

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2023.03.010

肝细胞新生脂肪生成过程的全转录组表达谱分析*

张丹彤^{1,2}, 逯素梅¹, 高毅男^{1,2}, 叶棣文^{1,3}, 马万山^{1△}

1. 山东第一医科大学第一附属医院/山东省千佛山医院检验科, 山东济南 250014; 2. 山东第一医科大学/山东省医学科学院, 山东济南 250117; 3. 潍坊医学院医学检验学院, 山东潍坊 261053

摘要:目的 探讨体外非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)模型脂肪变性过程全转录组基因表达谱的变化。方法 以人肝细胞株 LO2(HL-7702)为实验材料,油酸(50 $\mu\text{g/mL}$)作用 48 h 诱导建立肝细胞脂肪变性模型。围绕 lncRNA、circRNA、mRNA 进行真核生物全转录组测序分析。结果 测序结果显示,脂肪变过程中大量的基因转录组水平发生显著变化,上调的基因包括 1 884 个 mRNA、351 个 lncRNA、564 个 circRNA;下调的基因包括 1 975 个 mRNA、297 个 lncRNA、540 个 circRNA。针对具有表达差异的 mRNA 进行 GO 及 Pathway 富集分析,发现脂肪酸代谢、脂肪酸降解及炎症等多个信号通路被富集。结论 lncRNA、circRNA、mRNA 作为人类基因转录组的重要组成部分在 NAFLD 的发生与发展中发挥重要作用,该研究为肝脏新生脂肪生成过程的基因调控机制提供理论指导。

关键词:非酒精性脂肪性肝病; 新生脂肪生成; 全转录组表达谱; 基因测序

中图分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)03-0328-06

Whole transcriptome expression profiling analysis of hepatic de novo lipogenesis*

ZHANG Dantong^{1,2}, LU Sumei¹, GAO Yinan^{1,2}, YE Diwen^{1,3}, Ma Wanshan^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University/Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Jinan, Shandong 250014, China;

2. Shandong First Medical University/Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong 250117, China; 3. School of Medical Laboratory, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China

Abstract: **Objective** To investigate the changes in the whole transcriptome gene expression profile during steatosis in an in vitro model of non-alcoholic fatty liver disease(NAFLD). **Methods** A human hepatocyte cell line LO2 (HL-7702) was used as the experimental material, and oleic acid (50 $\mu\text{g/mL}$) was induced for 48 hours to establish a hepatocyte steatosis model. Eukaryotic whole transcriptome sequencing analysis was performed around lncRNA, circRNA and mRNA. **Results** The sequencing results showed that a large number of genes underwent significant changes at the transcriptome level during steatosis, and the up-regulated genes included 1 884 mRNAs, 351 lncRNAs, and 564 circRNAs; the down-regulated genes included 1 975 mRNAs, 297 lncRNAs, and 540 circRNAs. GO and Pathway enrichment analysis was performed for the differential mRNAs, and several signaling pathways were found to be enriched for fatty acid metabolism, fatty acid degradation and inflammation. **Conclusion** lncRNA, circRNA, and mRNA, as important components of the human gene transcriptome, play important roles in the occurrence and development of NAFLD, and the results of this project provide theoretical guidance for the gene regulation mechanism of the de novo adipogenesis process in the liver.

Key words: nonalcoholic fatty liver disease; de novo lipogenesis; whole transcriptome expression profile; gene sequencing

肝脏作为人体最大的实体器官,在人体新陈代谢和解毒方面起着核心作用。非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是我国最常见的慢性肝病,据调查 10%~

30%的 NAFLD 患者会发展成非酒精性脂肪性肝炎(NASH),当 NAFLD 进展为 NASH 时可快速进展为肝硬化,导致肝衰竭,增大肝细胞癌(HCC)的发病

* 基金项目:山东省自然科学基金面上项目(ZR2021MH187);山东省千佛山医院国家自然科学基金培育基金项目(QYPY2020NSFC1004; QYPY2021NSFC0804)。

