

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.05.0583

· 论 著 ·

大麻二酚通过促进自噬流减轻棕榈酸诱导的肝细胞损伤

陈 瑞,高晓刚,张 雷,施晓敏,郭闻渊,傅志仁*

第二军医大学长征医院器官移植科,上海 200003

[摘要] **目的** 观察大麻二酚(CBD)对棕榈酸(PA)诱导的肝细胞损伤的保护作用,并考察其与自噬流相关的潜在机制。**方法** 原代培养大鼠肝细胞,分别给予 1 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 CBD 处理 24 h,采用蛋白质印迹法检测自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)和 p62 的表达,考察 CBD 对细胞自噬的影响。将细胞分为 4 组并分别给予不同处理: PA 组(800 $\mu\text{mol/L}$ PA 处理细胞)、PA+CBD 组(800 $\mu\text{mol/L}$ PA 和 5 $\mu\text{mol/L}$ CBD 联合作用)、PA+CBD+CQ 组[800 $\mu\text{mol/L}$ PA、5 $\mu\text{mol/L}$ CBD 和 50 nmol/L 自噬抑制剂氯喹(CQ)共同作用]和阴性对照组(加入等体积 0.03% DMSO 处理细胞),每组作用时间均为 24 h;采用蛋白质印迹法检测 LC3 和 p62 的蛋白表达,流式细胞术考察细胞凋亡情况,qPCR 法检测内质网应激相关因子 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)、葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)和 X 盒结合蛋白 1(XBP-1) mRNA 的表达,Rh123 和 lucigenin 荧光探针分别检测线粒体的膜电位和活性氧簇(ROS)含量。**结果** 1 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ CBD 均不影响肝细胞 LC3-II/LC3-I 的比值以及 p62 蛋白的表达。与阴性对照组相比,PA 组肝细胞 LC3-II/LC3-I 的比值和 p62 蛋白表达增加($P<0.05$),细胞凋亡增加($P<0.05$),CHOP、GRP78、XBP-1 mRNA 表达增加($P<0.05$),线粒体膜电位降低($P<0.05$),线粒体 ROS 的生成增加($P<0.05$);与 PA 组相比,PA+CBD 组肝细胞内的自噬流恢复,细胞凋亡减少,内质网应激和线粒体失常减轻($P<0.05$);同时给予 CQ 处理可以逆转 CBD 的保护作用($P<0.05$)。**结论** CBD 能够通过促进自噬流减轻 PA 诱导的肝细胞损伤,改善内质网应激和线粒体功能。

[关键词] 肝细胞;大麻二酚;棕榈酸;自噬流;内质网应激;线粒体功能障碍;细胞凋亡

[中图分类号] R 575 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)05-0583-06

Cannabidiol attenuates palmitic acid-induced hepatocytes injury through promoting autophagic flux

CHEN Rui, GAO Xiao-gang, ZHANG Lei, SHI Xiao-min, GUO Wen-yuan, FU Zhi-ren*

Department of Organ Transplantation, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To explore the protective effect of cannabidiol (CBD) on palmitic acid (PA)-induced hepatocytes injury and to investigate the underlying mechanism associated with autophagic flux. **Methods** Primary cultured rat hepatocytes were treated with 1 or 5 $\mu\text{mol/L}$ CBD for 24 h and Western blotting was performed to detect autophagy-related protein microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and p62 expressions. Then the hepatocytes were divided into 4 groups and received different interventions, including PA group (the hepatocytes were stimulated with 800 $\mu\text{mol/L}$ PA), PA+CBD group (the hepatocytes were co-stimulated with 800 $\mu\text{mol/L}$ PA and 5 $\mu\text{mol/L}$ CBD), PA+CBD+CQ group (the hepatocytes were co-stimulated with 800 $\mu\text{mol/L}$ PA, 5 $\mu\text{mol/L}$ CBD and 50 nmol/L autophagy inhibitor chloroquine [CQ]) and negative control group (an equal volume of 0.03% DMSO was added to the culture medium); the hepatocytes in all groups were treated for 24 h. We used Western blotting to detect LC3 and p62 proteins expressions, flow cytometry to determine apoptosis, qPCR assay to detect the mRNA expressions of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP), glucose-regulated protein 78 (GRP78) and X-box-binding protein 1 (XBP-1), and the Rh123 and lucigenin fluorescent probes to detect the mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species (ROS) content, respectively. **Results** The ratio of LC3-II to LC3-I and p62

[收稿日期] 2016-12-02 **[接受日期]** 2017-02-21

[基金项目] 国家自然科学基金(81470900, 31100639),上海市自然科学基金(11ZR1448100). Supported by National Natural Science Foundation of China (81470900, 31100639) and Natural Science Foundation of Shanghai (11ZR1448100).

