

利拉鲁肽通过SIRT1/AMPK通路改善小鼠肝脏脂质变性的机制研究

路瑶¹, 焦谊², 杨晶晶¹, 马雪莲¹ (1. 新疆医科大学第二附属医院 内分泌科, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆医科大学 基础医学院 生物化学与分子生物学教研室, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要: **目的** 探讨利拉鲁肽通过沉默信息调节因子1 (silent information regulator 1, SIRT1)/腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 通路改善小鼠肝脏脂质变性的机制。**方法** 将24只健康雄性6周龄C57BL/6J小鼠随机分为对照组、模型组、模型+利拉鲁肽组、模型+ SIRT1组、模型+ SIRT1 + 利拉鲁肽组、模型+ SIRT1-NC组, 每组4只。对照组普通饲料饲养, 予以等容积生理盐水皮下注射, 模型组高脂饲养12周建立代谢相关脂肪性肝病 (metabolic dysfunction-associated fatty liver disease, MAFLD) 模型, 之后3周尾静脉注射SIRT1干扰慢病毒及利拉鲁肽。检测各组小鼠血清甘油三酯和丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 水平, 采用HE染色和油红O染色观察肝组织病理, 采用实时荧光定量RT-PCR检测AMPK、SIRT1、肝激酶B1 (liver kinase B1, LKB1) 和去乙酰化固醇调节元件结合蛋白 (sterol regulatory element binding protein-1c, SREBP-1c) 基因表达水平, 采用Western blot检测蛋白表达水平。**结果** 利拉鲁肽可降低高脂喂养的C57BL/6J小鼠体质量、肝湿重、血清甘油三酯及ALT水平, 油红O染色可见肝细胞脂滴减少。与模型组相比, 模型+利拉鲁肽组SIRT1 (0.212 ± 0.110 比 0.076 ± 0.010)、AMPK (0.518 ± 0.051 比 0.248 ± 0.023)、LKB1 (1.023 ± 0.039 比 0.576 ± 0.029) 基因表达量和AMPK (0.212 ± 0.026 比 0.100 ± 0.006)、LKB1 (0.413 ± 0.016 比 0.221 ± 0.015) 蛋白表达水平均上调, 而SREBP-1c基因 (0.727 ± 0.249 比 9.007 ± 1.530) 和蛋白 (0.187 ± 0.008 比 0.824 ± 0.114) 表达水平均下调 (P 均 < 0.05)。与模型组相比, 模型+ SIRT1组SIRT1 (0.029 ± 0.003 比 0.076 ± 0.010)、AMPK (0.105 ± 0.013 比 0.248 ± 0.023)、LKB1 (0.333 ± 0.106 比 0.576 ± 0.029) 基因表达量均下调 (P 均 < 0.05)。与模型+ SIRT1组相比, 模型+ SIRT1 + 利拉鲁肽组LKB1 (0.945 ± 0.110 比 0.333 ± 0.106 ; 0.380 ± 0.004 比 0.145 ± 0.014)、AMPK (0.319 ± 0.051 比 0.105 ± 0.013 ; 0.181 ± 0.039 比 0.051 ± 0.012) 基因表达量和蛋白表达量均上调, 而SREBP-1c基因表达量 (4.239 ± 0.554 比 12.740 ± 0.976) 下调 (P 均 < 0.05)。**结论** 利拉鲁肽改善C57BL/6J小鼠肝脏脂毒性可能通过直接上调SIRT1/AMPK通路信号分子基因和蛋白表达水平, 或间接激活LKB1并增强AMPK基因和蛋白表达、拮抗SREBP-1c基因和蛋白表达, 从而降低脂质合成相关分子水平, 而干扰SIRT1表达削弱了利拉鲁肽上调SIRT1/AMPK通路改善肝脏脂肪变性的作用。

关键词: 利拉鲁肽; 沉默调节因子1; 腺苷酸活化蛋白激酶; 小鼠; 代谢相关脂肪性肝病

Mechanism of liraglutide ameliorates fatty liver disease by regulation SIRT1/AMPK pathway in mice

Lu Yao¹, Jiao Yi², Yang Jingjing¹, Ma Xuelian¹ (1. Department of Endocrinology and Metabolism, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Xinjiang Urumqi 830000, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Xinjiang Urumqi 830000, China)

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2024.03.006

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2020D01C183); 省部共建中亚高发病因与防治国家重点实验室开放课题项目 (SKL-HIDCA-2022-DX6); 新疆维吾尔自治区创新团队基金资助项目 (2022D14009)

通信作者: 焦谊 Email: jymiranda@xjmu.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the mechanism of liraglutide ameliorates hepatic steatosis by regulation silent information regulator 1 (SIRT1) / adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) pathway in mice. **Methods** Twenty-four healthy 6-week-old C57BL/6J male mice were randomly divided into control group, model group, model + liraglutide group, model + SIRT1 group, model + SIRT1 + liraglutide group and model + SIRT1-NC group, 4 mice in each group. Mice in control group were fed with regular feed and received subcutaneous injection of equal volume physiological saline. Mice in model group were fed with high-fat diet for 12 weeks to establish a metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD) model, followed by tail vein injection of SIRT1 interference lentivirus and liraglutide for 3 weeks. The levels of serum triglycerides and alanine aminotransferase (ALT) of mice in each group were detected. HE staining and oil red O staining were used to observe liver tissue pathology. Real-time fluorescence quantitative RT-PCR was used to detect the gene expression levels of AMPK, SIRT1, liver kinase B1 (LKB1) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). Western blot was used to detect the protein expression levels. **Results** Liraglutide could reduce body mass, liver wet weight, serum triglycerides and ALT level of C57BL/6J mice with high-fat diet, and oil red O staining showed a decrease in hepatic lipid droplets. Compared with model group, SIRT1 (0.212 ± 0.110 vs. 0.076 ± 0.010), AMPK (0.518 ± 0.051 vs. 0.248 ± 0.023), LKB1 (1.023 ± 0.039 vs. 0.576 ± 0.029) gene expression levels and AMPK (0.212 ± 0.026 vs. 0.100 ± 0.006), LKB1 (0.413 ± 0.016 vs. 0.221 ± 0.015) protein expression levels were upregulated of mice in the model + liraglutide group, while SREBP-1c gene (0.727 ± 0.249 vs. 9.007 ± 1.530) and protein (0.187 ± 0.008 vs. 0.824 ± 0.114) expression levels were downregulated (all $P < 0.05$). Compared with model group, gene expression levels of SIRT1 (0.029 ± 0.003 vs. 0.076 ± 0.010), AMPK (0.105 ± 0.013 vs. 0.248 ± 0.023) and LKB1 (0.333 ± 0.106 vs. 0.576 ± 0.029) were all downregulated in the model + SIRT1 group (all $P < 0.05$). Compared with model + SIRT1 group, LKB1 (0.945 ± 0.110 vs. 0.333 ± 0.106 ; 0.380 ± 0.004 vs. 0.145 ± 0.014) and AMPK (0.319 ± 0.051 vs. 0.105 ± 0.013 ; 0.181 ± 0.039 vs. 0.051 ± 0.012) gene expression and protein expression in model + SIRT1 + liraglutide group were upregulated, while SREBP-1c gene expression was downregulated (4.239 ± 0.554 vs. 12.740 ± 0.976) (all $P < 0.05$). **Conclusions** Liraglutide may improve liver lipid toxicity in C57BL/6J mice by directly upregulating the gene and protein expression levels of SIRT1/AMPK signaling molecules, or indirectly activating LKB1 and enhancing AMPK gene and protein expression, antagonizing SREBP-1c gene and protein expression, thereby reducing lipid synthesis related molecular levels. Interference with SIRT1 expression weakens the effect of liraglutide upregulating the SIRT1/AMPK pathway on improving liver steatosis.

