She-ning^{1△}, YANG Jun-tao^{2,3△}

(1 School of Basic Medicine, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu, 730030, China; 2 State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences Beijing, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing, 102206, China; 3 National Engineering Research Center for Protein Drugs, Beijing, 102206, China)

ABSTRACT Objective: To research the influence of Berberine on liver steatosis induced by free fatty acids (free fatty acids, FFAs) from liver parenchymal cells. **Methods:** Mouse primary hepatocytes were isolated by a two-step collagenase perfusion procedure and cultured in vitro. Cells were divided into three groups, the control group, FFAs group and FFAs plus berberine treatment group. The content of triglyceride was determined in vitro. Steatosis was analyzed by oil red O staining. The MAPK related signal pathway was analyzed by Western-blot assay. Real-time PCR was used to detect the expression of miR-122 which was closely related to fat and relevant target genes in liver parenchymal cells. **Results:** Compared with FFAs group, berberine treatment decreased the content of triglyceride and fat particles significantly and improved steatosis obviously in liver parenchymal cells in a dose-dependent manner. Berberine could effectively inhibit phosphorylation of JNK pathway induced by FFAs. Q-PCR results showed that berberine could up-regulate the expression of miR-122 while down-regulate the expression of Dgat2. **Conclusions:** Berberine can significantly improve the steatosis induced by FFAs and inhibit phosphorylation of JNK pathway by a possible mechanism of miR-122 pathway.

Key words: Berberine; FFAs; Hepatocyte; Steatosis

Chinese Library Classification(CLC): R-332; R575.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)01-14-04

前言

非酒精性脂肪肝病(non-alcohol fatty liver disease, NAFLD)是指日摄入酒精量小于 10 g, 而肝脏脂肪沉积大于肝脏总重量 5%, 以肝实质细胞脂肪变性和脂肪贮积为特征的临床病理综合征。NAFLD 包括单纯性脂肪肝(NAFL)、非酒精性脂肪肝炎(NASH)、进展性肝纤维化和肝硬化等一系列肝脏疾

病^[1]。随着人们饮食结构和生活方式的改变, NAFLD 发病率逐年大幅上升, 其发病机制尚无明确定论。近年来研究者逐渐认识到肝细胞脂肪变性可能是 NAFLD 发病的中心环节之一。而目前缺乏疗效确切、副作用少的理想西药。许多研究表明中药单体对肝细胞脂肪变性有显著疗效。小檗碱, 也称黄连素, 一种常见的异喹啉生物碱, 是从毛茛科黄连属植物黄连、黄柏根茎中提取而出, 属季铵类化合物, 是目前研究最多的黄连生物碱。

* 基金项目: 重大科学仪器研究专项(2013YQ140405); 国家自然科学基金青年学者基金项目(31000405);

国家高技术研究发展计划(2012AA020201); 科技重大专项(2013ZX10002009-001)

作者简介: 赵娜(1991-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 细胞凋亡与信号转导, E-mail: zhaona8987@126.com

△ 通讯作者: 齐社宁, E-mail: qishn@lzu.edu.cn;

杨俊涛, E-mail: superyjt79@163.com

(收稿日期: 2014-07-16 接受日期: 2014-08-10)

具有抗肿瘤、抗心律失常、扩张冠状血管、抗肠道细菌感染等多种药理学作用。现代研究认为小蓂碱具有良好的降糖、降脂、提高胰岛素敏感性及改善胰岛素抵抗的作用^[23]。有研究表明小蓂碱可以通过调节抗氧化系统和脂质过氧化预防肝纤维化的发生,改善高脂血症和抑制胰岛素抵抗的作用^[4]。但具体机制尚不清楚。到目前为止在已发现的多种小蓂碱调脂作用机制中,都没有进行深入系统的研究,也并没有将小蓂碱作为调脂药真正广泛地应用于临床上。近年来对小蓂碱在临床上的调脂疗效观察较多,实验研究却较少,因此有必要关注小蓂碱在分子水平的进一步研究。

本研究以小鼠原代肝实质细胞为研究对象,体外建立脂肪化模型,检测小蓂碱对肝细胞脂肪变性的影响,以及细胞内 MAPK 相关信号通路磷酸化的变化,探讨与 miR-122 通路的相关性,针对性的探究细胞水平的脂肪肝发病机制,为 NAFLD 的分子机制奠定基础,并尝试为小蓂碱的临床应用提供良好的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

