

体外棕榈酸诱导自噬调节奶牛淋巴细胞炎症通路

李树森 杨晓燕 李莹 邓清华 薛江东 王新波 张玉明* 杜立银*

(内蒙古民族大学 动物科学技术学院,内蒙古 通辽 028000)

摘要 为探讨体外棕榈酸(Palmitic acid,PA)是否可以通过自噬调节奶牛淋巴细胞炎症信号通路的激活,分离健康奶牛淋巴细胞,采用3-MA(3-Methyladenin,细胞自噬抑制剂)和不同质量浓度PA作用于淋巴细胞,收集细胞及上清,利用qRT-PCR检测淋巴细胞*LC3B*、*Beclin1*、*mTOR*、*ULK1*、*SQSTM1*、*IL-1 β* 、*IL-6*和*TNF- α* mRNA表达情况;利用CCK-8和酶联免疫吸附法分别测定细胞活性和促炎细胞因子*TNF- α* 、*IL-6*和*IL-1 β* 的释放量。CCK-8结果表明:PA显著抑制淋巴细胞活性($P<0.01$),添加自噬抑制剂3-MA后细胞活性显著增强($P<0.01$);qRT-PCR结果表明:与对照组(PA=0 $\mu\text{g/mL}$)相比,PA处理组(不含3-MA)*ULK1*和*LC3B* mRNA表达极显著增加($P<0.01$),*mTOR*、*Beclin1*和*SQSTM1* mRNA表达极显著降低($P<0.01$);*IL-1 β* 和*IL-6* mRNA表达显著增强($P<0.01$),而*TNF- α* 未表达;添加3-MA后,与1 $\mu\text{g/mL}$ PA处理组相比较,*SQSTM1*和*Beclin1*极显著增加,而*LC3B* mRNA表达极显著降低($P<0.01$);*IL-1 β* 和*IL-6* mRNA表达显著下调($P<0.01$);PA增加促炎因子*IL-6*和*IL-1 β* 的释放($P<0.01$),显著抑制*TNF- α* 释放($P<0.01$),而含有3-MA的PA混合处理组则显著降低($P<0.01$)。综上,PA可通过自噬调节奶牛淋巴细胞炎症信号通路的激活。

关键词 奶牛; 棕榈酸; 淋巴细胞; 自噬; 炎症

中图分类号 S856.5

文章编号 1007-4333(2021)01-0043-08

文献标志码 A

Palmitic acid induces autophagy to regulate lymphocytic inflammatory pathways in dairy cows

LI Shusen, YANG Xiaoyan, LI Ying, DENG Qinghua, XUE Jiangdong,

WANG Xinbo, ZHANG Yuming*, DU Liyin*

(College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China)

Abstract To investigate whether palmitic acid (PA) in dairy cows *in vitro* can regulate the activation of inflammatory signaling pathway through autophagy, lymphocytes isolated from healthy dairy cows were treated with 3-MA and different concentrations of PA and cells and supernatants were collected. The expressions of *LC3B*, *Beclin1*, *mTOR*, *ULK1*, *SQSTM1*, *IL-1 β* , *IL-6* and *TNF- α* in lymphocytes were detected by qRT-PCR. The cell activity and release of proinflammatory cytokines *TNF- α* , *IL-6* and *IL-1 β* were measured by CCK-8 and ELISA, respectively. The CCK-8 results showed that PA significantly inhibited lymphocyte activity ($P<0.01$), and its cell activity was significantly enhanced after 3-MA treatment ($P<0.01$); Compared with the control group (PA = 0 $\mu\text{g/mL}$), the expression levels of *ULK1* and *LC3B* mRNA in the PA treatment group (excluding 3-MA) were significantly increased ($P<0.01$), *mTOR*, *Beclin1*, and *SQSTM1* mRNA were significantly decreased ($P<0.01$), *IL-1 β* and *IL-6* mRNA expression were significantly increased ($P<0.01$), while *TNF- α* was not expressed. After the addition of 3-MA, *SQSTM1* and *Beclin1*

收稿日期: 2020-02-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260626、31760752);内蒙古自治区肉牛疾病防控工程技术研究中心开放课题(MDK2017021);内蒙古自治区自然科学基金项目(2018LH03009)

第一作者: 李树森, 硕士研究生, E-mail: shusenli1995@163.com

通讯作者: 张玉明, 讲师, 主要从事动物代谢免疫学研究, E-mail: zhangyuming1117@163.com;

杜立银, 教授, 主要从事动物临床免疫学研究, E-mail: dly2000@aliyun.com

were significantly increased, while *LC3B* mRNA expression was significantly decreased ($P < 0.01$); *IL-1 β* and *IL-6* mRNA expression were significantly down-regulated ($P < 0.01$); PA increased the release of proinflammatory cytokines *IL-6* and *IL-1 β* ($P < 0.01$), significantly inhibited the release of *TNF- α* ($P < 0.01$), while it was significantly decreased in 3-MA + PA mixed treatment ($P < 0.01$). In conclusion, PA can regulate the activation of lymphocyte inflammatory signaling pathway in cows through autophagy.