Keywords: Liraglutide; Silent information regulator 1; Adenosine monophosphate-activated protein kinase; Mice; Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease

以肝实质细胞脂肪蓄积和脂肪变性为特征的代谢相关脂肪性肝病 (metabolic dysfunction-associated fatty liver disease, MAFLD) 被认为是代谢综合征的肝脏表现^[1]。全球成年人发病率达15%~30%, 且超过90%的严重肥胖症患者和50%的2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 患者伴有 MAFLD^[2,3]。MAFLD的患病率较高且目前尚无有效治疗手段。沉默信息调节因子1 (silent information regulator 1, SIRT1) 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 依

赖的去乙酰化酶, 在维持机体能量平衡和肝脏脂质稳态中发挥重要作用^[4]。既往研究表明, 一方面SIRT1通过直接去乙酰化肝激酶B1 (liver kinase B1, LKB1) 激活并增强下游分子腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 磷酸化表达, 从而调节细胞内能量代谢平衡^[5]; 另一方面, SIRT1可通过直接去乙酰化固醇调节元件结合蛋白 (sterol regulatory element binding protein-1c, SREBP-1c) 显著抑制 SREBP-1c转录活性和下游脂质合成关键酶基因表

达^[6]。特异性敲除SIRT1的高脂诱导小鼠对比野生型小鼠出现更加严重的肝脏脂肪变性和炎症^[7]。而小鼠肝脏过表达SIRT1可改善脂质代谢基因表达及肝脏胰岛素抵抗^[8]。AMPK是在肝脏、骨骼肌和脂肪组织中表达的丝苏氨酸/苏氨酸激酶,是糖脂代谢的关键调节剂。细胞内腺苷酸水平及LKB1可调控AMPK活性,磷酸化SREBP-1c结合蛋白抑制其核转位,起到减缓肝脂肪变性的作用^[9]。降糖药物利拉鲁肽是一种胰高血糖素样肽-1 (glucagon like peptide-1, GLP-1) 受体激动剂, GLP-1能改善胰岛素抵抗及肝脂肪变性,还可延缓胃排空、抑制饱食中枢^[10]。由于利拉鲁肽在改善代谢性肝病方面的作用越来越受到关注,而这种作用独立于它的降糖作用之外。因此,本研究通过建立小鼠MAFLD模型,以阐明SIRT1/AMPK通路介导利拉鲁肽改善高脂诱导C57BL/6J小鼠肝脏脂质变性的作用机制,为临床治疗MAFLD靶点和合理用药提供新的理论依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物及试剂 5~6周龄雄性C57BL/6J小鼠24只,购自珠海百试通生物科技有限公司,许可证号(SYXK粤2022-0292),体质量18~20 g,清洁级。动物中心使用干燥玉米碎末作为小鼠笼具的铺垫物,4只/笼,小鼠自由摄食和取水,室温(22±3)℃,饲养环境温度(22±2)℃,湿度40%~60%,每天8 h光照。利拉鲁肽购自丹麦诺和诺德公司。

1.2 动物模型分组与观察 将小鼠随机为对照组、模型组、模型+利拉鲁肽组、模型+ SIRT1组、模型+ SIRT1+利拉鲁肽组、模型+ SIRT1-NC组,每组4只。对照组普通饲料(5%脂肪含量)饲养,予以等容积生理盐水皮下注射,模型组高脂(5.24 kJ/g, 60%脂肪)饲养12周建立MAFLD模型,之后3周尾静脉注射SIRT1干扰空载慢病毒20 μl/鼠,10⁹ TU/ml,(擎科生物公司合成的载体PDS278-BsmBI,基因序列为5'-GCCACCAACACCTCTTCATAT-3',干扰效率相当于68.62%),以及利拉鲁肽注射液15 μg/kg, 1次/d。造模及药物干预前后每3 d观察各组小鼠的精神状态、活动量、饮食水量、尿便、体重及摄食情况,按照评估良好、一般、差各赋3分、2分、1分。

1.3 标本处理及生物化学指标测定 第16周末,小鼠禁食12 h,用异氟烷麻醉后经心脏采血。分离血清,-4℃冰箱中保存待用。采血后迅速取出肝脏,液氮保存。采用全自动生化仪检测血清甘油三酯和丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)。

1.4 肝脏组织形态学观察

1.4.1 HE染色 样本于10%甲醛浸泡7 d,石蜡包埋、

切片,厚度6 μm;组织切片在40℃温水浸泡;反复二甲苯中浸泡10 min 2次;浸泡无水乙醇5 min,置于95%、85%、70%乙醇中各浸泡5 min; PBS溶液洗涤3次,加苏木素染色液100 μl,充分染色10 min,蒸馏水冲洗,1%盐酸乙醇进行分化,双蒸水冲洗,加入促蓝液,泛蓝后清水清洗,再用双蒸水冲洗;加入伊红染色液3 min,染色完毕后,分别用80%乙醇脱水5 s, 95%乙醇脱水2 min,无水乙醇脱水2 min梯度脱水;二甲苯浸泡4 min,中性树胶封片。采用400倍视野的正置显微镜拍片。

1.4.2 油红O染色 新鲜肝脏置于液氮保存,对固定的组织冰冻切片,10%福尔马林固定10 min;蒸馏水冲洗;60%异丙醇浸洗20~30 s;改良油红O染色液10~15 min;60%异丙醇分化至间质清晰;再用苏木素复染1~2 min;1%的盐酸溶液分化;蒸馏水冲洗后甘油明胶封片。使用Image Pro plus 6软件统计脂滴数量。