作者简介:张丹彤,女,硕士研究生,主要从事代谢性疾病的发病机制研究。△ 通信作者, E-mail: mwsqianyi@163.com。

风险^[1-2]。

NAFLD 由包括肝脏脂肪堆积、线粒体功能障碍在内的多种因素引起,发病机制复杂,会对患者生命健康造成威胁,增加社会医疗负担。因此探索 NAFLD 发病机制尤为重要。人类基因组测序结果表明,人类基因组中 93% 的基因是转录的,其中包括编码 RNA(mRNA)、长链非编码 RNA(lncRNA)及环状 RNA(circRNA)等在内的大部分转录物为非编码 RNA(ncRNAs)。mRNA 作为蛋白质合成的直接模板虽然只占细胞总 RNA 的 2%~5%,但因其转录后修饰繁多而在疾病发病的研究中意义重大^[3]。lncRNA 表达水平的异常已被证实与人类肝脏疾病的发生、发展密切相关^[4-5]。circRNA 分子与线性 RNA 相比表达更加稳定,在哺乳动物中大量表达且稳定存在,且已有如 circRNA_0001805、hsA_CIRC_0048179 在内的多种 circRNA 被证明可能在脂肪变性的发病机制中发挥关键作用^[6-7]。但目前有关 NAFLD 肝组织 circRNAs 表达谱的报道较少。

本研究采用人 NAFLD 细胞脂肪变性模型,利用真核生物全转录组测序技术,检测 mRNA、lncRNA、circRNA 差异基因表达谱,为肝脏脂肪形成过程的基因调控机制提供理论指导。

1 资料与方法

1.1 材料 人肝细胞株 LO2(HL-7702)购于武汉普诺赛生命科技有限公司,以在体外培养的肝 LO2 细胞为研究对象,将其分为两组,实验组为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 油酸诱导脂肪变性 48 h,对照组加入等量二甲基亚砷(DMSO),与油酸同步作用。

1.2 仪器与试剂 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);总 RNA 提取试剂(中国上海奕杉生物科技有限公司);Gibco 胎牛血清(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);RPMI-1640 培养基(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);磷酸缓冲盐溶液(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);0.25%胰蛋白酶-EDTA(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);100 $\times$ 青霉素-链霉素双抗悬液(中国北京索莱宝科技有限公司);油酸(美国 Sigma 公司);培养板(美国 Corning 公司);油红 O 粉末(美国 Sigma 公司);异丙醇(上海国药试剂有限公司);去离子水(北京天根生化科技有限公司);二氧化碳培养箱(中国上海力康生物医疗科技有限公司);生物安全柜(中国济南鑫贝西生物技术有限公司);微量移液器(德国 Eppendorf);低温高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Nanodrop 2000 分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与油酸诱导脂肪变性 将人肝细胞株 LO2(HL-7702)培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱,细胞密度达到 80% 左右时,加入 0.25% 胰蛋白

酶-EDTA 进行消化离心,按照 E6 细胞数量接种于底面积 75 cm^2 的培养皿中培养细胞,当细胞密度约至 60% 时,加入含有油酸(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 RPMI-1640 培养基,24 h 更新一次培养基,油酸诱导脂肪变性 48 h 终止。对照组加入等量 DMSO。将油酸诱导 48 h 的 LO2 脂肪变性细胞与对照组一起做油红 O 染色,观察脂质聚集情况;收集细胞于 Trizol 试剂中,用于 RNA 提取和测序文库构建。

1.3.2 RNA 提取与质量检测及真核生物全转录组测序 将收集于 Trizol 试剂中的细胞使用总 RNA 提取试剂提取总 RNA,将总 RNA 溶于无酶无菌水,取 2 μL 溶液使用 Nanodrop 2000 分光光度计检测 RNA 浓度与质量。将质量合格样品送至上海康成生物科技有限公司进行真核生物全转录组测序。经过 Nanodrop 2000 浓度测定,每个样品选取 1~2 μg RNA 进行 RNA 测序文库的构建。构建好的文库通过 Agilent 2100 Bioanalyzer 鉴定文库质量,并用 qPCR 方法进行文库定量。混合好的不同样品文库使用 Illumina X-ten/Novaseq 测序仪进行测定。

