

# 烟酰胺单核苷酸对 Huh7 细胞胆固醇代谢调节作用的研究

刘文凤, 雷小灿, 向琼, 廖韦, 夏梦蝶, 彭娟

(南华大学衡阳医学院心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室 湖南省动脉硬化性疾病国际科技创新合作基地, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 烟酰胺单核苷酸; Huh7 细胞; 胆固醇代谢; 肝细胞核因子 1 $\alpha$ ; 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9; 低密度脂蛋白受体

[摘要] **目的** 探讨烟酰胺单核苷酸(NMN)对 Huh7 细胞胆固醇的调节作用及分子机制。**方法** 用不同浓度(0、12.5、25、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ )NMN 处理 Huh7 细胞 24 h, 采用细胞增殖及毒性检测试剂盒(CCK-8)检测 NMN 对细胞活力的影响; 油红 O 染色观察细胞内脂质蓄积情况; 免疫荧光显微镜观察细胞对 DiI-LDL 的摄取能力; 实时定量 PCR(qRT-PCR)和 Western blot 检测细胞内肝细胞核因子 1 $\alpha$ (HNF1 $\alpha$ )、前蛋白转化酶枯草溶菌素 9(PCSK9)、低密度脂蛋白受体(LDLR)的 mRNA 和蛋白表达情况。**结果** CCK-8 实验结果显示, 不同浓度 NMN 处理 Huh7 细胞 24 h 对细胞活力没有显著影响; 油红 O 染色显示, LDL 加入后细胞内红色脂滴数量随着 NMN 浓度增加而增多; 免疫荧光显微镜观察结果显示, 细胞核周红色荧光随着 NMN 浓度增加而增强; Western blot 和 qRT-PCR 结果显示, 100、200  $\mu\text{mol/L}$  NMN 使 Huh7 细胞 PCSK9、HNF1 $\alpha$  mRNA 和蛋白的表达显著降低, LDLR mRNA 和蛋白的表达明显升高( $P < 0.01$ )。**结论** NMN 可能通过介导 HNF1 $\alpha$ /PCSK9/LDLR 信号通路参与调节 Huh7 细胞的胆固醇代谢, 增强肝细胞对 LDL 的摄取能力。

[中图分类号] R5; R363

[文献标识码] A

## Effect of nicotinamide mononucleotide on cholesterol metabolism in Huh7 cells

LIU Wenfeng, LEI Xiaocan, XIANG Qiong, LIAO Wei, XIA Mengdie, PENG Juan

(Institute of Cardiovascular Disease & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province & Hunan International Scientific and Technological Cooperation Base of Arteriosclerotic Disease, Hengyang Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] nicotinamide mononucleotide; Huh7 cell; cholesterol metabolism; hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; proprotein convertase subtilisin kexin 9; low density lipoprotein receptor

[ABSTRACT] **Aim** To explore the regulatory effect of nicotinamide mononucleotide (NMN) on cholesterol in Huh7 cells and its molecular mechanism. **Methods** Huh7 cells were treated with different concentrations of NMN (0, 12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 hours, and the cell viability was detected by cell counting kit-8 (CCK-8). The lipid accumulation in cells was observed by oil red O staining. The uptake ability of cells to DiI-LDL was observed by immunofluorescence microscope. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot were used to detect the expressions of mRNA and protein of intracellular hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  (HNF1 $\alpha$ ), proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9), and low density lipoprotein receptor (LDLR). **Results** CCK-8 experiment showed that different concentrations of NMN had no significant effect on cell viability. Oil red O staining showed that the number of orange-red lipid droplets in the cells increased with the increase of NMN concentration after the addition of LDL. Immunofluorescence microscope observation results showed that the red fluorescence around the nucleus increased with the increase of NMN concentration. Western blot and qRT-PCR results showed that 100 and 200  $\mu\text{mol/L}$  NMN significantly reduced the expressions of PCSK9 and HNF1 $\alpha$  mRNA and protein, and significantly increased the expressions of LDLR mRNA and protein in Huh7 cells ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** NMN may be involved in regulating the cholesterol metabolism of Huh7 cells by

[收稿日期] 2021-04-23

[修回日期] 2021-05-22

[基金项目] 湖南省自然科学基金(2017JJ3277); 湖南省卫健委 2020 年重点指导课题(20201905)

[作者简介] 刘文凤, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治基础, E-mail 为 654045281@qq.com。通信作者彭娟, 副教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治基础, E-mail 为 pengjuan98@sina.com。

mediating the HNF1 $\alpha$ /PCSK9/LDLR signaling pathway, and enhance the uptake capacity of LDL by liver cells.

