

分类号:

密级: 否



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

山竹醇调控氧化应激对仔猪肝脏脂肪合成的作用及
机制研究

EFFECT AND MECHANISM OF GARCINOL
REGULATING LIVER LIPOGENESIS IN PIGLETS UNDER
OXIDATIVE STRESS

研究生: 贺琼玉
CANDIDATE: HE QIONGYU

学 号:
STUDENT NO.: 2017302110068

专 业: 动物营养与饲料科学
MAJOR: ANIMAL NUTRITION AND FEED
SCIENCE

导 师: 黄飞若 教授
SUPERVISOR: PROFESSOR HUANG FEIRUO

中国 武汉
WUHAN, CHINA

二〇二〇年六月

JUNE, 2020

华中农业大学硕士学位论文

山竹醇调控氧化应激对仔猪肝脏脂肪合成的作用及 机制研究

**Effect and Mechanism of Garcinol Regulating Liver
Lipogenesis in Piglets Under Oxidative Stress**

研 究 生：贺琼玉

学 号：2017302110068

指 导 教 师：黄飞若 教授

指 导 小 组：石德时 教授

孙铝辉 教授

马立保 副教授

齐智利 副教授

张妮娅 副教授

专业：动物营养与饲料科学

研究方向：猪的营养

获得学位名称：农学硕士

获得学位时间：2020 年 6 月

华中农业大学动物科技学院动物医学院

二〇二〇年六月

目录

摘要.....	i
Abstract.....	iii
缩略语表.....	vi
第一章 文献综述.....	1
1 前言.....	1
2 氧化应激.....	2
2.1 氧化应激与抗氧化系统.....	2
2.2 氧化应激与肝脏脂肪合成.....	3
2.3 氧化应激模型的构建.....	3
3 肝脏脂肪合成的调控因子.....	4
3.1 调控脂肪合成的基因.....	4
3.2 调控脂肪合成的转录因子.....	6
3.3 肝脏脂肪合成与乙酰化修饰.....	8
4 山竹醇.....	10
4.1 山竹醇的抗氧化活性.....	11
4.2 对组蛋白乙酰转移酶 PCAF 的抑制作用.....	11
4.3 山竹醇对脂质合成的调控作用.....	12
5 研究目的与意义.....	12
第二章 山竹醇对氧化应激猪肝脏脂肪合成和 PCAF 表达的影响.....	13
1 前言.....	13
2 材料与方法.....	13
2.1 试验设计与试验动物.....	13
2.2 试验材料.....	13
2.3 试验日粮与饲养管理.....	13
2.4 样品采集与指标测定.....	15
2.5 数据处理与统计分析.....	20
3 结果与分析.....	20
3.1 山竹醇对氧化应激仔猪生长性能的影响.....	20
3.2 山竹醇对氧化应激仔猪血清抗氧化功能的影响.....	21

3.3 山竹醇对氧化应激仔猪肝脏抗氧化功能的影响.....	22
3.4 山竹醇对仔猪肝脏组织形态及脂质沉积的影响.....	23
3.5 山竹醇对氧化应激仔猪血清和肝脏脂质水平的影响.....	24
3.6 山竹醇对氧化应激仔猪肝脏脂肪合成相关基因表达量的影响.....	25
3.7 山竹醇对氧化应激仔猪 PCAF 表达的影响.....	26
4 讨论.....	27
4.1 山竹醇和氧化应激对仔猪生长性能的影响.....	27
4.2 山竹醇对氧化应激仔猪抗氧化功能的影响.....	27
4.3 山竹醇对仔猪肝脏组织形态及脂质沉积的影响.....	28
4.4 山竹醇对氧化应激仔猪肝脏脂肪合成的作用.....	28
5 小结.....	29
第三章 山竹醇调控 PCAF 对猪肝细胞脂肪合成的作用.....	30
1 前言.....	30
2 材料与方法.....	30
2.1 主要溶液及其配制.....	30
2.2 仔猪原代肝细胞分离与培养方法.....	31
2.3 试验处理.....	32
2.4 MTT 法检测细胞活力.....	32
2.5 细胞抗氧化指标检测.....	33
2.6 脂质生成相关基因表达量测定.....	33
2.7 Western Blot 检测蛋白表达量.....	33
2.8 免疫共沉淀.....	34
2.9 数据处理与统计分析.....	34
3 结果与分析.....	34
3.1 仔猪原代肝细胞的形态观察.....	34
3.2 H ₂ O ₂ 处理对肝细胞活力的影响.....	34
3.3 H ₂ O ₂ 处理对肝细胞抗氧化能力的影响.....	35
3.4 山竹醇对肝细胞作用的安全浓度.....	36
3.5 山竹醇对氧化应激状态下肝细胞脂质含量的影响.....	37
3.6 山竹醇对氧化应激状态下肝细胞脂质合成基因表达的影响.....	37

3.7 山竹醇对氧化应激状态下肝细胞 PCAF 表达与 USF-1 乙酰化水平的影响	38
4 讨论	40
4.1 H ₂ O ₂ 处理肝细胞的适宜浓度和时间	40
4.2 山竹醇通过调控 PCAF 调节肝细胞脂质合成的作用机制	40
5 小结	41
第四章 结语	42
1 成果与结论	42
2 创新点	42
3 不足与展望	42
参考文献	43
致 谢	55
附录 研究生在读期间发表的主要论文	56

摘要

在目前的集约化养殖模式下,许多因素会导致仔猪发生氧化应激。猪氧化应激时脂质代谢紊乱,脂肪合成增加,肝脏脂质代谢紊乱造成肝脏负荷加重,影响仔猪生长性能。为研究山竹醇调控氧化应激对仔猪肝脏脂肪合成的作用及机制,本试验通过动物试验和细胞试验进行了探究。选择30头健康状况良好、胎次相近的体重为 $(9.2\pm 0.38\text{kg})$ 的三元(杜 \times 长 \times 大)断奶仔猪,随机分为5个组,分别为对照组、应激组、200 mg/kg山竹醇组、400 mg/kg山竹醇组和 600 mg/kg山竹醇组,每组6个重复,每个重复1头仔猪。预饲喂 7 d后,开始进行正式试验,试验期为 28 d。其中应激组和山竹醇组在试验第15天注射diquat,山竹醇组从试验第 1 d起饲喂山竹醇,直至试验结束。细胞水平上分离仔猪肝细胞,将细胞分为5个组,分别为对照组、应激组、5 μM 山竹醇组、10 μM 山竹醇组和 20 μM 山竹醇组,探究山竹醇调控氧化应激猪肝脏脂肪合成的作用及机理,其中应激组和山竹醇组利用400 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢处理细胞 2 h构建氧化应激模型。主要研究结果如下:

(1) 生长性能和抗氧化指标结果表明:氧化应激组仔猪的平均日增重(ADG)以及平均日采食量(ADFI)显著低于对照组($P < 0.05$),料肉比(F/G)显著高于对照组($P < 0.05$),而山竹醇组的 ADG 和 ADFI 显著高于应激组($P < 0.05$)。诱导氧化应激前,添加山竹醇显著提高了仔猪血清超氧化物歧化酶(SOD)活性以及总抗氧化能力(T-AOC)含量($P < 0.05$);诱导氧化应激后,氧化应激显著降低了血清和肝脏 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性($P < 0.05$),显著增加了丙二醛(MDA)含量($P < 0.05$);日粮添加山竹醇显著提高应激组仔猪血清和肝脏SOD、GSH-Px活性($P < 0.05$),显著降低 MDA 含量($P < 0.05$)。

(2) 脂质含量检测和肝脏组织学结果表明:与对照组相较而言,氧化应激组仔猪肝脏组织结构受到损伤,肝脏内脂质沉积显著增加,且仔猪血清和肝脏内甘油三酯(TG)水平显著增加($P < 0.05$);与应激组相比,山竹醇组的肝脏组织结构有一定程度上的恢复,脂质沉积也显著减少,除此之外仔猪血清和肝脏中甘油三酯(TG)水平显著减少($P < 0.05$)。

(3) 脂肪合成相关基因表达和PCAF基因表达结果显示:与对照组相比,应激组肝脏 *SREBP-1c*、*FAS*、*ACC*、*SCD1* 基因表达量显著上调($P < 0.05$);日粮添加山竹醇 200 mg/kg能够显著减少应激组 *SREBP-1c*、*ACC* mRNA的表达量($P <$

0.05)；日粮添加山竹醇 400 mg/kg 可以显著减少应激组 *SREBP-1c*、*FAS*、*ACC*、*SCD1* mRNA 的表达水平 ($P < 0.05$)；日粮添加山竹醇 600 mg/kg 可以显著减少应激组 *SREBP-1c*、*ACC*、*FAS* mRNA 的表达量 ($P < 0.05$)；三个山竹醇组间无显著差异。PCAF 基因表达结果显示，氧化应激显著增加了 *PCAF* 的表达水平 ($P < 0.05$)，日粮中添加山竹醇可以显著抑制 *PCAF* 的表达 ($P < 0.05$)，随着山竹醇添加量的升高，抑制效果越强。

(4) 细胞试验结果表明：应激组肝细胞内 TG 水平极显著高于对照组 ($P < 0.01$)，山竹醇组肝细胞内 TG 水平显著低于应激组 ($P < 0.05$)，且具有剂量依赖效应，随着山竹醇浓度的增加，肝细胞内 TG 水平不断降低。脂肪合成基因的表达量结果表明，与对照组比较而言，应激组的 *FAS*、*ACC*、*SCD1*、*SREBP-1c* 的基因表达量显著上调 ($P < 0.05$)；与应激组比较而言，低浓度山竹醇能够显著减少 *SREBP-1c* 的 mRNA 水平 ($P < 0.05$)；中浓度山竹醇能够显著减少 *FAS*、*ACC*、*SREBP-1c* 的 mRNA 水平 ($P < 0.05$)；高浓度山竹醇能够显著减少 *FAS*、*ACC*、*SCD1*、*SREBP-1c* 的 mRNA 水平 ($P < 0.05$)。PCAF 表达与免疫共沉淀结果表明，与对照组细胞相比较，氧化应激组 *PCAF* 基因表达量显著增加 ($P < 0.05$)，USF-1 乙酰化水平显著升高；与应激组相比，不同浓度山竹醇组均显著降低 *PCAF* 表达水平以及 USF-1 乙酰化水平 ($P < 0.05$)，随着山竹醇浓度增加，*PCAF* 表达水平与 USF-1 乙酰化水平下降。

综上所述，日粮添加山竹醇可以提高机体的抗氧化功能，缓解氧化应激，提高应激仔猪的生长性能；山竹醇可以通过抑制 *PCAF* 的表达，调节 USF-1 的乙酰化水平，通过 *PCAF*/USF-1 通路调节氧化应激下的肝脏脂肪合成，进而减少脂肪沉积，保护肝脏结构和功能的完整性。

关键词：肝脏；氧化应激；PCAF；USF-1；脂肪合成

Abstract

In the current intensive culture mode, many factors can lead to oxidative stress in piglets. Oxidative stress causes lipid metabolism disorder, increased de novo lipogenesis, which will increase liver load and affect growth performance of piglets. In order to study the effect and mechanism of garcinol regulating lipogenesis in liver of piglets under oxidative stress, this experiment was verified by in vitro and in vivo experiment. Thirty 35-day-old piglets with healthy condition and similar parity were randomly divided into five groups, including control group, oxidative stress group, 200 mg/kg garcinol group, 400 mg/kg garcinol group and 600 mg/kg garcinol group. There are 6 replicates in each group and 1 piglet in each replicate. After 7 days of pre-feeding, the formal trial was started. The experiment lasted for 28 days. The stress group and the garcinol groups were injected with diquat on the 15th day of the experiment, and the garcinol groups were fed the garcinol from the first day of the experiment until the end of the experiment. Hepatocytes of 5~7 days old piglets were isolated and divided into 5 groups, including control group, stress group, 5 μ M garcinol group, 10 μ M garcinol group and 20 μ M garcinol group to explore the role and mechanism of garcinol in regulating liver lipid synthesis in pig under oxidative stress. The stress group and the garcinol groups treated the cells with 400 μ mol/L hydrogen peroxide for 2 h to construct the oxidative stress model. The main findings are as follows:

(1) The results of growth performance and antioxidant index revealed that the average daily gain (ADG) and average daily feed intake (ADFI) of piglets in the oxidative stress group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$), the feed/gain (F/G) was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$), and the ADG and ADFI in the garcinol group were significantly higher than those in the stress group ($P < 0.05$). Garcinol significantly increased superoxide dismutase (SOD) activity and total antioxidant capacity (T-AOC) content in normal piglets ($P < 0.05$). The activity of SOD and glutathione peroxidase (GSH-Px) in serum and liver of the oxidative stress group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$), and the content of malondialdehyde (MDA) was significantly higher than that of the control group ($P <$

0.05). Dietary garcinol supplement significantly increased the activity of SOD and GSH-Px in serum and liver of piglets in the stress group ($P < 0.05$), and significantly decreased the content of MDA ($P < 0.05$).

(2) The results of liver histology and lipid content detection showed that compared with the control group, the liver tissue structure of the oxidative stress group was damaged, and lipid deposition in the liver was significantly increased, and the serum and liver triglyceride (TG) content was significantly increased ($P < 0.05$). The liver tissue structure of the garcinol group recovered to a certain extent compared with the stress group. In addition, lipid deposition was also significantly reduced, and the serum and liver triglyceride (TG) content was significantly reduced ($P < 0.05$). The effect was best when the dosage was 600 mg/kg.

(3) The expression of genes related to lipid synthesis and PCAF gene showed that compared with the control group, the mRNA expression levels of SREBP-1c, FAS, ACC and SCD1 in the stress group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the stress group, the mRNA expression of SREBP-1c and ACC in the 200 mg/kg garcinol group were significantly decreased ($P < 0.05$). The mRNA expression of SREBP-1c, FAS, SCD1 and ACC in the 400 mg/kg garcinol group were significantly decreased ($P < 0.05$). The mRNA expression of SREBP-1c, FAS and ACC in the 600 mg/kg garcinol group were significantly decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference among the three garcinol groups. PCAF gene expression results showed that oxidative stress significantly increased the expression of PCAF ($P < 0.05$), and the addition of garcinol to the diet significantly inhibited the expression of PCAF ($P < 0.05$). The inhibitory effect became stronger with the increase of garcinol.

(4) Cell experiment results showed that TG content in hepatocytes in the stress group was extremely significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$), while TG content in hepatocytes in the garcinol group was significantly lower than that in the stress group ($P < 0.05$), which was dose-dependent. TG content in hepatocytes decreased continuously with the increase of garcinol concentration. The results of lipid synthesis gene expression showed that compared with the control group, the gene expression of FAS, ACC, SCD1, and SREBP-1c in the stress group was significantly increased ($P <$

0.05). Compared with the stress group, the gene expression of SREBP-1c was significantly reduced in the low concentration of garcinol ($P < 0.05$), the gene expression of the FAS, ACC, SREBP-1c was significantly reduced in the medium concentration of garcinol ($P < 0.05$), the gene expression of the FAS, ACC, SCD1, SREBP-1c was significantly reduced in the high concentration of garcinol ($P < 0.05$). The results of PCAF expression and co-immunoprecipitation showed that compared with the cells in the control group, the PCAF gene expression in the oxidative stress group increased significantly ($P < 0.05$), and the level of USF-1 acetylation increased significantly. Compared with the stress group, the PCAF expression and USF-1 acetylation level in the different concentration of garcinol group was significantly reduced ($P < 0.05$). As the concentration of garcinol increased, PCAF expression and USF-1 acetylation level decreased.

In conclusion, dietary garcinol can improve the antioxidant capacity of the piglets, alleviate oxidative stress and improve the growth performance of stressed piglets. Garcinol can regulate the acetylation level of USF-1 by inhibiting the expression of PCAF, through the PCAF/USF-1 pathway to regulate liver lipid synthesis under oxidative stress, reducing lipid deposition, and protecting the integrity of liver structure and function.

Key words: liver, oxidative stress, PCAF, USF-1, lipid synthesis

缩略语表

(Abbreviation)

缩写	英文名称	中文名称
Abbr.	English name	Chinese name
ACC	Acetyl CoA carboxylase	乙酰辅酶A羧化酶
ADG	Average daily gain	平均日增重
ADFI	Average daily feed intake	平均日采食量
CAT	Catalase	过氧化氢酶
CREB	C-AMP response element binding protein	c-AMP应答原件结合蛋白
F/G	Feed/Gain	料肉比
FAS	Fatty acid synthetase	脂肪酸合成酶
FOXO1	Forkhead	叉头转录因子
GSH-Px	Glutathione peroxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
HAT	Histone acetyltransferase	组蛋白乙酰转移酶
HDAC	Histone deacetylase	组蛋白去乙酰化酶
MDA	Malondialdehyde	丙二醛
PCAF	P300-CBP associated factor	P300-CBP结合因子
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
SCD1	Stearyl-CoA desaturatase 1	硬脂酰辅酶A去饱和酶1
SEM	Standard error of mean	平均数标准误
SOD	Superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
SREBP-1c	Sterol regulatory element binding protein-1c	固醇调节元件结合蛋白
T-AOC	Total antioxidant capacity	总抗氧化能力
TG	Triglyceride	甘油三酯
USF	Upstream stimulatory factor	上游刺激因子

第一章 文献综述

1 前言

在目前的集约化养殖模式下,许多因素会导致仔猪发生氧化应激,如猪舍中的有毒有害气体、高温高湿及细菌病毒感染等。猪只发生氧化应激时,生成大量活性氧,机体内产生的自由基无法得到及时有效的清除,体内氧化系统与抗氧化系统平衡被破坏,致使机体损伤(Apel and Hirt 2004, Bhat et al 2015)。氧化应激是许多疾病发生的病理生理基础,它会造成动物生长性能下降、料肉比上升、畜产品品质下降等,给养殖业带来经济损失(Yuan et al 2007, Bhattacharyya et al 2014, 田刚等 2018)。