1.4 统计学处理 利用 Solexa 1.8 软件进行图像处理和碱基识别。采用 FastQC 软件对去接头后的 reads 进行测序质量评估(采用 cutadapt 去 3' 和 5' 接头)。通过 Hisat2 软件比对到参考基因组。使用 StringTie 软件参考官方数据库注释信息进行转录丰度估计。使用 R 软件 Ballgown 进行基因水平和转录物水平的 FPKM 计算,并分别计算基因水平和转录物水平表达差异情况,筛选出样品间或组间差异表达基因。circRNA 是通过 STAR 软件比对到参考基因组,使用 CIRCexplorer2 进行 Backsplice junction reads 检测,进行 Reads count 统计,并使用 R 软件 edgeR 进行差异表达计算。基于基因表达水平进行 PCA 分析、相关性分析,对差异表达基因进行聚类、基因本体(GO)功能显著性富集分析、Pathway 显著性富集分析等。

2 结果

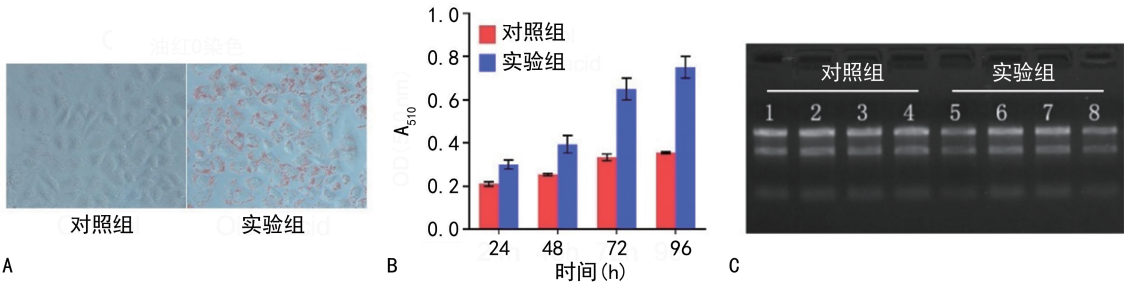
2.1 肝 LO2 细胞诱导脂肪变性的细胞模型 油酸诱导 48 h 的 LO2 实验组与对照组做油红 O 染色,可见实验组与对照组相比细胞内有明显的橘红色脂滴聚集,见图 1A、1B,表明 LO2 细胞脂肪变性模型已建立。提取实验组与对照组总 RNA 进行 RNA 电泳,检测 RNA 完整性良好,见图 1C。Nanodrop 2 000 进行 RNA 定量及质量检测,见表 1。

2.2 mRNA、lncRNA、circRNA 在脂肪生成过程中的变化情况 将实验组与对照组细胞进行真核生物全转录组测序。实验组与对照组相比有 564 个 circRNA 发生了上调,有 540 个 circRNA 下调,1 005 个 circRNA 没有变化。实验组与对照组相比有 1 884 个 mRNA 发生了上调,1 975 个 mRNA 下调,29 045 个 mRNA 没有变化。实验组与对照组相比有 351 个 lnc-

cRNA 发生了上调,有 297 个 lncRNA 下调,10 826 个 lncRNA 没有发生变化。

2.3 聚类分析前 10 位上调及下调的 mRNA、lncRNA、circRNA 针对差异表达的前 10 位上调及下调的 mRNA、lncRNA、circRNA 进行聚类分析,发现在实验标本与对照标本的对比中,ANGPTL4、PDK4、CHAC1、TMEM199、UNC5B、DEFB1、TRIB3、AMI-GO2、ORMDL3、GDF15 的 mRNA 发生上调,ALPI、AC007240.1、ALPPL2、ALPP、MEOX1、RHAG、AC010422.6、HPD、NPY4R2、RARRES3 的 mRNA 发生

下调。H19、MEAF6、SLAIN2、GUK1、AGA、SEC14L1、CASP8AP2、ZBTB37、MAPKAP1、RALGPS2 的 lncRNA 发生上调,LINC00511、AC093323.1、SNRPA1、CDSN、PNISR、NIT1、MOB3B、ENST00000628234、CRT3、GRN 的 lncRNA 发生下调。TM7SF3、RARS、PGD、PTPLA、FOXP1、PITPNC1、RHOB3、NUP214、RNF111、MAT2A 的 circRNA 发生上调,PHC3、RABGAP1、ZNF420、SOX13、PUM1、C4orf47、FCHO2、TCONS_l2_00007569、CCZ1B、EIF4G3 的 circRNA 发生下调。差异表达上调及下调前 10 位基因具体信息见表 2~4。



