

· 基础研究 ·

丹瓜方调控糖尿病大鼠 miR-34a/Nampt 轴研究

衡先培¹ 王志塔¹ 李 亮¹ 杨柳清¹ 黄苏萍² 王训立² 谢金东² 陈敏灵¹

摘要 **目的** 研究丹瓜方对糖脂代谢调控轴微小 RNA (miR)-34a/烟酰胺磷酸核糖转移酶 (Nampt) 的影响。**方法** 高脂高糖饲养大鼠 4 周后,以链脲佐菌素 (STZ) 腹腔注射制备糖尿病模型。根据血糖水平选出糖尿病成模大鼠 28 只,继续喂养高脂高糖饲料,并按体重分层、血糖随机,分为模型组、丹瓜组 [丹瓜方灌胃, 20.5 g / (kg · d)]、抑制组 (Nampt 阻滞剂 GEN-617 腹腔注射 1.25 mg/kg, 每周 1 次)、丹抑组 (同时用丹瓜方和 GEN-617), 每组 7 只。正常组 8 只鼠继续用常规饲料。干预 10 周。观测口服葡萄糖耐量试验 (OGTT)、胰岛素释放曲线下面积、胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)、糖化血红蛋白 (HbA1c)、血浆游离脂肪酸 (FFAs)。Elisa 法检测肝组织 Nampt 蛋白、血浆胰岛素 (Ins) 浓度;实时荧光定量 PCR 检测 Nampt-mRNA 和 miR-34a-mRNA 表达;并做肝组织 HE、Masson、油红 O 染色。**结果** 与正常组比较,模型组空腹血糖 (FBG)、OGTT 2 小时血糖 (PBG)、HbA1c、胰岛素释放曲线下面积、HOMA-IR、肝组织 Nampt 蛋白及 miR-34a-mRNA 表达升高 ($P<0.01$)。与模型组比较,丹瓜组 FBG、HbA1c、HOMA-IR、肝 miR-34a-mRNA 表达降低,FFA、肝 Nampt-mRNA、血 miR-34a-mRNA 及肝 Nampt 蛋白升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与丹瓜方组比较,丹抑组 FBG、FFA、HbA1c 升高 ($P<0.01$, $P<0.05$),肝 Nampt-mRNA 表达降低 ($P<0.05$);抑制组 FBG、HbA1c 升高 ($P<0.01$, $P<0.05$),肝 Nampt 蛋白水平降低 ($P<0.05$)。组织染色显示模型组有明确病理形态学改变及纤维化和脂肪变,并有炎性细胞浸润。丹瓜组病变轻微,抑制组病变较模型组更明显,丹抑组介于丹瓜组与抑制组之间。**结论** 调控 miR-34a/Nampt 轴是丹瓜方有效干预糖脂代谢病的机制之一。

关键词 丹瓜方;糖尿病;微小 RNA-34a;烟酰胺磷酸核糖转移酶;中药

Study on Dangua Recipe Regulating miR-34a / Nampt Axis in Diabetic Rats HENG Xian-pei¹, WANG Zhi-ta¹, LI Liang¹, YANG Liu-qing¹, HUANG Su-pin², WANG Xun-li², XE Jin-dong², and CHEN Min-ling¹ 1 Department of Endocrinology, People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350004); 2 Academy of Integrative Medicine Fujian, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Dangua Recipe regulating microRNA (miR)-34a/Nampt niacin nicotinate phosphoribosyl transferase (Nampt) axis controlling glycolipid metabolism. **Methods** After raised 4 weeks with high-fat and high-sugar chow, the diabetic model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). According to the blood glucose levels, 28 diabetic model rats were selected and received high-fat and high-sugar diet continuously. According to the body weight stratification and the blood glucose levels, model rats were randomized into model group, Dangua group (received Dangua Recipe by gavage, 20.5 g · kg⁻¹ · d⁻¹), inhibitor group (received Nampt inhibitor GEN-617 by intraperitoneal injections, 1.25 mg/kg, once a week), and DanInhib group (received both Dangua Recipe and GEN-617), 7 rats in each group. Eight rats in normal group received common feed continuously. Intervention lasted for 10 weeks. The oral

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (No. 81873213, No.81473550, No. 81603508);福建省科技厅高校产学研合作项目 (No. 2017-CX-42)

作者单位:1. 福建中医药大学附属人民医院暨福建省人民医院内分泌科 (福州 350004); 2. 福建中医药大学中西医结合研究院 (福州 350108)

通讯作者:衡先培, Tel: 0591-83947272, E-mail: hengxianpei@hotmail.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20221114.245

glucose tolerance test (OGTT), area under the insulin release curve, insulin resistance index (HOMA-IR), glycated hemoglobin (HbA1c), and plasma free fatty acids (FFAs) were observed and tested. Elisa method was used to detect the protein concentration of Nampt in liver tissue and the level of plasma insulin (Ins). Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression of Nampt-mRNA and miR-34a-mRNA. HE, Masson, and Oil red O stainings of liver tissue were performed. **Results** Compared with normal group, fasting blood glucose (FBG), OGTT 2h blood glucose (PBG), HbA1c, area under the insulin release curve (S), HOMA-IR, liver tissue Nampt protein and miR-34a-mRNA expression increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, FBG, HbA1c, HOMA-IR, liver miR-34a-mRNA expression decreased in Dangua group, while FFA, liver Nampt-mRNA, blood miR-34a-mRNA, and liver Nampt protein increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with Dangua group, FBG, FFA, HbA1c increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), liver Nampt-mRNA expression reduced in DanInhib group ($P < 0.05$). Meanwhile, FBG and HbA1c increased ($P < 0.01$) and liver Nampt protein level decreased ($P < 0.05$) in the inhibitor group. The tissue staining showed that the model group had clearly pathological changes, fibrosis, and steatosis with inflammatory cell infiltration. The lesions were slight in the Dangua group, and those in the inhibitor group were more obvious than in the model group. The lesions of DanInhib group were between the Dangua group and the inhibitor group. **Conclusion** Regulation of miR-34a/Nampt axis was one of the mechanisms Dangua Recipe effectively intervened in glycolipid metabolism.

