

本文引用: 彭 泉, 钟雁城, 杨霄旭, 成细华. 左归降糖清肝方对糖尿病性脂肪肝小鼠 PGC-1 α 和 DNMT3A 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(12): 2171-2176.

左归降糖清肝方对糖尿病性脂肪肝小鼠 PGC-1 α 和 DNMT3A 表达的影响

彭 泉^{1,2}, 钟雁城¹, 杨霄旭¹, 成细华^{1*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 长春中医药大学针灸推拿学院, 吉林 长春 130500

[摘要] **目的** 探讨左归降糖清肝方对高脂饮食 2 型糖尿病转基因 MKR 鼠脂肪肝发生中过氧化物酶体增殖活化受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferation-activated receptor- γ -coactivator 1 α , PGC-1 α)和 DNA 甲基转移酶 3A(DNA methyltransferase 3A, DNMT3A)表达的影响。**方法** 24 只 MKR 鼠随机分为对照组、高脂模型组和左归降糖清肝方(中药方)组;高脂模型组和中药方组均以高脂饲料喂养 8 周,对照组以基础饲料喂养;中药方组高脂饲料喂养 4 周后,以中药汤剂灌胃干预治疗 4 周,其他组灌胃等量的蒸馏水。采用电化学法检测空腹血糖;试剂盒测定肝组织甘油三酯(triglyceride, TG)和游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)含量;HE 染色观察肝组织形态结构及病理变化;qRT-PCR 检测小鼠肝组织 PGC-1 α 、线粒体转录因子 A(mitochondrial transcriptionfactor A, TFAM)、核呼吸因子-1(nuclear respiratory factor 1, NRF1)和 DNMT3A mRNA 表达;Western blot 和免疫组织化学检测 PGC-1 α 和 DNMT3A 蛋白表达。**结果** 高脂饮食诱发 MKR 鼠形成糖尿病性脂肪肝,肝细胞有大小不一的脂滴,呈脂肪性变;与对照组比较,高脂模型组小鼠血糖、肝指数和肝组织 TG 和 FFA 含量显著上升($P<0.01$),肝脏 PGC-1 α 、NRF1 和 TFAM 的 mRNA 及 PGC-1 α 蛋白表达显著下降($P<0.01$),而 DNMT3A mRNA 和蛋白表达均显著上升($P<0.01$)。与高脂模型组比较,左归降糖清肝方降低了高脂饮食 MKR 鼠血糖、肝指数和肝组织 TG 和 FFA 含量($P<0.01$),上调了肝脏 PGC-1 α 、NRF1 和 TFAM 的 mRNA 表达,以及 PGC-1 α 蛋白表达($P<0.01$),下调了 DNMT3A 的 mRNA 和蛋白表达($P<0.01$)。**结论** 左归降糖清肝方通过调节肝脏 PGC-1 α 及其通路相关基因表达,缓解糖尿病性脂肪肝小鼠肝脏脂肪性变,其机制可能通过抑制 DNA 甲基转移酶 3A 表达,减少 PGC-1 α DNA 的甲基化相关。

[关键词] 左归降糖清肝方;糖尿病性脂肪肝;PGC-1 α ;DNMT3A;甲基化

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.12.005

Effects of Zuogui Jiangtang Qinggan Formula on PGC-1 α and DNMT3A expressions of liver in diabetic fatty liver mice

PENG Quan^{1,2}, ZHONG Yancheng¹, YANG Xiaoxu¹, CHENG Xihua^{1*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. College of Acupuncture and Massage, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun, Jilin 130500, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Zuogui Jiangtang Qinggan Formula (ZGJTQGF) on the expression of peroxisome proliferation-activated receptor- γ -coactivator 1 α (PGC-1 α) and DNA methyltransferase 3A (DNMT3A) in fatty liver development of transgenic MKR mice with type 2 diabetes mellitus following a high-fat diet. **Methods** A total of 24 MKR mice