肝脏是脂质代谢的关键场所,在机体能量稳态中具有不可忽视的作用,它是脂肪酸合成和脂质循环的中枢,而脂肪酸是最常见的能量储存和循环形式。猪氧化应激时脂质代谢紊乱,脂肪的从头合成增加,肝脏脂质代谢紊乱造成肝脏负荷加重,影响仔猪生长性能(Nassir and Ibdah 2014, Baiceanu et al 2016)。研究表明,脂肪从头合成对于肝脏中脂肪沉积贡献率达到 26%(Foufelle et al 2002)。综上所述,研究肝脏中脂肪合成是必要的。脂肪合成相关基因的转录受到一系列转录因子的调控,主要包括固醇调节元件结合蛋白 1c(SREBP-1c)、上游刺激因子 1(USF-1)等(Wong and Sul 2010)。在摄食(胰岛素刺激)条件下,SREBP-1c 依赖于和 USF-1 的结合发挥其促进脂肪合成的效应,而 USF-1 需通过 P300/CBP 结合因子(PCAF)对其乙酰化发挥对脂肪合成基因的转录调控作用(Wang et al 2013)。由此可见除 SREBP-1c 和 USF1 两个重要转录因子之外,PCAF 也在脂肪合成中具有关键作用。PCAF 是一种组蛋白乙酰转移酶,主要乙酰化 H3 组蛋白。近年来研究报道,PCAF 可以通过结合或乙酰化修饰不同的酶和转录因子调控肝脏脂肪合成(Lin et al 2013, Kim et al 2015)。最近 Cao 等(2016)用 H₂O₂ 处理 HEK293T 细胞建立氧化应激模型,发现在氧化应激下 PCAF 的表达水平升高。那么氧化应激下 PCAF 是否是调控脂肪合成的关键靶点?为了验证这一观点,我们查阅文献后筛选出了 PCAF 的抑制剂—山竹醇。

山竹醇(Garcinol)是一种来自藤黄属植物的黄色晶体化合物,含有酚羟基和 β -二酮,属于聚异戊二烯化二苯甲酮衍生物(Balasubramanyam et al 2004, Jagtap et al 2015)。许多研究报道,山竹醇具备广泛的药理作用,如抗炎、抗氧化、清除自由

基、抑制组蛋白乙酰转移酶等功能，具有广泛的研究前景（周新莹与张辛燕 2014，Cheng et al 2010，Ahmad et al 2012，Hung et al 2016）。然而，山竹醇对于猪氧化应激状态下脂质合成方面的研究还鲜见报道。因此，本试验旨在通过体内试验和体外试验来探究仔猪氧化应激状态下山竹醇通过调控 PCAF 调节肝脏脂肪合成的作用及机制，为肝脏脂肪代谢的调控提供新的思路。

2 氧化应激

氧化应激指的是机体在遭受到外界因素刺激时，产生大量活性氧自由基和氮自由基，且机体内生成的自由基无法被及时有效地清理，体内氧化体系与抗氧化体系平衡被打破，致使组织损伤（Apel and Hirt 2004，Bhat et al 2015）。机体在代谢时会产生活性氧自由基，包括羟基自由基、超氧阴离子和过氧化氢等（崔艳军 2016，Krumova and Cosa 2016）。机体在处于正常生理状态时，活性氧（ROS）的生成和清除维持在平衡状态，ROS 不会对机体产生损害；但在氧化应激条件下，ROS 的生成超过了机体抗氧化系统的清理能力，因此产生的大量 ROS 会导致细胞、组织损伤（Brieger et al 2012）。

在目前的集约化养殖模式下，许多因素会导致猪发生氧化应激，如猪舍中的有毒有害气体、高温高湿及细菌病毒感染等（Halliwell 2011）。氧化应激是许多疾病发生的病理生理基础，它会造成动物生长性能下降、料肉比增加、畜产品品质下降、免疫力降低、发病率升高等，给养殖业带来经济损失（Yuan et al 2007，Bhattacharyya et al 2014，田刚等 2018）。

2.1 氧化应激与抗氧化系统

动物在长期的演变过程中形成了抗氧化系统，它会及时清理生成的过量 ROS，保障机体免于遭受氧化损伤，维持氧化还原平衡。抗氧化系统包括酶类抗氧化系统和非酶类抗氧化系统，酶类抗氧化系统包括过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、超氧化物歧化酶（SOD）等（Miyamoto et al 2010）。在动物体内 SOD 主要有 3 种形式，包括 Cu/Zn-SOD、Mn-SOD 和胞外 SOD，分别分布在细胞质、线粒体和血浆中，能够把超氧阴离子歧化为过氧化氢（Zelko et al 2002）。而 CAT 以及 GSH-Px 可以将过氧化氢还原为水和分子氧，保护细胞免受过氧化物的损伤（Michiels et al 1994，Willekens et al 2014）。在组织水平上，CAT 主要分布于肝脏和血液；在细胞水平上，CAT 主要分布在过氧化物酶体中。GSH-Px 主要分布于

细胞质中，是一种重要的细胞内源抗氧化酶。它们在机体中都发挥着独特且不可替代的作用，是细胞生存所必需的。只有抗氧化酶的活性保持适当的平衡状态时才能最大效率地发挥其保护作用。当 ROS 含量增加时，生物体抗氧化酶活性随之增加，清除自由基；但当 ROS 含量超过机体抗氧化体系清理能力时，抗氧化酶活性会显著降低，细胞受到损伤。SOD、GSH-Px、CAT 不仅可以作为机体清理自由基能力的参考，还能间接体现出 ROS 对细胞的损害，因此 SOD、GSH-Px、CAT 活性常用做判断机体抗氧化能力的参考指标（Nagy et al 2007, Mao et al 2014）。非酶类抗氧化系统包含谷胱甘肽、金属硫蛋白、维生素等。酶类抗氧化体系和非酶类抗氧化体系协同发挥其抗氧化能力。

2.2 氧化应激与肝脏脂肪合成

肝脏作为机体内代谢非常活跃的器官，在氧化应激条件下容易受到损害。大量研究表明，当机体处在氧化应激状态时，SREBP-1c 表达量增加，其下游基因脂肪酸合成酶（FAS）、乙酰辅酶 A 羧化酶（ACC）、硬脂酰辅酶去饱和酶 1（SCD1）表达量增加，脂质合成增多，同时氧化应激还会增加甘油三酯在肝脏内的积聚，造成脂质积累（Sekiya et al 2008, Fang et al 2013, Baiceanu et al 2016）。Lee 等研究表明，氧化应激能够通过激活肝细胞内 FAS 来引发脂质积聚（Lee et al 2015）。肝脏在脂类的合成、分解、转运等生物过程具有重要效应，肝脏部位中合成的脂肪酸可以为机体提供能量来源并且成为膜形成的结构组分，而肝脏作为氧化应激的重要靶器官，在氧化应激状态下会发生脂质代谢紊乱。氧化应激会影响线粒体脂肪酸氧化，损害脂蛋白的组装和分泌，使合成的甘油三酯在肝脏内积聚（Pan et al 2004, Bonnard et al 2008）。氧化应激还会干扰胰岛素介导的信号转导，使胰岛素信号通路受损，造成细胞的胰岛素抵抗（Evans et al 2003; Rains et al 2011）。胰岛素抵抗与脂质代谢失衡造成脂肪在肝细胞中的沉积，尤其是脂肪酸和甘油三酯（Day and James 1998）。氧化应激也会引起内质网应激，而内质网应激反应如内质网介导的降解和未折叠蛋白反应会促进肝细胞脂质积聚，它通过诱导脂肪从头合成，线粒体活性的改变和极低密度脂蛋白（VLDL）分泌的减少，直接通过内质网应激加强肝脏脂肪变性，而氧化还原平衡失调又加剧氧化应激，形成恶性循环（Baiceanu et al 2016）。

2.3 氧化应激模型的构建

敌草快（Diquat）是一种二吡啶除草剂，目前被广泛用于构建动物的氧化应激

模型。Diquat 能够把分子氧转变为超氧阴离子，然后生成其他氧化还原产物，它们可以引起细胞膜脂质过氧化，并可能造成细胞死亡（Jones and Vale 2000）。研究表明 Diquat 诱导的生长猪的氧化应激持续时间可以达到 28 d 以上，断奶仔猪的氧化应激持续时间可以达到 21 d 以上（徐静等 2008，刘通等 2016）。Lu 等（2010）利用 Diquat 建立大鼠的氧化应激模型探究连翘提取物的抗氧化作用；Lv 等（2012）利用 Diquat 构建氧化应激模型探究氧化应激对仔猪生长性能和色氨酸代谢的作用；Xu 等（2018）利用 Diquat 建立断奶仔猪的氧化应激模型探究日粮添加壳聚糖对氧化应激的缓解作用。

在细胞的氧化应激模型构建中， H_2O_2 的使用比较普遍。 H_2O_2 属于活性氧的一种，易穿过细胞膜，与其他活性氧相比，相对稳定，半衰期长，因此广泛的用作构建细胞氧化应激模型的物质。Kao 等人（2010）利用 H_2O_2 构建内皮细胞氧化应激模型，探究白藜芦醇对于细胞的保护效应。Bak 等人（2012）利用 H_2O_2 处理 HepG2 细胞后探究红参精油对其的抗氧化和保肝作用。Nirmaladevi 等人（2014）利用 H_2O_2 诱导氧化应激探究比卡维林对 SH-SY5Y 细胞系神经元损伤的神经保护效应。

3 肝脏脂肪合成的调控因子

3.1 调控脂肪合成的基因

肝脏是脂质代谢的关键场所，在机体能量稳态中具有不可忽视的作用，它是脂肪酸合成和脂质循环的中枢，而脂肪酸是最常见的能量储存和循环形式。研究表明，肝脏脂质代谢稳态失衡会造成肝细胞中甘油三酯非生理性的积聚甚至脂肪变性，而脂肪从头合成对于肝脏中脂肪沉积贡献率达到 26%（Ferre and Foufelle 2010, Kawano and Cohen 2013）。脂肪合成的过程受到多种基因的调控，包括 ACC、FAS、SCD1 等。

3.1.1 乙酰辅酶 A 羧化酶

乙酰辅酶 A 羧化酶是一种变构酶，有无活性的单体和有活性的聚合体两种存在。柠檬酸在无活性的单体和有活性的聚合体之间发挥调控作用，能够促进酶朝着有活性的类型转化，以加快脂肪酸的合成。ACC 有 2 种类型：ACC α 和 ACC β ，它们分别由不同的基因编码，并且在不同的组织中发挥效应。ACC α 在脂肪生成组织中的细胞液表达，ACC β 在心脏和肌肉组织中的线粒体表达（Travers et al 2001）。脂肪酸合成过程中，乙酰 CoA 在 ACC 功能域中的生物素羧化酶和羧基转移酶的作用下，

羧化为丙二酸单酰 CoA,这是脂肪酸合成的首步反应,也是限速反应(金国琴 2011)。之后丙二酰 CoA 作为长链脂肪酸合成过程的中间体,在脂肪酸合成过程中作为脂酰 CoA 延长酶的底物,生成 TG 和磷脂。

ACC 是脂肪合成中的重要酶,研究表明,肝脏 ACC α 敲除小鼠脂肪合成存在障碍,与野生型小鼠相比,肝脏 TG 含量减少 40%~70% (Mao et al 2006)。ACC α 的调控区有 3 个启动子,分别为 PI、PII 和 PIII,PI 是肝脏中发挥主要作用的启动子,与机体营养状况有关 (Travers et al 2001)。ACC 的表达受到转录因子的调控,在其启动子区存在 SRE 以及 CHRE 的结合位点,表明其受到 SREBP 以及 CHREBP 的调控。除此之外,其表达还受到营养条件、激素以及其他生理因子的调控,如胰岛素通过调节 ACC 的磷酸化状态来调节其活性。

3.1.2 脂肪酸合成酶

脂肪酸合成酶是一种同型二聚体,它是一种多功能酶,主要位于人和动物体内脂质代谢迅速的组织中。FAS 二聚体通过底物乙酰辅酶 A、丙二酰辅酶 A 和 NADPH 催化饱和脂肪酸、棕榈酸和硬脂酸等的合成 (Smith 1994, Smith et al 2003)。FAS 在很多组织中都有表达,研究表明,其在肝脏、脂肪组织、哺乳动物乳腺组织以及肿瘤组织中有较高的表达水平 (Semenkovich et al 1995)。FAS 在能量稳态中发挥重要作用,它将多余的能量转化成脂质进行储存,在需要时通过脂肪酸的 β 氧化供能。FAS 的活性上升能够使机体内 TG 含量增多,因此通过抑制 FAS 的活性可以减少脂肪合成。

FAS 有两个启动子 I 和 II,启动子 I 为主要启动子,它上面存在多个转录因子的结合位点,包括 SREBP-1c、CHREBP、LXR 等。SREBP-1c 的活性形式进入细胞核之后,激活 FAS 基因,促进其转录。在胰岛素条件下,当 -65E-box 的 USFs 结合位点突变或者 -150SRE 突变后 FAS 不能激活,表明 USF-1 是胰岛素条件下激活 FAS 启动子所必需的 (Latasa et al 2003, Wang et al 2013)。除转录因子外,FAS 的表达还受到激素水平的影响,如胰岛素可以促进 FAS 的转录,增加其在转录水平上的表达。

3.1.3 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1

SCD 是一种存在于内质网上的跨膜蛋白,由 4 个跨膜结构域组成。它存在多种亚型,鼠中存在 4 种亚型 (SCD1-SCD4),而人中只有 2 种亚型 (SCD1、SCD5),

其中 SCD1 主要分布于肝脏和脂肪组织中 (Sampath and Ntambi 2006)。SCD1 是脂肪合成过程中的重要酶之一, 它的底物由脂肪从头合成或膳食提供, 它可以促进饱和脂肪酸向单不饱和脂肪酸转化, 产生的单不饱和脂肪酸在磷酸甘油酰基转移酶及后续酶的催化效应下, 进一步合成甘油三酯 (TG), 促进脂肪变性 (Takeuchi and Reue 2009)。SCD1 在转录水平上受到 SREBP-1c 的调控, 也受到影响其稳定性或降解的其他因素的调控。

SCD1 在脂质代谢中具有重要作用, 其抑制剂已被开发成为治疗肥胖和异位脂质沉积的潜在药物。Sampath 与 Ntambi 在啮齿动物中的研究证明, SCD1 活性对于脂肪从头合成的过程是必要的 (Sampath and Ntambi 2011)。SCD1^{-/-}小鼠可以免受膳食诱导的肥胖和胰岛素抵抗, 瘦素缺乏小鼠、肥胖小鼠、瘦素抵抗小鼠模型中 SCD1 基因缺陷可以抑制小鼠体重, TG 积聚等 (Miyazaki et al 2004, Jiang et al 2005, Miyazaki et al 2009)。在小鼠原代肝细胞中, 使用 SCD1 抑制剂处理细胞, 结果发现处理之后的细胞 FAS、ACC、SREBP-1c 表达水平降低 (Kim et al 2011)。研究表明, miR-27a 通过下调小鼠肝脏中 SCD1 的表达水平, 抑制肝脏中的脂肪合成, 进而减少小鼠原代肝细胞中的 TG 积聚和 TG 含量 (Zhang et al 2017)。

3.2 调控脂肪合成的转录因子

肝脏中脂肪的合成对于形成极低密度脂蛋白和向其他组织提供能量尤为重要, 而这一过程受到精密调控。该过程涉及到多种脂肪合成相关基因, 而这些基因的转录受到一系列转录因子包括上游刺激因子 1 (USF-1)、SREBP-1c 等的调节。

3.2.1 上游刺激因子 1

上游刺激因子 (USF) 普遍存在于人类和哺乳动物中, 是一种在真核生物中大量表达且保守的特异性序列转录因子。它有 USF-1 和 USF-2 两种形式, 在哺乳动物中, 两者具有相似的基因组结构, 都包含 10 个外显子, 是碱性螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链 (bHLH-LZ) 转录因子家族的成员, 通过形成同源或异源二聚体与靶基因的 E-box 结合发挥其转录调控作用 (Corre and Galibert 2010)。因 E-box 在真核生物基因组内广泛存在, 因此 USF 在机体代谢过程中具有重要效应。USF 在脂质生成过程的关键作用早已在基因敲除小鼠上得到证明: USF 基因被敲除后, 脂质生成基因的转录受到严重影响 (Casado et al 1999)。对 USF-1 进行数量性状研究表明, 它可能是家族性高脂血症的候选基因 (Pajukanta, 2004)。在脂肪酸合成的反应中, FAS

发挥重要作用，而当 -65E-box 的 USFs 结合位点突变或者 -150SRE 突变后 FAS 不能激活，表明 USF-1 和 -65E-box 的结合是激活 FAS 启动子所必需的 (Latasa et al 2003, Wang et al 2013)。

许多涉及脂肪酸和甘油三酯合成的酶在其近端启动子区域都含有 E 盒与固醇调节元件 (SRE)，是在转录水平上被调节的，可能受到 USF-1 的转录调控。进食后，由于胰岛素和葡萄糖信号通路激活，在 USF-1 的作用下而使脂质合成基因转录增加 (师建辉等 2016)。在进食/胰岛素刺激下，USF-1 在 S262 位点被 DNA-PK 磷酸化，被磷酸化之后，USF-1 募集并在 K237 位点被乙酰化 (Wong and Sul 2009; Wong et al 2009)，结果表明，USF-1 的乙酰化与磷酸化在其对靶基因的转录调控过程中具有重要效应。

3.2.2 固醇调节元件结合蛋白

SREBP 是重要的核转录因子，属于 bHLH-Zip 超家族。目前已经确认的成员有 3 个，及 SREBP-1a, SREBP-1c, SREBP-2。SREBP-1c 主要调控脂肪酸生成关联基因的表达，SREBP-2 主要调控胆固醇代谢关联基因的表达 (Horton et al 2002)。SREBP-1 有 3 个结构域，分别为 N-端转录活性结构域、C-端调节结构域和疏水结构域 (Edwards et al 2000)。大量研究表明，SREBP-1c 在肝脏脂质合成基因的转录中具有关键作用，它参与调节脂肪酸 (FA) 和 TG 合成通路中的有关酶，如 FAS、SCD1 以及 ACC 等的转录，进而调节脂肪酸的合成。SREBP-1c 一开始是以无活性的前体形式嵌入在内质网上，受到特定刺激时 (如胰岛素信号、氧化应激等)，转移到高尔基体上，经其上的蛋白酶水解切割后，产生的氨基末端活性片段进入到细胞核，与位于靶基因启动子上的 SRE 结合，启动它们的转录 (Osborne and Espenshade 2009, Kim et al 2018)。研究发现，在果糖饲养的小鼠中，SREBP-1c 被活化，其靶基因 FAS 和 ACC 的表达上调，产生脂质积聚 (Zhang et al 2010)。SREBP-1c 促进 FA 合成并整合入 TG，异常高的 SREBP-1c 会导致肝内 TG 积累及其他脂质异常 (Horton et al 2002, Ferre P and Foufelle 2007)。有研究表明，一种新的长链非编码 RNA 能够通过负调控 SREBP-1c，减少 SREBP-1c 和 FAS 的表达，进而抑制油酸诱导的 TG 和脂滴积聚 (Li et al 2017)。

在进食或胰岛素刺激后 SREBP1-c 结合到 FAS 启动子 E-box 附近的 SRE 发挥调控效应，但是 SREBP-1c 向 FAS 启动子的募集依赖于 USF 与 65 E-box 的结合以及