KEYWORDS Dangua Recipe; diabetes; microRNA-34a; nicotinamide phosphoribosyltransferase; Chinese herbal medicine

超重和肥胖是 2 型糖尿病的危险因素。化学药物治疗糖尿病大多抑制代谢^[1]、增加体重,即使综合强化治疗也不能进一步降低患者的心血管风险和全因终点^[2]。笔者前期研究表明,痰瘀同治丹瓜方能解除高糖的细胞毒性^[3]并恢复细胞周期^[4],有效调节四类糖尿病发病相关基因^[5]及腺苷 5'-一磷酸活化蛋白激酶 [adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK]、脂联素等多个能量代谢靶点^[6-8],有效干预糖脂代谢和减轻体重^[9-11],保护糖尿病心、脑、肾的大小血管^[12-14],降低高危 2 型糖尿病患者心血管风险和全因终点^[15]。微小 RNA (miR)-34a 具有复杂的功能,可导致多方面的病理生理变化,尤其在肥胖相关疾病领域引起了重视^[16,17]。烟酰胺磷酸核糖转移酶 (nicotinamide phosphoribosyltransferase, Nampt) 是一种广泛存在于脂肪细胞的分泌蛋白。细胞内 Nampt 是合成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 补救途径的关键限速酶^[18],哺乳动物细胞中 80% 的 NAD⁺ 由该途径合成^[19]。研究表明 miR-34a/Nampt 轴与肥胖及 2 型糖尿病密切相关^[17],而且是调控三羧酸循环和呼吸链的重要因素^[20],对糖脂代谢具有重大影响。其涉及的表型特征与丹瓜方疗效契合。本文以高脂高糖饲养加链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 注射塑造糖尿病模型,并设 Nampt 特异性阻断剂干预作对照,研究丹瓜方对 miR-34a/NAMPT 轴的影响。

材料与方法

1 动物 SPF 级雄性健康 SD 大鼠 60 只,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,7 周龄,体重 (311 ± 11) g。许可证编号: SCXK (沪) 2017-0005。饲养于独立通气笼具,环境温度 (22 ± 1) °C,湿度 (50 ± 5) %。自由摄食,饮用水及垫材木屑每天更换。光照每 12 h 明暗交替。观察记录动物的状态。动物实验经福建中医药大学医学伦理委员会批准 [No. (2019) 福中医伦理审字 (037)], 遵守伦理原则,符合国家及部门有关实验动物保护与使用准则,善待动物。

2 药物及试剂 Nampt 特异性阻断剂 GEN-617, Apexbio 公司产品,货号 B1271。STZ, Sigma 公司,批号: S8050。拜安时糖化血红蛋白测试卡 (Bayer 公司,干化学检测法),产品批号: YZB/USA 1778-2011。糖化血红蛋白稀释液,产品批号: YZR/USA 1780-2011。SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen life technologies 公司,货号: 18080-044), Trizol 试剂 (Invitrogen life technologies 公司,货号: 15596-018)。Tris-HCl (sigma/美国,货号: T2663), EDTA (sigma/美国,货号: E7889), Ethidium Bromide (生工生物工程公司,货号: A600195), MOPS (华美生物工程公司,货号: B541005), 琼脂糖 (Biowest, 货号: BY-R0100), RNA 酶抑制剂 (Enzymatics, 货号: Y9240L), 2.5 mmol/L dNTP 混合液 (百奥莱

博, 货号: ALH284); PCR master mix (Arraystar, 货号: AS-MR-005-5)。丹瓜方(国家发明专利号: 201410599300.6)由丹参、瓜蒌、赤芍、法半夏、僵蚕、薤白按 3:3:2:2:2:2 组成。固定种类、固定来源的处方药材均经专家鉴定。按照标准生产工艺制成 1:1 的口服液, 实验用时再浓缩成需要的浓度。

3 主要仪器 拜安时糖化血红蛋白仪产品标准编号: YZB/USA 1442-2011; 连续波长多功能酶标仪(奥地利 TECAN 产品); CR2032 微量血糖测试仪(拜耳公司); 光学显微镜(MDL, 德国莱卡公司); DK-8D 型电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司); GC-1200 γ 全自动放免分析仪(安徽中科中佳科学仪器有限公司); NanoDrop ND-1000 微量紫外分光光度计、Heraeus Multifuge X1R 台式高速冷冻离心机(Thermo Scientific 公司); QuantStudio5 Real-time PCR System(Applied Biosystems 公司)。

4 造模方法 60 只大鼠适应性饲养 1 周后做口服葡萄糖的耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT), 排除空腹血糖(fasting blood glucose, FBG) ≥ 6.1 mmol/L、2 h 血糖(2 hours blood glucose, PBG) ≥ 7.8 mmol/L 的大鼠。按空腹体重分层, 随机取 8 只大鼠饲以普通饲料, 其余大鼠饲以高脂高糖饲料(配方: 精炼猪油 10%, 胆固醇 2%, 猪胆盐 0.3%, 蔗糖 20%, 常规饲料 67.7%)。饲养 4 周后, 空腹注射 STZ 25 mg/kg, 连续 2 天。第 2 次注射结束后的 72 h 做 OGTT。FBG > 11.1 mmol/L, 且 PBG > 16.7 mmol/L 视为糖尿病成模型大鼠^[21]。最终取 28 只成模大鼠纳入实验分组。

5 分组及干预方法 确定糖尿病成模次日称量空腹体重。依体重分层, 按血糖水平由高至低, 用随机数字表法, 将糖尿病成模大鼠随机分为模型组[灌服等量无菌水], 丹瓜组[用丹瓜方 20.5 g/(kg·d) 胃液, 每天 1 次], 抑制组(每周一按 1.25 mg/kg 的量腹腔注射 GEN-617), 丹抑组(同时用丹瓜方和阻断剂)。正常组 8 只鼠继续用常规饲料, 其余组仍用高脂高糖饲料。每天观察记录活动状态及进食饮水情况。第 2 周正常组 1 只因灌胃失败死亡。根据既往实验干预 10 周后, 禁食但不禁水 12 h 取标本。