肝脏是人体胆固醇代谢的主要靶器官,血液中低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)被肝细胞表面低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)识别,进入细胞溶酶体后水解为游离胆固醇及脂肪酸<sup>[1]</sup>。LDLR 是高表达于肝细胞膜上的一种糖蛋白,能清除血液中超过 70%的低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C),对维持细胞内胆固醇稳态起重要作用<sup>[2]</sup>。

烟酰胺单核苷酸(nicotinamide mononucleotide, NMN)是哺乳动物中烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)的关键前体物质之一<sup>[3]</sup>。NAD 是存在真核细胞内重要的氧化还原酶,是维持细胞生物学功能所必需的物质<sup>[4]</sup>。目前研究显示, NMN 通过恢复 NAD 的水平进而降低了糖尿病小鼠的脂质水平<sup>[5]</sup>。Stromsdorfer 等<sup>[6]</sup>研究显示小鼠腹腔注射 NMN 会增加肝脏内 NAD 的水平并降低小鼠肥胖程度。日本 Megumi 研发的 NMN 与白藜芦醇的食物组合物可降低血液中总胆固醇、LDL 和甘油三酯含量<sup>[7]</sup>。以上所述可知 NMN 有调节脂代谢的作用,但其具体作用机制尚不清楚。

众所周知,前蛋白转化酶枯草溶菌素 9(proprotein convertase subtilisin kexin 9, PCSK9)与 LDLR 形成复合物使其在蛋白水平降解,阻断其再循环转运 LDLC,导致血液内 LDLC 升高并诱发心血管疾病<sup>[8]</sup>。肝细胞核因子 1 $\alpha$ (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ , HNF1 $\alpha$ )在肝细胞中作为 PCSK9 转录因子,正向调控 PCSK9 的表达进而调节胆固醇代谢<sup>[9-10]</sup>。由此推测 NMN 或是作用于 HNF1 $\alpha$ /PCSK9/LDLR 通路来调控胆固醇代谢。为验证此想法,本实验拟用人肝 Huh7 细胞探讨 NMN 对胆固醇代谢的作用及机制,进而为指导临床应用提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞、试剂及仪器

人 Huh7 细胞购买自广州吉妮欧生物科技有限公司。细胞培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)购买自 Gibco 公司; NMN 购买自 Sigma 公司;胎牛血清购买自杭州四季青生物工程材料有限公司;磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)、胰蛋白酶细胞消化液、细胞增殖及毒性检测试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)购买自 Biosharp 公司;油红 O 染色液、苏木精染色液、DAPI 染色液

购买自北京索莱宝科技有限公司; LDL、DiI-LDL 购买自广州奕源生物科技有限公司;细胞蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、高灵敏蛋白印迹膜发光液试剂盒购买自北京康为世纪公司;总 RNA 提取试剂盒购买自 Omega 公司;反转录扩增试剂盒购买自 Toyobo 公司; LDLR、PCSK9、HNF1 $\alpha$ 、GAPDH 兔源一抗、羊抗兔二抗购自 Proteintech 公司。本实验所需使用的仪器均由南华大学心血管疾病研究所提供。

### 1.2 细胞培养及分组

Huh7 细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,待细胞生长密度融合达 90% 以上时进行传代培养。实验分为 NMN 不同浓度(0、12.5、25、50、100、200  $\mu$ mol/L)组,根据实验要求分组加入药物处理 24 h,之后收集样本。

### 1.3 CCK-8 法检测细胞活力

将传代的 Huh7 细胞悬液按 50% ~ 60% 细胞密度接种于 96 孔板并在培养箱中孵育,待细胞完全贴壁后更换培养液,加不同浓度 NMN 处理 24 h。根据 CCK-8 试剂盒说明,培养基终体积为 100  $\mu$ L,每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂,孵育 2 h。用酶标仪在 450 nm 波长处测吸光度,按照试剂盒说明书公式计算细胞存活率以反映药物对细胞的毒性作用。