[收稿日期]2023-06-29

[基金项目]国家自然科学基金区域联合创新研究重点支持项目(U21A20411);湖南省自然科学基金项目(2021JJ30491);湖南省教育厅重点项目(20A376);湖南省卫健委重点项目(A202303066904);湖南省教育厅一般项目(19C1385);湖南中医药大学大学生创新创业训练计划(2021-128,2022-153);湖南中医药大学一流学科《基础医学》项目;湖南省国内一流培育学科中西医结合学科项目;中西医结合病原生物学湖南省重点学科。

[第一作者]彭 泉,男,研究方向:中医药防治代谢性疾病研究。

[通信作者]*成细华,女,教授,硕士研究生导师,E-mail:1357655170@qq.com。

were randomly divided into control group, high fat model group and ZGJTQGF group. High fat model group and ZGJTQGF group were fed with high fat diet for eight weeks, and control group was fed with basic diet. After feeding high-fat diet for four weeks, the Chinese medicine group was treated with Chinese medicine decoction for four weeks, and the other groups were given the same amount of distilled water. Fasting blood glucose was determined by electrochemical method. The content of triglyceride (TG) and free fatty acid (FFA) in liver tissue was determined by the kit. HE staining was used to observe the morphological structure and pathological changes of liver tissue. The mRNA expressions of PGC-1 α , mitochondrial transcription factor A (TFAM), nuclear respiratory factor-1 (NRF1), and DNMT3A in mice liver were tested by qRT-PCR, and the protein expressions of PGC-1 α and DNMT3A were checked by Western blot and immunohistochemical analysis. **Results** High-fat diet induced the formation of nonalcoholic fatty liver in MKR mice. The liver cells had fat droplets of different sizes, which showed fatty changes. Compared with the control group, the blood glucose, liver index, TG and FFA content of liver tissue in the high-fat model group significantly increased ($P<0.01$), the PGC-1 α , NRF1, and protein expression of mRNA and PGC-1 α significantly decreased ($P<0.01$); the mRNA and protein expressions of DNMT3A significantly increased ($P<0.01$). Compared with high-fat model group, ZGJTQGF group had lower blood glucose, liver index, and TG and FFA content in liver tissues of high-fat diet MKR mice ($P<0.01$), up-regulated mRNA expressions of PGC-1 α , NRF1, and TFAM in liver and the PGC-1 α protein expression ($P<0.01$), down-regulated mRNA and protein expressions of DNMT3A ($P<0.01$). **Conclusion** ZGJTQGF alleviates hepatic steatosis by regulating the expression of PGC-1 α and its pathway related genes, which may be mediated by inhibiting the expression of DNMT3A and reducing the correlation of PGC-1 α DNA methylation.

[**Keywords**] Zuogui Jiangtang Qinggan Formula; diabetic fatty liver; peroxisome proliferation-activated receptor- γ -coactivator 1 α ; DNA methyltransferase 3A; Methylation

近年来 2 型糖尿病 (type 2 diabetes, T2DM) 发病率呈递增趋势, 2019 年全球有 4.63 亿糖尿病患者, 中国达 1.3 亿人^[1]。有 75% 的 T2DM 患者并发非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver, NAFLD), 其进一步可向肝炎、肝纤维化及肝癌等肝病发展^[1]。

过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 共激活因子 (peroxisomeproliferative activated receptor- γ activation of auxiliary factor1Alpha, PGC-1 α) 信号通路失调是 2 型糖尿病性脂肪肝发生发展的关键机制^[2], 而 PGC-1 α 信号失常与其 DNA 甲基化异常密切相关, DNA 甲基转移酶抑制剂能恢复 PGC-1 α 信号^[3]。因此, 抑制 DNA 甲基转移酶 (methyltransferase, DNMT) 表达, 能进一步影响 PGC-1 α 及其信号通路, 改善糖尿病性脂肪肝。