6 检测指标及方法

6.1 口服葡萄糖耐量试验 禁食不禁水 10 h 后, 尾尖取血, 用微量血糖仪(葡萄糖氧化酶法)测定空腹血糖。之后立即以 50% 葡萄糖注射液, 按葡萄糖 2 g/kg 灌胃, 并记录灌胃时间。灌胃后 2 h 再测血糖。

6.2 胰岛素释放曲线下面积(S) 按 OGTT 方法于空腹及灌胃后、1 h、2 h 尾静脉取血测定血浆胰岛素浓度。以横坐标为时间, 纵坐标为胰岛素浓度(insulin, Ins), 按照公式: $S(\text{mIU/L} \times \text{h}) = 0.5(\text{空腹 Ins} + 2 \text{ h Ins}) + 1 \text{ h Ins}$ 计算。

6.3 胰岛素抵抗指数(IR) 用改进型 HOMA 模型^[22]。先根据公式: $\text{IR} = \text{FBG}(\text{mmol/L}) \times \text{空腹 Ins}(\mu\text{U/mL}) / 22.5$ 计算, 再取自然对数。

6.4 糖化血红蛋白(lycated hemoglobin A1c, HbA1c)微量血法, 按试剂盒说明书操作, 空腹尾尖取血测定。

6.5 血浆游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)采用生化法检测。

6.6 Elisa 检测肝组织 Nampt 蛋白肝组织称取 50 mg, 手动匀浆, 4 ℃ 2 500 r/m 离心 10 min, 取上清 10 μL (余量冰冻保存) 加入标本稀释液 1 590 μL 中待测。测血浆胰岛素直接取血清。上板, 分别加入待测样品, 用封板膜封板后置 37 ℃ 温育 40 min。揭去封板膜, 弃液甩干, 洗板 5 次。每孔加蒸馏水及第一抗体工作液各 50 μL (空白除外), 混匀, 温育 20 min。再次洗板后加酶标试剂, 温育 10 min。第 3 次洗板后加工作液, 置 37 ℃ 暗处反应 15 min 后, 加终止液, 混匀。以空白孔调零后, 在相应波长下测量各孔的吸光度(OD 值)。

6.7 实时荧光定量 PCR 检测 Nampt-mRNA 和 miR-34a-mRNA 表达 取肝组织 100 mg, 液氮研磨, 参照 Trizol 说明书提取总 RNA。测血 miR-34a 直接用血浆提取。逆转录合成 cDNA。用 Primer 5.0 软件合成引物, 由上海康成生物工程有限公司合成。内参引物 GAPDH (用于测肝组织 Nampt-mRNA 表达): F: 5' -GCTCTCTGCTCCTCCCTGTTCTA-3'; R: 5' -TGGTAACCAGGCGTCCGATA-3', 产物长度 124 bp。Nampt: F: 5' -GTTGCTGCCACCTTACCTTAG-3', R: 5' -CCACCAGAACCACAAAGGAGAC-3', 产物长度 126 bp。U6 (用于测肝组织 rno-miR-34a-5p 表达): F: 5' -GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3', R: 5' -CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3', 产物长度 89 bp; rno-miR-423-5p (用于测血样 rno-miR-34a-5p 表达): GSP: 5' -TAAGCTCGGTCTGAGGC-3', R: 5' -CAGTGCGTGTCGTGGA-3', 产物长度 65 bp; rno-miR-34a-5p: GSP: 5' -GGGGTGGCAGTGTCTTAGC-3', R: 5' -CAGTGCGTGTCGTGGAGT-3', 产物长度 64 bp。退火温度均为 60 ℃。各样品的目的基因和内参基因分别进行实时 PCR 反应。根据预先绘制的

DNA 梯度稀释标准曲线,各样品目的基因和内参基因的浓度值直接由机器生成。每个样品的目的基因浓度除以其管家基因的浓度,即为此样品此基因的校正后的相对含量。

6.8 肝组织染色 HE 染色:组织洗涤,石蜡包埋,10 μm 厚度切片,脱蜡,苏木素浸染,1% 盐酸酒精分蓝,自来水浸泡返蓝,伊红浸染,浸洗,树脂封片。**Masson 染色**:石蜡切片,脱蜡,切片铬化处理,自来水浸洗至黄色消失后,再用蒸馏水滴注洗涤,加入 Regaud 苏木精染液,充分水洗,加入 Masson 丽春红酸性复红液,洗涤,1% 磷钼酸水溶液分化,苯胺蓝染色,0.2% 冰醋酸水溶液浸洗,脱水透明,中性树胶封片。**油红 O 染色**:冰冻切片,厚度 10 μm,70% 乙醇固定,蒸馏水洗涤,油红稀释液染,避光,密封,加入 60% 乙醇,蒸馏水洗涤,苏木素复染,蒸馏水洗涤,甘油明胶封片。

7 统计学方法 统计用 SPSS 17.0 软件处理。计量资料属正态分布者用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数比较用单因素方差分析,方差齐用 *LSD*。方差不齐者,经对数转换方差齐后,再用 *LSD* 比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 FBG、PBG 及 HbA1c 比较 (表 1) 与正常组比较,模型组 FBG、PBG 及 HbA1c 水平升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,丹瓜方组 FBG 和 HbA1c 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与丹瓜方组比较,丹抑组、抑制组 FBG 及 HbA1c 均显著增高 ($P < 0.01$)。

2 各组 S、IR 及 FFA 水平比较 (表 2) 与正常组比较,模型组 S 和 HOMA-IR 升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,丹瓜方组 HOMA-IR 明显降低,FFA 明显升高 ($P < 0.05$);丹抑组 FFA 显著升高 ($P < 0.01$)。抑制组 HOMA-IR 明显高于丹瓜方组 ($P < 0.05$)。