### 1.4 油红 O 检测细胞脂质蓄积情况

将传代的 Huh7 细胞悬液按 20% ~ 30% 细胞密度接种于 24 孔板并在培养箱中孵育,待细胞贴壁并生长融合后,把实验分为 6 组,先用 50 mg/L LDL 预处理 2 h,随后分别加入 0、12.5、25、50、100、200  $\mu$ mol/L NMN 培养 24 h。培养结束后,取出 24 孔板,倒掉原留培养液,室温 PBS 洗 3 次,每次 5 min,风干;加入 4% 多聚甲醛溶液每孔 500  $\mu$ L 固定 30 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min;加入预先过滤好的油红 O 工作液每孔 500  $\mu$ L 静置染色 30 min,室温双蒸水洗 3 次,每次 5 min;加入苏木精染液染色 10 s,室温双蒸水洗 3 次,每次 5 min。于光学显微镜下观察并拍片,检测各组细胞脂质蓄积情况。

### 1.5 细胞 DiI-LDL 摄取能力检测

将传代的 Huh7 细胞悬液按 20% ~ 30% 细胞密度接种于 24 孔板并在培养箱中孵育,待细胞贴壁并生长融合后,将实验分为 6 组,先分别加入 0、12.5、25、50、100、200  $\mu$ mol/L NMN 培养 24 h,随后避光加入 20 mg/L DiI-LDL 继续孵育 4 h。取出 24 孔板,避光,吸弃原留培养基,室温 PBS 洗 3 次,每次 5 min,

风干;加入 4% 多聚甲醛溶液每孔 500  $\mu\text{L}$  固定 30 min, 室温双蒸水洗 3 次, 每次 5 min; 加入 DAPI 染液每孔 200  $\mu\text{L}$  染核 5 min, 室温双蒸水洗 3 次, 每次 5 min; 于荧光显微镜下观察并拍片, 检测各组细胞内 DiI-LDL 的摄取情况。

### 1.6 Western blot 检测 LDLR、PCSK9 和 HNF1 $\alpha$ 蛋白的表达

将细胞按不同浓度实验分组处理后, 通过 Western blot 检测 LDLR、PCSK9 和 HNF1 $\alpha$  蛋白的表达。待细胞完全裂解后离心提取蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测样品蛋白浓度。根据试剂盒说明书制备 SDS-PAGE 胶, 根据浓度取等体积等质量蛋白样品按分组顺序依次注入到每个泳道进行电泳(恒压 80 V, 30 min; 120 V, 60 min), 转聚偏二氟乙烯膜(恒流 200 mA, 120 min), 5% 脱脂牛奶封闭液常温封闭 3~4 h。加入一抗 LDLR(1:2 000)、PCSK9(1:1 000)、HNF1 $\alpha$ (1:1 000) 及 GAPDH(1:5 000) 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜或室温孵育 2 h, TBST 洗 3 次,

每次 10 min; 加入羊抗兔二抗(1:8 000) 室温孵育 1.5 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min。采用凝胶成像系统进行检测, 高灵敏蛋白印迹膜发光液显色后, 曝光拍摄取图, 采用 Image J 软件进行各蛋白灰度值测量与分析。

### 1.7 实时定量 PCR 检测 LDLR、PCSK9 和 HNF1 $\alpha$ mRNA 的表达

将细胞按不同浓度实验分组处理后, 通过实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测 LDLR、PCSK9 和 HNF1 $\alpha$  mRNA 的表达。采用 Omega 总 RNA 试剂盒提取总 RNA 并测定 RNA 纯度与浓度, Toyobo 试剂盒反转录后得到 cDNA, 再以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 检测, 反应条件为 98  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 s, 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 60 s, 扩增为 40 个循环。采用 qRT-PCR 仪软件检测数据并用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法进行定量分析。本实验所用的引物均由生物工程(上海)股份有限公司提供, 见表 1。

表 1. LDLR、PCSK9、HNF1 $\alpha$  和 GAPDH 引物序列  
Table 1. LDLR, PCSK9, HNF1 $\alpha$  and GAPDH primer sequences

名称	序列(5'-3')	产物长度/bp	GenBank 号
LDLR	F-GACTGGTCAGATGAACCCATCAAAG R-AGGTCATTGCAGACGTGGGAAC	86	NM_000527.5
PCSK9	F-AGGGGAGGACATCATTGGTG R-CAGGTTGGGGTCAGTACC	229	NM_174936.4
HNF1 $\alpha$	F-TGGCGCAGCAGTTCACCCAT R-TGAAACGGTTCCTCGCCCC	96	NM_000545.8
GAPDH	F-ATGGGGAAGGTGAAGCTCG R-GGGGTCATTGATGGCAACAATA	108	NM_001357943.2