注:A 为油红 O 染色图;B 为红油染色半定量图;C 为 RNA 电泳图。

图 1 油酸诱导 LO2 细胞脂肪变性以及 RNA 质量鉴定

表 1 RNA 定量及质量检测表

样本号	A _{260/280}	A _{260/230}	水平(ng/ μ L)	体积(μ L)	数量(ng)	质量检测
对照①	1.99	2.34	1 207.85	20	24 157.00	合格
对照②	2.00	2.34	1 396.38	15	20 945.70	合格
对照③	1.99	2.32	1 055.21	20	21 104.20	合格
对照④	2.01	2.34	969.87	20	19 397.40	合格
实验①	1.97	2.34	633.74	30	19 012.20	合格
实验②	1.98	2.36	1 148.89	15	17 233.35	合格
实验③	1.96	2.34	1 072.76	15	16 091.40	合格
实验④	1.91	2.28	490.54	30	14 716.20	合格

表 2 前 10 位差异表达的 mRNA 信息

基因名称	Track_ID 号	差异倍数	P	基因名称	Track_id 号	差异倍数	P
上调基因				下调基因			
ANGPTL4	ENSG00000167772.11_3	15.45	0.000 2	ALPI	ENSG00000163295.4_2	0.243 0	0.036 3
PDK4	ENSG00000004799.7_2	4.80	<0.000 1	AC007240.1	ENSG00000284681.1_1	0.306 5	0.029 1
CHAC1	ENSG00000128965.11_2	2.89	0.006 8	ALPPL2	ENSG00000163286.8_3	0.309 4	0.010 9
TMEM199	ENSG00000244045.12_3	2.64	<0.000 1	ALPP	ENSG00000163283.6_2	0.316 9	0.013 2
UNC5B	ENSG00000107731.12_2	2.40	0.013 1	MEOX1	ENSG00000005102.12_2	0.341 8	0.009 6
DEFB1	ENSG00000164825.3_2	2.34	0.007 9	RHAG	ENSG00000112077.15_2	0.343 3	0.009 1
TRIB3	ENSG00000101255.10_3	2.32	0.003 8	AC010422.6	ENSG00000269693.1_4	0.360 6	0.001 7
AMIGO ₂	ENSG00000139211.6_2	2.27	0.008 0	HPD	ENSG00000158104.11_2	0.418 5	0.003 9
ORMDL3	ENSG00000172057.9_3	2.21	0.023 7	NPY4R2	ENSG00000264717.5_4_	0.430 3	0.003 6
GDF15	ENSG00000130513.6_3	2.17	0.028 0	RARRES3	ENSG00000133321.10_2	0.439 6	0.008 4

2.4 对差异表达的 mRNA 进行 GO 功能富集分析 生物学过程 上调差异基因主要富集到的生物学过

程包括内质网应激反应、对肽类激素的反应、细胞对脂质的反应、对糖皮质激素刺激的反应、促肾上腺激素释放激素刺激的反应、对有机氮化合物的反应、羧酸代谢过程、葡萄糖皮质激素的反应、对肽的反应、对脂质的反应,见图 2A。下调差异基因的生物学过程主要是对病毒的反应、免疫系统、对病毒的防御反应、对有机物质的反应、固有免疫应答、组织发育、免疫应答、对其他生物体的反应、对外界生物刺激的反应、对刺激的反应等功能有关,见图 2B。