Keywords cow; palmitic acid; lymphocyte; autophagy; inflammation

棕榈酸(Palmitic acid, PA)是一种 16 碳长链饱和脂肪酸,血浆中 PA 占总脂肪酸含量比例较高,对脂质代谢相关疾病的发展起到关键性作用,如肥胖、糖尿病和心血管疾病等。PA 不仅可通过 β 氧化作为一种能量来源,还可作为多种疾病发生发展的标志性分子。此外,还可促进细胞膜合成,构成细胞膜骨架,作为致癌信号脂质,如甘油磷脂、鞘脂和醚脂质等^[1-2]。多项研究表明,PA 可诱导机体炎症反应的发生^[3-5]。

自噬作为一种稳态机制出现,调节受损蛋白质和细胞器的周转,并通过回收细胞内成分帮助缓冲各种细胞应激。研究表明,许多人类疾病的发病机制与自噬失调有关,包括癌症、感染、退行性疾病和代谢性疾病^[6]。自噬机制被认为是一种应激反应,支持真核生物单细胞在病变条件下生存,可能通过调节能量稳态和/或通过蛋白质和细胞器降解途径来实现。自噬机制参与细胞应激反应通路(包括参与控制免疫反应和炎症的通路)调节,自噬蛋白可以和免疫信号分子直接相互作用^[7-8]。在适应性免疫中,自噬蛋白也发挥一定功能,包括免疫系统的发展和内稳态,以及抗原呈递^[8]。患有脂肪肝的奶牛,体内细胞长期处于高脂环境下,容易发生自噬现象^[9]。

越来越多的证据表明自噬与炎症之间具有重要联系。自噬蛋白在免疫诱导和抑制炎症反应中起作用,免疫和炎症信号在自噬的诱导和抑制中同样起作用^[10]。在敲除小鼠胚胎造血干细胞自噬基因 *Atg5* 后,体内的自噬蛋白 SQSTM1 积聚增加,减少了 B 细胞、*CD4⁺* T 细胞及 *CD8⁺* T 细胞数量,并导致胚胎造血干细胞的死亡^[11-13]。在造血细胞缺乏自噬基因 *Atg16L1* 的小鼠中,*IL-1 β* 和 *IL-18* 水平显示升高,炎症小体激活关键的促炎细胞因子,表明自噬基因可以激活炎症信号通路^[14-15]。另外,小鼠巨噬细胞特异性的自噬基因缺失使得大量炎症因子 *IL-1 β* 释放,导致引发葡萄膜炎^[16]。

尽管多项研究已经表明 PA 在巨噬细胞和星形

胶质细胞中损害自噬,导致炎症反应增强^[17-18]。但 PA 对淋巴细胞自噬功能的影响尚未被探索,PA 是否可以通过诱导奶牛淋巴细胞的自噬影响免疫功能。因此,本试验通过分离并培养奶牛淋巴细胞,探讨体外不同浓度的 PA 是否可以通过诱导淋巴细胞自噬调节炎症反应应答,并分析其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

棕榈酸(Sigma 公司, P0500-100G)粉末;胎牛血清、双抗、RPMI-1640(Thermo 公司, PM150122); Trizol Reagent (Invitrogen 公司);反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒和 qRT-PCR 扩增试剂(Taka-Ra 公司);Percoll 分离液(GE Healthcare, 17-0891-09);生理盐水;红细胞裂解液(TIANGEN 公司, S1821);3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)(Selleck 公司, S2767)粉末。

1.2 淋巴细胞的分离与培养

抽取健康奶牛(内蒙古民族大学实验基地) 50 mL 新鲜血于抗凝管中,与 PBS 1 : 1 稀释。Percoll 原液与生理盐水混合配制成 1.084 g/mL 的分离液,取 4 mL 分离液于离心管中,将 PBS 稀释后的抗凝血 2 mL 小心叠加在分离液上,1 500 rpm 水平离心 25 min,可观察到 4 个细胞层,从上至下分别为:死细胞残片和血小板层、单核细胞层、淋巴细胞层、中性粒细胞及红细胞层。分离淋巴细胞,加入 RPMI-1640 完全培养基(含 10%胎牛血清),接种于 24 孔板,每孔 2×10^6 个细胞。

