|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 分类号： |  | 密级： |
| U D C ： |  | 编号： |

**学 位 论 文**

二甲双胍对非酒精性脂肪肝细胞模型脂质沉积、

**PGC-1α** 表达和氧化应激水平的影响

Effects of Metformin on the lipid accumulation , the expression of PGC-1α and the level of oxidative stress in Nonalcoholic fatty liver cells model

**程 靖**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **指导教师姓名** | 蒋建华 副教授 安徽医科大学第一附属医院 | | | |
| **申请学位级别** | 硕士 |  | **专 业 名 称** | 内科学（内分泌与代谢病） |
| **提交论文日期** | 2014/03/10 | | **论文答辩日期** | 2014/05/03 |
| **课题基金来源** | 安徽省自然科学  基金 | | **项 目 编 号** | No. 11040606M200 |
| **学位授予单位和日期** | | 安徽医科大学 2014-06 | | |
|  | |  | **答辩委员会主席** | |
|  | |  | **评** 阅 人 | |
|  | |  | 2014 年 05 月 | |

安徽医科大学

Anhui Medical University

硕士学位论文

论 文 题 目：二甲双胍对非酒精性脂肪肝细胞模型脂质沉积、PGC-1α 表达和氧化应激水平的影响

Effects of Metformin on the lipid accumulation , the expression of PGC-1α and the level of oxidative stress in Nonalcoholic fatty liver cells model

作 者： 程 靖

指 导 老 师： 蒋建华 副教授

专 业 方 向： 内科学（内分泌与代谢病）研 究 方 向： 营养与代谢性疾病

论文工作时间 2013 年 6 月至 2014 年 4 月课题基金来源 安徽省自然科学基金项目，

No. 11040606M200。

二〇一四 年 三月

学位论文独创性声明

本人所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确说明并表示谢意。

学位论文作者签名： 日 期：

学位论文使用授权声明

本人完全了解安徽医科大学有关保留、使用学位论文的规定：学校有权保留学位论文并向国家主管部门或其指定机构送交论文的电子版和纸质版，有权允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。愿意将本人的学位论文提交《中国博士学位论文全文数据库》、《中国优秀硕士学位论文全文数据库》和《中国学位论文全文数据库》中全文发表，并可以以电子、网络及其他数字媒体形式公开出版，并同意编入 **CNKI**《中国知识资源总库》，在《中国博硕士学位论文评价数据库》中使用和在互联网上传播。保密的学位论文在解密后适用本规定。

学位论文作者签名： 导师签名：

日期： 日期：

目 录

[摘 要](#_Toc686563676) 7

**[1.](#_Toc686563677)** [电镜下观察](#_Toc686563677) 7

[2. 细胞内甘油三酯水平](#_Toc686563678) 7

[结 论](#_Toc686563679) 8

**[Abstract](#_Toc686563680)** 8

[3. 方法](#_Toc686563681) 11

[4. 结果](#_Toc686563682) 15

[5. 讨论](#_Toc686563683) 19

**[6](#_Toc686563684)** [结论](#_Toc686563684) 20

[参考文献](#_Toc686563685) 20

[附 录](#_Toc686563686) 22

[参考文献](#_Toc686563687) 24

**英文缩略词**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文全称 |
| AMPK | Adenosine 5'-monophosphate  (AMP)-activated protein kinase | AMP 依赖的蛋白激酶 |
| CPT-I | Carnitine Palmitoyltransferase I | 肉毒碱棕榈酰基转移酶 |
| FBS | Fasting blood sugar | 空腹血糖 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | 二甲基亚砜 |
| ER | Estrogen receptor | 雌激素受体 |
| FFA | Free fatty acid | 游离脂肪酸 |
| Fig | Figure | 图 |
| FINS | Fasting insulin | 空腹胰岛素 |
| FBG | Fasting blood sugar | 空腹血糖 |
| FIRI | Fasting insulin resistance index | 空腹胰岛素抵抗指数 |
| G-6-Pase | Glucose-6-phosphatase | 葡萄糖-6-磷酸酶 |
| GR | Glucocorticoid receptor | 糖皮质激素受体 |
| GLUT4 | Glucose transporter type4 | 葡萄糖运载体 4 |
| HNF4α | Hepatocyte nuclear factor 4α | 肝细胞核因子 4α |
| HMG-CoA | 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme  A reductase | 3-羟基-3-甲基戊二酰辅  酶 A 还原酶 |
| HDL-C | High density lipoprotein-cholesterol | 高密度脂蛋白胆固醇 |
| IR | Insulin resistance | 胰岛素抵抗 |
| LDL-C | Low density lipoprotein-cholesterol | 低密度脂蛋白胆固醇 |
| LCAD | Long-chain acyl-coenzyme A  dehydrogenase | 长链乙酰辅酶 A 脱氢酶 |
| MDA | Malondialdehyde | 丙二醛 |
| MCAD | Medium-chain acyl-coenzyme A | 中链乙酰辅酶 A 脱氢酶 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | dehydrogenase |  |
| MEF-2 | Myocyte-enhancer factor-2 | 肌原细胞增强因-2 |
| NAFLD | Nonalcoholic fatty liver disease | 非酒精性脂肪肝病 |
| NRF | Nuclear Respiratory Factors， | 核呼吸因子 |
| OD | Optical density | 光密度 |
| P | Probability | 概率 |
| PGC-1α | Peroxisome proliferators-activated  receptor-γcoactivator-1α， | 过氧化物酶体增殖物激  活受体 γ 辅激活因子 1α |
| PEPCK | Phosphoenol-pyruvate carboxy kinase | 磷酸烯醇式丙酮酸激酶 |
| PPAR | Peroxisome proliferator-  Activated receptor-gamma | 过氧化物酶体增殖体激  活受体 |
| RT-PCR | Reverse transcription-polymerase chain  reaction | 逆转录-聚合酶链反应 |
| ROS | Reactive oxygen species | 活性氧簇 |
| SOD | Superoxide dismutases | 超氧化物歧化酶 |
| Tab | Table | 表 |
| TG | Triglycerides | 甘油三酯 |
| TNF-α | Tumor necrosis factor-alpha | 肿瘤坏死因子-α |

二甲双胍对非酒精性脂肪肝细胞模型脂质沉积、

PGC-1α表达和氧化应激水平的影响

摘 要

**研究目的**

以油酸诱导正常人肝脏细胞L-02细胞建立NAFLD细胞模型，研究NAFLD形成前后核转录共激活因子PGC-1α表达、脂质及氧化应激水平的变化，在模型建立成功的基础上添加胰岛素增敏剂二甲双胍，观察不同浓度二甲双胍对NAFLD细胞模型PGC-1α基因及蛋白质的表达、氧化应激水平的影响，以及PGC-1α的表达与肝脏细胞脂肪堆积、线粒体损伤及氧化应激的关系，探讨PGC-1α 在

NAFLD发病过程中的作用，从而进一步阐明NAFLD的发病机制及二甲双胍用于

NAFLD治疗的作用机制。

**研究方法**

用20µg/ml 油酸（油酸以0. 5%DMSO溶解）诱导正常人肝脏细胞L-02细胞

72h，建立非酒精性脂肪变性肝细胞模型。通过电镜观察及细胞内甘油三酯水平的检测鉴定模型建立成功。对照组加入含10%胎牛血清的普通1640培养基。在模型组中分别添加含2.5、5、7.5 mmol/l终浓度的二甲双胍分别建立低、中、高剂量组，标记为1、2、3组，继续培养24h后收集细胞。采用RT-PCR检测L-02细胞PGC-1αmRNA的转录，Western blot技术检测L-02细胞PGC-1α蛋白质的表达，采用甘油三酯（组织细胞）酶法测定试剂盒检测L-02细胞中甘油三脂的变化，采用硫代巴比妥酸反应法测定细胞MDA含量，采用黄嘌呤氧化物法测定细胞SOD活性。

**结果**

# **1.** 电镜下观察

对照组细胞中可见少量大小不等的脂滴，线粒体呈椭圆形或圆形，嵴膜清晰。模型组细胞中脂滴明显增多（生化检测示模型组细胞内甘油三酯水平明显升高，说明油酸诱导造模成功），少数线粒体出现空泡样改变。二甲双胍终浓度为

2.5mmol/l（1组）、5mmol/l（2组）组细胞中可见脂滴分布，线粒体空泡样改变有所减少。二甲双胍终浓度为7.5mmol/l（3组）组细胞中可见较少脂滴，线粒体稍肿胀，但线粒体嵴膜清晰。

# 2. 细胞内甘油三酯水平

与对照组相比，模型组细胞内甘油三酯水平明显升高，差异有统计学意义

（*P*<0.05）；当二甲双胍终浓度为7.5mmol/l时，细胞内甘油三脂明显减少，与模型组相比差异有统计学意义（*P*<0.05）；二甲双胍终浓度为7.5mmol/l组比终浓度为2.5mmol/l组细胞内甘油三脂明显减少，差异有统计学意义（*P*<0.05）；