Balb/c 雄鼠购自维通利华实验技术有限公司,小蓂碱购自北京市药品检验所,Ⅳ型胶原酶购自美国 Sigma 公司,抗体和磷酸化抗体购自美国 CST 公司,TrizolRNA 提取试剂、游离脂肪酸(FFAs)购自美国 Sigma 公司,反转录试剂盒购自 Thermo Scientific,油红染料干粉、组织甘油三酯酶法测定试剂盒购自普利莱基因技术有限公司。DMEM 培养基、高脂培养基按参考文献^[5]配置。

1.2 方法

1.2.1 肝实质细胞的分离与培养 3%的戊巴比妥钠腹腔注射,麻醉后,固定于超净工作台中,75%的乙醇腹部消毒,解剖小鼠暴露肝脏、门静脉及下腔静脉,从门静脉插管对肝脏进行灌注 30 mL 灌注液。继灌注液后用 0.05%Ⅳ型胶原酶溶液灌注 30 mL。待消化完全后,取出小鼠肝脏放入平皿中,用镊子将肝脏撕碎,100 μ m 直径的筛网过滤。37 $^{\circ}$ C 水浴锅中消化 5 min。放入离心管 300 rpm,3 min 反复重悬离心至溶液上清清澈,细胞计数后接种于 6 孔板。分离后的肝实质细胞状态较好的呈圆形透亮状。将细胞板置于 5% CO₂,37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养。36 h 后,大部分细胞能够贴壁,呈现出肝实质细胞的状态,即可进行下一步实验。

1.2.2 实验分组 对照组只加 DMEM 培养基。高脂组加入 FFAs 培养。小蓂碱组加入 FFAs 和不同浓度(0~20 μ g/mL)的小蓂碱共同处理。

1.2.3 油红染色 贴壁细胞经处理 48 h 后小心吸去培养基,用 1 $\times$ PBS 轻缓漂洗一遍后加入 10%中性甲醛固定 30 min。按油红与去离子水 3:2 的比例稀释油红储液,室温静置 10 min 待用。甲醛固定后在培养板中加入油红工作液盖住板底,室温染色 20 min。去除油红,加入 75%酒精,脱色 1 min,PBS 轻缓漂洗一次,拍干液体,倒置显微镜下进行观察。

1.2.4 甘油三酯含量检测 在 6 孔板贴壁细胞分组处理后继续在培养箱中培养 24 h,取出细胞吸弃培养基,每孔加入 500 μ L 的裂解液,并用枪头研磨裂解后转入 1.5 mL EP 管,放入 70

$^{\circ}$ C 水浴锅中加热 10 min,3000 rpm 离心 5 min,取上层清夜做酶学测定。按照 10 μ L 的甘油标准品以及样品加入 190 μ L 工作溶液的比例分别加入工作液,加入后 37 $^{\circ}$ C 条件下反应 20 min,进行 OD570 nm 测定,并计算样品甘油三酯浓度。

1.2.5 Western blotting 检测 6 孔板肝实质细胞分组处理 2h 后提取细胞蛋白。用 0.9%氯化钠溶液轻柔洗涤后加入 400 μ L 0.9%氯化钠和 100 μ L 5 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液充分混匀,将混合物于 100 $^{\circ}$ C 加热变性 10 min,12000 $\times$ g 离心 1 min。取离心后蛋白样品 15 μ L 上样,用 12.5%SDS-PAGE 凝胶电泳分离,然后电转至 PVDF 膜。用 5%脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h,PBST 洗 3 次,每次 10 min。分别加入一抗 p-JNK、JNK 以及 GAPDH,工作浓度为 1:1000,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBST 洗膜后,加入工作浓度为 1:5000 辣根过氧化物酶标记的二抗,室温温育 1 h,PBST 洗 3 次。最后将发光试剂均匀涂于 PVDF 膜上,在暗室中曝光洗片。