[作者简介] 陈 瑞,硕士,主治医师. E-mail: roberto008@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885741, E-mail: zhirenf@sh163.net

protein expression had no change in the cultured rat hepatocytes treated with 1 or 5 $\mu\text{mol/L}$ CBD. Compared with the negative control group, the ratio of LC- II to LC3- I and p62 protein expression were significantly increased ($P < 0.05$), the apoptosis was significantly risen ($P < 0.05$), the mRNA expressions of *CHOP*, *GRP78* and *XBP-1* were significantly increased ($P < 0.05$), mitochondrial membrane potential was significantly decreased ($P < 0.05$), and the ROS content in mitochondrial was significantly increased ($P < 0.05$) in the PA group. Compared with PA group, the hepatocytes in the PA + CBD group showed an improved autophagic flux, increased apoptosis, reduced endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction (all $P < 0.05$). The protective effect of CBD on PA-induced hepatocytes injury was significantly inhibited by co-incubation with CQ ($P < 0.05$). **Conclusion** CBD can attenuate PA-induced hepatocytes injury through promoting autophagic flux, reducing hepatocyte apoptosis, and improving endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction.

[**Key words**] hepatocytes; cannabidiol; palmitic acid; autophagic flux; endoplasmic reticulum stress; mitochondrial dysfunction; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(5): 583-588]

非酒精性脂肪肝病(NAFLD)指排除酒精、病毒及其他明确的肝脏损害因素,由遗传、环境、代谢应激相关因素共同导致的脂质在肝细胞沉积,进而引起弥漫性肝细胞脂肪变。NAFLD发展到后期会出现肝纤维化、肝硬化,甚至肝细胞癌。现今 NAFLD 作为一种越来越普遍的慢性肝病,日益受到医务工作者的重视^[1]。

大麻的药用价值虽然早就为人们所熟知,但因其成瘾性和精神致幻作用,使其临床应用受到极大限制。大麻主要的活性成分是 Δ^9 -四氢大麻醇和大麻二酚(cannabidiol, CBD),与 Δ^9 -四氢大麻醇不同的是, CBD 没有成瘾性和精神致幻作用^[2]。CBD 可以通过受体和非受体的方式发挥药理作用,目前关于 CBD 的研究主要集中于免疫调控、促血管新生、抗癌,以及神经和心血管保护作用等^[3],而在肝功能保护方面的研究较少。体外细胞实验发现, Δ^9 -四氢大麻醇或 CBD 可以减轻油酸(不饱和脂肪酸)在肝细胞中的聚集^[4],预示 CBD 也许可以减轻 NAFLD 发病过程中脂肪酸对肝脏细胞造成的损伤。研究证明 NAFLD 中主要是饱和脂肪酸诱发脂肪毒性,促进细胞凋亡^[5-6]。为了证实 CBD 在 NAFLD 中的潜在作用,需要进一步阐明 CBD 是否对饱和脂肪酸诱导的肝脏损伤具有保护作用。

棕榈酸(palmitic acid, PA)是一种饱和脂肪酸,常被用于在体外实验中模拟 NAFLD 发病过程,诱导肝细胞损伤^[7]。因此本研究建立 PA 诱导的肝细胞损伤模型,观察 CBD 对 PA 在肝细胞中诱导的脂肪毒性的作用,并探讨相关机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物 15 只清洁级 8 周龄 SD 大鼠(250~300 g)购自第二军医大学动物实验中心,性别不限。动物生产许可证号:SCXK(沪)2012-0003,使用许可证号:SYXK(沪)2012-0003。