糖尿病性脂肪肝具有本虚 (脾肝肾亏虚、气阴两虚) 标实 (毒、瘀蕴积) 的病机特点, 据滋阴益气、清热利湿、化痰消瘀组方的左归降糖清肝方, 能改善糖尿病性脂肪肝高糖脂及肝损伤^[4-5], 然而其机制需深入研究。本研究选用具有遗传变异的转基因 2 型糖尿病 MKR 鼠, 加上高脂饲料喂养, 模拟临床人类糖尿病性脂肪肝发生, 建立糖尿病性脂肪肝动物模型^[6], 经左归降糖清肝方干预治疗后, 检测肝脏 PGC-1 α 、TFAM、NRF1 和 DNMT3A 表达, 从分子水平探讨该复方是否调节 PGC-1 α 及其信号通路相关基因表达, 缓解糖尿病性脂肪肝发生发展。

1 材料与方法

1.1 动物

24 只 MKR 鼠 (采用组织特异过度表达转基因技术产生), 由美国国立卫生研究院提供纯合子 MKR 鼠^[6], 经自然交配后繁殖的后代用于实验研究。小鼠在湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心饲养。伦理审核编号: XMBH-202203030004。饲养笼具、垫料、饮水的制备与消毒均符合 SPF 级实验动物饲养要求。

1.2 药物和试剂

左归降糖清肝方由黄芪 18 g、山药 12 g、熟地黄 12 g、黄连 6 g、丹参 9 g、茵陈 15 g、虎杖 12 g、郁金 9 g、陈皮 9 g 组成, 均购自湖南中医药大学杏林药号。制剂方法如下: 加水先浸泡 30 min, 再按照 W/V=1/8 量加水, 将药材及水加入煎药机中煎煮至沸腾, 15 min 后取滤液, 两次煎药所得滤液混合, 过滤浓缩至生药 2.4 g·mL⁻¹, 4 °C 冰箱贮存备用。

甘油三酯 (triglyceride, TG)、游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号: A110-1-1、A042-1-1); 动物组织总 RNA 提取试剂盒 (批号: B511311-0025)、逆转录试剂盒 (批号: B600020-0200)、Taq PCR 预混液 (批号: B110006)、PCR 引物均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 多克隆一抗: β -肌动蛋白 (β -actin) (京博奥森生物技

术有限公司,批号:bs-8770R);PGC-1 α 、DNMT3A、超敏二步法免疫组织化学检测试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司,批号:bs-7535R,bs-23029R、PV-0023)。

1.3 主要仪器

怡成超越 JPS 型血糖测试仪;日本日立 7150 全自动生化分析仪;BeckmanAllerga 25R 高速冷冻离心机;德国艾本德公司 Realplex2 型荧光定量 PCR 仪;日本尼康公司 DS-U3 型成像系统。

1.4 实验分组

24 只 MKR 鼠,8 周时根据性别、体质量,随机分为对照组、高脂模型组和左归降糖清肝方(中药方)组,每组 8 只。高脂模型组和中药方组小鼠均以高脂饲料(高脂饲料为动物基础饲料加 15%猪油、1%胆固醇)喂养 8 周,无小鼠死亡,形成糖尿病性脂肪肝;造模成功标准:空腹血糖 ≥ 11.1 mmol/L,小鼠肝细胞以弥漫性小泡性脂变为主,脂肪性变肝细胞达到 70%以上,符合 T2DM 合并 NAFLD 的病变特点^[4]。对照组以基础饲料喂养。试验中无小鼠死亡。高脂饲料喂养 4 周后,中药方组以左归降糖清肝方生药 29.64 g \cdot kg⁻¹灌胃^[4-5](中药药物剂量依据临床用药剂量,按人与动物体表面积计算法换算),对照组和高脂模型组以等体积蒸馏水灌胃,0.5 mL/20 g,每天 1 次,连续给药 4 周。隔夜禁食不禁水 12 h,小鼠称重后,取小鼠肝脏,称取肝脏湿重,计算肝指数(肝指数=肝质量/体质量 $\times 100\%$)。

