

The Effect Of Palmitate On The Expression Levels Of Genes Involved In Reverse Cholesterol Transport And Lipid Metabolism In HepG2 Cells

Elham Jafarpour¹, Elham Bahreini^{*2}, Habiballah Nazem³, Zolfaghar Lotfi⁴,
Yaser Mohammadi⁵

1. PhD student, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
4. Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
5. PhD student, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 2025/01/20

Accepted: 2025/05/06

Abstract

Introduction: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with metabolic disorders that disrupt lipid and cholesterol metabolism due to the accumulation of saturated fatty acids, such as palmitate. This study investigates the effects of palmitate on lipid droplet accumulation and the expression of genes involved in reverse cholesterol transport (RCT) in HepG2 liver cells.

Materials and Methods: HepG2 cells were cultured under standard conditions. Lipid droplet accumulation was assessed using Oil Red O staining. Cellular cholesterol and triglyceride levels were measured using standard kits, and gene expression changes for ABCA1 and ABCG (ATP-Binding Cassette Transporter A1 and G1, respectively), APO-A1 (Apolipoprotein A1), SR-BI (Scavenger Receptor Class B Type I), and LXR (Liver X Receptor) were evaluated by RT-qPCR.

Results: Treatment of HepG2 cells with palmitate resulted in a significant increase in lipid droplet accumulation, which inversely correlated with cell viability ($P < 0.0001$). Cholesterol and triglyceride levels also significantly increased following palmitate treatment compared to the control group ($P < 0.05$). Additionally, palmitate decreased the expression of ABCA1 and SR-BI ($P < 0.05$) while increasing the expression of ABCG1 ($P < 0.05$). No significant changes were observed in the expression of APOA1 and LXR ($P > 0.05$).

Conclusion: Palmitate disrupts reverse cholesterol transport by downregulating ABCA1 and SR-BI expression, leading to lipid accumulation and elevated intracellular cholesterol and triglyceride levels. The upregulation of ABCG1 as a compensatory response does not adequately counter these disruptions. These findings suggest that palmitate, through its effects on metabolic and inflammatory pathways, contributes to disturbances in lipid homeostasis and associated metabolic disorders.

***Corresponding Author:** Elham Bahreini

Address: Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Tel: +989352461622

E-mail: Bahreini.e@iums.ac.ir

Keywords: Lipid Droplets, Non-alcoholic Fatty Liver Disease, Palmitic Acid, Reverse Cholesterol Transport

How to cite this article: Jafarpour E, Bahreini E, Nazem H, Lotfi Z, Mohammadi Y., The Effect of Palmitate on the Expression Levels of Genes Involved in Reverse Cholesterol Transport and Lipid Metabolism in HepG2 Cells, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2025; 32(4):384-395. DOI: 10.30468/jsums.2025.8003.3193.

Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most prevalent liver disorder associated with metabolic disturbances, including obesity, type 2 diabetes, hypercholesterolemia, hypertension, and metabolic syndrome. The incidence of NAFLD is rising alongside increasing obesity rates worldwide, currently affecting approximately 25-30% of the global population. Saturated fatty acids, particularly palmitate, play a crucial role in the progression of NAFLD by inducing lipid droplet formation, oxidative stress, and inflammation in hepatic cells. Palmitate, primarily found in palm oil and animal fats, promotes triglyceride synthesis while inhibiting fatty acid oxidation, leading to excessive lipid accumulation in hepatocytes. Additionally, palmitate contributes to hypercholesterolemia by increasing the production of very low-density lipoprotein (VLDL) in the liver, raising low-density lipoprotein (LDL) levels. Another potential mechanism involves the disruption of reverse cholesterol transport, which facilitates the removal of excess cholesterol from peripheral tissues to the liver for excretion. Key proteins involved in reverse cholesterol transport, such as ABCA1, ABCG, APO-A1, and SR-BI, facilitate the transfer of cholesterol to high-density lipoprotein (HDL). Liver X receptor (LXR) regulates the expression of these genes in response to elevated cholesterol levels. This study aims to investigate the effect of palmitic acid on lipid droplet formation in HepG2 cells and explore its relationship with genes involved in reverse cholesterol transport.

Methodology

• **Cell Culture:** HepG2 cells were obtained from the Iranian Cell Bank and cultured in DMEM F-12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin under standard conditions (37°C, 5% CO₂, 95% humidity).

• **Determination of Optimal Palmitate Concentration:** The cytotoxicity and cell viability of various concentrations of palmitate (0.4–1.8 µM) were assessed using the MTT assay. Cells were incubated for 24 and 48 hours, and viability was evaluated by measuring absorbance at 570 nm after MTT conversion to formazan crystals.

• **Oil Red O Staining:** Lipid droplet formation in palmitate-treated HepG2 cells was visualized using Oil Red O staining, following cell fixation

and washing. Lipid droplets appeared as red droplets within the cytoplasm and were observed under an inverted microscope.

• **Cholesterol and Triglyceride Measurement:** Lipid content was quantified by lysing Palmitate-treated HepG2 cells using NP40 buffer, followed by centrifugation to separate cellular extracts. Cholesterol and triglyceride levels were measured using commercial kits.

• **Gene Expression Analysis:** RT-qPCR was used to assess the expression levels of genes involved in reverse cholesterol transport (ABCA1, ABCG1, SR-BI, LXR, Apo-A1) in palmitate-treated cells. Gene expression was normalized to TBP (TATA-Binding Protein) as the internal control, and relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Statistical Analysis: Data were analyzed using GraphPad Prism 9, applying one-way ANOVA or Student's t-test for comparisons. A p-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

• **Optimal Palmitate Dose for HepG2 Cell Steatosis:** The IC₅₀ (50% inhibitory concentration) of palmitate was determined using the MTT assay, showing no significant difference between 24-hour and 48-hour incubation periods. The optimal dose (IC₅₀ = 0.8 µM) was selected for subsequent experiments.

• **Lipid Droplet Formation:** Microscopic images revealed increased lipid droplet accumulation in palmitate-treated HepG2 cells at various concentrations, with a significant inverse correlation between cell viability and lipid droplet content. Higher palmitate concentrations led to greater lipid droplet formation and reduced cell viability.

• **Cholesterol and Triglyceride Levels:** Palmitate treatment significantly elevated intracellular cholesterol and triglyceride levels compared to untreated control cells, indicating enhanced lipid accumulation.

• **Gene Expression Changes in Reverse Cholesterol Transport Pathways:** palmitate treatment significantly reduced the expression of ABCA1 and SR-BI, while increasing ABCG1 expression (P < 0.05). No significant changes were observed in the expression of LXR and Apo-A1 (P > 0.05).