USF 与 SREBP-1c 的相互作用 (Griffin et al 2007)。Griffin 等 (2007) 通过串联亲和纯化和免疫共沉淀等技术证明了在体内和体外试验中 USFs 和 SREBP1-c 存在相互作用, USFs 的 bHLH 结构域可以直接和 SREBP1-c 的 bHLH 结构域的氨基末端结合, 两者协同激活脂肪合成基因的启动子 (师建辉等 2016)。这表明 SREBP-1c 与 USF-1 这两种转录因子在脂肪合成过程中均发挥着不可替代的效应。

3.3 肝脏脂肪合成与乙酰化修饰

3.3.1 乙酰基转移酶

乙酰基转移酶 (HAT) 是一组酶, 它可以把乙酰 CoA 上的乙酰基团转移到蛋白质的赖氨酸残基上, 使蛋白乙酰化。因为是在研究组蛋白乙酰化过程中首次发现这种酶, 因此它的全称为组蛋白乙酰转移酶。但后来的研究发现, 它也可以乙酰化非组蛋白 (Durrin et al 1991)。组蛋白的乙酰化以及去乙酰化在真核细胞的基因表达调节中起着关键作用。自蛋白质乙酰化被第一次发现至今, 已有研究报道超过 200 种的蛋白质存在乙酰化修饰。更有趣的是在营养物质代谢过程中的重要酶内大部分都存在乙酰化修饰, 说明其在代谢调控中发挥着重要效应。

组蛋白乙酰转移酶在酵母和人类之间是保守的, 对于生长和转录激活是必需的 (Wang et al 1997)。乙酰化后的组蛋白和 DNA 间的相互作用力变弱, 使染色质结构松弛, 进而使得转录因子更易和 DNA 链结合, 并且募集跟染色质重塑相关的蛋白复合物, 启动基因转录 (Stasevich et al 2014)。HAT 具有复杂的结构和功能, 依据真核细胞中的亚细胞定位, 它主要分成两大类: A 型和 B 型 (Roth et al 2001)。A 型 HAT 主要分布在细胞核内, 在转录中起作用, 主要包括 5 个家族 (见表 1-1): P300/CBP 家族、GNAT 家族、MYST 家族、SRC 家族和其他 (Sternier and Berger 2000, Marmorstein and Roth 2001, Ogryzko 2001, Pandey et al 2002, Carrozza et al 2003, Lee and Workman 2007)。B 型 HAT 主要分布于细胞质中, 可以对游离的组蛋白发挥乙酰化修饰作用, 促进组蛋白入核 (林瑞婷 2013)。

表 1-1 乙酰转移酶家族

Table 1-1 Acetyltransferases family

名称	成员
GNAT 家族	GCN5, PCAF, Hat1, Elp3, Hpa2, Hpa3, ATF2, Nut1
P300/CBP 家族	P300, CBP
MYST 家族	MOF, TIP60, HBO1, MOZ, MORF, YBF2
SRC 家族	SRC1, SRC2, SRC3, GRIP1
其他	TAF _{II} 250, Rtt109

3.3.2 PCAF 的结构和功能

GNAT 为最大的 HAT 家族，该家族有很多成员，P300 / CBP 结合因子（PCAF）是 GNAT 家族一种重要的乙酰转移酶，其基因定位于 3p24 上，大小为 4508 bp。它最早是由 Yang 等人在 cDNA 文库中分离得到的（Yang et al 1996）。组蛋白的 4 种类型均存在乙酰化修饰，在对 H3 组蛋白的乙酰化上，PCAF 的效率比 P300 / CBP 更高，其中 H3K9 和 H3K14 的研究较多（Jin et al 2010）。人 PCAF 由 3 个结构域构成，其中位于 C 端的布罗莫结构域能够结合核受体和辅助因子复合物，调节信号转导（Korzus et al 1998）。PCAF 可以形成乙酰转移酶复合物，其作为辅助激活因子发挥作用，结合在启动子近端上游刺激启动子活性，促进下游基因的转录（Krumm et al 1998, Nagy and Tora 2007）。

组蛋白被 PCAF 乙酰化后，与 DNA 的结合能力下降，核小体的结构松弛，转录因子更容易与 DNA 结合，调节基因的转录水平。PCAF 不但能够乙酰化组蛋白，还能够作用于非组蛋白，包括乙酰化 p53、Smad、E2F、Notch 等转录因子，调节其转录活性；乙酰化 PC4、HMGB-1 等转录共激活因子，进而调控细胞的增殖、分化、凋亡、DNA 的损伤与修复等生理过程（Sterner and Berger 2000, Bonaldi et al 2003）。以往对 PCAF 的研究基本上集中于肿瘤方面，也已经证实其在肿瘤方面的调控作用，其中包括胃癌、食管鳞状细胞癌以及乳腺癌等（Zhu et al 2009, Ying et al 2010）。如有研究发现，PCAF 在体内外均能抑制胃癌细胞的致瘤性，而在胃癌细胞系和肠型胃癌组织中，PCAF 表达明显降低（Ying et al 2010）。但除此之外，PCAF 对糖脂代谢也具有调控作用（Hirano et al 2010, Cai et al 2014, Zhao et al 2017）。近年来研究报道，PCAF 可以通过修饰不同的转录因子和酶调控脂肪合成（Wang et al 2018）。

3.3.3 PCAF 对脂肪合成的调控

P300 / CBP 结合因子 (PCAF) 是 GNAT 家族一种重要的乙酰转移酶, 主要乙酰化组蛋白, 是研究最广泛的乙酰转移酶之一。作为关键的代谢器官, 肝脏很大程度上受到赖氨酸乙酰化, 其发生在参与脂肪酸代谢的大多数代谢酶中。这些酶的乙酰化状态可能会改变它们的活性, 以应对代谢病理需求的任何变化 (Iyer et al 2012, McDonnell et al 2015)。

Kim 等研究表明, PCAF 可以通过乙酰化 c-AMP 应答元件结合蛋白 (CREBH) 改变其转录活性, 促进 CREBH-PPAR α 转录复合体的形成, 进而调控脂肪生成、脂肪酸氧化过程中的基因表达水平 (Kim et al 2015)。研究发现, 在高糖条件下, PCAF 可以通过乙酰化 ATP-柠檬酸裂解酶 (ACLY) 阻止其泛素化和降解, 促进脂肪酸合成 (Lin et al 2013)。PCAF 还能通过与 FOXO1 结合以及乙酰化 FOXO1 抑制其活性, 从而抑制 TG 合成减少脂质沉积 (Yoshimochi et al 2010)。Cao 等研究表明, 使用 H₂O₂ 处理 HEK293T 细胞建立氧化应激模型, 发现在氧化应激条件下 PCAF 的表达水平升高 (Cao et al 2016)。那么在氧化应激状态下, PCAF 是否是调控肝脏脂肪合成的关键靶点?

4 山竹醇

山竹醇 (Garcinol) 是一种来自藤黄属植物果皮的黄色晶体化合物, 在不同藤黄属植物中其含量也不同。它含有酚羟基和 β -二酮, 属于聚异戊二烯化二苯甲酮衍生物 (Balasubramanyam et al 2004; Jagtap et al 2015)。Muhammed 等通过研究发现, 在大鼠日粮中添加 300 mg/kg 和 2000 mg/kg 的山竹醇饲喂 28 天, 并未引起大鼠发育迟缓, 以及内脏脏器的病理变化, 证实了山竹醇的低毒性。(Muhammed et al 2018)。Tanaka 等研究表明, 给雄性大鼠饲喂含有 0.01% 和 0.05% 山竹醇的日粮, 可以显著降低结肠癌的产生, 且具有剂量依赖效应, 与此同时不会具有任何副作用 (Tanaka 2000)。这些都表明畜禽饲料中应用山竹醇是切实可行的。许多研究报道, 山竹醇具有广泛的药理作用, 包括抗炎、抗氧化、清除自由基、抗菌、抗糖基化等功能, 具有广泛的研究前景 (Padhye et al 2009, Cheng et al 2010, Ahmad et al 2012, Hung et al 2015)。

4.1 山竹醇的抗氧化活性

抗氧化活性是山竹醇具有的重要特性之一。对山竹醇的抗氧化机制进行研究，体外试验和体内试验结果都显示山竹醇能够抑制超氧阴离子和一氧化氮等自由基的形成，利用单电子转移与过氧自由基反应，之后烯醇化的 1,3-二酮的羟基去质子化，形成共振对，可以防止自由基种类的增加，从而减少氧化损伤，最终发挥其抗氧化作用（Tanaka et al 2000, Yamaguchi et al 2000a, Sang et al 2002, Liao et al 2005）。通过山竹醇对小鼠神经元皮质细胞的研究表明，山竹醇具有良好的抗氧化活性，且能够减弱脂质过氧化，保护细胞免受损害（Yamaguchi et al 2000a, Liao et al 2005）。Yamaguchi 等使用电子自旋共振（ESR）光谱法研究其自由基清除活性，数据显示，在次黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系中，山竹醇对超氧阴离子的抑制作用与维生素 E 几乎相同；在芬顿反应体系中，山竹醇对羟基自由基的抑制作用强于维生素 E（DL- α 生育酚）；在 H_2O_2 / NaOH / DMSO 系统中，山竹醇抑制了超氧阴离子，羟基自由基和甲基自由基（Yamaguchi et al 2000b）。这些结果都表明山竹醇具有很好的自由基清除性能。除此之外，通过各种技术如 ORAC, FRAP, ABTS 等对印度藤黄提取物的抗氧化活性进行测量，发现印度藤黄水溶液和煮沸提取物由于含有山竹醇而具有非常好的抗氧化潜力、自由基清除性能和抗脂质过氧化活性（Devasagayam et al 2006; Jagtap et al 2015）。Panda 等通过给乙醇诱导的肝损伤小鼠饲喂藤黄果皮水提物（400 mg/kg 和 800 mg/kg）发现其可以恢复体内抗氧化酶水平（Panda et al 2012）。还有研究表明，日粮中添加山竹醇可以降低小鼠肝脏中 MDA 和 ROS 的含量，同时增加 GSH-Px 的活性（Jing et al 2014）。

4.2 对组蛋白乙酰转移酶 PCAF 的抑制作用

组蛋白乙酰化是转录活性基因的特征，一些基因需要经过转录后修饰才能发挥自身转录调控作用。HAT 和脱乙酰酶（HDAC）的正确募集与功能是基因表达与细胞周期的关键调节步骤。这些酶中任何一个类型的功能缺陷均可能造成多种疾病。因此，HAT 和 HDAC 成为潜在治疗靶点。研究发现，一些 HAT 和 HDAC 抑制剂可以通过调控组蛋白乙酰化，改变染色质结构，促进或者抑制基因的转录，从而治疗某些疾病（Collins et al 2013）。山竹醇是体外和体内组蛋白乙酰转移酶 PCAF 的有效抑制剂，其可以抑制 HAT 活性相关的染色质转录，且它也可以抑制体内的组蛋白乙酰化，但对去乙酰化无影响（Balasubramanyam et al 2004）。对山竹醇处理的 Hela

细胞进行基因表达的微阵列分析表明，它可以抑制染色体转录。研究发现，PCAF 是动脉生成的关键调控因子，而山竹醇能够通过抑制其表达减缓动脉生成的速度（Bastiaansen et al 2013）。还有研究表明，p53 C-端激活区域赖氨酸的乙酰化是通过 PCAF 介导的，PCAF 能够促进 p53 靶基因的转录激活。而山竹醇可以通过改变 MCF7 细胞内 PCAF 的表达，从而导致重要组蛋白和 p53 翻译后修饰的重新编程，使肿瘤细胞生长停滞，成为癌症的化学预防剂（Gu and Roeder 1997, Collins et al 2013）。此外，据报道，山竹醇可以抑制 PCAF 的活性，对白血病细胞株还有诱导凋亡效应（De et al 2017）。

4.3 山竹醇对脂质合成的调控作用

山竹醇对脂质合成具有调控作用，有试验结果表明，在脂肪细胞分化过程中，它可以抑制脂滴形成和甘油三酯的积聚，能够减弱甘油-3-磷酸脱氢酶的活性，通过下调脂肪细胞内 PPAR γ 和 FAS 的基因和蛋白表达减少脂肪细胞内甘油三酯合成和脂质沉积（Hsu et al 2012）。除此以外，山竹醇也可抑制脂肪酸诱导的肝细胞中甘油三酯合成与脂质沉积，下调 FAS 基因表达，从而减少非酒精性脂肪肝细胞内的脂质合成（俞慧宏等 2017）。研究表明，饲喂山竹醇可以减少糖尿病大鼠体内 TG、胆固醇、极低密度脂蛋白的水平（Madhuri and Naik 2017）。以往涉及山竹醇的研究大多集中在它抗氧化、抗癌、抗炎等方面，关于山竹醇对脂肪合成影响的报道较少，它对脂肪合成的调控机制也尚不清楚。

5 研究目的与意义

目前集约化养殖模式下氧化应激的存在非常普遍，肝脏作为机体内代谢活跃的器官，容易受到氧化应激的影响。猪处于氧化应激状态时肝脏脂质代谢紊乱，脂肪的从头合成增加。肝脏是脂质代谢的重要场所，在机体能量稳态中具有不可忽视的作用，它是脂肪酸合成和脂质循环的中枢，而脂肪酸是最常见的能量储存和循环形式。肝脏脂质代谢紊乱会加重肝脏负荷，影响仔猪生长性能。研究表明，PCAF 可以通过修饰不同的转录因子和酶调控脂肪合成，此前又有研究报道，氧化应激状态下，PCAF 的表达水平升高。那么在氧化应激状态下，PCAF 是否是调控脂肪合成的关键靶点？本试验通过体外试验结合体内试验，探究氧化应激条件下，PCAF 对脂肪合成的调控机制，同时利用 PCAF 的天然抑制剂山竹醇进行干预，进一步验证该机制，预期为肝脏脂肪代谢的调控提供新的靶点和理论依据。

第二章 山竹醇对氧化应激猪肝脏脂肪合成和 PCAF 表达的影响

1 前言

肝脏是脂质代谢的关键场所，在机体能量稳态中具有不可忽视的作用，它是脂肪酸合成和脂质循环的中枢，而脂肪酸是最常见的能量储存和循环形式。氧化应激时猪肝脏脂质代谢发生紊乱，脂肪的从头合成增多，肝脏脂质代谢紊乱会加重肝脏负荷，影响仔猪生长性能。近来的研究表明，PCAF 可以通过乙酰化代谢酶和转录因子来调控脂肪合成，山竹醇是 PCAF 的天然抑制剂。为了探究氧化应激条件下 PCAF 是否是调控脂肪合成的关键靶点，本试验通过添加 200、400、600 mg/kg 不同浓度的山竹醇，测定其对断奶仔猪的生长性能、抗氧化功能、脂肪合成和 PCAF 表达的影响，探究山竹醇是否通过调控 PCAF 来调节脂肪合成。

2 材料与方法

2.1 试验设计与试验动物

选取健康状况良好、胎次相近的 (9.2 ± 0.38) kg “杜×长×大”断奶仔猪 30 头，根据体重相近原则随机分为 5 个组，分别为对照组（CON）、应激组（STR）和 200 mg/kg 山竹醇组（G-200）、400 mg/kg 山竹醇组（G-400）和 600 mg/kg 山竹醇组（G-600），每组 6 个重复，每个重复 1 头猪。预饲 7d 后，开始正式试验，试验期 28 d。对照组和应激组饲喂基础日粮，山竹醇组饲喂添加不同浓度山竹醇的日粮。应激组和山竹醇组于试验第 15 天腹腔注射 10 mg/kg Diquat，对照组腹腔注射等量灭菌生理盐水。仔猪全程单笼饲养。

2.2 试验材料

山竹醇购自陕西昊辰有限公司，有效含量为 30%；Diquat 购自 Toronto Research Chemicals 公司，使用时用灭菌生理盐水配成 Diquat 溶液；SOD、GSH-Px、T-AOC、MDA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

2.3 试验日粮与饲养管理

基础日粮参照 NRC(2012)仔猪营养需要进行配制，其组成及营养水平见表 2-1。在基础日粮中添加试验设计剂量的山竹醇构成试验日粮。

表 2-1 基础日粮组成及营养水平（风干基础）

Table 2-1 Composition and nutrient levels of basal diet (air-dry basis)		%
项目 Items	含量 Content	
原料 Ingredients		
玉米 Corn	61.04	
豆粕 Soybean meal	20.00	
豆油 Soybean oil	2.00	
乳清粉 Dried whey	2.50	
膨化大豆 Extruded soybean	5.00	
葡萄糖 Glucose	2.50	
鱼粉 Fish meal	3.00	
L-赖氨酸 98.5%	0.50	
DL-蛋氨酸 99.0%	0.10	
L-苏氨酸 98.5%	0.20	
色氨酸 98%	0.06	
石粉 Limestone	0.50	
磷酸氢钙 CaHPO_4	1.20	
食盐 NaCl	0.40	
预混料 Premix	1.00	
合计 Total	100.00	
营养水平 Nutrient levels		
消化能 DE/(MJ/kg)	14.43	
粗蛋白质 CP	18.23	
钙 Ca	0.71	
总磷 TP	0.61	
有效磷 AP	0.42	
可消化赖氨酸 DLys	1.37	
可消化蛋氨酸 DMet	0.42	
可消化蛋氨酸+胱氨酸 DMet+DCys	0.73	
可消化苏氨酸 DThr	0.89	
可消化色氨酸 DTrp	0.27	

注：预混料为每千克日粮提供 The premix provided the following per kilogram of the diet: VA, 12740 IU; VD3,

2940 IU; VE, 84 mg; VK3, 4 mg; VB1, 4 mg; VB2, 12.8 mg; VB6, 6 mg; VB12, 0.048 mg; VB3, 48 mg; VB5, 40 mg; 叶酸, 2.4 mg; 生物素, 0.32 mg; 铁, 150 mg; 铜, 115 mg; 锰, 60 mg; 锌, 130 mg; 碘, 0.39 mg; 硒, 0.45 mg。

Note: The premix provided the following per kilogram of the diet: VA, 12740 IU; VD3, 2940 IU; vitamin E, 84 IU; vitamin K3, 4mg; vitamin B1, 4mg; vitamin B2, 12.8mg; vitamin B6, 6mg; vitamin B12, 0.048; vitamin B3, 48mg; vitamin B5, 40mg; biotin, 0.32mg; pantothenic acid, 40mg; folic acid, 2.4mg; niacin, 48mg; Fe, 150mg; Cu, 115mg; Mn, 60mg; Zn, 110mg; I, 0.39mg; Se, 0.45mg.

