

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.11.007
文章编号: 1005-8982 (2023) 11-0037-08

实验研究·论著

达格列净促进高脂诱导肥胖小鼠肝脏 脂肪酸氧化的初步机制研究*

郭万成¹, 王雅静¹, 居梦娴¹, 易书欣¹, 王珺珺¹, 黄玉杰¹, 季欣¹, 方彭华², 张真稳¹

[1.扬州大学临床医学院(江苏省苏北人民医院)内分泌科,江苏扬州225001;2.南京中医药大学第一临床医学院临床医学实验研究中心,江苏南京210023]

摘要:目的 探讨达格列净对高脂诱导肥胖小鼠肝脏脂代谢的影响及初步作用机制。**方法** 将16只高脂饮食12周的C57BL/6肥胖小鼠分为达格列净组和模型对照组(OC组),每组8只,另选取8只低脂饮食小鼠为正常对照组(NC组)。达格列净组按照10 mg/(kg·d)给予连续3周灌胃,OC组和NC组分别给予等量生理盐水。测量各组小鼠体重、血糖、葡萄糖耐量及胰岛素耐量;酶联免疫吸附试验检测小鼠血清胰岛素及脂质水平;实时荧光定量聚合酶链反应和Western blotting分别检测肝脏沉默信息调节因子2相关酶1(SIRT1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)及肉碱棕榈酰转移酶1A(CPT1A)mRNA和蛋白表达。**结果** 实验后达格列净组小鼠体重和空腹血糖水平较实验前下降最明显($P < 0.05$)。实验后达格列净组小鼠血浆胰岛素水平、葡萄糖耐量曲线下面积、胰岛素耐量曲线下面积及HOMA胰岛素抵抗指数均低于OC组($P < 0.05$)。与OC组比较,达格列净组小鼠血清甘油三酯和胆固醇水平均降低($P < 0.05$)。与OC组比较,达格列净组小鼠肝脏甘油三酯、胆固醇及肝脏重量均降低($P < 0.05$)。肝脏PGC-1 α 、SIRT1、CPT1A mRNA和蛋白相对表达量均升高($P < 0.05$)。**结论** 达格列净可能通过激活肝脏SIRT1/PGC-1 α /CPT1A通路促进肥胖小鼠的肝脏脂肪酸氧化,减少肝脏脂肪蓄积,改善胰岛素抵抗。

关键词: 肥胖;达格列净;胰岛素抵抗;肝脏;脂肪酸氧化;小鼠
中图分类号: R587.1 **文献标识码:** A

Preliminary mechanism of Dapagliflozin promoting fatty acid oxidation in liver of obese mice induced by high fat*

Guo Wan-cheng¹, Wang Ya-jing¹, Ju Meng-xian¹, Yi Shu-xin¹, Wang Jun-jun¹,
Huang Yu-jie¹, Ji Xin¹, Fang Peng-hua², Zhang Zhen-wen¹

[1. Department of Endocrinology, Clinical Medical College of Yangzhou University (Jiangsu Subei People's Hospital), Yangzhou, Jiangsu 225001, China; 2. The Experimental Research Center of Clinical Medicine, The First Medical School of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210023, China]

Abstract: Objective To investigate the effects of Dapagliflozin on liver lipid metabolism and its primary mechanism in adipose-induced obesity mice. **Methods** Sixteen obese C57BL/6 mice were divided into two groups, which were model control group (OC group) and Dapagliflozin group, with 8 mice in each group. In addition, 8 low-fat diet were selected as normal control group (NC group). Dapagliflozin group was given 10 mg/(kg·d) intragastric administration for 3 weeks, while NC and OC groups were given the same amount of normal saline. The body

收稿日期: 2022-12-28

* 基金项目: 国家自然科学基金(No.: 81803792)

[通信作者] 张真稳, E-mail: zwzhang@yzu.edu.cn; Tel: 18921901233

weight, blood glucose, glucose tolerance, and insulin tolerance of mice in each group were detected. Serum insulin and lipid levels were detected by ELISA. The mRNA and protein levels of silencing information regulator 2 related enzyme 1 (SIRT1), deacetylation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC-1 α), and carnitine palmitoyl transferase 1A (CPT1A) in liver were detected by RT-PCR and Western blotting. **Results** Body weight and fasting plasma glucose in Dapagliflozin group decreased after experiment ($P < 0.05$). Compared with OC group, the body weight, fat content, fasting plasma glucose, serum insulin, serum triglyceride, and serum cholesterol decreased ($P < 0.05$); the area under glucose tolerance curve and insulin tolerance curve decreased ($P < 0.05$); liver weight, liver triglyceride level, and liver cholesterol level decreased ($P < 0.05$); the mRNA expression levels of SIRT1, PGC-1 α , and CPT1A in liver increased ($P < 0.05$); the protein expression levels of SIRT1, CPT1A, and PGC-1 α in liver increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Dapagliflozin may enhance hepatic fatty acid oxidation, decrease hepatic fat accumulation, and improve insulin resistance in obese mice by activating SIRT1/PGC-1 α /CPT1A pathway.

