

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.03.008

ALPL 缺陷加速高脂诱导小鼠肝内脂肪沉积*

张馨¹ 赵疆东² 刘雨婷¹ 魏笑¹ 张立强^{1Δ}

(1 西安交通大学第二附属医院干细胞与再生医学研究所 陕西 西安 710000; 2 空军军医大学航空航天医学系 陕西 西安 710038)

摘要 目的:明确肝/骨/肾型碱性磷酸酶基因(liver/bone/kidney alkaline phosphatase, ALPL)在高脂诱导肝内脂肪沉积的作用。**方法:**利用野生型(WT)和 ALPL 敲除小鼠(ALPL^{-/-}),给予高脂饮食 8 周诱导脂肪肝模型,检测小鼠肝内脂肪沉积和血清中葡萄糖、甘油三酯及胆固醇含量,并应用 RT-PCR、Western blotting 和免疫荧光染色检测肝组织中脂肪酸生成和转运相关基因表达变化。**结果:**ALPL^{-/-}组在正常饮食条件下较 WT 组肝内脂肪沉积无明显变化,而血清中葡萄糖和胆固醇含量增加;高脂条件下,敲除 ALPL 小鼠肝内脂肪沉积明显增加,且伴随血清中甘油三酯含量增加。RT-PCR 和 Western blotting 结果显示,在高脂诱导下 ALPL^{-/-}小鼠肝组织中关键脂肪酸生成基因 ACC1、ACC2 和 PPAR- γ ,及脂肪酸生成基因 LPL 表达明显增加。此外,免疫荧光染色结果显示高脂诱导下敲除 ALPL 小鼠肝组织中的 PPAR- γ 阳性肝细胞明显增加。**结论:**ALPL 敲除促进肝内脂肪酸生成和转运,加速高脂诱导小鼠肝内脂肪沉积,为阐明脂肪肝病变分子机制提供理论支持。

关键词:肝/骨/肾型碱性磷酸酶基因(ALPL);脂肪肝;脂肪酸生成和转运

中图分类号:R-33;Q953.1;R575 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)03-442-06

ALPL Deficiency Accelerates High-fat Diet-induced Hepatic Fat Deposition in Mice*

ZHANG Xin¹, ZHAO Jiang-dong², LIU Yu-ting¹, WEI Xiao¹, ZHANG Li-qiang^{1Δ}

(1 Institute for Stem Cell & Regenerative Medicine, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710000, China;

2 Aerospace Medicine School, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To clarify the role of the liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene (ALPL) in high-fat diet-induced hepatic fat deposition. **Methods:** A fatty liver model was induced by administration of high-fat diet in wild-type (WT) and ALPL knockout (ALPL^{-/-}) mice for 8 weeks. Intrahepatic fat deposition and serum glucose, triglyceride and cholesterol levels in serum were measured. RT-PCR, Western blotting and immunofluorescence staining were used to detect the expression of genes related to fatty acid synthesis and transport in liver. **Results:** No significant change in liver of fat deposition was observed in the ALPL^{-/-} group compared with the WT group on normal diet, while serum glucose and cholesterol levels were increased; under high-fat conditions, intrahepatic fat deposition in the ALPL^{-/-} mice was significantly increased and accompanied by an increase in serum triglyceride. RT-PCR and Western blotting results showed that the expression of the key fatty acid synthesis genes ACC1, ACC2 and PPAR- γ , and the fatty acid synthesis gene LPL in the liver of ALPL^{-/-} mice were significantly increased under high-fat induction. In addition, immunofluorescence staining showed that PPAR- γ -positive hepatocytes were also significantly increased in the liver of ALPL^{-/-} mice under high-fat induction. **Conclusions:** ALPL knockdown promotes the synthesis and transport of intrahepatic fatty acid and accelerates the fat deposition in the liver of mice induced by high fat. Our study provides potential theory to elucidate the molecular mechanism of liver steatosis.

Key words: Liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene; Fatty liver; Fatty acid synthesis and transport

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q953.1; R575 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)03-442-06

前言

非酒精性脂肪肝(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是最常见的慢性肝病,随着肥胖症、2型糖尿病和代谢综合征水平的上升^[1,2],NAFLD 发病率不断增加。如 NAFLD 不加干预将极大增加诱发脂肪性肝炎、肝纤维化、甚至肝硬化风险,预计

非酒精性脂肪肝将在未来十年成为需要肝移植的肝硬化的主要原因^[3,4]。NAFLD 的发展是一个复杂的过程,目前对 NAFLD 发病机制尚不十分了解。肝/骨/肾型碱性磷酸酶(liver/bone/kidney alkaline phosphatase, ALPL)是一种机体广泛表达的组织非特异性碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP),在肝脏和骨组织高表达。ALPL 在前脂肪细胞中表达(如 3T3-L1 和

