

O ANDROGRAPHOLIDE MELHORA A ESTEATOSE HEPÁTICA SUPRIMINDO A CAPTAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS MEDIADA POR FATP2 EM CAMUNDONGOS COM DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

Li-Sha Ran¹ · Ya-Zeng Wu¹ · Yi-Wen Gan¹ · Hong-Lian Wang² · Li-Juan Wu³ · Chun-Mei Zheng³ · Yao Ming³ · Ran Xiong³ · Yong-Lin Li³ · Shi-Hang Lei³ · Xue Wang³ · Xiao-Qing Lao¹ · Hong-Min Zhang¹ · Li Wang² · Chen Chen⁴ · Chang-Ying Zhao^{1,3}

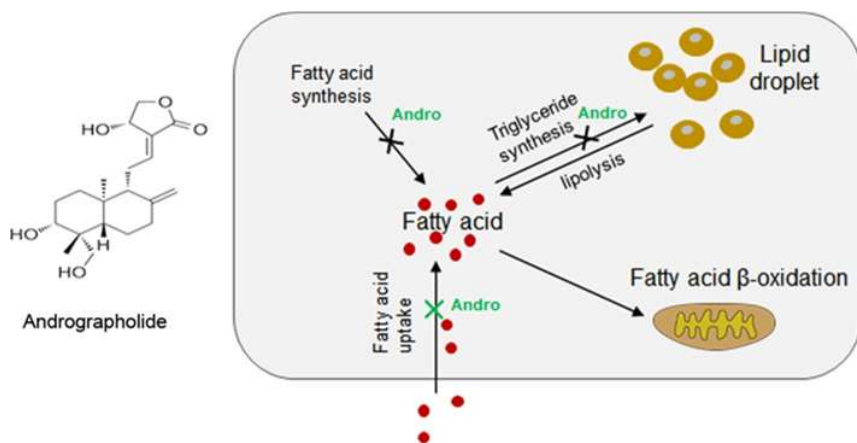
Recebido: 10 Abril 2022 / Aceito: 7 Agosto 2022 / Publicado online: 17 Setembro 2022

© O(s) autor(es) 2022

RESUMO

O acúmulo excessivo de lipídios intra-hepatocelulares ou esteatose é causado pelo metabolismo lipídico anormal e um caráter comum de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), que pode progredir para cirrose e câncer hepatocelular. O andrographolide (Andro) é o principal ingrediente ativo extraído de *Andrographis paniculata*, mostrando um papel protetor contra a esteatose dietética com o mecanismo não totalmente compreendido. Neste estudo, mostramos que a administração de Andro (50, 100 e 200 mg / kg / dia por 8 semanas, respectivamente) atenuou a obesidade e a síndrome metabólica em camundongos alimentados com dieta rica em gordura (HFD) com melhor tolerância à glicose, sensibilidade à insulina e redução da hiperinsulinemia, hiperglicemia e hiperlipidemia. Camundongos alimentados com HFD apresentaram esteatose hepática, que foi significativamente prevenida por Andro. In vitro, Andro diminuiu as gotículas lipídicas intracelulares em células LO2 tratadas com ácido oleico. A matriz de RT-PCR selecionada revelou uma supressão robusta da expressão das proteínas de transporte de ácidos graxos (FATPs) pelo tratamento com Andro. Mais importante ainda, descobrimos que o Andro reduziu consistentemente a expressão de FATP2 nas células LO2 tratadas com ácido oleico e nos tecidos hepáticos de camundongos alimentados com HFD. A superexpressão de FATP2 aboliu o efeito hipolipemiante de Andro em células LO2 tratadas com ácido oleico. O tratamento com andro também reduziu a captação de ácidos graxos em células LO2 tratadas com ácido oleico, que foi atenuada pela superexpressão de FATP2. Coletivamente, nossos achados revelam um novo mecanismo subjacente ao efeito anti-esteatose do Andro, suprimindo a captação de ácidos graxos mediada por FATP2, sugerindo a potencial aplicação terapêutica do Andro no tratamento da DHGNA.

RESUMO GRÁFICO



Palavras-chave: Andrographolide · DHGNA · Esteatose Hepática · FATP2 · Absorção de Ácidos Graxos

Li-Sha Ran, Ya-Zeng Wu contribuíram igualmente para este trabalho. Informações estendidas sobre o autor disponíveis na última página do artigo.

INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) contém uma série de disfunções hepáticas com a característica de acúmulo excessivo de lipídios nos hepatócitos ou esteatose hepática. A DHGNA torna-se a doença hepática crônica mais comum, atingindo cerca de 25% da população global [1]. Estima-se que a incidência da DHGNA aumente 56% nos próximos 10 anos na China com a epidemia de obesidade [1]. A DHGNA está de fato altamente relacionada à síndrome obesidade-metabolismo [1, 2]. Sem tratamento eficaz, a DHGNA pode progredir para cirrose e câncer de fígado. A DHGNA tornou-se a causa de crescimento mais rápido do carcinoma hepatocelular, causando um fardo de saúde esmagador em todo o mundo [1].

O fígado é um órgão importante para o metabolismo lipídico. A homeostase lipídica nas células hepáticas é controlada pela importação de lipídios (ácidos graxos e colesterol), lipogênese (síntese de ácidos graxos e triglicerídeos), oxidação lipídica e exportação de lipídios. A interrupção de qualquer um dos processos acima pode causar acúmulo de lipídios ectópicos nos hepatócitos e a ocorrência de esteatose hepática [3]. A esteatose hepática em si é um distúrbio consideravelmente benigno, mas pode progredir para esteato-hepatite, cirrose e até carcinoma hepatocelular [1]. A esteatose hepática tem uma relação complexa e estreita com a resistência à insulina e a síndrome metabólica [1].

Andrographolide (Andro), um diterpeno lactona, é um dos principais ingredientes bioativos da fitoterapia *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees [4]. Andro apresenta uma eficácia terapêutica significativa em múltiplas doenças inflamatórias envolvidas em órgãos como pulmão, coração, pele, interna, articulação e assim por diante [5-7].

Além disso, Andro também possui bioatividades de anticâncer, antioxidante, antibactérias, antivírus da imunodeficiência humana (HIV), antiobesidade e antidiabetes [7-11]. Em vista do fígado, várias linhas de evidência também apóiam um profundo papel hepatoprotetor de Andro. Andro atenuou a lesão hepática histológica e funcional em ratos desafiados por tetracloreto de carbono (CCl₄) [12].

Andro também mitigou a esteatohepatite não alcoólica (NASH), reduzindo a inflamação e fibrose hepática em camundongos alimentados com uma dieta deficiente em colina e em células HepG2 de gordura in vitro [13]. Em camundongos alimentados com dieta rica em gordura (HFD), o Andro aliviou a obesidade e a esteatose hepática, atenuando a lipogênese e a síntese de colesterol, regulando as proteínas de ligação ao elemento regulador de esteróis (SREBPs) [14]. Apesar desses achados, o mecanismo subjacente ao efeito anti-esteatose do Andro ainda não está totalmente estabelecido. Neste estudo, demonstramos que o Andro desempenha seu papel protetor contra a esteatose hepática também suprimindo importação de ácidos graxos pela regulação negativa da proteína de transporte de ácidos graxos 2 (FATP2).

1. RESULTADOS

2.1 Andro melhorou a Síndrome Metabólica em Camundongos Alimentados com HFD

Para investigar os efeitos do Andro na DHGNA, os camundongos C57BL / 6J foram alimentados com HFD por 16 semanas com diferentes doses (50, 100 e 200 mg / kg / dia) de Andro suplementadas nas últimas 8 semanas por gavagem (Fig. 1a, b). Além disso, a pioglitazona, um agonista do receptor ativado por proliferador de peroxissomo α/γ (PPAR α/γ) com eficácia validada para aliviar a síndrome metabólica e a esteatose [15], foi administrada (1,2 mg/kg/dia por gavagem) como controle positivo em um grupo de camundongos pelo mesmo período. Como mostrado na Fig. 1c-e, os camundongos alimentados com HFD por 16 semanas apresentaram obesidade óbvia com níveis aumentados de glicemia de jejum (FBG) e HbA1c.