Discussion

This study explored the effects of palmitate on cell viability, lipid droplet formation, and the expression of key genes involved in reverse cholesterol transport in HepG2 cells. The results demonstrated that palmitate treatment led to a significant increase in lipid accumulation, as evidenced by Oil Red O staining and elevated cholesterol and triglyceride levels. Gene expression revealed that palmitate downregulated the expression of ABCA1 and SR-BI, which are critical for the early and late stages of reverse cholesterol transport, respectively. Conversely, palmitate upregulated the expression of ABCG1, a protein involved in the final step of cholesterol transfer to mature HDL particles. These findings suggest that palmitate disrupts the normal function of reverse cholesterol transport by impairing cholesterol efflux pathways, potentially contributing to lipid retention in hepatocytes.

Interestingly, while a reduction in ABCA1 and SR-BI expression suggests a negative impact on cholesterol efflux, the compensatory increase in ABCG1 expression may represent an attempt to restore cholesterol homeostasis. However, this compensatory mechanism appears insufficient to counterbalance the dysregulation caused by the downregulation of ABCA1 and SR-BI. This disruption in reverse cholesterol transport likely leads to the accumulation of intracellular cholesterol, promoting the formation of lipid droplets and contributing to hepatic steatosis. Previous studies have also reported similar findings, indicating that palmitate interferes with the expression and function of ABCA1, leading to impaired cholesterol transport in hepatocytes.

Furthermore, despite the reduced expression of ABCA1 and SR-BI, palmitate did not

significantly alter the expression of Apo-A1, a key protein involved in HDL formation. This discrepancy may arise from different experimental conditions, as previous studies have shown varying effects of palmitate on APOA1 expression, potentially influenced by factors such as treatment duration, concentration, or cellular models.

Conclusion

The study highlights the complex effects of palmitate on cholesterol homeostasis and lipid metabolism, demonstrating that the disruption of reverse cholesterol transport can exacerbate lipid accumulation in the liver and contribute to the development of metabolic disorders like NAFLD. Although ABCG1 expression increases in response to palmitate, this compensatory mechanism is unlikely to fully counterbalance the impaired cholesterol transport caused by reduced ABCA1 and SR-BI expression. These findings underscore the importance of maintaining proper cholesterol efflux to prevent lipid retention and associated metabolic dysfunctions. Further investigations are warranted to elucidate the mechanisms underlying palmitate-induced dysregulation of cholesterol transport and explore potential therapeutic interventions targeting these pathways.

Acknowledgment

We thank the Biochemistry Department of Iran University of Medical Sciences for providing the conditions necessary for conducting this research.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no competing interests.

بررسی اثر پالمیتات بر سطوح بیان ژن‌های دخیل در انتقال معکوس کلسترول و متابولیسم لیپید در سلول‌های HepG2

الهام جعفرپور^۱، الهام بحرینی^{۲*}، حبیب‌الله ناظم^۳، ذوالفقار لطفی^۴، یاسر محمدی^۵

۱. دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲. دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۴. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۵. دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۰۱

چکیده

زمینه و هدف: بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) به‌عنوان یک بیماری شایع مرتبط با اختلالات متابولیک، به دلیل افزایش تجمع اسیدهای چرب اشباع مانند پالمیتات، منجر به اختلال در متابولیسم لیپید می‌شود. این پژوهش به بررسی اثر پالمیتات بر تجمع قطرات چربی و ژن‌های مرتبط با انتقال معکوس کلسترول در سلول‌های کبدی HepG2 می‌پردازد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های HepG2 در شرایط استاندارد کشت داده شدند. تجمع قطرات چربی با رنگ‌آمیزی Oil Red O، سطح کلسترول و تری‌گلیسرید با کیت‌های استاندارد و تغییرات بیان ژن‌های (ATP-Binding Cassette) و LXR (Liver X Receptor)، Apo-A1 (Apolipoprotein A1)، ABCA1 و ABCG1 (Transporter A1 and G1) با روش RT-qPCR ارزیابی گردید.

یافته‌ها: تیمار سلول‌های HepG2 با پالمیتات با افزایش تجمع قطرات چربی سیتوپلاسمی و درعین‌حال با کاهش قابل توجهی در زنده‌مانی سلول‌ها همراه بود ($P < 0.0001$). سطح کلسترول و تری‌گلیسرید سلول‌ها نیز به دنبال تیمار با پالمیتات نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($P < 0.05$). همچنین، پالمیتات باعث کاهش بیان ABCA1 و SR-BI ($P < 0.05$) و افزایش بیان ABCG1 ($P < 0.05$) شد، اما تأثیری بر بیان LXR و Apo-A1 نداشت ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری: پالمیتات با کاهش بیان ژن‌های ABCA1 و SR-BI، فرآیند انتقال معکوس کلسترول را مختل کرده و باعث تجمع لیپید و افزایش سطوح لیپید داخل سلولی می‌شود. افزایش بیان ABCG1 به‌عنوان یک پاسخ جبرانی نتوانست این اختلالات را جبران کند. این یافته‌ها تأکید می‌کند که پالمیتات از طریق تأثیر بر مسیرهای متابولیکی و التهابی می‌تواند به اختلال در هموستاز لیپید و بیماری‌های متابولیک مرتبط با آن منجر شود.

* نویسنده مسئول: الهام بحرینی

نشانی: گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
تلفن: +۹۸۹۳۵۲۴۶۱۶۲۲
رایانامه:

Bahreini.e@iums.ac.ir
شناسه ORCID:

0000-0003-2008-3715

شناسه ORCID نویسنده اول:

0000-0003-2008-3715

DOI:
10.30468/jsums.2025.8003.3193

کلیدواژه‌ها:

اسید پالمیتیک، انتقال معکوس کلسترول، بیماری کبد چرب غیرالکلی، قطرات چربی

۱. مقدمه

مانند چاقی، دیابت نوع ۲، سطح کلسترول بالا، فشارخون بالا و سندرم متابولیک شناخته‌شده است. NAFLD

بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) به‌عنوان شایع‌ترین بیماری کبدی مرتبط با اختلالات متابولیک،

سلول‌های کبدی HepG2 پرداخت. این تحقیق ارتباط پالمیتات با مسیرهای مرتبط با انتقال معکوس کلسترول، تأثیر آن بر بیان ژن‌های LXR، ABCG1، ABCA1، Apo- A1، SR-B1 و نقش تنظیمی LXR در این مسیرها را مورد بررسی قرار داد.

۲. مواد و روش

- کشت سلول

سلول‌های HepG2 از بانک سلول انسانی و حیوانی مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شدند و در محیط کشت DMEM F-12 حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین، در شرایط استاندارد ۳۷°C، ۵٪ CO₂ و ۹۵٪ رطوبت کشت داده شدند.