1.5 实时荧光定量RT-PCR检测AMPK、SIRT1、LKB1和SREBP1c基因水平 ①RNA提取:用液氮研磨组织样品,每50~80 mg组织加入1 ml Trizol,匀浆,每50~100 mg组织用1 ml Trizol试剂对组织进行裂解,样品体积不应超过Trizol体积的10%;加入200 ml氯仿混匀后室温放置2~5 min,离心(12000 r/min,离心半径24 cm, 4℃, 15 min),取上清于另一个EP管中,加入等体积异丙醇混匀,-20℃放置30 min以上;离心(12000 r/min,离心半径24 cm, 4℃, 15 min),倒掉上清液,加入75%乙醇,使沉淀漂浮起来洗涤;离心(12000 r/min, 24 cm, 4℃, 15 min),倒掉上清液;空管离心,吸尽液体,室温晾3 min;用无酶水溶解RNA沉淀,测定浓度。②逆转录cDNA:反应体系为总RNA 0.1 ng~5 μg,引物(0.1 μg/μl) 0.5 μl,反应缓冲液5 μl, RT/RI酶剂0.5 μl, gDNA去除剂0.5 μl,添加无酶水至总体积为10 μl。轻轻混匀, 25℃ 10 min, 42℃ 15 min, 85℃ 5 s取出,结束逆转录实验;将逆转录得到的cDNA用作模板进行荧光定量PCR。③荧光定量PCR:引物序列见表1, PCR反应体系总体积10 μl, RT-PCR Easy TM-SYBR Green I试剂5 μl, 5-羧基-X-罗丹明1 μl, cDNA 2 μl, 上游引物和下游引物各0.4 μl, ddH₂O 1.2 μl。PCR反应条件:预变性94℃ 3 min, 变性94℃ 5 s, 退火60℃ 20 s。qRT-PCR检测肝脏组织中AMPK、SIRT1、LKB1和SREBP1c扩增目标片段的荧光物质并计算基因表达量,以β-action作内参。

1.6 Western blot检测 用RIPA裂解法提取细胞总蛋白,采用BCA进行蛋白定量。调整蛋白浓度,根据目的蛋白AMPK、SIRT1、LKB1和SREBP-1c的分子量配胶,

上样，电泳条件为70 V，30 min，再110 V，150 min。采用湿转法恒流定时（200 mA，90 min）转膜，封闭，洗膜，加入一抗、二抗孵育，ECL加膜上，曝光成像，应用Image J软件对条带的灰度值进行定量分析。

1.7 统计学处理 采用SPSS 19.0软件进行统计学分析，采用Graph Pad Prism 6.0软件对数据进行统计作图。小鼠一般状况评分、ALT、甘油三酯、基因和蛋白相对表达量等均为正态分布的计量资料，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组内两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况评分 对照组小鼠一般状况良好，毛发有光泽、反应灵敏、活动敏捷，饮水和二便正常，造模后摄食较前明显增加，无死亡。模型组小鼠精神略沉郁、活动量减少、进食量下降、尿便量增加，逐渐出现毛色枯黄、蓬松。模型+利拉鲁肽组小鼠精神状态良好，活动敏捷，摄食正常，饮水量增多，尿便量增多。模型+ SIRT1组和模型+ SIRT1-NC组小鼠精神萎靡、嗜睡、活动差、食量有下降、尿便量减少，且逐渐出现毛色枯黄。模型+ SIRT1+利拉鲁肽组小鼠精神良好，活动敏捷，摄食、饮水和二便正常。各组小鼠一般情况评分无显著差异（ P 均 > 0.05 ）。见表2。

2.2 小鼠体质量 每3周记录各组小鼠体质量，造模后各组小鼠体质量较对照组呈上升趋势，9周显著上升（ $P < 0.0001$ ）；13周后开始药物干预，16周末时，

与对照组相比，模型组、模型+ SIRT1组、模型+ SIRT1 + 利拉鲁肽组和模型+ SIRT1-NC组小鼠体质量显著增加（ P 均 < 0.0001 ），与模型组相比，模型+利拉鲁肽组小鼠体质量显著降低（ $P < 0.0001$ ）；与模型+ SIRT1组相比，模型+ SIRT1 + 利拉鲁肽组小鼠体质量降低（ $P = 0.0225$ ）。由此可见，利拉鲁肽可降低高脂诱导的C57BL/6J小鼠上升的体质量，干扰SIRT1表达削弱了利拉鲁肽的减重作用。见图1。

2.3 小鼠肝湿重 对照组、模型组、模型+利拉鲁肽组、模型+ SIRT1组、模型+ SIRT1 + 利拉鲁肽组、模型+ SIRT1-NC组小鼠肝湿重分别为（ 0.56 ± 0.13 ）g、（ 0.97 ± 0.25 ）g、（ 0.64 ± 0.15 ）g、（ 1.36 ± 0.26 ）g、（ 0.84 ± 0.24 ）g、（ 0.80 ± 0.22 ）g，差异有统计学意义（ $F = 10.86$ ， $P < 0.001$ ）；其中模型组和模型+ SIRT1组显著高于对照组，模型+ SIRT1组显著高于模型组，模型+ SIRT1 + 利拉鲁肽组显著低于模型+ SIRT1组（ P 均 < 0.05 ），见图2。由此可见，利拉鲁肽可降低高脂诱导并SIRT1干扰的C57BL/6J小鼠肝湿重。

2.4 生物化学指标 对照组、模型组、模型+利拉鲁肽组、模型+ SIRT1组、模型+ SIRT1 + 利拉鲁肽组、模型+ SIRT1-NC组小鼠甘油三酯水平分别为（ 29.5 ± 1.11 ）mmol/L、（ 46.37 ± 4.18 ）mmol/L、（ 33.53 ± 0.84 ）mmol/L、（ 41.15 ± 4.12 ）mmol/L、（ 35.88 ± 3.26 ）mmol/L、（ 45.06 ± 3.05 ）mmol/L，

表1 荧光定量 PCR 引物序列

基因（小鼠）	序列（5'-3'）
β-actin	上游引物：CTCCATCCTGGCCTCGCTGT
	下游引物：GCTGTCACCTTCACCGTTCC
SIRT1	上游引物：TGATTGGCACCGATCCTCG
	下游引物：CCACAGCGTCATATCATCCAG
AMPK	上游引物：AATTCGCGCTACCTCTGCACT
	下游引物：GGAGGAAGAAGTCTTCGG
SREBP-1C	上游引物：ATGGACAAGTCTCCACCAC
	下游引物：AGCGGAGTCATCCCTGACA
LKB1	上游引物：TGTCGGTGGGTATGGACAC
	下游引物：CCTTGCCGTAAGAGCCTTCC