Keywords: obesity; Dapagliflozin; insulin resistance; liver; fatty acid oxidation; mice

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是严重危害人类健康的疾病之一。T2DM长期胰岛素抵抗可引起肝脏脂质代谢障碍,最终导致非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD),严重者可发展为肝硬化甚至肝癌^[1]。NAFLD是一种与胰岛素抵抗和遗传易感性密切相关的代谢应激性肝损伤,T2DM患者中约有半数以上合并NAFLD^[2]。在对NAFLD的治疗过程中,通过改变生活方式的途径减轻体重是一种常用且行之有效的治疗方法,对体重较重或伴内脏性肥胖的患者,可通过饮食控制和合理锻炼来改善NAFLD^[3]。

钠-葡萄糖共转运蛋白2(sodium-glucose cotransporter 2, SGLT2)抑制剂是一种新型降糖药物,不仅临床降糖效果显著,在减轻体重、改善肝脏脂肪变性等方面也具有较好的作用^[4]。SGLT2抑制剂可通过增加游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)氧化、加速脂肪分解、增加尿糖排泄,达到减轻体重和减少内脏脂肪含量的目的,同时可减少机体氧化应激,达到改善NAFLD的目的,这种能量的丢失会增加内脏脂肪尤其是肝脏脂肪的 β 氧化,使肝脏脂肪分解增多^[5]。临床研究表明,SGLT2抑制剂达格列净能够显著减少NAFLD患者肝脏脂肪空泡及肝小叶炎症,从而减少肝脏脂肪变性和脂肪堆积^[6]。另外,肝功能指标血清丙氨酸氨基转移酶和 γ -谷氨酰转肽酶水平均显著下降^[7-8]。在胰岛素抵抗的状态下,外周脂肪组织脂解率升高,转移到肝脏合成甘油三酯并储存,导致大量脂肪堆积,出现肝脏脂肪变性^[9]。动物实验研究发现,达格列净能够降低高脂诱导的肥胖小鼠及db/db糖尿病小鼠肝脏脂肪变

性^[10-11]。进一步研究发现,达格列净通过减少肝脏氧化应激及炎症反应,抑制肝脏甘油三酯合成,从而缓解肝脏脂肪变性^[12-13]。此外,达格列净也能够调控肝脏脂肪酸氧化分解代谢,但其具体作用机制尚不明确。因此,本研究通过复制高脂诱导肥胖小鼠模型,探讨达格列净对高脂诱导肥胖小鼠肝脏脂肪酸氧化代谢的初步作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

24只SPF级6~7周龄健康雄性C57BL/6小鼠,体重18~20g,购自扬州大学比较医学实验中心[实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2017-0007]。所有小鼠分笼饲养,标准小鼠颗粒饲料喂养,自由饮用纯净水,饲养环境温度(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 。在实验开始前,所有小鼠适应性饲养1周。

达格列净片(规格:10mg/片,批号:LP2385,中国阿斯利康制药有限公司),SDS-PAGE凝胶配置试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),BCA[™]蛋白检测试剂盒(美国Pierce Chemical公司)。TRIzol试剂(美国Gibco Invitrogen公司),实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)引物(上海Invitrogen公司),甘油三酯和胆固醇试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司),胰岛素酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司),过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator -1 α , PGC-1 α)一抗(ST-1202)(德国Merck Millipore公司),Tubulin一抗

(11224-1-AP)、沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (Silencing information regulator 2 related enzyme 1, SIRT1) 一抗(13161-1-AP)及肉碱棕榈酰转移酶 1A (Carnitine palmitoyl transferase 1A, CPT1A) 一抗(15184-1-AP)(武汉 Proteintech 公司)。

