

综述

SIRT6在非酒精性脂肪性肝炎中的作用

敬贤丹, 唐琴, 何金汗*

四川大学华西医院临床药学与药品不良反应研究室, 成都 610041

摘要: SIRT6是沉默信息调节蛋白家族中的一员, 具有烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的组蛋白去乙酰化酶活性和单ADP-核糖基转移酶活性。SIRT6在机体关键的生理和病理过程中起着重要作用, 包括脂代谢、炎症、氧化应激以及纤维化等, 被认为是代谢综合征的潜在治疗靶点。SIRT6敲除小鼠表现出严重的脂肪肝, 非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)小鼠模型的肝组织中SIRT6的表达量明显低于正常小鼠, 而过表达SIRT6能显著减轻NASH所引起的肝损伤, 提示SIRT6可能具有保护NASH动物模型的作用。本文将重点综述SIRT6在NASH发生、发展过程中的重要调节作用。

关键词: SIRT6; 非酒精性脂肪性肝炎; 脂代谢; 炎症; 肝纤维化

中图分类号: R58

The role of SIRT6 in nonalcoholic steatohepatitis

JING Xian-Dan, TANG Qin, HE Jin-Han*

Laboratory of Clinical Pharmacy and Adverse Drug Reaction, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: SIRT6, a member of the silencing information regulatory protein family, is a nicotinamide adenine dinucleotide-dependent histone deacetylase and an ADP-ribose transferase enzyme. It plays an important role in fundamental physiological and pathological processes, including lipid metabolism, inflammation, oxidative stress and fibrosis, and is considered as a potential therapeutic target for metabolic syndrome. SIRT6 knockout mice displayed severe fatty liver, and the expression of SIRT6 in the liver of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) mice was significantly lower than that of normal mice. Overexpression of SIRT6 significantly ameliorated NASH-induced liver damage. It is suggested that SIRT6 may play a key role in protecting against NASH. In this paper, we review the important regulatory functions of SIRT6 in the occurrence and development of NASH.

Key words: SIRT6; nonalcoholic steatohepatitis; lipid metabolism; inflammation; liver fibrosis

沉默信息调节蛋白 (silent information regulatory protein, Sirtuin) 是一类进化保守, 调控凋亡、代谢、能量平衡、线粒体功能和寿命等关键生理过程的蛋白质, 主要具有烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 依赖的组蛋白去乙酰化酶活性和单 ADP-核糖基转移酶活性^[1]。Sirtuin 家族的发现可以追溯到 40 多年前。在新的沉默因子筛选过程中, 研究人员首先在酿酒酵母中分离出了

沉默信息调节因子家族的一员, 命名为 SIR2^[2]。随后, 科学家们在哺乳动物上鉴定出了 7 种 SIR 同源物, 分别命名为 SIRT1~SIRT7 或 Sirtuins。这些蛋白位于不同的细胞区域。其中, SIRT1 及 SIRT2 定位于细胞核和细胞质, SIRT3、SIRT4 及 SIRT5 定位于线粒体, 而 SIRT6 和 SIRT7 定位于细胞核中。目前对于 SIRT1 的研究是最为广泛和充分的, 而近年来 SIRT6 的生物学功能也逐渐被揭示^[3]。多项研

Received 2021-01-20 Accepted 2021-07-16

Research from the corresponding author's laboratory was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82025007, 81930020, 81873662 and 81870599).

*Corresponding author. E-mail: jinhanhe@scu.edu.cn

究表明, SIRT6 在脂代谢、胰岛素抵抗、氧化应激和炎症等方面起着重要的调控作用, 被认为是代谢综合征的潜在治疗靶点^[4]。

非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 是非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的炎症亚型, 常伴有肝脏脂肪变性、小叶性炎症、肝细胞损伤, 并可能伴有肝纤维化, 是目前肝脏移植的第二大原因^[5]。NASH 与肥胖、血脂异常、炎症、2 型糖尿病和代谢综合征密切相关, 可能进展为肝硬化甚至肝癌, 被认为是肝脏相关发病率和死亡率的主要危险因素^[5]。目前, 关于 NASH 的发病机制, 最经典的是“二次打击”学说: 在 NAFLD 进展的情况下, 胰岛素抵抗导致的脂肪堆积 (脂肪变性) 被认为是“第一次打击”, 使肝细胞容易受到“第二次打击”, 如氧化应激、炎症和内质网应激, 从而发展为 NASH^[6]。近年来, “多次打击”学说被提出, 这一理论认为 NASH 是遗传变异、脂质代谢异常、氧化/内质网应激、线粒体功能紊乱、免疫反应改变和肠道微生物失衡等多种条件共同作用的结果^[7]。研究显示, SIRT6 在 NASH 小鼠肝脏中的含量较正常小鼠明显降低, 肝脏中 SIRT6 的缺失加速了肝脏脂肪变性, 胰岛素抵抗和炎症, 加重了 NASH 所致肝损伤。而 SIRT6 转基因小鼠则不受饮食所致 NASH 的影响^[8–10]。同时有研究显示, 过表达 SIRT6 能显著减轻 NASH 所引起的肝损伤^[11]。此外, Zhong 等研究显示, 和正常人肝组织相比, NASH 患者肝脏样本中 SIRT6 的 mRNA 表达水平明显降低^[10]。虽然根据现有研究无法得知 SIRT6 影响单纯性脂肪肝进展到 NASH 进程的具体机制, 但以上这些研究结果至少提示 SIRT6 在 NASH 发生、发展过程中或许发挥着不可忽视的作用, 因此探讨 SIRT6 在 NASH 病程中所起的重要调节作用及机制可能治疗 NASH 带来新的启示。本文将综述 SIRT6 在 NASH 发生及进展过程中的重要作用。

1 SIRT6 的结构与功能

人 SIRT6 基因位于第 19 号染色体的短臂 13.3 处, 含 8 个外显子, 其中 8 号外显子最长, 含 838 个碱基; 4 号外显子最短, 含 60 个碱基^[12]。SIRT6 蛋白分子含 355 个氨基酸残基, 分子量约为 39.1 kDa, 等电点为 9.12^[12]。在结构上, SIRT6 由一个 N 端扩展区 (N terminal extension, NTE)、一个 C 末端