试验在华中农业大学代谢室进行。室温保持在 26℃左右, 相对湿度保持在 55%~65%, 每天喂料 4 次 (08: 00、12: 00、16: 00、20: 00), 每次以仔猪吃饱后料槽内略有余料为度, 自由饮水。圈舍每天打扫, 注意通风换气, 定期消毒。

2.4 样品采集与指标测定

2.4.1 生长性能

试验期间准确记录每个重复试验猪每天的采食量, 在试验第 1、15、和 29 天早上试验猪空腹称重, 计算 1~14 天和 15~28 天的平均日增重 (ADG)、平均日采食量 (ADFI) 和料重比 (F/G)。

2.4.2 血清、肝脏生化指标

所有仔猪禁食 12 h 后, 于试验第 15 天和第 29 天早上前腔静脉采血, 置于普通采血管中, 静置 30 min 后 3500 r/min 离心 10 min, 分离血清, 分装后于 -20℃ 保存待测。于试验第 29 天早上称重采血后, 将仔猪屠宰, 放血、剖开腹腔。迅速分离肝脏, 用预冷生理盐水冲洗, 迅速取样, 放入液氮速冻, 于 -80℃ 保存待测。

测定血清、肝脏总抗氧化能力 (T-AOC)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性以及丙二醛 (MDA) 含量, 所有试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, 详细操作方法参见试剂盒说明书。血清和肝脏中甘油三酯 (TG) 含量为全自动生化分析仪测定。

2.4.3 肝脏组织形态学

肝脏组织石蜡包埋切片: 新鲜肝脏组织固定于 4% 多聚甲醛 24 h 以上, 梯度酒精进行脱水, 常规石蜡包埋, 4 μm 切片。

石蜡切片脱蜡: 依次将切片放入二甲苯 I 20 min - 二甲苯 II 20 min - 无水乙醇 I

10 min - 无水乙醇II 10 min - 95%酒精 5 min - 90%酒精 5 min - 80%酒精 5 min - 70%酒精 5 min - 蒸馏水洗。

苏木素染细胞核：切片入 Harris 苏木素染 3-8 min，自来水洗，1%的盐酸酒精分化数秒，自来水冲洗，0.6%氨水返蓝，流水冲洗。伊红染细胞质：切片入伊红染液中染色 1-3 min。

脱水封片：将切片依次放入 95%酒精 I 5 min - 95%酒精 II 5 min - 无水乙醇 I 5 min - 无水乙醇 II 5 min - 二甲苯 I 5 min - 二甲苯 II 5 min 中脱水透明，将切片从二甲苯拿出来稍晾干，中性树胶封片。光学显微镜下观察、统计、分析。

2.4.4 肝脏油红 O 染色

包埋：将冷冻的肝脏组织根据需要切成小块放于冰托上，用 OTC 包埋剂将组织完全覆盖，放入冰冻切片内冷冻；切片：将冷冻好的组织以及冰托固定在冰冻切片机上，按照需求调整好厚度进行切片，一般切 4~8 μm ；固定：将切好的组织片用载玻片贴起，放入甲醛固定中固定 30 s~1 min。固定后冷冻起备用。

将 OCT 包埋的冰冻组织切片取出复温，将油红 O 母液与蒸馏水按 3:2 比例混合，混合后静置 10 min，过滤后为工作液；切片经蒸馏水洗后，入 60%异丙醇浸洗；将工作液滴加到组织上染色 10 min；将切片入 60%异丙醇分色，镜下控制时间，蒸馏水洗；切片入 Harris 苏木素染 3~8 min，自来水洗，1%的盐酸酒精分化数秒，自来水冲洗，0.6%氨水返蓝，流水冲洗；将切片上的水分甩干，用甘油封片。封片后尽快镜检并拍照，观察肝脏脂质沉积情况。

2.4.5 脂质生成相关基因表达量测定

(1) 总 RNA 提取

取匀浆管，加入 1 ml 的 Trizol Reagent，置于冰上预冷，取 0.1g 组织，加入到匀浆管中，使用匀浆仪充分研磨直至无可见组织块，12000 r/min 离心 10 分钟，转移上清液至新的离心管中。加入 200 μL 氯仿，剧烈震荡 15 s，静置 5 分钟。4℃ 12000 r/min 离心 15 min，小心吸取上清 500 或 600 μL 转到离心管，加入等体积异丙醇，上下颠倒混匀，室温静置 10 min。4℃ 12000 r/min 离心 10min，含有 RNA 的白色沉淀在离心管底部。弃上清，每管加入 1 ml DEPC 水配置的 75%乙醇，涡旋混匀。4℃ 12000 r/min 离心 5min，弃上清，用 100 μL 移液枪将剩余的 75%的乙醇弃掉。在超净台将 RNA 沉淀吹 5~10 min 至半透明胶状。加 30~40 μL DEPC 处理水或 TE 缓冲

液溶解 RNA 沉淀。60°孵育 10 min，小心混匀样品，使用核酸蛋白测定仪检测 RNA 的浓度与纯度，吸光度（OD）260 / 280 在 1.8~2.0 之间较为理想。测定浓度后保存于-80℃冰箱备用。

（2）RNA 反转录为 cDNA

按照下表配制逆转录反应体系，配制完成后放入 PCR 仪，42℃反应 60min，99℃反应 5min，25℃反应 20min。

表 2-2 逆转录反应体系

Table 2-2 Formula of reverse transcription

试剂	使用量
总 RNA	2.5 μg
Oligo(dT) ₂₀	3 μl
5×buffer	5 μl
dNTPs (10 mmol/L)	2.5 μl
RNase 抑制剂 (40 U/μL)	0.5 μl
ReverTra Ace (100 U/μL)	1.25 μl
ddH ₂ O	补足到 25 μl

（3）荧光定量 PCR

PCR 反应体系为 10 μL：5 μL SYBR Premix Ex Taq，0.4 μL 上游引物，0.4 μL 下游引物，1 μL cDNA，3.2 μL ddH₂O。采用 Primer 5.0 软件设计引物，PCR 引物序列见表 2-3。PCR 扩增条件为：95℃预变性 30 s；95℃变性 5 s，在各基因最佳退火温度下退火 20 s，72℃ 20 s，共 40 个循环；PCR 反应后绘制熔解曲线以判断扩增产物的正确性，温度以 0.5℃/5s 的速度从 60℃上升到 95℃。以 β-肌动蛋白为内参，对得到的各样品 CT 值进行均一化处理，在各靶基因与β-肌动蛋白的扩增效率基本一致条件下，以对照组基因的表达水平为基准，通过 2^{-ΔΔCT}法对相关基因的表达水平进行比较分析。

表 2-3 基因引物序列

Table 2-3 Primer sequences of genes

基因名称	引物序列	退火温度
Gene names	Primer sequences (5'—3')	(°C)
固醇调节元件结合蛋白	F: GCTGGTCTGGCTGACGAATG	60
SREBP-1c	R: GCTTGCGATGCCTCCAGAA	
脂肪酸合成酶	F: CTGCTGAAGCCTAACTCCTCG	60
FAS	R: TGCTCCTGCACGTCTCCC	
乙酰辅酶 A 羧化酶	F: TTCCAGGCACAGTCCTTAGG	60
ACC	R: TCATCCAACACGAGCTCAGT	
硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1	F: AGCGTACTACCCTGACTATGGATT	60
SCD1	R: GCTTGGCTGTGCCTTATGAC	
β -肌动蛋白	F: TCCATCGTCCACCGCAAATG	60
β -actin	R: TTCAGGAGGCTGGCATGAGG	
P300-CBP 结合因子	F: CCTGCCGATGGCTATGAAGT	60
PCAF	R: ACAGATGCTTCGGCAGATCC	

2.4.6 Western Blot 检测蛋白表达量

(1) 蛋白的提取

把组织剪切成细小的碎片，融解 Western 及 IP 蛋白质裂解液，混匀。取适当量的裂解液，在使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂 PMSF，使 PMSF 的最终浓度为 1mmol/L。按照每 20mg 组织加入 100-200 μ l 裂解液的比例加入裂解液。用玻璃匀浆器匀浆，直至充分裂解。充分裂解后，10000-14000r/min 离心 3-5 分钟，取上清，根据 BCA 试剂盒的使用方法，测蛋白浓度，-80℃保存备用。按照比例添加 5x loading buffer，至 1x loading buffer 工作液，100℃煮沸 5~10min，混合瞬离备用。

(2) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

胶板的制备：玻璃板和胶条事先洗净、晾干、装好，分离胶的各组份充分混匀后缓慢注入安装好的两玻板间，并在刚注入的分离胶上方轻缓地加入 1 ml 75%乙醇液封以隔绝空气，注意加入乙醇时避免在固定位置一次性打入，冲散分离胶。室温静置一段时间后待分离胶凝固，倒弃乙醇，用滤纸吸干残留液体，再将混合好的浓

缩胶加入两玻板间，及时将梳子垂直插入胶内，室温静置 30 min。按照下表进行分离胶与浓缩胶的制备。

表 2-4 分离胶及浓缩胶成分表

Table 2-4 The formula of separating gal and stacking gal

试剂	10%分离胶	5%浓缩胶
H ₂ O	4.0	5.5
30%Acrylamide	3.3	1.3
1.5MTris-HCl (ph8.8)	2.5	--
1.5MTris-HCl (ph6.8)	--	1.0
10%SDS	0.1	0.08
10%AP (过硫酸铵)	0.1	0.08
TEMED	0.004	0.008

点样及电泳：拆除两玻板间的胶条，重新组装好玻板，倾斜着放入装有电泳液的电泳槽中，避免向凝胶底部引入气泡。往内槽中央加满电泳液，垂直向上拔去梳子，保证点样孔完整。蛋白样品在沸水中煮 8~10 min，置于冰上冷却，样品及预染蛋白 marker 加入上样孔内。采用 80 V 低电压进行浓缩胶电泳，当样品进入分离胶后将电压调高至 120 V，根据预染的蛋白 marker 判断目的蛋白的位置决定电泳时间。

电转：电泳结束后将分离胶切下，转移至湿润的滤纸上，硝酸纤维素（PVDF）膜提前在甲醇中浸泡 15s 活化，按以下顺序组装电转“三明治”：滤纸、分离胶、PVDF 膜、滤纸，用玻棒赶尽每层之间的气泡，装好夹子后放入电转槽中，注意正负极的安装，倒入转膜缓冲液，整个装置置于装满冰的冰盒中，恒流 200 mA 转膜 1 h。

封闭：电转结束后，PVDF 膜用 TBST 漂洗 3 次，每次 5 min，漂洗后的膜转移至封闭液中，摇床室温低速封闭 1~2 h。

一抗孵育：一抗按一定的比例用一抗稀释液稀释之后制成工作液，将一抗工作液及 PVDF 膜放入分子杂交袋中，室温下摇动孵育 1~2 h 或 4℃孵育过夜。

二抗孵育：一抗孵育结束后，PVDF 膜用 TBST 漂洗 3 次，每次 10 min。二抗按一定稀释比例用二抗稀释液稀释之后制成工作液，将二抗工作液及 PVDF 膜加入杂交袋中，摇床室温低速孵育 2 h。

暗室显影：二抗孵育结束后，PVDF 膜用 TBST 漂洗 3 次，每次 10 min，用 TBS 漂洗 3 次，每次 10 min。根据化学发光显色试剂盒说明书进行显色，压片。

2.4.7 免疫共沉淀

每 100 mg 肝脏组织加入 1 ml 裂解液，在冰上裂解 30 min；细胞处理完成后弃去培养液，用 PBS 清洗 3 遍，加入裂解液，冰上裂解 30 min。将裂解液转移到离心管中，4℃条件下 12000 r/min 离心 15 min 获得上清液。

取 100 μ l 蛋白溶液，用于 western blot 检测。剩余蛋白溶液加入 agrose 交联后的乙酰化赖氨酸抗体 20 μ l，轻混匀后，4℃反转孵育过夜。

4℃，2000 r/min，离心 2 min，弃上清，使用预冷的裂解液洗涤 3~5 次；弃上清，加上样缓冲液，混匀后 100℃变性 5 min，然后按照上述实验步骤进行电泳。

2.5 数据处理与统计分析

所有数据均采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析。试验数据采用单因素方差分析，Duncan 氏法进行多重比较，结果以平均值形式表示， $P < 0.05$ 表示差异显著， $P > 0.05$ 表示差异不显著。

3 结果与分析

3.1 山竹醇对氧化应激仔猪生长性能的影响

由表 2-5 可知，注射 Diquat 之前（第 1~14 天），与对照组比较而言，不同浓度山竹醇组仔猪的 ADG、ADFI 和 F/G 没有显著差异（ $P > 0.05$ ）。注射 Diquat 后（第 15~28 天），应激组仔猪的 ADG 和 ADFI 显著降低（ $P < 0.05$ ），F/G 显著升高（ $P < 0.05$ ）。除此之外，我们发现 200、400、600 mg/kg 山竹醇组的 ADFI 和 ADG 显著高于氧化应激组（ $P < 0.05$ ），400 mg/kg 山竹醇组的 F/G 显著低于氧化应激组（ $P < 0.05$ ），其他两个山竹醇组的 F/G 与氧化应激组无显著差异（ $P > 0.05$ ）；400、600 mg/kg 山竹醇组的 ADG 显著高于 200 mg/kg 山竹醇组（ $P < 0.05$ ）；200、400、600 mg/kg 山竹醇组的 ADFI 和 F/G 无显著差异（ $P > 0.05$ ）。

表 2-5 日粮添加山竹醇和氧化应激对仔猪生长性能的影响

Table 2-5 Effects of dietary garcinol supplementation and oxidative stress on growth

performance of piglets

项目	对照组	应激组	山竹醇组 Garcinol group			SEM
Items	Control group	Stress group	200mg/kg	400mg/kg	600mg/kg	
第 1~14 天						
平均日采食量 ADFI (g/d)	627.61	621.53	626.75	618.20	624.60	17.27
平均日增重 ADG (g/d)	429.87	440.80	438.29	451.46	442.98	10.13
料肉比 F/G	1.46	1.41	1.43	1.38	1.41	0.02
第 15~28 天						
平均日采食量 ADFI (g/d)	1087.26 ^a	980.39 ^b	1012.78 ^a	1004.85 ^a	1040.56 ^a	27.93
平均日增重 ADG (g/d)	621.29 ^a	420.77 ^d	464.58 ^c	543.16 ^b	512.59 ^b	22.36
料肉比 F/G	1.75 ^{bc}	2.33 ^a	2.18 ^{ab}	1.85 ^{bc}	2.03 ^{abc}	0.05

注：同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)，相同或无字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)， $n = 6$ 。下表同。

Note: In the same row, values with different letter superscripts indicates significant difference ($P < 0.05$), and with the same or no letter superscripts indicates no significant difference ($P > 0.05$), $n = 6$. The same as below.

3.2 山竹醇对氧化应激仔猪血清抗氧化功能的影响

由表 2-6 内数据可知，注射 Diquat 前，和对照组相较而言，200 mg/kg 山竹醇组的仔猪血清 SOD、GSH-Px、T-AOC 活性及 MDA 水平没有显著差异 ($P > 0.05$)；而 400、600 mg/kg 山竹醇组中仔猪血清 SOD 活性以及 T-AOC 含量显著提高 ($P < 0.05$)，但血清 GSH-Px 活性以及 MDA 水平没有显著差异 ($P > 0.05$)。注射 Diquat 后，与对照组相较而言，应激组仔猪血清 SOD、GSH-Px 活性显著降低 ($P < 0.05$)，血清 MDA 水平显著增加 ($P < 0.05$)，而 T-AOC 含量没有显著差异 ($P > 0.05$)；与应激组相比，200、400、600 mg/kg 山竹醇组仔猪的血清 SOD、GSH-Px 活性均显著提高 ($P < 0.05$)，MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$)。

表 2-6 山竹醇对氧化应激仔猪血清抗氧化功能的影响

Table 2-6 Effects of garcinol supplementation on serum antioxidant capacity of piglets

under oxidative stress						
项目	对照组	应激组	山竹醇组 Garcinol group			SEM
Items	Control group	Stress group	200mg/kg	400mg/kg	600mg/kg	
第 15 天						
SOD (U/ml)	83.55 ^b	84.13 ^b	85.15 ^b	91.42 ^a	89.80 ^a	1.63
T-AOC (U/ml)	1.93 ^b	1.82 ^b	2.10 ^{ab}	2.25 ^a	2.15 ^a	0.05
GSH-Px (U/ml)	435.61	440.26	437.12	445.19	441.68	8.21
MDA(nmol/ml)	1.73	1.70	1.67	1.62	1.64	0.15
第 29 天						
SOD (U/ml)	90.83 ^a	77.80 ^c	83.73 ^b	88.52 ^a	84.92 ^b	7.93
T-AOC (U/ml)	2.27	2.07	2.14	2.20	2.18	0.22
GSH-Px (U/ml)	447.50 ^a	385.72 ^c	407.97 ^b	436.40 ^a	412.72 ^b	25.17
MDA(nmol/ml)	1.94 ^c	2.75 ^a	2.34 ^b	1.90 ^c	2.27 ^b	0.24

3.3 山竹醇对氧化应激仔猪肝脏抗氧化功能的影响

通过表 2-7 中数据可以得知, 和对照组相较而言, 应激组仔猪肝脏抗氧化酶 SOD、GSH-Px 活性显著降低且 MDA 水平显著增加 ($P < 0.05$), 但 T-AOC 含量没有显著差异 ($P > 0.05$); 与应激组相比, 200、400、600mg/kg 山竹醇组中仔猪肝脏抗氧化酶 SOD、GSH-Px 活性均显著增加 ($P < 0.05$), 并随着山竹醇添加水平的增加呈现先升高后下降的趋势, 其中山竹醇添加水平为 400 mg/kg 效果最好, 且三个山竹醇组脂质过氧化物 MDA 水平均显著低于应激组 ($P < 0.05$)。

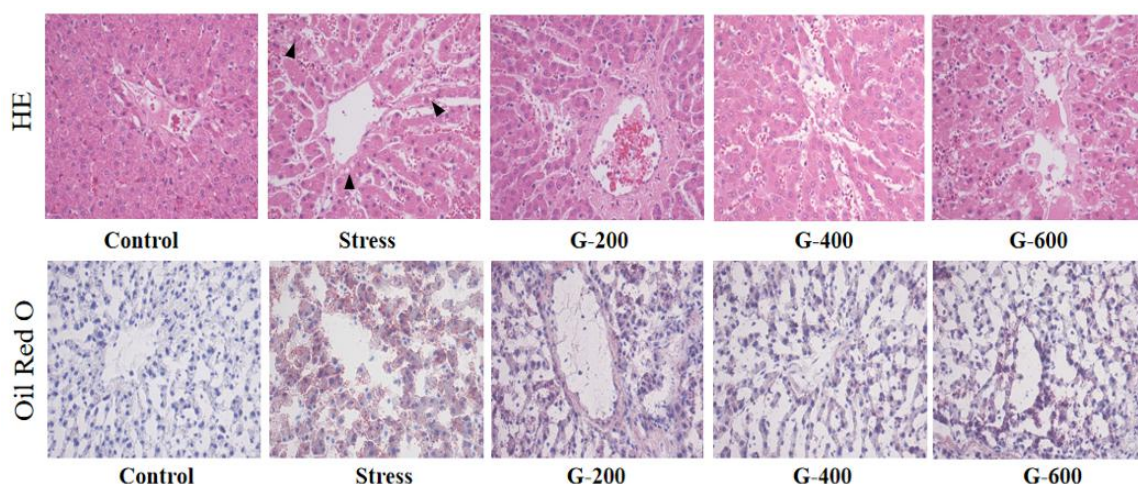
表 2-7 山竹醇对氧化应激状态下仔猪肝脏抗氧化功能的影响

Table 2-7 Effects of garcinol supplementation on liver antioxidant capacity of piglets
under oxidative stress