1.2 动物分组、模型复制及干预

将 24 只健康雄性 C57BL/6 小鼠均分为 3 组: 达格列净组、模型对照组(OC 组)及正常对照组(NC 组), 每组 8 只。格列净组和 OC 组小鼠予以高脂饮食喂养 12 周复制高脂诱导肥胖小鼠模型, NC 组小鼠给予低脂饮食喂养。达格列净组小鼠按照 10 mg/(kg·d) 给予连续 3 周灌胃, NC 组和 OC 组小鼠则分别给予等量生理盐水。给药前, 所有小鼠称量体重并检测空腹尾静脉血糖; 给药期间, 每周监测小鼠体重及空腹血糖; 给药结束后, 所有小鼠称量体重并检测空腹血糖, 之后通过眼球取血的方式处死小鼠, 分离肝脏与脂肪组织并称重, 对血液标本离心处理, 将离心后的血清及肝脏组织置于 -80 °C 冰箱冷冻保存。

1.3 葡萄糖耐量及胰岛素耐量检测

小鼠给药 2 周后, 禁食 12 h, 然后按照 1.5 g/kg 腹腔注射 50% 浓度的葡萄糖, 检测小鼠尾静脉血糖。3 d 后, 再将小鼠禁食 6 h, 按照 1 u/kg 体重腹腔注射胰岛素, 检测小鼠尾静脉血糖, 计算胰岛素耐量曲线下面积和胰岛素耐量曲线下面积, 记录并进行分析。

1.4 ELISA 检测血清胰岛素及脂质水平

严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测胰岛素、甘油三酯及胆固醇水平。小鼠眼眶取血时, 每组中有 2 份血液标本离心后发现溶血现象, 因此没有纳入数据。最后在多功能酶标仪 450 nm 波长处读取数值并进行分析。

1.5 肝脏 HE 染色

取肝脏用 4% 多聚甲醛溶液固定过夜, 石蜡包埋切片。将多聚甲醛固定石蜡包埋的肝组织切成 5 μm 石蜡切片, 然后进行 HE 染色。

1.6 qRT-PCR 检测肝脏 PGC-1α、SIRT1、CPT1A mRNA 表达

每组随机选取 4 只小鼠, 用 TRIzol 从 100 mg 冷冻肝脏中提取总 RNA。用 MMLV 逆转录酶从 1 μg RNA 合成 cDNA。使用 Bio-Rad CFX Connect™

Optics Module 实时 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国) 进行 qRT-PCR 检测。反应条件: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 62 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 共 40 个循环, 72 °C 继续延伸 4 min。PGC-1α 正向引物: 5'-ACCATGACTACTGTCTCAGTCACTC-3', 反向引物: 5'-GTCACAGGAGGCATCTTTGAAG-3'; SIRT1 正向引物: 5'-GATGACGATGACAGAACGTCACA-3', 反向引物: 5'-CAAAATGACCTAGCCTTCTATCGAA-3'; CPT1A 正向引物: 5'-CACCAACGGGCTCATCTTCTA-3', 反向引物: 5'-TGATGACTGTCTTGGCTTTTCG-3'; GAPDH 正向引物: 5'-AGAACATCATCCCTGCATCC-3', 反向引物: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。

1.7 Western blotting 检测肝脏 PGC-1α、SIRT1、CPT1A 蛋白表达

每组随机选取 3 只小鼠, 采用 BCA 标准蛋白定量测定肝脏蛋白浓度, 然后加上样缓冲液混匀煮沸 10 min 至蛋白变性, 迅速置于 -80 °C 冰箱使其蛋白充分变性, 待上样前, 少量分装蛋白样品并低温保存, 避免反复冻融引起蛋白降解。在 10% 的 SDS-PAGE 胶中加入等量样品电泳分离, 电泳条件设置为 70 V、30 min 和 120 V、60 min, 待溴酚蓝至底部时停止电泳, 后依据目的蛋白分子量大小进行切胶处理, 最后转印至 PVDF 膜上, 转印条件为 300 mA、120 min。转印结束后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 之后分别加入 PGC-1α、SIRT1 及 CPT1A 一抗 4 °C 摇床过夜孵育, 用 TBST 分别洗涤 3 次后加入对应的二抗室温孵育 1.5 h。二抗孵育结束后继续上述方法洗膜 3 次, 以 Tubulin 为内参, 配制超敏发光液进行曝光并进行数据分析。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 26.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析或重复测量设计的方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组小鼠体重和脂肪重量的比较

3 组小鼠实验前后体重差值比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 实验后各组小鼠体重均下

降,达格列净组小鼠体重下降最明显($P < 0.05$)。3组小鼠实验后脂肪重量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);达格列净组小鼠脂肪重量较OC组减少($P < 0.05$)。见表1。