1.3 棕榈酸(PA)的溶解

用 0.01 mol/L 的 NaOH 溶液配置 10 mmol/L 的棕榈酸储存液,于 70 °C 水浴中加入脱脂 BSA, 0.22 μ m 滤头过滤,分别配置 0、0.1、0.5、和 1 μ g/mL 质量浓度的 PA,现用现配。

1.4 试验设计

试验分为 5 个处理组(表 1),每组 3 个重复,以平均数士标准差进行数据分析。

表 1 试验设计

Table 1 Experimental designing

组别 Group	PA 质量浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$ PA concentration	3-MA 浓度/ (mmol/L) 3-MA concentration
对照组 Control group (Con.)	0	0
处理组 1 Treatment 1 (T1)	0.1	0
处理组 2 Treatment 2 (T2)	0.5	0
处理组 3 Treatment 3 (T3)	1	0
处理组 4 Treatment 4 (T4)	1	10

1.5 CCK-8 法检测细胞活性

按照每孔 $100 \mu\text{L}$ 细胞液, 约 2×10^5 个细胞接于 96 孔板。 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$ 预培养 1 h, 向孔内加入不同浓度棕榈酸, 培养 3 h 后, 每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液, 再孵育 4 h, 酶标仪测定 450 nm 处吸光度。

1.6 qRT-PCR 检测

收集棕榈酸处理的淋巴细胞, Trizol 法提总 RNA, 微量分光光度计测定 RNA 浓度, 使用反转录试剂盒反转录为 cDNA, 采用 SYBR Green I qRT-PCR 试剂盒检测自噬及炎症通路关键因子 mRNA 转录水平。

表 1 qRT-PCR 引物设计

Table 1 Primer design of qRT-PCR

基因 Gene	引物序列($5'-3'$) Primer sequence ($5'-3'$)	片段长度/bp Fragment length
<i>SQSTM1</i>	F: CAGATGCTGTCCATGGGGTT R: GAGGAGTCTCTCGCTCTGCC	404
<i>LC3B</i>	F: TAAGGAAACCGTGCTGCTGT R: GCAGTGGTGT TTTTCCGTGT	124
<i>ULK1</i>	F: CCTGATGGAGCAAGAGCACA R: ACTGCACCGTCTGCACTG	467
<i>Beclin1</i>	F: AGTTGAGAAAGGCGAGACAC R: GATGGAATAGGAACCACCAC	201
<i>mTOR</i>	F: CTCATGGCCCGATGTTTCCT R: ATCCTCAGTGACCTTCTTCTGC	384
<i>IL-6</i>	F: AAACGAGTGGGTAAAGAACGC R: GACCAGAGGAGGGAATGCC	143
<i>IL-1β</i>	F: GCATGAGCTTTGTGCAAGGA R: CTTGGGGTAGACTTTGGGGTC	149
<i>TNF-α</i>	F: CGGTGGTGGGACTCGTA R: AATGCGGCTGATGGTGT	185
<i>βactin</i>	F: ACTCCTATGTGGGTGACGAG R: CATCTTTTCACGGTTGGCCTTAG	206

根据 Genbank 中 *LC3B*、*Beclin1*、*mTOR*、*ULK1*、*SQSTM1*、*IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* 和 *β -actin* mRNA 序列和引物设计原则,利用 Primer 5.0 软件设计引物。qRT-PCR 反应体系(20 μ L)如下:ROX 10 μ L;上游引物 1 μ L,下游引物 1 μ L;模板 cDNA 1 μ L;ddH₂O 7 μ L。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s;60 $^{\circ}$ C 退火 15 s,共计 45 个循环。

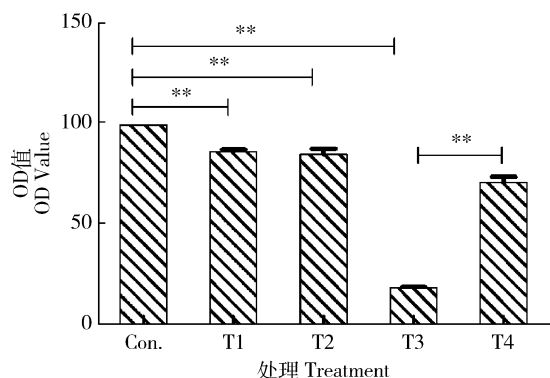
1.7 数据处理

采用 SPSS 17.0 进行数据处理,采用单因素方差分析(ANOVA)和多重比较分析(LSD),以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 PA 对细胞活力的影响

CCK-8 结果显示,与空白对照组相比,随着 PA 浓度逐渐升高,细胞活性逐渐降低;而与 1 μ g/mL PA 处理组相比较,添加 1 μ g/mL PA+3-MA 处理后,细胞活性显著增强(图 1)。这表明 PA 可能通过自噬影响细胞活性。



* 为显著差异 $P < 0.05$, ** 为极显著差异 $P < 0.01$ 。

* Significant difference $P < 0.05$, ** Extremely significant difference $P < 0.01$.