1.2 原代大鼠肝细胞培养 大鼠腹腔注射 3%戊巴比妥钠(2 mL/kg)麻醉,固定、消毒,U 型剖腹,18 号留置针穿刺门静脉,用 37 $^{\circ}\text{C}$ Hank's 平衡盐溶液冲洗肝脏,然后用 37 $^{\circ}\text{C}$ 预温的含有 IV 型胶原酶 Hank's 平衡盐溶液(0.75 mg/mL, 5 mL/min)灌注,摘取肝脏,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 DMEM 培养液中剪碎。细胞悬液先后经过 70 μm 和 40 μm 的尼龙筛网过滤。4 $^{\circ}\text{C}$ 30 \times g 离心 5 min,取沉淀用 DMEM 溶液洗 2 次。计数后以 5×10^5 /mL 细胞密度接种、培养(10%胎牛血清的 DMEM 培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95%空气的培养箱),约 6 h 后细胞贴壁,换液,培养 24 h 后开始实验。

1.3 实验分组与处理 首先分别给予肝细胞 1 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 CBD 处理 24 h,对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)给予等体积 0.03% DMSO 处理相同时间,每组设 3 个复孔,以观察 CBD 对肝细胞自噬流的影响。

另取肝细胞分为 4 组:阴性对照组、PA 组、PA + CBD 组和 PA + CBD + CQ 组。(1)PA 组,给予肝细胞 PA (800 $\mu\text{mol/L}$ ^[7]; P0500, 美国 Sigma 公司)处理 24 h;(2)PA + CBD 组,给予肝细胞 800 $\mu\text{mol/L}$ PA 与

5 $\mu\text{mol/L}$ [8] CBD (C7515, 美国 Sigma 公司) 处理 24 h; (3) PA + CBD + CQ 组, 给予肝细胞 PA (800 $\mu\text{mol/L}$)、CBD (5 $\mu\text{mol/L}$) 和自噬抑制剂氯喹 (chloroquine, CQ; 50 nmol/L [7]; C6628, 美国 Sigma 公司) 处理 24 h; (4) 阴性对照组, 给予肝细胞与前 3 组等体积 0.03% DMSO 处理细胞 24 h。每个实验组 DMSO 终浓度均为 0.03%。每组设 3 个复孔。

1.4 蛋白质印迹法检测自噬相关蛋白的表达 加入细胞裂解液 (P0013, 上海碧云天生物试剂公司) 裂解细胞并收集细胞蛋白, 100 $^{\circ}\text{C}$ 蛋白变性 10 min, 用蛋白浓度定量检测试剂盒 (GMS30031, 上海杰美基因医药科技有限公司) 测定蛋白浓度。行 SDS-PAGE 分离蛋白, 湿转法转膜 (PVDF 膜), 5% 脱脂奶粉室温封闭 4 h, TBST 溶液洗涤后依次标记一抗 LC3 抗体 (1 : 1 000; L7543, 美国 Sigma 公司)、p62 抗体 (1 : 500; SC-28359, 美国 Santa Cruz 公司) 和相应二抗, 以 GAPDH 作为内参照蛋白 (GAPDH 抗体, SC-32233, 美国 Santa Cruz 公司)。采用 ECL 发光法显影拍照, 用 Image J 图像分析软件分析条带灰度值。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡水平 按照细胞凋亡检测试剂盒 (V13241, 美国 Invitrogen 公司) 操作说明, 收集各组细胞, 800 $\times g$ 离心 8 min, PBS 冲洗 2 次。加入膜联蛋白 V (annexin V) 和碘化丙啶 (propidium iodide, PI), 混匀后 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min。用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况, 计算凋亡细胞的比例。

1.6 实时定量 PCR (qPCR) 检测内质网应激相关基因 mRNA 的表达 采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 反转录获得 cDNA, 按 qPCR 试剂盒 (210210, 德国 QIAGEN 公司) 操作说明进行 PCR 反应, 检测 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP; 上游 5'-GCA TGA AGG AGA AGG AGC AG-3', 下游 5'-CTT CCG GAG AGA CAG ACA GG-3')、葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78; 上游 5'-TCA TCG GAC GCA CTT GGA A-3', 下游 5'-CAA CCA CCT TGA ATG GCA AGA-3') 和 X 盒结合蛋白 1 (XBP-1; 上游 5'-CCT GAG CCC GGA GGA GAA-3', 下游 5'-CTC GAG CAG TCT GCG CTG-3') mRNA 的表达。用 GAPDH (5'-AGA CAG CCG