### 1.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6.0 进行统计分析, 所有实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异性比较采用 One-way ANOVA 单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异存在统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 烟酰胺单核苷酸对 Huh7 细胞活力的影响

采用 CCK-8 实验检测 NMN 是否对 Huh7 细胞存在毒性作用。分别以 0、12.5、25、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  NMN 处理细胞 24 h。结果显示, 与 0  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组相比, 12.5、25、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组细胞存活率无明显差异(图 1), 说明 NMN

在本实验浓度范围内对细胞没有毒性作用。

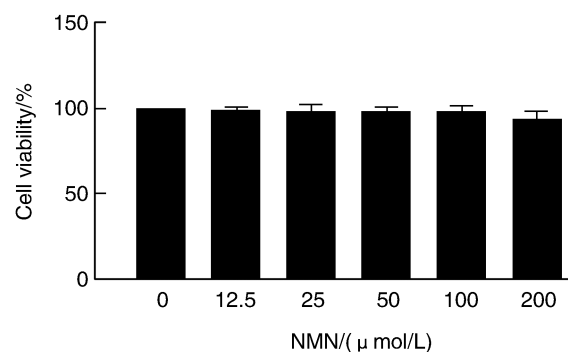


图 1. 不同浓度 NMN 对 Huh7 细胞存活率的影响( $n=4$ )  
Figure 1. Effect of different concentrations of NMN on the survival rate of Huh7 cells ( $n=4$ )

## 2.2 烟酰胺单核苷酸对 Huh7 细胞脂质蓄积的影响

50 mg/L LDL 处理的 Huh7 细胞分别加入 0、12.5、25、50、100 和 200  $\mu\text{mol/L}$  NMN 处理 24 h, 采用油红 O 染色实验检测细胞脂质蓄积情况。结果

显示, 与 0  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组相比, 随着 NMN 浓度的增加, Huh7 细胞内红色脂滴逐渐增多(图 2), 提示 NMN 可增加 Huh7 细胞脂质蓄积。

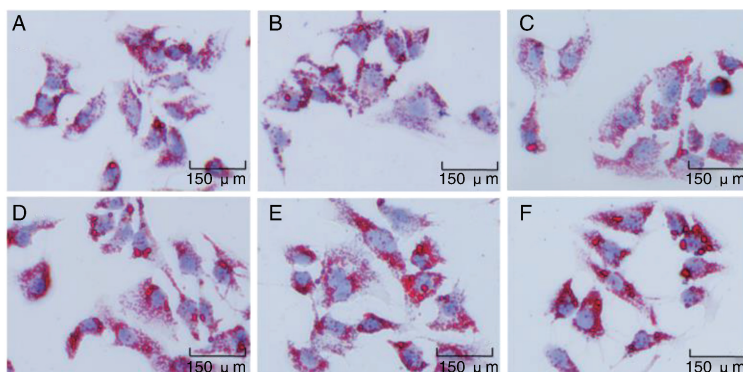


图 2. 不同浓度 NMN 对 Huh7 细胞脂质蓄积的影响

A 为 0  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组, B 为 12.5  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组, C 为 25  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组, D 为 50  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组, E 为 100  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组, F 为 200  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组。

Figure 2. Effect of different concentrations of NMN on the lipid accumulation of Huh7 cells

## 2.3 烟酰胺单核苷酸对 Huh7 细胞 DiI-LDL 摄取能力的影响

分别加入 0、12.5、25、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  NMN 处理 Huh7 细胞 24 h 后, 再加入 20 mg/L DiI-LDL 处理细

胞 4 h, 采用荧光显微镜观察细胞对 DiI-LDL 的摄取情况。结果显示, 与 0  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组相比, 随着 NMN 浓度的增加, 细胞核周红色荧光逐渐增强(图 3), 说明 NMN 可增强 Huh7 细胞对 DiI-LDL 的摄取。