* 基金项目:陕西省自然科学基金面上项目(2022JM-105)

作者简介:张馨,女,硕士研究生,研究方向:肝纤维化发病机制探究,E-mail: xzhang_xjtu@163.com

Δ 通讯作者:张立强,男,硕士,助理研究员,主要研究方向:干细胞与组织再生、修复,E-mail: liqiangzhang110@126.com

(收稿日期:2023-08-20 接受日期:2023-09-17)

3T3-F442A), 研究发现 ALP 活力与 3T3-L1 胞内脂质积累存在强相关性; 在 3T3-F442A 细胞中沉默 ALPL 或抑制 ALP 活力, 胞内成脂相关基因表达和脂质含量明显减少^[56], 这些研究提示 ALPL 参与调控胞内脂质代谢和积累途径。然而 ALPL 是否在脂肪肝发展中发挥重要功能鲜有报道。本实验主要探讨 ALPL 在高脂诱导脂肪肝中的作用, 初步探讨潜在分子机制。

1 材料与方法

1.1 ALPL 敲除小鼠

ALPL 敲除 (ALPL^{-/-}) 小鼠委托江苏集萃药康生物科技股份有限公司构建, 并饲养于 SPF 级动物饲养室饲养和繁育。所有动物实验均严格按照西安交通大学伦理委员会相关规定执行和操作。本研究选用杂合型 ALPL^{+/-} 小鼠进行实验, 因 ALP^{L^{-/-}} 全敲小鼠出生后 1~2 周死亡。

1.2 ALPL 敲除小鼠基因型鉴定

采用碧云天鼠尾基因型快速鉴定试剂盒 (D7283S), 按照说明书分离鼠尾 DNA; 随后, 对鼠尾 DNA 进行 PCR 基因型鉴定, 上游引物 -5'CATTGTCAGCTCCAGAGATGGAAC3'; 下游引物 5'GACCTGAGCGTTGGTGTATATG3'。PCR 产物大小为 365 bp, 鉴定为 ALPL 敲除小鼠 (ALPL^{-/-})。此外, 采集并分离小鼠血清, 使用 ALP 活力检测试剂盒 (A059-2-2, NJC-Bio), 酶标仪 510 nm 检测吸光值, 分析血清 ALP 活力。

1.3 建立高脂诱导脂肪肝模型及实验分组

小鼠脂肪模型的建立: 根据 Jackson K 和 Lee ES 等人的研究^[78], 将 8 周龄的 WT 型小鼠 (ALPL^{+/+}) 和 ALPL^{-/-} 小鼠给予 60% 脂肪功能的高脂饲料 (协同生物, XTHF60), 自由采食 8 周。对照组小鼠给予 10% 脂肪功能的常规饲料 (协同生物, XTCON50J), 自由采食 8 周。动物饲养在温度为 22 °C-25 °C, 光暗周期为 12:12 小时的环境下。实验分组: ALPL^{+/+}, ALPL^{-/-}, ALPL^{+/+} 高脂组 (ALPL^{+/+}+HF) 及 ALPL^{-/-} 高脂组 (ALPL^{-/-}+HF), 每组各 5 只。

1.4 肝组织取材

在高脂饮食 8 周, 各组小鼠经麻醉后行球后静脉丛取血。随后, 颈椎脱臼处死小鼠, 取肝组织, 经 4% 多聚甲醛 4 °C 固定

过夜, 切片用于肝形态学观察、油红 O 染色和免疫荧光染色实验; 取新鲜肝组织液氮中速冻并研磨, 分离肝总蛋白和总 RNA, 用于 Western blotting 或 RT-PCR 检测。

1.5 H&E 染色和油红 O 染色

固定的肝组织经常规制作石蜡切片 (6 μm), 采用改良 H&E 染色试剂盒染色: 加入适量苏木素染液染色 6-10 分钟, 自来水冲洗 10 秒钟; 分化液分化 1 秒钟, 去除过深的核着色及胞浆上多余的苏木素颜色, 自来水冲洗 30 秒钟; 去除切片上残留的酸终止分化, 返蓝液返蓝 1 分钟, 自来水冲洗 30 秒钟; 伊红染色 2 分钟后, 自来水冲洗, 脱水封片, 在显微镜下观察肝组织学变化。

固定的肝组织样本经 PBS 洗涤、30% 蔗糖脱水包埋, 常规制作冰冻切片 (6 μm)。采用改良油红 O 染色试剂盒 (碧云天, C0158S) 染色: 加入适量染色洗涤液洗涤 20 秒钟, 加入适量油红 O 染色工作液, 室温染色 20 分钟; 去除油红 O 染色工作液, 染色洗涤液洗涤 30 秒钟, PBS 洗涤 20 秒钟; 苏木素染色液进行细胞核的复染, 80% 甘油封片, 在显微镜下进行观察并拍照。

