

基于 AMPK/ACC/CPT1A 信号通路探讨羟基茜草素对 AML-12 细胞脂质沉积的影响

侯涿茗¹, 李莹¹, 许嘉鸿², 李正鑫², 马函琳², 陈逸云^{2*}

(1. 上海中医药大学附属龙华医院感染科, 上海 200032; 2. 上海市浦东新区公利医院中医科, 上海 200135)

摘要: 目的 探讨羟基茜草素 (Pur) 对 AML-12 细胞脂质沉积的影响。方法 通过棕榈酸+油酸 (PO, 0.5+0.25 mmol/L) 或棕榈酸 (PA, 0.5 mmol/L) 诱导 AML-12 细胞, 建立体外细胞脂质沉积模型。将细胞分为对照组、模型组和 Pur 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 组。CCK8 法测定细胞活力; 生化试剂盒检测细胞甘油三酯 (TG) 水平; 尼罗红染色检测细胞脂滴沉积情况; RT-qPCR 法检测细胞内相关脂质代谢基因 *SREBP1c*、*FASN*、*CD36*、*ACAC α* 、*PPAR- γ* 、*SCD1*、炎症基因 *IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* 、*CCL5*、*CXCL10* 及 AMPK/ACC/CPT1A 通路相关基因 *AMPK α 1*、*AMPK α 2*、*ACC*、*CPT1A* mRNA 表达; Western blot 法检测细胞 p-AMPK α 、AMPK α 、p-ACC、ACC、CPT1A 蛋白表达。结果 0~100 $\mu\text{mol/L}$ Pur 对 AML-12 细胞活力无明显抑制作用 ($P>0.05$)。与对照组比较, 模型组 AML-12 细胞尼罗红染色半定量和 TG 水平升高 ($P<0.01$); *SREBP1c*、*FASN*、*CD36*、*ACAC α* 、*PPAR- γ* 、*SCD1*、*IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* 、*CCL5*、*CXCL10* mRNA 表达升高 ($P<0.01$), *AMPK α 1*、*AMPK α 2*、*ACC*、*CPT1A* mRNA 表达降低 ($P<0.01$); p-AMPK/AMPK、p-ACC/ACC 比值及 CPT1A 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, Pur 40、80 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞尼罗红染色半定量和 TG 水平降低 ($P<0.01$); *SREBP1c*、*FASN*、*CD36*、*ACAC α* 、*PPAR- γ* 、*SCD1*、*IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* 、*CCL5*、*CXCL10* mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), *AMPK α 1*、*AMPK α 2*、*ACC*、*CPT1A* mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); p-AMPK/AMPK、p-ACC/ACC 比值及 CPT1A 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 Pur 对 AML-12 细胞脂质沉积有较好的抑制作用, 其作用可能与调控 AMPK/ACC/CPT1A 信号通路相关。

关键词: 羟基茜草素; AML-12 细胞; 棕榈酸; 油酸; 脂质沉积; 脂代谢; 炎症; AMPK/ACC/CPT1A 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)09-3096-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.09.043

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是最常见的慢性肝病之一, 近年来, 肥胖和代谢相关疾病的增加使得全球 NAFLD 患病率呈逐年增长趋势^[1]。NAFLD 的病理过程始于肝细胞内脂肪酸和甘油三酯 (TG) 的沉积逐渐增加, 随后引发肝脏炎症和损伤, 过度的脂质沉积进一步导致细胞损伤、胶原纤维的沉积和肝脏纤维化, 最终达成肝硬化和肝癌等终末期肝病结局^[2]。因此, 对 NAFLD 早期脂质沉积的干预是阻断疾病进展的重要策略。NAFLD 发病机制复杂, 目前研究证实腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 作为感知能量状态、控制能量消耗及储存的关键因子, 可通过调节脂质合成和葡萄糖代谢对调控脂质沉积发挥关键作用^[3-4]。在中医中, 非酒精性脂肪性肝病归属于“胁痛”“肝着”“肝积”“肥气”等范畴。肝为藏血之脏, 血瘀是本病的重

要病性证素之一^[5], 现代研究也佐证了 NAFLD 患者往往出现肝脏微循环障碍及外周血脂、全血黏度、血浆黏度、红细胞聚集指数等指标的异常^[6]。因此, 疏肝健脾、化痰祛瘀是本病重要治法^[7-10]。

羟基茜草素 (purpurin, Pur) 作为活血化瘀类中药茜草的活性成分, 现代药理学研究发现其具有抗氧化、抗炎、心血管保护及抗肿瘤等作用, 对脂质生成具有一定的抑制作用^[11]。本研究拟通过建立小鼠肝细胞系 AML-12 脂质沉积模型评价 Pur 的干预作用, 并以 AMPK/ACC/CPT1A 信号通路为切入点进行探讨, 以期 Pur 的药理学研究提供参考。