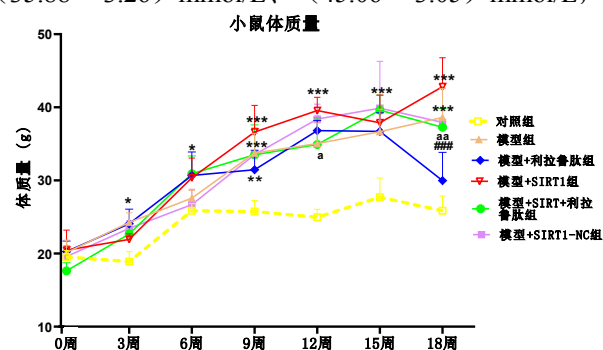


图1 各组小鼠体质量

注：与对照组相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ；与模型组相比，#### $P < 0.001$ ；与模型+ SIRT1组相比，^a $P < 0.05$ ，^{ab} $P < 0.01$ 。

表2 小鼠一般情况评分（ $\bar{x} \pm s$ ，分）

分组	精神状态	活动量	饮水量	进食量
对照组	2.56 ± 0.19	2.56 ± 0.19	2.67 ± 0.00	2.78 ± 0.19
模型组	2.11 ± 0.84	2.11 ± 0.84	1.78 ± 0.77	2.11 ± 0.51
模型+利拉鲁肽组	2.22 ± 0.69	2.22 ± 0.69	1.89 ± 0.69	2.00 ± 0.33
模型+ SIRT1组	1.89 ± 0.96	1.89 ± 0.96	2.00 ± 0.58	1.67 ± 0.58
模型+ SIRT1+利拉鲁肽组	2.00 ± 0.88	2.00 ± 0.88	1.89 ± 0.69	1.89 ± 0.69
模型+ SIRT1-NC组	2.00 ± 0.88	2.00 ± 0.88	1.667 ± 0.58	1.89 ± 0.69
<i>F</i> 值	0.274	0.274	1.017	1.552
<i>P</i> 值	0.919	0.919	0.450	0.246

差异有统计学意义 ($F = 14.36$, $P < 0.0001$), 其中模型组、模型+ SIRT1组、模型+ SIRT1-NC组显著高于对照组, 模型+利拉鲁肽组、模型+ SIRT1 +利拉鲁肽组显著低于模型组, 模型+ SIRT1 +利拉鲁肽组显著低于模型+ SIRT1组 (P 均 < 0.05)。各组小鼠ALT水平分别为 (4380 ± 390) U/L、(5938 ± 630) U/L、(5026 ± 540) U/L、(6429 ± 280) U/L、(5106 ± 450) U/L、(6132 ± 260) U/L, 差异有统计学意义 ($F = 9.36$, $P < 0.001$), 其中模型组、模型+ SIRT1组显著高于对照组, 模型+ SIRT1 +利拉鲁肽组显著低于模型+ SIRT1组 (P 均 < 0.05), 见图3。

2.5 肝组织HE染色 对照组小鼠肝小叶规则且结构较完整, 细胞有序排列, 无炎性细胞浸润。与对照组相比, 其他组出现大小不一脂肪空泡, 脂质明显蓄积在细胞核周围, 其中模型+ SIRT1组病变较严重; 与模型组相比, 模型+利拉鲁肽组脂肪空泡明显变小且数量减少, 模型+ SIRT1 +利拉鲁肽组病理改善较明显。与模型+ SIRT1组相比, 模型+ SIRT1 +利拉鲁肽组脂质蓄积明显减少, 脂肪空泡减少。见图4。

2.6 肝组织油红O染色 对照组可见零星细小脂滴, 小鼠肝脏内均有大量大小不等脂滴形成, 脂肪沉积明显, 模型+利拉鲁肽组小鼠肝脏有少量脂滴, 见

图5。对照组、模型组、模型+利拉鲁肽组、模型+ SIRT1组、模型+ SIRT1 +利拉鲁肽组、模型+ SIRT1-NC组脂滴数分别为 (1514 ± 396.3) 个、(4478 ± 425.8) 个、(2287 ± 515.6) 个、(5573 ± 656.0) 个、(3253 ± 869.7) 个、(3891 ± 387.3) 个, 差异有统计学意义 ($F = 40.37$, $P < 0.0001$), 其中模型组、模型+利拉鲁肽组、模型+ SIRT1组、模型+ SIRT1 +利拉鲁肽组显著多于对照组, 模型+利拉鲁肽组和模型+ SIRT1 +利拉鲁肽组显著少于模型组, 模型+ SIRT1 +利拉鲁肽组显著少于模型+ SIRT1组 (P 均 < 0.05), 见图6。

2.7 qRT-PCR检测SIRT1、AMPK、SREBP-1c、LKB1基因相对表达量 对照组、模型组、模型+利拉鲁肽组、模型+ SIRT1组、模型+ SIRT1 +利拉鲁肽组、模型+ SIRT1-NC组, SIRT1 mRNA相对表达量分别为 1.002 ± 0.001 、 0.076 ± 0.010 、 0.212 ± 0.110 、 0.029 ± 0.003 、 0.101 ± 0.036 、 0.058 ± 0.012 , 差异有统计学意义 ($F = 185.6$, $P < 0.001$); AMPK mRNA相对表达量分别为 1.000 ± 0.001 、 0.248 ± 0.023 、 0.518 ± 0.051 、 0.105 ± 0.013 、 0.319 ± 0.051 、 0.297 ± 0.002 , 差异有统计学意义 ($F = 305.9$, $P < 0.001$), SREBP-1c mRNA相对表达量分别为 1.020 ± 0.020 、 9.007 ± 1.530 、 0.727 ± 0.249 、 12.740 ± 0.976 、 4.239 ± 0.554 、 7.767 ± 2.055 , 差异有统计学意义 ($F = 51.71$, $P < 0.001$), LKB1 mRNA相对表达量分别为 1.005 ± 0.006 、 0.576 ± 0.029 、 1.023 ± 0.039 、 0.333 ± 0.106 、 0.945 ± 0.110 、 0.548 ± 0.125 , 差异有统计学意义 ($F = 36.79$, $P < 0.001$)。与对照组相比, SIRT1和AMPK mRNA相对表达量在其他各组均显著下调, SREBP-1c mRNA相对表达量在模型组、模型+ SIRT1组、模型+ SIRT1 +利拉鲁肽组和模型+ SIRT1-NC组均显著上调, LKB1 mRNA相对表达量在模型组和模型+ SIRT1组均显著下调 (P 均 < 0.05); 与模型组相比, SIRT1、AMPK和LKB1