1.2.6 Q-PCR 检测 分离的肝实质细胞贴壁后经高脂培养基和小蓂碱(小蓂碱终浓度:20 μ g/mL)处理 48 h,提取肝实质细胞总 RNA。反转录试剂盒合成 cDNA,以此为模板,利用实时定量 PCR 检测 miR-122 及相关靶基因的表达情况。miR-122 的检测取 5s-rRNA 作为内参,靶基因的检测取 β -actin 作为内参,试剂采用 SYBR Green 荧光标记,miRNA PCR 条件为 95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,70 $^{\circ}$ C 10 s,进行 45 个循环。靶基因 PCR 条件为 95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 32 s,进行 40 个循环。miRNA 基因引物由锐博生物公司(广州)提供, β -actin 和 Dgat2 由奥科生物公司(北京)合成,基因引物如下: β -actin:上游引物 5'-GT-GACGTTGACATCCGTAAAGA-3';下游引物 5'-GCCGGACT-CATCGTACTCC-3',Dgat2:上游引物 5'-ACTCTGGAGGTTG-GCACCAT-3';下游引物 5'-GGGTGTGGCTCAGGAGGAT-3'。

1.2.7 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小蓂碱能够抑制 FFAs 诱导的小鼠肝实质细胞内脂肪累积

分组加药后继续培养 48 h,进行油红染色处理,我们发现对照组细胞仍呈现出肝实质细胞的状态,未看到明显的脂肪滴。FFAs 组肝实质细胞内胞浆中脂肪滴数量明显增多,脂肪变性细胞较多。与高脂组比较,小蓂碱处理组细胞脂肪滴较少。油红染色显示,FFAs 培养能够明显诱导小鼠肝实质细胞内脂肪滴的形成,小蓂碱则能够明显减少脂肪的累积。此结果表明小蓂碱可以改善 FFAs 诱导的脂肪变性(图 1)。

2.2 小蓂碱能降低肝实质细胞内甘油三酯的含量

利用细胞甘油三酯检测试剂盒,进行肝实质细胞内总甘油三酯检测。结果同样表明,小蓂碱能够明显降低肝实质细胞内甘油三酯的含量,且呈明显的剂量效应。以上结果显示,小蓂碱在体外培养体系中,能够明显的抑制 FFAs 诱导的肝细胞脂肪变性,减少细胞内的甘油三酯累积(图 2)。

2.3 小蓂碱能够抑制 FFAs 诱导的肝实质细胞 JNK 通路的磷酸化

有研究表明 MAPK JNK 通路在肝脂肪变性中发挥了重要

作用,敲除小鼠 JNK1 基因后肝细胞脂肪变性增强^[9]。在本实验中,我们检测了在体外模型中 MAPK 通路的变化。Western blot 结果显示,FFAs 刺激后,肝实质细胞内 JNK 磷酸化程度明显增强。加小蘗碱和高脂共同处理后 JNK 磷酸化均不同程度的

减弱。随着小蘗碱浓度的增加,磷酸化减弱程度增强。这表明小蘗碱可以通过对 MAPK 通路的调节改善肝脂肪变性,有明显剂量效应关系(图 3)。

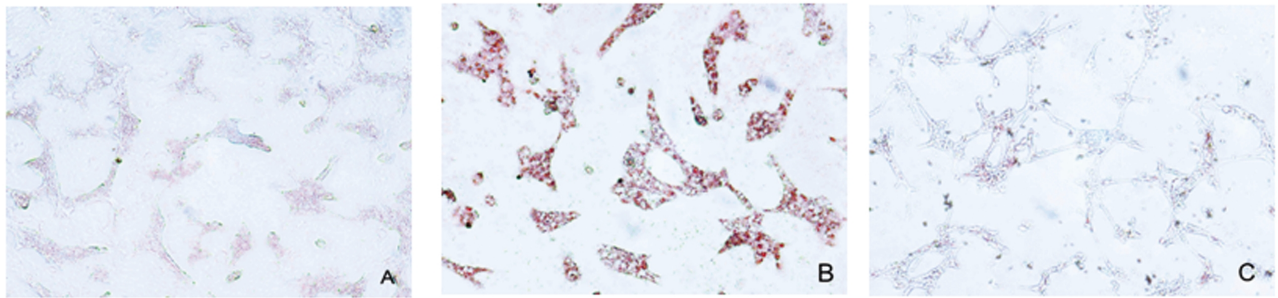


图 1 小蘗碱能够抑制 FFAs 诱导的小鼠肝实质细胞内脂肪滴形成

Fig. 1 Berberine can inhibit the formation of intracellular lipid droplets in liver parenchymal cells induced by FFAs