项目	对照组	应激组	山竹醇组 Garcinol group			SEM
Items	Control group	Stress group	200mg/kg	400mg/kg	600mg/kg	
SOD (U/mg prot)	412.08 ^a	354.02 ^c	376.83 ^b	407.03 ^{ab}	390.45 ^b	25.72
T-AOC (U/mg prot)	2.57	2.14	2.27	2.43	2.36	0.25
GSH-Px (U/mg prot)	126.82 ^a	99.17 ^d	110.27 ^c	124.62 ^a	118.83 ^b	11.43
MDA(nmol/mg prot)	2.25 ^d	3.69 ^a	3.01 ^b	2.41 ^d	2.78 ^c	0.38

3.4 山竹醇对仔猪肝脏组织形态及脂质沉积的影响

由图 2-1 中肝脏 HE 染色结果表明, 对照组仔猪肝脏结构正常, 肝细胞大小一致, 排列整齐; 氧化应激组仔猪肝脏发生明显病理改变, 肝小叶结构紊乱, 肝细胞肿胀; 200、400 和 600 mg/kg 山竹醇组组肝细胞部分肿胀, 与应激组相比肝脏组织结构有所恢复。油红 O 染色结果表明, 对照组仔猪肝细胞中基本无红色颗粒, 结构正常, 肝细胞排列整齐; 氧化应激组仔猪肝脏组织中有许多红色颗粒, 脂质积聚显著增加, 且结构被破坏, 肝细胞排列紊乱; 日粮添加山竹醇组红染颗粒减少, 减少了肝脏中脂质沉积。



注: Control: 对照组; Stress: 应激组; G-200: 200mg/kg 山竹醇组; G-400: 400mg/kg 山竹醇组; G-600: 600mg/kg 山竹醇组, $n = 6$

Note: Control represents control group, Stress represents stress group, G-200 represents 200mg/kg garcinol group, G-400 represents 400mg/kg garcinol group, G-600 represents 600mg/kg garcinol group, $n = 6$

图 2-1 山竹醇对氧化应激仔猪肝脏组织形态和脂质沉积的影响 ($\times 200$)

Fig. 2-1 Effects of garcinol supplementation on liver tissue morphology and lipid deposition of piglets under oxidative stress

3.5 山竹醇对氧化应激仔猪血清和肝脏脂质水平的影响

由图 2-2 内 A 图结果可知, 氧化应激组血清 TG 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$); 日粮添加 200 mg/kg 山竹醇对应激组血清 TG 水平没有显著影响 ($P > 0.05$); 日粮添加 400、600 mg/kg 山竹醇可显著降低氧化应激组血清 TG 水平 ($P < 0.05$); 三个山竹醇组间 TG 含量没有显著差异 ($P > 0.05$)。通过图 2-2 中 B 图结果我们发现, 氧化应激组肝脏 TG 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$); 添加 200、400 和 600 mg/kg 山竹醇可显著降低应激组肝脏 TG 含量 ($P < 0.05$), 且三组之间没有显著差异。

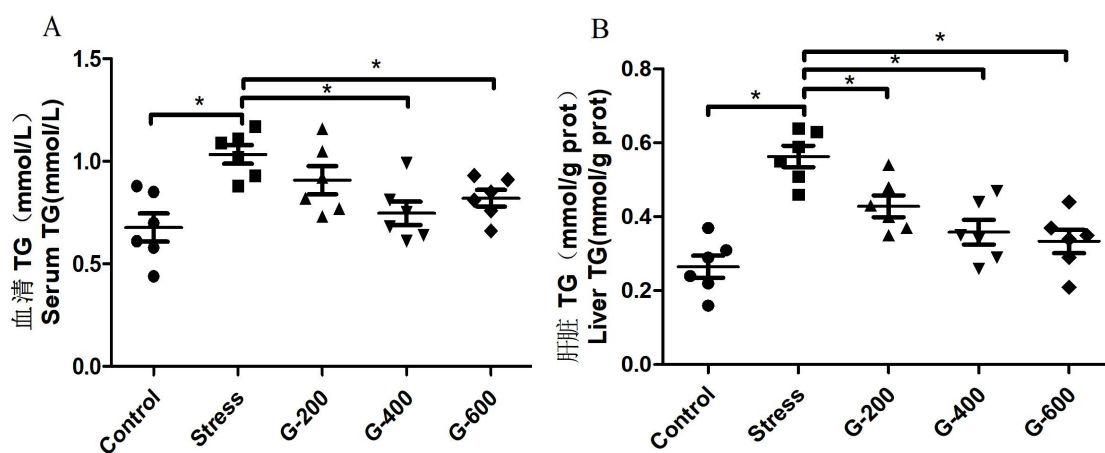


图 2-2 山竹醇对氧化应激仔猪血清和肝脏甘油三酯水平的影响

Fig. 2-2 Effects of garcinol supplementation on triglycerides levels in blood and liver of piglets under oxidative stress

*表示差异显著 ($P < 0.05$), **表示差异极显著 ($P < 0.01$), $n = 6$

* indicates significant difference ($P < 0.05$), ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$), $n = 6$

3.6 山竹醇对氧化应激仔猪肝脏脂肪合成相关基因表达量的影响

通过图 2-3 中数据我们发现,和对照组相较而言,氧化应激组肝脏 *SREBP-1c*、*FAS*、*ACC*、*SCD1* 基因表达量显著增加 ($P < 0.05$)。与应激组相比,日粮添加山竹醇 200 mg/kg 可以显著缓解氧化应激状态下 *SREBP-1c*、*ACC* 基因的表达量增加 ($P < 0.05$),但对 *FAS*、*SCD1* 基因的表达量没有显著影响 ($P > 0.05$);日粮添加山竹醇 400 mg/kg 可以显著降低氧化应激条件下 *SREBP-1c*、*FAS*、*ACC*、*SCD1* mRNA 的表达量 ($P < 0.05$);日粮添加山竹醇 600 mg/kg 可以显著下调氧化应激条件下 *SREBP-1c*、*FAS*、*ACC* mRNA 的表达量 ($P < 0.05$);日粮添加山竹醇 200、400、600 mg/kg 组三组间对于 *FAS*、*ACC*、*SCD1* mRNA 表达量的影响没有显著差异 ($P > 0.05$)。

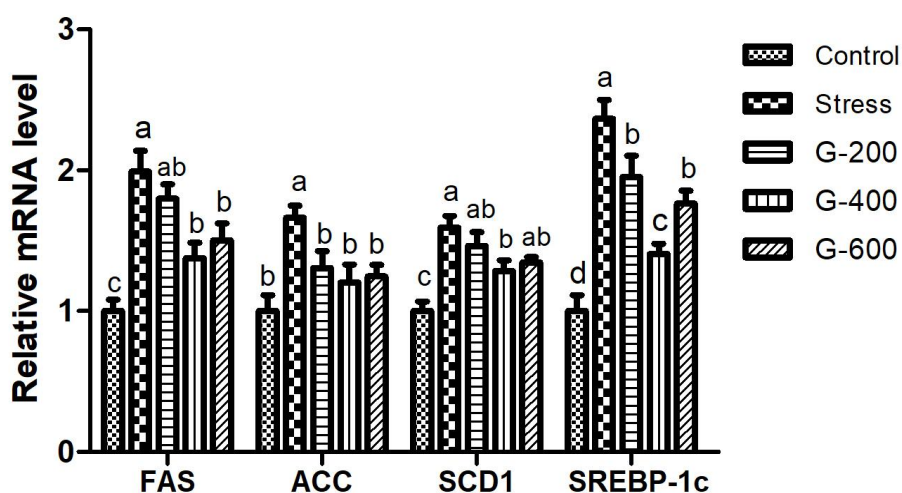


图 2-3 山竹醇对氧化应激状态下仔猪脂肪合成相关基因 mRNA 表达的影响

Fig. 2-3 Effects of garcinol supplementation on lipid synthesis related genes mRNA expression of piglets under oxidative stress

3.7 山竹醇对氧化应激仔猪 PCAF 表达的影响

通过图 2-4 中数据我们发现，和对照组相较而言，氧化应激组 PCAF 基因表达水平显著上调 ($P < 0.05$)；和应激组相较而言，200 mg/kg 山竹醇组 PCAF 基因表达水平无显著变化 ($P > 0.05$)，400、600 mg/kg 山竹醇组 PCAF 基因表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

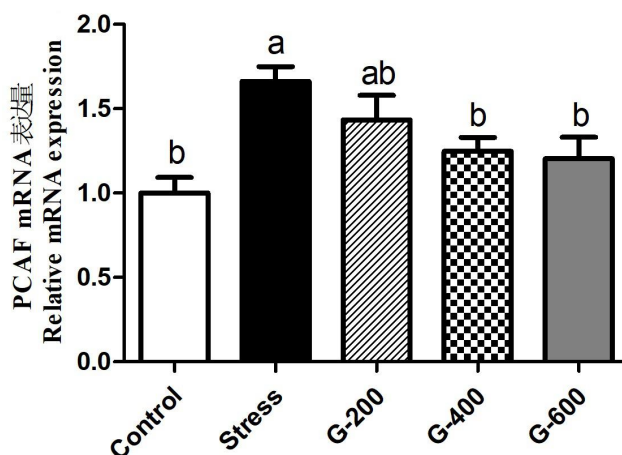


图 2-4 山竹醇对氧化应激仔猪 PCAF 表达的影响

Fig.2-4 The effect of garcinol on expression of PCAF in piglets under oxidative stress

4 讨论

4.1 山竹醇和氧化应激对仔猪生长性能的影响

有研究表明, Diquat 造模的氧化应激可以显著抑制低仔猪的 ADFI 与 ADG, 并且显著增加 F/G, 降低仔猪的生长性能 (Xu et al 2018, Cao et al 2018)。Muhammed 等 (2018) 研究发现, 在大鼠日粮中添加 300 mg/kg 和 2000 mg/kg 的山竹醇饲喂 28 天, 并未引起大鼠发育迟缓, 以及内脏脏器的病理变化, 证实了山竹醇的低毒性。这表明在仔猪日粮中应用山竹醇是切实可行的。此外, 本试验研究结果表明, 在正常饲养条件下日粮添加山竹醇对仔猪的生长性能无显著差异。除此之外我们发现本试验中氧化应激组仔猪的 ADFI 与 ADG 显著低于对照组, 且 F/G 显著高于对照组; 在日粮中添加不同水平山竹醇后, 应激仔猪的 ADFI 和 ADG 升高, F/G 降低, 说明山竹醇可以缓解氧化应激导致的生长性能下降情况。

4.2 山竹醇对氧化应激仔猪抗氧化功能的影响

仔猪处于正常生理条件时, 体内氧化体系与抗氧化体系维持平衡状态, 可以有效清理自由基, 保护机体免受损伤; 而氧化应激状态下, 仔猪体内氧化体系与抗氧化体系平衡被打破 (Bhat et al 2015)。SOD、GSH-Px 是动物体内天然的自由基清除剂, T-AOC 水平则反映了机体总抗氧化能力的强弱。研究发现, 氧化应激会显著降低仔猪血液中的 SOD、GSH-Px、CAT 等抗氧化酶活性, 提高 MDA 水平 (Lv et al 2012, Wang et al 2013)。肝脏作为机体内非常活跃的器官, 在氧化应激状态下容易受到损伤, 氧化应激可以显著降低仔猪肝脏中抗氧化酶活性, 提高 MDA 水平 (袁施彬和陈代文 2009, Mao et al 2014)。本试验结果表明, Diquat 显著降低仔猪的血清、肝脏抗氧化酶 SOD、GSH-Px 活性, 且显著升高脂质过氧化物 MDA 水平, 降低仔猪的抗氧化能力, 让仔猪处于氧化应激状态, 与前人研究结果一致; 而在日粮中添加山竹醇之后, 可以显著缓解氧化应激导致的血清和肝脏中抗氧化酶活性下降以及 MDA 水平的上升, 且山竹醇添加水平为 400 mg/kg 时效果最佳。仔猪处于正常生理状态时, 日粮添加山竹醇也能够提高血清抗氧化功能。研究表明, 日粮添加抗氧化剂不仅能够改善应激猪的抗氧化能力, 还可提高正常生理状态下猪的抗氧化功能 (田刚等 2018)。山竹醇具有良好的自由基清除能力以及抗氧化活性, 研究表明, 日粮中添加山竹醇可以降低小鼠肝脏中 MDA 和 ROS 的含量, 同时增加 GSH-Px 的活性 (Negi and Jayaprakasha 2006, Jing et al 2014)。结合本试验结果, 我们推测山

竹醇对猪只的保护作用或许是通过提高动物体的抗氧化能力来实现的。对山竹醇的抗氧化机制进行研究, 体外试验和体内试验结果都显示山竹醇能够抑制超氧阴离子和一氧化氮等自由基的形成, 或利用单电子转移和氧自由基反应, 形成共振稳定中间体, 可以预防自由基种类的增加, 从而减少氧化损伤, 最终发挥其抗氧化作用 (Yamaguchi et al 2000a, Sang et al 2002, Liao et al 2005, Tanaka et al 2010)。

4.3 山竹醇对仔猪肝脏组织形态及脂质沉积的影响

肝脏在脂类的合成、分解、转运等生物过程具有重要作用, 而肝脏作为氧化应激的重要靶器官, 在氧化应激条件下会发生脂质代谢紊乱。氧化应激会影响线粒体脂肪酸氧化, 干扰脂蛋白的组装和分泌, 使合成的甘油三酯在肝脏内积聚 (Pan et al 2004, Bonnard et al 2008)。氧化应激还会干扰胰岛素介导的信号转导, 使胰岛素信号通路受损, 造成细胞的胰岛素抵抗 (Evans et al 2003, Rains and Jain 2011)。胰岛素抵抗和脂质代谢紊乱致使脂肪在肝细胞中的积聚, 特别是脂肪酸和甘油三酯 (Day and James 1998)。

本试验中, 氧化应激导致肝脏组织结构损伤, 并且使得肝脏中脂质沉积明显增多, 而在日粮中补充山竹醇后, 肝脏组织结构有了一定程度的恢复, 同时也减少了应激导致的脂质沉积的增加, 在三个不同添加水平的山竹醇组中, 日粮中补充 400、600 mg/kg 山竹醇组中的肝脏组织形态和脂质沉积的改善情况较为明显。Panda 等 (2012) 研究发现, 山竹醇可以增加肝脏内源抗氧化剂, 减少脂质过氧化反应, 具有保护肝脏的效应。由此可见, 在日粮中添加山竹醇可以提高仔猪的抗氧化能力, 从而减少氧化应激带来的组织损伤。

4.4 山竹醇对氧化应激仔猪肝脏脂肪合成的作用

肝脏中具有丰富的与脂质合成相关的酶类, 包括 FAS、ACC、SCD1 等, 它们在脂质合成中具有重要作用, 而 SREBP-1c 是调节脂质合成的重要转录因子之一, 因此我们将它们作为反映山竹醇调控脂质合成作用的重要指标。氧化应激会导致肝细胞内 SREBP-1c、FAS、ACC、SCD1 表达量升高, 且随着氧化应激的加重, 基因表达水平随之升高; 氧化应激还会导致脂质沉积增多, 细胞内甘油三酯水平上升 (Sekiya et al 2008)。有研究显示, 山竹醇对脂质合成具有调控作用, 它可以通过下调脂肪细胞内 PPAR γ 和 FAS 的基因与蛋白表达减少脂肪细胞内 TG 合成与脂质沉积 (Hsu et al 2012)。除此以外, 山竹醇也可通过降低脂肪酸诱导的肝细胞内 FAS

的表达来减少脂质沉积（俞慧宏等 2017）。本试验发现，和对照组相较而言，氧化应激显著增加了肝脏 *SREBP-1c*、*FAS*、*ACC*、*SCD1* mRNA 表达量；与应激组相比，山竹醇组肝脏 *SREBP-1c*、*FAS*、*ACC*、*SCD1* mRNA 表达量随着日粮中山竹醇添加浓度的升高不断减少，山竹醇添加水平为 400、600 mg/kg 时改善效果较佳。试验结果还发现，氧化应激显著增加了血清和肝脏中 TG 的水平，而日粮中添加山竹醇可以抑制机体中脂肪的增加。综上所述，山竹醇可以减少脂肪合成的增加。

5 小结

日粮添加山竹醇能够提高机体的抗氧化功能，缓解 Diquat 诱导的氧化应激，提高应激仔猪的生长性能；还可改善应激导致的脂质合成的增加，减少脂质沉积，保护肝脏结构和功能的完整性。

第三章 山竹醇调控 PCAF 对猪肝细胞脂肪合成的作用

1 前言

近来的研究表明, PCAF 可以通过乙酰化代谢酶和转录因子来调控脂肪合成, USF-1 广泛存在于真核生物中, 研究表明, 大多参与脂肪酸和甘油三酯合成的酶在其近端启动子区域都含有 E 盒与固醇调节元件 (SRE), 是在转录水平上被调节的, 可能受到 USF-1 的转录调控 (Wang et al 2013)。在 USF-1 基因敲除小鼠中, 脂质合成基因的转录受到严重影响。此前又有研究报道, 氧化应激条件下, PCAF 的表达水平升高 (Cao et al 2016)。因此我们推测, 氧化应激条件下 PCAF 可能通过乙酰化 USF-1 来调节脂肪合成。本试验通过胶原酶灌流法分离仔猪肝细胞, 然后利用 5 μ M、10 μ M、20 μ M 这三种浓度的山竹醇作用于细胞, 测定细胞脂肪合成、PCAF 表达、USF-1 乙酰化水平等, 探究 PCAF 调控脂肪合成的作用机制。

2 材料与方法

2.1 主要溶液及其配制

1) 灌流缓冲液I: 在 PBS 溶液中加入终浓度为 5 mmol/L 的 EDTA-2Na, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 分装后 4℃保存。

2) 灌流缓冲液II: PBS 溶液, 称取 8 g NaCl、0.20 g KCl、3.58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.24 g KH_2PO_4 , 溶于三蒸水中, 调节 pH 至 7.4, 定容至 1 L, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 分装后 4℃保存。