**3.细胞内MDA浓度和SOD活力**

与对照组相比，模型组细胞内MDA 浓度明显升高，差异有统计学意义

（*P*<0.05），而SOD活力却明显降低，差异有统计学意义（*P*<0.05）；与模型组相比，当二甲双胍终浓度为5mmol/l组、7.5mmol/l时，细胞内MDA浓度明显降低，差异有统计学意义（*P*<0.05），而SOD活力却升高，差异有统计学意义（*P*<0.05）；与二甲双胍终浓度为2.5mmol/l组相比，当二甲双胍终浓度为5mmol/l、7.5mmol/l时，细胞内MDA浓度明显降低，差异有统计学意义（*P*<0.05），而SOD活力却升高，差异有统计学意义（*P*<0.05）。

**4.细胞PGC-1αmRNA转录水平**

与对照组相比，模型组L-02细胞中PGC-1αmRNA表达量明显减少，差异具有统计学意义(*P*<0.05)。与模型组相比，当二甲双胍终浓度为2.5mmol/l、5mmol/l、

## 7.5 mmol/l时L-02细胞中PGC-1αmRNA表达量明显增多，差异具有统计学意义

（*P*<0.05）. 二甲双胍终浓度为7.5mmol/l组比终浓度为2.5mmol/l组细胞内PGC-1α

mRNA表达量明显增多，差异具有统计学意义(*P*<0.05)。

**5.细胞PGC-1α蛋白质表达水平**

与对照组相比，模型组L-02细胞中PGC-1α蛋白质表达量明显减少，差异具有统计学意义(*P*<0.05)。与模型组相比，当二甲双胍终浓度为5mmol/l、7.5mmol/l时L-02细胞中PGC-1α蛋白质表达水平明显增多，差异具有统计学意义（*P*<0.05）。

**6.相关性**

肝细胞中PGC-1α表达水平与甘油三酯、MDA及SOD的相关性：L-02细胞中PGC-1αmRNA、蛋白质的表达水平与细胞内甘油三酯的水平呈负相关(*r*=-0.581、-0.601, *P*<0.05)；PGC-1αmRNA、蛋白质的表达水平与细胞内MDA的水平呈负相关(*r*=-0.629、-0.571, *P*<0.05)；PGC-1αmRNA、蛋白质的表达水平与细胞内SOD的水平呈相关（*r*=0.746、0.574, *P*<0.05） 。

结 论

1、用20µg/ml油酸诱导L-02细胞可成功构建NAFLD细胞模型。

2、PGC-1α表达水平降低可能在NAFLD的发病过程中起着重要的作用。

3、二甲双胍可改善NAFLD细胞模型内的氧化应激水平。

4、二甲双胍通过调节细胞内PGC-1α的表达及氧化应激水平从而减少脂肪堆积可能是用于非酒精性脂肪肝治疗的分子机制之一。

关键词 非酒精性脂肪肝病； PGC-1α； 二甲双胍； MDA； SOD

Effects of Metformin on the lipid accumulation , the expression of PGC-1αand the level of oxidative stress in Nonalcoholic fatty liver cells model

**Objective**

**Abstract**

L-02 cells were treated by 20µg/ml oleic acid (oleic acid was solutioned by 0. 5% DMSO) for 72h to induce the Nonalcoholic fatty liver cell model. To study the expression changes of PGC-1αand the levels of lipide as well as soxidative stress before and after the formation of NAFLD, added insulin sensitizer metformin based on the successful cells model, to observe the different concentrations of Mefformin on the expression of PGC-1αgene and protein as well as the level of soxidative stress, and the connection of PGC-1αamong lipide accumulation , the injury of mitochondria and soxidative stress in NAFLD cells model, to explore the role of PGC-1αon the pathogenesis of NAFLD, to elucidate the pathogenesis of NAFLD and the mechanism of the treatment of metformin for NAFLD.

**Method**

L-02 cells were treated by 20µg/ml oleic acid (oleic acid was solutioned by 0. 5% DMSO) for 72h to induce the Nonalcoholic fatty liver cell model. Testing the cells model by the observation under electron microscope and the detection of intracellular triglyceride level. The control group added ordinary 1640 culture medium containing 10% fetal bovine serum. The model group cells were cultured in the medium containing 2.5, 5, 7.5 mmol/l concentrations of metformin which were marked 1, 2, 3 groups and continue to cultivate 24 hour then collected cells. Use RT-PCR analysis of PGC-1αmRNA expression, measure the expression of PGC-1αprotein by Western blotting and use triglycerides (tissue) enzymatic assay kit to detect changes of

Triglycerides in L-02 cells. Using glucosinolates barbituric acid reaction method determination of MDA content, SOD activity was evaluated by xanthine oxidation method.

**Result**

**1. Observed under the electron microscope**

The structure of organelles under the electron microscope: Many mitochondria can be seen in cells of control group, their shape is elliptical or round, and the membrane and carinulae of mitochondria were clear. In the model group, the number of mitochondria was decreased apparently. The membrane and inner carinulae in deformed mitochondria were absent, most of mitochondrions changed to vacuole after the cells exposed to oleic acid(The level of intracellular triglyceride by biochemical detection showed that a increasing level in model group, it indicated that we successfully built up NAFLD cells model). when the final concentration of metformin was respectively 2.5mmol/l(Group1), 5mmol/l(Group2), the vacuolation of mitochondria were decreased. When the final concentration of metformin is 7.5mmol/l(Group3), the mitochondria were a little swelling, but the membrane and carinulae of mitochondria were clear and with a obvious reduction of vacuolation.

**2. The level of triglyceride in cells**

Compared with the control group, the level of triglyceride in the cells of the model group increased obviously, and the difference was statistically significant (*P*<0.05). When the final concentration of metformin is 7.5mmol/l, the level of triglyceride decreased compared with the model group and the difference was statistically significant(*P*<0.05). The level of triglyceride in the Group3 ( metformin 7.5mmol/l) decreased compared with Group1(metformin2.5mmol/l), the difference was statistically significant(*P*<0.05).

**3. The concentration of MDA and the vitality of SOD in cells**

Compared with the control group , the concentration of MDA was increased apparently with a difference of statistical significance(*P*<0.05), and the vitality of SOD is reduced significantly , the difference was statistically significant(*P*<0.05). Compared with the model group , when the final concentration of metformin is 5mmol/l , 7.5mmol/l, the concentration of MDA was reduced apparently with a difference of statistical significance(*P*<0.05), and the vitality of SOD is increased significantly , the difference was statistically significant(*P*<0.05). Compared with the final concentration of metformin was 2.5mmol/l group , when the final concentration of metformin was respectively 5mmol/l, 7.5mmol/l, the concentration of MDA was reduced apparently with a difference of statistical significance(*P*<0.05), and the vitality of SOD is increased significantly , the difference was statistically significant(*P*<0.05).

**4. PGC-1αtranscription level in cells**

Compared with the control group, the expression of PGC-1αmRNA in L-02 cells in model group decreased apparently with a difference of statistical significance(*P*<0.05). Compared with the model group, when the final concentration of metformin was respectively 2.5mmol/l, 5mmol/l, 7.5mmol/l, the expression of PGC-1αmRNA in L-02 cells were increased obviously and with a differences of statistical significance (*P*<0.05). The expression of PGC-1α mRNA in Group3 was higher than that in Group1 with a difference of statistical significance (*P*<0.05).

**5. The expression of PGC-1αprotein in cells**

Compared with the control group, the expression of PGC-1αprotein in L-02 cells in model group decreased obviously with a statistically significant difference(*P*<0.05). Compared with the model group , when the final concentration of metformin was respectively 5mmol/l, 7.5mmol/l, the expression of PGC-1αprotein in L-02 cells was

Increased obviously with a statistically significant difference (*P*<0.05).

**6. correlation**

The expression of PGC-1αmRNA and protein showed a negative correlation with the triglyceride levels in L-02 cells(*r*=-0.581, -0.601, *P*<0.05); The expression of PGC-1α mRNA and protein showed a negative correlation with the concentration of MDA in L-02 cells(*r*=-0.629, -0.571, *P*<0.05); The expression of PGC-1α mRNA and protein showed a positive correlation with the the vitality of SOD in L-02 cells(*r*=0.746, 0.574, *P*<0.05).

**Conclusions**

1. NAFLD cells model can be induced in L-02 cells by 20µg/ml oleic acid.

2. The decrease of the expression level of PGC-1αmay plays an important role in the pathogenesis of NAFLD.

3. Metformin can improve the level of oxidative stress in NAFLD cell model

4. Metformin can adjust the expression of PGC-1αand the level of oxidative stress which can decrease the fat accumulation, Maybe this is one of the molecular mechanism in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease.