CAT CTT CTT GT-3'; 5'-CTT GCC GTG GGT AGA GTC AT-3') 作为内参基因。采用 MJ Opticon Monitor 软件记录整理所得数据, mRNA 表达水平用倍数变化 ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) 表示。

1.7 探针法检测线粒体功能 收集细胞, 加入预冷的提取液 (0.25 mol/L 蔗糖, 0.01 mol/L Tris-HCl, 0.5 mmol/L EDTA, 0.1% 牛血清白蛋白; pH 7.4)。差速离心法分离纯化线粒体。使用 Rh123 探针 (R233, 上海同仁化学研究所) 检测线粒体膜电位, 激发波长/发射波长为 488 nm/525 nm。以 lucigenin (ENZ-52154, 广州宝柏贸易有限公司) 为探针检测线粒体的活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 生成水平, 激发波长/发射波长为 455 nm/505 nm。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 12.0 软件进行数据分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA); 方差齐性时运用 LSD 方法里德多重比较, 方差不齐性时则运用 Dunnett's T3 法。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 CBD 对 PA 刺激的肝细胞的自噬流影响 由图 1A、1B 可见, 单独使用不同剂量的 CBD 处理原代培养的肝细胞, 均不影响肝细胞中 LC3-II/LC3-I 的比值和 p62 的蛋白表达 ($P > 0.05$)。

给予肝细胞 PA 刺激增加了肝细胞内 LC3-II/LC3-I 的比值和 p62 的蛋白表达 ($P < 0.05$), 提示 PA 刺激使肝细胞内自噬溶酶体活性增加, 降解速度降低, 自噬流受到破坏。给予 CBD 处理后肝细胞内 LC3-II/LC3-I 的比值和 p62 的蛋白表达均降低 ($P < 0.05$), 即 CBD 能够促进 PA 刺激诱导的肝细胞内自噬溶酶体的降解, 促进了自噬流。而同时给予自噬抑制剂 CQ 处理肝细胞后, CBD 对自噬流的促进作用被逆转 ($P < 0.05$)。见图 1C、1D。

2.2 CBD 对 PA 刺激的肝细胞凋亡的影响 如图 2 所示, PA 刺激可以增加肝细胞的凋亡 ($P < 0.05$), 给予 CBD 处理后肝细胞凋亡数目减少 ($P < 0.05$); 同时给予自噬抑制剂 CQ 处理后可以逆转 CBD 的保护作用 ($P < 0.05$)。提示 CBD 可以通过促进 PA 刺激的肝细胞内自噬流的发生减轻 PA 诱导的肝细胞凋亡。