1.5 肝组织形态学观察

取小鼠肝脏最大叶距边缘 5 mm 处肝组织,10%甲醛溶液固定,石蜡包埋,病理切片,HE 染色后光镜观察,拍照。

1.6 肝脏 TG 和 FFA 的测定

取新鲜肝脏组织,用 9 g/L 的生理盐水 4 $^{\circ}$ C 制备 10%的肝匀浆,3 000 r/min 离心 15 min,取上清。严格按照试剂盒要求测定 TG 和 FFA 含量;TG 用单试剂 GPO-PAP 法,酶标仪检测;FFA 用比色法

检测(FFA 与铜离子结合形成脂肪酸的铜盐而溶于氯仿中,其含量与游离脂肪酸含量成正比)。

1.7 qRT-PCR 检测小鼠肝组织 PGC-1 α 、TFAM、NRF1 和 DNMT3A 的 mRNA 表达

取各组小鼠新鲜肝脏组织,用动物组织总 RNA 提取试剂盒抽提取总 RNA,采用紫外分光光度计测定其浓度。取 1 μ g 总 RNA,随后用逆转录试剂盒,以 Oligo(dT)为引物进行逆转录反应。PCR 引物见表 1。取 cDNA,用 Bio-Rad CFX Maestrol 1.0 Real-Time 系统对目的基因进行荧光定量检测。PCR 反应条件:预变性 95 $^{\circ}$ C,30 s,1 个循环。PCR 反应 95 $^{\circ}$ C,15 s;60 $^{\circ}$ C,15 s;72 $^{\circ}$ C,30 s;40 个循环。以 β -actin 作为内参,2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算 mRNA 的相对表达量^[7]。

1.8 Western blot 检测 PGC-1 α 和 DNMT3A 的蛋白表达

将肝组织中加入 RIPA(细胞裂解液)和 PMSF(蛋白酶抑制剂),冰上裂解细胞 30 min 后,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min,收集上清,BCA 法测定蛋白浓度。用 10%~12%SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,蛋白分离后在冷却的含 20%甲醇的转移缓冲液中电泳转移至 PVDF 膜。转移后迅速置于 TBS 液中,随后在室温下含 5%脱脂奶粉的 TBST 中封闭 1 h,洗涤后用相应的一抗按 1:1 000 的比例稀释后 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,脱色摇床洗膜 3 次(15 min/次),用 HRP 耦联的山羊抗鼠,兔 IgG 室温孵育 2 h,洗涤后用 ECL 化学发光试剂盒在凝胶成像分析系统(Bio-Rad 公司)显影,使用软件分析条带灰度值分析^[7]。

1.9 免疫组织化学检测 PGC-1 α 的蛋白表达

免疫组织化学严格按照试剂盒说明书进行操作。不着色为阴性。PBS 取代一抗作阴性对照,已知阳性组织作阳性对照。以细胞内有明显的棕黄色信号颗粒或信号斑为阳性^[9]。

1.10 统计学分析

所有实验数据用 SPSS 26.0 统计软件进行统计分析,结果用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较服从正态分布,

表 1 目的基因和内参基因引物

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	扩增大小/bp
PGC-1 α	CGCTG CTCCT GAGAA TGGAT AT	GTCAT ACTTG CTCTT GGTGG AA	157
TFAM	GAGCA GCTAA CTCCA AGTCA G	GAGCC GAATC ATCCT TTGCC T	181
NRF1	AGCAC GGAGT GACCC AAA	AGGAT GTCCG AGTCA TCA AA GA	147
DNMT3A	GCTCG GACCC CGCAA CT	AGGAA TTGCC GTGGT CTTTG T	164
β -actin	GCTGT CCCTG TATGC CTCT	AGGTC TTTAC GGATG TCAAC G	462

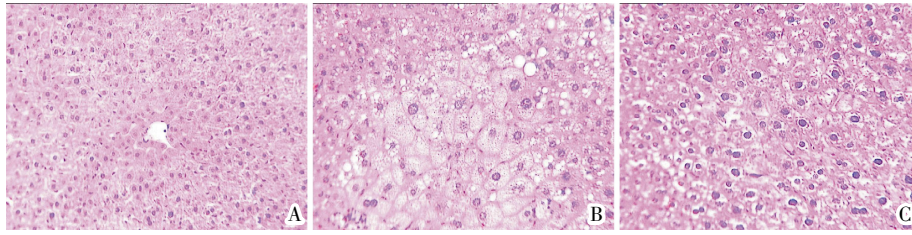


图 1 肝组织病理形态学变化(HE, ×400)