A: 对照组; B: 高脂组; C: 高脂加小蘗碱组(小蘗碱浓度: 20 $\mu\text{g/mL}$)。

A: Control group; B: FFAs group; C: FFAs plus berberine treatment group(concentration of berberine: 20 $\mu\text{g/mL}$)。

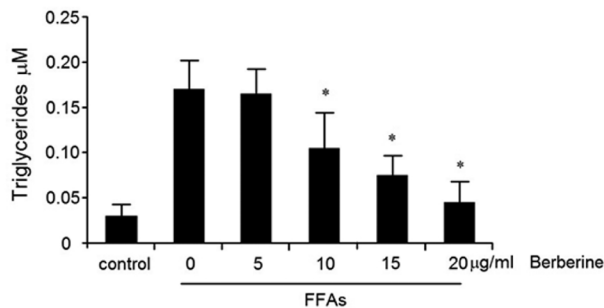


图 2 小蘗碱能够抑制 FFAs 诱导的小鼠肝实质细胞内甘油三酯的累积

Fig. 2 Berberine can inhibit the accumulation of triglycerides in liver parenchymal cells induced by FFAs

2.4 小蘗碱能够促进抗脂肪化 miRNA 的表达

研究指出,miR-122 在肝实质细胞脂肪化中发挥着重要的作用。肝脂肪变性实质上是甘油三酯在肝细胞内的积累,干扰小鼠 miR-122 基因,血清内胆固醇水平下降,脂肪酸及胆固醇合成速率下降,敲除小鼠 miR-122 基因后其肝脏甘油三酯含量升高^[7]。我们进一步研究了小蘗碱对肝实质细胞 miR-122 的表达调控。与对照组比,FFAs 诱导组 miR-122 的表达较低,小蘗碱处理后,miR-122 的表达显著上升(图 4A),同时,脂肪化重要相关蛋白 Dgat2 表达则明显降低(图 4B)。其中二酰甘油酰基转移酶(Dgat2)是甘油三酯在肝细胞内合成的关键酶之一,参与肝脏合成甘油三酯的最后一步^[8,9]。我们的结果表明,小蘗碱能够通过调控 miR-122 的表达进而参与肝实质细胞的脂肪化过程(图 4A)。

3 讨论

NAFLD 是一种无过量饮酒史,与遗传易感和胰岛素抵抗密切相关,由各种因素导致肝细胞内脂肪堆积,以肝实质细胞脂肪变性和脂肪贮积为主要特征的临床病理综合征。体内 FFA 在肝实质细胞脂肪变性过程中起到重要作用^[10]。生理状态下,FFA 可以通过自由扩散的方式或通过细胞膜上的脂肪酸转运蛋白进入细胞。经细胞内酶的催化作用与甘油形成甘油三酯,