- تعیین غلظت کاربردی پالمیتات

تهیه محلول پالمیتات: پالمیتات، یک اسید چرب اشباع، با فرمول شیمیایی C₁₆H₃₂O₂ و جرم مولی ۲۵۶.۴۲ است. برای تهیه ۵ میلی‌لیتر استوک اولیه پالمیتات با غلظت ۳۰ میلی‌مولار، میزان ۳۸.۴۶۴ میلی‌گرم از پودر پالمیتات به ۵ میلی‌لیتر الکل ۵۰٪ اضافه و به مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری ۶۰ درجه، قرار داده شد. با استفاده از فیلتر سرنگی ۰.۲، محلول فوق استریل و قابل‌استفاده برای کشت سلول شد. از این استوک اولیه، با استفاده از محیط کشت سلول، غلظت ۱۵ میکرومولار تهیه و سپس از آن برای تهیه رقت‌های تعریف‌شده در MTT استفاده شد.

- آزمون MTT

سنجش MTT بر اساس توانایی سلول‌های زنده برای تبدیل "۳- [۴،۵]-دی‌متیل‌تيازول-۲-یل]-۲،۵-دی‌فنیل‌تترازولیوم برومید" به کریستال‌های فورمازان توسط آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز وابسته به NAD(P)H است. به‌طور خلاصه، ۲۵۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت شد و با شیب غلظتی پالمیتات (۰.۴-۱.۸ μM) تیمار شدند. برای هر غلظت، چهارخانه به‌عنوان چهار مرتبه تکرار آزمون در نظر گرفته شد. سپس زنده‌مانی سلول‌ها در دو بازه زمانی آنکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعته ارزیابی شد. در پایان هریک از زمان‌های آنکوباسیون، محیط کشت حذف و سلول‌ها به مدت ۴ ساعت با محلول حاوی "۵۰٪ MTT + ۵۰٪ محیط کشت" در دمای ۳۷°C تیمار شدند. این معرف در حضور احیاکننده‌های سلولی به کریستال‌های فورمازان تبدیل می‌شود. پس از ۴ ساعت آنکوباسیون، با

به‌سرعت به یک چالش جدی در عرصه سلامت جهانی تبدیل‌شده است و تقریباً ۲۵٪ تا ۳۰٪ از جمعیت را درگیر کرده است (۱، ۲).

اسیدهای چرب، به‌ویژه اسیدهای چرب اشباع مانند پالمیتات، نقش کلیدی در پیشرفت NAFLD ایفا می‌کنند، زیرا تجمع بیش‌ازحد این چربی‌ها در سلول‌های کبدی منجر به تشکیل و تجمع قطرات چربی، استرس اکسیداتیو و التهاب می‌شود (۳). پالمیتیک اسید که به‌طور معمول در روغن پالم و چربی‌های حیوانی یافت می‌شود، با افزایش سنتز تری‌گلیسرید و کاهش اکسیداسیون اسیدهای چرب، به تجمع بیش‌ازحد تری‌گلیسرید در سلول‌های کبدی منجر می‌شود (۴). این فرآیند باعث تشکیل و رشد قطرات چربی شده و تعادل متابولیسم چربی در کبد را به هم می‌زند که یکی از عوامل کلیدی در پیشرفت NAFLD است. پالمیتات، می‌تواند از طریق چندین مکانیسم به هایپرکلسترولمی کمک کند. یکی از آن‌ها افزایش تولید لیپوپروتئین VLDL در کبد و به دنبال آن افزایش سطح LDL خون است (۵). مکانیسم احتمالی دیگر، اختلال در مسیر انتقال معکوس کلسترول (Reverse cholesterol transport) است.

انتقال معکوس کلسترول فرایندی است که طی آن کلسترول اضافی از سلول‌ها و بافت‌های محیطی از طریق لیپوپروتئین‌های پرچگال (HDL) به کبد منتقل می‌شود تا برای دفع از طریق صفراوی استفاده شود. این فرایند با همکاری پروتئین‌هایی نظیر ABCA1، ABCG1 و SR-BI هدایت می‌شود (۶). ABCA1 و ABCG1 پروتئین‌های غشایی هستند. هرچند هر دو پروتئین در انتقال کلسترول از سلول به HDL نقش دارند، اما هرکدام مکانیسم‌های خاص خود را دارند. ABCA1 با اتصال به آپولیپوپروتئین A- (Apo-A1) I، بیشتر روی تشکیل HDL تمرکز دارد، درحالی‌که ABCG1 با انتقال کلسترول از سلول‌ها به HDL در رشد آن نقش دارد (۷، ۸). LXR (Liver X Receptor)، گیرنده هسته‌ای است که تنظیم‌کننده اصلی این ژن‌ها است و بیان آن‌ها را در پاسخ به سطوح بالای کلسترول تنظیم می‌کند (۹). مطالعات قبلی مانند Nai-Qian و همکاران (۱۰)، Francisca و همکاران (۱۱) بیشتر بر تجمع چربی در سلول‌های کبدی تمرکز داشته‌اند، اما اثر پالمیتات بر بیان ژن‌های کلیدی انتقال معکوس کلسترول کمتر بررسی شده است.

مطالعه حاضر به بررسی اثر پالمیتات بر قطرات چربی در

قطرات چربی در سلول‌های چرب شده در مقایسه با سلول‌های چرب نشده با میکروسکوپ اینورت بررسی شد.

اندازه‌گیری کلسترول و تری‌گلیسیرید

با استفاده از بافر لیز NP40 و ۲۰ تا ۳۰ دقیقه آنکوباسیون، غشای سیتوپلاسمی سلول‌های HepG2 چرب شده با پالمیتات، تخریب و سلول‌ها لیز شدند. با سانتریفوژ سوسپانسیون حاصل در ۸۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه و جدا کردن محلول رویی، عصاره‌های سلولی جمع‌آوری و به میکروتیوب‌های جداگانه‌ای منتقل شدند. با اتوانالایزر و کیت‌های سنجش کلسترول و تری‌گلیسیرید پارس آزمون، محتوای کلسترول و تری‌گلیسیرید سلول‌های چرب شده در مقایسه با سلول‌های چرب نشده به روش آنزیمی طبق دستور کیت اندازه‌گیری و بر اساس میلی گرم در یک میلیون سلول بیان شد.