注:A.对照组;B.高脂模型组;C.中药方组。

采用单因素方差分析,组间方差齐时采用 *LSD* 检验,方差不齐,采用 *GamesHowell(A)* 检验;不服从正态分布资料,采用秩和检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 左归降糖清肝方对高脂饮食 MKR 鼠肝脏病理形态的影响

光镜下可见,对照组 MKR 鼠肝组织肝小叶结构正常,肝细胞规则排列,肝细胞大小正常,胞核位于细胞中央;高脂模型组 MKR 鼠肝细胞则以弥漫性小泡性脂变为主;中药方组 MKR 鼠肝组织脂肪性变程度明显改善。详见图 1。

2.2 左归降糖清肝方对小鼠血糖及肝指数的影响

与对照组比较,高脂模型组血糖、体质量、肝质量和肝指数差异均有统计学意义($P<0.01$)。与高脂模型组比较,中药方组小鼠除体质量外,血糖、肝质量和肝指数均有改善,差异均有统计学意义($P<0.01$)。详见表 2。

表 2 左归降糖清肝方对小鼠血糖及肝指数的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	血糖	体质量/g	肝质量/g	肝指数/($\times 10^{-2}$)
对照组	8.32±0.53	21.350±2.14	1.098±0.104	5.143±0.034
高脂模型组	12.21±0.46**	25.21±3.38**	2.231±0.143**	8.849±0.101**
中药方组	8.78±0.49 ^{△△}	24.14±1.82	1.564±0.073 ^{△△}	6.488±0.058 ^{△△}

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与高脂模型组比较,^{△△} $P<0.01$ 。

2.3 左归降糖清肝方对小鼠肝脏 TG 和 FAA 的影响

与对照组比较,高脂模型组和中药方组肝脏 TG 和 FAA 含量差异均有统计学意义($P<0.01$)。与高脂模型组比较,中药方组 TG 和 FAA 含量均有下降,差异均有统计学意义($P<0.01$)。详见表 3。

2.4 左归降糖清肝方对高脂饮食 MKR 鼠肝细胞 PGC-1 α 、TFAM、NRF1 和 DNMT3A mRNA 表达的影响

与对照组比较,高脂模型组 PGC-1 α 、NRF1 和

表 3 左归降糖清肝方对小鼠肝脏 TG 和 FAA 含量的影响($\bar{x}\pm s, n=8, \mu\text{mol/g}$)

组别	TG	FAA
对照组	25.69±2.38	31.64±2.41
高脂模型组	51.12±5.48**	96.46±7.87**
中药方组	35.54±3.21 ^{△△}	56.89±5.21 ^{△△}

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与高脂模型组比较,^{△△} $P<0.01$ 。

TFAM mRNA 表达下调,而 DNMT3A mRNA 表达上调,差异均有统计学意义($P<0.01$)。与高脂模型组比较,中药方组能上调 PGC-1 α 、NRF1 和 TFAM mRNA 表达,下调 DNMT3A mRNA 表达,差异均有统计学意义($P<0.01$)。详见表 4。

表 4 各组小鼠 PGC-1 α 、NRF1、TFAM 和 DNMT3A mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	PGC-1 α	NRF1	TFAM	DNMT3A
对照组	0.812±0.042	1.232±0.093	0.985±0.084	0.385±0.023
高脂模型组	0.498±0.032**	0.627±0.053**	0.513±0.034**	0.744±0.045**
中药方组	0.687±0.041 ^{△△}	0.844±0.035 ^{△△}	0.796±0.053 ^{△△}	0.582±0.028 ^{△△}