No entanto, a administração de Andro atenuou significativamente a obesidade com FBG recuperado em todas as doses testadas. Uma redução significativa de HbA1c foi observada em camundongos tratados com doses médias e altas de Andro (Fig. 1e). Consistentemente, os camundongos alimentados com HFD desenvolveram resistência significativa ao isolamento e tolerância à glicose diminuída, acompanhada de hiperinsulinemia e peptídeo C sérico elevado, que foram significativamente atenuados pelo tratamento com Andro em todas as doses testadas (Fig. 1f-k).

Além disso, os camundongos alimentados com HFD apresentaram níveis aumentados de triglicerídeos séricos totais (TG) e colesterol (TC). A administração de Andro reduziu notavelmente o

TG, tendo uma ligeira influência no CT (Fig. 1l, m). Coletivamente, esses dados demonstram que o tratamento com Andro melhora significativamente a síndrome metabólica induzida por HFD. A droga positiva pioglitazona mostrou um papel protetor semelhante para melhorar a homeostase da glicose e a hiperlipidemia.

2.1 Andro Reduziu a Esteatose em camundongos alimentados com HFD

A esteatose é uma demonstração hepática comum da síndrome metabólica. Em seguida, analisamos a alteração histológica do tecido vivo. Pela coloração HE, observamos hepatócitos maciços em balão ao redor da veia central na seção hepática de camundongos alimentados com HFD, sugerindo a existência de esteatose, que foi posteriormente confirmada pela coloração Oil Red O (Fig. 2a, b). No entanto, foram observados hepatócitos raros em balão, juntamente com uma coloração reduzida de Oil Red O, em seções hepáticas de ratinhos alimentados com HFD tratados com Andro ou pioglitazona. Em consistência, a administração de Andro também reduziu notavelmente o conteúdo de TG do fígado em camundongos alimentados com HFD (Fig. 2c). Portanto, a administração de Andro suprimiu o acúmulo de lipídios e a esteatose em camundongos alimentados com HFD.

*Fig. 1 O tratamento com Andro melhorou a síndrome metabólica em camundongos alimentados com HFD . a estrutura química de Andro. b. Fluxo de trabalho do experimento animal. c–e No final do experimento (idade da semana 24), peso corporal (c), glicemia de jejum (FBG, d), HbA1c (e), resistência à insulina (IPITT, f e g), tolerância à glicose (OGTT, h e i), ingestão sérica lin (j), peptídeo C (k), triglicerídeos totais (TG, l) e colesterol total (TC, m) foram determinados. g, i são quantificação da área sob a curva (AUC) de (f, h), respectivamente. Cada ponto representa dados de um animal. **p < 0,01 e ***p < 0,001 versus veículo. #p < 0,05, ##p < 0,01 e ###p < 0,001 versus grupo HFD (Ver Imagens no documento Original).*

2.2 Andro Suprimiu a Deposição Lipídica induzida por Ácido Oleico em Células LO2

A linha celular hepática tratada com ácido oleico LO2 foi então usada para investigar o efeito de Andro no metabolismo lipídico in vitro. A influência de Andro na viabilidade das células LO2 foi testada pela primeira vez pelo ensaio CCK8. Como mostrado na Fig. 3a, o tratamento com Andro igual ou inferior a 20 µM não mostrou toxicidade nas células LO2. Portanto, as séries de doses de 5, 10 e 20 µM de Andro foram selecionadas para a análise.

Conforme revelado pela coloração O vermelho de óleo na Fig. 3b, a incubação com ácido oleico (combinada com BSA) causa acúmulo intracelular maciço de gotículas lipídicas em células LO2 em comparação com as células não tratadas (em branco) ou tratadas com BSA. No entanto, a suplementação de Andro obviamente suprimiu o número de gotículas lipídicas em células LO2 tratadas com ácido oleico em todas as doses testadas (Fig. 3b). Isso foi confirmado pela análise de quantificação colorimétrica da coloração Oil red O (Fig. 3c).

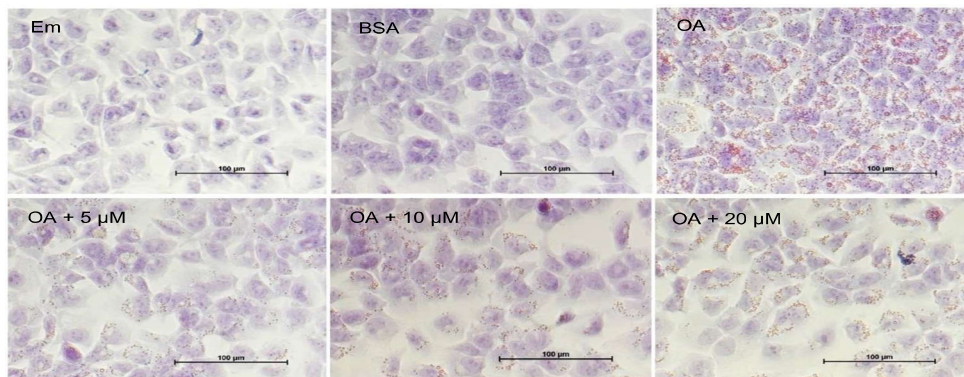


Fig. 3 Andro suprimiu o acúmulo de lipídios induzido pelo ácido oleico nas células LO2. **a** As células LO2 foram tratadas com concentrações indicadas de Andro por 24 h, seguidas da determinação da viabilidade com o reagente CCK8. *** $p < 0,001$ versus controle em branco (0). **b** As células LO2 foram tratadas com ácido oleico sozinho ou em combinação com Andro de concentrações indicadas por 48 h. Gotículas lipídicas intracelulares foram reveladas pela coloração Oil Red O. Barra de escala, 100 μm . **c** A coloração Oil Red O foi resolvida por isopropanol seguido de quantificação colorimétrica. *** $p < 0,001$. OA, ácido oleico.

2.3 Andro Regulou Diferencialmente a Expressão de Genes do Metabolismo Lipídico

A homeostase intracelular do pool lipídico é sinergicamente regulada pelos processos de anabolismo lipídico e catabolismo. Para desvendar o mecanismo subjacente ao papel protetor de Andro contra a esteatose, analisamos o perfil transcricional de genes selecionados do metabolismo lipídico em células LO2 tratadas com ácido oleico. Como mostrado na Fig. 4a, em relação ao anabolismo lipídico, o tratamento com Andro reduziu a expressão dos principais fatores adipogênicos *PPAR γ* e proteína de ligação ao elemento regulador de esteróis 1c (*SREBP-1c*) na ausência de ácido oleico. *SREBP-1c*, mas não *PPAR γ* , também foi diminuído por Andro após o tratamento com ácido oleico.