延伸区 (C terminal extension, CTE) 和一个功能结构保守的中心结构域组成。其中, NTE 与其催化活性有关, 而 CTE 对于其正确的核定位十分关键。此外, 两者在其与核小体结合过程中都起着重要作用^[13]。在 SIRT6 的中心结构域中, 仅需突变一个组氨酸残基就能导致 SIRT6 失去催化活性, 从而丧失与染色体的结合能力。研究显示, 与其它 Sirtuin 蛋白不同, SIRT6 缺乏经典的锌指蛋白结合序列和 Rossmann 折叠结构, 但 SIRT6 有一个独特的展开的锌指结合结构域; 此外, 虽然 SIRT6 缺乏保守的高度灵活的 NAD⁺ 结合环, 但它有一个高度稳定的单螺旋结构, 这一特性使得 SIRT6 即使在没有去乙酰化底物的情况下也能高亲和力地与 NAD⁺ 结合^[14]。

SIRT6 作为 Sirtuin 家族的一员, 在基因转录、新陈代谢、端粒完整性及 DNA 修复等过程中发挥着非常重要的作用^[3]。研究显示, SIRT6 同时具有 NAD⁺ 依赖的组蛋白去乙酰化酶活性和单 ADP-核糖基转移酶活性^[3]。SIRT6 首先被发现的酶活性是单 ADP-核糖基转移酶活性^[12]。早期的体外分析表明, SIRT6 可以利用 NAD⁺ 作为底物进行分子内 ADP-核糖基化, 现已发现的 SIRT6 糖基化底物主要包括 PARP1 的 K521 位点及核辅助抑制因子 KAP1 等^[3]。然而, SIRT6 的单 ADP-核糖基转移酶活性的生理意义有待阐明。后续研究显示, SIRT6 是一种相对位点特异性的组蛋白去乙酰化酶, 迄今已鉴定出三种组蛋白去乙酰化底物: 组蛋白 H3 的赖氨酸 9、18 和 56 (H3K9、H3K18 和 H3K56)^[3]。SIRT6 被积极招募到靶基因启动子上, 通过对 H3K9、H3K18 或 H3K56 位点的去乙酰化作用而抑制靶基因的转录活性, 从而维护基因组稳定性和端粒完整性, 促进 DNA 修复及防止衰老等^[3, 15, 16]。除了组蛋白以外, SIRT6 还可使多种非组蛋白底物去乙酰化, 包括叉头盒 O1 (forkhead box O1, FoxO1)、相关因子组蛋白乙酰基转移酶 5 (general control non-repressible-5, GCN5) 及 C 末端结合蛋白相互作用蛋白 (C-terminal binding protein interacting protein, CTIP) 等, 从而参与葡萄糖稳态等的调节。

2 SIRT6 与肝脏脂代谢

肝脏是机体执行代谢功能的核心器官, 脂类的消化、吸收、运输、分解代谢和合成代谢都与肝脏有着密切的联系^[17]。在 NASH 发病过程中, 首先是各种因素导致肝脏内脂肪酸增多, 增加的游离脂

肪酸 (free fatty acid, FFA) 可与甘油进行酯化反应形成甘油三酯 (triglyceride, TG), 导致肝脏脂肪堆积。在最初的肝脏脂肪浸润后, 肝脏更容易受到脂肪因子和氧化应激等一系列因素带来的打击, 导致肝细胞损伤, 最终从单纯性脂肪变性发展为 NASH 和纤维化^[17]。FFA 是 NASH 发病机制的核心。肝细胞从血浆中摄取 FFA 以及肝细胞中脂肪酸的从头生物合成是肝脏中脂肪酸的主要来源; 线粒体 β 氧化及脂肪酸再形成 TG 是肝细胞中脂肪酸的主要去路。在正常情况下, 肝脏只储存少量 TG。但在营养过剩和肥胖的背景下, 肝脏脂肪酸代谢发生改变, 通常会导致细胞内 TG 的储积, 并触发 NASH 的发生^[18]。因此, 调控肝脏脂代谢对于缓解 NASH 的发生、发展有着重要的意义。

SIRT6 已被证明是肝脏脂代谢的重要调节分子。肝细胞特异性敲除 SIRT6 的老年小鼠即使在正常饮食 (normal control diet, NCD) 条件下即可出现脂肪肝^[19]。在高脂饮食条件下, 与野生型 (wild-type, WT) 小鼠相比, 过表达 SIRT6 的小鼠肝脏中 TG 储积显著降低^[20]。此外, Bae 等通过蛋氨酸-胆碱缺乏 (methionine and choline deficiency, MCD) 饮食构建小鼠 NASH 模型, 发现 SIRT6 在 MCD 饮食小鼠的肝组织中的表达受到抑制, 且喂食 MCD 的小鼠肝脏脂肪堆积增加, 绞股蓝提取物 (*Gynostemma pentaphyllum* extract, GPE) 能使 SIRT6 蛋白表达恢复至 NCD 小鼠水平, 且 GPE 通过上调 SIRT6 的表达, 对 MCD 饮食所致 NASH 的进展起到延后作用^[8]。同时, 在高脂高果糖 (high-fat and high-fructose, HFHF) 饮食条件下, 肝脏特异性敲除 SIRT6 会加重小鼠的脂肪肝和胰岛素抵抗^[9]。这些研究结果提示 SIRT6 可能在 NASH 进展过程中的肝脏脂代谢环节发挥重要调节作用。

研究显示, SIRT6 基因缺失增加了多个参与脂肪酸转运及脂肪酸从头合成、酯化过程的基因的表达, 包括 *Cd36*、*Fatp*、*Fas*、*Acc1* 和 *Scd1* 等, 而对 VLDL 的分泌无明显影响^[19]。此外, 体外研究显示, 与 WT 小鼠的原代肝细胞相比, SIRT6 敲除小鼠的原代肝细胞中 TG 含量明显增加^[20]。相应地, SIRT6 转基因小鼠在高脂饮食喂养条件下, 肝脏中 FFA 及 TG 含量显著降低, 参与 TG 合成的过氧化物酶体增植物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ) 靶基因 *DGAT1* 的表达也显著下调^[20]。在机制上, SIRT6 可以通过其组蛋