1.6 Western blotting 检测

提取肝组织总蛋白, 经 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳, 将分离胶中蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 5% BSA 室温封闭 2 小时, 将膜与分别与一抗 PPAR-γ (1:1 000, Cell Signaling Technology, 2435), LPL (Santa Cruz Biotechnology, sc-373759), ACC (1:1 000, Cell Signaling Technology, 3662) 及 β-Actin (1:4 000, Yeasen Biotechnology, 30201ES20) 于 4 °C 孵育过夜后, 二抗 (1:20 000) 室温孵育 2 小时。采用化学发光法在天能化学发光成像仪成像。

1.7 RT-PCR 检测

采用 MiZOL1 (米鼠生物, MI00617) 提取各组肝组织总 RNA, 利用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒 (TAKARA, 6210A) 将 RNA 反转录成 cDNA; 随后, 采用 2X Universal SYBR Green Fast qPCR Mix (Abclonal, RK21203) 进行 RT-PCR, Bio-Rad CFX96 上机检测相关基因表达。RT-PCR 相关引物具体见表 1。

表 1 RT-PCR 引物

Table 1 The primer of RT-PCR

Gene	Sense primer (5' → 3')	Antisense primers (5' → 3')
β-Actin	CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC	ATGGAGCCACCGATCCACA
PPAR-γ	TCGCTGATGCACTGCCTATG	GAGAGGTCCACAGAGCTGATT
LPL	GGGAGTTTGGCTCCAGATTT	TGTGTCTTCAGGGGTCCTTAG
ACC1	ATGGGCGGAATGGTCTCTTTC	TGGGGACCTTGTCTTCATCAT
ACC2	CGCTCACCAACAGTAAGGTGG	GCTTGGCAGGGAGTTCCTC

1.8 免疫荧光染色

固定后的肝组织样本经 PBS 洗涤、30% 蔗糖脱水, 常规制作冰冻切片 (6 μm)。经 0.3% Triton X-100 室温处理 10 分钟, 1% 山羊血清室温封闭 0.5 小时, 于一抗 PPAR-γ (1:100, Cell Signaling Technology, 2435) 中 4 °C 孵育过夜后, 于 Cy3 标记荧

光二抗 (1:200) 室温孵育 2 小时, DAPI 室温孵育 5 分钟。采用激光共聚焦显微镜 (Olympus FluoView FV 1000, Japan) 进行观察并拍照。

1.9 统计学处理

统计分析使用 Prism graphpad 8.0.2 软件。数据以平均值 ±

标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较进行单因素方差分析,两两比较使用 Student's *t* 检验分析。 $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ALPL 敲除小鼠基因型鉴定

根据基因型鉴定引物,ALPL 敲除小鼠的 PCR 产物长度大小为 365 bp, 凝胶电泳结果显示 ALPL^{-/-} 小鼠的 PCR 产物在 250~500 bp 区间,符合杂合型鉴定结果(图 1A)。ALP 活力检测结果显示,ALPL^{-/-} 组小鼠 ALP 活力较 WT 组减少 50%以上(图 1B)。以上结果证明敲除 ALPL 小鼠基因敲除成功,为杂合型 ALPL 敲除小鼠。ALPL^{-/-} 小鼠的外貌、习性、行动和生长周期与野生型(ALPL^{+/+})比无明显差异。

2.2 肝组织形态检测结果

高脂饲料诱导脂肪肝 8 周, 观察小鼠的肝组织形态学变化。H&E 染色结果显示正常条件下,ALPL^{-/-} 组较 WT 组无明显变化;高脂条件下,ALPL^{-/-}+HF 组较 WT+HF 组,肝组织中存在

明显小泡性脂肪变(图 A 上)。随后,油红 O 染色结果显示,高脂条件下敲除 ALPL 明显加剧肝细胞内脂滴沉积(图 A 下和图 B),与 H&E 染色结果一致。

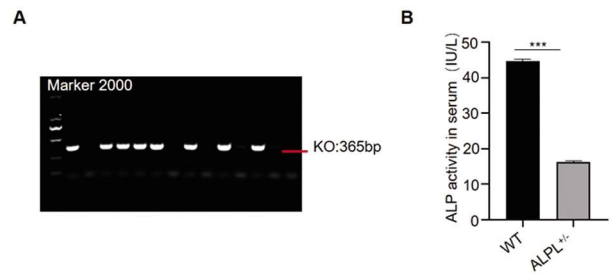


图 1 ALPL 敲除小鼠基因型检测

Fig.1 ALPL knockout mice genotype detection

图注: A:PCR 鉴定 ALPL 敲除小鼠基因型;B:小鼠血清 ALP 活性检测。与对照组(WT)比较 (***) $P < 0.001$ 。

Note: A: PCR to identify the genotypes of ALPL knockout mouse; B: Mouse serum ALP activity assay. Comparison with the control group (WT) (***) $P < 0.001$.