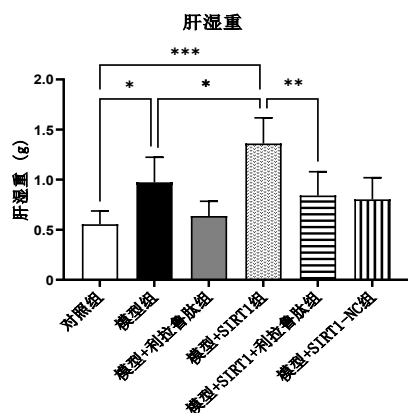


图2 各组小鼠肝湿重

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

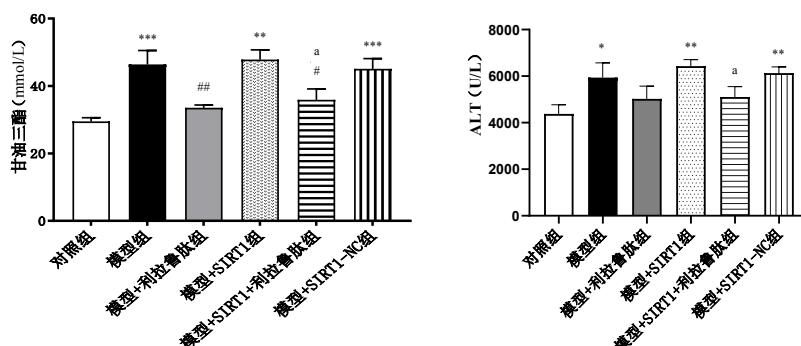


图3 各组小鼠甘油三酯和ALT水平

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型+ SIRT1组相比, # $P < 0.05$ 。

mRNA相对表达量在模型+利拉鲁肽组均显著上调，而SREBP-1c mRNA相对表达量显著下调（ P 均 < 0.05 ）；与模型+ SIRT1组相比，模型+ SIRT1 + 利拉鲁肽组SIRT1 mRNA相对表达量无显著变化（ $P > 0.05$ ），而LKB1和AMPK mRNA相对表达量显著上调，SREBP-1c mRNA相对表达量显著下调（ P 均 < 0.05 ）。见图7。

2.8 Western blot检测蛋白表达量 对照组、模型组、模型+利拉鲁肽组、模型+ SIRT1组、模型+ SIRT1+利拉鲁肽组、模型+SIRT1-NC小鼠SIRT1蛋白表达量分别为 0.274 ± 0.028 、 0.100 ± 0.006 、 0.121 ± 0.018 、 0.039 ± 0.008 、 0.108 ± 0.014 、 0.050 ± 0.015 ，差异有统计学意义（ $F = 26.71$ ， $P < 0.0001$ ），AMPK蛋白表达量分别为 0.493 ± 0.030 、 0.083 ± 0.011 、 0.212 ± 0.026 、 0.051 ± 0.012 、 0.181 ± 0.039 、 0.058 ± 0.007 ，差异有统计学意义（ $F = 49.43$ ， $P < 0.0001$ ），SREBP-1c蛋白表达量分别为 0.124 ± 0.033 、 0.824 ± 0.114 、 0.187 ± 0.008 、 1.368 ± 0.103 、 0.330 ± 0.078 、 0.526 ± 0.071 ，差异有统计学意义（ $F = 36.80$ ， $P < 0.0001$ ），LKB1蛋白表达量分别为 0.376 ± 0.023 、 0.221 ± 0.015 、 0.413 ± 0.016 、 0.145 ± 0.014 、 0.380 ± 0.004 、 0.224 ± 0.034 ，差异有统计学意义（ $F =$

30.26 ， $P < 0.0001$ ）。与对照组相比，模型组SIRT1、AMPK和LKB1蛋白表达水平显著下调，而SREBP-1c蛋白显著上调（ P 均 < 0.05 ）；与模型组相比，模型+利拉鲁肽组AMPK和LKB1蛋白表达量显著上调，而SREBP-1c蛋白表达量显著下调（ P 均 < 0.05 ）；与模型+ SIRT1组相比，模型+ SIRT1 + 利拉鲁肽组LKB1和AMPK蛋白表达量显著上调，而SREBP-1c蛋白表达量显著下调（ P 均 < 0.05 ），见图8、图9。

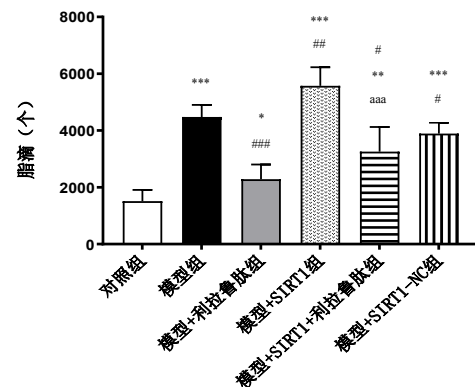


图6 各组小鼠肝组织脂肪含量

注：与对照组相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ；与模型组相比，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.001$ ；与模型+ SIRT1组相比，aaa $P < 0.001$ 。

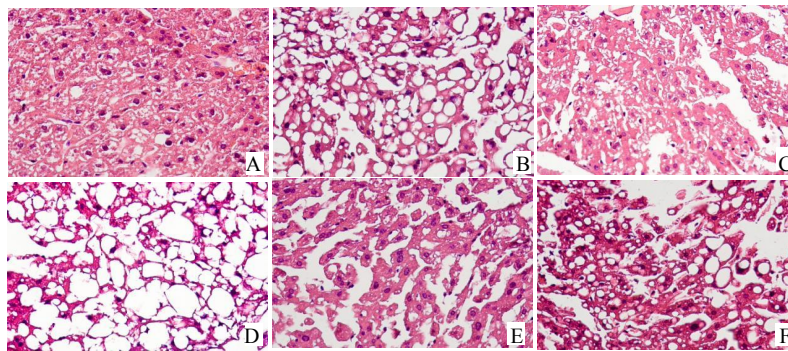


图4 各组小鼠肝组织 HE 染色（ $\times 400$ ）

注：A 图示对照组小叶规则，细胞有序；B 图示模型组脂肪空泡，脂质蓄积；C 图示模型+利拉鲁肽组脂肪空泡变，数量减少；D 图示模型+ SIRT1 组较模型组更加严重；E 图示模型+ SIRT1 + 利拉鲁肽组脂质蓄积减少，空泡减少；F 图示模型+ SIRT1-NC 组脂肪空泡，脂质蓄积。