- ارزیابی سطوح بیان ژن فاکتورهای دخیل در انتقال معکوس کلسترول

در این مطالعه، میزان بیان ژن‌های LXR، SR-B1, Apo-A1, ABCA1, ABCG1 به عنوان پارامترهای اختصاصی استئاتوز در سلول‌های چرب شده HepG2 با استفاده از روش RT-qPCR بررسی شد. به طور خلاصه، پس از کشت یک میلیون سلول در پلیت‌های ۶-خانه، سلول‌ها تیمار و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط آنکوباسیون نگهداری شدند. پس از تخریب سلول‌ها با استفاده از بافر لیز موجود در کیت استخراج RNA یکتاتجهیز (Favorgen)، توتال RNA طبق پروتکل ذکر شده در کیت، استخراج و خالص‌سازی و کیفیت RNA از طریق الکتروفورز ژل آگارز بررسی و غلظت آن با دستگاه NanoDrop اندازه‌گیری شد. از RNA استخراج شده طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA یکتاتجهیز (YT4500, Yekta Tajhiz)، cDNA تهیه و تا زمان انجام آزمون Real time PCR در ۸۰°C- نگهداری شد. با استفاده از cDNA حاصل، سوپر مستر میکس ریل تایم شرکت یکتاتجهیز (2x Super SYBR Green qPCR) و پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱)، سطوح بیان ژن‌های فوق‌الذکر بررسی گردید. ژن TBP "TATA-binding protein" به عنوان کنترل داخلی استفاده و تغییرات بیان ژن با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد.

افزودن DMSO، کریستال‌ها حل شدند. رنگ بنفش حاصل، در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری و درصد زنده‌مانی بر اساس مقایسه جذب نوری چاهک‌های تیمار شده با میانگین جذب نوری کنترل طبق فرمول ذیل محاسبه شد:

"(میانگین جذب نوری چاهک آزمون/میانگین جذب نوری چاهک کنترل) × ۱۰۰ = درصد زنده‌مانی نسبی سلول".

* IC_{50} به عنوان دوزی از پالمیتات در نظر گرفته شد که در آن، زنده‌مانی سلول‌ها به ۵۰ درصد (V_{50}) می‌رسد. این غلظت به عنوان محدوده کاربردی پالمیتات برای سلول‌های HepG2 در نظر گرفته شد. علاوه بر V_{50} ، غلظت پالمیتات در زنده‌مانی‌های V_{60} و V_{70} نیز برای بررسی تجمع قطرات لیپیدی استفاده شد. با توجه به افزایش مرگ سلولی در نمونه کنترل و تیمار در بازه زمانی ۴۸ ساعت و عدم وجود اختلاف معنادار در IC_{50} به دست آمده در دو زمان مختلف، تصمیم به محدود کردن مدت تیمار به ۲۴ ساعت گرفته شد.

- رنگ آمیزی Oil red O

برای مشاهده قطرات چربی، سلول‌های HepG2 چرب شده و سلول‌های HepG2 چرب نشده (کنترل منفی) با رنگ لیپوفیلک Oil red O رنگ شدند. این فرآیند شامل تهیه "محلول Oil Red O Stock"، با حل کردن پودر Oil Red O در ایزوپروپانول و سپس رقیق کردن محلول استوک با آب بود. به طور خلاصه، ۰.۱ میلی گرم پودر Oil Red O در ۲۰ میلی لیتر ایزوپروپانول خالص حل شد و سپس با کاغذ صافی محلول یکنواخت به دست آمد. این محلول تا یک سال پایدار است. محلول کار با مخلوط کردن ۰.۱ میلی لیتر از محلول استوک با ۱۰ میلی لیتر آب تهیه شد. این محلول تا ۲ ساعت پایدار است. قبل از رنگ‌آمیزی، سلول‌ها به مدت ده دقیقه در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. پس از شستشوی سلول‌ها با آب دو بار تقطیر، سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه با ایزوپروپانول (۶۰٪) تیمار شدند. پس از حذف ایزوپروپانول، سلول‌ها در معرض محلول کاری Oil Red قرار گرفتند و به مدت ۲۰ دقیقه با تکان دادن ملایم آنکوبه شدند. پس از ۲ تا ۳ بار شستشوی سلول‌ها با آب دو بار تقطیر و تخلیه رنگ اضافه، وجود

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در Real time PCR

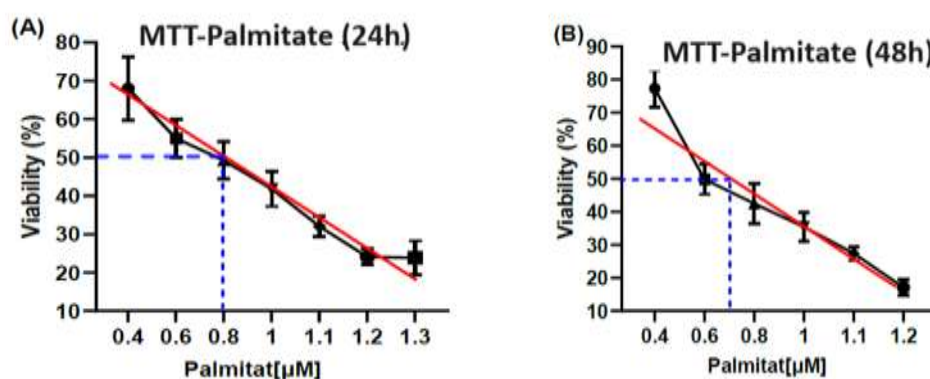
ژن	ردیف نوکلئوتیدی پرایمر	PCR طول محصول	دماي اتصال پرایمر
ABCA1	F 5'- TGTCCGTGTTTGTGTGGTG -3' R 5'- TCCAATGCCCTGCTCCTCA -3'	246	62
ABCG1	F 5'- TGCCGAGGTGAACCTTTTCT -3' R 5'- CTTCGTTCCCGATCCCCAAGT -3'	224	61
SR-B1	F 5'- GGCAATCCGATCAGTGCAACA -3' R 5'- TTCGTTGGGTGGGTAGATGGA -3'	218	60
Apo-A1	F 5'- AGGCTCGGCATTTCTGGCA -3' R 5'- GCTGTCCCAGTTGTCAAGGAG -3'	179	60
LXR- α	F 5'- CGCTACAACCACGAGACAGAG -3' R 5'- CCGAGAAGATGTTGATGGCGA -3'	187	60
TBP	F 5'- GTTCAGCAGTCAACGTCCCAG -3' R 5'- GTCATGGGGGAGGGATACAGTG -3'	154	62

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های پژوهش با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 9 مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و نیز student T test برای تحلیل نتایج استفاده و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد (SD) ارائه و $P\text{-value} < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

۳. یافته‌ها

- دوز ایتیم پالمیتات برای چرب کردن سلول‌های HepG2



شکل ۱. نمودارهای (A و B) اثر دوزهای مختلف پالمیتات را به ترتیب پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون نشان می‌دهند. محور X غلظت پالمیتات (μM) و محور Y درصد زنده‌مانی ($\text{Viability}(\%)$) سلول‌ها را در غلظت‌های مشخص پالمیتات نشان می‌دهند. IC_{50} با نقطه چین بر روی نمودارها مشخص شده است.