**Key Words** Non-alcoholic; Fatty liver; Disease; / Peroxisome proliferators-activated receptor-gamma coactivator-1alpha / Metformin / MDA / SOD

二甲双胍对非酒精性脂肪肝细胞模型脂质沉积、

PGC-1α表达和氧化应激水平的影响

**1.前言**

近年来，随着生活水平的提高及饮食习惯的改变，非酒精性脂肪肝(Nonalcoholic fatty liver, NAFLD)的发病率呈上升趋势。NAFLD是患者无饮酒史，主要表现为肝细胞变性和脂肪贮积等症状的临床综合病理特征，多由遗传-环境-代谢多因素所致，可导致多种心脑血管疾病。NAFLD被认为是代谢综合征在肝脏的表现[1]，其和胰岛素抵抗(Insulin resistance, IR)和代谢综合征的发病密切相关。NAFLD患者常常伴有肥胖、葡萄糖耐量受损、2型糖尿病等IR症状，因此对于

NAFLD的治疗，关键在于改善与IR有关的代谢紊乱。

NAFLD的发病机制尚不明确。近年“二次打击”[2]学说被越来越多的研究者所认同，该学说认为第一次打击主要是IR. IR可以通过促进高胰岛素血症和增加外周脂肪的分解引起肝细胞脂肪变性，脂肪变性的肝脏细胞活力相对不足并且对内、外源性损伤因子的敏感性也明显增强。第二次打击主要为随着氧化应激反应代谢物的增多，与脂质过氧化有关的细胞因子、Fas配体和线粒体解偶联蛋白2等被激活，从而进一步导致脂肪变性的肝细胞发生炎症坏死、纤维化。因此多认为NAFLD的发病是以IR为中心的。有研究提示，高胰岛素血症及IR为可能是引起原发性NAFLD的中心性环节和始动性因素而非NAFLD自身发展的结果[3]，其他因素如药物、肠外营养、胆碱缺乏、载脂蛋白B基因突变等也可与IR一同或者单独导致肝脏脂肪变性。

PPAR是过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator activated receptors, PPARs)的一个亚型，是一类由配体激活的核转录因子，属于核受体超家族成员，分为三种亚型，即PPAR-α、PPAR-β、PPAR-γ。过氧化物酶体增殖物激活受体γ辅激活因子1α(peroxisome proliferators-activated receptor-γcoactivator-1α, PGC-1α)是一种核转录共激活因子，在糖脂代谢中是一种核受体转

录辅助活化因子，可通过激活糖异生、脂肪酸氧化、线粒体呼吸的关键酶参与了

IR、线粒体损伤和脂代谢紊乱的形成，而这些目前已经被公认参与NAFLD的发生机制。

PGC-1α有与机体细胞多种受体结合的位点，主要有过氧化物酶体增殖物活化受体(PPARs)、糖皮质激素受体(GR)、细胞核呼吸因子(NRF) -1、视黄酸X受体(RXR)、雌激素受体(ER)等。PGC-1α对PPAR-α的协同刺激作用可增加脂肪酸β氧化酶的转录活性。当哺乳动物细胞转染PGC-1α后，PPAR-α介导的下游靶基因得转录活性明显增强。共同转染PGC-1α和PPAR-α的细胞与单独转染PGC-1α或PPAR-α者相比，其脂肪酸氧化有关酶如长链乙酰辅酶A脱氢酶(LCAD)的表达水平显著增加，细胞内棕榈酸的氧化速率也明显增加[4]。在PGC-1α基因被敲除的小鼠肝脏中，其甘油三酯检测水平比对照组增加了将近3倍，但是脂肪酸氧化酶的mRNA表达水平如肌肉肉毒碱棕榈酰基转移酶-1(CPF-1)、乙酰辅酶A氧化酶及中链乙酰辅酶A脱氢酶(MCAD)等水平比对照组降低了90％-94％[5]。PGC-1α还可以协同激活HNF4α和PPAR-γ，从而进一步增加famesoid X受体(FXR)的基因的表达水平。另外，PGC-1α还可与FXR的DNA结合区直接作用，增强了FXR下游靶基因的表达水平，从而使空腹情况下肝脏中甘油三酯的输出量明显减少，并且增加了其β氧化的水平以保证机体代谢的平衡和能量的供给[6]。

PGC-1α是一种重要的协同刺激因子之一，它除了可与细胞受体结合外还可以与体内的多种转录因子结合从而发挥不同的生理功能。PGC-1α与肌细胞特异性增强子(MEF) -2的结合可以增加骨骼肌葡萄糖运载体4(GLUT4)的表达水平，从而使餐后血糖水平明显下降。而与细胞核呼吸因子(NRF) -1的结合可以调控机体线粒体的功能及产热水平，从而影响肥胖的发生和发展；但在病理情况下，骨骼肌中的PGC-1α表达水平却明显下降，这可能是引起糖尿病患者餐后血糖升高的重要原因之一。因为正常水平的PGC-1α可以与糖皮质激素受体(GR)和HNF4α结合促进肝脏的糖异生，从而维持机体空腹或长期禁食状态下的血糖水平的稳定。相反，在有些病理情况下，肝脏中PGC-1α表达的水平可异常增高，其可以激活糖异生的关键酶，使肝糖输出明显增多，从而使空腹血糖水平升高，这在肝脏IR

的形成和发展中起着关键的作用。因此PGC-1α的表达水平异常无论是过低还是过高都可以引起机体代谢的紊乱。近年来PGC-1α在脂质代谢和糖代谢中的作用已经成为越来越多的学者研究的热点。将来以PGC-1α为作用靶点开发研究调节糖脂代谢的药物和减肥药物也得到了广大学者的重视。

“二次打击”学说认为氧化应激反应代谢产物的增多及脂质过氧化在NAFLD

发病过程中起着重要的作用。当肝细胞发生脂肪变性时，游离脂肪酸（Free fatty

acid，FFA）的大量增多并超过了肝脏的氧化代谢能力，从而导致氧自由基的增多，而自由基的增多诱发了生物膜中不饱和脂肪酸的脂质过氧化反应，进一步加重了肝组织的损害[7]。产生的脂质过氧化物中最主要的是丙二醛（Malondialdehyde, MDA），其含量水平的高低可反映机体脂质过氧化的程度。超氧化物歧化酶

（Superoxide dismutases, SOD）是普遍存在于需氧代谢细胞中一种重要的抗氧化酶，SOD是一种生物活性的蛋白质，在体内维持自由基平衡中起着重要作用。

二甲双胍作为一种口服降糖药可促进外周组织对葡萄糖的利用和减少肝糖的输出。二甲双胍可以在不刺激胰岛素分泌的基础上改善IR和高胰岛素血症，还可以直接作用于胰岛素靶细胞如肝脏细胞、脂肪细胞、肌肉细胞等，通过受体后机制增加胰岛素的敏感性，因而二甲双胍也被用于非酒精性脂肪肝的治疗。胰岛素增敏药物二甲双胍在NAFLD的治疗中，不仅对改善IR、肝脏血清酶学指标和体重有明确的疗效[8]，而且对肝脏脂肪变性、肝细胞损伤和NAFLD活动评分也一定作用[9]。而最近一些研究[10-12]显示二甲双胍虽能改善IR等代谢紊乱症状却对肝脏组织学改善不明显，这可能与各研究中二甲双胍剂量、观察时间及评价方法不同等有关。所以对该药的具体疗效、治疗机制及其副作用仍有待研究。

AMPK是新近发现的一种细胞内能量代谢的重要调节因子，在体内AMPK不仅能调节脂肪酸的氧化，也参与机体胰岛素敏感性的调节。二甲双胍作为一种口服降糖药已被证实为AMPK的激活剂，可促进外周组织对葡萄糖的利用和减少肝糖的输出[13-14]。有研究认为AMPKα活化可通过激活PPARα和PPARγ的复合激活子1(PGC-1)增加小鼠骨骼肌细胞的脂肪酸氧化[15]。有研究[16]发现二甲双胍可以增加人类骨骼肌细胞PGC-1α的表达。在人类的肌小管中，PGC-1α的过表达增了

棕榈酸的氧化速率和调节脂质代谢相关基因的mRNA表达，并促进了线粒体的生物合成功能[17]。目前关于人肝脏细胞中PGC-1α的表达水平及二甲双胍干预的体外实验较少，但有研究显示在成年小鼠的肝脏细胞中二甲双胍可阻止雷帕霉素靶蛋白复合物2(TORC2) -调节的PGC-1α的上调[18]，所以二甲双胍对肝脏细胞PGC-1α的表达的影响及具体分子机制还有待进一步研究。

目前有许多研究提示PGC-1α在机体肝脏脂肪代谢中发挥作用，并且也有一些PGC-1α参与了NAFLD等肝脏代谢障碍性疾病发生的线索，相关研究已经明确IR 和高胰岛素血症为原发性NAFLD 发病的始动因素，但PGC-1α 在引起

NAFLD发生的过程中与IR之间的关系仍不清楚。本课题组前期动物实验研究发现，在高脂饮食诱导SD大鼠NAFLD过程中，NAFLD模型大鼠中肝脏PGC-1α

mRNA表达与空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)及空腹胰岛素抵抗指数(FIRI)呈显著正相关，而这些指标可间接反映反映IR的水平，因此，PGC-1α可能在IR的发生过程中起到了关键作用。

