

和厚朴酚对脂变性状态下 HepG2 细胞脂合成的影响

翟 婷, 刘亚云, 续 威, 陈 勇*

(湖北大学中药生物技术省重点实验室, 药物高通量筛选技术国家地方联合工程研究中心, 湖北 武汉 430062)

摘要: 本文采用油红 O 染色法检测细胞脂滴含量, 荧光光度法检测细胞的葡萄糖摄取量, 实时荧光定量 PCR 及蛋白印迹法检测目标基因的表达量, 研究了和厚朴酚 (honokiol, HN) 对正常、TO901317 (TO) 和油酸 (oleic acid, OA) 处理的 HepG2 细胞脂合成、葡萄糖摄取及细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450 proteins, CYP) 家族的 CYP2E1、CYP4A 蛋白表达的影响。结果显示: ① TO 和 OA 处理能明显提高细胞中脂滴数量, 以及固醇调节元件结合蛋白 1c (sterol regulatory element binding protein-1, SREBP-1c) 和脂肪营养蛋白 3 (patatin-like phospholipase domain-containing 3, PNPLA3) 的 mRNA 和蛋白表达水平; 经 HN (10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理细胞 24 h 后, 肝细胞中脂滴明显减少, SREBP-1c 和 PNPLA3 mRNA 及蛋白表达量降低。② OA 处理能明显抑制细胞的糖摄取; 经 HN 处理 24 h 后, 肝细胞对荧光葡萄糖 [2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose, 2-NBDG] 的吸收呈剂量依赖性增加。③ 正常及 TO、OA 处理的 HepG2 细胞经 HN 处理 24 h 后, 胞内 CYP2E1 的蛋白表达量较对照组明显降低, 但 HN 给药仅抑制了经 OA 处理的 HepG2 细胞中 CYP4A 的蛋白表达量。上述结果表明, HN 可通过抑制脂变性状态下肝细胞内 SREBP-1c 和 PNPLA3 的表达而降低肝细胞的脂堆积, 通过下调肝细胞内 CYP2E1、CYP4A 的蛋白表达及促进肝细胞的糖摄取, 改善肝细胞的脂质过氧化和胰岛素抵抗。

关键词: 和厚朴酚; HepG2 细胞; 脂堆积; 糖摄取; CYP2E1; CYP4A

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 08-1324-07

The effects of honokiol on lipid synthesis in HepG2 cells with steatosis

ZHAI Ting, LIU Ya-yun, XU Wei, CHEN Yong*

(Hubei Province Key Laboratory of Biotechnology of Chinese Traditional Medicine, National and Local Joint Engineering Research Center of High-throughput Drug Screening Technology, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: In this study, the effects of honokiol (HN) treatment for 24 h on lipid synthesis was examined in HepG2 cells. The parameters include intracellular lipid droplet and the expression of SREBP-1c and PNPLA3, glucose uptake, and oxidative stress including the expression of CYP2E1 and CYP4A in normal, TO901317 (TO)- and oleic acid (OA)-treated HepG2 cells. The lipid droplets were detected by oil red O staining. The glucose uptake was measured by fluorescence spectrophotometry using [2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose, 2-NBDG] as probe. The expression levels of target genes were detected by quantitative PCR and Western blot. The results showed that: ① TO (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and OA (0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) treatment increased the levels of intracellular lipid accumulation and the mRNA and protein expression of SREBP-1c and PNPLA3. After HN (10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) treatment for 24 h, the lipid accumulation and the expression of SREBP-1c and PNPLA3 were all decreased in the tested cells. ② OA treatment significantly suppressed glucose uptake, while HN treatment dose-dependently increased the glucose uptake in OA-treated cells.

收稿日期: 2018-03-16; 修回日期: 2018-05-28.

基金项目: 湖北省新世纪高层次人才工程项目 (鄂人社函【2017】817号); 教育部大学生创新创业训练计划项目 (201610512001).

*通讯作者 Tel: 86-27-88663590, E-mail: cy101610@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0225

③ Compared with control group, CYP2E1 protein level significantly decreased in the three tested cells, and CYP4A protein level significantly decreased only in OA-treated cells following HN treatment. The above results suggest that HN may attenuate lipid accumulation by suppressing the expression of SREBP-1c and PNPLA3, and reduce lipid peroxidation and insulin resistance by down-regulation of the protein levels of CYP2E1 and CYP4A in HepG2 cells with steatosis.