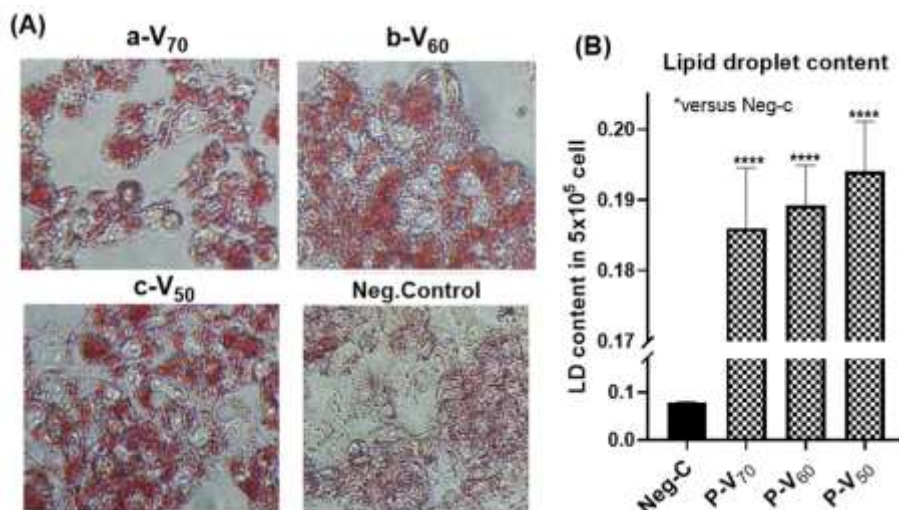
یا IC_{50} ، 60% (V_{60}) و 70% (V_{70}) و نیز سلول‌های چرب نشده (کنترل منفی) نشان می‌دهد. قطرات چربی به صورت قطرات قرمز در سیتوپلاسم سلول‌ها قابل مشاهده بودند. نمودار B-۲ درصد قطرات چربی را در سلول‌های چرب شده با غلظت‌های مختلف

- ارزیابی قطرات چربی در سلول‌های HepG2 چرب شده با پالمیتات

شکل A-۲ تصاویر میکروسکوپی قطرات چربی را در سلول‌های چرب شده با دوزهای مختلف پالمیتات در زنده‌مانی‌های 50% (V_{50})

بودن محتوای قطرات چربی در زنده‌مانی V_{50} ، غلظت IC_{50} پالمیتات به عنوان غلظت تیمار برای مرحله بعدی انتخاب شد.

پالمیتات، نسبت به سلول‌های چرب نشده نشان می‌دهد. در رابطه با هر تیمار، بین محتوای قطرات چربی و درصد زنده‌مانی رابطه معنی‌دار و معکوس مشاهده شد ($P > 0.0001$). با توجه به بالاتر



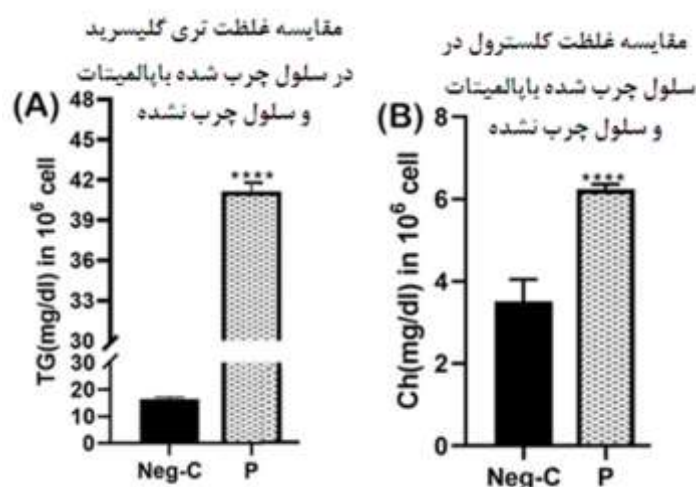
شکل ۲. (A) تصویر میکروسکوپی (40x) از سلول‌های چرب شده با سه غلظت پالمیتات در زنده‌مانی‌های ۷۰٪ (a: V₇₀)، ۶۰٪ (b: V₆₀) و ۵۰٪ (c: V₅₀) و رنگ‌شده با Oil red O و کنترل منفی (Neg control، تیمار نشده). (B) نمودار مقایسه محتوای قطرات چربی در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مشخص پالمیتات در زنده‌مانی‌های به ترتیب ۷۰٪ (P-V₇₀)، ۶۰٪ (P-V₆₀)، ۵۰٪ (P-V₅₀).

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

پالمیتات در مقایسه با کنترل منفی (سلول‌های تیمار نشده) نشان می‌دهد. مقایسه آماری t-آزمون نشان داد که تیمار سلول‌ها با پالمیتات باعث افزایش معنی‌داری در سطوح تری گلیسیرید و کلسترول نسبت به گروه کنترل منفی شد ($P < 0.05$).

تأثیر پالمیتات بر سطوح تری گلیسیرید و کلسترول سلولی

شکل ۳ تغییرات سطوح تری گلیسیرید (شکل ۳-۱) و کلسترول (شکل ۳-۲) سلولی را پس از تیمار با غلظت IC_{50}