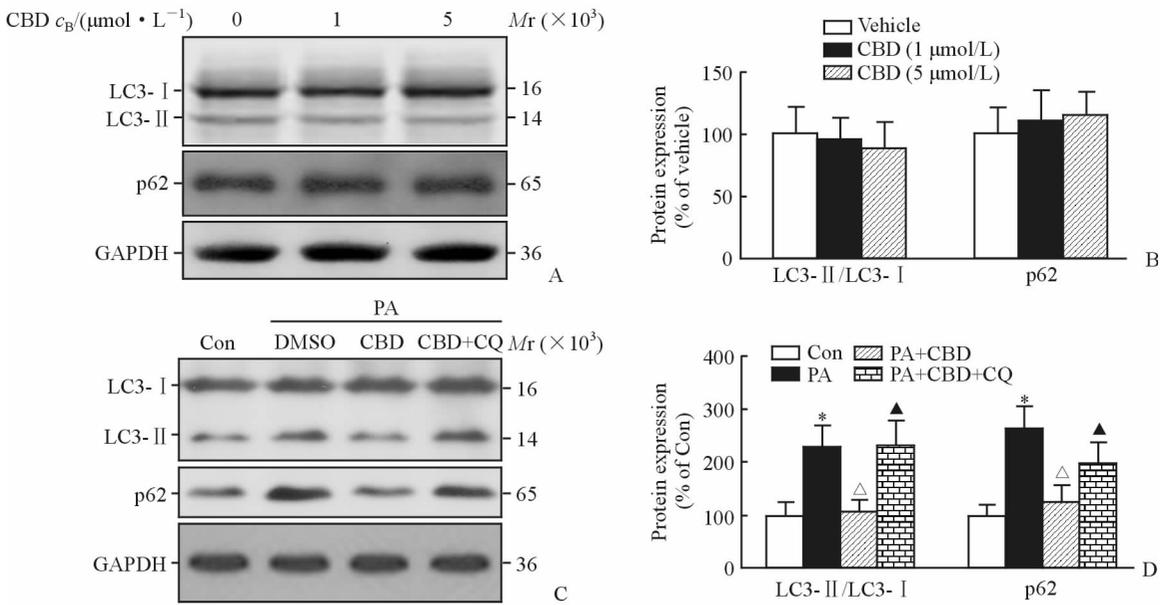


图1 CBD对PA刺激的肝细胞自噬流的影响

Fig 1 Effect of CBD on autophagic flux of hepatocytes stimulated with PA

A, B: Expression of LC3 and p62 treated with CBD; C, D: Expression of LC3 and p62 stimulated with PA. CBD; Cannabidiol; LC3: Autophagy-related protein microtubule-associated protein 1 light chain 3; GAPDH: Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; Con: Control; PA: Palmitic acid; CQ: Chloroquine. * $P < 0.05$ vs Con group; $\triangle P < 0.05$ vs PA group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs PA+CBD group. $n=3, \bar{x} \pm s$

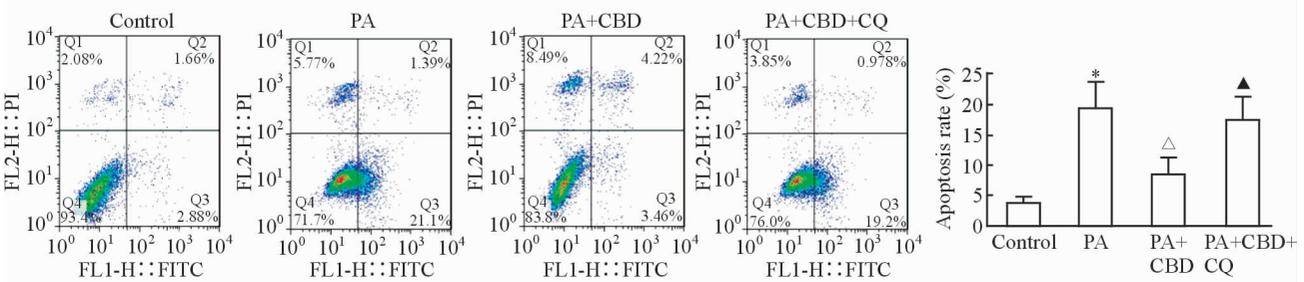


图2 CBD对PA刺激的肝细胞凋亡的影响

Fig 2 Effect of CBD on PA-induced hepatocytes apoptosis

CBD: Cannabidiol; PA: Palmitic acid; CQ: Chloroquine. * $P < 0.05$ vs control group; $\triangle P < 0.05$ vs PA group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs PA+CBD group. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.3 CBD对PA刺激的肝细胞内质网应激的影响 由图3可见,原代培养的肝细胞给予PA刺激后,其内质网应激相关因子CHOP、GRP78和XBP-1的mRNA表达均增加($P < 0.05$),同时给予

CBD处理后CHOP、GRP78和XBP-1的mRNA表达均降低($P < 0.05$),给予CQ处理后CBD的保护作用减弱($P < 0.05$)。结果提示CBD通过促进PA诱导的肝细胞的自噬流改善其内质网应激。