Key words: honokiol; HepG2 cell; lipid accumulation; glucose uptake; CYP2E1; CYP4A

非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指在无过量饮酒史的情况下, 肝组织学的改变类似于酒精性肝病, 表现特征主要为肝细胞内脂肪过度沉积和脂肪变性^[1]。随着人们生活水平的提高, NAFLD 已经成为最常见的肝脏疾病之一, 寻找治疗 NAFLD 的药物具有十分重要的意义。

脂质堆积是 NAFLD 形成的主要特征^[2]。许多基因参与了肝脏的脂质代谢, 其中 SREBP-1c 和 PNPLA3 对肝脏中脂肪酸的合成具有重要作用。SREBP-1c 是脂肪酸合成相关基因的主要转录因子, 它可通过激活脂肪生成相关基因如乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl CoA carboxylase, ACC)、脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, FAS)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 (stearoyl-CoA desaturase 1, SCD-1)^[3, 4]及调控 PNPLA3 的表达来调节肝脂代谢^[5]。PNPLA3 也与肝脂堆积密切相关^[6], 过表达 PNPLA3 可促进小鼠原代肝细胞及人胚肾 HEK293 细胞中的甘油三酯含量^[7, 8]。研究表明在 NAFLD 状态下肝脏中 SREBP-1c 和 PNPLA3 的表达显著升高^[6, 9], 提示它们可能是治疗 NAFLD 的关键靶点。近来研究发现胰岛素抵抗和氧化应激也与 NAFLD 密切相关, NAFLD 患者肌肉、肝脏及脂肪组织的胰岛素敏感性降低^[10-12], 葡萄糖氧化和糖原合成减少^[11], 细胞脂质过氧化物水平显著提高^[13]。细胞色素 P450 家族中的 CYP2E1 和 CYP4A 与脂肪酸代谢密切相关, CYP2E1 可通过促进氧化应激、炎症反应、胰岛素抵抗及蛋白修饰作用影响 NAFLD 的发展^[14]。

和厚朴酚 (honokiol, HN) 是从传统中药厚朴中提取出来的一种带有烯丙基的连苯二酚类化合物, 具有抗菌、消炎、抗病毒、抗肿瘤等作用^[15, 16]。研究表明 HN 可通过抑制 SREBP-1c 的表达而抑制其下游的脂代谢相关基因 ACC、FAS 及 SCD-1 的表达, 逆转大鼠酒精性脂肪肝^[17]及游离脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂堆积^[18]。联合使用 HN 与厚朴酚可通过抑制 SREBP-1c 的表达及诱导某些脂肪酸氧化相关基因的表达, 进而缓解细胞脂堆积^[19]。HN 还可通过胰岛素信号通路促进前脂肪细胞的分化及脂肪细胞对葡萄

糖的摄取^[20, 21]。此外, HN 还能明显改善高脂饲料诱导的小鼠肝脏脂肪变性^[19]及高脂饲料-链脲佐菌素联合诱导的 2 型糖尿病大鼠血糖血脂及肝脏氧化应激损伤^[22]。然而, HN 是否可以缓解 NAFLD 状态下肝细胞的脂堆积目前尚不清楚。本文利用 TO901317 (肝 X 受体激动剂, TO) 和油酸 (肝脂变性诱导剂, oleic acid, OA) 处理 HepG2 细胞模拟人 NAFLD 病理状态, 体外研究了 HN 对 NAFLD 状态下 HepG2 细胞脂堆积及胰岛素抵抗的影响及其可能的作用机制。

材料与方 法

试剂 HN (纯度大于 97%, 武汉泰凯塞公司); DMEM 培养基 (美国 GIBCO 公司); 胎牛血清 (德国 Biochrom 公司); Trizol、2-NBDG (美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒 (上海海洋纺生物科技有限公司); DCFH-DA (中国 Beyotime Biotechnology 公司); β -actin、SREBP-1c、PNPLA3 引物 (上海桑尼生物科技有限公司); TO、OA、牛血清白蛋白、小鼠抗人 β -actin 多克隆抗体 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 兔抗人 PNPLA3、CYP 2E1 多克隆抗体、兔抗人 CYP 4A 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司) 兔抗人 SREBP-1c 多克隆抗体 (沈阳万类生物公司)。