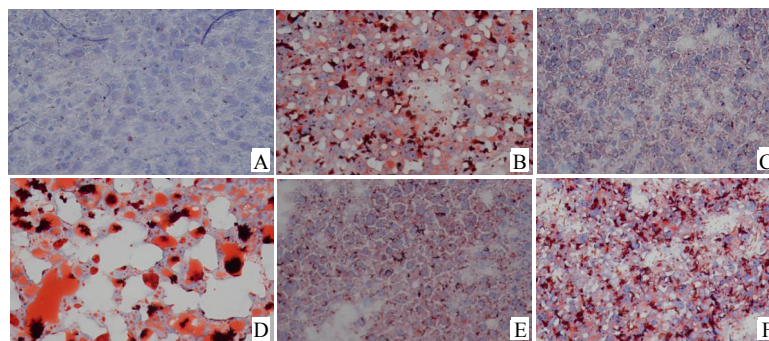


图5 小鼠肝组织油红 O 染色（ $\times 400$ ）

注：A 图示对照组零星细小脂滴；B 图图示模型组大量脂滴，脂肪沉积；C 图示模型+利拉鲁肽组脂滴数量减少；D 图示模型+ SIRT1 组脂滴更大，明显沉积；E 图示模型+ SIRT1 + 利拉鲁肽组脂滴数量明显下降；F 图示模型+ SIRT1-NC 组大量脂滴，脂肪沉积。

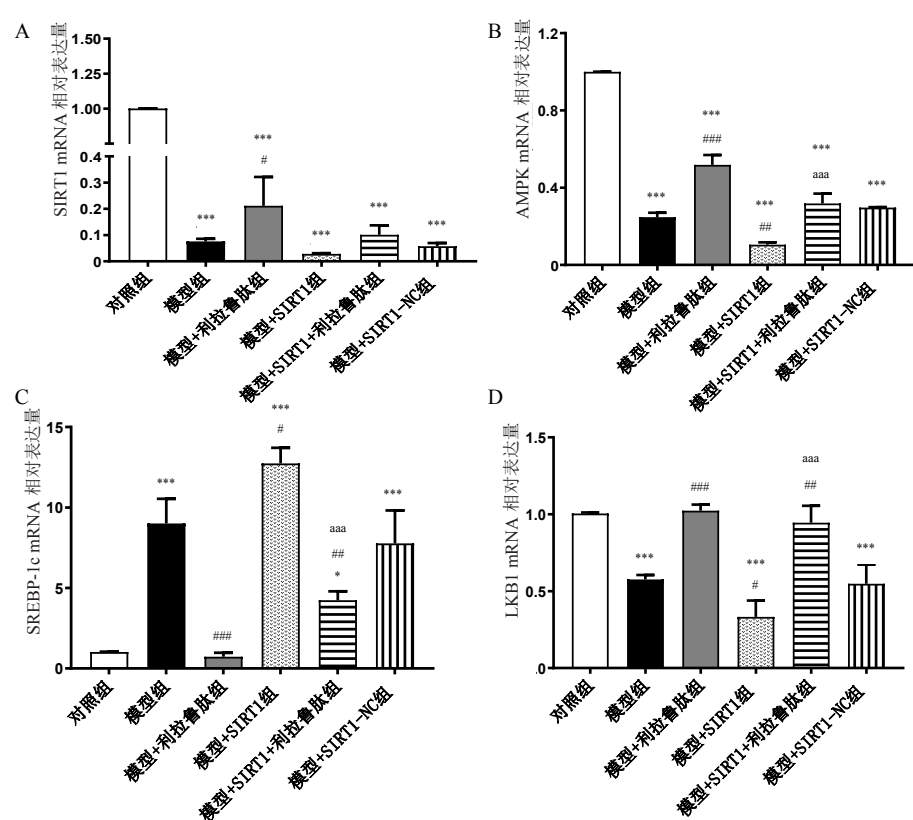


图 7 各组小鼠 SIRT1、AMPK、SREBP-1c、LKB1 mRNA 相对表达量

注：A～D 分别为 SIRT1、AMPK、SREBP-1c、LKB1 mRNA 相对表达量；与对照组相比，* $P < 0.05$ ，*** $P < 0.001$ ；与模型组相比，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ；与模型 + SIRT1 组相比，aaa $P < 0.001$ 。

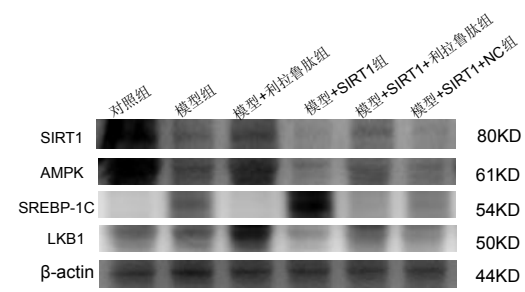


图 8 各组小鼠 AMPK、LKB1、SIRT1 和 SREBP-1c 蛋白表达的 Western blot 图

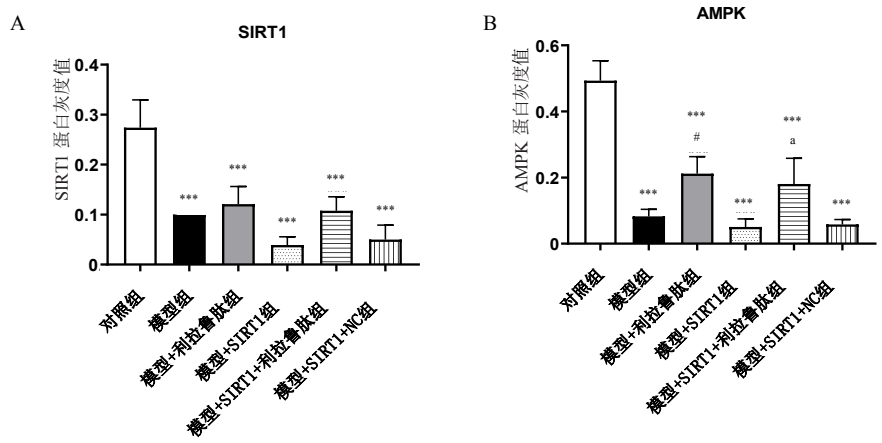
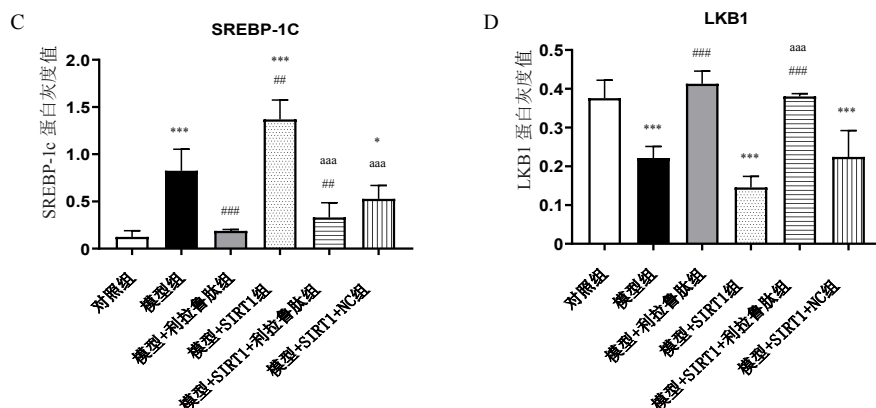