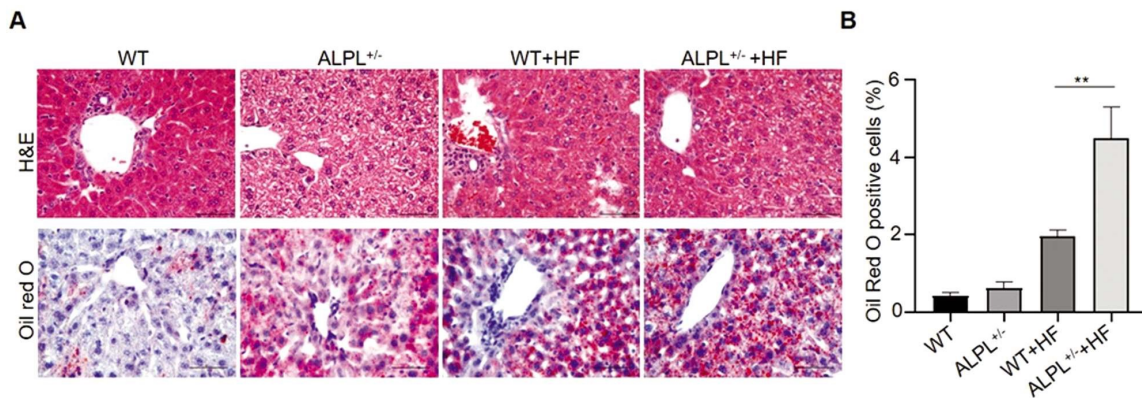


图 2 肝组织形态学检测

Fig.2 Histomorphological observation of liver

图注:A:H&E 染色(上排),油红 O 染色(下排),标尺=50 μm ;B:肝细胞内油红 O 阳性细胞定量分析 (**) $P < 0.01$ 。

Note: A: H&E staining (top row), Oil Red O staining (bottom row), scale bar = 50 μm ; B: Quantitative analysis of oil red O-positive cells in hepatocytes (**) $P < 0.01$).

2.3 血清学检测结果

高脂诱导脂肪肝 8 周,检测小鼠血清中葡萄糖、甘油三酯和胆固醇变化。葡萄糖检测结果显示,在正常和高脂饮食条件下,敲除 ALPL 小鼠血清中的葡萄糖含量较对照组 WT 明显升高(图 3A)。血脂检测结果显示:正常条件下敲除 ALPL 甘油三酯无显著变化,但高脂条件下 ALPL^{-/-}+HF 组较 WT+HF 组血清中甘油三酯明显升高(图 3B);胆固醇结果表明高脂饮食较正常饮食血清中胆固醇明显升高,且无论正常还是高脂条件下敲除 ALPL 导致血清中胆固醇含量明显升高(图 3C)。以上组织学和血清学检测结果表明,敲除 ALPL 导致高脂诱导肝内脂肪沉积加速。

2.4 ALPL 对脂肪酸代谢影响

为了明确 ALPL 调控肝内脂肪沉积,通过检测肝组织内脂肪酸生成 ACC1、ACC2 和 PPAR- γ , 以及脂肪酸转运相关基因 LPL 在转录水平和蛋白水平的表达。RT-PCR 结果显示,在高脂诱导条件下,ALPL^{-/-}+HF 组小鼠肝组织内的 ACC1、ACC2 和 PPAR- γ 较 WT+HF 组明显增加。另外,在正常和高脂饮食条件

下,敲除 ALPL 明显促进肝组织中 LPL 表达(图 4A)。Western blotting 结果显示,在高脂诱导下 ALPL^{-/-}+HF 和 WT+HF 两组肝组织中的 LPL、ACC 和 PPAR- γ 的表达均高于正常饮食组,且 ALPL^{-/-}+HF 组的 LPL、ACC 和 PPAR- γ 较 WT+HF 组显著增加(图 4B)。

免疫荧光染色显示,相较 WT 对照组,正常和高脂条件下敲除 ALPL 组的肝组织中 PPAR- γ 的阳性细胞明显增加,尤其高脂诱导脂肪肝显著增加 PPAR- γ 的阳性细胞数量(图 5A 和 B)。该结果提示敲除 ALPL 潜在地促进肝细胞内脂肪酸的生成和转运,进而加速脂肪肝形成。

3 讨论

ALPL 是一种在肝脏、肾脏和骨组织中高表达的组织非特异性 ALP,在机体骨骼和牙齿矿化过程发挥重要功能^[9]。Ali 等研究发现,在脂肪前体细胞 3T3-L1 中增加 ALPL 表达促进其向脂肪细胞的分化,而 ALP 抑制剂 levamisole 处理减少细胞内甘油三酯的积累^[10,11]。与此不同,我们之前研究显示 ALPL 敲