3 miR-34a/Nampt 轴比较 (图 1,表 3) 肝组

表 1 各组 FBG、PBG 及 HbA1c 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FBG (mmol/L)	PBG (mmol/L)	HbA1c (%)
正常	7	5.93 ± 1.47	8.11 ± 1.54	5.89 ± 0.45
模型	7	26.04 ± 5.50*	27.43 ± 7.08*	11.96 ± 0.36*
丹瓜	7	18.03 ± 5.14 [△]	26.86 ± 5.04	9.79 ± 0.93 ^{△△}
丹抑	7	26.47 ± 8.38 [▲]	26.87 ± 8.49	11.92 ± 0.32 [▲]
抑制	7	27.77 ± 5.65 [▲]	29.76 ± 4.09	12.41 ± 0.45 [▲]

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与丹瓜方组比较,[▲] $P < 0.01$

表 2 各组 S、HOMA-IR 和 FFA 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	S (mIU/l·h)	HOMA-IR (Ln)	FFA (μmol/L)
正常	7	1.07 ± 0.04	0.47 ± 0.21	268.67 ± 48.46
模型	7	1.41 ± 0.09*	2.07 ± 0.49*	238.25 ± 66.06
丹瓜	7	1.34 ± 0.17	1.64 ± 0.27 [△]	323.11 ± 83.83 [△]
丹抑	7	1.32 ± 0.23	1.89 ± 0.33	349.57 ± 62.69 ^{△△}
抑制	7	1.39 ± 0.34	2.12 ± 0.33 [▲]	252.37 ± 64.22

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与丹瓜方组比较,[▲] $P < 0.01$

织 Nampt、miR-34a、血 miR-34a 及相应内参的扩增曲线和溶解曲线有良好的一致性。与正常组比较,模型组肝组织 Nampt 蛋白及 miR-34a-mRNA 表达升高 ($P < 0.01$); Nampt-mRNA 则降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较,丹瓜组肝组织 Nampt 蛋白水平及 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),肝 miR-34a-mRNA 表达明显降低而血 miR-34a-mRNA 明显升高 ($P < 0.05$)。与丹瓜组比较,丹抑组肝组织 Nampt-mRNA 表达、抑制组肝 Nampt 蛋白及血 miR-34a-mRNA 表达下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

4 各组肝组织染色结果比较 (图 2) HE:正常组的肝小叶清楚,肝索、肝窦呈辐射状分布排列。窦周间隙及胆小管清楚,肝细胞形态正常,细胞核近圆形,位于细胞中央。汇管区小叶间动脉、静脉、胆管清楚,无炎性细胞聚积。模型组肝索、肝窦排列紊乱,缺乏放射状结构。汇管区炎性细胞浸润,肝细胞间紧密。丹瓜方组肝索、肝窦放射状结构清楚,肝细胞间间隙明显,无明显炎性细胞浸润。丹抑组肝索、肝窦

表 3 各组肝组织 Nampt 蛋白、Nampt-mRNA、miR-34a-mRNA 及血 miR-34a-mRNA 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肝 Nampt 蛋白	肝 Nampt-mRNA (×100)	肝 miR-34a-mRNA	血 miR-34a-mRNA
正常	7	30.03 ± 10.54	6.47 ± 1.89	1.06 ± 0.27	0.96 ± 0.13
模型	7	58.13 ± 10.93**	4.56 ± 1.71*	2.13 ± 0.25**	1.24 ± 0.42
丹瓜	7	76.69 ± 9.87 ^{△△}	6.86 ± 1.26 [△]	1.78 ± 0.27 [△]	1.89 ± 0.80 [△]
丹抑	7	72.57 ± 13.39	4.60 ± 1.21 [▲]	2.07 ± 0.30	1.89 ± 0.59
抑制	7	62.46 ± 4.10 [▲]	5.40 ± 1.70	1.49 ± 0.27	1.04 ± 0.26 ^{▲▲}

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与丹瓜方组比较,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$