1 材料

1.1 细胞 小鼠正常肝细胞 AML-12, 购自中国科学院上海细胞库。

收稿日期: 2024-11-18

基金项目: 上海市浦东新区卫生系统学科带头人 (PWRd2024-15); 上海市中医药高层次人才引领计划 (沪卫中发 [2021] 2 号); 上海市浦东新区卫生健康委员会面上项目 (PW2021A-45)

作者简介: 侯涿茗 (1997—), 女, 博士生, 研究方向为慢性肝病的中西医诊疗。Tel: 15670938860, E-mail: luluminho111@163.com

* 通信作者: 陈逸云 (1986—), 女, 博士, 副主任医师, 研究方向为慢性肝病的中西医诊疗。Tel: 13564426906, E-mail: cheniyun@shutcm.edu.cn

1.2 药物与试剂 羟基茜草素 (批号 BP1183) 购自成都普瑞法科技开发有限公司; 甘油三酯 (triglyceride, TG) 检测试剂盒 (货号 R0327) 购自浙江东瓯诊断产品有限公司; CCK-8 试剂盒 (批号 LK814) 购自日本同仁化学研究所; DMEM/F-12 培养基 (批号 8122488) 购自美国 Gibco 公司; 尼罗红 (货号 N3013-100MG) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 异丙醇 (批号 K46428840) 购自德国 Merck 公司; 无水乙醇、氯仿 (批号 20210913、20210803) 购自国药集团化学试剂有限公司; DEPC 水、TRIzol 总 RNA 提取试剂盒 (批号 HB11KA2384、G826KA6730) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; RNA 逆转录试剂盒 (货号 G486) 购自加拿大 Applied Biological Materials 公司; SYBR® Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 (含 ROX) (批号 AG11718) 购自湖南艾科瑞生物工程有限公司; AMPK α 、p-AMPK α 、ACC、p-ACC、CPT1A (货号 ab214425、ab133448、ab109368、ab68191、ab128568) 购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器 5427R 型台式高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); F200 PRO 型酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); ViiA7 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); Mini PROTEAN® Tetra 小型垂直电泳槽、Power Pac Basic 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); Odyssey 扫描仪及双色红外激光成像系统 (美国 LI-COR 公司); IX73-DP80 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 取生长状态良好的 AML-12 细胞, 复苏、培养传代, 使用含 10% 胎牛血清 (FBS) 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM/F-12 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.2 细胞分组与干预 取对数生长期的 AML-12 细胞, 分别接种于 96、24、12 孔板及 30 mm×30 mm 培养皿中, 待细胞长至 70%~80% 时, 分为对照组、模型组和 Pur 20、40、80 μ mol/L 组, 每组设置 3 个复孔。分别向相应的细胞培养孔中加入含有不同浓度 Pur 的 1% FBS+DMEM/F-12 培养基, AML-12 细胞脂质沉积模型由 PO 即棕榈酸 (PA, 0.25 mmol/L) + 油酸 (OA, 0.5 mmol/L) 或 PA (0.5 mmol/L) 诱导^[12-13], 细胞培养 12 h 或 24 h 后进行指标检测。

2.3 指标检测

2.3.1 CCK8 法检测细胞活力 取对数生长期的 AML-12 细胞, 以 5×10^4 /mL 的密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 待细胞长至 80% 左右, 分别加入含 0、5、10、20、40、80、100 μ mol/L Pur 的 1% FBS+DMEM/F-12 培养基进行孵育, 每组设置 3 个复孔, 于培养箱中培养 22 h, 向每孔加入 10 μ L CCK8 溶液后继续孵育 2 h, 使用酶标仪测定每孔在 450 nm 波长处的光密度 (OD) 值, 计算细胞活力。

2.3.2 试剂盒检测细胞内 TG 水平 取对数生长期的 AML-12 细胞, 按“2.2”项下方法分组及干预, 24 h 后收

集细胞, 制备匀浆液。参照试剂盒说明书步骤进行操作, 检测 AML-12 细胞内 TG 水平, 并采用 BCA 法测定匀浆液细胞沉淀蛋白表达, 进行数据标准化。

2.3.3 尼罗红染色观察细胞脂质沉积 取对数生长期的 AML-12 细胞, 按“2.2”项下方法分组及干预, PBS 洗涤 3 次, 用 0.4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 3 次, 加 0.5 μ g/mL 尼罗红染液避光室温孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 于倒置显微镜下观察细胞脂质沉积情况, 并选取具有代表性的视野拍照保存。最后使用 Image pro plus 软件对尼罗红染色荧光强度进行定量分析。