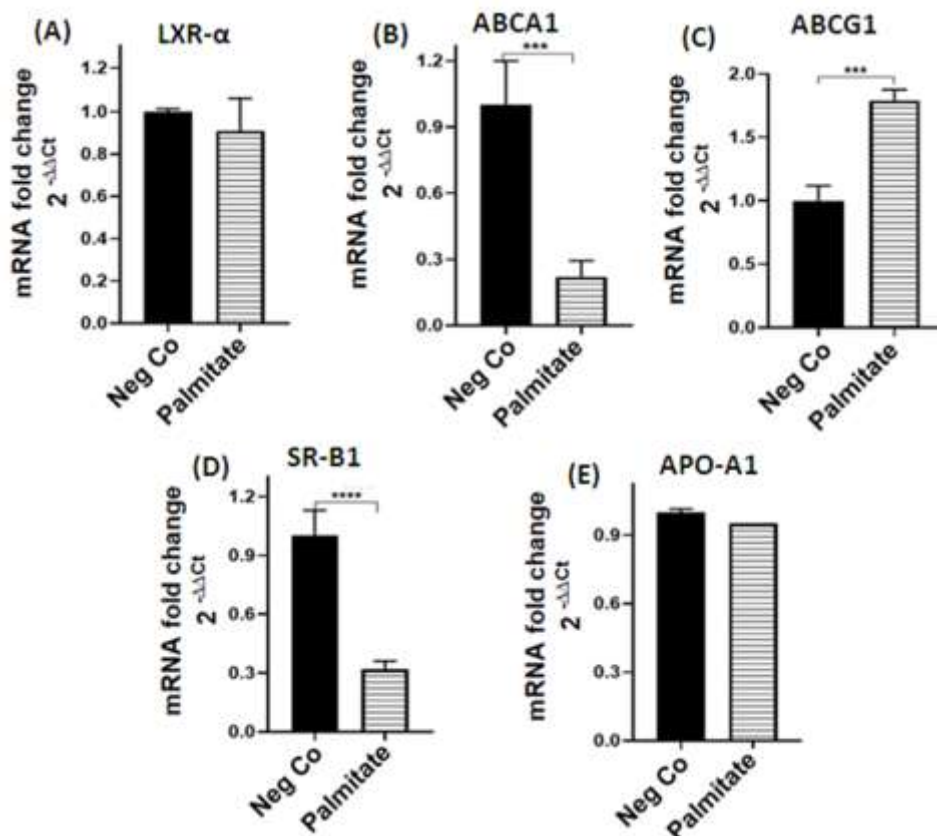
شکل ۳. تغییرات سطوح سلولی تری گلیسیرید (A) و کلسترول (B) پس از تیمار با پالمیتات در مقایسه با کنترل منفی (سلول تیمار نشده). P: پالمیتات؛ Neg-C: کنترل منفی (سلول‌های تیمار نشده).

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$

HepG2 با پالمیتات سطح بیان ژن‌های ABCA1 و SR-B1 را نسبت به کنترل منفی چرب نشده کاهش داد ($P < 0.05$)، درحالی‌که سطح بیان ABCG1 را افزایش و تأثیری بر بیان ژن‌های LXR و Apo-A1 ($P > 0.05$) نداشت.

- تأثیر پالمیتات بر بیان ژن‌های دخیل در انتقال معکوس کلسترول

شکل ۴ تغییرات سطوح بیان ژن‌های ABCA1، ABCG1، SR-B1، LXR و Apo-A1 را به دنبال تیمار با غلظت IC_{50} پالمیتات نشان می‌دهد. چرب شدن سلول‌های



شکل ۴. تغییرات سطوح بیان ژن‌های (A) LXR- α ، (B) ABCA1، (C) ABCG1، (D) SR-B1 و (E) Apo-A1 به دنبال تیمار با غلظت IC_{50} پالمیتات در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده (کنترل منفی). **** $P < 0.0001$; *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

تجمع قطرات چربی و زنده‌مانی سلولی رابطه معکوس وجود داشت؛ بدین‌صورت که با افزایش غلظت پالمیتات، هم‌زمان با افزایش قطرات چربی، زنده‌مانی سلول‌ها کاهش می‌یافت؛ بنابراین، غلظت IC_{50} پالمیتات به‌عنوان نقطه اپتیمم بین نرخ افزایش ذخیره قطرات چربی و کاهش زنده‌مانی در نظر گرفته شد. تیمار با پالمیتات به‌طور معناداری سطوح کلسترول و تری گلیسیرید داخل سلولی را نسبت به گروه کنترل بدون تیمار افزایش داد. تحلیل بیان ژن نشان داد که پالمیتات باعث

۴. بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر اثرات پالمیتات را بر زنده‌مانی سلولی، تجمع لیپید و بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با انتقال معکوس کلسترول در سلول‌های HepG2 بررسی کرد. هرچند تفاوت معناداری بین غلظت IC_{50} پالمیتات در ۲۴ و ۴۸ ساعت وجود نداشت، به دلیل افزایش مرگ‌ومیر سلولی هم در گروه کنترل و هم در گروه تیمار، IC_{50} به‌دست‌آمده از تیمار ۲۴ ساعته و مدت آنکوباسیون ۲۴ ساعت برای ادامه کار در نظر گرفته شد. بین

کاهش بیان ژن‌های ABCA1 و SR-B1، افزایش بیان ژن ABCG1 و عدم تغییر در بیان ژن‌های LXR و Apo-A1 شد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که اختلال در عملکرد ABCA1 و SR-B1 می‌تواند منجر به کاهش ظرفیت انتقال کلسترول و افزایش تجمع لیپیدها در کبد شود. برای مثال، Lyu و همکاران (۱۲) و Jeon و همکاران (۱۳) نیز در مطالعات جداگانه نشان دادند که پالمیتات بیان ژن ABCA1 و در نتیجه انتقال کلسترول را در سلول‌های کبدی کاهش می‌دهد. هرچند در مطالعه قبلی تأثیر پالمیتات بر بیان یا فعالیت SR-B1 یافت نشد، اما Rein و همکاران در مطالعه خود گزارش کردند که NAFLD تأثیری بر SR-B1 ندارد (۱۴). Spady و همکاران نیز نشان دادند که جایگزینی اسیدهای چرب غیراشباع شده با کلسترول و چربی‌های اشباع در رژیم غذایی بیان SR-B1 را افزایش و HDL خون را کاهش می‌دهد (۱۵). این تغییرات منجر به احتباس کلسترول داخل سلولی، افزایش تری گلیسیرید و تشکیل قطرات لیپیدی می‌شود و در نهایت توانایی سلول‌ها را برای حفظ تعادل لیپیدی مختل می‌کند (۶). این وضعیت نه تنها به هایپرکلسترولمی و احتمال وقوع NAFLD منجر می‌شود بلکه خطر بروز بیماری‌های قلبی-عروقی نیز افزایش می‌دهد (۱۶). ABCA1 نقش کلیدی در مرحله اولیه انتقال کلسترول از سلول به Apo-A1 کم‌لیپید ایفا می‌کند که این فرایند منجر به تشکیل ذرات HDL اولیه می‌شود (۶). کاهش بیان ABCA1 در پاسخ به پالمیتات نشان می‌دهد که این اسید چرب می‌تواند تشکیل HDL اولیه را مختل کرده و ظرفیت انتقال کلسترول را کاهش دهد. هرچند مطالعاتی وجود دارد که ادعا کرده‌اند پالمیتات می‌تواند بیان Apo-A1 را کاهش دهد (۱۷-۱۹)، در این مطالعه، پالمیتات تأثیر قابل توجهی بر بیان Apo-A1 نداشت. این نتیجه، با یافته‌های مطالعه‌ی Vargas و همکاران (۱۹) که کاهش قابل توجهی را در بیان Apo-A1 در سلول‌های کبدی تیمار شده با پالمیتات را گزارش کردند، مغایرت دارد. Vargas و همکاران نیز گزارش کردند که پالمیتات به‌طور غیرمستقیم بر تولید Apo-A1 تأثیر می‌گذارد این تفاوت‌ها ممکن است به دلیل استفاده از مدل‌های تجربی متفاوت یا تفاوت در شرایط تیمار باشد (۱۹).