图 9 各组小鼠 AMPK、LKB1、SIRT1 和 SREBP-1c 蛋白表达的灰度值

注：A～D 分别为 SIRT1、AMPK、SREBP-1c、LKB1 蛋白表达的灰度值；与对照组相比，* $P < 0.05$ ，*** $P < 0.001$ ；与模型组相比，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.001$ ；与模型 + SIRT1 组相比，^a $P < 0.05$ ，aaa $P < 0.001$ 。



续图9 各组小鼠 AMPK、LKB1、SIRT1 和 SREBP-1c 蛋白表达的灰度值

注: A ~ D 分别为 SIRT1、AMPK、SREBP-1c、LKB1 蛋白表达的灰度值; 与对照组相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与模型 + SIRT1 组相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

3 讨论

MAFLD是指超过5%肝细胞的脂质积累,且不是由酒精、药物引起^[11]。MAFLD发病与肝脏脂代谢稳态改变密切相关,脂肪酸及脂肪合成途径显著增强和脂质分解及转运明显减弱是其根本机制^[12,13]。另外MAFLD发展与遗传倾向、胰岛素抵抗、新脂肪生成、炎症反应、氧化应激、微生物失调、免疫、线粒体损伤及凋亡有关^[14,15]。

胰高血糖素样肽-1 (glucagon like peptide-1, GLP-1) 受体激动剂,如降糖药物利拉鲁肽,既能改善胰岛素抵抗及肝脂肪变性,还可延缓胃排空、抑制饱食中枢^[10]。研究表明,利拉鲁肽可作用于脂肪酸沉积的L02细胞模型,细胞内脂滴数量较处理前明显减少,细胞中甘油三酯和总胆固醇含量也较前明显降低^[16]。在动物研究中,利拉鲁肽可降低糖尿病合并MAFLD小鼠的体质量和肝脏质量,血清及肝脏中脂质沉积减轻,肝脏生物化学指标改善,空腹血糖水平降低^[17]。2019年发表在《柳叶刀》杂志上的一项随机对照试验表明,与安慰剂相比,利拉鲁肽与MAFLD患者的肝脏脂肪含量和肝硬度显著降低有关^[18];一项纳入82例T2DM伴MAFLD患者的回顾性临床研究表明,利拉鲁肽有改善肝脏炎症、肝纤维化和减少体质量的作用^[19];因此,大多数研究承认GLP-1受体激动剂可保护肝细胞,降低甚至恢复MAFLD患者的血清ALT和肝内甘油三酯水平,降低肝脏脂肪变性^[20-22],但利拉鲁肽在代谢性肝病中作用的潜在有益机制尚不完全清楚。我们推测利拉鲁肽对MAFLD的作用可能是由于对全身代谢途径的多效性作用的获益。

SIRT1在哺乳动物细胞中广泛表达,包括肝脏、骨骼肌、脂肪组织、胰腺(β 细胞)、大脑和内皮细胞^[23]。SIRT1在细胞核中与LKB1、过氧化

物酶体增殖物激活受体(Peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR- γ) 等非组蛋白结合,乙酰化底物参与胰岛素敏感性、炎症与氧化应激、细胞凋亡及脂质代谢的基因表达调控^[24,25]。一项临床前研究表明,肝脏中缺乏SIRT1表达的小鼠会出现肝脂肪变性并伴有天门冬氨酸氨基转移酶水平升高^[26]。还有研究表明,高脂喂养SIRT1敲除小鼠和其野生型小鼠后给予GLP-1受体激动剂治疗,可逆转野生型小鼠肝脏脂肪变性,而SIRT1敲除小鼠的肝脏脂肪变性无明显改善,这表明SIRT1缺失严重影响GLP-1Ra的作用^[27-29],与本研究有一致之处,本研究中利拉鲁肽治疗可明显改善高脂喂养的C57BL/6J小鼠体质量、甘油三酯及ALT升高,改善肝细胞脂肪变性,而干扰SIRT1则削弱了利拉鲁肽逆转小鼠肝脏脂肪变性的作用。

AMPK是与肝脏正性脂质调节相关的能量代谢开关,也被认为是MAFLD的治疗靶点^[30]。其是一个三聚体复合物,由催化亚基 α 和调节亚基 β 、 γ 组成^[31]。临床前研究发现,在糖尿病小鼠中,AMPK的激活可阻断SREBP1c的核转位并减轻异常的脂肪生成^[32]。在另一项对3T3-L1细胞的研究中发现,AMPK可磷酸化SREBP1c前体,并阻止其成熟^[33]。SREBP-1c属于碱性螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链家族成员转录因子,可调节甘油三酯脂肪酶、游离脂肪酸和乙酰辅酶A羧化酶等多种脂肪生成基因,诱导细胞内的脂肪生成^[33-35]。AMPK可磷酸化SREBP-1c抑制其核转位,调节脂质合成相关分子;pAMPK还可通过改变NAD⁺和NAD⁺/NADH比值上调SIRT1直接去乙酰化LKB1(一种丝氨酸/苏氨酸激酶,通过促进AMPK α 亚基上Thr172位点的磷酸化激活AMPK),放大AMPK通路,阻止脂质合成和抑制新生脂肪^[36]。本研究也表明利拉鲁肽通过上调

SIRT1、LKB1、AMPK基因和LKB1、AMPK蛋白水平或协同二者,拮抗SREBP-1c基因和蛋白表达水平,降低脂质合成相关分子水平;当干扰SIRT1表达时,利拉鲁肽间接激活并上调LKB1/AMPK基因和蛋白表达水平,放大AMPK通路,保障了重要脂质代谢转录因子的平衡。本研究还有不足之处,因小鼠模型对人类NASH治疗的预测价值仍存在争议,本研究中暂未涉及肝纤维化的标准化组织学检测及利拉鲁肽改善小鼠肝纤维化程度的评估。

综上,利拉鲁肽可改善MAFLD小鼠体质量、肝湿重、肝脏脂质变性、ALT及甘油三酯,其机制与利拉鲁肽协同或互补调控SIRT1、LKB1/AMPK基因和蛋白表达有关。