2.3.4 RT-qPCR 法检测细胞相关基因表达 取对数生长期的 AML-12 细胞, 按“2.2”项下方法分组及干预, 细胞孵育 12 h 后使用 TRIzol 裂解液裂解细胞并提取 RNA。根据逆转录试剂盒说明书操作, 将总 RNA 逆转录为 cDNA, 逆转录条件为 25 °C 10 min, 42 °C 15 min, 85 °C 5 min, 4 °C 5 min。以 GAPDH 为内参进行荧光定量 PCR 扩增, 检测各组细胞相关基因表达。PCR 扩增反应条件为 95 °C 预变性 2 min, 循环 1 次; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 15 s, 共循环 40 次。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各目的基因相对表达量。扩增引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计并合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列
GAPDH	正向 5'-CATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3'
	反向 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCCTTCAG-3'
SREBP1c	正向 5'-CGACTACATCCGCTTCTTGACAG-3'
	反向 5'-CCTCCATAGACACATCTGTGCC-3'
FASN	正向 5'-CACAGTGCTCAAAGGACATGCC-3'
	反向 5'-CACCAGGTGTAGTGCCTTCCTC-3'
SCD1	正向 5'-GCAAGCTCTACACCTGCCTCTT-3'
	反向 5'-CGTGCCTTGTAACTTCTGTGCC-3'
CD36	正向 5'-GGACATTGAGATTCTTTTCCCTCTG-3'
	反向 5'-GCAAAGGCATTGGCTGGAAGAAC-3'
ACAC α	正向 5'-GTTCTGTTGGACAACGCCTTCAC-3'
	反向 5'-GGAGTCACAGAAGCAGCCATT-3'
PPAR- γ	正向 5'-GTACTGTGGTTTCAGAAAGTCC-3'
	反向 5'-ATCTCGCCAAACAGCTTCTCT-3'
IL-6	正向 5'-TACCACCTCACAAGTCGGAGGC-3'
	反向 5'-CTGCAAGTCATCATCGTTGTT-3'
TNF- α	正向 5'-GGTGCCTATGTCTACGCCTCTT-3'
	反向 5'-GCCATAGAAGTATGAGAGGGAG-3'
IL-1 β	正向 5'-GCTACAAGAGGATCACCAGCAG-3'
	反向 5'-GTCTGGACCCATTCTTCTTGG-3'
CCL5	正向 5'-CCTGTGCTTTGCTACCTCTC-3'
	反向 5'-ACACACTGGCGGTTCCTTCGA-3'
CXCL10	正向 5'-ATCATCCCTGGGAGCTTCTCT-3'
	反向 5'-GACCTTTTTGGCTAAACGCTTTC-3'
AMPK α 1	正向 5'-GGTGTACGGAAGGCAAAATGGC-3'
	反向 5'-CAGGATTCTTCTTCTGACACGC-3'
AMPK α 2	正向 5'-CTGAAGCCAGAGAATGTGCTGC-3'
	反向 5'-GAGATGACCTCAGGTGCTGCAT-3'
CPT1A	正向 5'-GGCATAAACGCAGACATTCTCTG-3'
	反向 5'-CAGTGTCCATCTCTGAGTAGC-3'
ACC	正向 5'-ATGTCTGGCTTGACACCTAGTA-3'
	反向 5'-CCCCAAAGCGAGTAACAAATTCT-3'

2.3.5 Western blot 法检测细胞相关蛋白表达 取对数生长长期的 AML-12 细胞,按“2.2”项下方法分组及干预,细胞孵育 12 h,使用 RIPA 裂解液裂解细胞并提取总蛋白,使用 BCA 法进行蛋白定量,95 °C 金属浴煮沸变性 10 min,即得蛋白样本。蛋白样本经电泳、转膜后,加 5% 脱脂奶粉溶液封闭膜 1 h,加入 AMPK α 、p-AMPK α 、ACC、CPT1A 一抗 4 °C 孵育过夜,TBS 洗 3 次,加二抗孵育 1 h,TBS 洗 3 次,使用 Odyssey 荧光扫膜仪显影蛋白条带并保存图片。加 GAPDH 孵育 1 h,TBS 洗 3 次,加二抗孵育 1 h,再次显影。蛋白条带使用 Image J 1.51 软件分析其灰度值,以目的条带灰度值与内参条带灰度值比值表示目的蛋白相对表达量。