پالمیتات با مهار FOXO3، بیان Apo-A1 را کاهش می‌دهد که این امر می‌تواند به افزایش آسیب اکسیداتیو و کاهش توانایی سلول‌ها در مقابله با استرس منجر شود. کاهش فعالیت FOXO3 به‌طور غیرمستقیم بر بیان Apo-A1 تأثیر گذاشته و ظرفیت انتقال معکوس کلسترول را مختل می‌کند (۱۸، ۱۹).

همچنین، SR-B1 انتقال کلسترول به ذرات HDL بالغ را تسهیل می‌کند و کاهش بیان آن در سلول‌های تحت تیمار با پالمیتات می‌تواند جذب کلسترول را مختل کند. در NAFLD، کاهش SR-B1 جذب کلسترول از HDL را کم کرده، اما کلسترول از طریق مسیرهای جایگزین مانند افزایش فعالیت LDLR و سنتز داخلی وارد هپاتوسیت‌ها می‌شود. همچنین، کاهش عملکرد ناقلین ABC مانند ABCA1 منجر به تجمع کلسترول در کبد می‌شود. التهاب و استرس اکسیداتیو ناشی از این شرایط، سنتز چربی را تشدید و توانایی کبد در دفع آن را کاهش می‌دهند. در نهایت، کاهش SR-B1 و اختلال در حمل‌ونقل HDL، علی‌رغم افزایش سطح HDL غنی از کلسترول در خون، به تجمع لیپیدها و آسیب کبدی منجر می‌شود (۲۰، ۲۱).

پالمیتات با کاهش ABCA1 و SR-B1، باعث افزایش بیان ABCG1 می‌شود که نقش مهمی در انتقال کلسترول به ذرات HDL بالغ‌تر دارد و این افزایش ممکن است پاسخی جبرانی به بار لیپیدی ناشی از پالمیتات باشد (۲۲)؛ اما این افزایش نمی‌تواند اختلالات ناشی از کاهش ABCA1 و SR-B1 را به‌طور کامل جبران کند و در نتیجه، کارایی کلی RTC کاهش می‌یابد و تشکیل مؤثر ذرات HDL اولیه مختل می‌شود. Kennedy و همکاران افزایش ABCG1 در کبد چرب را مشاهده کردند، درحالی‌که Min و همکاران کاهش آن را در NAFLD گزارش کردند (۲۳). علاوه بر پژوهش‌های مرتبط با کبد، مطالعات متعددی نیز به بررسی تأثیر اسیدهای چرب اشباع بر بیماری‌های قلبی عروقی پرداخته‌اند: از جمله Wang و همکاران که نشان دادند، کاهش بیان ABCA1 و ABCG1 به‌طور هم‌زمان منجر به کاهش بیشتری در RCT ماکروفاژها نسبت به سلول‌هایی که فقط بیان ABCG1 آن‌ها کاهش یافته بود، می‌شود (۲۴).

پالمیتات، به‌ویژه از طریق تأثیرات غیرمستقیم خود بر استرس اکسیداتیو و مسیرهای التهابی، ممکن است فعالیت LXR را مهار کند (۲۵، ۲۶). LXR به‌عنوان تنظیم‌کننده اصلی ژن‌های ABCA1 و SR-B1 شناخته می‌شود و کاهش فعالیت آن می‌تواند بر فرآیند انتقال معکوس کلسترول تأثیر منفی بگذارد (۲۶). این مطالعه نتایج متفاوتی نسبت به تحقیقات قبلی در زمینه اثر پالمیتات بر LXR داشته است، به‌طوری‌که تغییرات معنی‌داری در بیان LXR مشاهده نشد. این ممکن است به دخالت پالمیتات در مسیرهای دیگری مانند SREBP1 در متابولیسم چربی و کلسترول مربوط باشد، درحالی‌که برخی مطالعات قبلی اثرات معناداری بر فعالیت

تشکر و قدردانی

از گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی ایران که شرایط انجام این تحقیق را فراهم کردند قدردانی می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران با کد اخلاق (IR.IUMS.FMD.REC.1403.054) است.

سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان در تمامی بخش‌های پژوهش و نگارش مقاله نقش داشتند.

حمایت مالی

این مطالعه حمایت مالی دریافت نکرده است.

تضاد منافع

بین هیچ‌کدام از نویسندگان این مقاله، تعارض منافی وجود ندارد.

LXR و کاهش بیان آن گزارش کرده‌اند (۲۷). مطالعه Huang و همکاران (۲۰۲۱) نشان داده است که اختلال در عملکرد HDL و مسیر RCT می‌تواند منجر به تجمع لیپید در بافت‌ها و افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی-عروقی شود (۶، ۲۸). اختلاف نتایج این مطالعه با مطالعات قبلی ممکن است به تفاوت در مدل‌های تجربی، غلظت‌های پالمیتات یا زمان‌های تیمار مربوط باشد. همچنین، پالمیتات ممکن است تأثیرات خود را از طریق مکانیسم‌های دیگری که به تنظیم LXR و SREBP1 تأثیر می‌گذارند، اعمال کند.

در مجموع، این مطالعه پیچیدگی‌های پاسخ سلولی به پالمیتات و تأثیر آن بر مسیر انتقال معکوس کلسترول را نشان می‌دهد. پالمیتات با کاهش بیان ABCA1 و SR-B1 و افزایش ABCG1، تعادل انتقال کلسترول را مختل کرده و به‌طور غیرمستقیم بر عملکرد HDL تأثیر می‌گذارد. کاهش توانایی HDL در تسهیل انتقال کلسترول می‌تواند منجر به افزایش سطح کلسترول داخل سلولی و تشکیل قطرات لیپید شود که به اختلالات متابولیک و بیماری‌های قلبی عروقی کمک می‌کند. همچنین، کاهش خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی HDL می‌تواند به تشدید آترواسکلروز و اختلالات متابولیک منجر شود.