细胞培养与处置 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, HepG2 细胞 (武汉大学典型培养物保藏中心) 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。取对数生长期细胞接种于 6 孔板中 (2×10^5 细胞/孔), 贴壁后按以下 3 种方式经 HN (10 、 20 和 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[18]处理 24 h: ① 正常 HepG2 组: 设溶剂对照组 (仅加入药物助溶剂二甲基亚砷 DMSO) 及低、中、高浓度 HN 给药组; ② TO 处理的 HepG2 组: 设溶剂对照组 (仅加入药物助溶剂 DMSO)、TO ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对照组及同时加 TO ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和低、中、高浓度 HN 给药组; ③ OA 处理的 HepG2 组: 设溶剂对照组 (仅加入药物助溶剂 DMSO 和甲醇)、OA ($0.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对照组 (经 OA 预处理 24 h 后再加 DMSO 处理 24 h) 及

OA ($0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 预处理后再经低、中、高浓度 HN 处理组。各溶剂对照组所用溶剂浓度与对应组其他给药组的溶剂浓度保持一致。

油红 O 染色 细胞经给药处理后, 用 PBS 缓冲液清洗 3 次, 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min, 60% 异丙醇润洗 10 s, 油红 O 染色液染色 30 min, 吸弃染色液后经 60% 异丙醇漂洗及 PBS 清洗后, 用倒置显微镜观察细胞内红色脂滴。

实时荧光定量 PCR 细胞经给药处理后, 提取总 RNA, 按照逆转录试剂盒说明逆转录成 cDNA。用 SYBR Green I 荧光染料法进行实时荧光定量 PCR, 反应条件为 95°C 预变性 3 min、 95°C 变性 30 s、 58.3°C 退火 30 s、 72°C 延伸 30 s, 共 40 个循环; 定量 PCR 的引物序列如下: SREBP-1c: Forward 5'-CGACATCG AAGACATGCTTCAG-3', Reverse 5'-GGAAGGCTTC AAGAGAGGAGC-3'; PNPLA3: Forward 5'-CTGTAC CCTGCCTGTGGAAT-3', Reverse 5'-TCGAGTGAAC ACCTGTGAGG-3'; β -actin: Forward 5'-TCACCCACA CTGTGCCATCTACGA-3', Reverse 5'-CAGCGGAA CCGCTCATTGCCAATGG-3'; 各基因表达水平的定量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算。

蛋白印迹 细胞经给药处理后, 提取总蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳分离目的蛋白并转至 PVDF 膜上, 封闭后 4°C 温孵一抗过夜, 用 TBST 洗膜后置于辣根过氧化酶标记的二抗中室温孵育 1 h, 使用增强化学发光法 (ECL) 进行化学发光反应。

葡萄糖摄取量检测 细胞经给药处理后, 换无糖 DMEM 培养基饥饿 3 h, 然后加入 $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2-NBDG 处理 30 min, 最后用预冷的 PBS 清洗细胞 3 次, 收集细胞后用多功能荧光酶标仪检测荧光强度, 激发光波长为 485 nm, 发射光波长为 535 nm。

数据处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析, 多组之间两两进行 t -检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

结果

1 HN 对细胞内脂堆积的影响

各组细胞经油红 O 染色法检测细胞内脂滴含量结果见图 1。图 1A 显示, 当 HN 给药浓度为 $40 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞内脂滴明显减少; 图 1B、C 显示, TO 组和 OA 组细胞内脂滴含量较图 1A 组显著增加, 但经低、中、高浓度 HN 处理后, 细胞内脂滴逐渐减少。结果表明, HN 能缓解经 TO 及 OA 诱导的 HepG2 细胞内脂堆积状况。