2.4 统计学分析 通过 SPSS 24.0 软件进行处理,计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两组间比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度 Pur 对 AML-12 细胞活力的影响 0~100 $\mu\text{mol/L}$ Pur 对 AML-12 细胞活力无明显抑制作用 ($P > 0.05$),见图 1。

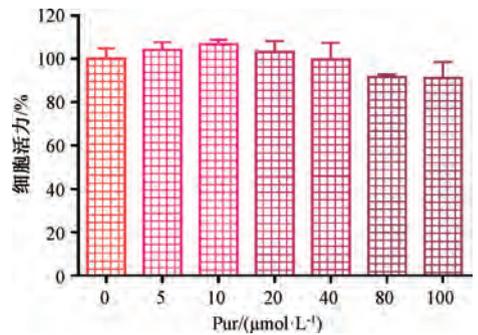
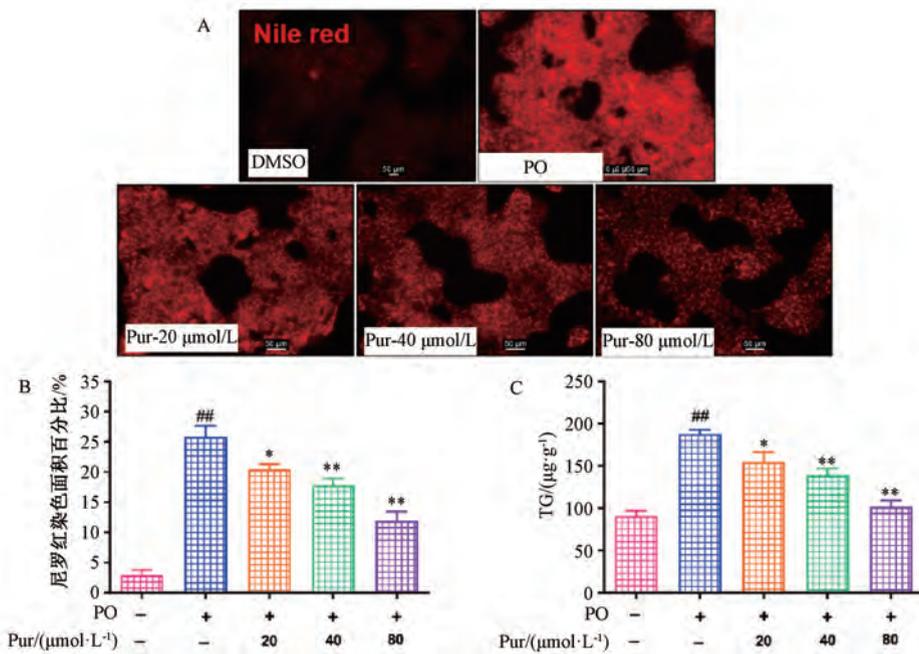


图 1 不同浓度 Pur 对细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3.2 Pur 对 PO 诱导 AML12 细胞脂质沉积的影响 尼罗红染色显示,对照组细胞红色荧光较为暗淡;PO 处理 24 h 后,与对照组比较,模型组出现大量且强度高的红色荧光,尼罗红染色面积百分比增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,Pur 浓度组红色荧光强度降低,尼罗红染色面积百分比降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),见图 2A~2B。

与对照组比较,模型组 TC 水平升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,Pur 各浓度组 TC 水平降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),见图 2C。