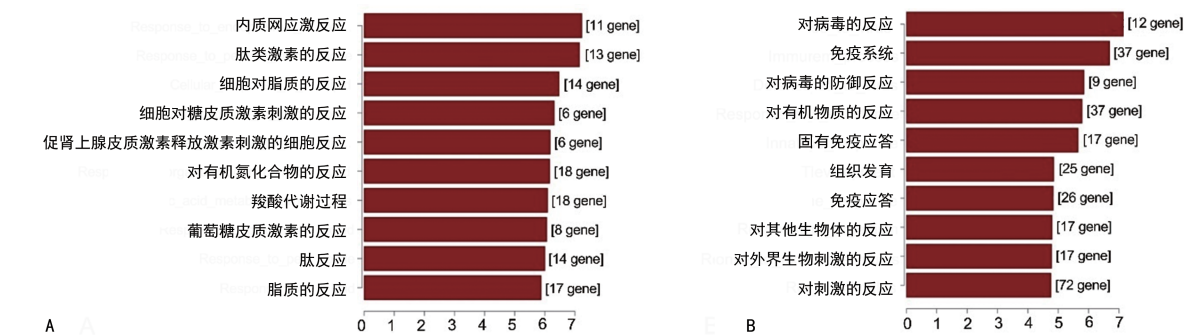
2.5 对差异表达的 mRNA 进行 Pathway 富集分

析 上调的 mRNA 差异基因的 Pathway 分析结果显示,主要富集到的生物学过程包括脂肪酸降解、脂肪酸代谢、白细胞介素(IL)-17、沙门菌感染、PPAR、转录失调、代谢组学、军团杆菌病、TNF、叶酸-碳。下调的差异 mRNA 的 Pathway 结果显示,其中下调差异基因主要与维生素 B₁ 代谢、叶酸合成、蛋白质消化与吸收、补体和凝血、苯丙氨酸代谢、近端小管碳酸氢盐回收、组氨酸代谢、幽门螺杆菌感染中的上皮细胞信号转导、RIG- I 样受体信号通路、黏着斑等功能有关。

表 3 前 10 位差异表达的 lncRNA 信息

基因名称	lncRNA_ID 号	基因座	差异倍数	P
上调基因				
H19	ENST00000414790	chr11:2016393-2019105	16.29	0.000 1
MEAF6	ENST00000487788	chr1:37958999-37980333	7.79	0.001 6
SLAIN2	ENST00000506375	chr4:48371866-48381741	6.54	9.32E-07
GUK1	ENST00000477206	chr1:228335167-228336634	4.93	<0.000 1
AGA	ENST00000506853	chr4:178355538-178363563	4.33	0.000 4
SEC14L1	ENST00000434411	chr17:75084755-75091072	4.13	4.14 E-06
CASP8AP2	ENST00000237177	chr6:90539658-90584155	3.41	0.03 3
ZBTB37	ENST00000450589	chr1:173833039-173837125	3.34	0.005 7
MAPKAP1	ENST00000483937	chr9:128200748-128234184	3.07	0.019 3
RALGPS2	ENST00000477383	chr1:178846675-178863126	3.01	<0.000 1
下调基因				
LINC00511	ENST00000581801	chr17:70319299-70588494	0.66	0.029 5
AC093323.1	ENST00000624473	chr4:6693782-6694189	0.66	0.005 8
SNRPA1	ENST00000540017	chr15:101821914-101835460	0.66	0.023 9
CDSN	ENST00000548049	chr6:31082550-31101471	0.66	0.019 8
PNISR	ENST00000476159	chr6:99849338-99854003	0.66	0.008 4
NIT1	ENST00000461376	chr1:161088698-161089733	0.66	0.035 5
MOB3B	ENST00000603061	chr9:27359022-27421712	0.66	0.006 9
—	ENST00000628234	chr1:44511662-44526886	0.66	0.001 1
CRTC3	ENST00000561255	chr15:91141578-91169018	0.66	0.019 5
GRN	ENST00000589923	chr17:42428140-42429163	0.65	0.000 1

注:—表示未找到相关基因名称。



注:A 为上调差异基因的 BP;B 为下调差异基因的 BP。

图 2 肝 LO2 细胞诱导脂肪变性后差异表达 mRNA 的 GO 分析

表 4 前 10 位差异表达的 circRNA 信息

基因名称	circRNA_ID 号	基因座	长度 (nt)
上调基因			
TM7SF3	hsa_circ_0007683	chr3:169889160-169896726;-	272
RARS	hsa_circ_0128547	chr5:167920898-167929110;+	688
PGD	hsa_circ_0110291	chr1:10463127-10464336;+	185
PTPLA	hsa_circ_0006751	chr10:17645558-17646046;-	226
FOXP1	hsa_circ_0066527	chr3:71050122-71102924;-	780
PITPNC1	hsa_circ_0107533	chr17:65528917-65628354;+	408
RHOBTB3	hsa_circ_0073433	chr5:95072592-95072779;+	187
NUP214	hsa_circ_0089172	chr9:134049441-134053797;+	526
RNF111	hsa_circ_0035473	chr15:59323002-59359282;+	1 705
MAT2A	/	chr2:85768205-85770157;+	994
下调基因			
PHC3	hsa_circ_0005362	chr3:169889160-169896726;-	400
RABGAP1	hsa_circ_0002672	chr9:125751575-125752492;+	333
ZNF420	hsa_circ_0109533	chr19:37579940-37582023;+	216
SOX13	hsa_circ_0009157	chr1:204082042-204092932;+	1 376
PUM1	hsa_circ_0011241	chr1:31437520-31468067;-	1 603
C4orf47	hsa_circ_0125941	chr4:186350487-186366284;+	663
FCHO ₂	hsa_circ_0129569	chr5:72302271-72313135;+	301
TCONS_l2_00007569	hsa_circ_0030389	chr13:64576517-64608670;-	334
CCZ1B	/	chr7:6851582-6863797;-	642
EIF4G3	hsa_circ_0010458	chr1:21167348-21191755;-	1439