综上所述，PGC-1α与脂肪酸氧化、线粒体生物功能和脂代谢紊乱密切相关，研究不同浓度二甲双胍对PGC-1α 表达的影响，可进一步明确二甲双胍用于

NAFLD治疗的分子机制。二甲双胍已被证实为AMPK的激活剂，由此我们推测二甲双胍可能通过活化细胞内调节因子AMPKα从而激动PGC-1α基因的表达，以增加脂酶的活性和提高胰岛素敏感性，在调节肝脏的脂肪代谢功能和改善肝细胞脂肪变性等方面具有显著效果。

本课题的研究目的旨在观察不同浓度二甲双胍对NAFLD细胞模型PGC-1α基因及蛋白质表达、脂质氧化应激水平的影响，以及PGC-1α的表达与肝脏细胞脂肪堆积、线粒体损伤、氧化应激的关系，探讨PGC-1α在NAFLD发病过程中的作用，从而进一步阐明NAFLD的发病机制及二甲双胍用于NAFLD治疗的作用机制。

**2.材料**

## **2.1** 研究对象与分组

人肝细胞株(L-02)购自上海中国科学院细胞库；将离体培养的L-02细胞传代培养24h 后，待细胞生长稳定、融合度约达80%时，加入20µg/ml 油酸（油酸以

0.5%DMSO溶解）诱导72h形成非酒精性脂肪肝细胞模型。对照组加入含10%胎牛血清的普通1640培养基。在模型组中分别添加含2.5、5、7.5mmol/l终浓度的二甲双胍培养基分别建立1、2、3组，继续培养24h后收集细胞。

## 2.2 主要试剂

#### （1) TG 检测试剂盒 南京建成生物工程研究所

MDA、SOD试剂盒 南京建成生物工程研究所

BCA蛋白浓度测定试剂盒 碧云天公司。

#### （2) 胎牛血清 美国 Hyclone 公司

1640 培养基 美国 Gibco 公司

1:125胰蛋白酶 美国Gibco公司

二甲双胍 美国 Sigma 公司

Hank's 实验室配制

PBS 实验室配制

#### （3) RT 试剂盒 美国 Invitrogen 公司

PCR试剂盒 美国Invitrogen公司

PCR 引物 上海生工生物工程技术服务有公司溴化乙锭(EB) 美国 Sigma 公司产品

600bpDNA ladder Marker MBI 公司 焦碳酸二乙酯(DEPC) MBI 公司

Tris·HCl AMRESCO公司

琼脂糖 美国 Sigma 公司

异丙醇广东新宁化工厂

氯仿广东新宁化工厂

Trizol美国Invitrogen公司

无水乙醇上海鑫达精细化工有限公司

PGC-1α引物序列为：

上游：CAGCAAGTCCTCAGTCCTCAC下游：TGCCTCCAAAGTCTCTCTCAG

产物大小247 bp。β-actin引物序列为：

上游：GAAATGGAGGCACCCCTTC下游：TTGCCGACAGGATGCAGAA

产物大小100 bp。

#### （4) RIPA 裂解液 上海搏彩公司产品。

Protein molecular weight marker MBI公司

ECL显色试剂盒Santa Cruz公司

硝酸纤维素膜Milipore公司

核蛋白提取试剂盒美国Pierce公司。

脱脂奶粉光明乳业有限公司

吐温20(Tween 20)天津光复化工研究所

DMSO 美国 sigma 公司

Western Blotting Luminol Reagent美国Santa Cruz公司

4×蛋白上样缓冲液北京索莱宝科技有限公司

显影液、X－光片、定影液 厦门锐坷医疗器材有限公司兔抗鼠 PGC-1α 多克隆抗体 美国 Santa Cruz 公司

鼠抗鼠 β-actin 单克隆抗体 美国 Santa Cruz 公司 ft羊抗兔 IgG 辣根过氧化物酶标记抗体 北京中杉生物技术有限公司 ft羊抗鼠 IgG 辣根过氧化物酶标记抗体 北京中杉生物技术有限公司

## 2.3 主要仪器

恒温培养箱北京东方电泳设备有限公司

超低温冰箱、4℃冰箱中国海尔集团

MIR-153干燥箱日本三洋

超净工作台北京嘉创博远净化科技有限公司

移液器（不同取液量）德国Eppendorf公司

电子称天津市天平仪器公司

PCR仪德国Biometra公司

电泳仪北京东方电泳设备有限公司

凝胶电泳槽北京东方电泳设备有限公司

DYY-312型双稳电泳仪北京东方仪器厂生产

紫外透视仪[北京博朗特科技公司](http://www.baidu.com/baidu.php?url=K00000aAMzRTFMETEyV9U9OMxuoLDPtKRsjkF9iG5-0X9Fg_5oVSZCLvBdZUjka2jARKhLYutuh2AD8Sip-ZWGhe7BakrirrntT7wKTGcubQwMCzFv31KOUlNSt7.DR_aSuSJJ9ZfuhWG6C_LsRyUSy9n17ASWwspgknYZHwt8jlrpknwECFvUPMQWdQjPakbtUPl60.U1YY0ZDqdtOP3_v3zXHiksKY5Ix51XQP8nMbY_T0pyYqnW0Y0ZTq0ATqIyRsn0KdpHdBmy-bIykV0APzm1Y1Pjmvns&amp;ck=730.0.188.123.321.193.125.3015)

自动三重纯水蒸馏器海南爱博特科技有限公司

紫外可见分光光度计南京固琦分析仪器制造有限公司

UNIVERSAL台式冷冻离心机德国Hettich公司酶标仪美国Bio-Rad公司

Western blot电泳槽、转移槽美国Bio-Rad公司

电热恒温水浴箱江苏新康医疗器械有限公司转移脱色摇床TS-8型江苏海门其林贝尔仪器厂

# 3. 方法

## 3.1 **L-02**细胞培养

### 3.1.1 细胞培养

用含10%胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)的1640培养液，在培养箱条件为

5%CO2、37℃及饱和湿度中进行培养，根据细胞显微镜下生长情况进行换液，注意监测培养基的pH值，在细胞生长密度达到80%-90%时进行传代。倒置显微镜下观察细胞的生长情况和形态变化。

### 3.1.2 细胞传代

倒掉培养瓶中的培养液，加入PBS液冲洗细胞一遍，然后加入胰蛋白酶溶液

lml，摇晃培养瓶，使消化液流遍所用细胞表面，37℃孵育箱内或室温25℃以上环境下进行消化。2-5min后，置于倒置显微镜下面观察，发现胞质回缩、细胞的间隙增大后，立即倒掉消化液，加入含血清的培养液终止消化。然后用弯头吸管，吸取瓶内培养液，反复吹打瓶底贴壁的细胞，将细胞悬液吸入10ml离心管中，平衡后将离心管放入台式离心机中，以1000转/分钟离心6分钟。弃去上清液，加入2ml培养液，用滴管反复吹打细胞形成细胞的悬液。将细胞悬液轻轻吸出分装至2-3个培养瓶中，并加入适量培养基拧紧瓶盖。置于倒置显微镜下面观察细胞的数量，观察细胞生长情况，并同时计数。

### 3.1.3 细胞冻存

预先配制含10%DMSO、10%胎牛血清的冻存培养液。倒去培养瓶中的培养基，并用枪吸去培养瓶中残余的培养基，用PBS冲洗两次，用胰酶消化细胞，将悬浮细胞移至10ml的离心管中然后以1000转/分钟离心6分钟。倒去胰蛋白酶，将预冷的冻存液加入消化完全的细胞中，用滴管轻轻的吹打混匀。将混匀的细胞分装入冻存管中，每管1～1.5 ml。在冻存管上标明细胞的名称，冻存的时间及操作者姓名。冻存的程序为将装有细胞的冻存管先放入4℃冰箱冻存两小时，然后转到-20℃冰箱继续冻存两小时，再放入-80℃冰箱中过夜，取出冻存管，移入液氮容器内。

### 3.1.4 细胞复苏

预先将恒温水浴箱的温度调节至37℃，然后从液氮容器中取出冻存管，迅速浸入37℃的温水中并迅速晃动，直至冻存液完全的溶解。从37℃水浴中迅速取出冻存管，吸出细胞冻存液并转移到离心管中，加入5ml的培养液，并反复吹打混匀细胞，以1000转/分钟离心6分钟。弃去上清液，并向细胞沉淀内加入含有10%胎牛血清的培养基，反复吹打使之混匀，将细胞悬液吸取到培养瓶中，放入37℃培养箱培养，次日更换一次培养基，放入培养箱内继续培养。

### 3.1.5 细胞计数

消化细胞制备细胞悬液，微量移液枪吸取10μl细胞悬液，滴加在预先用酒精棉球擦拭过的覆盖盖玻片的细胞计数器内，以充满加样池而不溢出盖玻片及两

侧玻璃槽，加样时避免气泡。倒置显微镜下，用10×物镜观察计数板四角大方格中的细胞数，压线细胞只计左侧和上方者，不计右侧和下方者。

按照下列公式进行细胞密度计算：细胞密度(个/ml) =(细胞计数总和/4) ×

104.