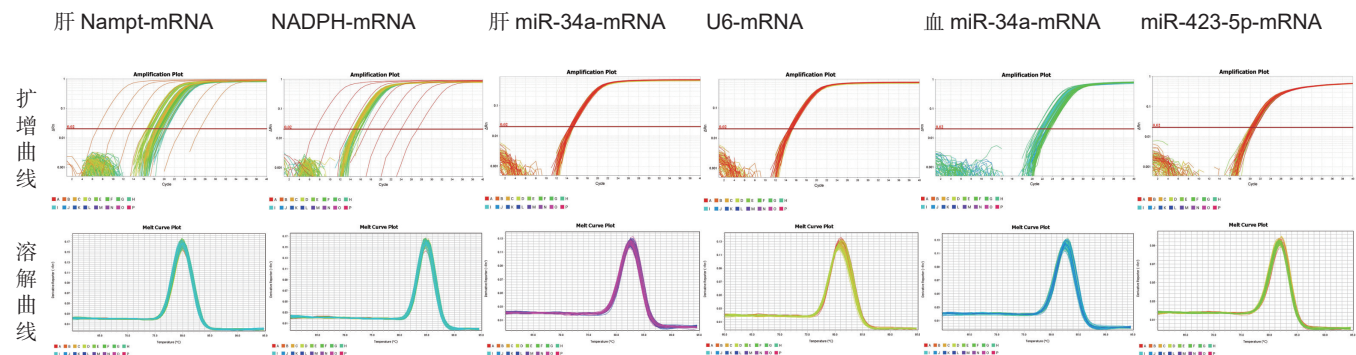


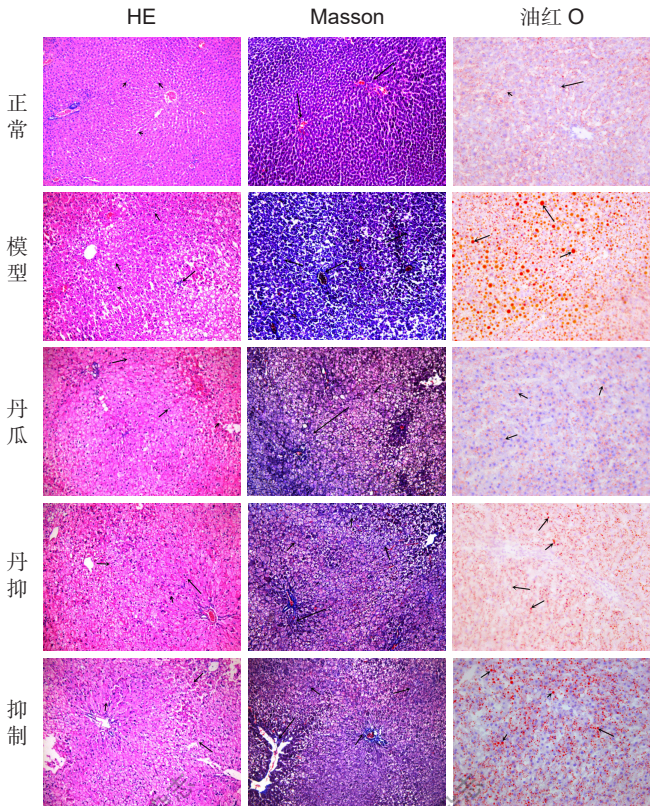
图 1 肝组织 Namp、miR-34a、血 miR-34a 及各内参的扩增曲线和溶解曲线

较紊乱，细胞间间隙较小，无明显炎性细胞浸润。抑制组肝索、肝窦放射状结构几近消失，细胞间紧密，汇管区明显炎性细胞聚集。Masson：正常组肝小叶无明显纤维化改变；模型组肝小叶呈网状变，网线粗且深染；丹瓜组无网状结构，丹抑组有间断纤维化结构；抑制组肝小叶网状结构显著。油红 O：正常组、丹瓜方组呈沙粒样脂染；模型组、抑制组脂滴满布，并有较大脂滴；丹抑组以小脂滴为主，基本上无大脂滴。

讨 论

miRNA 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子，由 pri-miRNA 经酶切后转化为 pre-miRNA 并再切而来，在动植物中参与转录后基因表达调控。其最广泛的功能是靶向负调控基因的 mRNA 水平，也可以与其他功能蛋白相结合，或直接激活 TLR 受体蛋白，或提高某些蛋白表达水平，或直接激活基因转录过程，或靶向负调控其他非编码 RNA 的前体 RNA，有的还可靶向调控线粒体相关基因 mRNA，功能非常复杂^[23]。目前已经发现 28 645 个 miRNA，其中 miR-34a 在代谢病领域受到越来越多的重视。研究发现，miR-34a 在肥胖的非酒精性脂肪肝（nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD）和 2 型糖尿病人群中都升高^[24, 25]，而且与糖尿病多种并发症相关^[26, 27]。

细胞内 Namp 是合成 NAD⁺ 补救途径的限速酶^[18]，NAD⁺ 既是三羧酸（tricarboxylic acid, TCA）循环的限速酶，也是主要呼吸链 NADH 氧化呼吸链的限速酶。Namp 受 miR-34a 的反向调控，miR-34a 通过 miR-34a/Namp 轴，可以影响能量代谢。GEN-617 阻断 Namp 表达，通过下调烟酰胺单核苷酸（nicotinamide mononucleotide, NMN）向 NAD 的转化，从而降低 TCA 循环通量，减少糖脂的分解，从而增加重体和糖、脂的贮积。目前尚未查到 Namp 阻断剂 GEN-617 与 miR-34a 相互调控的报道。研究表明，在高代谢细胞中，miR-34a 等 miRNAs 增加^[28]，所以高热量饮食会导致 miR-34a 的高水平^[29]。GEN-617 阻断 Namp 降低能量代谢，可能导致 miR-34a 水平相对下调。此外，Namp 阻断后脂肪代谢受到明显影响，脂肪的流动性降低可能与 miRNA 表达下降有关^[30]。



注：箭头所指：HE 指向肝索、肝窦，肝细胞；Masson 指向纤维化病变；油红 O 指向脂滴

图 2 各组肝组织 HE 染色、Masson 染色、油红 O 染色（×100）

氧化应激可升高 Namp 蛋白水平，这是因为适

度的氧化应激是生命体正常生理功能所必须, 高代谢通常伴随增加的氧化应激水平^[31]。模型组 Nampt 蛋白表达升高, 可能与高脂高糖导致的氧化应激增加有关。模型组 Nampt-mRNA 的表达与 Nampt 蛋白的表达水平不一致, 可能与模型组更复杂的代谢应激有关, 但造成这一结果的确切机制尚不清楚, 文献也有类似的 inconsistent 的结果^[32, 33], 尚待今后深入探索。相对于模型组, 丹瓜方上调 Nampt 蛋白水平, 与增加 Nampt-mRNA 的表达一致。相对于丹瓜方组, 丹抑组 Nampt-mRNA 表达下调, Nampt 蛋白也有所下调, 表明 Gen-617 减弱了丹瓜方对 Nampt 的调节效果。既往研究表明, 丹瓜方对于细胞膜系统功能具有一定的保护作用^[21, 13]。经丹瓜方干预后, 由于细胞膜的功能得到改善, 细胞内 miR-34a 能顺利地排出细胞而进入循环进行代谢, 使细胞内的 miR-34a 得以降低并相应升高了其在循环中的水平。