表1 各组小鼠体重和脂肪重量的比较 ($n=8, g, \bar{x} \pm s$)

组别	实验前后体重差值	实验后脂肪重量
NC组	1.03 ± 0.33	0.90 ± 0.19
OC组	1.89 ± 0.63	4.10 ± 0.56
达格列净组	2.68 ± 0.68	1.82 ± 0.19 [†]
F值	17.110	167.700
P值	0.000	0.000

注:†与OC组比较, $P < 0.05$ 。

表2 3组小鼠血浆胰岛素、葡萄糖耐量曲线下面积、胰岛素耐量曲线下面积及HOMA胰岛素抵抗指数比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	血浆胰岛素/(mIU/L)	葡萄糖耐量曲线下面积	胰岛素耐量曲线下面积	HOMA胰岛素抵抗指数
NC组	15.79 ± 1.23	11.12 ± 2.92	4.54 ± 0.46	3.76 ± 0.28
OC组	19.74 ± 3.16	17.10 ± 2.56	7.37 ± 1.10	8.77 ± 0.28
达格列净组	15.56 ± 0.94 [†]	12.96 ± 2.16 [†]	5.58 ± 0.78 [†]	5.34 ± 0.52 [†]
F值	8.031	38.550	73.530	89.590
P值	0.004	0.000	0.000	0.000

注:†与OC组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 3组小鼠血清脂代谢变化

3组小鼠血清甘油三酯和胆固醇水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);与OC组比较,达格列净组小鼠血清甘油三酯和胆固醇水平均降低($P < 0.05$)。见表3。

2.4 3组小鼠肝脏脂质水平、肝脏重量比较及肝脏HE染色结果

与OC组比较,达格列净组小鼠的肝脏脂滴

表3 3组小鼠血清甘油三酯和胆固醇比较 ($n=6, mmol/L, \bar{x} \pm s$)

组别	甘油三酯	胆固醇
NC组	0.45 ± 0.07	2.04 ± 0.15
OC组	1.05 ± 0.18	4.80 ± 0.34
达格列净组	0.79 ± 0.08 [†]	3.19 ± 0.43 [†]
F值	36.910	105.600
P值	0.000	0.000

注:†与OC组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 3组小鼠的空腹血糖、胰岛素及胰岛素敏感性比较

实验前后NC组、OC组、达格列净组小鼠空腹血糖差值分别为(0.33 ± 0.10) mmol/L、(1.05 ± 0.34) mmol/L、(2.51 ± 0.78) mmol/L, 3组比较,差异有统计学意义($F = 40.670, P = 0.000$);达格列净组小鼠空腹血糖下降最明显($P < 0.05$)。实验后,3组小鼠血浆胰岛素水平、葡萄糖耐量曲线下面积、胰岛素耐量曲线下面积及HOMA胰岛素抵抗指数(HOMA胰岛素抵抗指数=空腹血糖 × 空腹胰岛素/22.5)比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);达格列净组小鼠血浆胰岛素水平、葡萄糖耐量曲线下面积、胰岛素耐量曲线下面积及HOMA胰岛素抵抗指数均低于OC组($P < 0.05$)(见表2)。

和空泡显著减少(见图1)。3组小鼠肝脏甘油三酯、肝脏胆固醇及肝脏重量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);与OC组比较,达格列净组小鼠肝脏甘油三酯、肝脏胆固醇及肝脏重量均降低($P < 0.05$)(见表4)。

2.5 3组小鼠肝脏PGC-1 α 、SIRT1、CPT1A mRNA相对表达量的比较

3组小鼠肝脏PGC-1 α 、SIRT1、CPT1A mRNA相对表达量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),与OC组比较,达格列净组小鼠肝脏PGC-1 α 、SIRT1、CPT1A mRNA相对表达量升高($P < 0.05$)。见表5。

2.6 3组小鼠肝脏PGC-1 α 、SIRT1、CPT1A蛋白相对表达量的比较

3组小鼠肝脏PGC-1 α 、SIRT1、CPT1A蛋白相对表达量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);与OC组比较,达格列净组小鼠肝脏PGC-1 α 、SIRT1、CPT1A蛋白相对表达量均升高($P < 0.05$)。见表6和图2。