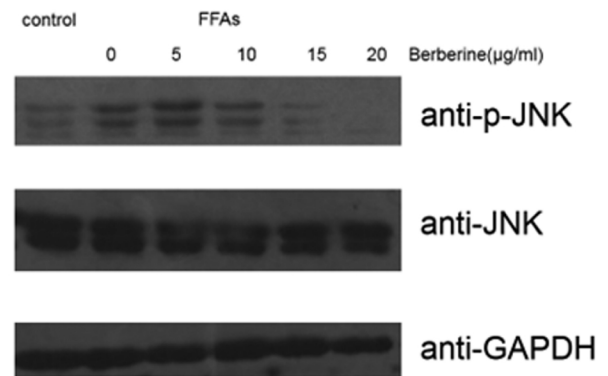


图 3 小蘗碱能够抑制 FFAs 诱导的 JNK 磷酸化

Fig. 3 Berberine can inhibit JNK phosphorylation induced by FFAs

甘油三酯又可以通过和蛋白结合生成低密度脂蛋白进而被转运到细胞外。病理因素下这种平衡被打破,导致细胞内甘油三酯大量贮积,引起肝实质细胞脂肪变性。

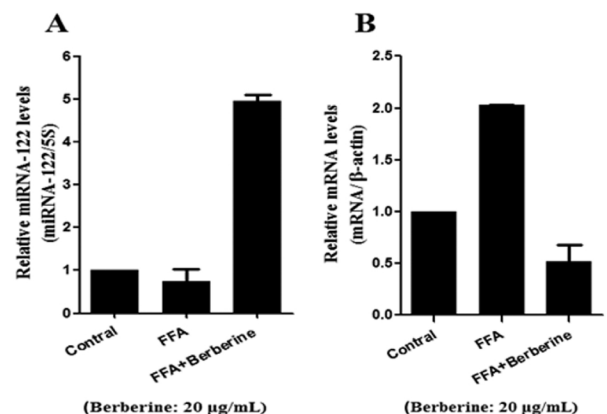


图 4 小蘗碱提高小鼠肝实质细胞内 miR-122 的表达(A),抑制 Dgat2 基因的表达(B)

Fig. 4 Berberine can enhance the expression of miR-122 (A)and inhibit the expression of Dgat2 (B) in liver parenchymal cells

詹莉^[11]等通过构建大鼠脂肪肝模型实验得出小蘗碱能够改善肝指数,降低血清及肝匀浆中甘油三酯含量,对高脂饲料

所致的大鼠 NAFLD 具有一定保护作用。李晓翠等利用高脂饮食复制 NAFLD 大鼠模型,造模成功后应用小檗碱治疗 4 周,发现小檗碱可以改善 NAFLD 的血脂紊乱,有抑制肝细胞脂性改变的作用^[12]。此外,Brusq 等^[13]将小檗碱作用于人肝癌细胞证实了小檗碱可以通过磷酸腺苷活化蛋白激酶抑制肝细胞内脂质合成和分泌,减少肝脏的脂质储存。Zhou 等通过类似实验发现小檗碱还可以通过体外上调肝脏低密度脂蛋白受体的表达从而降低肝癌细胞内脂质含量^[14]。近年来人们对小檗碱的调脂作用越来越重视,但具体机制尚不明确,直接针对原代肝细胞的研究也较少,本研究以小鼠原代肝实质细胞为实验对象,通过油红染色和甘油三酯含量测定的方法进一步检测小檗碱的调脂作用探讨相关机制。实验结果显示小檗碱能够显著降低肝实质细胞内甘油三酯的含量,抑制肝细胞内脂质蓄积,改善肝细胞脂肪变性。

既往研究表明在 NAFLD 慢性炎症病理进程中,JNK-AP-1 和 IKK-NF- κ B 两条信号传导通路起到至关重要的作用^[15]。JNK 是促有丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-Activated Protein Kinases, MAPK) 家族成员之一,在脂肪肝、高脂诱导的肝细胞脂肪变性发展过程中均起到关键作用,Indrani 等通过动物实验表明抑制 JNK 可以阻止高脂诱导的肝细胞脂肪变性^[16]。已知体外 FFAs 刺激肝实质细胞可以诱导 MAPK 通路磷酸化的改变,使肝实质细胞内 JNK 磷酸化程度明显增强^[17]。本实验中采用高脂刺激肝实质细胞发现 JNK 磷酸化程度显著增强,这与曾等^[17]实验结果相一致。我们将小檗碱作用于 FFAs 诱导的肝实质细胞,检测 MAPK 磷酸化信号通路的变化。从结果看小檗碱处理后 JNK 磷酸化程度比 FFAs 组明显减弱,随着小檗碱浓度增大磷酸化抑制作用也增强,实验结果表明小檗碱可以抑制 JNK 通路磷酸化,且剂量效应关系明显。