3) 灌流缓冲液III: 在 PBS 溶液中加入灭菌的 64 g/L CaCl_2 溶液, 使含有 0.64 g/L CaCl_2 , 现配现用。

4) 灌流缓冲液IV: 在灌流缓冲液III中加入的 IV 型胶原酶母液, 使含有 0.5 g/L 胶原酶, 现配现用。

5) IV 型胶原酶母液 (20 g/L, 50 \times): 将 0.5 g 的 IV 型胶原酶干粉溶于 25 ml 的 PBS 溶液中配成 20 g/L 的母液, 使用一次性针头过滤器过滤除菌, 分装后-20℃保存。

6) CaCl_2 母液 (64 g/L, 100 \times): 称 1.28 g 无水 CaCl_2 溶于 20 ml 三蒸水中配成 64 g/L 的母液, 使用一次性针头过滤器过滤除菌, 现配现用。

7) 地塞米松 (40 μ g/ml): 添加时按 1%添加。

8) 人胰岛素 (10 $\mu\text{g/ml}$) : 添加时按 1%添加即可。

9) HGF (10 ng/ml) : 10 μg 干粉溶于 20 μl 无菌水中配成 0.5 mg/ml 的母液, 之后将其稀释为 1 $\mu\text{g/ml}$, 添加时按 1%添加。

10) EGF (20 ng/ml) : 200 μg 干粉溶于 2 ml 无菌水中配成 0.1 mg/ml 的母液, 之后将其稀释为 2 $\mu\text{g/ml}$, 添加时按 1%添加。

11) r/minI-1640 贴壁培养液: 10%新生胎牛血清 (FBS)、10 ng/ml 的肝细胞生长因子 HGF、20 ng/ml 的表皮生长因子 EGF、10 $\mu\text{g/ml}$ 人胰岛素、40 $\mu\text{g/ml}$ 地塞米松、双抗 (100 IU/ml 青霉素及 100 IU/ml 链霉素)。

2.2 仔猪原代肝细胞分离与培养方法

2.2.1 仔猪原代肝细胞的分离

1) 手术前仔猪自由饮水并禁食过夜, 颈部肌肉注射麻醉剂, 麻醉仔猪;

2) 待仔猪麻醉后, 仰卧位保定在小动物手术台上, 使用 75%酒精浸泡后的纱布擦拭仔猪全身, 对仔猪进行消毒, 消毒完成后转入超净工作台内;

3) 无菌条件下打开腹腔, 暴露肠系膜静脉, 用玻璃分针分离出一段后腔静脉, 结扎远肝门-端静脉, 近肝门-端静脉用动脉夹夹住并插管 (输液管钝性去针头部分), 结扎绑紧后将动脉夹松开形成通路;

4) 进行灌流分离。第一步为消化前灌流, 以 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的灌流液 I (含可结合 Ca^{2+} 的螯合剂 EDTA, 可使细胞间桥粒断裂) 按 50 ml/min 的速率灌注, 待肝脏稍为鼓胀时剪开后腔静脉胸段, 持续大约 15 min (以流出物中不含或只含较少红细胞为宜)。接着以同样速率灌注 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的灌流缓冲液 II 持续 5 min (冲洗为目的)。再以同样速率灌注 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的灌流液 III (含 Ca^{2+} 利于胶原酶更好发挥作用), 持续 5 min ;

5) 待流出的液体变清后, 进行第二步消化灌流, 以 20 ml/min 速率灌入 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的含 IV 型胶原酶的灌流液 IV, 并用镊子夹住后腔静脉, 使灌注液在肝脏内稍作停留至肝脏膨起, 然后松开镊子, 反复 3 次, 同时用 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 PBS 缓冲液间断地淋在肝脏的表面, 使肝脏的温度维持在 37 $^{\circ}\text{C}$ 左右, 以利于酶的消化, 20~30 min 后肝脏逐渐消化;

6) 轻微触动肝脏被膜, 表现比较松软后, 摘取肝脏, 放入一无菌平皿中, 加入 5 ml 预冷的 Hanks 液, 剔除胆囊、血管、脂肪和结缔组织, 剪去肝脏周边消化不完

全的部分；

7) 用镊子撕掉肝脏包膜，剪碎肝组织，大口径吸管轻轻吹打，随后过 100 目、200 目、400 目细胞筛，所得肝细胞悬液用基础培养液清洗 2 次（4℃，500 r/min 离心 5 min）。

2.2.2 猪原代肝细胞的培养

用 RPMII-1640 贴壁培养液重悬细胞，稀释到细胞终密度约为 $7 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 个/cm²，并接种于培养皿上，置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度条件下的细胞培养箱内培养。4h 细胞贴壁后，用生长培养液（含 10% FBS 及 100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 1640 培养液）全量换液，尽量去除死细胞与组织碎片，48 h 后再用生长培养基全量换液。

2.3 试验处理

试验一采用不同浓度的 H₂O₂ 处理肝细胞不同时间，从中筛选出对肝细胞造成氧化损伤的 H₂O₂ 处理的适宜浓度及时间。细胞接种到 96 孔细胞培养板后，更换新的处理液，H₂O₂ 处理液浓度为 0、200 μM、400 μM、600 μM 和 800 μM，处理时间为 2 h、4 h 和 6 h。通过 MTT 法检测细胞活力，收集细胞和培养液测定抗氧化指标，包括 SOD、GSH-Px、MDA 和 T-AOC。每次试验平行复孔 6 个，采用每次试验所得平均值进行统计分析。

试验二通过采用测定山竹醇（0，5，10，20，40，80 μM）处理细胞 24h 对细胞活力的影响来确定山竹醇处理肝细胞的安全浓度，然后通过添加不同浓度（安全浓度范围内）山竹醇探究山竹醇对猪肝细胞氧化应激状态下脂肪合成的调控作用。试验设置对照组、应激组、GL（低浓度山竹醇）组、GM（中浓度山竹醇）组、GH（高浓度山竹醇）组五个组，测定 PCAF 表达水平、USF-1 乙酰化水平及脂肪合成能力。

2.4 MTT 法检测细胞活力

1) 取对数生长期的肝细胞按照 1×10^5 个/ml 的密度接种于 96 孔板中，每孔 100 μl，5% CO₂，37℃ 孵育 24 小时；

2) 换含不同浓度 H₂O₂（0、200 μM、400 μM、600 μM 和 800 μM）的培养基孵育细胞 2 h、4 h 和 6 h。等体积培养基作为空白对照组，每组做 6 个复孔；

3) H₂O₂ 处理之后用 PBS 缓冲液洗两次，每孔加入 10 μl 的 MTT 溶液(5 mg/ml，

即 0.5% MTT), 继续培养 4 h, 弃上清液。

4) 每孔加入 150 μ l 的二甲基亚砷 (DMSO), 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶标仪 OD 490 nm 处测量各孔的吸光度值。

5) 根据细胞存活率 = (试验孔 OD₄₉₀ - 空白孔 OD₄₉₀) / (对照组 OD₄₉₀ - 空白孔 OD₄₉₀) \times 100%, 计算细胞活力。

试验孔: 含有细胞的培养基、MTT、DMSO、H₂O₂

对照孔: 含有细胞的培养基、MTT、DMSO

空白孔: 不含细胞和 H₂O₂ 的培养基、MTT、DMSO

筛选出细胞存活率在 60%~70% 之间的 H₂O₂ 处理浓度和时间, 用于后续指标测定。

2.5 细胞抗氧化指标检测

取对数生长期的肝细胞接种在 6 孔板中, 1 ml/孔, 孵育 24 小时; 根据筛选出的 H₂O₂ 处理浓度和时间, 换含不同浓度的 H₂O₂ 的培养基处理细胞一定时间, 换全培养液孵育 12 小时; 然后用 PBS 洗 1~2 次, 加入适量 0.25% 的胰酶并置于 37℃ 培养箱内消化 2~3 min, 在显微镜下观察细胞变圆且细胞间隙变大时, 加入适当体积的完全培养基终止消化, 用移液枪吹打待细胞完全脱落后, 移入无菌离心管内, 800 r/min 离心 5 min, 沉淀细胞。吸弃上清液, 加入适量 PBS 重悬细胞, 之后超声波破碎细胞, 每个处理组均设 6 个重复。测定细胞内超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性以及丙二醛 (MDA) 含量, 所有试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, 详细操作方法参见试剂盒说明书。

2.6 脂质生成相关基因表达量测定

脂质生成相关基因表达量测定同第二章。

2.7 Western Blot 检测蛋白表达量

原代肝细胞在生长培养下培养 48 h 以后, 吸干培养液, 用 PBS 冲洗细胞 2~3 次, 最后一次彻底吸干残留液。加入适当体积的 RIPA (使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂) 于培养板内 3~5 min。期间反复晃动培养板, 使试剂与细胞充分接触。用细胞刮刀将细胞及试剂刮下, 收集到 1.5 ml 离心管中。冰浴 30 min, 期间用移液器反复吹打, 确保细胞完全裂解。12000 r/min 离心 5 min, 收集上清, 即为总蛋白溶液, 利用 BCA 法测蛋白浓度。随后小心吸取上清液移至干净预冷的离心管中, -80℃ 保存

备用，短期保存可至于 -20°C 。后续步骤同第二章。

2.8 免疫共沉淀

免疫共沉淀步骤同第二章。

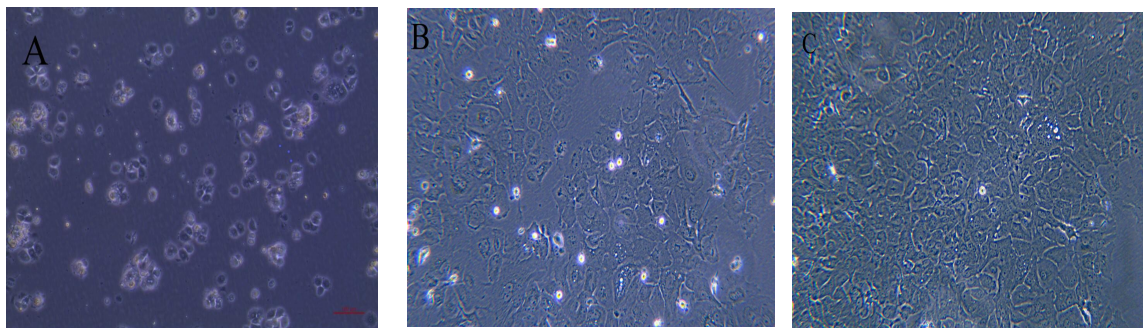
2.9 数据处理与统计分析

所有数据均采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析。试验数据采用单因素方差分析，Duncan 氏法进行多重比较，结果以平均值形式表示， $P < 0.05$ 表示差异显著， $P > 0.05$ 表示差异不显著。

3 结果与分析

3.1 仔猪原代肝细胞的形态观察

利用胶原酶灌流法分离仔猪原代肝细胞，发现细胞呈圆球状，散在状态分布，培养 4 h 后，肝细胞开始贴壁（见图 3-1A）；培养 24 h 后，肝细胞胞体变大变平，向外延伸，呈不规则的多边形，相邻的肝细胞之间建立了连接（见图 3-1B）；培养 48 h 后，肝细胞间的连接愈发紧密，形成岛状结构，基本铺满培养皿（见图 3-1C）。



A: 接种 4h, B: 接种 24h, C: 接种 48h

图 3-1 仔猪肝细胞形态

Fig. 3-1 Morphology of hepatocytes in piglets

3.2 H_2O_2 处理对肝细胞活力的影响

为了筛选出 H_2O_2 诱导肝细胞氧化应激的适宜浓度以及时间，添加 0、200、400、600、800 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度梯度的 H_2O_2 分别处理肝细胞 1 h、2 h、4 h。根据图 3-2 中数据可知， H_2O_2 对于肝细胞的细胞活性具有时间剂量依赖性效应，伴随着 H_2O_2 添加剂量的加大，肝细胞活性不断降低；而在相同浓度条件下，随着处理时间的增加，肝细胞活性也不断下降。和对照组比较而言，400 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理肝细胞 1

h 的细胞活性显著降低 ($P < 0.05$), 600、800 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理肝细胞 1 h 的细胞存活率极显著降低 ($P < 0.01$), 而处理时间增加到 2 h 和 4 h 时, 200~800 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理之后肝细胞存活率均显著降低 ($P < 0.05$)。细胞存活率在 60%~70% 之间的 H_2O_2 适宜处理剂量和时间为 600 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 作用肝细胞 1 h, 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 作用肝细胞 2 h, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 作用肝细胞 4 h, 存活率分别为 60.40%、63.50%、70.00%。

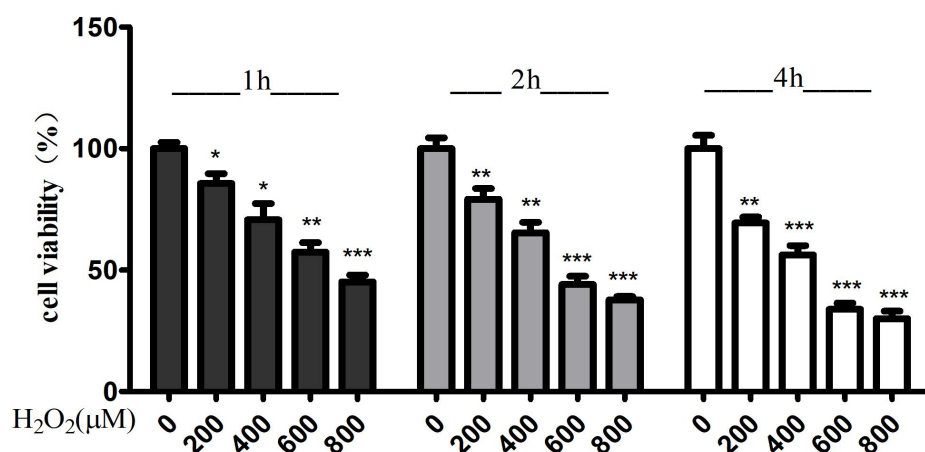


图 3-2 H_2O_2 处理对肝细胞存活率的影响

Fig. 3-2 Effect of H_2O_2 treatment on hepatocyte survival rate

*表示差异显著 ($P < 0.05$), **表示差异极显著 ($P < 0.01$), ***表示差异极显著 ($P < 0.001$), $n =$

12

* indicates significant difference ($P < 0.05$), ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$), *** indicates extremely significant difference ($P < 0.001$), $n = 12$.

3.3 H_2O_2 处理对肝细胞抗氧化能力的影响

肝细胞抗氧化功能随着 H_2O_2 处理浓度与时间的变化如表 3-1 中所示, 结果表明, 和对照组相较而言, T1、T2 和 T3 组的 SOD 和 GSH-Px 活性显著下降 ($P < 0.05$), MDA 含量显著增加 ($P < 0.05$); 而三组之间 SOD 和 GSH-Px 活性没有显著差异 ($P > 0.05$); MDA 含量 T2 组含量最高。结合图 3-2 中 H_2O_2 处理对肝细胞存活率的影响, 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 刺激肝细胞 2 h 后, 细胞的抗氧化功能显著降低, 说明氧化系统和抗氧化系统处于失衡状态, 细胞受到氧化损伤, 因此选择该浓度和时间进行后续试验。

表 3-1 H₂O₂ 处理对肝细胞抗氧化能力的影响Table 3-1 Effect of H₂O₂ treatment on antioxidant capacity of hepatocytes

项目	CON	T1	T2	T3	SEM	P 值
SOD (U/mg prot)	31.44 ^a	24.06 ^b	23.75 ^b	26.74 ^b	0.90	0.002
GSH-Px (U/mg prot)	42.45 ^a	34.09 ^b	33.03 ^b	36.80 ^b	1.01	0.001
MDA(nmol/mg prot)	1.00 ^d	1.74 ^{ab}	2.01 ^a	1.52 ^{bc}	0.09	<0.001

注：CON 代表对照组，T1 代表 600 μ mol/L 的 H₂O₂ 处理肝细胞 1h，T2 代表 400 μ mol/L 的 H₂O₂ 处理肝细胞 2h，T3 代表 200 μ mol/L 的 H₂O₂ 处理肝细胞 4h， $n = 6$ 。

Note: CON represented the control group, T1 represented 600 μ mol/L H₂O₂ treated hepatocytes for 1h, T2 represented 400 μ mol/L H₂O₂ treated hepatocytes for 2h, and T3 represented 200 μ mol/L H₂O₂ treated hepatocytes for 4h, $n = 6$.