根据倍比稀释法按照实验细胞数要求进行稀释。

## 3.2 **L-02**细胞**NAFLD**模型构建

参照文献[19]方法，正常人L02肝细胞株用含10%胎牛血清的1640培养基培养于25ml培养瓶，置于37℃、饱和湿度、含5%CO2的培养箱中培养。将离体培养的肝细胞传代培养24h后，待细胞生长稳定、融合度约达80%时，加入20µg/ml油酸

（油酸以0.5%DMSO溶解）诱导肝细胞脂肪变性，细胞隔天换液并加入新配制的油酸。油酸作用72h形成非酒精性脂肪变性肝细胞模型。对照组加入含10%胎牛血清的普通1640培养基。在模型组中分别添加含2.5、5、7.5mmol/l终浓度的二甲双胍培养基建立1、2、3组，继续培养24h后收集细胞。

## 3.3 肝细胞的电镜检查

直接取各组L-02细胞，将细胞悬液吸入10ml离心管中。平衡后将离心管放入台式离心机中，1500转离心3分钟。细胞沉淀用2.5%戊二醛固定，再用1%锇酸固定，乙醇脱水，环氧树脂包埋，做超薄切片，枸橼酸铅染色，通过在透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)下观察各组肝细胞超微结构变化并摄片。

## 3.4 细胞内**TG**的检测

采用6孔板，每孔植入约1×105个细胞，培养24 h后弃去上清液，收集各组培养板上的细胞，反复冻融裂解细胞，3 000 r/min离心10 min，取上清液检测TG。采用TG检测试剂盒，按试剂盒的说明书检测TG含量。取残余的下层液体，进行蛋白定量，蛋白定量按照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书进行操作，取TG

标准品，制作标准曲线。测定490 nm的OD值，对比标准曲线，计算每孔样品的细胞TG浓度值，细胞蛋白中所含的TG量以测出的甘油三酯量除以蛋白质含量（μg TG/mg protein ）来表示。

## 3.5 细胞内**MDA**、**SOD** 的检测

按常规培养方法培养L-02细胞，当细胞生长密度达90%左右时消化、收集细胞，计数，调节细胞密度为5×105/ml，将细胞悬液接种至96孔板，每孔200μl，37℃培养箱中培养24h。按实验分组分别处理细胞后，弃去上清液，用常规培养液收集培养板中各组细胞，置于低温冰箱(-80℃)反复冻融裂解，3 000 r/min离心10 min，取上清检测SOD活力和MDA浓度。

（1）按照SOD试剂盒说明书的操作步骤，测定OD值。计算各组细胞上清液中SOD的活力。

计算公式：

SOD活力U/ml=[(对照管吸光度值一测定管吸光度值) /对照管吸光度值]÷50%×稀释倍数。

（2）按照MDA测定试剂盒说明书的操作步骤，依次在测定管、标准管、标准空白管中分别加入相应的试剂，在532 nm处测其OD值。然后按计算公式换算出各组上清液中MDA的浓度。

计算公式：：

细胞上清液中MDA浓度(nmol/ml) =[(测定管吸光度-标准空白管吸光度) /(标准管吸光度一标准空白管吸光度)]×标准品浓度(10nmol/ml) ×样本测试前稀

释倍数。

## 3.6 **L-02**细胞PGC-1α表达的检测

### 3.6.1 引物

引物设计及引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。引物序列

如下所示，PGC-1α上游：cagcaagtcctcagtcctcac；下游：tgcctccaaagtctctctcag；片段大小247bp；β-action上游：gaaatggaggcaccccttc；下游ttgccgacaggatgcagaa；片段大小100bp。

### 3.6.2 实验器具的准备和处理

#### （1) 塑料制品的处理(包括EP管、枪头等)

将1ml DEPC溶于1000ml双蒸水中配制配成1‰的DEPC水，放置过夜。将

DEPC水从容量瓶中倒入铁饭盒内，将枪头、EP管等逐个浸泡入DEPC水中，其中小枪头需要通过吸管将DEPC水打入其中，放置过夜，第二天开过高压后再烤干备用。实验之前再开高压一次，烤干后使用。

#### （2) 玻璃和金属制品的处理

泡酸过夜，冲洗干净，烤干，包被锡箔纸放入200℃烘箱内烤6小时左右，备用。

### 3.6.3 试剂配制

#### （1) 75%乙醇配制

将开过高压的1‰DEPC水与无水乙醇混合配制成75%的乙醇，置于-20℃冰箱内保存备用。

#### （2) DEPC水配制

泡实验器具的DEPC水的配制：将1mlDEPC加到装有1000ml双蒸水的容量瓶内，上下颠倒晃动，然后放置过夜后备用。

逆转录中的DEPC水的配制：将40ml双蒸水加入100ml的盐水瓶内，然后加入40µl的DEPC，37℃放置过夜，然后开高压，分装到处理过的EP管内，置于-20℃冰箱内保存备用。

#### （3) 电泳缓冲液配制

分别称取硼酸27.5g、Tris碱54g，然后加入0.5mol/L EDTA 20ml，再用蒸馏水将其定容至2000ml，配制成5×电泳缓冲液，作为储存液，使用的时候再加入9份的去离子水即是工作液。

#### （4) 1%琼脂糖凝胶的配制

称量琼脂糖1g，然后加入100ml电泳缓冲液（即工作液），放入微波炉中加热直至沸腾溶化，重复3次，当溶化的琼脂糖液冷却至60℃左右时加入5µl的EB溶液，充分混匀后倒入已安装好的胶膜中，室温下静置20-30min即可进行电泳。

#### （5) 10mg/ml溴化乙锭(EB)

称量0.2g溴化乙锭并加入在20ml的水中，用力搅拌数小时。在将溶液转移至棕色的广口瓶中，放入4℃冰箱内保存备用。

### **3.6.4** **Trizol**法抽提总**RNA**

当细胞长满约90%的瓶壁时，将细胞培养瓶(5-10×106个细胞)置于冰上，倒掉培养液，直接加入1 ml的Trizol试剂，用加样器吹打至液体澄清且看不到细胞团块。将细胞裂解液转移至1.5m1 的EP管中，室温放置约10min，然后加入

0.2m1的氯仿，盖紧EP管，上下颠倒剧烈摇动约15s，室温放置约10min，在4℃的高速离心机内12000转离心15min，吸取上清液加至新的1.5m1EP管中。再加入同体积的异丙醇，室温放置10min, 4℃的高速离心机内12000 r/min 离心

10min。吸去离心后的上清液，加入75%的乙醇(含DEPC水) 1 ml，上下颠倒混匀，洗涤沉淀一次，4℃，7500 r/min，离心5min，吸去乙醇，将EP管置于封闭的空气或真空中干燥约5-10min，应避免过度的干燥。再向EP管中加入20µl的DEPC水溶解。溶解过后的RNA放入4℃冰箱内过夜。若需要长期保存，向装RNA 的