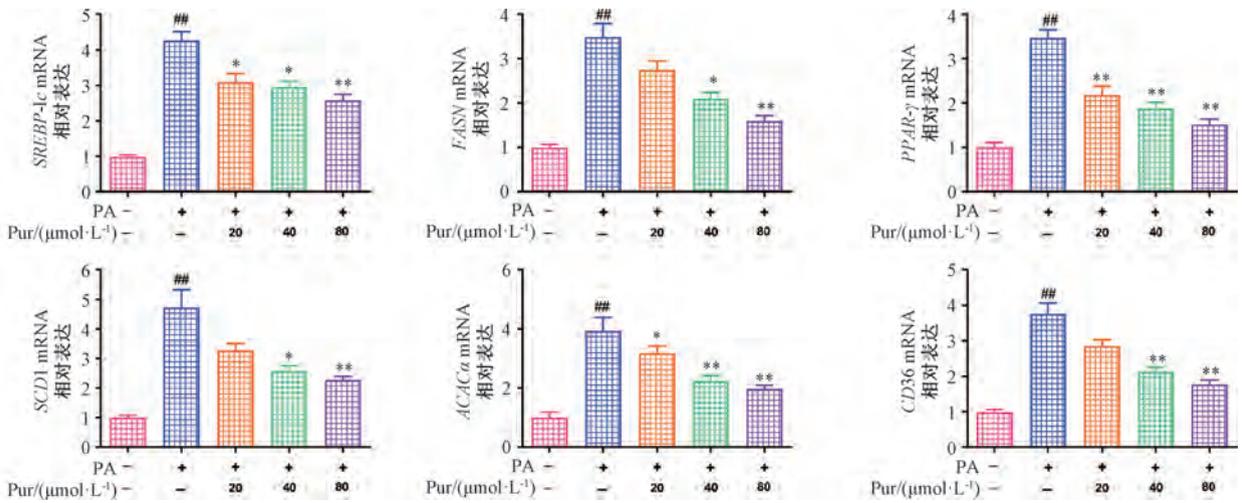


注:与对照组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

图 2 各组细胞尼罗红染色和 TC 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

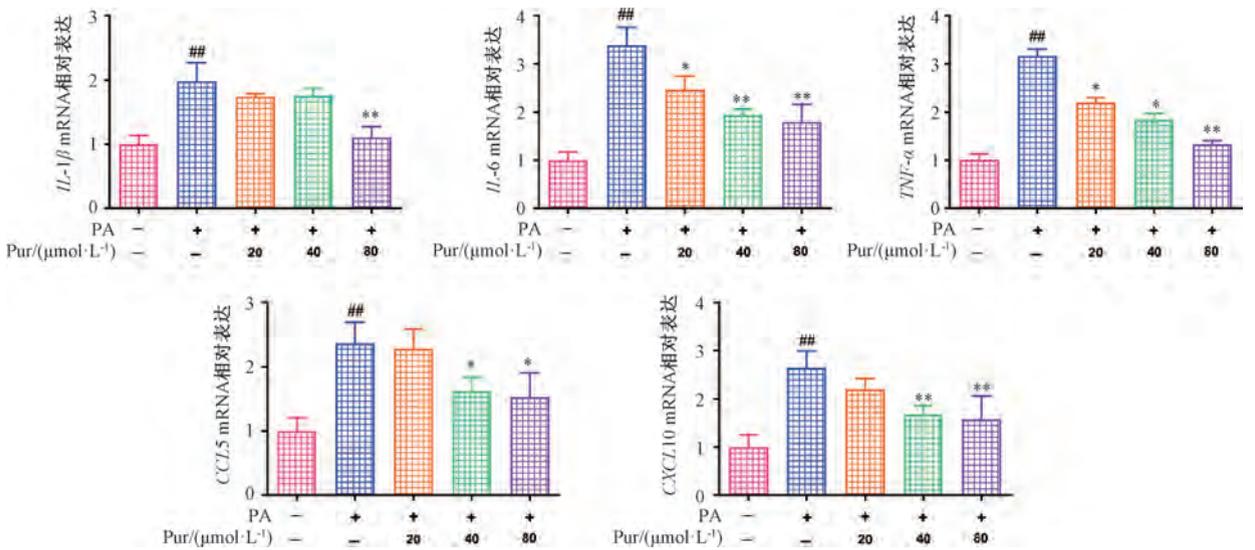
3.3 Pur 对 PA 诱导 AML12 细胞 *SREBP1c*、*FASN*、*CD36*、*ACAC α* 、*PPAR- γ* 、*SCD1* mRNA 表达的影响 与对照组比较,模型组细胞 *SREBP1c*、*FASN*、*CD36*、*ACAC α* 、*PPAR- γ* 、*SCD1* mRNA 表达升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,Pur 40、80 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞 *SREBP1c*、*FASN*、*CD36*、*ACAC α* 、*PPAR- γ* 、*SCD1* mRNA 表达均降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),Pur 20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞 *SREBP1c*、*ACAC α* 、*PPAR- γ* mRNA 表达降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),见图 3。

3.4 Pur 对 PA 诱导 AML12 细胞 *IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* 、*CCL5*、*CXCL10* mRNA 表达的影响 与对照组比较,模型组细胞 *IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* 、*CCL5*、*CXCL10* mRNA 表达升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,Pur 80 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞 *IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* 、*CCL5*、*CXCL10* mRNA 表达降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),Pur 40 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞 *IL-6*、*TNF- α* 、*CCL5*、*CXCL10* mRNA 表达降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),Pur 20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞 *IL-6*、*TNF- α* mRNA 表达降低 ($P < 0.05$),见图 4。



注：与对照组比较，## $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图3 各组细胞 *SREBP1c*、*FASN*、*CD36*、*ACACα*、*PPAR-γ*、*SCD1* mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