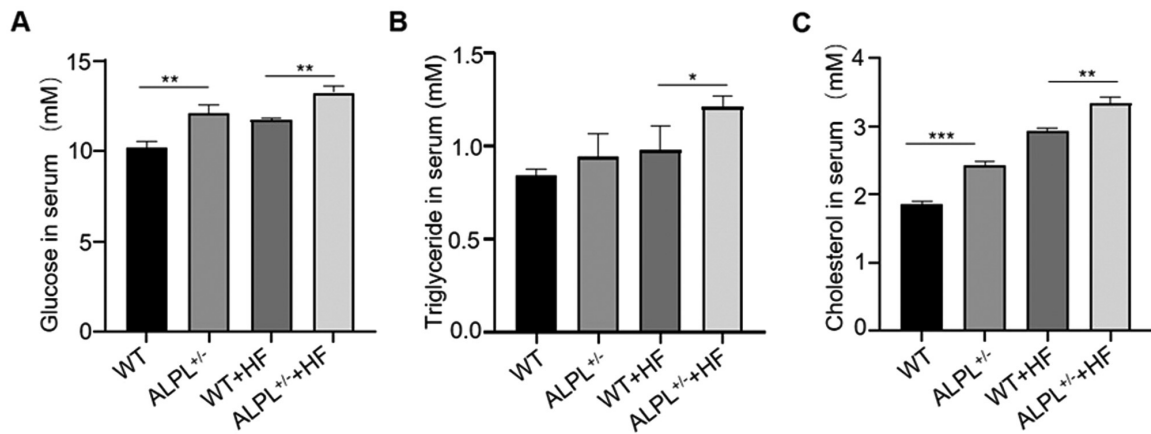


图3 血糖和血脂检测

Fig.3 Blood glucose and lipid testing

图注: A: 血清中葡萄糖含量检测 (** $P < 0.01$); B: 血清中甘油三酯含量检测 ($P < 0.05$); C: 血清中胆固醇含量检测 (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

Note: A: Serum glucose level assay (** $P < 0.01$); B: Serum triglyceride level assays ($P < 0.05$). C: Serum cholesterol level assays (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

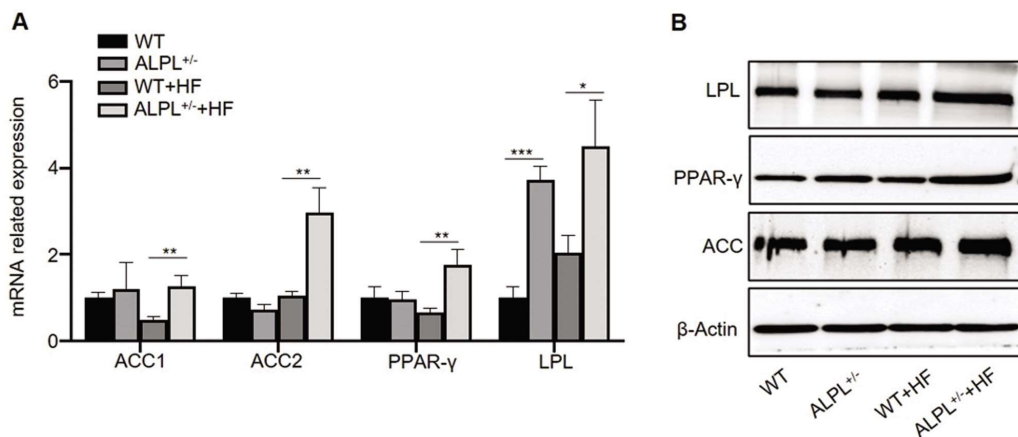


图4 脂肪酸生成和转运相关基因表达检测

Fig.4 Analysis of fatty acid synthesis and transport related gene expression

图注: A: RT-PCR 检测肝组织中脂肪生成和转运相关基因在蛋白水平的表达 ($P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$); B: Western blotting 检测肝组织中脂肪生成和转运相关基因在蛋白水平的表达。

Note: A: The expression of genes related to fat synthesis and transport at the transcriptional level in liver by RT-PCR ($P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$);

B: The expression of genes related to fat synthesis and transport at the protein level level in liver by Western blotting.