EP管中加入2.5倍体积的乙醇，置于-80℃冰箱内保存，备用。

### 3.6.5 **RNA**纯度鉴定

取上述RNA溶液5µl，溶于lml 1×TE中，分别测定其在260nm和280nm

的吸光度值(OD)。计算OD260与OD280的比值，若比值在1.8-2.0，证明所提取的

RNA无蛋白和酚等杂质的污染。

### 3.6.6 **RNA**定量

取2µl RNA以去离子水稀释成50µl，在紫外分光光度计中测定OD值。RNA浓度(µg/µl) =OD 260×25（稀释倍数） ×40/1000。

### 3.6.7 **cDNA**合成

逆转录反应按RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)试剂

盒说明书操作，具体步骤简述如下∶

#### （1) 冰上充分溶解cDNA合成试剂盒中的相关试剂及RNA；准备实验用的0.2ml

EP管。

#### （2) 往0.2mlEP管中依次加入如下试剂后，充分混匀；

Oligo(dT) 1µl

RNA-freeH2O 6µl

RNA 5µl

#### （3) 将EP管放入PCR仪中70℃孵育10min，取出放于冰上；

#### （4) 继续往向EP管中依次加入下列试剂后，充分混匀；

RevertAid 1µl

5×反应缓冲液4µl

dNTPmix 2µl

RNA 酶抑制剂 1µl

(5)将EP管放入PCR仪中42℃孵育60min，最后于70℃10min终止反应。将合成的cDNA放于-20℃冰箱贮存备用。

### 3.6.8 **PCR** 反应

(1)将PCR试剂盒中相关试剂及cDNA放置于冰上，充分溶解。

(2)向0.2mlEP管中依次加入下列试剂（25µl反应体系）：无菌双蒸水8.5µl

2×PCR Master Mix 12.5µl

反义链primer(10µM) 1µl

正义链primer(10µM) 1µl

cDNA 2µl

(3) PCR的反应条件：

PGC-1α：预变性95℃5min，进入循环，95℃50s，55℃50s，72℃50s，32个循环后72℃10min。

内参：预变性95℃5min，进入循环，95℃50s，55℃50s，72℃50s，32个循

环后，72℃10min。

### 3.6.9 **PCR**产物检测及半定量分析

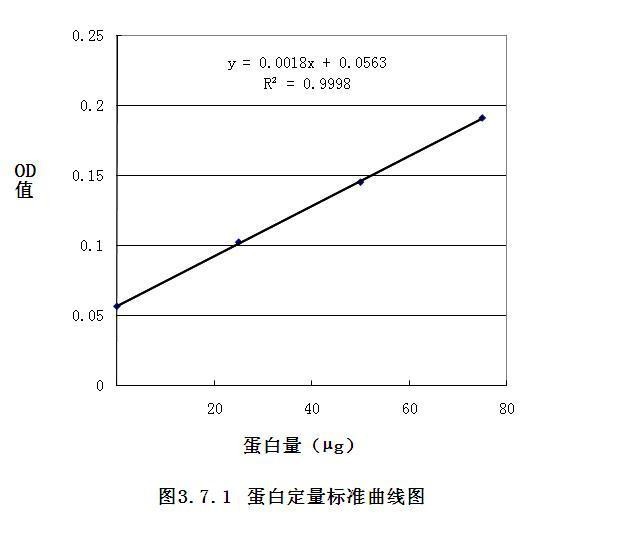
分别将10µl的各PCR产物与1µl上样缓冲液混合，沿加样孔后缘缓慢加样（勿产生气泡），再将10µl的600 bpDNA Ladder沿加样孔后缘缓慢加样（勿产生气泡）。将带胶板的胶槽放入电泳槽，再向电泳槽内加1×TBE缓冲液至没过胶板约1 cm；在

120V电压条件下电泳，约20 min,取出胶板，用凝胶成像分析仪拍照；再以同样方法将各PCR产物电泳，拍照。测量各条带的面积灰度值，以每例样本目的电泳条带面积灰度值与内参照β-actin电泳带面积灰度值之比作为该例样本目的基因表达的相对值。

## 3.7 **Western Blot**检测PGC-1α蛋白质的表达

### 3.7.1 细胞总蛋白质的提取及定量

倒掉培养液，并将瓶倒扣在吸水纸上使吸水纸吸干培养液，每瓶细胞加入约3ml 4℃预冷的PBS，平放轻轻摇动1min左右洗涤细胞，然后弃去PBS。重复以上操作步骤两次，共洗涤细胞三次以洗去残留的培养液。将PBS弃净后把培养瓶置于冰上。向1ml 裂解液中加入10µl PMSF（100mM），摇匀置于冰上（PMSF要摇匀至无结晶时才可与裂解液混合）。向每瓶细胞中加入400µl含PMSF的裂解液，置于冰上裂解约30min，为使细胞充分裂解每隔5-10min要将培养瓶来回摇动。裂解完成后，用干净的刮棒快速将细胞刮于培养瓶的一侧，然后用枪将细胞碎片和裂解液移至1.5ml离心管中，整个操作尽量在冰上进行。放入4℃的高速离心机内12000rpm离心5min。将离心后的上清分装到0.5ml的离心管中。用BCA法，在562nm处测定吸光度值，用标准蛋白拟合标准曲线，计算出蛋白质浓度，确定上样量。标准曲线见下图3.7.1。



### 3.7.2 样品的处理及试剂配制

#### （1）样品处理：在蛋白质样品中加入等体积的2×Loading Buffer，100℃或沸水浴加热3-5分钟，以充分变性蛋白。冷却后置于冰上。

#### （2）配制10%分离胶（两块胶，15ml）：加入以下试剂

去离子水5.9ml

1.5M Tris-HCl(pH8.8) 3.8ml TEMED 6μl

10%SDS 150μl

10%AP 150μl

30%丙烯酰胺5ml

每加一种成分随即摇匀，为了加快凝胶，可以将过硫酸胺和TEMED量加大，

根据实验当时的温度适当调整，加入TEMED混匀后应立即灌胶。灌胶后加入1m1

蒸馏水压胶，以保证胶面平整。置于室温环境中凝固。

#### （3）配制5%浓缩胶（两块胶，6ml）加入以下试剂

去离子水4.1ml

TEMED 6μl

10%AP 60μl

10%SDS 60μl

1M Tris-HCl(pH6.8) 0.75ml

30%丙烯酰胺1ml

每加一种成分随即摇匀，为了加快凝胶，可以将过硫酸胺和TEMED量加大，根据实验当时的温度适当调整，加入TEMED混匀后应即刻灌胶。灌胶后立即插入样孔制备梳子，放入室温环境中凝固；拔出梳子，即得加样孔。

### **3.7.3** **SDS-PAGE**

清洗玻璃板和电泳槽。将玻璃板对齐，然后放入夹中卡紧。将玻璃板垂直的卡在电泳槽中准备灌胶。将10%分离胶缓缓加入固定好的玻璃板间隙内，并在分离胶的顶层加入少量蒸馏水，防止空气中的氧影响分离胶的聚合。当水和胶之间有一条折射线时，说明胶已凝固了。倒掉上面覆盖的蒸馏水，并滤纸吸干残余液体。将剩余空间灌满5%浓缩胶，然后将梳子插入浓缩胶中。放置2小时后，加入1×电泳缓冲液，两手分别捏紧梳子的两端并轻轻竖直向上将其拔出。用双蒸水冲洗梳孔，将凝胶放入准备好的电泳槽中，上下游加入l×电泳缓冲液，检查是否泄漏。每孔上样20-30μl，最边上的加样孔中加入Marker 6μl。上样完成后打开电泳仪电源，100V恒压电泳15分钟，当蛋白Marker跑至分离胶位置改为120V，当电泳至溴酚兰跑出时即可终止电泳，部分作考马斯亮蓝染色，部分进行转膜。

### 3.7.4 电转移

#### （1）配制转膜液(1000ml)：按照Tris碱3.03g、甘氨酸14.14g、甲醇200m1、双蒸水800m1配方，配制转膜液。

#### （2）PVDF膜置于甲醇中浸泡30秒，再移至转膜液中浸泡约20分钟，同时将

胶和滤纸也浸入转膜液中浸泡约20分钟。

（3）将塑料支架放入装有电泳缓冲液的电泳容器中，在塑料架子上放上专用的转移海绵，依次放置滤纸，PAGE胶，PVDF膜，滤纸，海绵，用玻璃棒赶走气泡，夹好转移夹，放入转移槽中。胶靠负极，PVDF膜靠正极。

（4）打开电源，100V恒压转膜90分钟。

（5）转移结束后，取出PVDF 膜放入盛有丽春红染液的培养皿中，染色约

7-10min，确定转膜的效果和Marker、蛋白质条带的位置。

#### （6）用1×PBS冲洗PVDF膜，每次约5-10min，共洗涤三次。

### 3.7.5 封闭

将PVDF膜置入培养皿中，然后加入配制的封闭液：5%奶粉，1×PBS (pH

7.6）. 封闭液的量以浸过PVDF膜即可，封闭过夜。

### 3.7.6 与一抗反应

将转膜后的PVDF膜放入杂交袋，加入稀释好的PGC-1α一抗，然后用食指和中指轻轻赶走袋内的气泡后封紧袋口，4℃环境中置于脱色摇床上过夜。取出

PVDF膜置于1×PBS溶液中冲洗3次，每次l0min。

### 3.7.7 与二抗反应

将PVDF膜放入杂交袋，加入预先按照要求稀释好的相应二抗，用食指和中指轻轻赶走袋内的气泡后封紧袋口，放置于脱色摇床上，室温条件下孵育1小时左右。用镊子取出PVDF膜并置于盛有1×PBS溶液的培养皿中冲洗3次，每次约l0min。

### 3.7.8 显色

将ECL显色试剂盒中的试剂A液和B液等体积混匀（一般常用为各500μl），即为ECL工作液。进入暗室，打开X-光片夹，铺上保鲜膜，将PVDF膜面朝上放置于保鲜膜上，滴加ECL工作液1-3min后可见到荧光，用保鲜膜将PVDF膜包好。分别将1×显影液，双蒸水和定影液分别倒入不同的培养皿中；取出X－光片，用剪刀裁剪到适当的大小（比膜的长和宽均需大1cm左右）；把X－光片

覆盖在膜上，一旦放上，便不可再移动，关上X-光片夹，开始计时；可根据信号的强弱适当调整曝光得时间，一般为1-5min，也可选择不同的时间多次压片，以达到最佳的效果；曝光完成后，将胶片放入盛有显影液的培养皿中显影约1分钟左右，温度过低时（低于16℃）需适当延长显影的时间，显影结束后取出，放入清水中冲洗胶片3分钟左右，最后放入定影液中进行定影，定影时间一般为5-10min，以胶片透明为止，清水洗净后晾干。