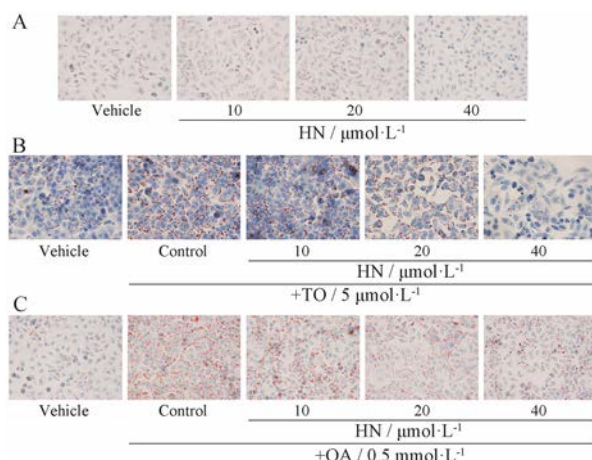


Figure 1 Effect of HN treatment for 24 h on the lipid accumulation in normal (A), TO-treated (B) and OA-pretreated (C) HepG2 cells detected by oil-red O staining ($400\times$). HN: Honokiol; TO: TO901317; OA: Oleic acid

2 HN 对 SREBP-1c 和 PNPLA3 表达的影响

各组细胞经实时荧光定量 PCR 及 Western blot 检测的 SREBP-1c 和 PNPLA3 mRNA 及蛋白表达的结果见图 2。图 2A 显示, 与溶剂对照组相比, HN 能抑制 HepG2 细胞 PNPLA3 mRNA 和蛋白的表达, 以及 SREBP-1c 的蛋白表达, 且中高剂量组有显著性差异。图 2B、C 显示, TO 及 OA 对照组与对应的溶剂对照组相比, SREBP-1c 及 PNPLA3 的 mRNA 和蛋白表达明显增加, 当使用 HN 处理后, SREBP-1c、PNPLA3 mRNA 和蛋白表达减少, 且与模型组相比, HN 给药组均有显著性差异。结果表明, HN 能抑制经 TO 及 OA 诱导的 HepG2 细胞 SREBP-1c、PNPLA3 mRNA 和蛋白表达。

3 HN 对细胞葡萄糖摄取的影响

各组细胞对荧光葡萄糖 2-NBDG 的摄取结果见图 3。图 3A、B 显示, HN 对正常及 TO 处理的 HepG2 细胞荧光葡萄糖摄取无明显影响。图 3C 显示 OA 对照组细胞对 2-NBDG 的摄取显著少于溶剂对照组, 但经低、中、高浓度 HN 处理 24 h 后, 细胞对 2-NBDG 的摄取呈剂量依赖性升高, 且低、中剂量组与 OA 组相比有显著性差异。结果表明, TO 处理不影响 HepG2 细胞的糖摄取能力, OA 处理能抑制 HepG2 细胞的糖摄取能力, 而 HN 处理能拮抗 OA 诱导的对肝细胞糖摄取的抑制作用。

4 HN 对 HepG2 细胞 CYP2E1、CYP4A 蛋白表达的作用

各组细胞内 CYP2E1 与 CYP4A 的蛋白表达量结果见图 4。结果显示, HN 处理对正常及经 TO 诱导的 HepG2 细胞 CYP4A 蛋白表达无明显影响, 但能显著