白去乙酰化酶活性, 调节转录因子 PPAR γ 和甾醇调节元件结合蛋白 1/2 (sterol-regulatory element binding protein 1/2, SREBP1/2) 来抑制肝脏的 TG 和胆固醇的生物合成^[4, 21]。这些研究共同表明 SIRT6 是 TG 合成的负向调节因子, 能够通过调节肝脏 TG 合成从而改善肝脏脂肪变性。当小鼠肝脏 SIRT6 敲除时, 会使小鼠肝脏的 TG 合成增加, 形成脂肪肝^[9]。而当小鼠肝脏中的 TG 合成增加, 脂质积累过多时会导致 NASH 的发生^[5]。这提示 SIRT6 也许能够通过调节肝脏 TG 合成从而影响 NASH 的进展。

除了参与 TG 合成外, SIRT6 也参与肝脏中脂肪酸 β -氧化过程的调节。例如, 肝细胞特异性敲除 SIRT6 后, 小鼠肝脏中脂肪酸 β -氧化相关基因 *Cpt1* 及 *Aox* 表达水平明显下调^[19]。此外, Yang 等研究发现, SIRT6 能够激活肝脏中的腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 信号通路, 从而促进脂肪酸 β -氧化, 显著减轻肝脏中脂质的储积^[4]。MicroRNA-122 (miR-122) 是一种在肝脏中高表达的小 RNA, 占肝脏 miRNA 总量的 70%。miR-122 参与肝脏多种代谢过程的调节, 包括胆固醇生物合成、脂肪酸从头合成及 β -氧化等。研究显示, SIRT6 能够通过去乙酰化启动子区域的 H3K56 位点而下调 miR-122 的表达, 从而上调脂肪酸 β -氧化相关基因的表达水平^[22]。以上研究表明 SIRT6 能够通过促进肝脏脂肪酸 β -氧化过程而改善肝脏脂质代谢。Ka 等人在 HFHF 饮食建立 NASH 模型上的研究显示, SIRT6 敲除小鼠肝脏中 β -氧化相关基因如 *Ppara* 和 *Cpt1* 的表达水平下调, 而脂肪酸从头合成相关基因的表达水平无明显改变。因此, SIRT6 敲除小鼠肝脏脂肪堆积增加可能是由于脂肪酸 β -氧化降低所致^[9]。该研究进一步表明 SIRT6 也许能够通过调节肝脏 β -氧化过程来延缓 NASH 的进展。

综上所述, SIRT6 通过其去乙酰化酶活性, 促进肝脏脂肪酸 β -氧化, 抑制 TG 的合成, 从而降低肝脏中脂质沉积。肝脏脂质堆积是触发 NASH 的关键环节, SIRT6 通过调节肝脏脂代谢在 NAFLD 发生以及 NAFLD 向 NASH 进展过程中均发挥着重要的作用。

3 SIRT6与肝脏炎症

炎症是机体受到外伤、感染等损伤因子的刺激时所发生的一种以防御反应为主的基本病理过程^[23]。

当肝脏中有过多脂质积累时, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 自由基、内质网应激和其他组织损伤反应等因素都会引起肝损伤和细胞功能损害。而肝组织损伤还会引起免疫反应, 包括循环的巨噬细胞、驻留的巨噬细胞和中性粒细胞的聚集, 激活肝脏炎症通路, 从而导致 NASH 的发生及发展^[24]。因此, NASH 的病理特点之一是伴有大规模炎症反应。研究显示, 断奶后存活的 SIRT6 突变小鼠多个器官表现出大规模的炎症反应, 其中最严重的是肝脏组织^[25]。进一步研究显示, 与 WT 小鼠相比, SIRT6 突变小鼠肝脏中多种促炎因子的基因表达水平显著上调, 包括单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)、白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6)、IL-1、血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM1) 及 C-C 趋化因子受体 2 (C-C-chemokine receptor 2, CCR2) 等^[25]。这些研究表明 SIRT6 与肝脏炎症有着密切的关系。Zhong 等研究发现, 在西方饮食 (western diet, WD) 所致小鼠 NASH 模型中, 肝脏特异性敲除 SIRT6 导致小鼠肝脏中炎症因子 [如 IL-1 β 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)] 表达水平显著增加, 而肝脏特异性过表达 SIRT6 可显著降低小鼠肝脏中炎症因子的表达^[10]。此外, 在 HFHF 饮食、MCD 饮食和高脂饮食等不同饮食条件下, 肝脏 SIRT6 敲除均导致小鼠肝脏炎症显著加重^[8, 9, 20]。因此, SIRT6 可能在介导 NASH 炎症通路的调控中发挥重要作用。

介导 NASH 炎症的关键促炎信号通路主要包括核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 及 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路^[26]。其中, NF- κ B 是介导多种炎症因子表达的关键转录因子。NF- κ B 信号的激活可促进促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-6 等靶基因的转录及表达^[27–29]。研究人员通过不同的饮食模型 (HFHF, MCD, HFD) 对 NASH 病程中所涉及的脂肪酸 [如 FFA、游离胆固醇 (free cholesterol, FC) 和多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA)] 的脂毒性进行研究, 结果显示这些脂肪酸通过激活 NF- κ B 促炎信号通路, 引起肝脏炎症反应, 促进 NASH 的发展^[30–32]。值得注意的是, 在 NASH 患者及所有 NASH 动物模型的肝脏中均存在 NF- κ B 的活化^[26]。研究显示, 核转录抑制蛋白 I κ B (inhibitor of nuclear factor kappa-B) 的表达可降低 NF- κ B 与 DNA 的结合, 从而抑制促炎相关细胞

因子的转录及表达。这种对 NF- κ B 转录活性的抑制可显著减少肝脏炎症及肝脏损伤, 对 NASH 的进展起到重要的延缓及阻断作用^[26]。SIRT6 作为一种组蛋白去乙酰化酶, 可与 NF- κ B 的 RelA 亚基重链结合, 使 NF- κ B 靶基因启动子 H3K9 去乙酰化, 导致 NF- κ B 靶基因表达降低, 从而缓解肝脏炎症。而 SIRT6 的缺失则促进了 NF- κ B 靶基因的转录及表达^[25]。