注:/表示未查到 ID 号。

3 讨 论

目前 NAFLD 发病率逐年升高,在男性中发病率为 30%~40%,在女性中为 15%~20%^[8-10],作为全球慢性肝脏疾病的主要病因,暂无药物可以根治,临床对于 NAFLD 患者的治疗意见大多是减肥,但仅有少数患者可以通过减肥达到控制 NAFLD 的目的^[11]。在亚洲,中国已成为 NAFLD 发病率最高的国家,其会给国家医疗系统带来巨大的负担^[12]。因此探索 NAFLD 复杂的发病机制对于临床治疗 NAFLD 十分重要。

本研究成功建立了体外肝细胞脂肪变的模型,对肝细胞脂肪形成过程中全转录组表达谱的基本分析,分别给出了 circRNA、lncRNA、mRNA 在脂肪变模型中上调及下调基因的总体变化,以及 circRNA、lncRNA、mRNA 在脂肪变模型中显著差异的基因信息。再充分运用生物信息工具挖掘 NAFLD 新生脂肪生成过程潜在的关键基因。通过 GO 分析得到上调的 mRNA 主要富集在脂肪酸代谢、脂肪酸降解及炎症等信号通路;下调的 mRNA 主要富集在叶酸合成、蛋白质消化与吸收等信号通路。Pathway 分析得到上调的 mRNA 主要富集在 PPAR、组氨酸代谢、细胞对脂质及葡萄糖的反应等通路。Pathway 分析得

到下调的 mRNA 主要富集在免疫系统、免疫反应等通路。本研究结果所示关键差异基因有些在既往文献中已显示与 NAFLD 的发病及疾病进展有不同程度的相关性。其中与本研究一致的是 Pathway 分析 mRNA 得到的 PPAR 通路及上调前 10 位 mRNA 的血管生成素样蛋白 4 (ANGPTL4) 分子被验证在 NAFLD 中 PPAR- α /ANGPTL4 信号通路在抑制 NAFLD 中发挥重要作用^[13]。NAFLD 发病的“二击”理论广为人知。第一击,是由胰岛素抵抗引起的肝细胞脂质的蓄积^[14-16]。第二击,是氧化应激引起的肝脏的损伤及炎症,在活性氧的诱导下加剧肝细胞的损伤^[17-18]。丙酮酸脱氢酶激酶同工酶 4 (PDK4) 在调节葡萄糖摄取中起重要作用,与胰岛素抵抗密切相关,因此会在 NAFLD 的发病中发挥重要作用^[19];另外有研究报道了 TMEM199 缺乏症小鼠模型在饮食中出现了明显的肝脏脂肪变性^[20]。以上实验结果都提示对于本研究预测到的一些有明显变化的其他分子及信号通路对进一步进行 NAFLD 发病机制的研究有重要的意义。另外本研究揭示了重要的转录组成分 mRNA 发生高表达被显著富集到的 IL-17 通路中的 HSP90、TRAF6、USP25、转录因子等下游靶分子(通路)起到促进肝细胞脂肪变性及 NAFLD 向 NASH

进展的作用,为下一步动物实验乃至靶向药物研发提供了较为现实的理论依据。在下调的 mRNA 被富集到的蛋白质消化与吸收通路中,例如 ASCT2、PAT1 等分子,在后续研究中可能会成为研究 NAFLD 发病机制的重要分子,可从蛋白质组学层面进一步对 NAFLD 的研究提供新的思考。