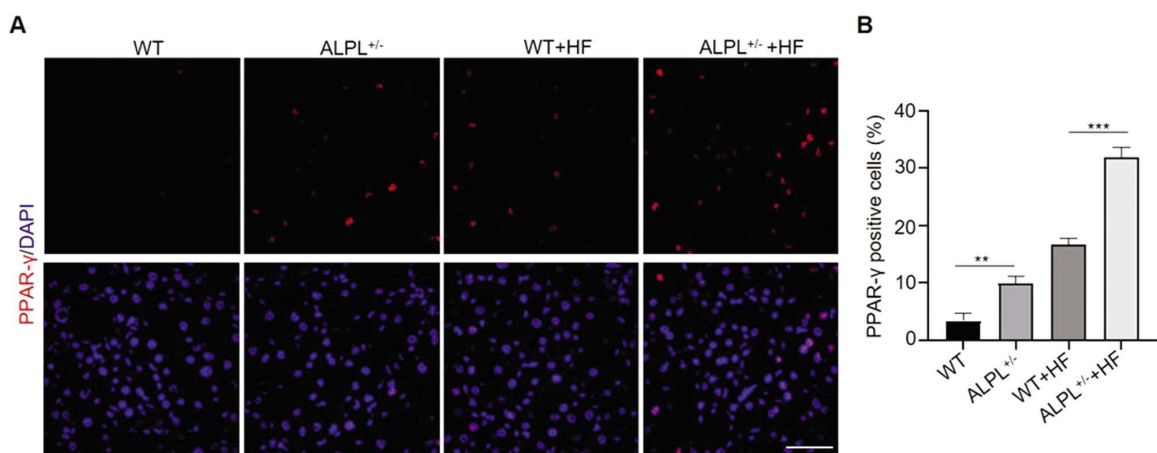


图5 免疫荧光染色检测肝组织中 PPAR-γ 表达

Fig.5 Detection of PPAR-γ expression in liver tissues by immunofluorescence staining

图注: A: 免疫荧光染色检测肝组织中 PPAR-γ 的表达, 标尺 = 50 μm; B: 肝细胞内 PPAR-γ 阳性细胞定量分析 (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

Note: A: The positive cells of PPAR-γ in liver tissue were performed by immunofluorescence staining, scale bar = 50 μm; B: Quantitative analysis of the positive cells of PPAR-γ in hepatocytes (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

除小鼠骨量下降伴有骨髓中的脂肪含量增加,且敲除 ALPL 导致骨髓间充质干细胞的成脂肪细胞分化能力显著提升^[12,13]。此外,成熟脂肪细胞 3T3-F442A 中利用 levamisole 抑制 ALP 活力可明显减少脂肪分解^[6]。尽管这些研究中存在一些差异,然而提示我们 ALPL 在诱导脂肪细胞分化和调节脂肪代谢方面发挥重要作用。临床上,NAFLD 患者血清中 ALP 常异常升高,甚至升高到正常值的 2-3 倍^[14,15],常用于辅助诊断 NAFLD,但 ALPL 具体在 NAFLD 发病中的作用尚不清楚。

本研究我们比较了 ALPL 在正常和高脂饮食条件下对肝脏脂肪代谢的影响。我们结果表明在正常条件下敲除 ALPL 小鼠的肝组织形态没有发生显著改变,血清中的葡萄糖和胆固醇含量有所增加。在高脂饮食条件下,敲除 ALPL 小鼠的肝内小泡样脂肪病性明显,肝细胞内的脂滴沉积和 PPAR- γ 阳性细胞明显增多,且伴随血清中葡萄糖、甘油三酯和胆固醇增加。与我们研究相似,Reyes 等研究利用含 10%脂肪饲料喂养小鼠,ALPL 敲除小鼠的肝内脂肪沉积明显增加^[6],但血糖水平及脂肪生成相关基因乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 和脂肪酸合酶 (FASN) 表达无显著变化。然而,我们结果表明在高脂条件下 ALPL 敲除小鼠的血糖水平和肝组织中脂肪酸生成和转运基因 ACC、PPAR- γ 和 LPL 表达显著增加。经分析可能是由以下原因导致结果存在差异,一方面是两篇研究中所用的高脂饲料脂肪含量存在差异,我们使用的是含脂肪 60%的饲料;另一方面,两篇研究中造模时间存在差异,Reyes 研究中高脂诱导时间紧 17 天,而我们进行高脂诱导 60 天。然而,ALPL 具体通过调控何种信号通路或关键调控因子控制肝细胞内脂肪酸生成和转运尚不清楚。我们结果显示在高脂条件下,敲除 ALPL 肝组织中 ACC 在 RNA 和蛋白水平上显著升高。AMP 激活蛋白激酶 (AMPK) 信号通路通过调控脂肪生成基因 (FAS, SREBP-1c 和 ACC) 的表达控制脂肪酸和胆固醇的生成^[17,18],在改善脂质代谢紊乱方面发挥着重要作用。在高脂诱导的脂肪肝模型中,通过激活 AMPK 通路可显著抑制脂肪生成基因 SREBP-1 和 ACC 表达^[19,20],进而抑制新生脂肪形成和促进脂肪酸氧化作用,达到改善肝内脂肪沉积的效果。众所周知,线粒体生成过剩的 ATP 抑制 AMPK 激活^[21]。ATP 作为 ALPL 的底物,ALPL 可将细胞外 ATP 依次水解为 ADP 和 AMP^[22,23]。我们之前研究证实敲除 ALPL 导致间充质干细胞内 ATP 水平增加,并抑制 AMPK 激活^[13]。因此,敲除 ALPL 可能导致肝细胞的胞外和胞内 ATP 水平增加抑制 AMPK 激活,进而促进 ACC 表达增加脂肪酸生成。此外,磷脂酰乙醇胺 (Phosphatidylethanolamine, PEA) 作为机体一种重要的磷脂质,在 ALPL 突变引起低碱性磷酸酯酶患者的血液和尿液中会蓄积 PEA^[24,25],其可能被肝细胞摄取导致脂质肝内累积。