图 1 CCK-8 检测淋巴细胞细胞活性

Fig. 1 Detection of cell viability of lymphocyte by CCK-8

2.2 PA 诱导奶牛淋巴细胞自噬相关基因 mRNA 的表达

如图 2 所示,不同浓度 PA 处理细胞 3 h 后,与对照组相比,*ULK1* 和 *LC3B* mRNA 表达极显著增加($P < 0.01$)(图 2(b)和(d)),*mTOR*、*SQSTM1* 和 *Beclin1* mRNA 表达极显著降低($P < 0.01$)(图 2(a)、(c)和(e));添加 3-MA 后,与 1 μ g/mL PA 处理组相比较,*SQSTM1* 和 *Beclin1* 极显著增加,而 *LC3B*

mRNA 表达极显著降低($P < 0.01$)。表明 PA 可以诱导奶牛淋巴细胞自噬。

2.3 PA 通过自噬调节奶牛淋巴细胞促炎细胞因子 mRNA 的表达

如图 3 所示,与对照组相比较,PA 处理组显著增加 *IL-1 β* 和 *IL-6* mRNA 的表达($P < 0.01$)(图 3(a)和(b)),而显著抑制 *TNF- α* mRNA 的表达($P < 0.01$)(图 3(c));与 PA 处理组相比较,PA+3-MA 处理组中 *IL-1 β* 和 *IL-6* mRNA 的表达极显著降低,这表明 PA 可以通过自噬调节炎症反应($P < 0.01$)。

2.4 PA 通过自噬调节奶牛淋巴细胞促炎细胞因子的释放

如图 4 所示,与对照组相比较,PA 处理组显著增加 *IL-1 β* 和 *IL-6* 的释放($P < 0.01$)(图 4(a)和(b)),显著抑制 *TNF- α* 的释放($P < 0.01$)(图 4(c));与 PA 处理组相比较,PA+3-MA 处理组中 *IL-1 β* 和 *IL-6* 释放量极显著降低($P < 0.01$),进一步表明 PA 可通过自噬调节炎症反应应答。

3 讨论

脂肪肝奶牛机体类似 2 型糖尿病患者(T2DM),长期存在慢性炎症,主要由血液中的高浓度脂肪酸(PA)造成,高水平的 PA 环境导致细胞对 PA 的摄取增加。临床和流行病学研究表明,血浆 PA 水平升高(而不是其他饱和脂肪酸)可能与代谢综合征有关^[19-21]。另外,PA 可以显著诱导小胶质细胞促炎因子 *IL-1 β* 、*IL-6* 和 *TNF- α* 的释放^[22-24]。这与本研究中 *IL-1 β* 和 *IL-6* 水平的显著升高一致,不同的是,其对 *TNF- α* 的分泌产生了抑制作用,这可能与细胞的差异性相关。

研究表明,高浓度的脂肪酸在肥胖和糖尿病等疾病的发病机制中起着重要作用,血液中淋巴细胞长期浸润在高浓度脂肪酸中,由于脂毒性改变其功能^[25],而自噬被认为是调节脂质代谢和脂毒性的重要机制,如肝细胞通过自噬来消化和利用脂滴既脂肪的溶酶体降解途径^[26-27]。本研究中,通过分离并培养奶牛淋巴细胞,体外 PA 诱导淋巴细胞建立奶牛脂肪肝体内环境模型,研究 PA 通过诱导自噬调节奶牛淋巴细胞的炎症信号通路,并分析其机制。