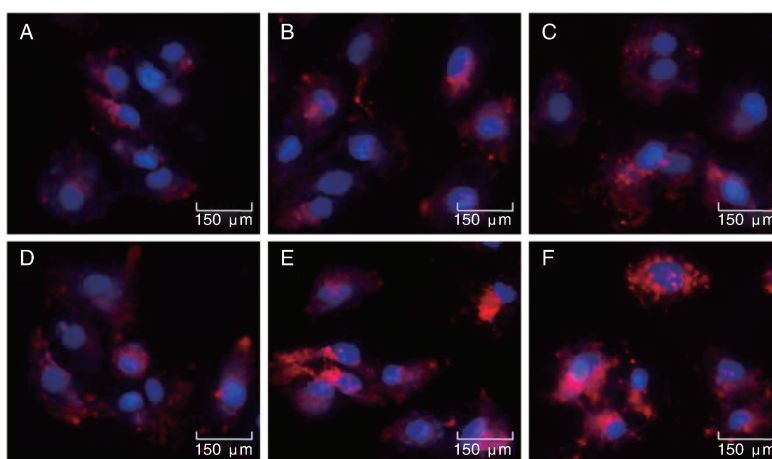


图 3. 不同浓度 NMN 对 Huh7 细胞脂质摄取的影响

A 为 0  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组, B 为 12.5  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组, C 为 25  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组, D 为 50  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组, E 为 100  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组, F 为 200  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组。

Figure 3. Effect of different concentrations of NMN on the lipid uptake of Huh7 cells

## 2.4 烟酰胺单核苷酸对 Huh7 细胞中 LDLR 表达的影响

分别用 0、12.5、25、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  NMN 处理 Huh7 细胞 24 h, qRT-PCR 和 Western blot 分别

检测细胞中主要 LDL 摄取受体 LDLR mRNA 和蛋白表达情况。结果显示, 与 0  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组相比, 100  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组、200  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组 LDLR



mRNA 和蛋白表达水平明显升高(图4)。

## 2.5 烟酰胺单核苷酸对 Huh7 细胞中 PCSK9 表达的影响

PCSK9 是影响肝脏脂质代谢的重要分子,可在蛋白水平靶向降解 LDLR。我们采用 qRT-PCR 及 Western blot 检测了不同浓度 NMN 处理后细胞中 PCSK9 mRNA 和蛋白表达情况。结果显示,与 0  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组相比,100  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组、200  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组 PCSK9 mRNA 和蛋白表达水平明显降低(图5)。由此可知,NMN 可能通过抑制 PCSK9 的表达,进而上调 LDLR 表达,从而增加肝细

胞对 LDLC 的摄取。

## 2.6 烟酰胺单核苷酸对 Huh7 细胞中 HNF1 $\alpha$ 表达的影响

HNF1 $\alpha$  是 PCSK9 基因的正向转录因子且参与脂代谢调控。用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 HNF1 $\alpha$  mRNA 和蛋白的表达情况。结果显示,与 0  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组相比,100  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组、200  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组 HNF1 $\alpha$  mRNA 和蛋白的表达水平明显降低(图6)。表明 NMN 可能通过抑制 HNF1 $\alpha$  的表达,介导 PCSK9 下调,进而上调 LDLR 表达,从而增加肝细胞对胆固醇的摄取。

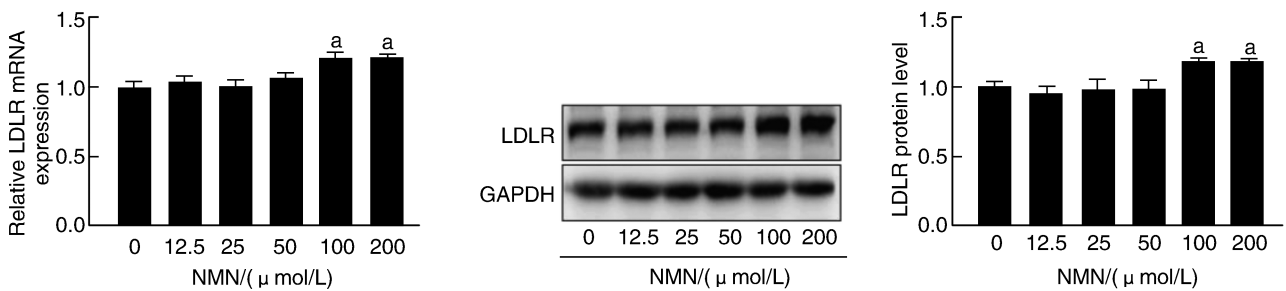


图4. 不同浓度 NMN 对 Huh7 细胞中 LDLR mRNA 和蛋白表达的影响( $n=3$ )

a 为  $P<0.01$ ,与 0  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组比较。

Figure 4. Effect of different concentrations of NMN on the expressions of LDLR mRNA and protein in Huh7 cells ( $n=3$ )