除了 NF- κ B 信号通路外, JNK 也是 NASH 发生和发展过程的关键炎症信号通路之一。JNK 可被氧化应激和 FFA、FC 直接激活, 或者通过与生长因子和 TNF 超家族死亡信号受体结合而被激活, 继而激活线粒体凋亡途径, 形成 c-Jun-c-Fos 异二聚体 AP-1 (activator protein 1)。AP-1 具有促炎作用, 通常诱导与 NF- κ B 相似的基因转录与表达^[26]。研究显示, NASH 模型小鼠的肝脏中 JNK 信号通路被激活^[26]。降低饮食中 FC 的含量可抑制 JNK 的活化, 从而减轻肝损伤、肝细胞凋亡和巨噬细胞的蓄积^[26]。且有研究显示, 在小鼠 NASH 模型中, JNK 基因敲除明显减轻了肝脏的炎症和纤维化^[33], 提示 JNK 信号通路在 NASH 发生和发展中起着重要作用。Xiao 等人研究发现, SIRT6 能与 c-Jun 相互作用, 在 c-Jun 启动子上通过 H3K9 去乙酰化作用下调促炎细胞因子 MCP-1、IL-6 及 TNF- α 的表达; 而 SIRT6 的缺失会导致 c-Jun 与其靶基因启动子的结合增加, 从而上调促炎细胞因子的表达, 促进炎症进展; 由 shRNA 介导的 c-Jun 基因的敲低可逆转这些靶基因在 SIRT6 突变细胞中表达上调的情况, 进一步提示 SIRT6 在 JNK 炎症信号通路中的重要作用^[25]。综上, SIRT6 通过其去乙酰化酶活性, 抑制 NF- κ B 及 JNK 等相关炎症信号通路转录因子的活性, 在抑制 NASH 炎症进展过程中发挥关键作用。

4 SIRT6与氧化应激

氧化应激是机体在有氧代谢过程中产生的 ROS/活性氮 (reactive nitrogen species, RNS) 与过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽和维生素 C/E 等非酶电子受体之间的不平衡所引起的细胞应激反应。肥胖、病毒、药物、酒精等多种因素在肝脏内可触发氧化应激。在上述因素的持续刺激下, ROS/RNS 大量生成, 对细胞结构和功能造成严重破坏^[34]。大量证据表明, 氧化应激与慢性炎症密切相关并相互协调, 从而推动了 NASH 的发生和发展^[35]。虽然从单纯性脂肪变性到 NASH 的疾病进展的分子机制

尚未完全阐明,但越来越多的证据表明,氧化应激引起的氧化还原平衡改变在NAFLD、NASH和纤维化的发病机制中起着至关重要的作用^[34]。因此,氧化应激在NASH发病过程中的作用不容小觑。

研究显示,细胞防御氧化应激的一个关键调节因子是核因子E2相关因子2(nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2),它通过抗氧化反应元件(antioxidant reaction element, Are)来调控抗氧化基因的表达^[36]。Nrf2/Are信号通路可以保护内皮细胞免受氧化应激介导的细胞损伤,并抑制炎症反应^[36]。当机体发生氧化应激时,Nrf2易位进入细胞核,与MafK或c-Jun结合形成异源二聚体。而碱性亮氨酸拉链转录因子1(basic leucine zipper transcription factor 1, Bach1)也能够与MafK形成异二聚体,并与Nrf2竞争结合Are位点。Bach1可以阻断Nrf2介导的抗氧化基因的表达,成为Nrf2的功能抑制剂^[9]。研究显示,SIRT6是保护细胞免受氧化应激损伤的重要蛋白分子^[37]。SIRT6能够激活受Nrf2调控的抗氧化基因的转录及表达,细胞缺失SIRT6会导致胞内ROS水平显著增加^[9, 37]。此外,SIRT6能够在抗氧化因子血红素氧合酶1(heme oxygenase-1, HO-1)基因的启动子上发挥其H3K56去乙酰化酶作用,正向调控Nrf2介导的抗氧化通路,从而使得细胞免受氧化应激^[37]。为了进一步探讨SIRT6是否能够通过调节Nrf2相关通路来影响NASH的发病进程,Ka等人给予小鼠HFHF饮食16周以构建NASH小鼠模型,发现肝脏中SIRT6的缺失导致细胞核中Nrf2表达降低而Bach1表达增加,Nrf2与HO-1启动子区Are位点的结合减少,而Bach1与这些启动子的结合增加,导致Nrf2的抗氧化功能减弱,从而加重肝脏炎症。而过表达Sirt6可逆转这一改变,显著减轻氧化应激所致肝脏炎症及损伤。机制研究结果显示,SIRT6可降低Bach1与MafK的相互作用,增强Nrf2的核转位并增加Nrf2与MafK的相互作用和下游抗氧化靶基因的转录激活,从而抑制ROS介导的NASH进展^[9]。这些研究表明SIRT6是重要的Nrf2辅助激活因子,能够通过调节Nrf2介导的抗氧化应激途径来改善NASH的进展。

5 SIRT6与肝纤维化

研究表明,NASH通常伴随着不同程度的肝纤维化^[5]。肝纤维化的发生机制是由受压或受损的肝细胞和活化的巨噬细胞(肝脏中的Kupffer细胞)发

出的信号所驱动,从而导致肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化成为肌成纤维细胞,后者分泌大量细胞外基质(包括I型和III型胶原)导致肝脏纤维化的形成^[38]。以往的研究表明,转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是诱导肝纤维化最关键的细胞因子^[39],它能够诱导HSC的激活,使得细胞外基质沉积,促进肝纤维化的发生^[40]。Smad蛋白家族是TGF- β 信号传导至核内的关键下游信号分子。其中,Smad2/3在TGF- β 诱导的肝纤维化过程中起促进作用^[40]。

之前有研究者通过HFHF饮食喂养小鼠16周后建立NASH模型,发现肝细胞特异性敲除SIRT6会加重小鼠肝纤维化^[9]。此外,Zhong等通过对NASH患者肝活体标本进行检测发现,当疾病进展到纤维化后,肝脏中SIRT6表达水平显著降低,进一步提示SIRT6在NASH进展到肝纤维化的过程中具有重要调控作用^[10]。本研究组近期研究发现,与肝脏中其他类型的细胞相比,HSC中SIRT6的表达最为丰富,而在HSC激活后,SIRT6的表达水平显著降低^[41]。此外,SIRT6在纤维性肝分离出的HSC中的表达明显降低^[41],这与Zhong等人的发现一致,且HSC中SIRT6的缺失会加重小鼠的肝纤维化^[10]。这些结果均提示SIRT6可能在肝纤维化发生和发展过程中扮演重要角色。