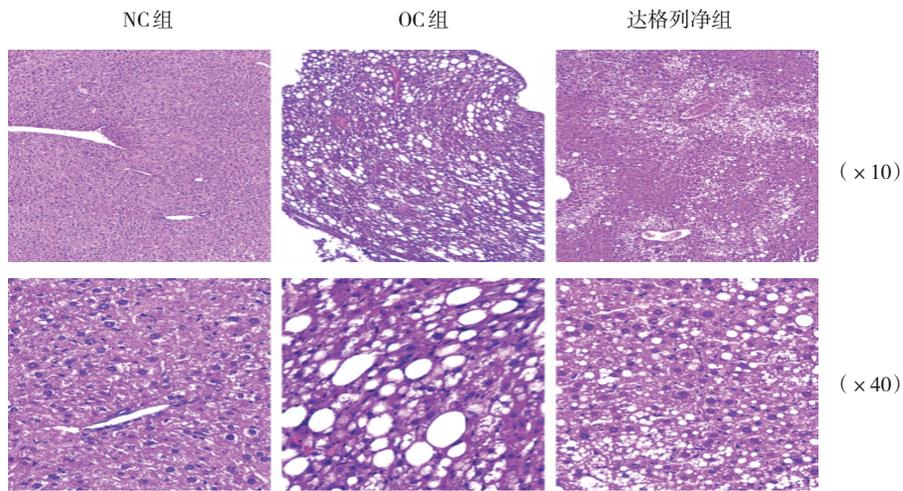


图 1 3组小鼠肝脏 HE 染色

表 4 3组小鼠的肝脏甘油三酯、肝脏胆固醇和肝脏重量比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	甘油三酯/(mmol/L)	胆固醇/(mmol/L)	肝脏重量/g
NC组	0.79 ± 0.23	0.91 ± 0.19	0.95 ± 0.05
OC组	2.81 ± 0.46	2.81 ± 0.43	1.45 ± 0.06
达格列净组	1.71 ± 0.15 [†]	1.84 ± 0.12 [†]	1.30 ± 0.04 [†]
F 值	64.640	69.620	166.400
P 值	0.000	0.000	0.000

注: †与OC组比较, P<0.05。

表 5 3组小鼠SIRT1、PGC-1 α 、CPT1A mRNA 相对表达量比较 (n=4, $\bar{x} \pm s$)

组别	PGC-1 α mRNA	SIRT1 mRNA	CPT1A mRNA
NC组	0.136 1 ± 0.001 7	0.0171 ± 0.003 8	0.124 9 ± 0.021 3
OC组	0.060 1 ± 0.012 2	0.0062 ± 0.000 8	0.012 1 ± 0.002 6
达格列净组	0.094 1 ± 0.014 2 [†]	0.011 4 ± 0.001 0 [†]	0.071 3 ± 0.013 2 [†]
F 值	30.120	21.560	60.250
P 值	0.000	0.000	0.000

注: †与OC组比较, P<0.05。

表 6 3组小鼠PGC-1 α 、SIRT1、CPT1A 蛋白相对表达量比较 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	PGC-1 α 蛋白	SIRT1 蛋白	CPT1A 蛋白
NC组	0.34 ± 0.12	0.81 ± 0.33	0.86 ± 0.30
OC组	0.20 ± 0.04	0.44 ± 0.04	0.27 ± 0.03
达格列净组	1.03 ± 0.35 [†]	1.23 ± 0.30 [†]	0.83 ± 0.25 [†]
F 值	12.850	6.851	6.511
P 值	0.007	0.029	0.031

注: †与OC组比较, P<0.05。

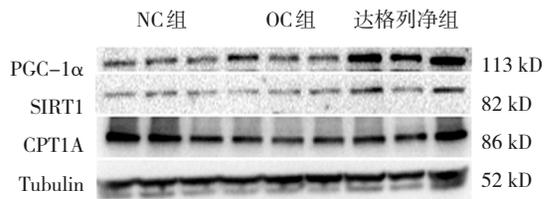


图2 3组小鼠 PGC-1 α 、SIRT1、CPT1A、Tubulin 蛋白表达

3 讨论

NAFLD 是一种常见的影响全身系统的慢性代谢性疾病,其发病机制与胰岛素抵抗引起的糖脂代谢紊乱有关^[14]。NAFLD 的病理生理学机制复杂,大量证据表明,NAFLD、胰岛素抵抗、肥胖和 T2DM 经常共存,并在不良肝脏和肝外临床结果(如心血管疾病)的发展中起作用^[15-17]。代谢相关脂肪性肝病(metabolic associated fatty liver disease, MAFLD)与超重或肥胖、血脂异常、代谢失调、空腹血糖受损及胰岛素抵抗等因素有关,尽管一些学者建议将术语从 NAFLD 改为 MAFLD,但 MANTOVANI 等^[18]认为保留 NAFLD 术语也是合适的。NAFLD 开始表现为单纯的脂肪变性,继而发展为非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH),最后进展为肝硬化和肝癌^[19]。