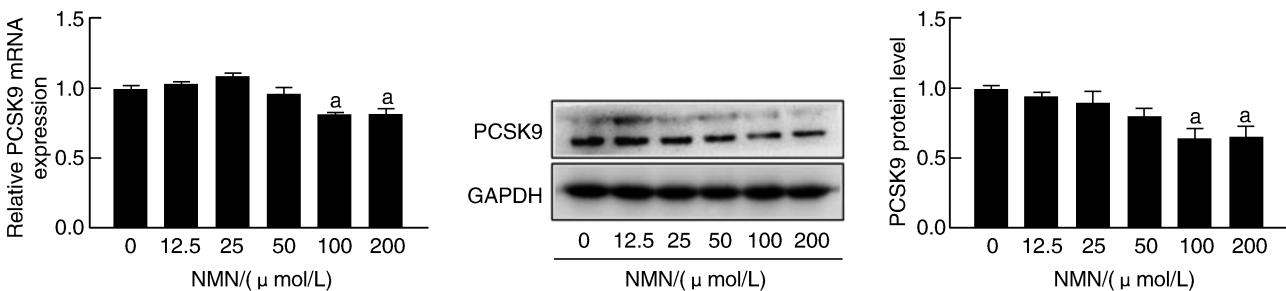


图5. 不同浓度 NMN 对 Huh7 细胞中 PCSK9 mRNA 和蛋白表达的影响( $n=3$ )

a 为  $P<0.01$ ,与 0  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组比较。

Figure 5. Effect of different concentrations of NMN on the expressions of PCSK9 mRNA and protein in Huh7 cells ( $n=3$ )

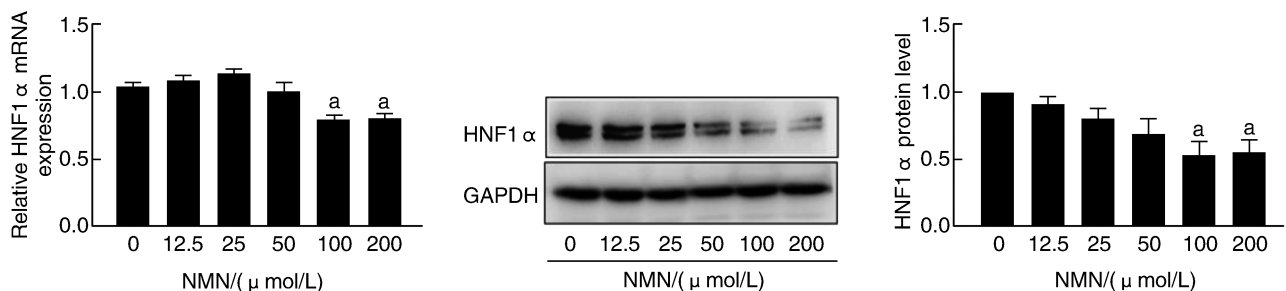


图6. 不同浓度 NMN 对 Huh7 细胞中 HNF1 $\alpha$  mRNA 和蛋白表达的影响( $n=3$ )

a 为  $P<0.01$ ,与 0  $\mu\text{mol/L}$  NMN 组比较。

Figure 6. Effect of different concentrations of NMN on the expressions of HNF1 $\alpha$  mRNA and protein in Huh7 cells ( $n=3$ )

### 3 讨论

胆固醇代谢稳态对维持正常生命活动起重要作用,血液中胆固醇浓度处于过低水平或者过高水平平均会对人体产生不利影响<sup>[11]</sup>。高胆固醇血症是胆固醇代谢紊乱中高含量的 LDLC 所造成的,是导致心、脑血管疾病临床事件的主要原因<sup>[12-13]</sup>。《2019 年 ESC/EAS 血脂异常管理指南》指出高胆固醇血症以他汀类药物治疗为主,PCSK9 抑制剂治疗为辅,但其治疗效果仍存在风险,因此寻找新的治疗药物仍是研究的热点<sup>[14-15]</sup>。NMN 是 NAD 合成途径中一个重要前体物质,现研究发现人工补充 NMN 可以修复脑损伤和线粒体呼吸缺陷,拮抗缺血再灌注损伤,对脑出血、老年退行性疾病、视网膜退行性疾病等均具有一定疗效<sup>[7]</sup>。动物实验证实了补充 NMN 能够催化 NAD 的生物合成,改善胰岛功能障碍,恢复胰岛素分泌,进而发挥改善肥胖的作用<sup>[16-17]</sup>;研究显示 NMN 通过增加脂肪分解、提高肝脏中的 NAD 水平,增强线粒体能量代谢,加快能量消耗<sup>[6]</sup>;NMN 与亮氨酸协同作用增加脂肪酸氧化,减少了胆固醇的积聚<sup>[18]</sup>。本研究通过细胞 LDL 荷脂和 DiI-LDL 摄取实验证实了 NMN 能增加 Huh7 细胞对脂质的摄取,提示 NMN 可能通过增强肝细胞对血液中 LDLC 的摄取,从而降低血液中 LDLC 的水平。