注：与对照组比较，## $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图4 各组细胞 *IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α*、*CCL5*、*CXCL10* mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.5 Pur 对 PA 诱导 AML12 细胞 *AMPKα1*、*AMPKα2*、*ACC*、*CPT1A* mRNA 表达的影响 与对照组比较，模型组细胞内 *AMPKα1*、*AMPKα2*、*ACC*、*CPT1A* mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，Pur 40、80 μmol/L 组 AML-12 细胞 *AMPKα1*、*AMPKα2*、*ACC*、*CPT1A* mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，Pur 20 μmol/L 组细胞 *AMPKα1*、*CPT1A* mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)，见图 5。

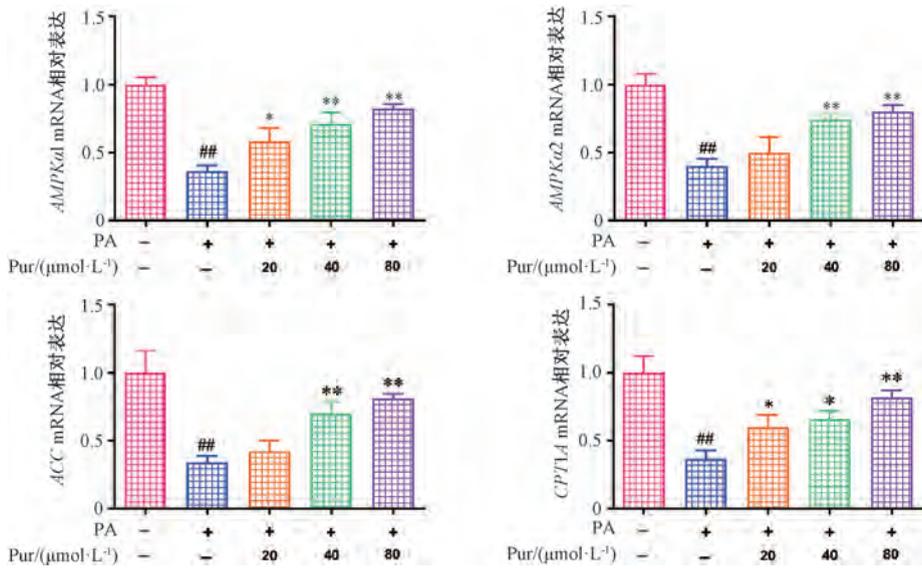
3.6 Pur 对 PA 诱导 AML12 细胞 p-*AMPKα*、*AMPKα*、p-*ACC*、*ACC*、*CPT1A* 蛋白表达的影响 与对照组比较，模型组细胞 p-*AMPKα*/*AMPKα*、p-*ACC*/*ACC* 及 *CPT1A* 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，Pur 各浓度组细胞 p-*AMPKα*/*AMPKα*、p-*ACC*/*ACC* 及 *CPT1A* 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，见图 6。

4 讨论

NAFLD 的初期阶段通常起始于肝细胞内脂质的异常积

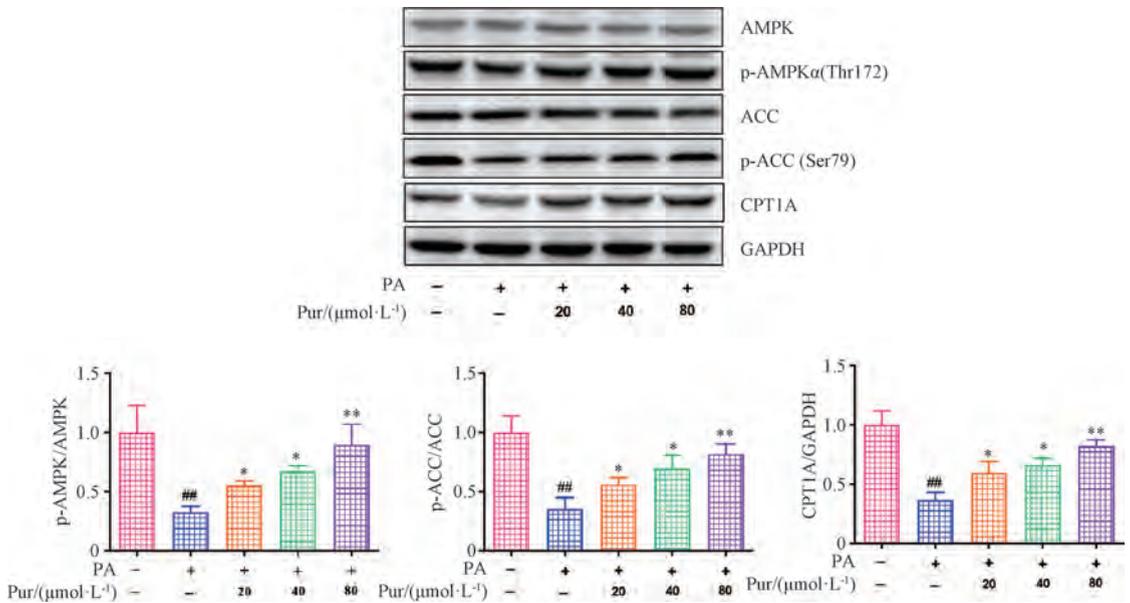
累，脂质沉积导致了脂质代谢紊乱，形成脂滴，是 NAFLD 病理进程发展的关键点^[14]。近年来，多次打击学说正逐渐兴起，这一观点认为 NAFLD 的发展是一个多因素相互作用的过程，不仅仅局限于脂质沉积和第二打击，而是包括遗传因素、肠道微生物组变化、代谢综合征等，它们在不同程度上对 NAFLD 的发生和发展产生影响^[15]。目前治疗方案主要为日常生活干预，建议超重者减轻体质量^[16]。本研究建立了 PO 诱导的体外脂质沉积细胞模型，通过测定细胞内 TG 水平，及尼罗红染色法来评估脂滴沉积情况，发现 Pur 可以有效减轻 PO 处理后 AML12 细胞内的脂质沉积增加。