美国波士顿塔夫茨大学研究发现, 高糖饲养小鼠肝 miR-34a 表达上调, 同时沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1)、Nampt 的活性和 AMPK 磷酸化显著降低; 上调脂肪从头合成相关蛋白的表达; 下调与脂肪酸氧化有关的基因的 mRNA 表达; 降低胆固醇代谢相关基因的表达, 也上调肝脏炎症相关基因的表达^[29]。美国伊利诺伊大学研究发现, miR-34a 通过靶向 Nampt 降低 NAD⁺ 水平和 SIRT1 活性^[20]。miR-34a 的功能性结合位点存在于 Nampt-mRNA 基因的 3' 端非翻译区 (3'UTR) 中。肝 miR-34a 的过表达降低 Nampt/ NAD⁺ 水平, 上调 SIRT1 靶向转录调节因子过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator 1 α , PGC-1 α)、固醇调节元件结合蛋白-1c (sterol regulatory element-binding protein-1c, SREBP-1c)、法尼醇 X 受体 (Farnesoid X receptor, FXR) 和核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 的乙酰化程度, 从而导致肥胖表型。通过补充 NMN 以增加 NAD⁺ 的治疗措施, 可逆转 miR-34a 导致的部分下调。饮食诱导的肥胖小鼠中, 抑制 miR-34a 的作用可恢复 Nampt / NAD⁺ 水平并减轻肝脂肪变性、炎症和葡萄糖耐受不良^[34]。表明 miR-34a 对代谢的多方面影响, 都涉及 Nampt 及其下游因素 NAD⁺。本实验研究表明, 模型大鼠肝 miR-34a 表达显著升高, 同时伴 Nampt-mRNA 表达显著下调。经丹瓜方干预后, miR-34a 回调, 且 Nampt-mRNA 表达明显增加, 血 Nampt 蛋白水平显著升高。表 3 还显示特异

性 Nampt 阻断剂可阻断丹瓜方上调肝组织 Nampt-mRNA 表达的作用, 但 miR-34a 不受阻断剂影响。表明丹瓜方可靶向调控 Nampt-mRNA 表达以改善糖脂代谢异常表型特征。

胰岛素抵抗诱导的 ERK1 / 2 激活, ERK1 / 2 同向调节 miR-34a^[34]。说明是胰岛素抵抗导致了 miR-34a-mRNA 表达水平的升高。表 2 示丹瓜方干预后 HOMA-IR 降低, 提示表 3 中丹瓜方干预后 miR-34a-mRNA 水平的下降可能是间接由胰岛素抵抗减轻导致的, 而不是丹瓜方的直接靶向作用。

FFAs 包括油酸、软脂酸、亚油酸、棕榈酸等, 大部分 FFAs 与白蛋白结合存在于血液中, 以脂肪形式贮存的能量必须脂解成 FFAs 和甘油才能被组织利用。如果机体持续消耗的能量显著增加, 则必须由脂解贮脂以提供 FFAs 进行供能。肝脏既是重要的贮脂器官, 也是能量代谢的场所。肉碱棕榈酰转移酶 1A (recombinant carnitine palmitoyltransferase 1A, CPT1A) 和溶质载体家族 27A (solute carrier family 27A, SLC27A) 是 TG 特异性脂解基因, 受过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α) 的正向调节。miR-34a 抑制 PPAR α 的活性可降低 TG 脂解, 而 miR-34a 的拮抗剂 circRNA_0046366 则能上调 PPAR α 的活性、促进脂解, 降低细胞内脂肪^[35]。既往的研究表明, 丹瓜方对 NAFLD 具有显著防治作用, 不但上调肝组织 PPAR α -mRNA 表达, 并且对脂解与供能其它多种相关基因都具有调控作用^[5, 6, 8, 12, 14]。本研究显示丹瓜方干预显著减少了肝细胞的脂肪化, 并且升高了血浆 FFAs 水平。华盛顿大学医学院人类营养中心研究表明, 上调 Nampt 表达促进脂解对于调节适应性生热和全身能量代谢至关重要^[31]。人体棕色脂肪组织产热与相对高表达的 Nampt 促进脂解相关。介导 NAD⁺ 生物合成是 Nampt 促进脂解的途径^[36]。本文同时也表明, 丹瓜方确能上调肝细胞 Nampt-mRNA 表达及其蛋白的水平, 也可支持丹瓜方促进肝脏脂解的功能。表明丹瓜方促进了肝细胞脂解。一般认为 FFAs 释放增加, 会促进炎症和导致胰岛素抵抗^[37]。但本文表 2 显示, 丹瓜方干预组的 IR 不但没有加重反而减轻; 前期临床和实验研究均提示丹瓜方干预显著减轻代谢性炎症^[10, 11, 38]。这是因为 FFAs 导致 IR 是由 FFAs 在非脂组织异位沉积所致, 而丹瓜方促进肝脏脂解所升高的 FFAs 是用于氧化供能。研究表明, 丹瓜方显著增加三羧酸循环代谢、优化呼吸链功能, 促进多余的贮存脂肪分解消除和减轻体

重^[9, 11], 从而很好地解释了丹瓜方升高 FFAs 同时又减轻 IR 的实验结果。

糖尿病的基本病机是痰瘀互结^[39]。正常的食物入胃, 需要经过脾的运化传输才能到达靶器官被利用, 其中精微物质首先到达肝脏, 部分精微经肝脏的疏泄作用敷布到四肢百骸。正如《黄帝内经》所谓“食气入胃, 散精于肝, 淫气于筋”。如摄入过多, 脾胃受损, 失于升清, 则过多的精微化为痰浊, 壅结于肝, 甚而溢于四肢百骸, 发为肥胖。因此, 笔者认为糖脂代谢病发病过程就是“痰生于脾而壅滞于肝”的过程。肝为多气多血之脏, 气易郁而血易滞。如脾所生之痰贮于肝, 使肝内邪气更加壅滞, 血滞成瘀。且痰本生瘀, 又痰瘀互生, 终致痰瘀互结, 形成多食肥胖者的基本病机特征。病久者可因郁生热, 如伤及津液, 可发为消渴。丹瓜方功能化痰活血、清润通络, 重在祛邪, 兼防病邪的演变发展^[39]。其中薤白味辛性温, 功能通阳化痰、行气消滞, 所含槲皮素、柚皮素等多种成分^[40], 能改善胰岛素抵抗、降脂降糖^[41]; 瓜蒌含丰富的瓜蒌酸, 又称为石榴酸, 是一种“超级共轭亚油酸”, 具有显著的抗衰老和胰岛素抵抗作用^[42]。丹参含丹参酮、木犀草素, 具有改善代谢作用^[43]。丹参与瓜蒌相互为用, 痰瘀同治, 且丹参性微寒又兼养营血, 瓜蒌性寒而润, 二者配合清热祛邪又能护营阴, 活血化痰, 标本同治。赤芍、僵蚕、法半夏均含调节代谢化学成分, 可增强化痰活血之功效。前期研究表明, 该方能显著改善糖脂代谢, 对 2 型糖尿病、脂肪肝、代谢性心血管疾病都具有良好的治疗效果^[7-14]。本文进一步揭示其疗效机制与调控 miR-34/Nampt 轴有关。