自噬是维持细胞稳态的重要机制,直接影响细胞活性,药理学或遗传抑制自噬导致凋亡细胞死亡^[28],自噬损伤与代谢性疾病,以及其它病理生理条

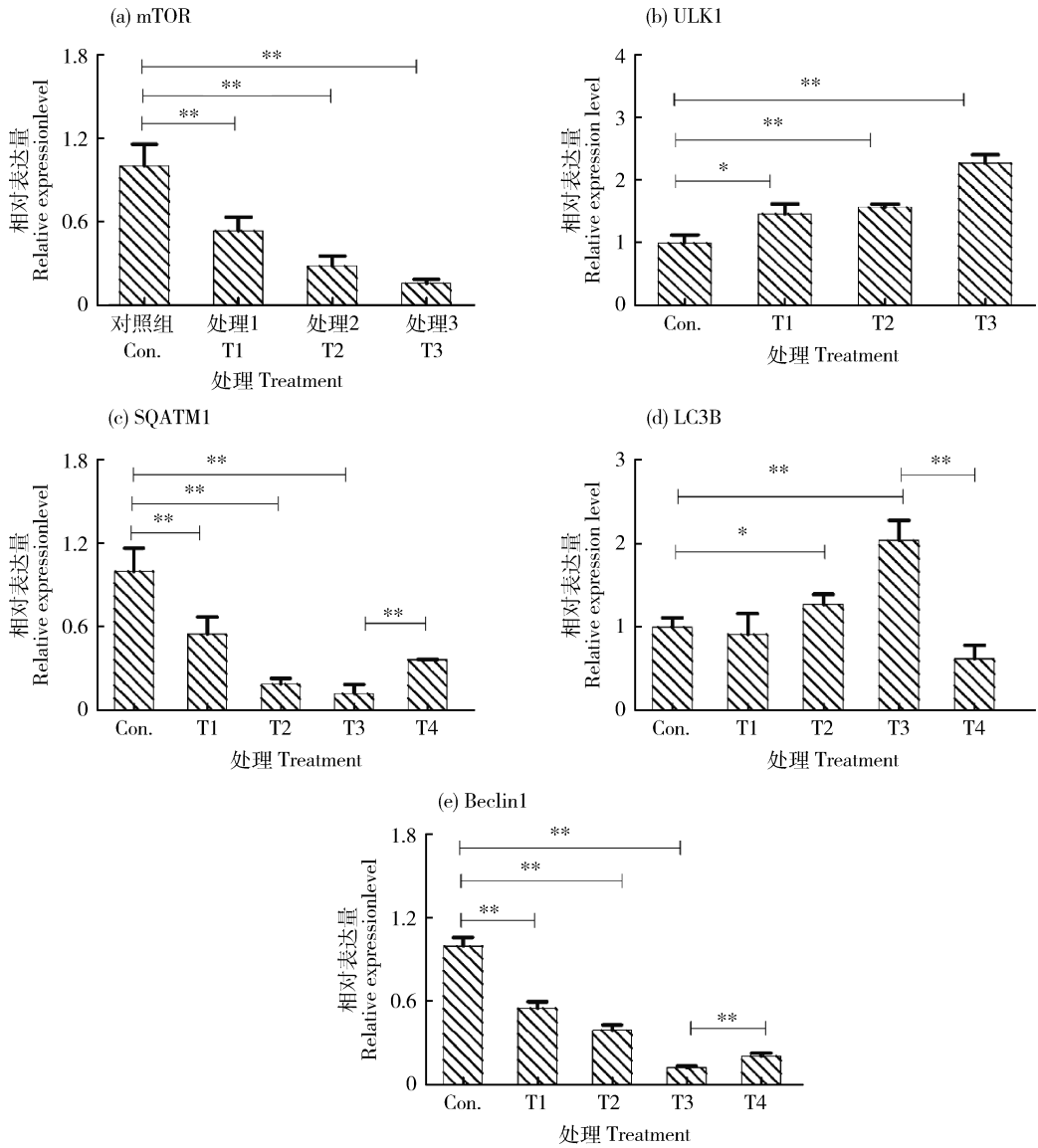


图 2 PA 诱导淋巴细胞自噬基因 mRNA 表达

Fig. 2 The mRNA expression of autophagy related gene in lymphocytes treated with PA

件有关^[29]。若能消化和利用脂肪滴,降低脂肪酸浓度,可使肝细胞发生自噬促进细胞内脂质代谢^[30-32]。在本研究中,随着 PA 浓度的升高,自噬基因表达被显著抑制,这可能与细胞种类和棕榈酸浓度不同有关。自噬是一个细胞内降解过程,重新利用大分子和受损的细胞器,以及在代谢功能障碍条件下提供能量^[31]。自噬通过 TRIF 依赖的 TLR4 信号通路来调节,siRNA 抑制 TRIF,完全阻止了 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 GFP-LC3 的自噬表达,表明 LPS 通过 TRIF 依赖性 TLR4 信号通路诱导自噬^[33]。同样,TLR 介导细胞自噬,自噬也会反过来调节炎

症反应应答。有研究表明,TRAF3 通过激活 TLR4 使 TBK1 被激活,TBK1 对 P62 介导的自噬具有调节作用,证明了细胞自噬机制可以负反馈调节 TLR 和炎症信号通路^[34]。当自噬被药物抑制后,LPS 激活的炎症小体被显著抑制,炎症细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的释放量显著下降,进一步证明自噬能调控炎症反应应答。本研究中,自噬被抑制后,促炎细胞因子释放和 mRNA 表达显著下降,这表明 PA 可以通过诱导淋巴细胞自噬调节炎症反应应答。这些结果有助于理解和阐明脂肪肝奶牛并发症的分子机制,以及为治疗奶牛脂肪肝提供了新的理论依据。