References

- Vancells Lujan P, Viñas Esmel E, Sacanella Meseguer E. Overview of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and the Role of Sugary Food Consumption and Other Dietary Components in Its Development. *Nutrients*. 2021;13(5). doi: 10.3390/nu13051442.
- Henry L, Paik J, Younossi ZM. Review article: the epidemiologic burden of non-alcoholic fatty liver disease across the world. *Aliment Pharmacol Ther*. 2022;56(6):942-56. doi: 10.1111/apt.17158.
- Leamy AK, Egnatchik RA, Young JD. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Prog Lipid Res*. 2013;52(1):165-74. doi: 10.1016/j.plipres.2012.10.004.
- Murru E, Manca C, Carta G, Banni S. Impact of Dietary Palmitic Acid on Lipid Metabolism. *Front Nutr*. 2022;9:861664. doi: 10.3389/fnut.2022.861664.
- van Rooijen MA, Plat J, Blom WAM, Zock PL, Mensink RP. Dietary stearic acid and palmitic acid do not differently affect ABCA1-mediated cholesterol efflux capacity in healthy men and postmenopausal women: A randomized controlled trial. *Clin Nutr*. 2021;40(3):804-11. doi: 10.1016/j.clnu.2020.08.016.
- Ouimet M, Barrett TJ, Fisher EA. HDL and Reverse Cholesterol Transport. *Circ Res*. 2019;124(10):1505-18. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.312617.
- Yu XH, Tang CK. ABCA1, ABCG1, and Cholesterol Homeostasis. *Adv Exp Med Biol*. 2022;1377:95-107. doi: 10.1007/978-981-19-1592-5_7.
- Yvan-Charvet L, Wang N, Tall AR. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(2):139-43. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179283.
- Bilotta MT, Petillo S, Santoni A, Cipitelli M. Liver X Receptors: Regulators of Cholesterol Metabolism, Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. *Front Immunol*. 2020;11:584303. doi: 10.3389/fimmu.2020.584303.
- Zhao NQ, Li XY, Wang L, Feng ZL, Li XF, Wen YF, et al. Palmitate induces fat accumulation by activating C/EBP β -mediated G0S2 expression in HepG2 cells. *World J Gastroenterol*. 2017;23(43):7705-15. doi: 10.3748/wjg.v23.i43.7705.
- Teixeira FS, Pimentel LL, Vidigal S, Azevedo-Silva J, Pintado ME, Rodríguez-Alcalá LM. Differential Lipid Accumulation on HepG2 Cells Triggered by Palmitic and Linoleic Fatty Acids Exposure. *Molecules*. 2023;28(5). doi: 10.3390/molecules28052367.
- Lyu J, Imachi H, Fukunaga K, Sato S, Kobayashi T, Dong T, et al. Role of ATP-binding cassette transporter A1 in suppressing lipid accumulation by glucagon-like peptide-1 agonist in hepatocytes. *Mol Metab*. 2020;34:16-26. doi: 10.1016/j.molmet.2019.12.015.
- Jeon BH, Lee YH, Yun MR, Kim SH, Lee BW, Kang ES, et al. Increased expression of ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) as a possible mechanism for the protective effect of cilostazol against hepatic steatosis. *Metabolism*. 2015;64(11):1444-53. doi: 10.1016/j.metabol.2015.07.014.
- Rein-Fischboeck L, Krautbauer S, Eisinger K, Pohl R, Meier EM, Weiss TS, et al. Hepatic scavenger receptor BI is associated with type 2 diabetes but unrelated to human and murine non-alcoholic fatty liver disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;467(2):377-82. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.149.

- [15]. Spady DK, Kearney DM, Hobbs HH. Polyunsaturated fatty acids up-regulate hepatic scavenger receptor B1 (SR-BI) expression and HDL cholesteryl ester uptake in the hamster. *J Lipid Res.* 1999;40(8):1384-94. doi: 10.1016/S0022-2275(20)33380-0
- [16]. Rocca C, De Bartolo A, Guzzi R, Crocco MC, Rago V, Romeo N, et al. Palmitate-Induced Cardiac Lipotoxicity Is Relieved by the Redox-Active Motif of SELENOT through Improving Mitochondrial Function and Regulating Metabolic State. *Cells.* 2023;12(7). doi: 10.3390/cells12071042.
- [17]. Liu C, Zhou B, Meng M, Zhao W, Wang D, Yuan Y, et al. FOXA3 induction under endoplasmic reticulum stress contributes to non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2021;75(1):150-62. doi: 10.1016/j.jhep.2021.01.042.
- [18]. Li Y, Xu Y, Jadhav K, Zhu Y, Yin L, Zhang Y. Hepatic Forkhead Box Protein A3 Regulates ApoA-I (Apolipoprotein A-I) Expression, Cholesterol Efflux, and Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(8):1574-87. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312610.
- [19]. Vargas-Alarcón G, Fragoso JM, Ramírez-Bello J, Posadas-Sánchez R. FOXA3 Polymorphisms Are Associated with Metabolic Parameters in Individuals with Subclinical Atherosclerosis and Healthy Controls-The GEA Mexican Study. *Biomolecules.* 2022;12(5). doi: 10.3390/biom12050601.
- [20]. Shen WJ, Azhar S, Kraemer FB. SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. *Annu Rev Physiol.* 2018;80:95-116. doi: 10.1146/annurev-physiol-021317-121550.
- [21]. Rivera K, Quiñones V, Amigo L, Santander N, Salas-Pérez F, Xavier A, et al. Lipoprotein receptor SR-B1 deficiency enhances adipose tissue inflammation and reduces susceptibility to hepatic steatosis during diet-induced obesity in mice. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2021;1866(6):158909. doi: 10.1016/j.bbalip.2021.158909.
- [22]. Moore JM, Bell EL, Hughes RO, Garfield AS. ABC transporters: human disease and pharmacotherapeutic potential. *Trends Mol Med.* 2023;29(2):152-72. doi: 10.1016/j.molmed.2022.11.001.
- [23]. Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldán A, Tarr P, Fishbein MC, et al. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 2005;1(2):121-31. doi: 10.1016/j.cmet.2005.01.002.
- [24]. Wang X, Collins HL, Ranalletta M, Fuki IV, Billheimer JT, Rothblat GH, et al. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest.* 2007;117(8):2216-24. doi: 10.1172/JCI32057.
- [25]. Korbecki J, Bajdak-Rusinek K. The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms. *Inflamm Res.* 2019;68(11):915-32. doi: 10.1007/s00011-019-01273-5.
- [26]. Ahn SB, Jang K, Jun DW, Lee BH, Shin KJ. Expression of liver X receptor correlates with intrahepatic inflammation and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci.* 2014;59(12):2975-82. doi: 10.1007/s10620-014-3289-x.
- [27]. Parks E, Yki-Järvinen H, Hawkins M. Out of the frying pan: dietary saturated fat influences nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2017;127(2):454-6. doi: 10.1007/s11154-019-09512-0.
- [28]. Madaudo C, Bono G, Ortello A, Astuti G, Mingoa G, Galassi AR, et al. Dysfunctional High-Density Lipoprotein Cholesterol and Coronary Artery Disease: A Narrative Review. *J Pers Med.* 2024;14(9). doi: 10.3390/jpm14090996.