综上所述,在高脂诱导脂肪肝小鼠模型,敲除 ALPL 通过上调肝内脂肪酸生成和转运相关基因表达,加速小鼠肝内脂肪沉积。ALPL 是否通过调控 AMPK-ACC 通路控制肝细胞脂肪酸生成或通过 PEA 途径促进肝脂肪沉积有待进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Ahmed A, Wong RJ, Harrison SA. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Review: Diagnosis, Treatment, and Outcomes [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2015, 13(12): 2062-2070.
- [2] Henry L, Paik J, Younossi ZM. Review article: the epidemiologic burden of non-alcoholic fatty liver disease across the world [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2022, 56(6): 942-956.
- [3] Maurice J, Manousou P. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. Clin Med (Lond), 2018, 18(3): 245-250.
- [4] Raza S, Rajak S, Upadhyay A, et al. Current treatment paradigms and emerging therapies for NAFLD/NASH [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2021, 26(2): 206-237.
- [5] Ali AT, Penny CB, Paiker JE, et al. The relationship between alkaline phosphatase activity and intracellular lipid accumulation in murine 3T3-L1 cells and human preadipocytes [J]. Anal Biochem, 2006, 354(2): 247-254.
- [6] Hernandez-Mosqueira C, Velez-delValle C, Kuri-Harcuch W. Tissue alkaline phosphatase is involved in lipid metabolism and gene expression and secretion of adipokines in adipocytes [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1850(12): 2485-2496.
- [7] Jackson K, Dressler N, Ben-Shushan RS, et al. Effects of alkaline-electrolyzed and hydrogen-rich water, in a high-fat-diet nonalcoholic fatty liver disease mouse model [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(25): 5095-9108.
- [8] Lee ES, Kwon MH, Kim HM, et al. Curcumin analog CUR5-8 ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in mice with high-fat diet-induced obesity [J]. Metabolism, 2020, 103: 1532-8600.
- [9] Bartlett CA-O, Cave EA-O, Crowther NA-O, et al. A new perspective on the function of Tissue Non-Specific Alkaline Phosphatase: from bone mineralization to intra-cellular lipid accumulation [J]. Mol Cell Biochem, 2022, 477(8): 1573-4919.
- [10] Ali AT, Penny CB, Paiker JE, et al. Alkaline phosphatase is involved in the control of adipogenesis in the murine preadipocyte cell line, 3T3-L1 [J]. Clin Chim Acta, 2005, 354(1-2): 101-109.
- [11] Chirambo GM, van Niekerk C, Crowther NJ. The role of alkaline phosphatase in intracellular lipid accumulation in the human hepatocarcinoma cell line, HepG2 [J]. Exp Mol Pathol, 2017, 102(2): 1096-0945.
- [12] Liu W, Zhang L, Xuan K, et al. Alkaline Phosphatase Controls Lineage Switching of Mesenchymal Stem Cells by Regulating the LRP6/GSK3beta Complex in Hypophosphatasia [J]. Theranostics, 2018, 8(20): 5575-5592.
- [13] Liu W, Zhang L, Xuan K, et al. Alpl prevents bone ageing sensitivity by specifically regulating senescence and differentiation in mesenchymal stem cells [J]. Bone Res, 2018, 6(04): 2095-4700.
- [14] Jafarirad S, Goodarzi R, Mohammadtaghvaei N, et al. Effectiveness of the pomegranate extract in improving hepatokines and serum biomarkers of non-alcoholic fatty liver disease: A randomized double blind clinical trial [J]. Diabetes Metab Syndr, 2023, 17(1): 1878-0334.
- [15] Luger M, Kruschitz RA-O, Kienbacher C, et al. Vitamin D (3) Loading Is Superior to Conventional Supplementation After Weight Loss Surgery in Vitamin D-Deficient Morbidly Obese Patients: a Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial [J]. Obes surg, 2017, 27(5): 1708-0428.
- [16] Gamez-Belmonte R, Tena-Garitaonandia M, Hernandez-Chirlaque C, et al. Deficiency in Tissue Non-Specific Alkaline Phosphatase Leads to Steatohepatitis in Mice Fed a High Fat Diet Similar to That