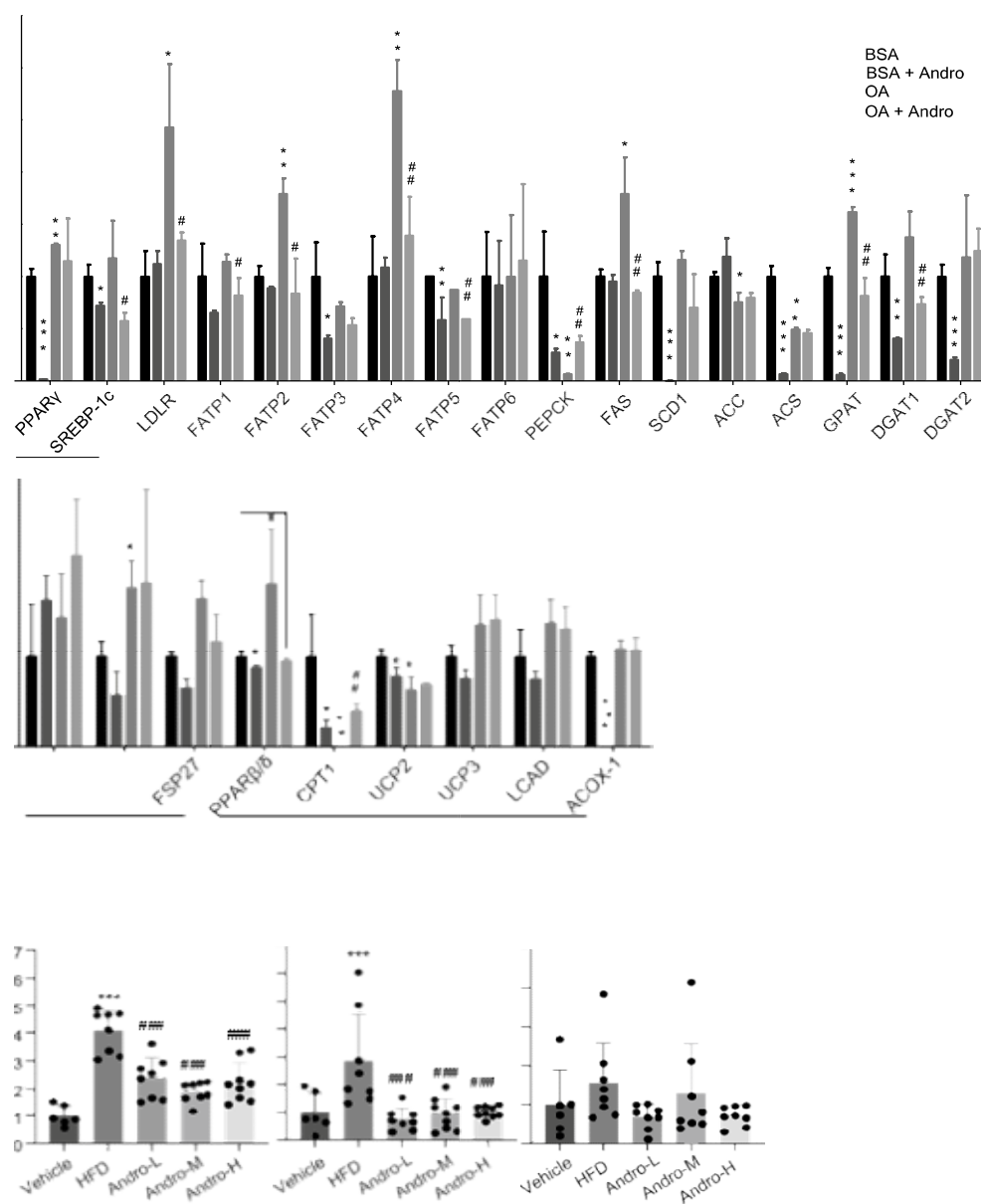
Para a captação de colesterol/ácidos graxos, o ácido oleico elevou a expressão do receptor de lipoproteína de baixa densidade (*LDLR*), proteína de transporte de ácidos graxos 2 (*FATP2*) e *FATP4*, enquanto o Andro diminuiu as elevações. Andro também suprimiu *FATP3* e *FATP5* em LO2 sem tratamento com ácido oleico, embora ambos os genes não tenham sido regulados positivamente pelo ácido oleico. A *FATP5* foi reduzida por Andro no grupo de tratamento com ácido oleico. Em termos de gliceroneogênese e síntese de ácidos graxos, a transcrição de fosfoenolpiruvato carboxiquinase (*PEPCK*), estearoil-coenzima A dessaturase 1 (*SCD1*) e acetil-CoA sintetase (*ACS*) foi diminuída pelo tratamento com Andro sem ácido oleico, embora tal redução não tenha ocorrido na presença de ácido oleico.

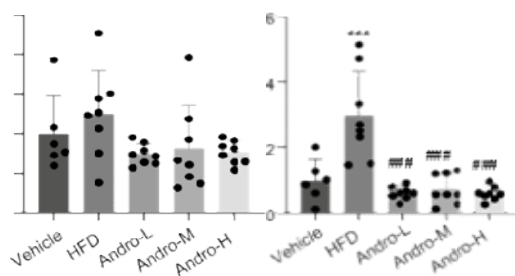
No entanto, a expressão da enzima limitante da taxa, ácido graxo sintase (*FAS*), foi significativamente aumentada pelo ácido oleico, mas reduzida pelo Andro. Para o processo de lipogênese ou síntese de triglicerídeos, o tratamento com Andro diminuiu significativamente a expressão de glicerol-3-fosfato aciltransferase (*GPAT*), diacilglicerol aciltransferase-1 (*DGAT1*) e

DGAT2 na ausência de ácido oleico. Andro também reduziu significativamente a expressão de *GPAT* e *DGAT1* em células LO2 tratadas com ácido oleico.

Curiosamente, a maioria dos genes-chave relacionados ao catabolismo lipídico, incluindo lipólise e β -oxidação de ácidos graxos a jusante, foram fracamente alterados pelo tratamento com Andro, conforme mostrado na Fig. 4b. Vários genes, incluindo *PPAR β / δ* , proteína uncoupling 2 (*UCP-2*) e acil-CoA oxidase 1 (*ACOX-1*) foram reduzidos pelo tratamento com Andro.

Uma exceção foi a carnitina palmitoiltransferase 1 (*CPT1*), cuja expressão foi reduzida por Andro na ausência de ácido oleico, mas significativamente aumentada por Andro na presença de ácido oleico (Fig. 4b). Portanto, a análise do perfil transcricional sugeriu que o Andro atenua predominantemente o anabolismo, mas influencia fracamente o catabolismo dos lipídios para reduzir o acúmulo de lipídios nas células hepáticas.





◀ Fig. 4 Andro regulou diferencialmente a expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico . As células a, b LO2 foram tratadas com ácido oleico ou seu veículo (BSA) em combinação com ou sem 20 μ M de Andro por 24 h. RT-PCR foi realizado para quantificar a expressão relativa de genes indicados associados ao anabolismo lipídico (a) e catabolismo (b), respectivamente. Cada tratamento foi realizado em triplicatas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus BSA. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,01$ versus OA. c-g RT-PCR para quantificar a expressão relativa de FATP1 a 5 em tecidos hepáticos de camundongos com tratamentos indicados. Cada ponto representa um animal. $p < 0,001$ versus veículo. ### $p < 0,001$ contra HFD. OA, ácido oleico

2.4 O Tratamento com Andro Reduziu a Expressão de FATPs Hepáticas em Camundongos Alimentados com HFD

Foi relatado que o Andro suprime a expressão de genes relacionados à síntese de ácidos graxos e triglicerídeos [14]. Uma observação interessante no presente estudo é que Andro também apresenta uma ampla supressão transcricional da família de genes FATP em células LO2 tratadas com ácido oleico (*FATP1*, *FATP2*, *FATP4* e *FATP5* na Fig. 4uma). Portanto, os FATPs podem desempenhar um papel na modulação do acúmulo de lipídios nas células hepáticas por Andro. Em seguida, analisamos a expressão de FATPs em tecidos hepáticos de camundongos tratados com Andro.

Como mostrado na Fig. 4c-g, RT-PCR revelou um aumento da expressão de *FATP1*, *FATP2* e *FATP5* no fígado de camundongos alimentados com HFD, e os aumentos foram novamente reduzidos por Andro. Andro também reduziu ligeiramente a expressão de *FATP3* e *FATP4* em camundongos alimentados com HFD tratados com a dose baixa e alta de Andro, apesar de não haver significância estatística. Em contraste com o resultado em LO2, *FATP6* não foi detectado por RT-PCR no tecido hepático (dados não mostrados).