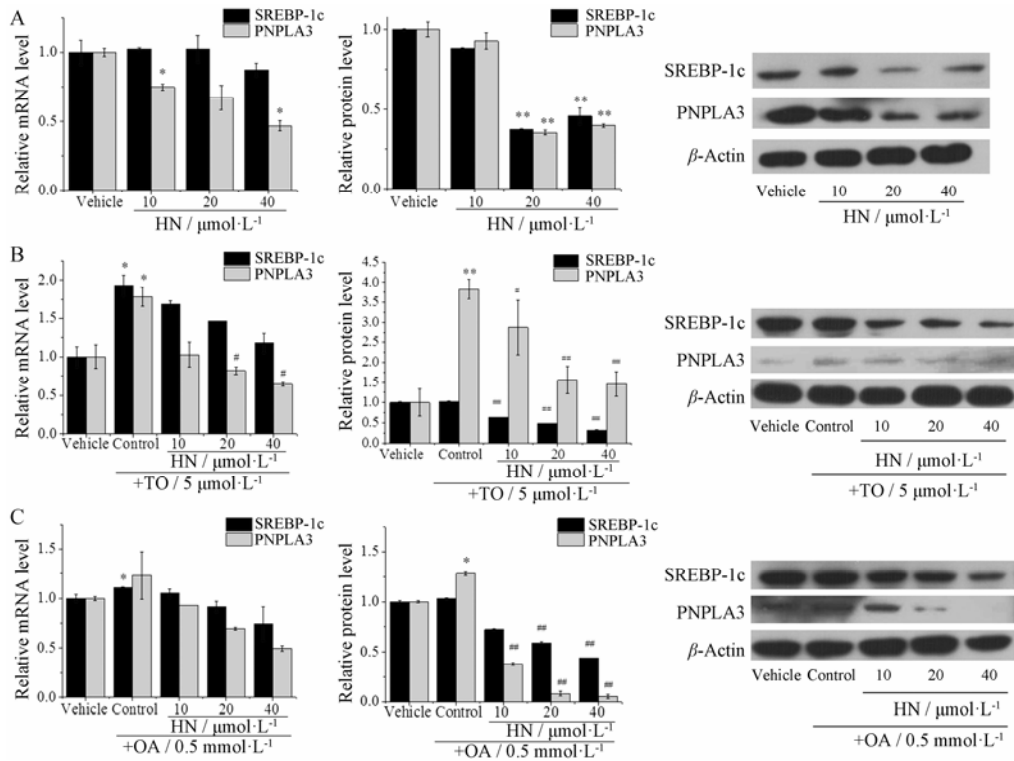


Figure 2 Effect of HN treatment for 24 h on the expression levels of mRNA and protein of SREBP-1c and PNPLA3 in normal (A), TO-treated (B) and OA-pretreated (C) HepG2 cells. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs vehicle; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs TO or OA

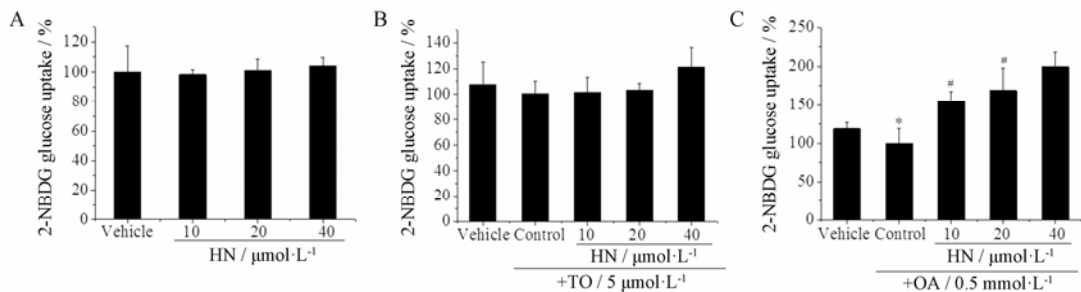


Figure 3 Effect of HN treatment for 24 h on the uptake of 2-NBDG in normal (A), TO-treated (B) and OA-pretreated (C) HepG2 cells. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. * $P<0.05$ vs vehicle; # $P<0.05$ vs OA. 2-NBDG: 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose

下调各组细胞 CYP2E1 的蛋白表达, 及经 OA 诱导的 HepG2 细胞 CYP4A 蛋白的表达, 且与空白或模型组相比, HN 给药组均有极显著性差异。

讨论

NAFLD 的发病机制目前尚无定论, “二次打击”学说得到较多认可。该学说认为第一次打击是由胰岛素抵抗导致的肝细胞脂堆积和脂变性, 第二次打击则是由第一次打击引起的肝细胞二次损伤, 包括氧化应激紊乱和线粒体功能障碍等^[23]。OA 是一种不饱和脂肪酸, 不仅能诱导 HepG2 细胞脂变性及 TNF- α 和 PNPLA3 的表达, 抑制 PPAR γ 和 SOD-1 的表达^[24, 25], 也能通过激活 p38 诱导肝细胞胰岛素抵

抗^[26]。TO 是肝 X 受体激动剂, 体内能显著诱导小鼠肝脏 SREBP-1c 的表达^[27], 体外也能诱导 HaCaT 细胞和 HepG2 细胞 SREBP-1c 及其下游脂肪合成关键基因 FAS 等的表达, 促进脂质合成增多^[28-30]。