茜草始载于《神农本草经》，性寒，味苦，归肝经，具有行血凉血止血、通经活络祛瘀的功效。Pur 是从茜草根中分离出来的天然蒽醌，近年来在脂质代谢及抗炎抗氧化等方面的药理学潜能备受瞩目^[17-19]。体外实验证实，Pur 具



注：与对照组比较，## $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图5 各组细胞 AMPKα1、AMPKα2、ACC、CPT1A mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



注：与对照组比较，## $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图6 各组细胞 AMPKα1、AMPKα2、ACC、CPT1A 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

有抑制 3T3-L1 脂肪细胞的分化和脂质积累的作用^[20]。本研究结果显示，Pur 可下调关键脂质代谢基因 *SREBP1c*、*FASN*、*CD36*、*ACACα*、*PPAR-γ* 及 *SCD1* mRNA 表达，提示 Pur 可通过调控脂肪酸合成改善肝细胞脂质代谢。本研究还发现，Pur 可下调炎症相关基因 *IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α*、*CCL5* 及 *CXCL10* mRNA 表达，提示 Pur 可抑制调节因脂肪酸摄取引起的肝细胞炎症反应。

肝脂质沉积是由循环脂质的摄取和脂质处理之间的失衡引起的，这一过程主要通过循环脂质的摄取、新生脂质的合成、脂肪酸氧化 (fatty acid oxidation, FAO) 以及脂质在极低密度脂蛋白中的输出^[21]，这 4 个主要途径进行调节。AMPK 是细胞内能量平衡的感应器，通过调控 ACC 磷

酸化来影响丙二酰辅酶 A (Malonyl-CoA) 的生成，Malonyl-CoA 不仅是脂肪酸合成的中间产物，同时抑制肉碱棕榈酰转移酶 1A (CPT1A) 的活性^[22]。CPT1A 在 FAO 过程中将脂肪酸转运至线粒体内，因此被认为是脂肪酸氧化的限速酶^[23]。AMPK 激活后通过磷酸化 ACC 抑制 Malonyl-CoA 的生成，降低 Malonyl-CoA 浓度，解除其对 CPT1A 的抑制作用，促进脂肪酸氧化，增强脂肪酸的代谢，从而提高 ATP 水平并恢复能量平衡^[24-26]。本研究结果显示，Pur 可通过激活 AMPK 信号通路，增加 p-ACC 和 CPT1A 的表达。

综上所述，Pur 可抑制游离脂肪酸诱导的肝细胞脂质沉积，其可能与调控 AMPK/ACC/CPT1A 信号通路有关，本研究结果可为 Pur 作为 NAFLD 先导化合物提供一定的基

础,也为活血化痰中药茜草的抗NAFLD作用提供一定的科学依据。

参考文献:

[1] Chalasani N, Younossi Z, Lavine J E, *et al.* The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases[J]. *Hepatology*, 2018, 67(1): 328-357.

[2] Guo X, Yin X, Liu Z, *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) pathogenesis and natural products for prevention and treatment[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 15489.