研究显示,SIRT6能够通过H3K9去乙酰化作用,抑制Smad家族成员中的Smad3的激活,从而抑制关键的TGF- β 信号基因的表达,发挥重要的纤维化缓解作用^[39]。此外,本研究组先前的研究显示,SIRT6能够在Smad2上的Lys54位点去乙酰化而抑制TGF- β 信号,从而抑制由TGF- β 诱导的HSC的活化,进而显著减轻肝纤维化^[41]。值得注意的是,在该研究中本研究组首次使用SIRT6变构激动剂MDL-800来作用于被激活的HSC细胞,结果显示MDL-800显著降低了肝纤维化相关基因的表达^[41]。该研究进一步证实了SIRT6在肝纤维化过程中的重要作用。此外,Zhong等人用WD喂养小鼠建立NASH模型,发现小鼠肝脏HSC细胞中SIRT6表达水平显著低于NCD组小鼠,而Smad2和Smad3磷酸化水平明显升高^[10]。TGF- β 处理的原代HSC中SIRT6的mRNA表达水平显著下调,提示SIRT6可能参与TGF- β 诱导的HSC活化。与WT小鼠相比,HSC特异性敲除SIRT6的小鼠肝脏纤维化程度显著增加,而SIRT6转基因小鼠的肝纤维化程度明显减

轻。机制研究显示, SIRT6 通过在 Smad3 上的 K333 和 K378 位点去乙酰化抑制 TGF- β 诱导的 HSC 活化, 从而诱导肝纤维化相关基因的表达下调, 抑制了肝纤维化的发生和发展^[10]。综上所述, 目前的研究表明 SIRT6 可能通过 Smad2/3 调节由 TGF- β 诱导的 HSC 活化, 从而在缓解肝纤维化过程中发挥重要作用, 但 SIRT6 在 NASH 发展为肝纤维化过程中的具体机制仍需要进一步研究。

6 SIRT6与肝癌

研究表明, NASH 是肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 发生的重要危险因素。由 NASH 进展到 HCC 的机制是非常复杂的。在 NASH 存在的情况下, 由于代谢和氧化应激、炎症、免疫反应以及纤维化的影响, 对肝细胞的持续破坏和代偿性增殖创造了一个有利于癌变的环境。随着从慢性肝炎、肝硬化再演变为肝癌, 基因组畸变逐渐积累^[42]。因此, 了解 SIRT6 在 NASH 进展为肝硬化及肝癌中所扮演的角色对于 NASH 的治疗也是十分重要的。研究显示, SIRT6 通过去乙酰化作用下调 miR-122 的表达, 从而促进脂肪酸 β -氧化; 而 miR-122 则可抑制 SIRT6 的表达水平, 从而抑制肝脏脂肪酸 β -氧化, 因此 SIRT6 和 miR-122 相互调节, 在脂肪酸 β -氧化过程中发挥相反的调节作用。但在 HCC 中, miR-122 和 SIRT6 都是有效的抑癌基因^[22]。对肝癌患者预后情况的分析结果显示, 预后较好的患者 SIRT6 与 miR-122 的表达无显著的相关性^[22]。而且研究显示 miR-122 在 NASH 所致 HCC 小鼠模型和 NASH 所致 HCC 患者的肝组织样本中的表达都明显下调^[43]。同时, 体内研究表明 SIRT6 的表达上调在肝癌早期的重要性^[44]。因此, SIRT6 和 miR-122 表达水平之间的相关性可作为肝癌患者治疗效果的生物标志物, 两者也许在 NASH 所致 HCC 过程中起着重要的作用。此外, 研究显示, c-Jun、AP-1 和 Survivin 的活化与人类炎症性肝病和慢性肝炎有关^[44–46]。在肝癌早期, AP-1 的组成部分 c-Jun 和 c-Fos 能够增加 SIRT6 的表达水平, 后者通过去乙酰化 H3K9 来抑制 NF- κ B 的激活, 进而抑制癌基因 Survivin 的表达, 从而延缓肝癌的发展^[44]。

7 结语与展望

NAFLD 是目前世界范围内最常见的慢性肝病之一, 包括非酒精性脂肪肝、NASH、肝纤维化、

肝硬化以及肝癌。虽然单纯的脂肪变性可以保持为良性和无症状的疾病, 改变饮食和体力活动后可能会消退, 但随着时间的推移, 大约 30% 的 NAFLD 患者会进展为 NASH, 且 NASH 大幅度增加了罹患肝硬化甚至肝癌的风险^[47]。迄今为止, NASH 的发病机制仍未完全阐明, 且尚无针对 NASH 的靶向治疗药物上市, 患者只能通过控制体重、血脂等水平来稳定 NASH 的病情发展^[47]。因此, 进一步揭示 NASH 发生和发展的机制, 探寻 NASH 潜在治疗靶点对于防治 NASH 十分重要。

NASH 的发生和发展是一个十分复杂的过程, 除了肝脏自身的一些反应外, NASH 的发生和发展与某些肝外组织也有关系, 包括肠道、脂肪组织与肌肉组织等。在肠道中, 肠道释放的脂多糖会加重炎症和肝细胞凋亡, 从而影响 NASH 的进展^[48]。在脂肪组织中, 当机体发生脂肪变性时, 脂肪组织会释放出 MCP-1、TNF- α 等脂肪因子加重机体胰岛素抵抗^[26, 48]。此外, 研究表明, 肌肉组织在胰岛素信号传导过程中起着重要的作用。骨骼肌分泌的肌因子 Irisin 能通过 PPAR α 通路参与肝脏脂肪酸 β -氧化过程, 从而影响 NASH 的进展^[49]。而已有研究表明, SIRT6 能够调节机体肠道及脂肪的炎症及机体胰岛素抵抗过程, 且当肌肉组织中 SIRT6 缺乏时小鼠也会出现胰岛素抵抗^[50–52]。本文前面已经提到 SIRT6 能够通过不同的信号通路影响肝脏的炎症、脂代谢、纤维化等过程, 进而在 NASH 进展过程中发挥重要作用, 再结合以上这些研究, 表明 SIRT6 有可能通过作用于其它组织从而间接影响 NASH 的发生和发展。虽然 SIRT6 在 NASH 中的具体作用机制尚不明确, 但目前已有多项研究表明在 NASH 患者的肝脏组织中 SIRT6 的表达量明显下调, SIRT6 会随着 NASH 进展为肝纤维化而表达下调^[10, 41, 53], 这些在临床 NASH 患者肝脏中观察到 SIRT6 下调的结果是令人欣喜的, 这对 NASH 的临床治疗具有一定的启示作用。同时, 到目前为止, 研究者们已经发现了多种不同的 SIRT6 激动剂^[54]。SIRT6 激动剂对于 NASH 的治疗作用也逐渐被证实。例如, 能够增加 SIRT6 去乙酰化酶活性的 SIRT6 激动剂槲皮素和花青素已被证明能够通过抗氧化应激途径来减轻 NASH 引起的肝损伤以及肝纤维化^[55, 56]。此外, 本研究组近期也证实 SIRT6 特异性激活剂 MDL-800 能够显著抑制肝纤维化的进程, 进一步提示 SIRT6 激动剂对 NASH 具有潜在的治疗作用^[41, 54]。