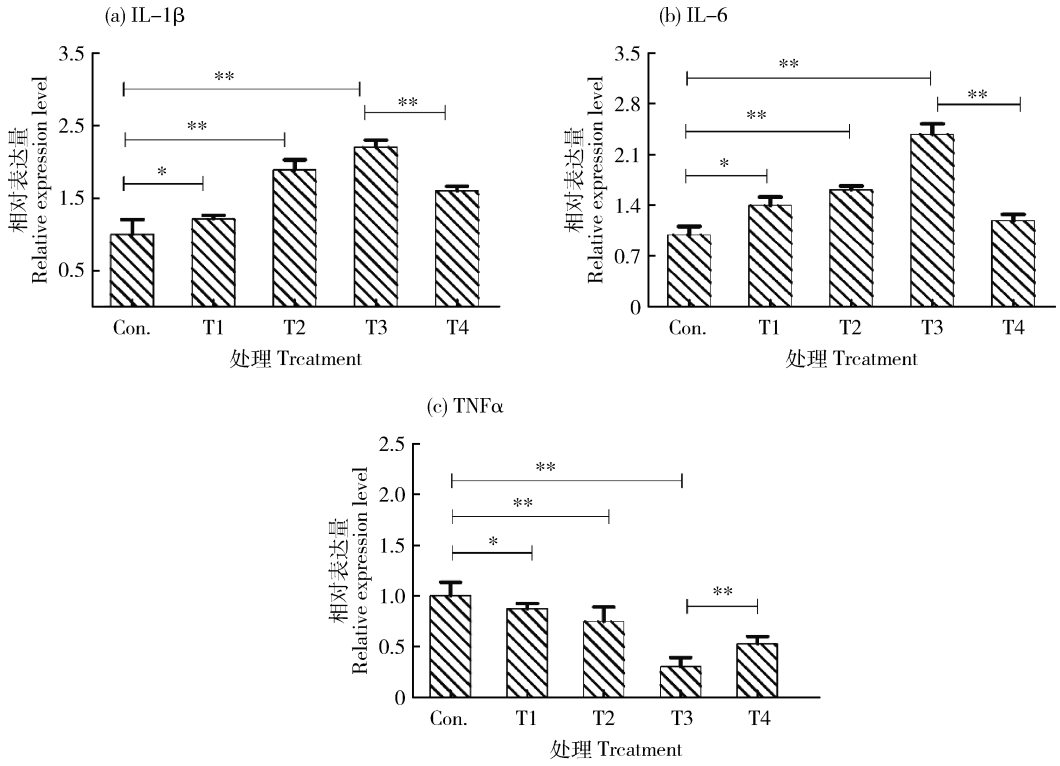


图3 PA诱导淋巴细胞促炎因子 mRNA 的表达

Fig. 3 The mRNA expression of proinflammatory factor in PA-treated lymphocytes. .