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与高脂模型组比较,^{△△} $P<0.01$ 。

2.5 Western blot 检测左归降糖清肝方对高脂饮食 MKR 鼠肝细胞 PGC-1 α 和 DNMT3A 蛋白表达的影响

与对照组比较,高脂模型组和中药方组 PGC-1 α 蛋白表达下调,而 DNMT3A 蛋白表达上调,差异均有统计学意义($P<0.01$);与高脂模型组比较,中药方组能上调高脂饮食 MKR 鼠 PGC-1 α 蛋白表达,下调 DNMT3A 表达,差异均有统计学意义($P<0.01$)。详见图 2。

2.6 免疫组织化学检测左归降糖清肝方对高脂饮食 MKR 鼠肝细胞 PGC-1 α 蛋白表达的影响

免疫组织化学显示,PGC-1 α 蛋白分布在胞浆,染色后成棕褐色,在 MKR 鼠肝细胞中 PGC-1 α 含量高,高脂饮食 MKR 鼠肝细胞中明显减少,左归降糖清肝方能增加 PGC-1 α 蛋白表达。详见图 3。

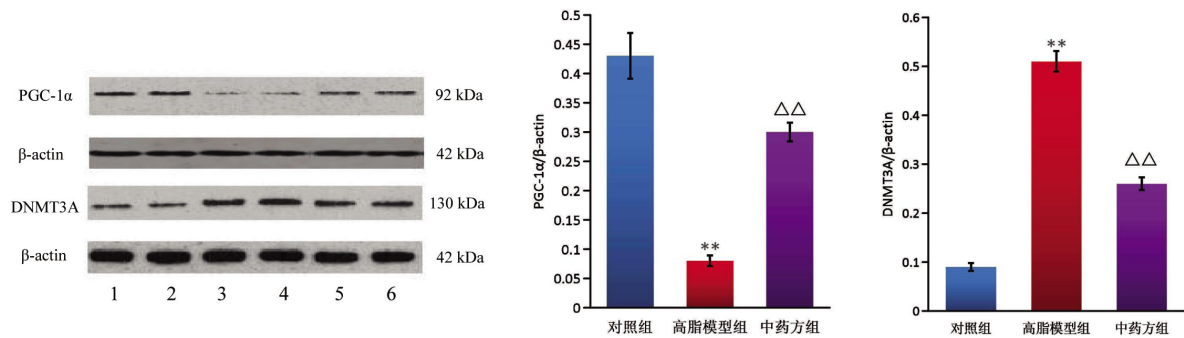


图2 左归降糖清肝方对高脂饮食 MKR 鼠肝细胞 PGC-1 α 和 DNMT3A 蛋白表达的影响($n=3$)

注:1—2.对照组;3—4.高脂模型组;5—6.中药方组;与对照组比较,** $P<0.01$;与高脂模型组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

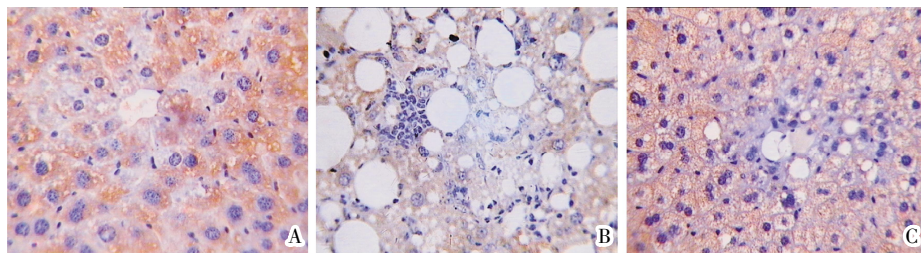


图3 左归降糖清肝方对高脂饮食 MKR 鼠肝细胞 PGC-1 α 蛋白表达的影响(免疫组织化学, $\times 400$)

注:A.对照组;B.高脂模型组;C.中药方组。

3 讨论

TM2D 中 NAFLD 的发生率持续增加,正成为主要的健康负担,但目前缺乏标准的治疗方案^[8-9]。中医药在防治糖尿病性脂肪肝中凸显优势^[4-5,10-11]。糖尿病性脂肪肝,据其临床特点,中医学将其归属于“消渴”“胁痛”“积聚”等范畴,其主要病因为饮食不节、起居无常、不知持满、不时御神、情志失调、久病体虚。据滋阴益气、清热利湿、化痰消瘀组方的左归降糖清肝方,能减轻高脂饮食加剧的 MKR 鼠的胰岛抵抗,降低血糖、ALT、AST 和血脂水平^[4-5,11]。