现有研究已证实,LDLR 数量或活性的增加会降低血液中 LDLC 水平<sup>[19]</sup>。本研究检测到 NMN 处理细胞后 LDLR 蛋白和 mRNA 水平的表达均明显升高,证实 NMN 可能通过增加 LDLR 表达从而增强了对 LDL 的摄取。研究表明肝细胞表面 LDLR 与循环中 PCSK9 结合,LDLR/PCSK9 蛋白复合物被运送到溶酶体进行降解,阻止 LDLR 循环转运 LDL 使血浆中胆固醇含量过高导致高胆固醇血症<sup>[20]</sup>。因此,治疗高胆固醇血症可使用 PCSK9 单克隆抗体抑制剂或小分子抑制剂<sup>[21-22]</sup>。本研究结果显示 NMN 可明显降低肝细胞内 PCSK9 mRNA 和蛋白水平的表达,这说明 NMN 通过下调 PCSK9 表达,从而上调了 LDLR 蛋白的表达,增加了肝细胞对胆固醇的吸收。但是,我们的实验结果也发现 NMN 也可增加 LDLR mRNA 水平的表达,这一作用可能与 PCSK9 表达下调无关,其确切机制还需进一步探讨。

HNF1 $\alpha$  作为 HNF 家族中关键的一员,对维持肝细胞的生物学功能起着重要的作用。HNF1 $\alpha$  在肝细胞中作为 PCSK9 的转录因子,可调控 PCSK9

基因的表达并调节胆固醇代谢<sup>[23]</sup>。研究发现降糖药利拉鲁肽通过 HNF1 $\alpha$  依赖机制抑制肝细胞中 PCSK9 的表达,增加胰岛素分泌,降低血脂水平<sup>[24]</sup>。天然降低胆固醇化合物小檗碱介导泛素蛋白酶体降解通路下调肝脏中 HNF1 $\alpha$  蛋白的表达,从而抑制 PCSK9 的转录,增加肝细胞对 LDL 及极低密度脂蛋白的摄取<sup>[25]</sup>。芦荟大黄素抑制 HNF1 $\alpha$  的表达并下调 PCSK9 表达,上调 LDLR 表达,从而促进 LDL 的摄取<sup>[26]</sup>。本研究结果显示 NMN 可显著降低肝细胞内 HNF1 $\alpha$  mRNA 和蛋白的表达水平,进一步验证了 NMN 通过抑制 HNF1 $\alpha$ /PCSK9 的表达,上调 LDLR 的表达,增加肝细胞对 LDL 的摄取,降低血浆中胆固醇的水平。

综上所述,本研究显示 NMN 可能通过介导 HNF1 $\alpha$ /PCSK9/LDLR 信号通路参与调节 Huh7 细胞的胆固醇代谢,增强肝细胞对 LDL 的摄取能力。这为临床上应用 NMN 改善高胆固醇血症提供了实验依据。但 NMN 调控肝细胞的脂质摄取是否存在诱发肝脏脂肪变性的可能性也需进一步研究明确。

#### [参考文献]

- [1] 梁英权, 韩际宏, 余茂耘. 霍山石斛对高脂诱导的 LDLR 基因敲除小鼠动脉粥样硬化和血管钙化的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(11): 930-935.
- [2] XU Y Q, GAO J, GONG Y Q, et al. Hsa-miR-140-5p down-regulates LDL receptor and attenuates LDL-C uptake in human hepatocytes [J]. *Atherosclerosis*, 2020, 297: 111-119.
- [3] HOSSEINI L, FAROKHI-SISAKHT F, BADALZADEH R, et al. Nicotinamide mononucleotide and melatonin alleviate aging-induced cognitive impairment via modulation of mitochondrial function and apoptosis in the prefrontal cortex and hippocampus [J]. *Neuroscience*, 2019, 423: 29-37.
- [4] OKABE K, YAKU K, TOBE K, et al. Implications of altered NAD metabolism in metabolic disorders [J]. *J Biomed Sci*, 2019, 26(1): 34.
- [5] YOSHINO J, MILLS K F, YOON M J, et al. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD<sup>+</sup> intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice [J]. *Cell Metab*, 2011, 14(4): 528-536.
- [6] STROMSDORFER K L, YAMAGUCHI S, YOON M J, et al. Namp1-mediated NAD<sup>+</sup> biosynthesis in adipocytes regulates adipose tissue function and multi-organ insulin sensitivity in mice [J]. *Cell Rep*, 2016, 16(7): 1851-1860.
- [7] 赵娟, 张建, 余志坚, 等. 烟酰胺单核苷酸的研究及应用进展 [J]. *食品科技*, 2018, 43(4): 257-262.
- [8] WU Y, XU M J, CAO Z, et al. Heterozygous Ldlr-