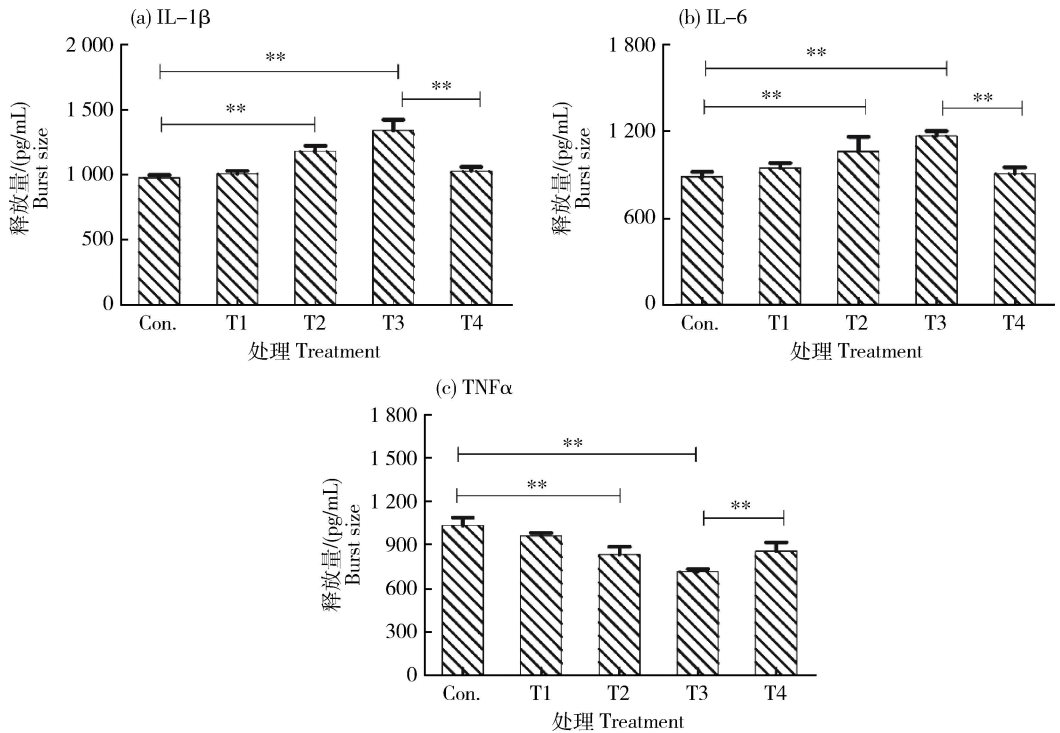


图4 PA诱导淋巴细胞促炎细胞因子分泌的释放水平

Fig. 4 Level of proinflammatory cytokine in lymphocytes induced by PA

参考文献 References

- [1] Dolce V, Cappello A R, Lappano R, Maggiolini M. Glycerophospholipid synthesis as a novel drug target against cancer[J]. *Current Molecular Pharmacology*, 2011, 4(3): 167-175
- [2] 周优萍, 吴蓉, 沈薇, 俞慧宏, 于圣杰. 油酸、软脂酸对 HepG2 细胞脂质沉积及 mTOR/S6K1/SREBP-1c 通路影响的比较[J]. *中华肝脏病杂志*, 2018, 26(6): 451-456
Zhou Y P, Wu R, Shen W, Yu H H, Yu S J. Comparison of effects of oleic acid and palmitic acid on lipid deposition and mTOR/S6K1/SREBP-1c pathway in HepG2 cells[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2018, 26(6): 451-456 (in Chinese)
- [3] Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MaxT H, Brickey W J, Ting JennyP Y. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling[J]. *Nature Immunology*, 2011, 12(5): 408-415
- [4] Shi H, Kokoeva M V, Inouye K, Tzameli I, Yin H L, Flier J S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116(11): 3015-3025
- [5] Nguyen M T A, Favelukis S, Nguyen A K, Reichart D, Scott P A, Jenn A, Liu-Bryan R, Glass C K, Neels J G, Olefsky J M. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(48): 35279-35292
- [6] 陈燕锋, 曾群力. 自噬与代谢及代谢性疾病[J]. *中国细胞生物学学报*, 2015, 37(2): 249-255
Chen Y F, Zeng Q L. Autophagy, metabolism and metabolic diseases[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2015, 37(2): 249-255 (in Chinese)
- [7] Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response[J]. *Molecular Cell*, 2010, 40(2): 280-293
- [8] Saitoh T, Akira S. Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2010, 189(6): 925-935
- [9] Jones S A, Mills K H G, Harris J. Autophagy and inflammatory diseases [J]. *Immunology and Cell Biology*, 2013, 91(3): 250-258
- [10] Deretic V, Levine B. Autophagy balances inflammation in innate immunity[J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 243-251
- [11] Liu F, Lee J Y, Wei H J, Tanabe O, Engel J D, Morrison S J, Guan J-L. FIP200 is required for the cell-autonomous maintenance of fetal hematopoietic stem cells[J]. *Blood*, 2010, 116(23): 4806-4814
- [12] Virgin H W, Levine B. Autophagy genes in immunity[J]. *Nature Immunology*, 2009, 10(5): 461-470
- [13] Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation[J]. *Nature Cell Biology*, 2010, 12(9): 823
- [14] Cohen M, Guo E, Pucchio A, de Vrijer B, Shepherd T G, Eastabrook G. Maternal obesity reduces placental autophagy marker expression in uncomplicated pregnancies[J]. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 2020, 46(8): 1282-1291
- [15] Saitoh T, Fujita N, Jang M H, Uematsu S, Yang B G, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production[J]. *Nature*, 2008, 456(7219): 264-268
- [16] Cadwell K, Liu J Y, Brown S L, Miyoshi H, Loh J, Lennerz J K, Kishi C, Kc W, Carrero J A, Hunt S, Stone C D, Brunt E M, Xavier R J, Sleckman B P, Li E, Mizushima N, Stappenbeck T S, Virgin H W. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells[J]. *Nature*, 2008, 456(7219): 259-263
- [17] Santeford A, Wiley L A, Park S, Bamba S, Nakamura R, Gdoura A, Ferguson T A, Rao P K, Guan J L, Saitoh T, Akira S, Xavier R, Virgin H W, Apte R S. Impaired autophagy in macrophages promotes inflammatory eye disease [J]. *Autophagy*, 2016, 12(10): 1876-1885
- [18] Las G, Serada S B, Wikstrom J D, Twig G, Shirihaï O S. Fatty acids suppress autophagic turnover in β -cells[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(49): 42534-42544
- [19] Jeppesen J, Maarbjerg S J, Jordy A B, Fritzen A M, Pehmoller C, Sylow L, Serup A K, Jessen N, Thorsen K, Prats C, Qvortrup K, Dyck J R B, Hunter R W, Sakamoto K, Thomson D M, Schjerling P, Wojtaszewski J F P, Richter E A, Kiens B. LKB β regulates lipid oxidation during exercise independently of AMPK[J]. *Diabetes*, 2013, 62(5): 1490-1499
- [20] Yu Y H, Cai Z Z, Zheng J S, Chen J Z, Zhang X, Huang X F, Li D. Serum levels of polyunsaturated fatty acids are low in Chinese men with metabolic syndrome, whereas serum levels of saturated fatty acids, zinc, and magnesium are high[J]. *Nutrition Research*, 2012, 32(2): 71-77
- [21] Kabagambe E K, Tsai M Y, Hopkins P N, Ordovas J M, Peacock J M, Borecki I B, Arnett D K. Erythrocyte fatty acid composition and the metabolic syndrome: A national heart, lung, and blood institute GOLDN study [J]. *Clinical Chemistry*, 2008, 54(1): 154-162
- [22] Cook S L, Konrad S D, Goh Y K, French M A, Clandinin M T. Palmitic acid effect on lipoprotein profiles and endogenous cholesterol synthesis or clearance in humans[J]. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 1997, 6(1): 6-11
- [23] Morselli E, Fuente-Martín E, Finan B, Kim M, Frank A,