高脂饮食可诱导肝脏脂肪变性、胰岛素抵抗,表现为肝脏重量增加、肝脏脂质增多及血清丙氨酸氨基转移酶升高^[20]。临床研究发现,达格列净作为 SGLT2 抑制剂的代表药物之一,除具有很好的心肾保护作用外,还可以改善胰岛素抵抗、肝脏糖脂代谢和减轻肝脏的脂毒性^[21]。随机对照试验研究表明,达格列净治疗 NAFLD 患者 12 或 24 周后,内脏脂肪和血清丙氨酸氨基转移酶和 γ -谷氨酰转肽酶水平均显著降低,肝脏脂肪变性及纤维化程度均显著下降,提示达格列净可以通过减少内脏脂肪含量来缓解 NAFLD 及恢复肝功能^[6-8]。动物实验研究发现,达格列净治疗糖尿病大鼠 6 周后,大鼠肝脏重量、肝功能代谢酶及肝脏脂肪水平均显著下降。此外,达格列净能够增加糖尿病大鼠抗氧化酶、谷胱甘肽水平,降低白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)等炎症因子水平,提高胰岛素敏感性^[12]。本研究中,达格列净治疗 3 周后,肥胖小鼠胰岛素抵抗水平显著下降,表现为体重和内脏脂肪减少,血糖、胰岛素

水平降低,糖耐量和胰岛素耐量水平升高,血清及肝脏甘油三酯和胆固醇水平下降,肝脏脂肪变性明显减少,提示达格列净可以改善高脂诱导肥胖小鼠的胰岛素敏感性及肝脏脂肪代谢水平。

NAFLD 主要通过多个环节引起肝脂肪变性,包括胰岛素抵抗引起外周脂肪分解释放大量游离脂肪酸,导致游离脂肪酸进入肝细胞显著增加、肝细胞合成游离脂肪酸的能力增强、肝细胞游离脂肪酸氧化减少,以及极低密度脂蛋白分泌减少引起的甘油三酯转运障碍。前期研究表明,达格列净通过增加糖尿病小鼠脂肪酸氧化而减少脂质在体内的蓄积,改善糖脂代谢^[22]。有研究表明,CPT1A 是脂肪酸 β 氧化的限速酶,在脂肪酸 β 氧化过程中发挥关键作用^[23]。高脂肪饮食肥胖小鼠肝脏 CPT1A 表达显著减少,导致肝脏脂肪酸氧化减少,引起肝细胞内外脂肪堆积。本研究发现,OC 组小鼠肝脏 CPT1A mRNA 和蛋白相对表达量较 NC 组显著减少,而达格列净治疗肥胖小鼠 3 周后,肝脏脂肪酸氧化酶 CPT1A 水平显著升高,提示达格列净可以通过增加肝脏 CPT1A 水平,提高脂肪酸氧化水平,从而减少肝脏脂肪变性。

研究发现,SIRT1/PGC-1 α 是调控 NAFLD 肝脏脂肪酸氧化的关键信号通路^[24-25]。SIRT1 是一种通过脱乙酰化酶和转录调节因子,不仅能够介导非组蛋白赖氨酸位点的去乙酰化,调节细胞内非组蛋白的乙酰化水平,还可以通过调控特定基因的转录和表达,激活或抑制信号蛋白,参与多种生命过程的调控^[26]。高脂诱导肥胖小鼠实验表明,长期高脂饮食引起肝脏 SIRT1 表达显著下降,同时伴随肝脏甘油三酯、胆固醇、天门冬氨酸氨基转移酶和丙氨酸氨基转移酶水平升高,超氧化物歧化酶活性降低^[27]。另外,SIRT1 是一种重要的转录因子,通过调节生成 PGC-1 α 的表达及活性,参与肝脏脂肪酸的分解^[26-27]。PGC-1 α 是调控线粒体生成与氧化代谢的主要转录共激活因子,对肝脏线粒体呼吸和脂肪酸氧化起重要调节作用^[27]。临床研究显示,NAFLD 和 NASH 患者肝脏 SIRT1 及 PGC-1 α 表达水平显著下降,并且与 NAFLD 患者的肝脏脂肪堆积程度呈负相关^[24, 28-29]。此外,SIRT1 或 PGC-1 α 敲除小鼠肝脏脂肪变性和炎症显著加重,肝细胞脂肪酸氧化活性显著降低^[25, 28-29],而 PGC-1 α 过表达后能够显著增加与