SREBP-1c 和 PNPLA3 是 NAFLD 的敏感基因。在 NAFLD、饥饿及 2 型糖尿病状态下, 肝脏中 SREBP-1c 和 PNPLA3 的表达显著升高^[6, 9]。小鼠、大鼠及人肝脏中的 PNPLA3 基因受到 SREBP-1c 的直接调控, SREBP-1c 的上调表达会引起 PNPLA3 转录水平的显著上调^[5, 25]。本文研究发现, HN 能减少正常及 NAFLD 状态下 HepG2 细胞内的脂堆积, 抑制脂代谢关键基因 SREBP-1c 和 PNPLA3 的表达。胰岛素抵抗与 NAFLD 密切相关, 它能导致肝脂变性, 促

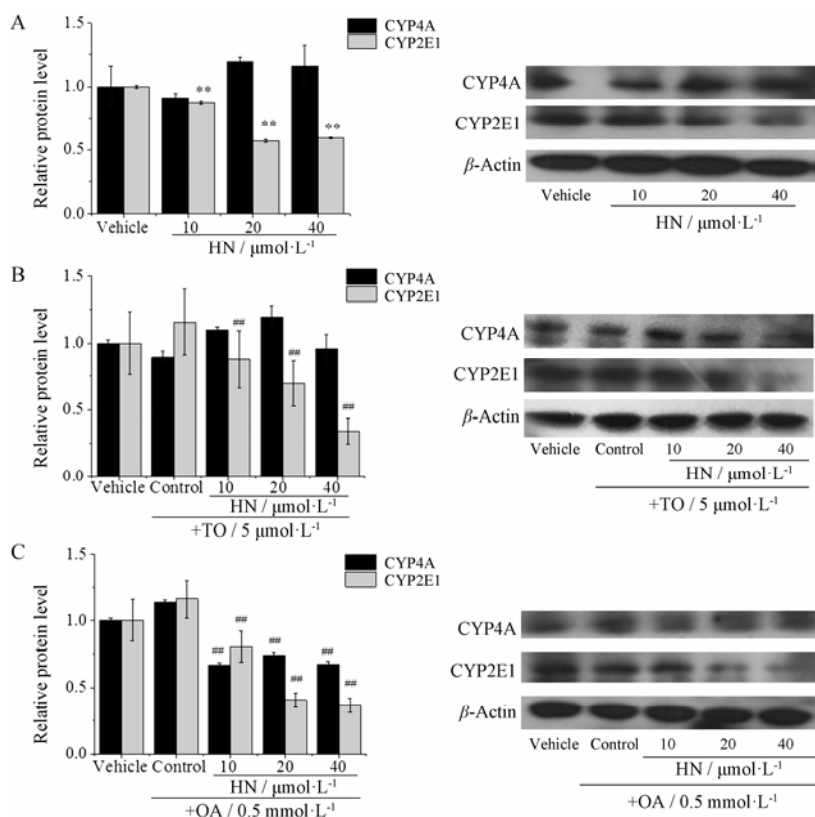


Figure 4 Effect of HN treatment for 24 h on the levels of CYP2E1 and CYP4A protein in normal (A), TO-treated (B) and OA-pretreated (C) HepG2 cells. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. ** $P<0.01$ vs vehicle; ### $P<0.01$ vs TO or OA

进肝脏对游离脂肪酸的吸收并通过酯化作用生成甘油三酯^[31, 32]。本文发现 OA 能抑制肝细胞的糖摄取, HN 处理能拮抗 OA 诱导的这种作用, 但在 TO 处理组则没有发现该现象, 这可能是因为 TO 只通过调控 SREBP-1c 而非通过胰岛素信号通路来调节脂代谢。上述结果表明, HN 能降低 NAFLD 状态下肝细胞的脂堆积, 促进对葡萄糖的摄取, 从而改善肝细胞的胰岛素抵抗。