- García-Caceres C, Navas C R, Gordillo R, Neinast M, Kalainayakan S P, Li D L, Gao Y Q, Yi C X, Hahner L, Palmer B F, Tschöp M H, Clegg D J. Hypothalamic PGC-1 α protects against high-fat diet exposure by regulating ER α [J]. *Cell Reports*, 2014, 9(2): 633-645
- [24] Gupta S, Knight A G, Gupta S, Keller J N, Bruce-Keller A J. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2012, 120(6): 1060-1071
- [25] González-Rodríguez A, Mayoral R, Agra N, Valdecantos M P, Pardo V, Miquilena-Colina M E, Vargas-Castrillón J, Iacono O L, Corazzari M, Fimia G M, Piacentini M, Muntané J, Boscá L, García-Monzón C, Martín-Sanz P, Valverde Á M. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic Reticulum stress during the development of NAFLD[J]. *Cell Death & Disease*, 2014, 5: e1179
- [26] Liu K, Czaja M J. Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2013, 20(1): 3-11
- [27] Dedukhova V I, Mokhova E N, Skulachev V P, Starkov A A, Arrigoni-Martelli E, Bobyleva V A. Uncoupling effect of fatty acids on heart muscle mitochondria and submitochondrial particles[J]. *FEBS Letters*, 1991, 295(1-3): 51-54
- [28] 刘芳, 刘凯, 刘道洁, 乔录新, 谢立, 陈德喜. 棕榈酸对肝癌 HepG2 细胞自噬和凋亡的影响[J]. *山东医药*, 2014, 54(12): 112-113
- Liu F, Liu K, Liu D J, Qiao L X, Xie L, Chen D X. Effect of palmitic acid on autophagy and apoptosis of hepatocellular carcinoma cell line HepG2[J]. *Shandong Medical Journal*, 2014, 54(12): 112-113 (in Chinese)
- [29] Ravanan P, Srikumar I F, Talwar P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses[J]. *Life Sciences*, 2017, 188: 53-67
- [30] Rabinowitz J D, White E. Autophagy and metabolism[J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1344-1348
- [31] Lee J Y, Sohn K H, Rhee S H, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(20): 16683-16689
- [32] Lee J Y, Hwang D H. The modulation of inflammatory gene expression by lipids: Mediation through Toll-like receptors [J]. *Molecules and Cells*, 2006, 21(2): 174-185
- [33] Boya P, González-Polo R A, Casares N, Perfettini J L, Dessen P, Larochette N, Métivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(3): 1025-1040
- [34] Xu Y, Jagannath C, Liu X D, Sharafkhaneh A, Kolodziejska K E, Eissa N T. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity[J]. *Immunity*, 2007, 27(1): 135-144

责任编辑: 秦梅