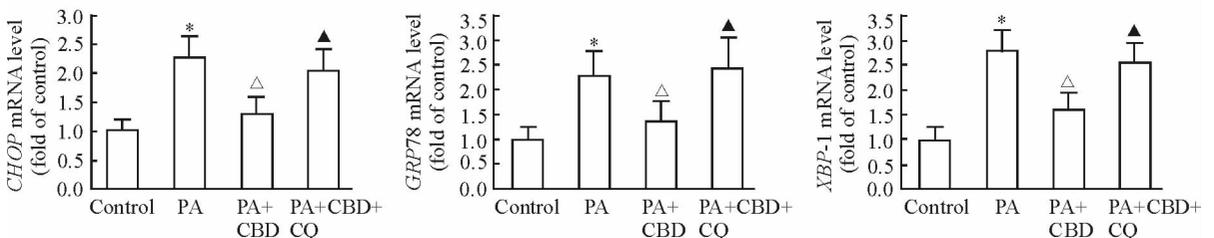


图3 CBD对PA刺激的肝细胞内质网应激的影响

Fig 3 Effect of CBD on endoplasmic reticulum stress of hepatocytes stimulated with PA

CBD: Cannabidiol; PA: Palmitic acid; CQ: Chloroquine; CHOP: CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein; GRP78: Glucose-regulated protein 78; XBP-1: X-box protein 1. * $P < 0.05$ vs control group; $\triangle P < 0.05$ vs PA group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs PA+CBD group. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.4 CBD 对 PA 刺激的肝细胞线粒体功能的影响 线粒体荧光探针检测图见图 4A。原代培养的肝细胞给予 PA 刺激后线粒体膜电位下降($P < 0.05$)、线粒体 ROS 生成增加($P < 0.05$), 而给予 CBD 处理后肝细胞线粒体膜电位增加($P < 0.05$)、

线粒体 ROS 生成减少($P < 0.05$), 同时给予 CQ 能够逆转 CBD 对线粒体功能的保护作用($P < 0.05$)。见图 4B、4C。结果提示 CBD 能够通过促进 PA 刺激肝细胞的自噬流改善 PA 诱导的肝细胞线粒体功能障碍。

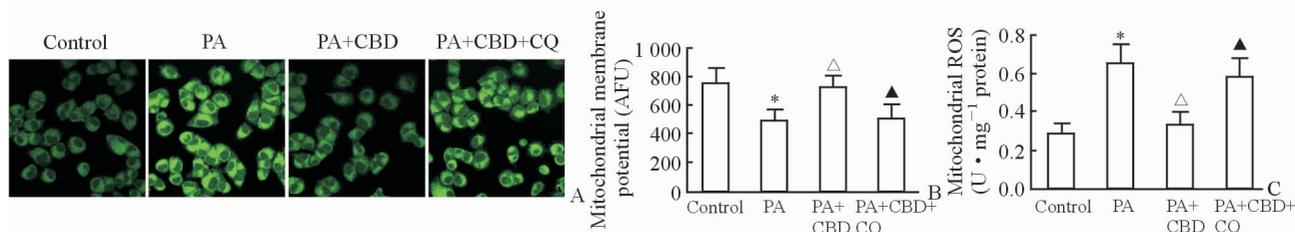


图 4 CBD 对 PA 刺激的肝细胞线粒体功能的影响

Fig 4 Effect of CBD on mitochondrial function of hepatocytes stimulated with PA

A: Fluorescent images of mitochondrial; B: Change of mitochondrial membrane potential; C: Contents of mitochondrial ROS. CBD: Cannabidiol; PA: Palmitic acid; CQ: Chloroquine; AFU: Arbitrary fluorescence unit; ROS: Reactive oxygen species. Original magnification: $\times 400$ (A). * $P < 0.05$ vs control group; $\triangle P < 0.05$ vs PA group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs PA+CBD group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