参考文献

- [1] POUWELS S, SAKRAN N, GRAHAM Y, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss[J]. BMC Endocr Disord, 2022, 22(1): 63.
- [2] VOLPE S, LISCO G, FANELLI M, et al. Once-weekly subcutaneous semaglutide improves fatty liver disease in patients with type 2 diabetes: a 52-week prospective real-life study[J]. Nutrients, 2022, 14(21): 4673.
- [3] RONG L, ZOU J Y, RAN W, et al. Advancements in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. Front Endocrinol, 2023, 13: 1087260.
- [4] LI N, YIN L, SHANG J M, et al. Kaempferol attenuates nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetic mice via the Sirt1/AMPK signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 165: 115113.
- [5] SHARMA A, ANAND S K, SINGH N, et al. Berberine induced activation of the SIRT1/LKB1/AMPK signaling axis attenuates the development of hepatic steatosis in high-fat diet-induced NAFLD rats[J]. Food Funct, 2021, 12(2): 892-909.
- [6] QIU B, LAWAN A, XIROUCHAKI C E, et al. MKP1 promotes nonalcoholic steatohepatitis by suppressing AMPK activity through LKB1 nuclear retention[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 5405.
- [7] XU F, LI Z, ZHENG X, et al. SIRT1 mediates the effect of GLP-1 receptor agonist exenatide on ameliorating hepatic steatosis[J]. Diabetes, 2014, 63(11): 3637-3646.
- [8] SALMAN M, KAMEL M A, EL-NABI S E H, et al. The regulation of HBP1, SIRT1, and SREBP-1c genes and the related microRNAs in non-alcoholic fatty liver rats: the association with the folic acid anti-steatosis[J]. PLoS One, 2022, 17(4): e0265455.
- [9] LIOU C J, LEE Y K, TING N C, et al. Protective effects of licochalcone A ameliorates obesity and non-alcoholic fatty liver disease via promotion of the Sirt-1/AMPK pathway in mice fed a high-fat diet[J]. Cells, 2019, 8(5): 447.
- [10] LU J M. The role of glucagon-like peptide-1 receptor agonists in type 2 diabetes in Asia[J]. Adv Ther, 2019, 36(4): 798-805.
- [11] TINIAKOS D G, ANSTEE Q M, BURT A D. Fatty liver disease[M]. MacSween's Pathology of the Liver: 7th Edition. Philadelphia: Elsevier, 2018: 308371.
- [12] 薛峰, 魏来. 从代谢谈脂肪性肝病: 疾病本源与新药终点再思考[J]. 中华肝脏病杂志, 2023, 31(8): 785-788.
- [13] EN LI CHO E, ANG C Z, QUEK J, et al. Global prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus: an updated systematic review and Meta-analysis[J]. Gut, 2023, 72(11): 2138-2148.
- [14] CATURANO A, ACIERNO C, NEVOLA R, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: from pathogenesis to clinical impact[J]. Processes, 2021, 9: 135.
- [15] GARIANI K, JORNAYVAZ F R. Pathophysiology of NASH in endocrine diseases[J]. Endocr Connect, 2021, 10(2): R52-R65.
- [16] GAO H, ZENG Z, ZHANG H, et al. The glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide inhibits oxidative stress and inflammatory response in the liver of rats with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease[J]. Biol Pharm Bull, 2015, 38(5): 694-702.
- [17] YABUT J M, DRUCKER D J. Glucagon-like peptide-1 receptor-based therapeutics for metabolic liver disease[J]. Endocr Rev, 2023, 44(1): 14-32.
- [18] CEGLA J. Liraglutide safety and efficacy in patients with nonalcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 study[J]. Ann Clin Biochem, 2016, 53(4): 518.
- [19] POWELL E E, WONG V W S, RINELLA M. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. Lancet, 2021, 397(10290): 2212-2224.
- [20] PATEL C C, CUSI K, KADIYALA S. The emerging role of glucagon-like peptide-1 receptor agonists for the management of NAFLD[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2022, 107(1): 29-38.
- [21] CUSI K. Incretin-based therapies for the management of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes[J]. Hepatology, 2019, 69(6): 2318-2322.
- [22] FERGUSON D, FINCK B N. Emerging therapeutic approaches for the treatment of nafld and type 2 diabetes mellitus[J]. Nat Rev Endocrinol, 2021, 17(8): 484-495.
- [23] ZHOU Q, WANG Y, HAN X, et al. Efficacy of resveratrol supplementation on glucose and lipid metabolism: a metaanalysis and systematic review[J]. Front Physiol, 2022, 13: 795980.
- [24] ANGREINI P, KUNCORO H, SUMIWI S A, et al. Role of the AMPK/SIRT1 pathway in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Mol Med Rep, 2023, 27(2): 35.
- [25] CHEN J, LOU R H, ZHOU F, et al. Sirtuins: key players in obesity-associated adipose tissue remodeling[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1068986.
- [26] YANG H, LIU Y, WANG Y, et al. Knockdown of Sirt1 gene in mice results in lipid accumulation in the liver mediated via PGC1 α induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress[J]. Bull Exp Biol Med, 2021, 172(2): 180-186.
- [27] KADONO K, KAGEYAMA S, NAKAMURA K, et al. Myeloid ikaros-SIRT1 signaling axis regulates hepatic inflammation and pyroptosis in ischemia-stressed mouse and human liver[J]. J Hepatol, 2022, 76(4): 896-909.
- [28] XIANG J, QIN L Y, ZHONG J L, et al. GLP-1RA Liraglutide and semaglutide improves obesity-induced muscle atrophy via SIRT1 pathway[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2023, 16: 2433-2446.
- [29] FANG C Q, PAN J H, QU N, et al. The AMPK pathway in fatty liver disease[J]. Front Physiol, 2022, 13: 970292.
- [30] DING R B, BAO J L, DENG C X. Emerging roles of Sirt1 in fatty liver diseases[J]. Int J Biol Sci, 2017, 13(7): 852-867.
- [31] CANTÓ C, AUWERX J. Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is NAD⁺[J]. Pharmacol Rev, 2012, 64(1): 166-187.
- [32] LI Y, XU S, MIHAYLOVA M M, et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice[J]. Cell Metab, 2011, 13(4): 376-388.
- [33] HA J H, JANG J, CHUNG S I, et al. AMPK and SREBP-1c mediate the anti-adipogenic effect of β -hydroxyisovalerylshikonin[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(3): 816-824.
- [34] NAGAI Y, YONEMITSU S, ERION D M, et al. The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 beta in the pathogenesis of fructose-induced insulin resistance[J]. Cell Metab, 2009, 9(3): 252-264.
- [35] RUDERMAN N B, XU X J, NELSON L, et al. AMPK and Sirt1: a long-standing partnership?[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010, 298(4): E751-E760.
- [36] HARDIE D G, ROSS F A, HAWLEY S A, et al. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(4): 251-262.

收稿日期: 2023-10-31

路瑶, 焦谊, 杨晶晶, 等. 利拉鲁肽通过SIRT1/AMPK通路改善小鼠肝脏脂质变性的机制研究[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2024, 16(3): 36-44.