- Produced by a Methionine and Choline Deficient Diet [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 51.
- [17] Fang C, Pan J, Qu N, et al. The AMPK pathway in fatty liver disease [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 1664-042X.
- [18] Xu Q, Tian W, He S, et al. Apocarotenoids from *Equisetum debile* Roxb. ex Vaucher regulate the lipid metabolism via the activation of the AMPK/ACC/SREBP-1c signaling pathway [J]. *Bioorg chem*, 2023, 138: 1090-2120.
- [19] Chang B, Bae J, Yun S, et al. Wheat sprouts (*Triticum aestivum* Linn.) cultured by a smart farm system ameliorate NAFLD through the AMPK-mediated SREBP signaling pathway [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2023, 32(11): 2092-6456.
- [20] Soetikno V, Andini P, Iskandar M, et al. Alpha-Mangosteen lessens high-fat/high-glucose diet and low-dose streptozotocin induced-hepatic manifestations in the insulin resistance rat model [J]. *Pharm Biol* 2023, 61(1): 1744-5116.
- [21] Zhang W, Li D, Li B, et al. STAT3 as a therapeutic target in the metformin-related treatment [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 116: 1878-1705.
- [22] Ciancaglini P, Yadav Mc Fau - Simão AMS, Simão Am Fau - Narisawa S, et al. Kinetic analysis of substrate utilization by native and TNAP-, NPP1-, or PHOSPHO1-deficient matrix vesicles [J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(4): 716-723.
- [23] Zhang ZA-O, Nam HA-O, Crouch S, et al. Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase Function in Bone and Muscle Progenitor Cells: Control of Mitochondrial Respiration and ATP Production [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1422-0067.
- [24] Sadhukhan S, Mehta P, Rajender S, et al. Proposing a clinical algorithm for better diagnosis of hypophosphatasia in resource-limiting situations [J]. *Osteoporos Int*, 2022, 33 (12): 1433-2965.
- [25] Shajani-Yi Z, Ayala-Lopez N, Black M, et al. Urine phosphoethanolamine is a specific biomarker for hypophosphatasia in adults Hypophosphatasia: Biological and Clinical Aspects, Avenues for Therapy [J]. *Bone*, 2022, 163: 1873-2763.

(上接第 409 页)

- [19] 韦柳兴, 李杨宏, 卢冠铭. 长链非编码 RNA 在甲状腺乳头状癌发生机制及临床应用的研究进展 [J]. *右江民族医学院学报*, 2020, 42 (4): 504-508.
- [20] 曲衍清, 刘新强, 崔莎莎, 等. 小干扰 RNA 靶向干扰低密度脂蛋白受体相关蛋白 4 基因对甲状腺乳头状癌细胞增殖的影响及其机制 [J]. *中华实验外科杂志*, 2021, 38(5): 832-834.
- [21] 熊代刚, 侯泽宇, 蔡玉怀, 等. 过表达 JAZF1 对甲状腺乳头状癌 BCP AP 细胞增殖、凋亡的影响及其机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(9): 55-60.
- [22] 霍青峰, 张生来, 张文杰. 甲状腺乳头状癌免疫逃逸机制进展 [J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(2): 366-369.
- [23] 牛彦强, 谢金会, 倪雅琼, 等. 甲状腺乳头状癌自噬 - 上皮间质转化 - 铁死亡串扰调控机制的研究进展 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2022, 29(19): 1427-1432.
- [24] 牛彦强, 周祖邦, 田利民, 等. 非编码 RNAs 对甲状腺乳头状癌分子调控机制研究进展 [J]. *肿瘤防治研究*, 2021, 48 (11): 1030-1034.
- [25] 秦青青, 李婷婷, 郑永钦, 等. microRNA 在甲状腺乳头状癌中作用机制的研究进展 [J]. *基础医学与临床*, 2017, 37(8): 1184-1189.
- [26] Marczyk M, Polańska J, Wojcik A, et al. Analysis of the Applicability of microRNAs in Peripheral Blood Leukocytes as Biomarkers of Sensitivity and Exposure to Fractionated Radiotherapy towards Breast Cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8705.
- [27] 来旭, 范亚楠, 王瑞丰. LINC01106 靶向 miR-744-5p 影响乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移及侵袭 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2021, 28(4): 577-582.
- [28] El Kilany FH, Youness RA, Assal RA, et al. miR-744/eNOS/NO axis: A novel target to halt triple negative breast cancer progression [J]. *Breast Dis*, 2021, 40(3): 161-169.
- [29] 何黎明, 郭新程, 陶山松, 等. CCND1、ORA0V1、ERCC1 在舌鳞状细胞癌中的表达和临床意义 [J]. *口腔医学研究*, 2015, 31 (6): 597-600.
- [30] 王妹兴, 印季良, 肖健, 等. 结肠癌组织中 miR-340 和 CCND1 表达及临床意义 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2019, 24(6): 538-542.