应激状态下细胞自噬清除无用的、多余的、受损的或癌变的细胞器、异常蛋白、脂滴, 在调控代谢、维持机体内环境稳态方面发挥重要作用^[9]。既往多以自噬体的数量, 即 LC3-II/LC3-I 的比值评价自噬水平的强弱; 最近研究发现自噬体数量的增加并不能从本质上反映自噬水平, 因为自噬体的数量由形成和清除两方面决定, 准确地评价自噬水平不仅仅是检测自噬体的数量, 还应动态观察整个自噬流是否通畅; 并认为自噬底物 p62 的降解对于评价自噬流尤为重要^[10]。当自噬体生成增加, 但自噬流被破坏时, 自噬体的降解水平降低, 细胞内自噬体大量累积促使细胞凋亡发生^[11]。本研究结果显示 PA 诱导肝细胞内自噬溶酶体活性增加, 降解速度降低, 使自噬流受到破坏; 给予 CBD 处理降低了肝细胞内 LC3-II/LC3-I 的比值和 p62 蛋白的表达, 即 CBD 通过促进自噬体的降解减轻 PA 对自噬流的破坏。本研究结果也显示 CBD 不影响正常肝脏细胞中 LC3-II/LC3-I 的比值和 p62 蛋白的表达。而研究发现 CBD 对多种疾病模型的自噬流有促进作用, 如在 tau 病小鼠模型中, CBD 可以增加自噬流的发生, 减少体内 tau 蛋白的沉积, 从而减轻症状^[12]; 在毛果芸香碱诱发的癫痫发作慢性期, CBD 可以促进自噬流的发生, 从而减轻癫痫症状^[13]; 在酒精诱发的小鼠脂肪肝中, CBD 也可以促进肝脏中自噬流的发生, 从而减轻肝脏损伤^[14]。我们前期研究发现促进自噬流不仅可以减少肝细胞内脂质沉积, 还可以减轻内质网应激和线粒体损伤, 从而缓解蛋氨酸/胆碱

缺乏饲料诱发小鼠脂肪性肝脏病变^[15], 可见 CBD 恢复 PA 破坏的自噬流对保护 PA 诱导的肝细胞损伤十分重要。

内质网是细胞内蛋白合成、折叠、成熟与分泌的主要场所。在疾病状态下, 蛋白质因某些因素不能正常修饰或蛋白质由内质网向高尔基体转运受阻时, 导致未折叠蛋白或错误折叠蛋白在内质网腔大量蓄积, 继而破坏钙离子平衡, 造成典型的内质网应激。肝脏细胞内血浆蛋白的合成与分泌、脂蛋白和极低密度脂蛋白的合成与分泌、胆固醇的合成及外源物代谢等都需要内质网参与完成, 异常导致内质网应激也参与多种疾病的发生、发展, 如在非酒精性脂肪性肝炎中, 内质网应激促进了肝细胞内脂肪沉积、炎症反应、氧化应激、细胞凋亡的发生^[16]。本研究结果表明 PA 刺激下肝细胞内内质网应激水平上调, 而 CBD 处理能够通过促进自噬流减轻 PA 诱导的内质网应激。

线粒体是细胞内 ROS 生成的主要亚细胞器, 线粒体损伤时膜电位下降、膜通透性增加、ROS 生成增加, 同时线粒体中细胞色素 c 等因子释放进入细胞浆引发线粒体依赖的细胞凋亡发生; 而自噬对维持线粒体功能的正常十分重要, 通过清除细胞内过多或受损的线粒体维持细胞内线粒体的数目和功能^[17]。研究表明线粒体功能损伤在 NAFLD 中发挥重要作用^[18], 而使用花生四烯酸、丁硫氨酸亚砷胺或氯仿诱导的 HepG2 肝细胞线粒体损伤能够被自噬激动剂改善^[19]。本研究结果也显示 PA 刺激导致肝细胞内线粒体膜电位下降、ROS 生成增加, 受损肝细胞线粒体功能异常, 而给予细胞 CBD 处理能

够通过促进自噬流减轻 PA 诱导的线粒体损伤,降低了线粒体损伤相关的氧化应激和细胞凋亡。

综上所述,在离体原代培养的大鼠肝细胞中,CBD能够通过促进自噬流减轻 PA 诱导的肝细胞凋亡,改善受损肝细胞的内质网应激和线粒体功能异常。

[参考文献]