综上所述,本研究展示的在体外肝细胞新生脂肪形成模型中有显著变化的共 60 个 circRNA、lncRNA、mRNA。mRNA 的 Pathway 及 GO 分析结果进一步丰富了基因的代谢网络,在机制研究中尤为重要。本课题将为肝脏新生脂肪形成过程的基因调控机制提供理论指导,提示可以通过实验进一步探索、挖掘 NAFLD 发病的具体机制。

参考文献

- [1] MUNDI M S, VELAPATI S, PATEL J, et al. Evolution of NAFLD and its management[J]. *Nutr Clin Pract*, 2020, 35(1): 72-84.
- [2] FARZANEGI P, DANA A, EBRAHIMPOOR Z, et al. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): roles of oxidative stress and inflammation[J]. *Eur J Sport Sci*, 2019, 19(7): 994-1003.
- [3] KRAMPS T, PROBST J. Messenger RNA-based vaccines: progress, challenges, applications[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2013, 4(6): 737-49.
- [4] LAO Y, LI Q, LI N, et al. Long noncoding RNA ENST00000455974 plays an oncogenic role through up-regulating JAG2 in human DNA mismatch repair-proficient colon cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(2): 339-347.
- [5] ZHAO X Y, XIONG X, LIU T, et al. Long noncoding RNA licensing of obesity-linked hepatic lipogenesis and NAFLD pathogenesis[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2986.
- [6] LI J, QI J, TANG Y, et al. A nanodrug system overexpressed circRNA_0001805 alleviates nonalcoholic fatty liver disease via miR-106a-5p/miR-320a and ABCA1/CPT1 axis[J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 363.
- [7] YANG W, ZHAO J, ZHAO Y, et al. Hsa_circ_0048179 attenuates free fatty acid-induced steatosis via hsa_circ_0048179/miR-188-3p/GPX4 signaling[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(23): 23996-24008.
- [8] BYRNE C D, TARGHER G. NAFLD: a multisystem disease[J]. *J Hepatol*, 2015, 62(1 Suppl): S47-S64.
- [9] BERARDO C, DI PASQUA L G, CAGNA M, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: current issues and future perspectives in preclinical and clinical research[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24): 9646.
- [10] POWELL E E, WONG W S, RINELLA M. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Lancet*, 2021, 397(10290): 2212-2224.
- [11] SUMIDA Y, YONEDA M. Current and future pharmacological therapies for NAFLD/NASH[J]. *J Gastroenterol*, 2018, 53(3): 362-376.
- [12] ZHOU J, ZHOU F, WANG W, et al. Epidemiological features of NAFLD from 1999 to 2018 in China[J]. *Hepatology*, 2020, 71(5): 1851-1864.
- [13] HE Y, YANG W, GAN L, et al. Silencing HIF-1alpha aggravates non-alcoholic fatty liver disease in vitro through inhibiting PPAR-alpha/ANGPTL4 signaling pathway[J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2021, 44(5): 355-365.
- [14] TANASE D M, GOSAV E M, COSTEA C F, et al. The intricate relationship between type 2 diabetes mellitus (t2dm), insulin resistance (ir), and nonalcoholic fatty liver disease (nafld) [J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 3920196.
- [15] FUJII H, KAWADA N. The role of insulin resistance and diabetes in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 3863.
- [16] MUZUROVIĆ E, MIKHAILIDIS D P, MANTZOROS C. Non-alcoholic fatty liver disease, insulin resistance, metabolic syndrome and their association with vascular risk[J]. *Metabolism*, 2021, 119: 154770.
- [17] GASTALDELLI A. Insulin resistance and reduced metabolic flexibility: cause or consequence of NAFLD? [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(22): 2701-2704.
- [18] LI X, WANG T X, HUANG X, et al. Targeting ferroptosis alleviates methionine-choline deficient (MCD)-diet induced NASH by suppressing liver lipotoxicity[J]. *Liver Int*, 2020, 40(6): 1378-1394.
- [19] LI T, XU J, QIN X, et al. Glucose oxidation positively regulates glucose uptake and improves cardiac function recovery after myocardial reperfusion[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2017, 313(5): E577-E585.
- [20] LARSEN L E, BOOGERT V D, RIOS-OCAMPO W A, et al. Defective lipid droplet-lysosome interaction causes fatty liver disease as evidenced by human mutations in tmem199 and ccdc115[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2022, 13(2): 583-597.

(收稿日期: 2022-07-20 修回日期: 2022-10-11)