MicroRNAs(miRNAs)是一类长约 20~25 个核苷酸,具有调控功能的内源性非编码小 RNA,参与体内如发育、细胞增殖、造血过程、器官形成、病毒防御等众多重要的生物进程^[18,19]。也有研究表明 miRNA 在调节脂质代谢、脂肪细胞分化等方面均发挥重要作用^[20]。占肝脏总量 miRNA70% 的 miR-122,在肝脏胆固醇及脂肪酸合成代谢调节中发挥关键作用^[21]。最早研究发现反义抑制 miR-122,可降低血浆中胆固醇水平^[22]。Iliopoulos 等^[23]体外实验证明,miR-370 可以通过调节 miR-122 的表达间接调控胆固醇调节元件蛋白 1c(Srebp-1c)、二酰基甘油酰基转移酶(Dgat2)、脂肪酸合酶(Fas)、乙酰辅酶 A 羧化酶(Acc1)等相关转录调控因子,进而导致甘油三酯的积累。Monetti^[24]等发现 Dgat2 表达增强 2 倍后肝脏中甘油三酯的含量可增强 5 倍,与此同时,JNK 磷酸化却受到抑制。在 NAFLD 患者中,miR-122 的表达明显下降,Fas、Srebp-1c 等与脂质生成相关基因表达则上调,而以 HepG2 细胞为研究对象的体外实验证明沉默 miR-122 后,上述基因 24 h 内表达明显上调,但 48 h 后均下降^[25]。本实验中对 miR-122 和相关靶基因的表达进行检测,结果显示小檗碱能够促进肝实质细胞内 miR-122 的表达,并降低 Dgat2 的表达。

综上所述,小檗碱能够显著降低肝实质细胞内甘油三酯的含量,抑制肝细胞内脂质蓄积,改善肝细胞脂肪变性。本研究进一步表明小檗碱具有调脂、改善肝细胞脂肪变性的功能,其机

制可能与 MAPK 磷酸化通路和 miR-122 通路及相关靶基因密切相关,确切机制还有待于进一步的深入研究。

参考文献(References)

- [1] Moore JB. Non-alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome[J]. Proc Nutr Soc, 2010, 69(2): 211-220
- [2] 陆灏,叶伟成,丁学屏. 黄连素对实验大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. 辽宁中医学院学报, 2002, 4(4): 259-260
Lu Hao, Ye Wei-cheng, Ding Xue-ping. Effects of berberine on insulin resistance in rats [J]. Journal of Liaoning College of Traditional Chinese Medicine, 2002, 4(4): 259-260
- [3] 魏敬,吴锦丹,蒋建东,等. 盐酸小檗碱治疗 2 型糖尿病合并脂肪肝的临床研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2004, 14(6): 334-336
Wei Jing, Wu Jin-dan, Jiang Jian-dong, et al. Clinical study on improvement of type II diabetes mellitus complicated with fatty liver treated by berberine[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Liver Diseases, 2004, 14(6): 334-336
- [4] Zhang BJ, Xu D, Guo Y, et al. Protection by and anti-oxidant mechanism of berberine against rat liver fibrosis induced by multiple hepatotoxic factors[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008, 35(3): 303-309
- [5] Zhang X, Yang J, Guo Y, et al. Functional proteomic analysis of non-alcoholic fatty liver disease in rat models: enoyl-coenzyme A hydratase down-regulation exacerbates hepatic steatosis[J]. Hepatology, 2010, 51(4): 1190-1199
- [6] Sabio G, Cavanagh-Kyros J, Ko HJ, et al. Prevention of steatosis by hepatic JNK1[J]. Cell Metab, 2009, 10(6): 491-498
- [7] Esau C, Davis S, Murray SF, et al. MiR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting [J]. Cell Metab, 2006, 3(2): 87-98
- [8] Wurie HR, Buckett L, Zammit VA. Diacylglycerol acyltransferase 2 acts upstream of diacylglycerol acyltransferase 1 and utilizes nascent diglycerides and de novo synthesized fatty acids in HepG2 cells[J]. FEBS J, 2012, 279(17): 3033-3047
- [9] Yen CL, Stone SJ, Koliwad S, et al. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis[J]. J Lipid Res, 2008, 49(11): 2283-2301
- [10] Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Clin Invest, 2005, 115(5): 1343-1351
- [11] 詹莉,张丹,敖英,等. 小檗碱对高脂饲料所致大鼠非酒精性脂肪肝的保护作用[J]. 武汉大学学报(医学版), 2010, 31(1): 65-67
Zhan Li, Zhang dan, Ao Ying, et al. Protective effect of berberine on the nonalcoholic fatty liver induced by high-fat diet in rats[J]. Medical Journal of Wuhan University, 2010, 31(1): 65-67
- [12] 李晓翠,孙丹莉,张予蜀,等. 盐酸小檗碱对大鼠非酒精性脂肪性肝病的干预作用[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2011, 20(2): 107-112
Li Xiao-cui, Sun Dan-li, Zhang Yu-shu, et al. Effect of berberine hydrochloride on nonalcoholic fatty liver disease in rats [J]. Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2011, 20(2): 107-112
- [13] Brusq JM, Ancellin N, Grondin P, et al. Inhibition of lipid synthesis through activation of AMP kinase: an additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine [J]. J Lipid Res, 2006, 47 (6): 1281-1288