2.5 A Supressão de FATP2 é Essencial para o efeito Anti-Esteatose de Andro

Os perfis de expressão de FATPs in vivo e in vitro mostraram que *FATP2* foi o único membro da família FATP que demonstrou expressão consistentemente aumentada no fígado de camundongos alimentados com HFD e células LO2 tratadas com ácido oleico. Esse aumento da expressão de *FATP2* foi reduzido pelo tratamento com Andro (Fig. 4). Portanto, levantamos a hipótese de que o *FATP2* poderia ser um gene-chave reduzido por Andro para suprimir a importação/captação de ácidos graxos e o acúmulo de lipídios nos hepatócitos.

A análise da expressão da proteína por western blot mostrou que, consistente com sua expressão de mRNA, o *FATP2* foi aumentado tanto nas células LO2 tratadas com ácido oleico quanto nos tecidos

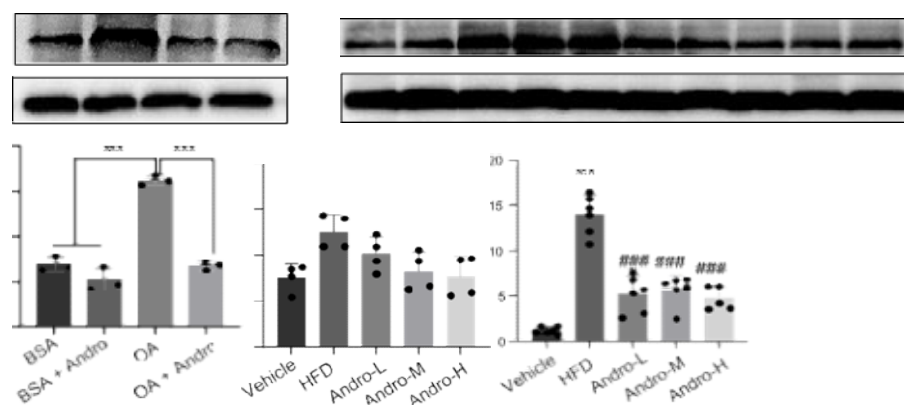
hepáticos de camundongos alimentados com HFD, e foi reduzido pelo tratamento com Andro (Fig. 5A-D). Consequentemente, a imunomarcação de FATP2 em seções hepáticas também mostrou resultados semelhantes (Fig. 5e, f).

Para confirmar ainda mais o significado funcional da regulação negativa do FATP2 no efeito protetor do Andro contra o acúmulo de lipídios nos hepatócitos. FATP2 foi superexpresso em células LO2 pela transfecção de um vetor pLVX-FATP2 que abriga a sequência de codificação FATP2 conduzida pelo promotor CMV. A transfecção de pLVX-FATP2 causou superexpressão robusta de FATP2 em células LO2, conforme revelado por western blot (Fig. 6uma). Em células tratadas com ácido oleico, a superexpressão de FATP2 aboliu o efeito hipolipemiante de Andro, conforme demonstrado pela coloração Oil Red O (Fig. 7b). Também é interessante descobrir que a superexpressão de FATP2 sozinha também resultou em um acúmulo de lipídios fracamente aumentado sem a indução do ácido oleico (Fig. 7b).

2.6 Andro Reduziu a Captação de Ácidos Graxos em Células LO2 tratadas com á=Ácido Oleico, que foi Abolida pela Superexpressão de FATP2

Os FATPs medeiam a importação de ácidos graxos do ambiente extracelular. Em seguida, realizamos o ensaio fluorométrico de captação de ácidos graxos para testar se o tratamento com Andro poderia influenciar a captação de ácidos graxos por meio da regulação do FATP2. O substrato de ácido graxo marcado com corante fluorescente incorporado foi verificado pelo microscópio fluorescente (Fig. 7a) ou quantificado por citometria de fluxo (Fig. 7b).

Nas células de controle tratadas com BSA, o Andro não teve influência significativa na absorção de ácidos graxos. As células LO2 tratadas com ácido oleico apresentaram um aumento significativo na absorção de ácidos graxos (191% do grupo BSA), que foi reduzida pelo tratamento com Andro (85% do grupo ácido oleico sozinho). É importante ressaltar que a superexpressão de FATP2 por transfecção de plasmídeo aboliu completamente a supressão da captação de ácidos graxos prestada por Andro (150% do ácido oleico mais o grupo Andro). Além disso, a superexpressão de FATP2 também causou um ligeiro aumento na captação de ácidos graxos em células LO2 tratadas com BSA. Tomados em conjunto, esses achados demonstraram que o tratamento com Andro reduz a esteatose, pelo menos parcialmente, suprimindo a importação de ácidos graxos mediados por FATP2 (ver Fig. 8).



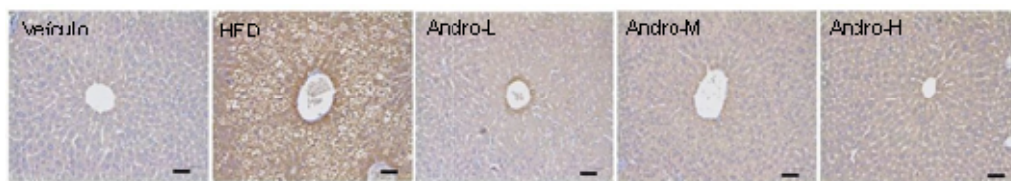


Fig. 5 FATP2 foi suprimido pelo tratamento com Andro in vivo e in vitro. **a** As células LO2 foram tratadas com OA ou veículo conjugado com BSA 0,5 mM (BSA) em combinação com ou sem 20 μ M de Andro por 48 h. O nível de proteína FATP2 foi determinado por western blot. **b** Quantificação de (**a**). $n = 3$ para cada tratamento. *** $p < 0,001$. **c-f** O

2. DISCUSSÃO

A esteatose hepática é a característica comum da DHGNA e altamente relacionada à ocorrência e progressão da síndrome metabólica, diabetes e distúrbios cardiovasculares [1]. Neste estudo, demonstramos que o extrato natural de ervas Andro reduziu a obesidade, hiperglicemia hiperinsulinemia e hiperlipidemia induzidas por HFD e melhorou a resistência à insulina e a intolerância à glicose. Histologicamente, o tratamento com Andro aliviou a deposição lipídica hepática ou esteatose nos camundongos alimentados com HFD e nas células LO2 tratadas com ácido oleico.

O nível de proteína de FATP2 nos tecidos hepáticos dos grupos de camundongos indicados foi verificado por western blot (**c, d**) e imuno-histoquímica (**e, f**). **d, f** Quantificação de (**c, e**), respectivamente. Cada ponto em (**d, f**) representa um animal. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ versus veículo. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ contra HFD. A barra de escala em **e** é de 50 μm . OA, ácido oleico

Essas observações estão alinhadas com o estudo anterior e confirmam ainda mais o valor clínico do Andro no tratamento de distúrbios associados à síndrome metabólica [14, 16]. O conteúdo lipídico intracelular é uma leitura combinada orquestrada pela captação de lipídios, lipogênese, lipólise e oxidação de ácidos graxos. SREBP-1c é o regulador mestre da síntese de ácidos graxos [3].

Nas células LO2 tratadas com ácido oleico neste estudo, o tratamento com Andro prejudicou significativamente a expressão de SREBP-1c e FAS, este último foi o gene limitante da taxa de síntese de ácidos graxos. Por outro lado, o PPAR γ é o principal fator que promove a diferenciação dos adipócitos, a captação de ácidos graxos e a síntese de triglicerídeos [17]. Neste estudo, embora Andro não tenha suprimido a expressão de PPAR γ em células LO2 tratadas com ácido oleico, a expressão de enzimas-chave (GPAT e DGAT1) na síntese de triglicerídeos foi suprimida.