- deficient hamster as a model to evaluate the efficacy of PCSK9 antibody in hyperlipidemia and atherosclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): 5936.
- [9] WARDEN B A, FAZIO S, SHAPIRO M D. The PCSK9 revolution: current status, controversies, and future directions [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2020, 30(3): 179-185.
- [10] GUO Y, YAN B, TAI S, ZHOU S, et al. PCSK9: associated with cardiac diseases and their risk factors? [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2021, 704: 108717.
- [11] 王凤玲, 隋小芳, 索树珍, 等. 胆固醇代谢紊乱及其相关疾病的研究进展[J]. *中国老年保健医学*, 2015, 13(1): 13-15.
- [12] SILVERMAN M G, FERENCZ B A, IM K, et al. Association between lowering LDL-C and cardiovascular risk reduction among different therapeutic interventions: a systematic review and Meta-analysis[J]. *JAMA*, 2016, 316(12): 1289-1297.
- [13] 赵量, 温军, 郭远林. 肝脏移植治疗纯合型家族性高胆固醇血症的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(4): 353-358.
- [14] MACH F, BAIGENT C, CATAPANO A L, et al. 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk [J]. *Eur Heart J*, 2020, 41(1): 111-188.
- [15] DE ISLA L P, ALONSO R, WATTS G F, et al. Attainment of LDL-cholesterol treatment goals in patients with familial hypercholesterolemia: 5-year SAFEHEART registry follow-up[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 67(11): 1278-1285.
- [16] REVOLLO J R, KÖRNER A, MILLS K F, et al. Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme [J]. *Cell Metab*, 2007, 6(5): 363-375.
- [17] SPINLER R, GORSKI T, STOLZ K, et al. The adipocytokine Nampt and its product NMN have no effect on beta-cell survival but potentiate glucose stimulated insulin secretion[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54106.
- [18] ZEMEL M B. Modulation of energy sensing by leucine synergy with natural sirtuin activators: effects on health span[J]. *J Med Food*, 2020, 23(11): 1129-1135.
- [19] ROSENSON R S, HEGELE R A, FAZIO S, et al. The evolving future of PCSK9 inhibitors [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72(3): 314-329.
- [20] Xiao J, Deng Y M, Liu X R, et al. PCSK9: a new participant in lipophagy in regulating atherosclerosis? [J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 495: 358-364.
- [21] PAGE M M, WATTS G F. PCSK9 inhibitors--mechanisms of action[J]. *Aust Prescr*, 2016, 39(5): 164-167.
- [22] DELLA BADIA L A, ELSHOUBAGY N A, MOUSA S A. Targeting PCSK9 as a promising new mechanism for lowering low-density lipoprotein cholesterol [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 164: 183-194.
- [23] SHENDE V R, WU M, SINGH A B, et al. Reduction of circulating PCSK9 and LDL-C levels by liver-specific knock-down of HNF1 alpha in normolipidemic mice[J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(4): 801-809.
- [24] YANG S H, XU R X, CUI C J, et al. Liraglutide down-regulates hepatic LDL receptor and PCSK9 expression in HepG2 cells and db/db mice through a HNF-1a dependent mechanism[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2018, 17(1): 48.
- [25] DONG B, LI H, SINGH A B, et al. Inhibition of PCSK9 transcription by berberine involves down-regulation of hepatic HNF1 alpha protein expression through the ubiquitin-proteasome degradation pathway [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(7): 4047-4058.
- [26] Su Z L, Hang P Z, Hu J, et al. Aloe-emodin exerts cholesterol-lowering effects by inhibiting proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in hyperlipidemic rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(8): 1085-1092.

(此文编辑 曾学清)