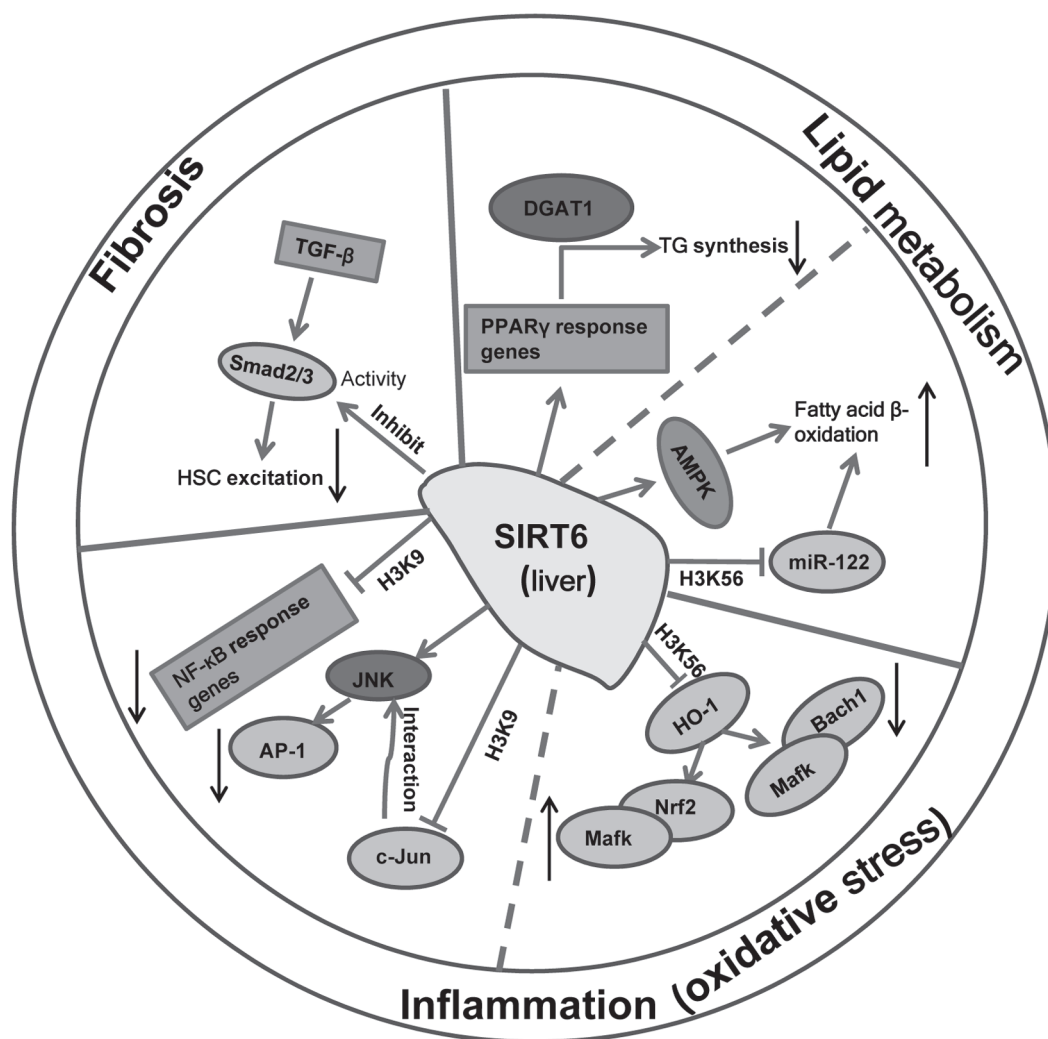


图 1. SIRT6在NASH中的作用

Fig. 1. The role of SIRT6 in nonalcoholic steatohepatitis (NASH). SIRT6 decreases triglyceride (TG) accumulation in liver by inhibiting TG synthesis and increasing fatty acid β -oxidation, inhibits liver inflammation by regulating nuclear factor- κ B (NF- κ B) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathways, plays the function of antioxidant stress by enhancing Nrf2 transcriptional activity, and regulates the occurrence and development of liver fibrosis by inhibiting the activation of hepatic stellate cells (HSCs) through transforming growth factor- β (TGF- β)/Smad signaling pathway. AP-1, activator protein 1; AMPK, AMP-activated protein kinase; HO-1, heme oxygenase-1; DGAT1, diacylglycerol acyltransferase 1.

基于已有的研究，我们有理由相信，SIRT6有望成为NASH治疗的潜在靶点，SIRT6激动剂的开发能够为NASH的治疗带来新的曙光。

综上，现有的证据已经证实SIRT6作为一种组蛋白去乙酰化酶，在肝脏代谢的多个环节发挥重要调控作用（图1），主要包括：（1）通过抑制肝脏中TG合成、增加脂肪酸 β -氧化而改善肝脏中TG的储积；（2）通过调控NF- κ B及JNK信号通路而抑制肝脏中炎症的发生和发展；（3）通过增强Nrf2的转

录活性而发挥抗氧化应激功能；（4）通过TGF- β /Smad信号通路抑制HSC的活化，进而抑制肝纤维化的发生。此外，学者们已经发现SIRT6的激动剂对肝脏纤维化有明显的治疗作用^[41, 55, 56]。在之后的研究中也也许可以从NASH发病机制的“多次打击”学说入手，结合这些SIRT6的已知功能及其与其它组织疾病间的联系，为我们进一步研究SIRT6在NASH中的作用机制带来一些启发，也可能使得SIRT6成为NASH治疗的潜在靶点。