A supressão da síntese de ácidos graxos e triglicerídeos por Andro está de acordo com o relatório anterior [14]. A família FATP consiste em 6 membros, FATP1 a 6, que são responsáveis pela captação de ácidos graxos do espaço extracelular em vários tecidos [18]. As FATPs mostram expressão diferencial no fígado e desempenham papéis importantes no metabolismo lipídico hepático [3]. A descoberta mais significativa e inovadora neste estudo foi que o Andro suprimiu a expressão de vários membros de FATPs em células LO2 tratadas com ácido oleico e no fígado de camundongos alimentados com HFD. Consistentemente, a captação de ácidos graxos celulares também foi impedida por Andro in vitro. Dentre esses FATPs, demonstramos que a supressão de FATP2 estava funcionalmente envolvida no efeito anti-esteatose de Andro pelo estudo de ganho de função com superexpressão de FATP2. No entanto, uma coisa digna de nota é que tanto o FATP2 quanto o FATP5 são abundantemente expressos no fígado para facilitar a captação de ácidos graxos e o desenvolvimento de esteatose hepática [18].

A deleção ou silêncio de FATP2 ou FATP5 reduz o conteúdo hepático de triglicerídeos e melhora a esteatose induzida por dieta em camundongos [19-21]. Embora tenhamos focado apenas no

FATP2 no estudo funcional profundo em células LO2 tratadas com Andro, considerando a expressão extremamente baixa de FATP5 (valor Ct superior a 30), o papel potencial de FATP5 no efeito anti-esteatose hepática de Andro não deve ser excluído, pois o tratamento com Andro também suprimiu robustamente a expressão de FATP5 no tecido hepático de camundongos alimentados com HFD (Fig. 4g).

Além disso, a supressão significativa de FATP1 também foi observada em camundongos alimentados com HFD tratados com Andro (Fig. 4c). Como não há estudo funcional de FATP1 no metabolismo lipídico hepático, o significado biológico de tal supressão por Andro na proteção da esteatose hepática ainda precisa ser esclarecido no estudo futuro.

No que diz respeito ao catabolismo lipídico, o PPAR β/δ medeia a ativação da β -oxidação de ácidos graxos e promove o gasto de energia [17, 22]. Neste experimento, o tratamento Andro suprimiu a expressão de PPAR β/δ , mas não afetou a expressão de genes a jusante envolvidos na oxidação β de ácidos graxos, exceto CPT1 em células LO2 tratadas com ácido oleico. Simultaneamente, os genes envolvidos na lipólise não foram afetados pelo Andro (Fig. 4b). Esses dados sugeriram que o Andro executou seu efeito anti-esteatose principalmente suprimindo o anabolismo lipídico, mas não o catabolismo. Deve-se enfatizar que apenas testamos a expressão de genes aqui sem confirmação de seus níveis de proteína. De fato, foi relatado que o Andro promoveu a β -oxidação de ácidos graxos no tecido adiposo marrom (BAT) de camundongos alimentados com HFD [14]. Portanto, o excesso de calorías derivado do HFD pode ser consumido pelo BAT, que também pode ser responsável pela melhora da dislipidemia e da síndrome metabólica.

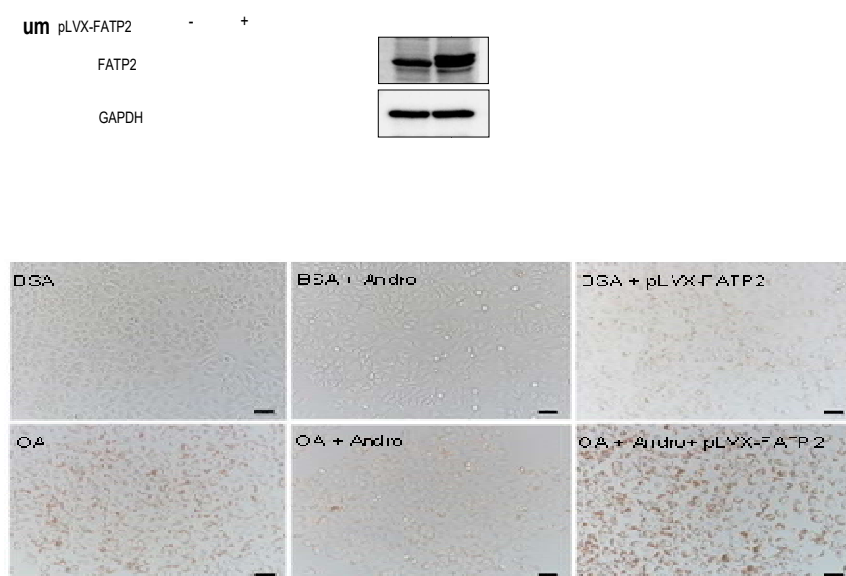


Fig. 6 A superexpressão de FATP2 aboliu o efeito anti-esteatose por Andro. **a** As células LO2 foram transfectadas com pLVX-FATP2 por 48 h, seguidas da determinação da expressão de FATP2 por western blot. **b** As células LO2 foram transfectadas com ou sem pLVX-FATP2 seguidas de tratamento com os reagentes indicados por 48 h. A coloração Oil Red O foi realizada para mostrar gotículas lipídicas intracelulares. Barra de escala, 50 μ m. OA, ácido oleico

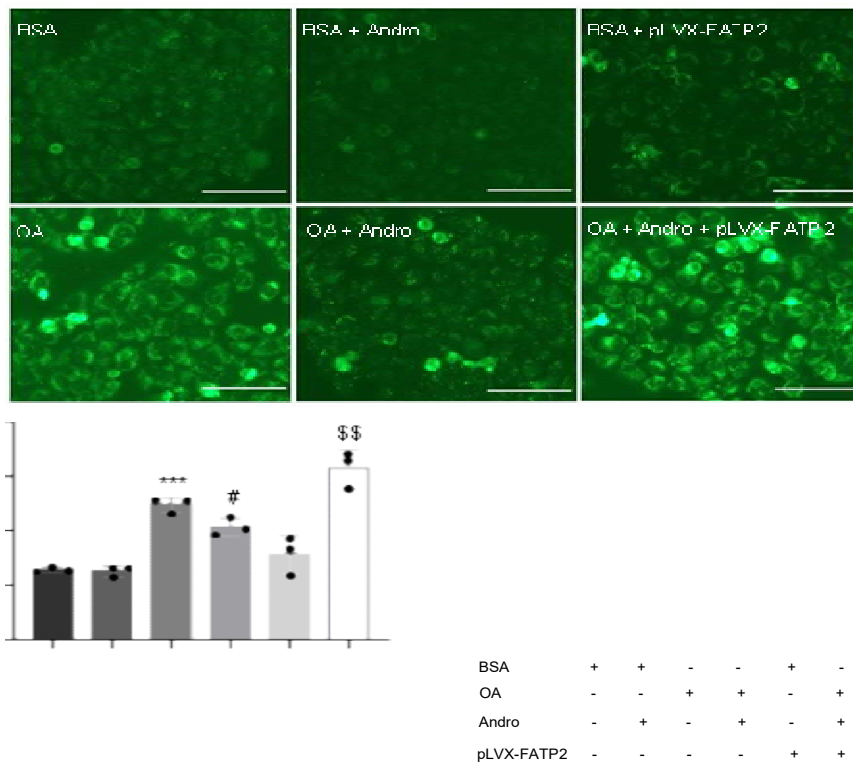


Fig. 7 Andro suprimiu o efeito de OA na absorção de ácidos graxos.