在骨骼肌、肝脏、褐色脂肪组织和心脏的脂质代谢中,PGC-1 α 促进 NRF1 表达,NRF1 随后上调 TFAM,进而刺激线粒体 DNA(mtDNA)转录和复制,促进线粒体生物合成,从而调控氧化磷酸化相关酶的表达来调节脂质代谢^[12-13]。此外 PGC-1 α 具有直接调节脂质代谢转录因子[如过氧化物酶体增殖剂激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α)、固醇调节元件结合蛋白-1c(sterol regulatory element binding protein-1c, SREBP-1c)等的效应,促进了线粒体脂肪酸 β 氧化,抑制脂肪酸合成,参与脂质代谢^[14-15]。肝脏、骨骼肌等器官 PGC-1 α 表达异常,线粒体功能紊乱和脂肪酸 β 氧化不完全是 2 型糖尿病性脂肪肝发生的主要机制^[3]。本实

验中,高脂饮食 MKR 鼠肝脏 PGC-1 α 、NRF1 和 TFAM 的 mRNA 表达显著下降($P<0.01$),PGC-1 α 蛋白表达也显著下降($P<0.01$),与本研究团队前期研究高脂饮食 MKR 鼠 PGC-1 α 调控的 SREBP-1c 表达水平显著增加的结果是一致的^[16],表明高脂饮食 MKR 鼠肝脏中 PGC-1 α 下调,出现线粒体功能低下,脂肪酸 β -氧化下降,脂肪酸合成增加,脂质在肝脏内不断积累成脂肪肝;左归降糖清肝方能上调糖尿病性脂肪肝小鼠 PGC-1 α 表达,进一步调节 PGC-1 α 信号通路,降低肝脏脂质堆积。

DNA 甲基化与糖尿病及其并发症的发生密切相关^[3,17-18],缺乏胆碱和叶酸饮食的 A/J 和 WSB/EJ 小鼠,肝脏 DNMT1 和 DNMT3A 上调,高甲基化改变与肝脂质堆积及损伤显著相关^[19];在神经细胞中发现,FFAs 诱导了 PGC-1 α 启动子高甲基化,导致 PGC-1 α 表达减少^[20]。本实验中,高脂饮食 MKR 鼠肝脏 DNMT3A 表达显著增加,与 PGC-1 α 表达呈负相关。本研究团队推测,可能 PGC-1 α 存在 DNA 甲基化异常,抑制了 PGC-1 α 表达。左归降糖清肝方干预治疗后,高脂饮食 MKR 鼠肝脏 DNMT3A mRNA 和蛋白表达均显著降低,PGC-1 α 则显著上升,说明该复方可能通过下调 DNMT3A 表达,减少 PGC-1 α 甲基化,促进 PGC-1 α 表达,减少肝脏脂质堆积。

本实验结果初步证明,左归降糖清肝方可调节

PGC-1 α 及其信号通路基因表达来减缓脂肪肝的发生,从分子水平证实了该复方能缓解糖尿病性脂肪肝的发展,对肝脏具有保护作用。同时发现,该复方可以抑制高脂饮食 MKR 鼠肝脏 DNMT3A 基因表达,推测该复方通过下调 DNMT3A 表达,减少 PGC-1 α DNA 甲基化,从而促进 PGC-1 α 表达,进一步调节肝脏脂肪代谢相关基因表达,减少肝脏脂质堆积。本研究团队后期将进一步通过体外实验,设计甲基化酶激活剂组和抑制剂组等,检测 PGC-1 α 启动子甲基化水平及 PGC-1 α 下游通路,深入研究左归降糖清肝方基于 DNA 甲基化修饰调控 PGC-1 α 通路防治糖尿病性脂肪肝的作用机制。