参考文献

- Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* 2010; 5: 253–295.
- Rine J, Strathern JN, Hicks JB, Herskowitz I. A suppressor of mating-type locus mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for and identification of cryptic mating-type loci. *Genetics* 1979; 93(4): 877–901.
- Chang AR, Ferrer CM, Mostoslavsky R. SIRT6, a mammalian deacetylase with multitasking abilities. *Physiol Rev* 2020; 100(1): 145–169.
- Yang SJ, Choi JM, Chae SW, Kim WJ, Park SE, Rhee EJ, Lee WY, Oh KW, Park SW, Kim SW, Park CY. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by rosiglitazone increases sirt6 expression and ameliorates hepatic steatosis in rats. *PLoS One* 2011; 6(2): e17057.
- Lequoy M, Gigante E, Couty JP, Desbois-Mouthon C. Hepatocellular carcinoma in the context of non-alcoholic steatohepatitis (NASH): recent advances in the pathogenic mechanisms. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2020; 41(1):/j/hmbci.2020.41.issue-1/hmbci-2019-0044/hmbci-2019-0044.xml. doi: 10.1515/hmbci-2019-0044.
- Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM* 2010; 103(2): 71–83.
- Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010; 52(5): 1836–1846.
- Bae UJ, Park EO, Park J, Jung SJ, Ham H, Yu KW, Park YJ, Chae SW, Park BH. Gypenoside UL4-rich gynostemma pentaphyllum extract exerts a hepatoprotective effect on diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Chin Med* 2018; 46(6): 1315–1332.
- Ka SO, Bang IH, Bae EJ, Park BH. Hepatocyte-specific sirtuin 6 deletion predisposes to nonalcoholic steatohepatitis by up-regulation of Bach1, an Nrf2 repressor. *FASEB J* 2017; 31(9): 3999–4010.
- Zhong X, Huang M, Kim HG, Zhang Y, Chowdhury K, Cai W, Saxena R, Schwabe RF, Liangpunsakul S, Dong XC. SIRT6 protects against liver fibrosis by deacetylation and suppression of SMAD3 in hepatic stellate cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2020; 10(2): 341–364.
- Bang IH, Kwon OK, Hao L, Park D, Chung MJ, Oh BC, Lee S, Bae EJ, Park BH. Deacetylation of XBP1s by sirtuin 6 confers resistance to ER stress-induced hepatic steatosis. *Exp Mol Med* 2019; 51(9): 1–11.
- Mahlknecht U, Ho AD, Voelter-Mahlknecht S. Chromosomal organization and fluorescence *in situ* hybridization of the human Sirtuin 6 gene. *Int J Oncol* 2006; 28(2): 447–456.
- Tennen RI, Berber E, Chua KF. Functional dissection of SIRT6: identification of domains that regulate histone deacetylase activity and chromatin localization. *Mech Ageing Dev* 2010; 131(3): 185–192.
- Gertler AA, Cohen HY. SIRT6, a protein with many faces. *Biogerontology* 2013; 14(6): 629–639.
- Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padilla-Nash H, Damian M, Cheung P, Kusumoto R, Kawahara TL, Barrett JC, Chang HY, Bohr VA, Ried T, Gozani O, Chua KF. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature* 2008; 452(7186): 492–496.
- Tasselli L, Xi Y, Zheng W, Tennen RI, Odrowaz Z, Simeoni F, Li W, Chua KF. SIRT6 deacetylates H3K18ac at pericentric chromatin to prevent mitotic errors and cellular senescence. *Nat Struct Mol Biol* 2016; 23(5): 434–440.
- Yilmaz Y. Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions? *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36(9): 815–823.
- Alves-Bezerra M, Cohen DE. Triglyceride metabolism in the liver. *Compr Physiol* 2017; 8(1): 1–8.
- Kim HS, Xiao C, Wang RH, Lahusen T, Xu X, Vassilopoulos A, Vazquez-Ortiz G, Jeong WI, Park O, Ki SH, Gao B, Deng CX. Hepatic-specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis. *Cell Metab* 2010; 12(3): 224–236.
- Kanfi Y, Peshti V, Gil R, Naiman S, Nahum L, Levin E, Kronfeld-Schor N, Cohen HY. SIRT6 protects against pathological damage caused by diet-induced obesity. *Aging Cell* 2010; 9(2): 162–173.
- Tao R, Xiong X, DePinho RA, Deng CX, Dong XC. Hepatic SREBP-2 and cholesterol biosynthesis are regulated by FoxO3 and Sirt6. *J Lipid Res* 2013; 54(10): 2745–2753.
- Elhanati S, Ben-Hamo R, Kanfi Y, Varvak A, Glazz R, Lerrer B, Efroni S, Cohen HY. Reciprocal regulation between SIRT6 and miR-122 controls liver metabolism and predicts hepatocarcinoma prognosis. *Cell Rep* 2016; 14(2): 234–242.
- Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB. Inflammation and cancer. *Ann Afr Med* 2019; 18(3): 121–126.
- Haas JT, Francque S, Staels B. Pathophysiology and mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *Annu Rev Physiol* 2016; 78: 181–205.
- Xiao C, Wang RH, Lahusen TJ, Park O, Bertola A, Maruyama T, Reynolds D, Chen Q, Xu X, Young HA, Chen WJ, Gao B, Deng CX. Progression of chronic liver inflammation and fibrosis driven by activation of c-JUN signaling in Sirt6 mutant mice. *J Biol Chem* 2012; 287(50): 41903–