脂解和脂肪酸氧化功能相关的基因表达,减少高脂诱导的脂肪变性^[30-31]。研究还发现,SIRT1 调控 NAFLD 肝脏脂肪酸氧化过程主要是通过降低 PGC-1 α 乙酰化水平,从而激活 PGC-1 α ,增加线粒体脂肪酸氧化代谢^[32]。激活肝脏 PGC-1 α 及其下游信号过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferators activate receptors α , PPAR α)能够增加肝细胞脂肪酸 β 氧化,促进线粒体生物合成,降低肝脏脂肪变性^[29,33]。因此,调控肝脏 SIRT1 及 PGC-1 α 表达是缓解肝脏脂肪酸氧化及脂肪变性重要策略。本研究发现达格列净治疗肥胖小鼠 3 周后,肝脏 SIRT1 和 PGC-1 α mRNA 和蛋白表达均显著升高,提示达格列净可能是通过增加肝脏 SIRT1 及 PGC-1 α 表达,提高肝脏脂肪酸氧化水平,从而减少肝脏脂肪变性。因此,本研究表明达格列净可能通过激活 SIRT1/PGC-1 α 信号通路增强肝脏脂肪酸氧化,初步揭示了 SGLT2 抑制剂增加肝脏脂肪酸氧化的信号机制,为进一步研究奠定了重要实验依据。

参 考 文 献 :

- [1] LUO H H, ZHAO M D, FENG X F, et al. Decreased plasma n6 : n3 polyunsaturated fatty acids ratio interacting with high C-peptide promotes non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes patients[J]. J Diabetes Investig, 2021, 12(7): 1263-1271.
- [2] GHARAIBEH N E, RAHHAL M N, RAHIMI L, et al. SGLT-2 inhibitors as promising therapeutics for non-alcoholic fatty liver disease: pathophysiology, clinical outcomes, and future directions[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2019, 12: 1001-1012.
- [3] ROMERO-GÓMEZ M, ZELBER-SAGI S, TRENELL M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise[J]. J Hepatol, 2017, 67(4): 829-846.
- [4] CHRYSAVGIS L, PAPTAEODORIDI A M, CHATZIGEORGIOU A, et al. The impact of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors on non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2021, 36(4): 893-909.
- [5] SAKAI S, KAKU K, SEINO Y, et al. Efficacy and safety of the SGLT2 inhibitor luseogliflozin in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus stratified according to baseline body mass index: pooled analysis of data from 52-week phase III trials[J]. Clin Ther, 2016, 38(4): 843-862.e9.
- [6] MANTOVANI A, BYRNE C D, TARGHER G. Efficacy of peroxisome proliferator-activated receptor agonists, glucagon-like peptide-1 receptor agonists, or sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors for treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2022, 7(4): 367-378.
- [7] ERIKSSON J W, LUNDKVIST P, JANSSON P A, et al. Effects of dapagliflozin and n-3 carboxylic acids on non-alcoholic fatty liver disease in people with type 2 diabetes: a double-blind randomised placebo-controlled study[J]. Diabetologia, 2018, 61(9): 1923-1934.
- [8] SHIMIZU M, SUZUKI K, KATO K, et al. Evaluation of the effects of dapagliflozin, a sodium-glucose co-transporter-2 inhibitor, on hepatic steatosis and fibrosis using transient elastography in patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease[J]. Diabetes Obes Metab, 2019, 21(2): 285-292.
- [9] CHEN L G, CHEN X W, HUANG X, et al. Regulation of glucose and lipid metabolism in health and disease[J]. Sci China Life Sci, 2019, 62(11): 1420-1458.
- [10] HAN T, FAN Y J, GAO J, et al. Sodium glucose cotransporter 2 inhibitor dapagliflozin depressed adiposity and ameliorated hepatic steatosis in high-fat diet induced obese mice[J]. Adipocyte, 2021, 10(1): 446-455.
- [11] OMORI K, NAKAMURA A, MIYOSHI H, et al. Effects of dapagliflozin and/or insulin glargine on beta cell mass and hepatic steatosis in db/db mice[J]. Metabolism, 2019, 98: 27-36.
- [12] HAZEM R M, IBRAHIM A Z, ALI D A, et al. Dapagliflozin improves steatohepatitis in diabetic rats via inhibition of oxidative stress and inflammation[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 104: 108503.
- [13] ELMAHDY M K, HELAL M G, EBRAHIM T M. Potential anti-inflammatory effect of dapagliflozin in HCHF diet- induced fatty liver degeneration through inhibition of TNF- α , IL-1 β , and IL-18 in rat liver[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 86: 106730.
- [14] VASQUEZ-RIOS G, NADKARNI G N. SGLT2 inhibitors: emerging roles in the protection against cardiovascular and kidney disease among diabetic patients[J]. Int J Nephrol Renovasc Dis, 2020, 13: 281-296.
- [15] TARGHER G, LONARDO A, BYRNE C D. Nonalcoholic fatty liver disease and chronic vascular complications of diabetes mellitus[J]. Nat Rev Endocrinol, 2018, 14(2): 99-114.
- [16] MANTOVANI A, SCORLETTI E, MOSCA A, et al. Complications, morbidity and mortality of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Metabolism, 2020, 111S: 154170.
- [17] ANSTEE Q M, TARGHER G, DAY C P. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(6): 330-344.
- [18] MANTOVANI A, DALBENI A. Treatments for NAFLD: state of art[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2350.
- [19] YOUNOSSI Z, ANSTEE Q M, MARIETTI M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(1): 11-20.
- [20] TSUCHIDA T, LEE Y A, FUJIWARA N, et al. A simple diet- and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer[J]. J Hepatol, 2018, 69(2): 385-395.