Absorção de ácidos graxos induzida por ácido oleico que foi abolida pela superexpressão de FATP2. **a** As células LO2 foram transfectadas com ou sem plasmídeo pLVX-FATP2 seguido de tratamento com reagentes indicados. A captação de ácidos graxos foi monitorada incubando as células com ácido graxo marcado com corante fluorescente e verificada com um microscópio fluorescente. A barra de escala é de 50 μ m. **b** Análise por citometria de fluxo para quantificar a fluorescência incorporada do ácido graxo marcado com corante. Cada tratamento foi realizado em triplicatas. $p < 0,001$ versus grupo BSA. $\#p < 0,05$ versus grupo OA. $\$p < 0,01$ contra o grupo OA + Andro. OA, ácido oleico

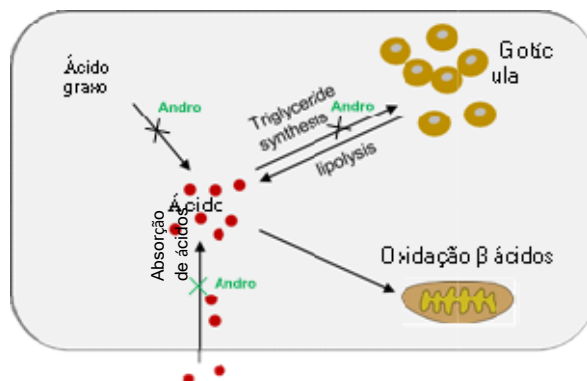


Fig. 8 Gráfico esquemático para resumir o mecanismo anti-esteatose de Andro em células hepáticas. O Andro executa seu efeito anti-esteatose não apenas suprimindo a síntese de ácidos graxos e triglicerídeos de novo, conforme relatado anteriormente (indicado pelas cruzes pretas), mas também atenuando a absorção de ácidos graxos visando os FATPs, conforme demonstrado neste estudo (indicado pela cruz verde).

3. CONCLUSÕES

Coletivamente, este estudo revelou a nova atividade de Andro para suprimir a importação de ácidos graxos mediada por FATP2, que pode atuar sinergicamente com a redução da síntese de ácidos graxos e lipogênese, resultando em esteatose hepática atenuada. No entanto, como Andro regula a expressão de FATP2 na esteatose ainda precisa ser abordada em trabalhos futuros. Além disso, nossos

resultados também sugerem que Andro pode ter uma ampla supressão em membros da família FATP na esteatose, embora apenas FATP2 seja selecionado para a validação funcional neste estudo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Experiência Animal

Camundongos C57BL/6 J machos com 8 semanas de idade foram adquiridos da SPF Biotechnology Co., Ltd (Pequim, China) e mantidos em uma instalação específica livre de patógenos com um ciclo claro/escuro de 12/12 h. Os camundongos foram divididos aleatoriamente nos seguintes 6 grupos: grupos Controle, HFD, Andro-L, Andro-M, Andro-H e PIO, com cada grupo contendo 10 animais. Os camundongos dos grupos HFD, Andro-L, Andro-M, Andro-H e PIO receberam o HFD por 16 semanas, enquanto os camundongos do grupo controle foram tratados com ração normal para roedores. Nas últimas 8 semanas, camundongos dos grupos Andro-L, Andro-M e Andro-H foram administrados por gavagem com 50, 100 e 200 mg/kg/dia de Andro (dissolvido em carboximetilcelulose sódica (viscosidade 800–1200, Solar-bio, cat# C8621, China), respectivamente.

Ratos no controle e Os grupos HFD receberam administração do veículo por gavagem. Como controle positivo, os camundongos do grupo PIO receberam 1,2 mg/kg/dia de pioglitazona por sonda gástrica. Todos os animais tiveram livre acesso a comida e água durante o experimento. Ao final do experimento, os camundongos foram mantidos em jejum por 12 h com livre acesso à água, seguido de anestesia com pentobarbital sódico e luxação cervical. O sangue foi coletado para isolamento sérico. O tecido hepático foi colhido e armazenado a -80 °C para o isolamento de RNA e proteína. Parte do tecido hepático foi fixada em formaldeído neutro a 4% por 24 h, seguida de inclusão em parafina para histologia. Todas as manipulações de animais estavam em conformidade com os regulamentos emitidos e aprovados pelo comitê de ética experimental animal da Southwest Medical University (aprovação nº 20211103–001).

5.2 Teste Oral de Tolerância à Glicose - TOTG

Para determinar o TOTG, os camundongos foram mantidos em jejum por 12 h, seguidos pela entrega de 2 g/kg de glicose por gavagem. O nível de glicose no sangue da ponta da cauda foi determinado nos momentos de 0, 30, 60, 90 e 120 min, respectivamente, por um medidor de glicose portátil (Yuwell, China).

5.3 Teste de Tolerância à Insulina Intraperitoneal - IPITT

Para determinar o IPITT, os camundongos foram mantidos em jejum por 12 h seguidos de injeção intraperitoneal de 0,5 U/kg de insulina. O nível de glicose no sangue foi monitorado conforme acima.

5.4 Bioquímica do Sangue

Os níveis séricos de triglicerídeos totais (TG) e colesterol total (CT) foram determinados pelo analisador bioquímico automático (Mindray, China).

5.5 Elisa

A insulina sérica foi determinada com o kit ELISA de isolamento de camundongo (Zci-Bio, cat# ZC-38920, China). O peptídeo C sérico foi verificado pelo kit ELISA de peptídeo C de camundongo (Zci-Bio, cat# ZC-37771, China). O nível de HbA1c no sangue foi quantificado pelo kit de HbA1c ESLIA de camundongo (Zci-Bio, cat# ZC-38711, China).

5.6 Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE)

O tecido embebido em parafina foi seccionado a 4 μ m, seguido de desparafinação em xileno e reidratação em etanol gradiente. A coloração HE foi realizada com o Kit de Coloração HE (Beyotime, cat# C0105, China) de acordo com a instrução do fabricante. As imagens foram tiradas com um microscópio óptico (Leica, ICC50W, Alemanha).

5.7 Imuno-Histoquímica - IHQ

A secção hepática reidratada foi submetida à recuperação de antígeno mediada por micro-ondas em ácido cítrico 10 mM (pH 6,0) por 10 min. A atividade da peroxidase endógena foi apagada em H₂O₂ a 3% por 15 min. Após o bloqueio com 2,5% de BSA, a seção foi incubada com anticorpo anti-FATP2 de coelho (1:100, Proteintech, cat# 14,048-1-AP, EUA) a 4 °C durante a noite. Em seguida, a seção foi lavada com PBS e incubada com IgG anti-coelho caprino (polímero HRP, ZSGB-Bio, cat# PV-6001, China) em RT por 20 min. Após a lavagem com PBS, a cromogênese foi realizada em solução de DAB, seguida de coloração do núcleo com hematoxilina. Após a montagem em balsam neutro, as imagens foram tiradas conforme descrito acima.

5.8 Preparação de Albumina de Soro Bovino (BSA) — Ácido Oleico Conjugado

Para fazer o ácido oleico conjugado com BSA, 19 μ L de ácido oleico (Sigma, cat# O1383, EUA) foram adicionados em 3 mL de NaOH 0,1 M seguidos de incubação a 75 °C por 20 min. Misture a solução de ácido oleico com 3 mL de solução BSA (Solarbio, cat# A88505, China) sem gordura a 20% (em PBS) e incube em RT por 30 min. Em seguida, a mistura BSA-ácido oleico com uma concentração final de ácido oleico de 10 mM foi filtrada através de um Filtro de 0,4 μ m e armazenado a 4 °C em alíquotas.

5.9 Cultura Celular e CCK8

A linhagem celular LO2 foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC) e cultivada em meio RPMI 1640 (Gibco, cat# 11,875,119, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, PAN-Biotech, cat# ST30-3302, Alemanha) e 1% de solução de penicilina-estreptomicina (Beyotime, cat# C0222, China) a 37 °C com 5% de CO₂ e 100% de umidade. Andro foi dissolvido em DMSO como uma solução estoque de 64 mM e diluído na concentração indicada com meio de cultura.