### 3.7.9 蛋白质目的条带的半定量检测

将胶片进行扫描或拍照，应用ID Image Analysis Software进行表达强度的测定，以光密度(OD)值表示蛋白质表达的多少。以同张膜表达的β-Actin成像条带作为内参照。将成像图中每个目的蛋白条带分别与同张膜成像的β-Actin条带的光密度相比较，其相对比值作为目的蛋白质的相对表达水平。按下列公式计算目的蛋白的相对表达水平：目的蛋白的相对表达水平=目的蛋白条带的表达强度

/β-Actin条带的表达强度。

## **3.8** 统计学处理

所有数据输入采用SPSS 16.0软件进行统计学处理。计量资料均以均数标准差±*s*）表示，两组间比较，如数据符合正态分布组间比较采用两样本*t*-检验，两因素相关性采用pearson相关分析。*P*＜0.05有统计学差异。

# 4. 结果

## 4.1 电镜下观察线粒体损伤及脂滴变化

对照组细胞中可见少量大小不等的脂滴，线粒体呈椭圆形或圆形，嵴膜清晰。模型组细胞中脂滴明显增多（生化检测示模型组细胞内甘油三酯水平明显升高，说明油酸诱导造模成功），少数线粒体出现空泡样改变。1(二甲双胍2.5mmol/l)、

2(二甲双胍5mmol/l)组细胞中可见脂滴分布，线粒体空泡样改变有所减少。3(二甲双胍7.5mmol/l)组细胞中可见较少脂滴，线粒体稍肿胀，但线粒体嵴膜清晰。

见图4.1。



**图 4.1** L-02**细胞电镜下改变（×10000 ）**

Fig 4.1 The change in electron microscope of L-02 cells（×10000）注: A: 模型组；B: 对照组；C: 1组；D: 2组；E: 3 组

## 4.2 不同浓度二甲双胍对**L-02**细胞内甘油三酯含量的影响

与对照组相比，模型组细胞内甘油三酯水平明显升高，差异有统计学意义

（*P*<0.05）；当二甲双胍终浓度为7.5mmol/l（3 组）时，细胞内甘油三脂明显减少，与模型组相比差异有统计学意义（*P*<0.05）；二甲双胍终浓度为7.5mmol/l 组

比终浓度为2.5mmol/l组（1组）细胞内甘油三脂明显减少，差异有统计学意义

（*P*<0.05）；见表4.2，图4.2.

**表 4.2** L-02**细胞内甘油三酯的含量（μg/mg cell protein）**

**Tab 4.2 The content of intracellular triglyceride in L-02 cells (μg/mg cell protein)**

| 组别 | TG（μg/mg cell protein） |
| --- | --- |
| 模型 | 39.28±2.22# |
| 对照 | 29.83±1.47\*△ |
| 1 | 36.87±1.95 # |
| 2 | 35.02±1.16 # |
| 3 | 32.24±2.63 \*△ |

注：与模型组比较，\* *P*<0.05；与对照组比较，# *P*<0.05；与1组比较，△*P*<0.05；

Compared with the model group, \* *P*<0.05; Compared with the control group,

#*P*<0.05; Compared with the first group, △*P*<0.05.



**图 4.2** L-02**细胞内甘油三酯的含量（μg/mg cell protein）Fig 4.2 The content of intracellular triglyceride in L-02 cells (μg/mg cell**

**protein)**

Compared with the model group, \* *P*<0.05; Compared with the control group,

#*P*<0.05;Compared with the first group, △*P*<0.05.

## 4.3 不同浓度二甲双胍对**L-02**细胞**MDA**浓度和**SOD**活力的影响

与对照组相比，模型组细胞内MDA 浓度明显升高，差异有统计学意义

（*P*<0.05），而SOD活力却明显降低，差异有统计学意义（*P*<0.05）；与模型组相比，当二甲双胍终浓度为5mmol/l组、7.5mmol/l时，细胞内MDA浓度明显降低，差异有统计学意义（*P*<0.05），而SOD活力却升高，差异有统计学意义（*P*<0.05）；与二甲双胍终浓度为2.5mmol/l组相比，当二甲双胍终浓度为5mmol/l、7.5mmol/l时，细胞内MDA浓度明显降低，差异有统计学意义（*P*<0.05），而SOD活力却升高，差异有统计学意义（*P*<0.05）。见表4.3，图4.3.1，图4.3.2。

**表 4.3** L-02**细胞MDA浓度和SOD活力**

Tab 4.3 The concentration of MDA and the vitality of SOD in L-02 cells

| 组别 | MDA(nmol/ml) | SOD(U/ml) |
| --- | --- | --- |
| 模型 | 29.4±0.82# | 13.3±0.51# |
| 对照 | 21.6±0.86\*△ | 19.2±0.50\*△ |
| 1 | 28.4±1.33# | 14.1±0.57# |
| 2 | 24.6±0.70\*#△ | 16.9±1.20\*#△ |
| 3 | 23.4±0.93\*△ | 18.3±0.60\*△ |

注：与模型组比较，\* *P*<0.05；与对照组比较，# *P*<0.05；与1组比较，△*P*<0.05；

Compared with the model group, \* *P*<0.05; Compared with the control group,

#*P*<0.05; Compared with the first group, △*P*<0.05.



**图4.3.1 L-02细胞MDA浓度(nmol/ml) Fig4.3.1 The concentration of MDA in L-02 cells(nmol/ml)**

Compared with the model group, \* *P*<0.05; Compared with the control group,

#*P*<0.05;Compared with the first group, △*P*<0.05.

****

**图**

### **4.3.2** **L-02**细胞**SOD**活力**(U/ml) Fig4.3.2 The vitality of SOD in L-02 cells(U/ml)**

Compared with the model group, \* *P*<0.05; Compared with the control group,

#*P*<0.05; Compared with the first group, △*P*<0.05.

## 4.4 不同浓度二甲双胍对**L-02**细胞PGC-1α**mRNA**表达的影响

与对照组相比，模型组L-02细胞中PGC-1αmRNA表达量明显减少，差异具有统计学意义(*P*<0.05)。与模型组相比，当二甲双胍终浓度为2.5mmol/l、

5mmol/l、7.5mmol/l时L-02细胞中PGC-1αmRNA表达量明显增多，差异具有统计学意义(*P*<0.05). 二甲双胍终浓度为7.5mmol/l组比终浓度为2.5mmol/l组细胞内PGC-1αmRNA表达量明显增多，差异具有统计学意义（*P*<0.05）. 见表4.4，图4.4.1，图4.4.2.

**表 4.4** L-02**细胞PGC-1α相对表达量**

**Tab 4.4 The expression of** PGC-1αmRNA in L-02 **cells**



| 组别 | 灰度值（PGC-1α/β-actin） |
| --- | --- |
| 模型 | 0.72±0.05 #△ |
| 对照 | 1.03±0.13 \* |
| 1 | 0.92±0.10 \* |
| 2 | 1.01±0.07 \* |
| 3 | 1.10±0.08 \*△ |

与模型组比较，\* *P*<0.05；与对照组比较， # *P*<0.05；与 1 组比较，△*P*<0.05；

Compared with the model group, \* *P*<0.05; Compared with the control gro

#*P*<0.05;Compared with the first group, △*P*<0.05.

up,



**图 4.4.1** L-02**细胞PGC-1αmRNA相对表达量**

**Fig 4.4.1 The expression of** PGC-1αmRNA in L-02 **cells**

Compared with the model group, \* *P*<0.05; Compared with the control group,

#*P*<0.05; Compared with the first group, △*P*<0.05.



**图 4.4.2** L-02**细胞PGC-1αmRNA相对表达量**

**Fig 4.4.2 The expression of** PGC-1αmRNA in L-02 **cells**

M: DNA Marker 600；1：模型组；2：对照组；3: 1组；4: 2组；5: 3 组

## 4.5 不同浓度二甲双胍对**L-02**细胞PGC-1α蛋白质表达的影响

与对照组相比，模型组L-02细胞中PGC-1α蛋白质表达量明显减少，差异具有统计学意义(P<0.05)。与模型组相比，当二甲双胍终浓度为5mmol/l、7.5mmol/l 时

L-02细胞中PGC-1α蛋白质表达水平明显增多，差异具有统计学意义(P<0.05)。见表4.5，图4.5.1，图4.5.2。

**表4.5** **L-02细胞PGC-1α蛋白质相对表达量**

**Tab 4.5** The **expression of** PGC-1αprotein in L-02 **cells**

| 组别 | 灰度值（PGC-1α/β-action） |
| --- | --- |
| 模型 | 0.78±0.05 # |
| 对照 | 0.91±0.01 \* |
| 1 | 0.86±0.06 |
| 2 | 0.93±0.02 \* |
| 3 | 0.90±0.05 \* |

与模型组比较，\* *P*<0.05；与对照组比较，#*P*<0.05。

Compared with the model group, \* *P*<0.05; Compared with the control group, #*P*<0.05.



**图4.5.1** L-02**细胞PGC-1α蛋白质相对表达量Fig4.5.1 The expression of** PGC-1αprotein in **L-02 cells**与模型组比较，\* *P*<0.05；与对照组比较，#*P*<0.05.