氧化应激紊乱是 NAFLD 发生发展的重要原因^[33, 23]。肝脏中细胞色素 P450 家族中的 CYP2E1 和 CYP4A 在代谢一些低分子质量化合物如乙醇、脂肪酸、对乙酰氨基酚等过程中产生活性氧自由基 (ROS), 引发氧化应激反应、炎症反应与胰岛素抵抗, 进而诱发脂肪性肝病^[14, 34, 35]。ROS 虽是氧化应激的标志物, 但它的产生机制十分复杂, 体内 ROS 的主要来源是线粒体呼吸链的氧化还原反应, 其他如 NADPH 的氧化还原反应, CYP2E1/4A 对小分子化合物的代谢, 以及脂代谢等过程也是 ROS 生成的重要途径, 总 ROS 的含量并不能反映 CYP2E1/4A 与 NAFLD 的关系。此外, 文献报道芹菜素、草质素处理 HepG2 细胞, 能诱导 ROS 的生成导致肝癌细胞凋

亡, 从而发挥抗癌作用^[36, 37], HN 也有抗肿瘤作用, 能促进淋巴瘤细胞 Raji 细胞 ROS 的生成^[38], 因此, 本文没有报道 HN 对 OA 诱导的 HepG2 细胞 ROS 生成的影响, 而是根据 CYP2E1/4A 与 NAFLD 的关系, 探讨 HN 通过氧化应激途径对 NAFLD 的影响。本文发现 HN 可抑制脂变性状态下 HepG2 细胞 CYP2E1 和 4A 的蛋白表达, 这可能是 HN 缓解 NAFLD 模型细胞氧化应激损伤与胰岛素抵抗的重要原因。

References

- [1] Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, et al. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease [J]. Dig Dis, 2012, 28: 155–161.
- [2] Duvnjak M, Lerotic I, Barsic N, et al. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13: 4539–4550.
- [3] Shimomura I, Shimano H, Korn BS, et al. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver [J]. J Biol Chem, 1998, 273: 35299–35306.
- [4] Cha JY, Repa JJ. The liver X receptor (LXR) and hepatic

- lipogenesis: the carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR [J]. *J Biol Chem*, 2006, 282: 743–751.
- [5] Dubuquoy C, Robichon C, Lasnier F, et al. Distinct regulation of adiponutrin/PNPLA3 gene expression by the transcription factors ChREBP and SREBP1c in mouse and human hepatocytes [J]. *J Hepatol*, 2011, 55: 145–153.
- [6] Romeo S, Kozlitina J, Xing C, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Nat Genet*, 2008, 40: 1461–1465.
- [7] Qiao A, Liang J, Ke Y, et al. Mouse patatin-like phospholipase domain-containing 3 influences systemic lipid and glucose homeostasis [J]. *Hepatol*, 2011, 54: 509–521.
- [8] Lake AC, Sun Y, Li JL, et al. Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of adiponutrin family members [J]. *J Lipid Res*, 2005, 46: 2477–2487.
- [9] Ahmed MH, Byrne CD. Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Drug Discov Today*, 2007, 12: 740–747.
- [10] Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, et al. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects [J]. *Gastroenterology*, 2007, 133: 496–506.
- [11] Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms [J]. *Diabetologia*, 2005, 48: 634–642.
- [12] Lomonaco R, Ortiz-Lopez C, Orsak B, et al. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatol*, 2012, 55: 1389–1397.
- [13] Narasimhan S, Gokulakrishnan K, Sampathkumar R, et al. Oxidative stress is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in subjects with and without type 2 diabetes [J]. *Clin Biochem*, 2010, 43: 815–821.
- [14] Abdelmegeed MA, Banerjee A, Yoo SH, et al. Critical role of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the development of high fat-induced non-alcoholic steatohepatitis [J]. *J Hepatol*, 2012, 57: 860–866.
- [15] Sumit A, Seema S, Gary AP, et al. Honokiol: a novel natural agent for cancer prevention and therapy [J]. *Curr Mol Med*, 2012, 12: 1244–1252.
- [16] Chen SZ. Research progress in anticancer effects and molecular targets of honokiol in experimental therapy [J]. *Acta Pharma Sin (药学报)*, 2016, 51: 202–207.
- [17] Yin HQ, Kim YC, Chung YS, et al. Honokiol reverses alcoholic fatty liver by inhibiting the maturation of sterol regulatory element binding protein-1c and the expression of its downstream lipogenesis genes [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2009, 236: 124–130.
- [18] Seo MS, Kim JH, Kim HJ, et al. Honokiol activates the LKB1-AMPK signaling pathway and attenuates the lipid accumulation in hepatocytes [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2015, 284: 113–124.
- [19] Lee JH, Jung JY, Jang EJ, et al. Combination of honokiol and magnolol inhibits hepatic steatosis through AMPK-SREBP-1c pathway [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2014, 240: 508–518.
- [20] Alonso-Castro AJ, Zapata-Bustos R, Domínguez F, et al. *Magnolia dealbata* Zucc and its active principles honokiol and magnolol stimulate glucose uptake in murine and human adipocytes using the insulin-signaling pathway [J]. *Phyto-medicine*, 2011, 18: 926–933.
- [21] Choi SS, Cha BY, Iida K, et al. Honokiol enhances adipocyte differentiation by potentiating insulin signaling in 3T3-L1 preadipocytes [J]. *J Nat Med*, 2011, 65: 424–430.
- [22] Wang JJ, Zhao R, Liang JC, et al. Antidiabetic and antioxidative effects of honokiol on diabetic rats induced by high-fat diet and streptozotocin [J]. *Chin Herb Med*, 2014, 6: 42–46.
- [23] Giorgio V, Prono F, Graziano F, et al. Pediatric non alcoholic fatty liver disease: old and new concepts on development, progression, metabolic insight and potential treatment targets [J]. *BMC Pediatr*, 2013, 13: 40.
- [24] Cui W, Chen SL, Hu KQ. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells [J]. *Am J Transl Res*, 2010, 2: 95–104.
- [25] Huang Y, He S, Li JZ, et al. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 7892–7897.
- [26] Liu HY, Collins QF, Xiong Y, et al. Prolonged treatment of primary hepatocytes with oleate induces insulin resistance through p38 mitogen-activated protein kinase [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 14205–14212.
- [27] Oberkofler H, Schraml E, Krempler F, et al. Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α [J]. *Biochem J*, 2003, 371: 89–96.
- [28] Hong I, Rho HS, Kim DH, et al. Activation of LXR α induces lipogenesis in HaCaT cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2010, 33: 1443–1449.
- [29] Zhong D, Zhang Y, Zeng YJ, et al. MicroRNA-613 represses lipogenesis in HepG2 cells by downregulating LXR α [J]. *Lipids Health Dis*, 2013, 12: 32.
- [30] Zhong D, Huang G, Zhang Y, et al. MicroRNA-1 and