Para o ensaio CCK8, as células LO2 foram semeadas em uma placa de 96 poços com 20 \times 103 células cada poço. No dia seguinte, o meio fresco contendo as concentrações indicadas de Andro foi

suplementado seguido de incubação por 24 h. Em seguida, o meio foi substituído por meio basal sem soro contendo 10% de reagente CCK8 (Dojindo, cat# CK04, China).

Após incubação por 4 h, a absorbância óptica no comprimento de onda de 450 nm foi determinada com o leitor de microplacas multifuncional (BioTeck, Synergy 2, EUA). Para analisar a influência de Andro no acúmulo de lipídios induzido pelo ácido oleico, as células LO2 foram incubadas com ácido oleico conjugado com BSA 0,5 mM junto com ou sem concentrações indicadas de Andro por 48 h, seguidas de coloração com Oil Red O ou análise da expressão de RNA e proteína.

5.10 Coloração O Vermelho Óleo

Para a coloração Oil Red O no tecido hepático, a secção do criostato foi realizada a 10 µm para o tecido hepático fresco embebido no composto OCT. O corte foi fixado em paraformaldeído a 4% por 10 min e lavado em água destilada 2 vezes por 10 min de cada vez. Em seguida, a coloração Oil Red O foi realizada com o Kit de Coloração Oil Red O Modificado (Beyotime, cat# C0158, China) de acordo com as instruções do fabricante. Para a coloração com Oil Red O nas células, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 10 min, seguidas de lavagem com PBS. A coloração Oil Red O foi realizada conforme descrito acima.

5.11 RT-PCR

O RNA total foi isolado das células ou tecidos hepáticos com o reagente Trizol (CWBio, cat# CW0580, China). O cDNA foi sintetizado com o Kit de Síntese de cDNA HiFiScript (CWBio, cat# CW2569, China). A RT-PCR foi realizada com a mistura UltraSYBR (CWBio, cat# CW0957, China). A expressão gênica foi normalizada para GAPDH. Os primários usados no RT-PCR são detalhados na Tabela S1.

5.12 Western Blot

A proteína total foi isolada de células LO2 ou tecidos hepáticos com tampão de lise RIPA. A concentração de proteína foi quantificada com o BCA Protein Assay Kit (Beyotime, P0012, China). A proteína de 30 µg foi separada em gel SDS-PAGE a 10% e transferida para a membrana de PVDF. Após o bloqueio com albumina sérica bovina (BSA) a 5%, a membrana foi incubada com anticorpo primário a 4 °C durante a noite, seguida de lavagem com TBST. A incubação de anticorpos secundários conjugados com HRP foi realizada à temperatura ambiente (TR) por 1 h.

Os sinais foram desenvolvidos com o kit de detecção ECL (Solarbio, cat# PE0010, China) e detectados pelo sistema Chemi-Scope 600 Exp (ClinX, China). Os anticorpos usados no western blot incluem coelho anti-FATP2 (1:1000, Protein-tech, cat# 14,048-1-AP, EUA), coelho anti-GAPDH (CST, cat# 1574, EUA) e cabra conjugada com HRP anti-coelho IgG (ZSGB-Bio, cat# ZB2301,

China). O valor de cinza da banda da proteína foi quantificado com o software ImageLab 6.0 (Bio-Rad, EUA).

5.13 Construção e Transfecção de Plasmídeo

O DNA murino de FATP2 foi amplificado com primers listados na Tabela S1 e clonado no vetor pLVX sob o promotor do citomegalovírus humano (CMV) para obter o plasmídeo de superexpressão pLVX-FATP2. O plasmídeo foi preparado com o EndoFree Plasmid Mini Kit (CWBio, cat# CW2106S, China) e transfectado em células LO2 com o Reagente de Transfecção ViaFect™ (Promega, cat# E4981, EUA).

5.14 Ensaio de Captação de Ácidos Graxos


A capacidade de absorção de ácidos graxos das células LO2 foi determinada pelo Screen Quest™ Fluorimetric Fatty Acid Uptake Assay Kit (AAT Bioquest, cat# 36,385, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as células LO2 foram semeadas na placa de 96 poços com 20×10^3 células cada poço.

No dia seguinte, as células foram transfectadas com ou sem plasmídeo pLVX-FATP2 de 100 ng, conforme descrito acima. 24 h depois, as células foram tratadas com ácido oleico conjugado com BSA 0,5 mM ou BSA junto com ou sem 20 μ M de Andro por mais 24 h. Em seguida, o meio foi substituído por meio sem soro por 1 h, seguido pela adição de 100 μ L de substrato de ácido graxo fluorescente por mais 1 h. A intensidade de fluorescência celular foi monitorada em microscópio fluorescente (EVOS FL Auto Cell Imaging System, Invitrogen, EUA) ou quantificada por análise de citometria de fluxo (BD Canto II, EUA) com o canal FITC após a digestão da tripsina.


5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram apresentados como média \pm DP. Para análise estatística, utilizou-se o software SPSS 16.0. A ANOVA de uma via seguida do teste LSD foi aplicada para comparação entre vários grupos. Os gráficos foram gerados no software Graphpad Prism 5. $p < 0,05$ é considerado estatisticamente significativo.

Informações suplementares A versão on-line contém material complementar disponível em <https://doi.org/10.1007/s11418-022-01647-w>.

 **Agradecimentos** Este estudo foi apoiado pelo Fundo de Ciência e Tecnologia, Departamento da Província de Sichuan (2022YFS0407), Subsídio Conjunto da Universidade Médica do Sudoeste de Luzhou (2018LZXNYD-YL07), Fundo Especial de Talentos de Alto Nível da Universidade Médica do Sudoeste (0903-00040056), Fundo de Pesquisa da Universidade Médica do Sudoeste (2016-4 e 2017-ZRQN-124), Fundo de Pesquisa do Hospital de


Medicina Tradicional Afilado da Universidade Médica do Sudoeste (2018-6), e o Fundo de Pesquisa Inovadora de Estudantes Universitários (S202110632205 e 2021205).

 **Contribuições dos autores** CYZ e HLW projetaram o estudo que foi supervisionado por CC. LSR, YZW, XQL, HMZ e YWG realizaram os experimentos. LSR, HLW, LJW, CMZ e YM analisaram os dados. LSR e HLW escreveram o manuscrito. RX, YLL, SHL, XW e LW revisaram o manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito.

 **Financiamento** Acesso Aberto financiamento habilitado e organizado pelo CAUL e suas Instituições Membros.

❖ **DECLARAÇÕES**

 **Conflito de Interesse** Os autores não têm conflitos de interesse.

 **Acesso Aberto** Este artigo está licenciado sob uma Licença Creative Commons Attribution 4.0 International, que permite o uso, compartilhamento, adaptação, distribuição e reprodução em qualquer meio ou formato, desde que você dê o devido crédito ao(s) autor(es) original(is) e à fonte, forneça um link para a licença Creative Commons e indique se foram feitas alterações. As imagens ou outro material de terceiros neste artigo estão incluídos na licença Creative Commons do artigo, salvo indicação em contrário em uma linha de crédito para o material. Se o material não estiver incluído na licença Creative Commons do artigo e o uso pretendido não for permitido por regulamentação legal ou exceder o uso permitido, você precisará obter permissão diretamente do detentor dos direitos autorais. Para ver uma cópia desta licença, visite <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

6. REFERÊNCIAS

1. Huang DQ, El-Serag HB, Loomba R (2021) **Epidemiologia global do CHC relacionado à DHGNA: tendências, previsões, fatores de risco e prevenção.** Nat Rev Gastroenterol Hepatol 18:223–238. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00381-6>
2. Mundi MS, Velapati S, Patel J, Kellogg TA, Abu Dayyeh BK, Hurt RT (2020) **Evolução da DHGNA e sua gestão.** Nutr Clin Pract 35: 72–84. <https://doi.org/10.1002/ncp.10449>

3. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P (2018) **Mecanismos moleculares de acúmulo de lípidios hepáticos na doença hepática gordurosa não alcoólica.** *Célula Mol Life Sci* 75:3313–3327. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2860-6>
4. Kumar G, Singh D, Tali JA, Dheer D, Shankar R (2020) **Andro-grapholide: modificação química e seu efeito nas atividades biológicas.** *Bioorg Chem* 95:103511. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103511>
5. Gao J, Peng S, Shan X, Deng G, Shen L, Sun J, Jiang C, Yang X, Chang Z, Sun X, Feng F et al (2019) **A inibição da piroptose mediada por inflamassoma AIM2 por Andrographolide contribui para a melhora da inflamação pulmonar induzida por radiação e fibrose.** *Morte Celular Dis* 10:957. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2195-8>
6. Peng S, Hang N, Liu W, Guo W, Jiang C, Yang X, Xu Q, Sun Y (2016) **O sulfonato de andrographolide melhora a lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeos em camundongos pela regulação negativa das vias MAPK e NF-kappaB.** *Acta Pharm Sin B* 6: 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.002>
7. Qu J, Liu Q, You G, Ye L, Jin Y, Kong L, Guo W, Xu Q, Sun Y (2022) **Avanços na melhora de doenças inflamatórias e cânceres por andrographolide: farmacocinética, farmacodinâmica e perspectiva.** *Med Res Rev* 42:1147–1178. <https://doi.org/10.1002/med.21873>
8. Calabrese C, Berman SH, Babish JG, Ma X, Shinto L, Dorr M, Wells K, Wenner CA, Standish LJ (2000) **Um estudo de fase I de andro-grapholide em pacientes HIV positivos e voluntários normais.** *Phyto-ther Res* 14: 333–338. [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200008\)14:5%3c333::aid-pt584%3e3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200008)14:5%3c333::aid-pt584%3e3.0.co;2-d)
9. Arifullah M, Namsa ND, Mandal M, Chiruvella KK, Vikrama P, Gopal GR (2013) **Avaliação do potencial antibacteriano e antioxidante de andrographolide e equidininina isolados da cultura de cálcio de *Andrographis paniculata* Nees.** *Asiático Pac J Trop Biomed* 3: 604–610. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60123-9](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60123-9) (discussão 609-610)
10. Yang S, Evens AM, Prachand S, Singh AT, Bhalla S, David K, Gordon LI (2010) **Apoptose mediada por mitocôndrias em células de linfócito pelo diterpenóide lactona andrographolide, o componente ativo de *Andrographis paniculata*.** *Clin Cancer Res* 16: 4755–4768. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0883>
11. Zhou J, Hu SE, Tan SH, Cao R, Chen Y, Xia D, Zhu X, Yang XF, Ong CN, Shen HM (2012) **Andrographolide sensibiliza a apoptose induzida por cisplatina por meio da supressão da fusão autofagossomo-lisossomo em células cancerígenas humanas.** *Autofagia* 8: 338–349. <https://doi.org/10.4161/auto.18721>

12. Handa SS, Sharma A (1990) **Atividade hepatoprotetora do andrografólido de *Andrographis paniculata* contra a tetracolorida de carbono.** Indian J Med Res 92: 276–283
13. Cabrera D, Wree A, Povero D, Solis N, Hernandez A, Pizarro M, Moshage H, Torres J, Feldstein AE, Cabello-Verrugio C, Brandan E et al (2017) **O andrographolide melhora a inflamação e a fibrogênese e atenua a ativação do inflamassoma na esteato-hepatite não alcoólica experimental.** Sci Rep 7:3491. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03675-z>
14. Ding L, Li J, Song B, Xiao X, Huang W, Zhang B, Tang X, Qi M, Yang Q, Yang Q, Yang L et al (2014) **Andrographolide previne a obesidade induzida por dieta rica em gordura em camundongos C57BL / 6, suprimindo a via da proteína de ligação ao elemento regulador de esteróis.** J Pharmacol Exp Ther 351: 474–483. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.217968>
15. Hsiao PJ, Chiou HC, Jiang HJ, Lee MY, Hsieh TJ, Kuo KK (2017) **A pioglitazone aumenta a lipólise citosólica, a beta-oxidação e a autofagia para melhorar a esteatose hepática.** Sci Rep 7:9030. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09702-3>
16. Toppo E, Darvin SS, Esakkimuthu S, Nayak MK, Balakrishna K, Sivasankaran K, Pandikumar P, Ignacimuthu S, Al-Dhabi NA (2017) **Efeito de dois derivados de andrographolide em modelos celulares e de roedores de doença hepática gordurosa não alcoólica.** Biomed Pharmacother 95:402–411. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.071>
17. Gross B, Pawlak M, Lefebvre P, Staels B (2017) **PPARs em DM2 induzido por obesidade, dislipidemia e DHGNA.** Nat Rev Endocrinol 13: 36–49. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.135>
18. Koo SH (2013) **Doença hepática gordurosa não alcoólica: mecanismos moleculares para a esteatose hepática.** Clin Mol Hepatol 19: 210–215. <https://doi.org/10.3350/cmh.2013.19.3.210>
19. Doege H, Baillie RA, Ortegon AM, Tsang B, Wu Q, Punreddy S, Hirsch D, Watson N, Gimeno RE, Stahl A (2006) **A deleção direcionada de FATP5 revela múltiplas funções no metabolismo hepático: alterações na homeostase lipídica hepática.** Gastroenterologia 130:1245–1258. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.02.006>
20. Doege H, Grimm D, Falcon A, Tsang B, Storm TA, Xu H, Ortegon AM, Kazantzis M, Kay MA, Stahl A (2008) **O silenciamento da proteína 5 transportadora de ácidos graxos hepáticos in vivo reverte a doença hepática do fígado gorduroso não alcoólico induzida pela dieta e melhora a hiperglicemia.** J Biol Chem 283: 22186–22192. <https://doi.org/10.1074/JBC.M803510200>

21. Falcon A, Doege H, Fluit A, Tsang B, Watson N, Kay MA, Stahl A (2010) **FATP2 é um transportador de ácidos graxos hepáticos e acil-CoA sintetase peroxissomal de cadeia muito longa.** Am J Physiol Endocrinol Metab 299: E384-393. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.N00226.2010>
22. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM (2013) **Sinalização PPARgama e metabolismo: o bom, o ruim e o futuro.** Nat Med 19: 557–566. <https://doi.org/10.1038/nm.3159>

Nota do Editor: *A Springer Nature permanece neutra em relação a reivindicações jurisdicionais em mapas publicados e afiliações institucionais.*

AUTORES E AFILIAÇÕES

Li-Sha Ran¹ · Ya-Zeng Wu¹ · Yi-Wen Gan¹ · Hong-Lian Wang² Li-Juan Wu³ Chun-Mei Zheng³ Yao Ming³ · Ran Xiong³ · Yong-Lin Li³ Shi-Hang Lei³ Xue Wang³ Xiao-Qing Lao¹ · Hong-Min Zhang¹ · Li Wang² Chen Chen⁴ · Chang-Ying Zhao^{1,3}

² Centro de Pesquisa de Medicina Integrativa, Hospital de Medicina Tradicional Afiliado da Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China

³ Departamento de Endocrinologia, Hospital de Medicina Tradicional Afiliado da Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China

⁴ Escola de Ciências Biomédicas, Universidade de Queensland, Santa Lúcia, Brisbane 4067, Austrália

Chen Chen chen.chen@uq.edu.au

Chang-Ying Zhao - zhaocy540@163.com

¹ Faculdade de Medicina Chinesa e Ocidental Integrada, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China.