(下转第 32 页)

- chronic liver failure during antiviral treatment [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2011, 19(10): 734-737
- [14] Suzuki F, Miyakoshi H, Kobayashi M, et al. Correlation between serum hepatitis B virus core-related antigen and intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B patients [J]. J Med Virol, 2009, 81(1): 27-33
- [15] Takkenberg R B, Zaaijer H L, Molenkamp R, et al. Validation of a sensitive and specific real-time PCR for detection and quantitation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in plasma of chronic hepatitis B patients[J]. J Med Virol, 2009, 81(6): 988-995
- [16] Imazeki F, Wu S, Arai M, et al. HBeAg and HBV DNA in chronic hepatitis B[J]. Nihon Rinsho, 2011, 69(Suppl 4): 428-433
- [17] Yalamanchili N, Syed R, Chandra M, et al. A latest and promising approach for prediction of viral load in hepatitis B virus infected patients[J]. Indian J Hum Genet, 2011, 17(1): 17-21
- [18] Zhang W, Li Y H, Zhu S J, et al. Hepatitis B virus X-DNA. A serum marker for early detection of resistance development during lamivudine therapy[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1137: 264-272
- [19] Breitskreutz R, Zhang W, Lee M, et al. Hepatitis B virus nucleic acids circulating in the blood: distinct patterns in HBs carriers with hepatocellular carcinoma[J]. Ann N Y Acad Sci, 2001, 945: 195-206
- [20] Zhang S, Wang S, Wang Y. Inhibition of hepatitis B virus replication in vitro by phosphorothioate and tetradecyl phosphorothioate analogs of antisense oligonucleotide directed against precore and core regions[J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 1996, 35(2): 95-98

(上接第 17 页)

- [14] Zhou Y, Cao S, Wang Y, et al. Berberine metabolites could induce low density lipoprotein receptor up-regulation to exert lipid-lowering effects in human hepatoma cells[J]. Fitoterapia, 2014, 92: 230-237
- [15] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders [J]. Nature, 2006, 444(7121): 860-867
- [16] Sinha-Hikim, Sinha-Hikim AP, Shen R, et al. A novel cystine based antioxidant attenuates oxidative stress and hepatic steatosis in diet-induced obese mice[J]. Exp Mol Pathol, 2011, 91(1): 419-428
- [17] 晏贤春, 胡彬, 王赫, 等. 游离脂肪酸诱导小鼠肝实质细胞体外脂肪化并加速细胞凋亡[J]. 肝脏, 2013, 18(5): 306-309
- Yan Xian-chun, Hu Bin, Wang He, et al. FFAs induced mice hepatocytes to lipid accumulation and accelerated apoptosis in vitro[J]. Chinese Hepatology, 2013, 18(5): 306-309
- [18] Rottiers V, Naar AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(4): 239-250
- [19] Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship [J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(4): 271-282
- [20] Sacco J, Adeli K. MicroRNAs: emerging roles in lipid and lipoprotein metabolism[J]. Curr Opin Lipidol, 2012, 23(3): 220-225
- [21] Ceccarelli S, Panera N, Gnani D, et al. Dual Role of MicroRNAs in NAFLD[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(4): 8437-8455
- [22] Esau C, Davis S, Murray SF, et al. MiR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting [J]. Cell Metab, 2006, 3(2): 87-98
- [23] Iliopoulos D, Drosatos K, Hiyama Y, et al. MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1alpha and affects lipid metabolism[J]. J Lipid Res, 2010, 51(6): 1513-1523
- [24] Monetti M, Levin MC, Watt MJ, et al. Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver[J]. Cell Metab, 2007, 6(1): 69-78
- [25] Cheung O, Puri P, Eicken C, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression [J]. Hepatology, 2008, 48(6): 1810-1820