- microRNA-206 suppress LXR α -induced lipogenesis in hepatocytes [J]. *Cell Signal*, 2013, 25: 1429–1437.
- [31] D'Adamo E, Cali AM, Weiss R, et al. Central role of fatty liver in the pathogenesis of insulin resistance in obese adolescents [J]. *Diabetes Care*, 2010, 33: 1817–1822.
- [32] Cali AM, De Oliveira AM, Kim H, et al. Glucose dysregulation and hepatic steatosis in obese adolescents: is there a link? [J]. *Hepatology*, 2009, 49: 1896–1903.
- [33] Kumar A, Sharma A, Duseja A, et al. Patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) have higher oxidative stress in comparison to chronic viral hepatitis [J]. *J Clin Exp Hepatol*, 2013, 3: 12–18.
- [34] Enriquez A, Leclercq I, Farrell GC, et al. Altered expression of hepatic CYP2E1 and CYP4A in obese, diabetic *ob/ob* mice, and *fa/fa* Zucker rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 255: 300–306.
- [35] Leclercq IA, Farrell GC, Field J, et al. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105: 1067–1075.
- [36] Choi SI, Jeong CS, Cho SY, et al. Mechanism of apoptosis induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells: involvement of reactive oxygen species generated by NADPH oxidase [J]. *Arch Pharm Res*, 2007, 30: 1328–1335.
- [37] Qiao Y, Xiang Q, Yuan L, et al. Herbacetin induces apoptosis in HepG2 cells: involvements of ROS and PI3K/Akt pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 51: 426–433.
- [38] Gao DQ, Qian S, Ju T. Anticancer activity of honokiol against lymphoid malignant cells *via* activation of ROS-JNK and attenuation of Nrf2 and NF- κ B [J]. *J BUON*, 2016, 21: 673–679.