利益冲突: 本文无相关利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Heng XP, Li XJ, Li L, et al. Therapy to obese type 2 diabetes mellitus: how far will we go down the wrong road? [J]. Chin J Integr Med, 2020, 26 (1): 62-71.
- [2] Heng XP, Yang LQ, Chen ML, et al. Paradox of using intensive lowering of blood glucose in diabetics and strategies to overcome it and decrease cardiovascular risks[J]. Chin J Integr Med, 2015, 21 (9): 425-434.
- [3] Heng XP, Chen KJ, Hong ZF, et al. Glucose endothelial cytotoxicity and protection of Dan-Gua-Fang, a Chinese herb prescription in huvec in hyperglycemia medium[J]. J Diabetes Complicat, 2009, 23 (5): 297-303.
- [4] Heng XP, Chen KJ, Hong ZF, et al. Toxicity features of high glucose on endothelial cell cycle and protection by Dan-Gua-Fang in ECV-304 in high glucose medium[J]. Chin J Integr Med, 2013, 19 (8): 596-602.
- [5] 衡先培, 李亮, 王志塔, 等. 糖脂代谢肝病传脾基因本质研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41 (1): 56-64.
- [6] 蓝元隆, 李亮, 衡先培, 等. 丹瓜方对 ApoE^{-/-} 糖尿病小鼠肝脏 AdipoR2 表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36 (9): 1097-1102.
- [7] Lan YL, Huang SP, Heng XP, et al. Dan-gua Fang improves glycolipid metabolic disorders by promoting hepatic adenosine 5'-monophosphate activated protein kinase expression in diabetic Goto-Kakizaki rats[J]. Chin J Integr Med, 2015, 21 (3): 188-195.
- [8] 黄苏萍, 康文倩, 刘永进, 等. 丹瓜方对糖尿病大鼠肝脏 LKB1、AMPK、SIRT1 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34 (9): 4003-4007.
- [9] 衡先培, 黄苏萍, 程心玲, 等. 丹瓜方干预糖尿病动脉粥样硬化大鼠糖脂代谢及氧化应激研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33 (2): 244-251.
- [10] 杨柳清, 李亮, 衡先培, 等. 丹瓜方对糖尿病动脉粥样硬化大鼠炎症标志物及内皮细胞功能的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37 (6): 692-698.
- [11] 衡先培, 李亮, 黄苏萍, 等. 丹瓜方对 ApoE 糖尿病模型小鼠糖脂代谢及血管细胞粘附分子-1 及 mRNA 表达水平的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34 (9): 1086-1095.
- [12] 徐睿熙, 王志塔, 陈依楚, 等. 丹瓜方对糖尿病大鼠心肌 ATP、PPAR- α 、GLUT-4 及形态的影响研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38 (11): 1363-1368.
- [13] 陈依楚, 李亮, 衡先培, 等. 丹瓜方对 ApoE^{-/-} 糖尿病模型小鼠脑组织 Caspase-3 蛋白及 Bcl-2、Bax mRNA 表达水平的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37 (12): 1476-1481.
- [14] 衡先培, 杨柳清, 李亮, 等. 丹瓜方调控 ApoE^{-/-} 糖尿病模型小鼠肾脏 p38-MAPK、MCP-1、FN 蛋白及 mRNA 表达研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018,