- [21] WILLIAMS D M, EVANS M. Dapagliflozin for heart failure with preserved ejection fraction: will the DELIVER study deliver?[J]. *Diabetes Ther*, 2020, 11(10): 2207-2219.
- [22] VALLON V, THOMSON S C. Targeting renal glucose reabsorption to treat hyperglycaemia: the pleiotropic effects of SGLT2 inhibition[J]. *Diabetologia*, 2017, 60(2): 215-225.
- [23] SCHLAEPFER I R, JOSHI M. CPT1A-mediated fat oxidation, mechanisms, and therapeutic potential[J]. *Endocrinology*, 2020, 161(2): bqz046.
- [24] COLLIN de L'HORTET A, TAKEISHI K, GUZMAN-LEPE J, et al. Generation of human fatty livers using custom-engineered induced pluripotent stem cells with modifiable SIRT1 metabolism[J]. *Cell Metab*, 2019, 30(2): 385-401.e9.
- [25] PURUSHOTHAM A, SCHUG T T, XU Q, et al. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation[J]. *Cell Metab*, 2009, 9(4): 327-338.
- [26] RODGERS J T, LERIN C, HAAS W, et al. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1[J]. *Nature*, 2005, 434(7029): 113-118.
- [27] GERHART-HINES Z, DOMINY J E Jr, BLÄTTLER S M, et al. The cAMP/PKA pathway rapidly activates SIRT1 to promote fatty acid oxidation independently of changes in NAD(+)[J]. *Mol Cell*, 2011, 44(6): 851-863.
- [28] LEONE T C, LEHMAN J J, FINCK B N, et al. PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis[J]. *PLoS Biol*, 2005, 3(4): e101.
- [29] BESSE-PATIN A, LÉVEILLÉ M, OROPEZA D, et al. Estrogen signals through peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α to reduce oxidative damage associated with diet-induced fatty liver disease[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(1): 243-256.
- [30] MORRIS E M, MEERS G M E, BOOTH F W, et al. PGC-1 α overexpression results in increased hepatic fatty acid oxidation with reduced triacylglycerol accumulation and secretion[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 303(8): G979-G992.
- [31] MORRIS E M, JACKMAN M R, MEERS G M E, et al. Reduced hepatic mitochondrial respiration following acute high-fat diet is prevented by PGC-1 α overexpression[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013, 305(11): G868-G880.
- [32] NEMOTO S, FERGUSON M M, FINKEL T. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 α [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(16): 16456-16460.
- [33] VEGA R B, HUSS J M, KELLY D P. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor α in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(5): 1868-1876.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 郭万成, 王雅静, 居梦娴, 等. 达格列净促进高脂诱导肥胖小鼠肝脏脂肪酸氧化的初步机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(11): 37-44.

Cite this article as: GUO W C, WANG Y J, JU M X, et al. Preliminary mechanism of Dapagliflozin promoting fatty acid oxidation in liver of obese mice induced by high fat[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(11): 37-44.