- 41913.
- 26 Farrell GC, van Rooyen D, Gan L, Chitturi S. NASH is an inflammatory disorder: Pathogenic, prognostic and therapeutic implications. *Gut Liver* 2012; 6(2): 149–171.
- 27 Ratzliff V, Harrison SA, Francque S, Bedossa P, Leher P, Serfaty L, Romero-Gomez M, Boursier J, Abdelmalek M, Caldwell S, Drenth J, Anstee QM, Hum D, Hanf R, Roudot A, Megnien S, Staels B, Sanyal A. Elafibranor, an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor- α and - δ , induces resolution of nonalcoholic steatohepatitis without fibrosis worsening. *Gastroenterology* 2016; 150(5): 1147–1159.e5.
- 28 Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2015; 7(8): 1012–1019.
- 29 Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* 2012; 52(1): 59–69.
- 30 Lee GS, Yan JS, Ng RK, Kakar S, Maher JJ. Polyunsaturated fat in the methionine-choline-deficient diet influences hepatic inflammation but not hepatocellular injury. *J Lipid Res* 2007; 48(8): 1885–1896.
- 31 Li Z, Berk M, McIntyre TM, Gores GJ, Feldstein AE. The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity. *Hepatology* 2008; 47(5): 1495–1503.
- 32 Tetri LH, Basaranoglu M, Brunt EM, Yeran LM, Neuschwander-Tetri BA. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295(5): G987–G995.
- 33 Brenner DA, Seki E, Taura K, Kisseleva T, Deminici S, Iwaisako K, Inokuchi S, Schnabl B, Oesterreicher CH, Paik YH, Miura K, Kodama Y. Non-alcoholic steatohepatitis-induced fibrosis: Toll-like receptors, reactive oxygen species and Jun N-terminal kinase. *Hepatol Res* 2011; 41(7): 683–686.
- 34 Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci* 2015; 16(11): 26087–26124.
- 35 Li S, Hong M, Tan HY, Wang N, Feng Y. Insights into the role and interdependence of oxidative stress and inflammation in liver diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 4234061.
- 36 Chen XL, Dodd G, Thomas S, Zhang X, Wasserman MA, Rovin BH, Kunsch C. Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(5): H1862–H1870.
- 37 Pan H, Guan D, Liu X, Li J, Wang L, Wu J, Zhou J, Zhang W, Ren R, Zhang W, Li Y, Yang J, Hao Y, Yuan T, Yuan G, Wang H, Ju Z, Mao Z, Li J, Qu J, Tang F, Liu GH. SIRT6 safeguards human mesenchymal stem cells from oxidative stress by coactivating NRF2. *Cell Res* 2016; 26(2): 190–205.
- 38 Seki E, Brenner DA, Karin M. A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology* 2012; 143(2): 307–320.
- 39 Maity S, Muhamed J, Sarikhani M, Kumar S, Ahamed F, Spurthi KM, Ravi V, Jain A, Khan D, Arathi BP, Desingu PA, Sundaresan NR. Sirtuin 6 deficiency transcriptionally up-regulates TGF- β signaling and induces fibrosis in mice. *J Biol Chem* 2020; 295(2): 415–434.
- 40 Xu F, Liu C, Zhou D, Zhang L. TGF- β /SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis. *J Histochem Cytochem* 2016; 64(3): 157–167.
- 41 Zhang J, Li Y, Liu Q, Huang Y, Li R, Wu T, Zhang Z, Zhou J, Huang H, Tang Q, Huang C, Zhao Y, Zhang G, Jiang W, Mo L, Zhang J, Xie W, He J. Sirt6 alleviated liver fibrosis by deacetylating conserved lysine 54 on Smad2 in hepatic stellate cells. *Hepatology* 2021; 73(3): 1140–1157.
- 42 Kutlu O, Kaleli HN, Ozer E. Molecular pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis- (NASH-) related hepatocellular carcinoma. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018; 2018: 8543763.
- 43 Takaki Y, Saito Y, Takasugi A, Toshimitsu K, Yamada S, Muramatsu T, Kimura M, Sugiyama K, Suzuki H, Arai E, Ojima H, Kanai Y, Saito H. Silencing of microRNA-122 is an early event during hepatocarcinogenesis from non-alcoholic steatohepatitis. *Cancer Sci* 2014; 105(10): 1254–1260.
- 44 Min L, Ji Y, Bakiri L, Qiu Z, Cen J, Chen X, Chen L, Scheuch H, Zheng H, Qin L, Zatloukal K, Hui L, Wagner EF. Liver cancer initiation is controlled by AP-1 through SIRT6-dependent inhibition of survivin. *Nat Cell Biol* 2012; 14(11): 1203–1211.
- 45 Montorsi M, Maggioni M, Falleni M, Pellegrini C, Donadon M, Torzilli G, Santambrogio R, Spinelli A, Coggi G, Bosari S. Survivin gene expression in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2007; 54(79): 2040–2044.
- 46 Hasselblatt P, Rath M, Komnenovic V, Zatloukal K, Wagner EF. Hepatocyte survival in acute hepatitis is due to c-Jun/AP-1-dependent expression of inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(43): 17105–17110.
- 47 Roeb E, Geier A. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) - current treatment recommendations and future developments. *Z Gastroenterol* 2019; 57(4): 508–517.
- 48 Bessone F, Razori MV, Roma MG. Molecular pathways of

- nonalcoholic fatty liver disease development and progression. *Cell Mol Life Sci* 2019; 76(1): 99–128.
- 49 Bhanji RA, Narayanan P, Allen AM, Malhi H, Watt KD. Sarcopenia in hiding: The risk and consequence of underestimating muscle dysfunction in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2017; 66(6): 2055–2065.
- 50 Xu K, Guo Y, Ping L, Qiu Y, Liu Q, Li Z, Wang Z. Protective effects of SIRT6 overexpression against DSS-induced colitis in mice. *Cells* 2020; 9(6): 1513.
- 51 Kuang J, Zhang Y, Liu Q, Shen J, Pu S, Cheng S, Chen L, Li H, Wu T, Li R, Li Y, Zou M, Zhang Z, Jiang W, Xu G, Qu A, Xie W, He J. Fat-specific Sirt6 ablation sensitizes mice to high-fat diet-induced obesity and insulin resistance by inhibiting lipolysis. *Diabetes* 2017; 66(5): 1159–1171.
- 52 Cui X, Yao L, Yang X, Gao Y, Fang F, Zhang J, Wang Q, Chang Y. SIRT6 regulates metabolic homeostasis in skeletal muscle through activation of AMPK. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2017; 313(4): E493–E505.
- 53 Wu T, Liu YH, Fu YC, Liu XM, Zhou XH. Direct evidence of sirtuin downregulation in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Ann Clin Lab Sci* 2014; 44(4): 410–418.
- 54 Klein MA, Denu JM. Biological and catalytic functions of sirtuin 6 as targets for small-molecule modulators. *J Biol Chem* 2020; 295(32): 11021–11041.
- 55 Shih PH, Hwang SL, Yeh CT, Yen GC. Synergistic effect of cyanidin and PPAR agonist against nonalcoholic steatohepatitis-mediated oxidative stress-induced cytotoxicity through MAPK and Nrf2 transduction pathways. *J Agric Food Chem* 2012; 60(11): 2924–2933.
- 56 Marcolin E, San-Miguel B, Vallejo D, Tieppo J, Marroni N, González-Gallego J, Tuñón MJ. Quercetin treatment ameliorates inflammation and fibrosis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr* 2012; 142(10): 1821–1828.