3.4 山竹醇对肝细胞作用的安全浓度

通过 MTT 法测定细胞存活率筛选出山竹醇对肝细胞作用的安全浓度，不同剂量山竹醇作用肝细胞的结果如图 3-3 所示。从图中我们可以发现，0~20 μ mol/L 山竹醇处理肝细胞对细胞活力没有显著影响（ $P > 0.05$ ）；山竹醇浓度为 40 μ mol/L 时，肝细胞活力显著降低（ $P < 0.05$ ），且随着浓度增加，活力降低越明显。基于所得到的数据，我们选择利用低于 20 μ mol/L 的山竹醇浓度进行后续试验。

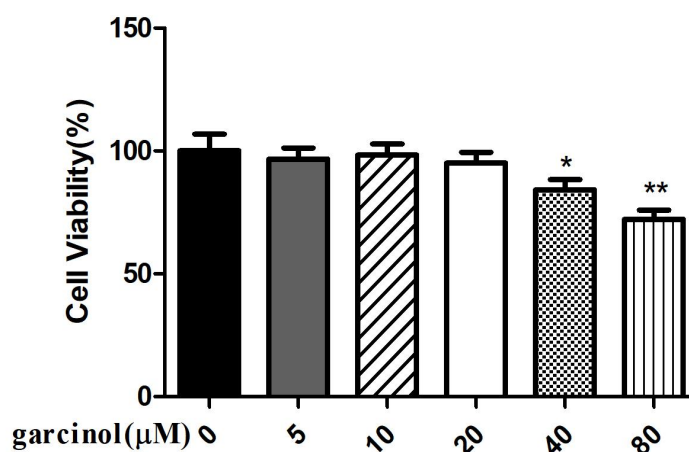


图 3-3 山竹醇对肝细胞活力的影响

Fig. 3-3 Effects of garcinol treatment on cell viability in hepatocytes

*表示差异显著（ $P < 0.05$ ），**表示差异极显著（ $P < 0.01$ ）， $n = 6$

* indicates significant difference ($P < 0.05$), ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$), $n = 6$

3.5 山竹醇对氧化应激状态下肝细胞脂质含量的影响

图 3-4 展示了山竹醇对氧化应激状态下肝细胞脂质含量的影响, 数据显示, 应激组 (400 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理肝细胞 2 h) 肝细胞内 TG 水平极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 山竹醇组肝细胞内 TG 含量显著低于应激组 ($P < 0.05$), 随着山竹醇浓度的升高, 肝细胞内 TG 含量不断降低。

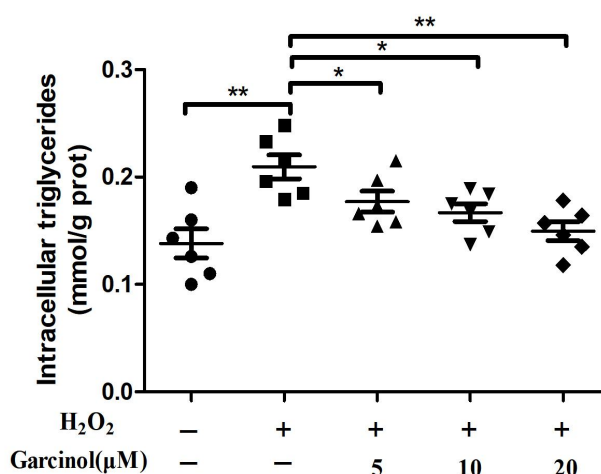


图 3-4 山竹醇对氧化应激状态下肝细胞内 TG 含量的影响

Fig.3-4 The effect of garcinol on triglyceride content in hepatocytes under oxidative stress

3.6 山竹醇对氧化应激状态下肝细胞脂质合成基因表达的影响

山竹醇对氧化应激状态下肝细胞脂质合成基因表达的作用如图 3-5 所示。数据表明, 和对照组相较而言, 氧化应激组的 *FAS*、*ACC*、*SCD1*、*SREBP-1c* 的基因表达量显著增加 ($P < 0.05$)。与应激组相比, 低浓度山竹醇能够显著减少 *SREBP-1c* 的 mRNA 水平 ($P < 0.05$); 中浓度山竹醇能够显著减少 *FAS*、*ACC*、*SREBP-1c* 的 mRNA 水平 ($P < 0.05$); 高浓度山竹醇能够显著减少 *FAS*、*ACC*、*SCD1*、*SREBP-1c* 的 mRNA 水平 ($P < 0.05$)。总的来说, 山竹醇能够下调氧化应激状态下肝细胞脂质合成基因的表达水平, 且具有剂量依赖性, 随着其浓度升高, mRNA 水平随之降低。

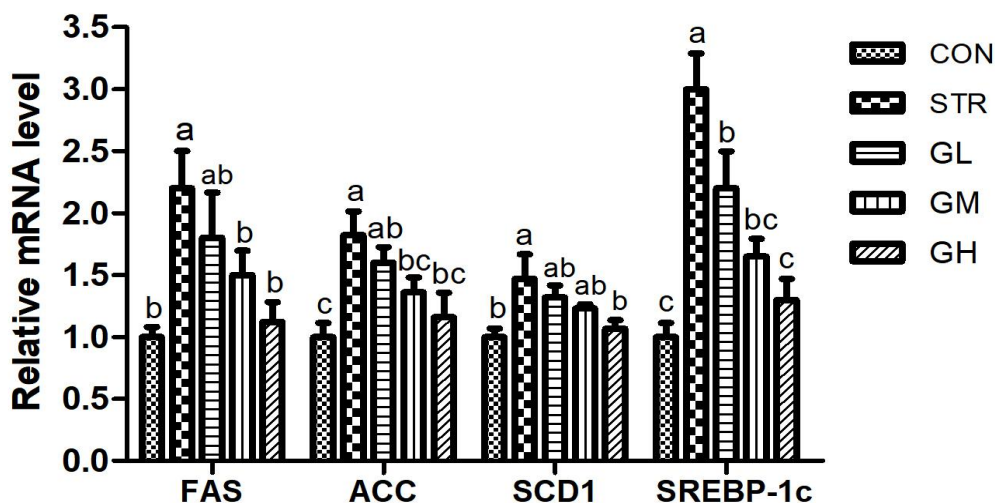


图 3-5 山竹醇对氧化应激状态下肝细胞脂质合成基因表达的影响

Fig. 3-5 Effect of garcinol on the expression of lipid synthesis related genes in hepatocytes under oxidative stress

3.7 山竹醇对氧化应激状态下肝细胞 PCAF 表达与 USF-1 乙酰化水平的影响

由图 3-6 中 A 结果可知，跟对照组细胞相较来说，氧化应激组 PCAF 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)；与应激组相较来说，低浓度、中浓度、高浓度山竹醇组均显著降低 PCAF 表达水平 ($P < 0.05$)，当山竹醇添加量增加时，PCAF 表达水平下调，具有剂量依赖效应。由图 3-6 中 B 结果可知，氧化应激组 USF-1 乙酰化水平显著高于对照组 ($P < 0.05$)；5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 山竹醇组 USF-1 乙酰化水平显著低于应激组 ($P < 0.05$)。

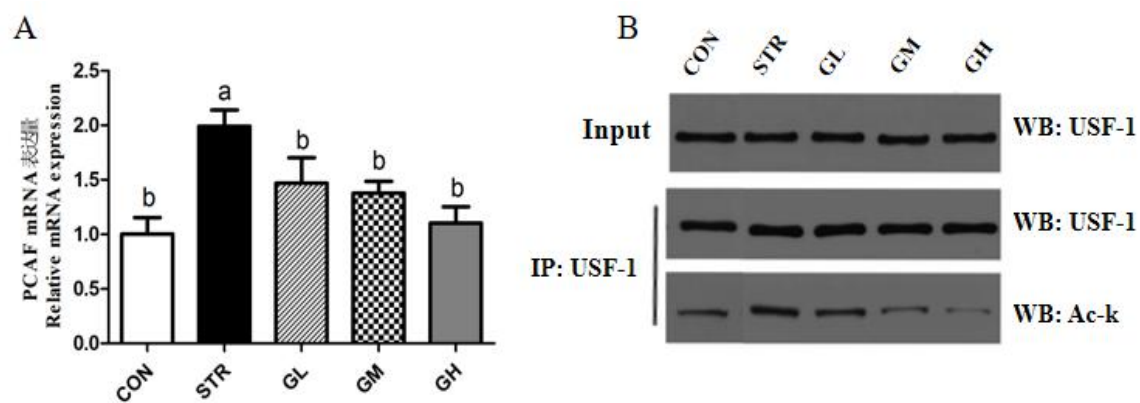


图 3-6 山竹醇对氧化应激状态下肝细胞 PCAF 表达与 USF-1 乙酰化水平的影响

Fig. 3-6 The effect of garcinol on expression of PCAF and and the acetylation level of USF-1 in hepatocytes under oxidative stress

4 讨论

4.1 H_2O_2 处理肝细胞的适宜浓度和时间

分离肝细胞的方法主要包括灌流法和非灌流法，目前应用较多的为灌流法，因为该方法所得到的肝细胞产率较高且细胞活力良好，为后续试验的进行提供了良好的条件。本试验应用胶原酶灌流法分离仔猪肝细胞，影响细胞活力和数量的关键步骤有：在插管时确保形成通路，便于观察肝脏消化程度，进而控制每个步骤的灌流时间；在用胶原酶消化时，要使灌流液在肝脏内停留一段时间，重复数次，有利于胶原酶更好的发挥作用；在消化过程中可以根据肝脏颜色和触感判断消化程度，在肝脏变为黄白色，触感松软时即可停止消化，尽量避免消化不完全或消化过度。

本试验中我们采用不同浓度的 H_2O_2 作用肝细胞不同时间，通过细胞存活率测定与抗氧化指标测定，筛选出对肝细胞造成氧化损伤的 H_2O_2 处理的适宜浓度及时间。 H_2O_2 属于活性氧的一种，易穿过细胞膜，与其他活性氧相比，相对稳定，半衰期长，因此广泛的用作构建细胞氧化应激模型的物质（Kao et al 2010, Cao et al 2016）。细胞活力可以反映出细胞受损的程度，细胞活力过高说明细胞受损不严重，而活力过低则表明有大量细胞死亡，不利于后续试验的开展，故而我们选择细胞活力在 60%~70% 之间的 H_2O_2 处理时间和浓度进行试验。细胞抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 能够体现细胞清理自由基的能力，MDA 水平能够体现脂质过氧化程度。结合 H_2O_2 处理对肝细胞细胞活力的影响和细胞抗氧化指标的结果，我们发现 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 作用肝细胞 2 h 后，细胞的抗氧化功能显著降低，说明氧化系统和抗氧化系统处于失衡状态，细胞受到氧化损伤，因此选择该浓度和时间作为氧化应激组进行后续试验。

4.2 山竹醇通过调控 PCAF 调节肝细胞脂质合成的作用机制

通过试验结果我们发现，山竹醇组肝细胞的 TG 含量相比于对照组显著减少，脂肪合成相关基因的表达水平也显著下调，且具有剂量依赖性。那么山竹醇是通过什么机制来调控脂肪合成的呢？最近有研究发现，用 H_2O_2 处理 HEK293T 细胞建立氧化应激模型，发现在氧化应激下 PCAF 的表达水平升高（Cao et al 2016）。而山竹醇对 PCAF 的作用已有报道，研究发现，山竹醇是 PCAF 的天然抑制剂（Bastiaansen et al 2013, Collins et al 2013）。有趣的是 PCAF 能够通过结合或乙酰化不同的酶和转录因子来调控脂肪合成（Lin et al 2013, Kim et al 2015），那么氧化应激状态下山竹

醇对脂肪合成的调控是否与 PCAF 存在联系？本试验发现山竹醇可以抑制 PCAF 的表达水平，并且具有一定的剂量依赖效应，随着山竹醇浓度的升高，它对 PCAF 的抑制能力也增强。在山竹醇对 USF-1 乙酰化水平的影响中我们也发现了类似的结果，随着山竹醇浓度的升高，USF-1 的乙酰化水平逐渐降低，与 PCAF 的变化趋势一致。USF-1 广泛存在于真核生物中，研究发现，许多参与脂肪酸和甘油三酯合成的酶在其近端启动子区域都含有 E 盒与固醇调节元件（SRE），是在转录水平上被调节的，可能受到 USF-1 的转录调控。在本试验中随着 PCAF 表达量和 USF-1 乙酰化水平的降低，细胞的 SCD1、ACC、FAS 等脂质合成相关基因的表达量也减少，与 PCAF、USF-1 的变化趋势一致。此外有研究表明，PCAF 过表达时 USF-1 乙酰化水平增高，而在体外添加山竹醇后其乙酰化水平又降低（Wang et al 2013）。因此山竹醇可能是通过 PCAF-USF-1 通路来调控脂肪合成，减少氧化应激状态下的脂肪合成增多。

5 小结

氧化应激状态下，PCAF 是调节脂肪合成的关键靶点，它可以乙酰化 USF-1，进而促进脂肪合成相关基因的表达。而山竹醇是 PCAF 的抑制剂，它可以通过抑制 PCAF，通过 PCAF/USF-1 通路调节肝脏脂肪合成。

第四章 结语

1 成果与结论

本试验从体内试验和体外试验两个方面探究了山竹醇对氧化应激猪肝脏脂肪合成的作用机制，得到如下结果：

日粮添加山竹醇能够提高机体的抗氧化功能，缓解 Diquat 诱导的氧化应激，提高应激仔猪的生长性能；还可改善应激导致的脂质合成的增加，减少脂质沉积，保护肝脏结构和功能的完整性。

氧化应激状态下，PCAF 是调节脂肪合成的关键靶点，它可以乙酰化 USF-1，进而促进脂肪合成相关基因的表达，增加 TG 含量。而山竹醇是 PCAF 的抑制剂，它可以通过抑制 PCAF，通过 PCAF/USF-1 通路调节肝脏脂肪合成。

2 创新点

本研究阐明了氧化应激下 PCAF 调节脂肪合成的作用机制，可以将 PCAF 作为一个新的靶点，利用其抑制剂来调控肝脏脂肪合成。

3 不足与展望

本试验中所用山竹醇是由公司提供，成本较高；之后可以利用实验室提取，降低成本，扩大山竹醇的应用范围。

参考文献

1. 崔艳军. 热应激和氧化应激对肥育猪骨骼肌代谢的影响及硫辛酸的调控作用. [学位论文]. 北京: 中国农业科学院, 2016
2. 金国琴. 生物化学. 上海: 科学技术出版社, 2011
3. 林瑞婷. 柠檬酸裂酶的乙酰化调控及其在肺癌中的作用和分子机制. [学位论文]. 上海: 复旦大学图书馆, 2013
4. 刘通, 李泽青, 闫峻, 李宁, 穆淑琴, 李驰, 马墉, 王文杰. 构建 Diquat 诱导断奶仔猪氧化应激模型的研究. 畜牧兽医杂志, 2016(35):63
5. 师建辉, 许熊飞, 章卫平. 肝脏脂质合成的转录调控研究进展. 医学研究杂志, 2016(12)
6. 田刚, 黄琳慧, 宋晓华, 陈代文, 毛湘冰, 虞洁, 郑萍, 何军, 余冰. 壳寡糖对氧化应激仔猪生长性能、抗氧化能力及空肠养分消化和转运能力的影响. 动物营养学报, 2018, 30(7):2652-2661
7. 徐静, 余冰, 陈代文. Diquat 诱导的生长猪氧化应激持续时间及适宜的应激标识. 中国农业科学, 2008(12)
8. 俞慧宏, 沈薇, 于圣杰. Garcinol 对非酒精性脂肪肝细胞内脂质合成的作用及机制. 肝胆外科杂志, 2017, 25(4):308-312
9. 袁施彬, 陈代文. 氧化应激对断奶仔猪组织抗氧化酶活性和病理学变化的影响. 中国兽医学报, 2009, 29(1):74-78
10. 周新莹, 张辛燕. 山竹醇对癌症的化学预防作用. 常州大学学报:自然科学版, 2014, 026(004):30-36
11. Ahmad A, Sarkar SH, Bitar B, Ali S, Aboukameel A, Sethi S, Li Y, Bao B, Kong D, Banerjee S, Sarkar FH. Garcinol Regulates EMT and Wnt Signaling Pathways In Vitro and In Vivo, Leading to Anticancer Activity against Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(10):2193-2201
12. Apel K, Hirt H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev of Plant Bio*, 2004, 55(1):373-399
13. Baiceanu A, Mesdom P, Lagouge M, Fougelle F. Endoplasmic reticulum proteostasis in hepatic steatosis. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(12):710

14. Bak MJ, Jun M, Jeong WS. Antioxidant and Hepatoprotective Effects of the Red Ginseng Essential Oil in H₂O₂-Treated HepG₂ Cells and CCl₄-Treated Mice. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(12):2314-2330
15. Balasubramanyam K, Altaf M, Varier RA, Swaminathan V, Ravindran A, Sadhale PP, Kundu TK. Polyisoprenylated Benzophenone, Garcinol, a Natural Histone Acetyltransferase Inhibitor, Represses Chromatin Transcription and Alters Global Gene Expression. *J Biol Chem*, 2004, 279(32):33716-33726
16. Barber MC, Price NT, Travers MT. Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1733(1):0-28
17. Bastiaansen AJNM, Ewing MM, de Boer HC, van der Pouw Kraan TC, de Vries MR, Peters EAB. Lysine Acetyltransferase PCAF Is a Key Regulator of Arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(8):1902-1910
18. Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA, Ganie SA. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother*, 2015, 74: 101-110
19. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev*, 2014, 94(2):329-354
20. Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porta A, Bachi A, Rubartelli A, Agresti A, Bianchi E. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J*, 2003, 22(20):5551-5560
21. Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseaume E, Chauvin MA, Morio B, Vidal H, Rieusset J. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest*, 2008, 118(2):789-800
22. Brieger K, Schiavone S, Miller Jr FJ, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*, 2012, 142: w13659
23. Cai K, Wan Y, Wang Z, Wang Y., Zhao X, Bao X. C5a promotes the proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells through PCAF-mediated STAT3 acetylation. *Oncol Rep*, 2014, 32(5):2260-2266
24. Cao X, Li C, Xiao S, Tang Y, Huang J, Zhao S, Li X, Li J, Zhang R, Yu W.

- Acetylation promotes TyrRS nuclear translocation to prevent oxidative damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 114: 687
25. Cao S, Wu H, Wang C, Zhang Q, Jiao L, Lin F. Diquat-induced Oxidative Stress Increases Intestinal Permeability, Impairs Mitochondrial Function and Triggers Mitophagy in Piglets. *J Anim Sci*, 2018, 96(5)
26. Carrozza MJ, Utley RT, Workman JL, Cote J. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet*, 2003, 19(6):321-329
27. Casado M, Vallet VS, Kahn A, Vaulont S. Essential role in vivo of upstream stimulatory factors for a normal dietary response of the fatty acid synthase gene in the liver. *J Biol Chem*, 1999, 274: 2009-2013
28. Cheng AC, Tsai ML, Liu CM, Lee MF, Nagabhushanam K, Ho CT. Garcinol inhibits cell growth in hepatocellular carcinoma Hep3B cells through induction of ROS-dependent apoptosis. *Food Func*, 2010, 1(3):301-307
29. Corre S, Galibert MD. Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigm Cell Res*, 2010, 18(5): 337-348
30. Collins HM, Abdelghany MK, Marie M, Baigong Y, Deeves SE, Kindle KB, Mantelingu K, Aslam A, Winkler GS, Kundu T, Heery DM. Differential effects of garcinol and curcumin on histone and p53 modifications in tumour cells. *BMC Cancer*, 2013, 13(1):37-37
31. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two“hits”? *Gastroenterology*, 1998, 114: 842-845
32. De Jong RC, Ewing MM, De Vries MR, Karper JC, Bastiaansen AJ, Peters HA, Baghana F, Van Den Elsen PJ, Gongora C, Jukema JW. The epigenetic factor PCAF regulates vascular inflammation and is essential for intimal hyperplasia development. *Plos One* 2017;12:e0185820
33. Devasagayam TPA, Tilak JC, Bapat MM, Mishra A. Antioxidant activity of *Garcinia indica* (kokam) and its syrup. *Curr Sci*, 2006, 91: 90-93
34. Durrin LK, Mann RK, Kayne PS, Grunstein M. Yeast histone H4 N-terminal sequence is required for promoter activation in vivo. *Cell*, 1991, 65(6):1023-1031
35. Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A. Regulation of gene expression by

- SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1529(1-3):0-113
36. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signalling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction? *Diabetes*, 2003, 52:1-8
 37. Fang DL, Wan Y, Shen W, Cao J, Sun ZX, Yu HH, Zhang Q, Cheng WH, Chen J, Ning B. Endoplasmic reticulum stress leads to lipid accumulation through upregulation of SREBP-1c in normal hepatic and hepatoma cells. *Mol Cell Biochem*, 2013, 381(1-2):127-137
 38. Ferré P, Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab*, 2010, 12(Supplement s2):83-92
 39. Foufelle F, Ferré, Pascal. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J*, 2002, 366(2):377-91
 40. Griffifin MJ, Wong RH, Pandya N, Sul HS. Direct interaction between USF and SREBP-1c mediates synergistic activation of the fatty acid synthase promoter. *J Biol Chem*, 2007, 282, 5453-5467
 41. Gu W, Roeder RG. Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain. *Cell*, 1997, 90(4):595-606
 42. Halliwell B. Free radicals and antioxidants—quo vadis? *Trends Pharmacol S*, 2011, 32: 125-130
 43. Hirano G, Izumi H, Kidani A, Yasuniwa Y, Han B, Kusaba H, Akashi K, Kuwano M, Kohno K. Enhanced Expression of PCAF Endows Apoptosis Resistance in Cisplatin-Resistant Cells. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(6):864-872
 44. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 2002, 109(9):1125-1131
 45. Hsu CL, Lin YJ, Ho CT, Yen GC. Inhibitory effects of garcinol and pterostilbene on cell proliferation and adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Food Func*, 2012, 3
 46. Hung WL, Liu CM, Lai CS, Ho CT, Pan MH. Inhibitory effect of garcinol against