- [1] HUANG X, XU M, CHEN Y, PENG K, HUANG Y, WANG P, et al. Validation of the fatty liver index for nonalcoholic fatty liver disease in middle-aged and elderly Chinese[J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94: e1682. doi: 10.1097/MD.0000000000001682.
- [2] JACOBS D S, KOHUT S J, JIANG S, NIKAS S P, MAKRIYANNIS A, BERGMAN J. Acute and chronic effects of cannabidiol on Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)-induced disruption in stop signal task performance[J]. *Exp Clin Psychopharmacol*, 2016, 24: 320-330.
- [3] PISANTI S, MALFITANO A M, CIAGLIA E, LAMBERTI A, RANIERI R, CUOMO G, et al. Cannabidiol: state of the art and new challenges for therapeutic applications [J/OL]. *Pharmacol Ther*, 2017. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.041.
- [4] SILVESTRI C, PARIS D, MARTELLA A, MELCK D, GUADAGNINO I, CAWTHORNE M, et al. Two non-psychoactive cannabinoids reduce intracellular lipid levels and inhibit hepatosteatosis[J]. *J Hepatol*, 2015, 62: 1382-1390.
- [5] BARREYRO F J, KOBAYASHI S, BRONK S F, WERNEBURG N W, MALHI H, GORES G J. Transcriptional regulation of Bim by FoxO3A mediates hepatocyte lipoapoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 27141-27154.
- [6] MALHI H, BRONK S F, WERNEBURG N W, GORES G J. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 12093-12101.
- [7] GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ A, MAYORAL R, AGRAN, VALDECANTOS M P, PARDO V, MIQUILENA-COLINA M E, et al. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1179. doi: 10.1038/cddis.2014.162.
- [8] SUN S, HU F, WU J, ZHANG S. Cannabidiol attenuates OGD/R-induced damage by enhancing mitochondrial bioenergetics and modulating glucose metabolism via pentose-phosphate pathway in hippocampal neurons[J]. *Redox Biol*, 2017, 11: 577-585.
- [9] ANDING A L, BAEHRECKE E H. Autophagy in cell life and cell death[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2015, 114: 67-91.
- [10] ZHANG X J, CHEN S, HUANG K X, LE W D. Why should autophagic flux be assessed? [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34: 595-599.
- [11] OUYANG L, SHI Z, ZHAO S, WANG F T, ZHOU T T, LIU B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis[J]. *Cell Prolif*, 2012, 45: 487-498.
- [12] CASAREJOS M J, PERUCHO J, GOMEZ A, MUÑOZ M P, FERNANDEZ-ESTEVEZ M, SAGREDO O, et al. Natural cannabinoids improve dopamine neurotransmission and tau and amyloid pathology in a mouse model of tauopathy [J]. *J Alzheimers Dis*, 2013, 35: 525-539.
- [13] HOSEINZADEH M, NIKSERESHT S, KHODAGHOLI F, NADERI N, MAGHSOUDI N. Cannabidiol post-treatment alleviates rat epileptic-related behaviors and activates hippocampal cell autophagy pathway along with antioxidant defense in chronic phase of pilocarpine-induced seizure[J]. *J Mol Neurosci*, 2016, 58: 432-440.
- [14] YANG L, ROZENFELD R, WU D, DEVI L A, ZHANG Z, CEDERBAUM A. Cannabidiol protects liver from binge alcohol-induced steatosis by mechanisms including inhibition of oxidative stress and increase in autophagy[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 68: 260-267.
- [15] CHEN R, WANG Q, SONG S, LIU F, HE B, GAO X. Protective role of autophagy in methionine-choline deficient diet-induced advanced nonalcoholic steatohepatitis in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 770: 126-133.
- [16] BOZAYKUT P, SAHIN A, KARADEMIR B, OZER N K. Endoplasmic reticulum stress related molecular mechanisms in nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Mech Ageing Dev*, 2016, 157: 17-29.
- [17] LIU K, ZHAO Q, LIU P, CAO J, GONG J, WANG C, et al. ATG3-dependent autophagy mediates mitochondrial homeostasis in pluripotency acquirement and maintenance [J]. *Autophagy*, 2016, 12: 2000-2008.
- [18] CABRÉ N, CAMPS J, JOVEN J. Inflammation, mitochondrial metabolism and nutrition: the multifaceted progression of non-alcoholic fatty liver disease to hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2016, 5: 438-443.
- [19] WU D, CEDERBAUM A I. Inhibition of autophagy promotes CYP2E1-dependent toxicity in HepG2 cells via elevated oxidative stress, mitochondria dysfunction and activation of p38 and JNK MAPK[J]. *Redox Biol*, 2013, 1: 552-565.