- 38 (4): 459–465.
- [15] 衡先培, 杨柳清, 黄苏萍, 等. 丹瓜护脉口服液干预 2 型糖尿病患者主要心血管危险因素的临床研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39 (3): 275–281.
- [16] Fu T, Kemper JK. MicroRNA-34a and impaired FGF19/21 signaling in obesity[J]. *Vitam Horm*, 2016, 101: 175–196.
- [17] Collier JB, Schnellmann RG. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 regulates NAD metabolism during acute kidney injury through microRNA-34a-mediated NAMPT expression[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77 (18): 3643–3655.
- [18] Grolla AA, Miggiano R, Di Marino D, et al. A nicotinamide phosphoribosyltransferase-GAPDH interaction sustains the stress-induced NMN/NAD⁺ salvage pathway in the nucleus[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295 (11): 3635–3651.
- [19] Lundt S, Zhang N, Wang X, et al. The effect of NAMPT deletion in projection neurons on the function and structure of neuromuscular junction (NMJ) in mice[J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 99.
- [20] Choi SE, Fu T, Seok S, et al. Elevated microRNA-34a in obesity reduces NAD⁺ levels and SIRT1 activity by directly targeting NAMPT[J]. *Aging Cell*, 2013, 12 (6): 1062–1072.
- [21] Heng XP, Wang ZT, Li L, et al. Mechanisms of Dangua Recipe in improving glycolipid metabolic disorders based on transcriptomics[J]. *Chin J Integr Med*, 2022, 28 (2): 130–137.
- [22] 李光伟. 胰岛素抵抗评估及其临床应用 [J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2004, 3 (1): 11–13.
- [23] Dragomir MP, Knutsen E, Calin GA, et al. SnapShot: unconventional miRNA functions[J]. *Cell*, 2018, 174 (4): 1038–1038.
- [24] Oses M, Margareto Sanchez J, Portillo MP, et al. Circulating miRNAs as biomarkers of obesity and obesity-associated comorbidities in children and adolescents: a systematic review[J]. *Nutrients*, 2019, 11 (12): 2890.
- [25] 孔磊, 韩文霞, 姜秀云, 等. 2 型糖尿病发病过程中外周血 miR-34a 的表达水平及其临床意义 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2010, 48 (10): 1–3.
- [26] Thounaojam MC, Bartoli M. MicroRNA-34a and vascular senescence in diabetes[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11 (24): 11799–11800.
- [27] Banerjee J, Roy S, Dhas Y, et al. Senescence-associated miR-34a and miR-126 in middle-aged Indians with type 2 diabetes [J]. *Clin Exp Med*, 2019, 20 (1): 149–158.
- [28] Liu X, Chai B, Wang X, et al. Environmentally persistent free radical promotes lung cancer progression by regulating the expression profile of miRNAs[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2022, Doi: 10.1089/cbr.2021.0378.
- [29] Li X, Lian F, Liu C, et al. Isocaloric pair-fed high-carbohydrate diet induced more hepatic steatosis and inflammation than high-fat diet mediated by miR-34a/SIRT1 axis in mice[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16774.
- [30] Monchusi B, Kaur M. miRNAs as modulators of cholesterol in breast cancer stem cells: an approach to overcome drug resistance in cancer[J]. *Curr Drug Targets*, 2022, 23 (6): 656–677.
- [31] 黄琼, 丁鹤林. 尼克酰胺磷酸核糖转移酶功能研究进展 [J]. 国际内科学杂志, 2009, 36 (11): 648.
- [32] Hingorani P, Zhang W, Zhang Z, et al. Trastuzumab deruxtecan, antibody-drug conjugate targeting HER2, is effective in pediatric malignancies: a report by the pediatric preclinical testing consortium[J]. *Mol Cancer Ther*, 2022, 21 (8): 1318–1325.
- [33] Song P, Jiang N, Zhang K, et al. Ecotoxicological evaluation of zebrafish liver (Danio rerio) induced by dibutyl phthalate[J]. *J Hazard Mater*, 2022, 425: 128027.
- [34] Choi SE, Fu T, Seok S, et al. Elevated microRNA-34a in obesity reduces NAD⁺ levels and SIRT1 activity by directly targeting NAMPT[J]. *Aging Cell*, 2013, 12 (6): 1062–1072.
- [35] Guo XY, Sun F, Chen JN, et al. circRNA_0046366 inhibits hepatocellular steatosis by normalization of PPAR signaling[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24 (3): 323–337.
- [36] Yamaguchi S, Franczyk MP, Chondronikola M, et al. Adipose tissue NAD⁺ biosynthesis is required for regulating adaptive thermogenesis and whole-body energy homeostasis in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116 (47): 23822–23828.
- [37] 马慧娟. 游离脂肪酸与胰岛素抵抗 [J]. 国外医学 (老

- 年医学分册), 2002, 23 (3): 122-125.
- [38] 衡先培, 褚克丹, 林青, 等. 丹瓜方对血糖控制不良 2 型糖尿病患者 TNF- α 的干预研究 [J]. 福建中医学院学报, 2009, 19 (2): 9-12.
- [39] 衡先培, 杨柳清, 李亮. 基于代谢病肝病传脾探索早期干预 2 型糖尿病的新思路 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35 (5): 756-761.
- [40] 王荣, 白思慧, 王露露, 等. 薤白的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2021, 40 (10): 73-82.
- [41] Hosseini A, Razavi BM, Banach M, et al. Quercetin and metabolic syndrome: a review [J]. Phytother Res, 2021, 35 (10): 5352-5364.
- [42] Takenaga M, Hirai A, Terano T, et al. *In vitro* effect of trichosanic acid, a major component of *Trichosanthes japonica* on platelet aggregation and arachidonic acid metabolism in human platelets [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1988, 31 (2): 65-72.
- [43] Pereira OR, Catarino MD, Afonso AF, et al. *Salvia elegans*, *salvia greggii* and *salvia officinalis* decoctions: antioxidant activities and inhibition of carbohydrate and lipid metabolic enzymes [J]. Molecules, 2018, 23 (12): 3169.
- (收稿: 2020-11-04 在线: 2023-01-10)
- 责任编辑: 汤 静

欢迎订阅 2023 年 *Chinese Journal of Integrative Medicine*

Chinese Journal of Integrative Medicine 《中国结合医学杂志》是由中国中西医结合学会、中国中医科学院主办的国际性学术期刊, 旨在促进结合医学及替代医学的国际交流, 及时发表结合医学或替代医学领域的最新进展、趋势以及临床实践、科学研究、教育、保健方面经验和成果的科学论文。1995 年创刊, 由中国科学院院士陈可冀担任主编。设有述评、专题笔谈、论著、临床经验、病例报道、综述、药物相互作用、法规指南、学术探讨、思路与方法、跨学科知识、会议纪要、书评、读者来信等栏目。本刊被多种国际知名检索系统收录, 如: Science Citation Index Expanded (SCI-E)、Index Medicus/Medline、Chemical Abstracts (CA)、Abstract Journal (AJ)、CAB Abstracts、CAB International、Excerpta Medica (EMBASE)、Expanded Academic、Global Health、Google Scholar、Index Copernicus (IC)、Online Computer Library Center (OCLC)、SCOPUS 等。本刊于 2007 年被 SCI-E 收录, 2022 年 6 月底科睿唯安公布 2021 年本刊 SCI 影响因子为 2.626。2010 年 10 月 1 日与汤森路透集团签约, 正式采用 ScholarOne Manuscripts 在线投审稿系统。

Chinese Journal of Integrative Medicine 为大 16 开本, 铜版纸印刷, 彩色插图, 2011 年改为月刊, 80 页, 国内定价, 60.00 元/期, 全年定价: 720.00 元。国际标准刊号: ISSN 1672-0415, 国内统一刊号: CN 11-4928/R, 国内邮发代号: 82-825, 海外发行由 Springer 公司代理。国内订户在各地邮局均可订阅, 也可直接汇款至本社邮购。

地址: 北京市海淀区西苑操场 1 号, 中国中西医结合杂志社, 邮政编码: 100091; 电话: 010-62886827, 62876547, 62876548; 传真: 010-62876547-815; E-mail: cjim_en@cjim.cn; 网址: <http://www.cjim.cn>。