- 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced skin inflammation and tumorigenesis in mice. *J Funct Foods*, 2015, 18:432-444
47. Iyer A, Fairlie DP, Brown L. Lysine acetylation in obesity, diabetes and metabolic disease. *Immunol Cell Biol*, 2012, 90: 39-46
48. Jagtap P, Bhise K, Prakya V. A phytopharmacological review on *Garcinia indica*. *Int J Herb Med*, 2015
49. Jiang G, Li Z, Liu F, Ellsworth K, Dallas-Yang Q, Wu M, Ronan J, Esau C, Murphy C, Szalkowski D, Bergeron R, Doebber T, Zhang BB. Prevention of obesity in mice by antisense oligonucleotide inhibitors of stearoyl-CoA desaturase-1. *J Clin Invest*, 2005;115:1030-1038
50. Jin Q, Yu LR, Wang L, Zhang Z, Kasper LH, Lee JE, Wang C, Brindle PK, Dent SY, Ge K. Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *EMBO J*, 2010, 30(2):249-262
51. Jing Y, Ai Q, Lin L, Dai J, Jia M, Zhou D, Che Q, Wan J, Jiang R, Zhang L. Protective effects of garcinol in mice with lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced apoptotic liver injury. *Int Immunopharmacol*, 2014, 19(2):373-380
52. Jones GM, Vale JA. Mechanisms of Toxicity, Clinical Features, and Management of Diquat Poisoning: A Review. *J Toxicol-Clin Toxic*, 2000, 38(2):123-128
53. Kao CL, Chen LK, Chang YL, Yung MC, Hwang SJ. Resveratrol Protects Human Endothelium from H₂O₂-Induced Oxidative Stress and Senescence via SirT1 Activation. *J atheroscler thromb*, 2010, 17(9):970-979
54. Kim E, Lee JH, Ntambi JM, Hyun CK. Inhibition of stearoyl-CoA desaturase1 activates AMPK and exhibits beneficial lipid metabolic effects in vitro. *Eur J Pharmacol*, 2011, 672(1-3):38-44
55. Kim H, Mendez R, Chen X, Fang D, Zhang K. Lysine Acetylation of CREBH Regulates Fasting-Induced Hepatic Lipid Metabolism. *Mol Cell Biol*, 2015, 35: 4121-34
56. Kim JY, Garcia-Carbonell R, Yamachika S, Zhao P, Dhar D, Loomba R, Kaufman RJ, Saltiel AR, Karin Michael. ER Stress Drives Lipogenesis and Steatohepatitis via

- Caspase-2 Activation of S1P. *Cell*, 2018, 175: 133-145
57. Korzus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McInerney EM, Mullen TM, Glass CK, Rosenfeld MG. Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science*, 1998, 279(5351): 703-707
 58. Krumm A, Madisen L, Yang XJ, Goodman R, Groudine NM. Long-Distance Transcriptional Enhancement by the Histone Acetyltransferase PCAF. *Proc Natl Acad Sci U S America*, 1998, 95(23):13501-13506
 59. Krumova K, Cosa G. Overview of Reactive Oxygen Species. In: Nonell S, Flors C eds., Singlet oxygen: applications in biosciences and nanosciences. *Royal Society of Chemistry*, 2016, 1-21
 60. Latasa MJ, Griffin MJ, Moon YS, Kang C, Sul HS. Occupancy and function of the -150 sterol regulatory element and -65 E-box in nutritional regulation of the fatty acid synthase gene in living animals. *Mol Cell Biol*. 2003, 23:5896-5907
 61. Lee J, Homma T, Kurahashi T, Kang ES, Fujii J. Oxidative stress triggers lipid droplet accumulation in primary cultured hepatocytes by activating fatty acid synthesis. *Biochem Biophys Res Co*, 2015, 464(1):229-235
 62. Lee KK, Workman JL. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(4):284-295
 63. Li D, Cheng M, Niu YQ, Chi XJ, Liu XY, Fan JJ, Fan H, Chang YS, Yang W. Identification of a novel human long non-coding RNA that regulates hepatic lipid metabolism by inhibiting SREBP-1c. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(3):349-357
 64. Liao CH, Ho CT, Lin JK. Effects of garcinol on free radical generation and NO production in embryonic rat cortical neurons and astrocytes. *Biochem Biophys Res Co*, 2005, 329(4):0-1314
 65. Lin R, Tao R, Gao X, Li T, Zhou X, Guan KL, Xiong Y, Lei QY. Acetylation Stabilizes ATP-Citrate Lyase to Promote Lipid Biosynthesis and Tumor Growth. *Mol Cell*, 2013, 51: 506
 66. Lu T , Piao X L , Zhang Q , Wang D, Piao XS, Kim SW. Protective effects of Forsythia suspensa extract against oxidative stress induced by Diquat in rats. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(2):0-770

67. Lv M, Yu B, Mao XB, Zheng P, He J, Chen DW. Responses of growth performance and tryptophan metabolism to oxidative stress induced by Diquat in weaned pigs. *Animal*, 2012, 6(06):928-934
68. Madhuri K, Naik PR. Modulatory effect of garcinol in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Arch Physiol Biochem*, 2017:1-8
69. Mao J, Demayo FJ, Li H, Abu-Elheiga L, Gu Z, Shaikenov TE, Kordari P, Chirala SS, Heird WC, Wakil SJ. Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(22):8552-8557
70. Mao X, Lv M, Yu B, He J, Zheng P, Yu J, Wang QY, Chen DW. The effect of dietary tryptophan levels on oxidative stress of liver induced by Diquat in weaned piglets. *J Anim Sci Biotechno*, 2014, 5(1):49
71. Marmorstein R, Roth SY. Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, 11(2):155-161
72. McDonnell E, Peterson BS, Bomze HM, Hirschey MD. SIRT3 regulates progression and development of diseases of aging. *Trends Endocrin Met*, 2015, 26: 486
73. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and CU/ZN-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Bio Med*, 1994, 17(3):235-248
74. Miyamoto S, Arai H, Terao J. Enzymatic antioxidant defenses. Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Practical Applications, *Wiley Blackwell*, 2010, 21-33
75. Miyazaki M, Dobrzyn A, Man WC, Chu K, Sampath H, Kim HJ, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, 2004;279: 25164-25171
76. Miyazaki M, Sampath H, Liu X, Flowers MT, Chu K, Dobrzyn A, Ntambi J. Stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency attenuates obesity and insulin resistance in leptin-resistant obese mice. *Biochem Bioph Res Co*, 2009, 380(4):0-822

77. Muhammed M, Sarang B, Beena B, Anjali P, Lakshmi M, Prakriti N. Safety profile of 40% Garcinol from *Garcinia indica* in experimental rodents. *Toxicol Rep*, 2018, 5:750-758
78. Nagy G, Clark JM, Buzás EI, Gorman CL, Cope AP. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. *Immunol Lett*, 2007, 111:1-5
79. Nagy ZL, Tora L. Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene*, 2007, 26(37):5341-5357
80. Nassir F, Ibdah J. Role of Mitochondria in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(5):8713-8742
81. Negi PS, Jayaprakasha GK. Control of Foodborne Pathogenic and Spoilage Bacteria by Garcinol and *Garcinia indica* extracts, and their Antioxidant Activity. *J Food Sci*, 2006, 69(3):FMS61-FMS65
82. Nirmaladevi D, Venkataramana M, Chandranayaka S, Ramesha A, Srinivas C. Neuroprotective Effects of Bikaverin on H₂O₂-Induced Oxidative Stress Mediated Neuronal Damage in SH-SY5Y Cell Line. *Cell Mol Neurobiol*, 2014, 34(7)
83. Ogryzko VV. Mammalian histone acetyltransferases and their complexes. *Cell Mol Life Sci Cmls*, 2001, 58(5-6):683-692
84. Osborne TF, Espenshade PJ. Evolutionary conservation and adaptation in the mechanism that regulates SREBP action: what a long, strange tRIP it's been. *Genes Dev*, 2009, 23, 2578-2591
85. Padhye S, Ahmad A, Oswal N, Sarkar FH. Emerging role of Garcinol, the antioxidant chalcone from *Garcinia indica* Choisy and its synthetic analogs. *J Hematol Oncol*, 2009, 2(1):38
86. Pajukanta P, Lilja HE, Sinsheimer JS, Cantor RM, Lusis AJ, Gentile M, Duan XJ, Soro-Paavonen A, Naukkarinen J, Saarela J. Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat Genet*, 2004, 36(4):371-376
87. Panda V, Ashar H, Srinath S. Antioxidant and hepatoprotective effect of *Garcinia indica* fruit rind in ethanolinduced hepatic damage in rodents. *Interdiscip Toxicol*,

- 2012, 5(4)
88. Pandey R, Muller A, Napoli CA, Selinger DA, Pikaard CS, Richards EJ, Bender J, Mount DW, Jorgensen RA. Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 5036-55
89. Pan M, Cederbaum AI, Zhang YL, Ginsberg HN, Williams KJ, Fisher EA. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. *J Clin Invest*, 2004, 113:1277-1287
90. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Bio Med*, 2011, 50(5):567-575
91. Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 81-120
92. Sampath H, Ntambi JM. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1, sterol regulatory element binding protein-1c and peroxisome proliferator-activated receptor- α : independent and interactive roles in the regulation of lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2006, 9(2):84-88
93. Sampath H, Ntambi JM. The role of stearyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation. *Ann NY Acad Sci*, 2011, 1243:47-53
94. Sang S, Liao CH, Pan MH, Rosen RT, Lin-Shiau SY, Lin JK. Chemical studies on antioxidant mechanism of garcinol: analysis of radical reaction products of garcinol with peroxy radicals and their antitumor activities. *Tetrahedron*, 2002, 58(51):10095-10102
95. Sekiya M, Hiraishi A, Touyama M, Sakamoto K. Oxidative stress induced lipid accumulation via SREBP1c activation in HepG2 cells. *Biochem Bioph Res Co*, 2008, 375(4):0-607
96. Semenkovich CF, Coleman T, Fiedorek FTJ. Human fatty acid synthase mRNA: Tissue distribution, genetic mapping, and kinetics of decay after glucose deprivation. *J Lipid Res*, 1995, 36(7):1507
97. Smith S. The Animal Fatty Acid Synthase: One Gene, One Polypeptide, Seven

- Enzymes, *FASEB J*, 1994, 8: 1248-1259
98. Smith S, Witkowski A, Joshi AK. Structural and Functional Organization of Animal Fatty Acid Synthase, *Prog Lipid Res*, 2003, 42, 289-317
 99. Stasevich TJ, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, Maehara K, Ohkawa Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Nagase T, Nozaki N, McNally JG, Kimura H. Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells. *Nature*, 2014, 516(7530):272-275
 100. Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64: 435-59
 101. Takeuchi K, Reue K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 296(6):1195-209
 102. Tanaka T, Kohno H, Shimada R, Kagami S, Yamaguchi F, Kataoka S, Ariga T, Murakami A, Koshimizu K, Ohigashi H. Prevention of colonic aberrant crypt foci by dietary feeding of garcinol in male F344 rats. *Carcinogenesis*, 2000, 21(6):1183-1189
 103. Travers MT, Vallance AJ, Gourlay HT, Gill CA, Klein I, Bottema CB, Barber MC. Promoter I of the ovine acetyl-CoA carboxylase- α gene: an E-box motif at -114 in the proximal promoter binds upstream stimulatory factor (USF)-1 and USF-2 and acts as an insulin-response sequence in differentiating adipocytes. *Biochem J*, 2001, 359(2):273-284
 104. Wang AN, Cai CJ, Zeng XF, Zhang FR, Zhang G, Thacker PA. Dietary supplementation with *Lactobacillus fermentum* i5007 improves the anti-oxidative activity of weanling piglets challenged with Diquat. *J Appl Microbiol*, 2013, 114(6): 1582-1591
 105. Wang L, Mizzen C, Ying C, Candau R, Barlev N, Brownell J, Allis CD, Berger S. Histone acetyltransferase activity is conserved between yeast and human GCN5 and is required for complementation of growth and transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(1):519-527
 106. Wang T, Yao W, Shao Y, Zheng R, Huang F. PCAF fine-tunes hepatic metabolic

- syndrome, inflammatory disease, and cancer. *J Cell Mol Med*, 2018
107. Wang Y, Wong RH, Tang T, Hudak C, Yang D, Duncan R. Phosphorylation and recruitment of BAF60c in chromatin remodeling for lipogenesis in response to insulin. *Mol Cell*, 2013, 49(2):283-297
108. Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Montagu MV, Inzé D, Camp WV. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *Embo J*, 2014, 16(16):4806-4816
109. Wong RH, Sul HS. Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective. *curr opin pharmacol*, 2010, 10(6):0-691
110. Xu YQ, Xing YY, Wang ZQ, Yan SM, Shi BL. Pre-protective effects of dietary chitosan supplementation against oxidative stress induced by Diquat in weaned piglets. *Cell Stress Chaperon*, 2018
111. Yamaguchi F, Ariga T, Yoshimura Y, Nakazawa H. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind, *J Agric Food Chem*, 2000a, 48:180-185
112. Yamaguchi LF, Yoshimura Y, Ariga T, Saito PTM, Nakazawa H. Free radical scavenging activity and antiulcer activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *J Agric Food Chem*, 2000b, 48(6):2320
113. Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y. A p300 /CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, 1996, 382 (6589):319-324
114. Ying MZ, Wang JJ, Li DW, Yu G, Wang X, Pan J, Chen Y, He MX. The p300 /CBP associated factor: is frequently downregulated in intestinal-type gastric carcinoma and constitutes a biomarker for clinical outcome. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(4):312-320
115. Yuan S, Chen D, Zhang K, Yu B. Effects of Oxidative Stress on Growth Performance, Nutrient Digestibilities and Activities of Antioxidative Enzymes of Weanling Pigs. *Asian-austral j anim sci*, 2007, 20(10):1600-1605
116. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD(SOD1), Mn-SOD(SOD2), and EC-SOD(SOD3) gene

- structures, evolution, and expression. *Free Radical Bio Med*, 2002, 33(3):337-349
117. Zhang C, Chen X, Zhu RM, Zhang Y, Xu DX. Endoplasmic reticulum stress is involved in hepatic SREBP-1c activation and lipid accumulation in fructose-fed mice. *Toxicol Lett*, 2012, 212(3):229-240
118. Zhang M, Sun W, Zhou M, Tang Y. MicroRNA-27a regulates hepatic lipid metabolism and alleviates NAFLD via repressing FAS and SCD1. *Sci Rep*, 2017, 7(1)
119. Zhao M, Geng R, Guo X, Yuan R, Zhou X, Zhong Y, Huo Y, Zhou M, Shen Q, Li Y, Zhu W, Wang J. PCAF/GCN5-Mediated Acetylation of RPA1 Promotes Nucleotide Excision Repair. *Cell Rep*, 2017, 20(9):1997-2009
120. Zhu C, Qin YR, Xie D, Chua DT, Fung JM, Chen L, Fu L, Hu L, Guan XY. Characterization of tumor suppressive function of P300/CBP-associated factor at frequently deleted region 3p24 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 2009, 28(31):2821-2828

致 谢

时间转瞬即逝，三年研究生生涯即将结束，而入学之时恍如昨日，回首这三年，百感交集，目之所及，皆是回忆。在这些过往中，有过迷茫、有过低落，但也有坚定、认可与关怀。在这个过程中，真的收获了太多太多，即使有万般不舍，但仍心怀感激。

在本论文完成之际，首先要感谢我的导师黄飞若教授。从论文的选题、试验方案的确定到开题报告、中期检查以及在本论文的撰写过程中，从初稿以及多次修改后的定稿，都离不开黄老师的悉心指导和帮助。在疫情期间，仍不懈怠，为本文提供了宝贵意见。师者，所以传道受业解惑也。黄老师不仅在科研中给予了我很多帮助，在生活当中，他严谨的治学态度、精益求精的工作作风，也深深地感染和激励着我，而他为人处世的观念，积极乐观的态度也影响着我，让我受用终生。在此谨向黄老师致以衷心的感谢和崇高的敬意！

衷心的感谢我们动物营养与饲料科学系的老师：彭健教授、齐德生教授、晏向华教授、孙铝辉教授、马立保副教授、齐智利副教授、王艳青副教授、张妮娅副教授、周忠新副教授、魏宏奎副教授在我研究生期间的教导和帮助！

在此，特别感谢王同心师兄、姚卫磊师兄在我科研学习过程中提出的宝贵意见和建议，以及对我生活和学习上的鼓励和帮助！感谢邵亚飞、高景、王向明、刘宇宸等同窗和李娟、夏军、张黎、黄璐、徐明明、张政等师弟师妹，正是有了你们的陪伴，我的研究生生活才如此丰富多彩。

借此机会，我要感谢我的父母和家人在这三年的学习生活中给予的支持、鼓励 and 信任。祝愿父母身体健康，再次感谢父母的无私付出与支持。

冬季的黑暗尽管漫长，但永远遮挡不住黎明的曙光。在此最后向逆行者们致以最崇高的敬意，幸得有你，山河无恙。祝愿祖国繁荣昌盛国泰民安！

附录 研究生在读期间发表的主要论文

- 1.贺琼玉, 邵亚飞, 姚卫磊, 夏军, 黄飞若. 山竹醇对氧化应激仔猪生长性能、抗氧化功能及肝脏脂质合成的影响[J].动物营养学报, 2019, 31(12).
- 2.Wang TX, **He QY**, Yao WL, Shao YF, Li J, Huang FR. The Variation of Nasal Microbiota Caused by Low Levels of Gaseous Ammonia Exposure in Growing Pigs[J]. Frontiers in Microbiology. 2019, 10: 1083.
- 3.邵亚飞, **贺琼玉**, 姚卫磊, 夏军, 黄飞若. 山竹醇对生长育肥猪生长性能、肌肉抗氧化能力和 肌纤维类型组成的影响[J].动物营养学报, 2020, 32(3).
- 4.Wang TX, Yao WL, **He QY**, Shao YF, Zheng RL, Huang FR. L-leucine stimulates glutamate dehydrogenase activity and glutamate synthesis by regulating mTORC1/SIRT4 pathway in pig liver[J]. Animal Nutrition, 2018, 4: 329-337.