参考文献

- [1] KHNEIZER G, RIZVI S, GAWRIEH S. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2021, 1307: 417-440.
- [2] SAKAI M. Exploring the signal-dependent transcriptional regulation involved in the liver pathology of type 2 diabetes[J]. *Diabetology International*, 2023, 14(1): 15-20.
- [3] WU J B, GULATI S, TEAGUE A M, et al. AMPK regulates DNA methylation of PGC-1 α and myogenic differentiation in human mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells and Development*, 2023, 32(5/6): 131-139.
- [4] 吴勇军, 成细华, 喻 嵘, 等. 左归降糖清脂方对 2 型糖尿病转基因 MKR 鼠脂肪肝发生的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(5): 140-143.
- [5] 成细华, 程莉娟, 张 琴, 等. 滋阴益气活血解毒法对糖尿病合并脂肪肝小鼠 SREBP-1c 表达的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2013, 36(8): 534-537, 577.
- [6] 成细华, 喻 嵘, 明 霞, 等. 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝动物模型的建立[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2011, 20(1): 77-80.
- [7] 王 娟, 孙 峰, 杨晶晶, 等. DNMT3A 调控 Drp1 对肝星状细胞活化增殖和迁移能力的影响[J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(10): 1542-1547.
- [8] LIU N, WANG G, LIU C, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and complications in type 1 and type 2 diabetes: A Mendelian randomization study[J]. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2023, 25(2): 365-376.
- [9] MINGRONE G, CASTAGNETO-GISSEY L, BORNSTEIN S R. New horizons: Emerging antidiabetic medications[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2022, 107(12): e4333-e4340.
- [10] 李 勤, 谢冰昕, 靳 敏, 等. 从虚、郁、痰、瘀论治 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝[J]. *陕西中医*, 2020, 41(5): 653-655.
- [11] 勾阳阳, 杨娇娇, 向 琴, 等. 左归降糖清脂方对 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病 MKR 鼠 Visfatin 信号分子的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(4): 585-590.
- [12] ZHAO X T, AMEVOR F K, CUI Z F, et al. Steatosis in metabolic diseases: A focus on lipolysis and lipophagy[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023, 160: 114311.
- [13] YANG X, LIU Q, LI Y, et al. The diabetes medication canagliflozin promotes mitochondrial remodelling of adipocyte via the AMPK-Sirt1-PGC-1 α signalling pathway[J]. *Adipocyte*, 2020, 9(1): 484-494.
- [14] RAFFAELE M, BELLNER L, SINGH S P, et al. Epoxyeicosatrienoic intervention improves NAFLD in leptin receptor deficient mice by an increase in PGC1 α -HO-1-PGC1 α -mitochondrial signaling[J]. *Experimental Cell Research*, 2019, 380(2): 180-187.
- [15] KRISTENSEN C M, DETHLEFSEN M M, TØNDERING A S, et al. PGC-1 α in hepatic UPR during high-fat high-fructose diet and exercise training in mice[J]. *Physiological Reports*, 2018, 6(15): e13819.
- [16] 程莉娟, 成细华, 喻 嵘, 等. 内质网应激相关基因在 2 型糖尿病合并脂肪肝小鼠肝脏中的表达变化[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(2): 415-418.
- [17] ELDOR R, NORTON L, FOUREAUDOT M, et al. Increased lipid availability for three days reduces whole body glucose uptake, impairs muscle mitochondrial function and initiates opposing effects on PGC-1 α promoter methylation in healthy subjects[J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0188208.
- [18] 王灵叶, 杨 晗, 葛胜祥, 等. DNA 甲基化在 2 型糖尿病治疗中的研究进展[J]. *生命科学*, 2023, 35(7): 925-934.
- [19] TRYNDYAK V P, HAN T, FUSCOE J C, et al. Status of hepatic DNA methylome predetermines and modulates the severity of non-alcoholic fatty liver injury in mice[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 298.
- [20] SU X M, CHU Y P, KORDOWER J H, et al. PGC-1 α promoter methylation in Parkinson's disease[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134087.

(本文编辑 苏 维)