[3] Ren Q, Sun Q, Fu J. Dysfunction of autophagy in high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Autophagy*, 2024, 20(2): 221-241.

[4] Schindler M, Pendzialek M, Grybel K J, *et al.* Adiponectin stimulates lipid metabolism *via* AMPK in rabbit blastocysts[J]. *Hum Reprod*, 2017, 32(7): 1382-1392.

[5] 覃映霖, 胡振斌, 陈彩凤, 等. 非酒精性脂肪肝证候分布规律探析[J]. 中国中医药现代远程教育, 2021, 19(17): 45-48.

[6] 刘亚娟, 李良平. 非酒精性脂肪性肝病肝脏微循环障碍探索[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(4): 913-916.

[7] 孙琳, 赵安聚, 魏玉成, 等. 非酒精性脂肪肝从痰论治研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(3): 339-342.

[8] 巫翠玲, 鲁玉辉. 从“初病湿热在经, 久则瘀热入络”论治非酒精性脂肪肝[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(3): 421-423; 427.

[9] 丁佳璐, 方晨晔. 基于《金匱要略》探讨经方在非酒精性脂肪性肝病治疗中的应用[J]. 江苏中医药, 2021, 53(2): 21-23.

[10] 张雯婷, 潘赐明, 王维, 等. 基于健脾活血法论治非酒精性脂肪性肝病[J]. 实用中医内科杂志, 2021, 35(9): 4-7.

[11] Singh J, Hussain Y, Luqman S, *et al.* Purpurin: a natural anthraquinone with multifaceted pharmacological activities[J]. *Phytother Res*, 2021, 35(5): 2418-2428.

[12] Zhai T, Xu W, Liu Y, *et al.* Honokiol alleviates methionine-choline deficient diet-induced hepatic steatosis and oxidative stress in C57BL/6 mice by regulating CFLAR-JNK pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 2313641.

[13] Lan T, Jiang S, Zhang J, *et al.* Breviscapine alleviates NASH by inhibiting TGF- β -activated kinase 1-dependent signaling[J]. *Hepatology*, 2022, 76(1): 155-171.

[14] Loomba R, Friedman S L, Shulman G I. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Cell*, 2021, 184(10): 2537-2564.

[15] Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis E A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Metabolism*, 2016, 65(8): 1038-1048.

[16] Pafili K, Roden M. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) from pathogenesis to treatment concepts in humans[J]. *Mol Metab*, 2020, 50: 101122.

[17] Nam W, Kim S P, Nam S H, *et al.* Structure-antioxidative and anti-inflammatory activity relationships of purpurin and related anthraquinones in chemical and cell assays[J]. *Molecules*, 2017, 22(2): 265.

[18] Su B, Jing L, Honyu L, *et al.* Purpurin, an anthraquinone induces ROS-mediated A549 lung cancer cell apoptosis *via* inhibition of PI3K/AKT and proliferation[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021, 73(8): 1101-1108.

[19] Yusuf H, Jyoti S, Waseem R, *et al.* Purpurin ameliorates alcohol-induced hepatotoxicity by reducing ROS generation and promoting Nrf2 expression[J]. *Life Sci*, 2022, 309: 120964.

[20] Bedi O, Aggarwal S, Trehanpati N, *et al.* *In vitro* targeted screening and molecular docking of stilbene, quinones, and flavonoid on 3T3-L1 pre-adipocytes for anti-adipogenic actions[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2020, 393(11): 2093-2106.

[21] Ipsen D H, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(18): 3313-3327.

[22] Pérez-Díaz A J, Núñez-Sánchez M Á, Ramos-Molina B. Revisiting liver metabolism through acetyl-CoA carboxylase inhibition[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2024, 35(7): 563-565.

[23] Yao Q Y, Li S Y, Cheng X L, *et al.* Yin Zhi Huang, a traditional Chinese herbal formula, ameliorates diet-induced obesity and hepatic steatosis by activating the AMPK/SREBP-1 and the AMPK/ACC/CPT1A pathways[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(5): 231.

[24] Kim J M, Sim Y D, Lee M H, *et al.* Hypolipogenic effect of shikimic acid *via* inhibition of MID1IP1 and phosphorylation of AMPK/ACC[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(3): 582.

[25] Fullerton M D, Galic S, Marcinko K, *et al.* Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin[J]. *Nat Med*, 2013, 19(12): 1649-1654.

[26] Deja S, Fletcher J A, Kim C W, *et al.* Hepatic malonyl-CoA synthesis restrains gluconeogenesis by suppressing fat oxidation, pyruvate carboxylation, and amino acid availability[J]. *Cell Metab*, 2024, 36(5): 1088-1104.