Compared with the model group, \* *P*<0.05; Compared with the control group, #*P*<0.05.



**图 4.5.2** L-02**细胞PGC-1α蛋白质相对表达量**

**Fig4.5.2 The expression of** PGC-1αprotein in L-02 **cells**

## 4.6 肝细胞中PGC-1α表达水平与甘油三酯、**MDA**及**SOD**的相关性：L-02细胞中PGC-1αmRNA、蛋白质的表达水平与细胞内甘油三酯的水平呈负相关(*r*=-0.581、-0.601，*P*<0.05)。PGC-1αmRNA、蛋白质的表达水平与细胞内MDA的水平呈负相关(*r*=-0.629、-0.571，*P*<0.05)。PGC-1αmRNA、蛋白质的表达水平与细胞内SOD的水平呈相关(*r*=0.746、0.574，*P*<0.05) 。

# 5. 讨论

目前对NAFLD的治疗尚未建立规范化方案，临床常用的治疗药物有胰岛素增敏剂、减肥药物、降脂药物和护肝药物等[20]。在NAFLD的发病机制中胰岛素抵抗起着重要的作用，这使得胰岛素增敏剂被用于NAFLD的治疗逐渐得到重视

[21]. 二甲双胍是当前被临床广泛应用的胰岛素增敏剂，它不仅可调节患者的胰岛

素抵抗水平还可以明显改善患者的高胰岛素血症，在糖尿病及NAFLD等代谢性疾病的治疗过程中起到非常积极的作用。

## 5.1 **NAFLD**细胞模型的建立

目前对NAFLD的体外研究主要是采用以大鼠为主的动物模型，部分实验也

采用小鼠模型，但是动物模型个体之间差异较大，不能完全涵盖人类NAFLD的疾病谱及发病机制，而且实验条件难以控制，这些不利因素使细胞和分子水平上的研究受到了限制。理想的NAFLD模型应具有与人类NAFLD相似的代谢紊乱和病理生理过程，并且需要稳定性好，重复率高。然而日前尚无标准的体内外模型[22]。

NAFLD细胞模型与动物模型相比具有造模时间短、条件易控制、干扰因素少等特点，目前应用较广泛。目前用于NAFLD细胞模型的细胞主要有L-02肝细胞株、HepG2肝癌细胞株、小鼠肝癌McNtcp.24细胞株以及动物原代细胞。建立细胞模型的来源细胞不同，结果也有明显差异。目前有许多实验采用HepG2肝癌细胞株，但癌细胞的能量代谢差异比较大，当细胞外的脂质水平不同时，癌细胞都可能会增加脂肪酸的从头合成，增加参与脂质代谢的α-胎蛋白的表达，故其有效性已经引起质疑。目前发现来自正常人肝细胞的L-02细胞模型与人类NAFLD病理生理过程较为接近，现已逐渐得到应用[23]。

目前研究表明，FFA是重要的脂毒性因子，它能通过多种途径引起糖脂代谢紊乱、胰岛素抵抗、脂质过氧化等，在引起NAFLD的发病机制中起到了重要的作用[24-26]。过多的FFA进入肝细胞内并超过其氧化能力时便会被酯化为甘油三酯(TG)，从而导致脂质在肝细胞内的沉积。TG合成增多，可以使线粒体β氧化水平代偿性增加，为脂质过氧化提供了所需的反应基质和能量，因此产生了大量具有细胞毒性和反应活性的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS) [27-28]. FFA还可以诱导肝合成HMG-CoA，加快胆固醇的合成[29]。电镜观察发现肝细胞脂肪变性形成后，线粒体发生肿胀并且线粒体数量明显减少，代表线粒体功能状态的线粒体嵴也明显减少，提示在肝细胞发生脂肪变性后线粒体功能受损并可影响肝细胞对FFA代谢，进而加重TG在肝细胞中的沉积。因此，本实验以油酸诱导正常肝细胞L-02成功建立NAFLD细胞模型，油酸诱导法短期内可使肝细胞出现大量脂滴，形成印戒样细胞[30]，与体内脂肪变肝细胞具有基本一致的病理表现，并对NAFLD细胞模型，用三酰甘油试剂盒检测细胞内三酰甘油水平，对肝细胞脂肪代谢进行直接评估。它符合形成的病理生理过程，易于控制，克服了大量动物模

型的不足，而且代价小、耗时短，能针对性地研究非酒精性脂肪肝发病机制且能有效的选择治疗方法并缩短筛选治疗药物的进程。

## 5.2 **P**GC-1α与**NAFLD**的关系

PGC-1α是一种核受体家族辅助激活因子，可协同激活多种因子，广泛参与体内能量的生成和利用过程，在细胞线粒体的生物合成、脂肪酸的β氧化、肝脏糖异生、机体的适应性产热及骨骼肌葡萄糖的转运等方面起着重要的作用，因此其在维持生物体的能量和代谢的动态平衡方面有重要的生理意义[31]，研究发现PGC-1α表达水平的异常与机体多种代谢性疾病相关[32-34]。在小鼠肝脏、骨骼肌等组织中PGC-1α的表达过高或过低都可以通过干扰线粒体的代谢功能而导致胰岛素抵抗的发生[35-36]，而线粒体功能损伤是胰岛素抵抗和多种代谢性疾病的潜在发病机制之一，因此维持PGC-1α的正常表达对预防和改善胰岛素抵抗、代谢紊乱可能具有一定的临床意义，未来以PGC-1α为新靶点以提高与恢复线粒体的功能和氧化能力将成为治疗代谢疾病的新方法[37]．

PGC-1α通过与多种核激素受体及转录因子相互作用参与糖、脂代谢。体外研究发现在原代肝细胞中过度表达PGC-1α能够提高糖异生关键基因的表达，在小鼠的肝脏中由siRNA干扰引起的PGC-1α表达的降低可以使糖异生的关键酶磷酸烯醇丙酮羧基酶( Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)和葡萄糖6-磷酸酶酶( Glucose-6- phosphatase, G6Pase)的表达显著降低。在PGC-1α基因敲除的小鼠中由于糖异生基因表达的受损而出现低血糖，此实验者研究者还发现在经过短期饥饿之后，一组PGC-1α基因敲除的小鼠却产生了肝脂肪变性[38]，这可能是由于线粒体脂肪酸氧化功能的减少和脂肪生成基因表达增加的双重作用导致的。禁食同样可通过PGC-1α的辅激活作用来促进PPAR的表达，从而促进肝脂肪酸氧化相关基因的表达。PGC-1α可促进长链脂肪酸进入线粒体中进行氧化[39]，PGC-1α基因敲除的小鼠脂肪酸氧化相关基因表达下调[5]，肝细胞中线粒体的呼吸率下降，脂肪酸的氧化速率也降低[40]。因此，PGC-1α缺陷，线粒体呼吸率下降，最终导致脂肪酸氧化能力下降，

PGC-1α在二甲双胍降糖作用中发挥作重要的调控作用。Caton等研究发现

乙酰转移酶GCN5为二甲双胍在肝细胞作用时的新靶点[41]，二甲双胍可通过增加GCN5的表达使PGC-1α乙酰化，转变成无活性的乙酰化PGC-1α，因此抑制了糖异生中PEPCK基因的转录。另外，二甲双胍可通过AMPK激活后介导的eNOS磷酸化和PGC-1α表达的上调促进ATP的合成，从而改善心室重构和心脏功能。在基因方面，PGC-1α的基因多态性和肝脏PGC-1αmRNA表达水平低是NAFLD重要的遗传学病因[42]。轻度及长期的PGC-1α表达降低是致使肝脏产生

IR的原因之一[43]。从目前的研究来看，PGC-1α表达增强有利于减轻三酰甘油在肝脏的堆积，但在此过程中产生的大量ROS至脂质过氧化产物也不容忽视。

在本实验中，与对照组肝脏细胞比较，油酸诱导的非酒精性脂肪肝细胞模型中TG的含量明显增多而PGC-1αmRNA的表达量明显下降，提示在高FFA环境中肝脏细胞中PGC-1α的表达受到了抑制，但具体的作用机制还有待进一步研究。当给予二甲双胍药物干预后，各药物组细胞中的TG水平明显低于模型组，而PGC-1αmRNA的表达量有所增加，且细胞中PGC-1α基因的表达水平与细胞内

TG的水平呈负相关，这提示改善PGC-1α的表达可减少肝脏细胞中脂质的堆积。最近国内也有研究发现，肝细胞脂肪变性的减轻与PGC-1α的转录活性的增加密切相关[44]。总之，PGC-1α在代谢性疾病的发生、发展过程中起着重要的作用，为了更好的研究PGC-1α的临床意义，还需进一步全面得认识其分子作用机制．

## 5.3 氧化应激在**NAFLD**发病过程中的作用

氧化应激是机体细胞利用氧呼吸产生ATP时， 氧衍生的自由基或ROS 的产生过多或发生了代谢障碍， 氧化程度超出了抗氧化物的清除代谢能力，细胞氧化还原失调从而引起的组织、细胞损伤的状态。NAFLD形成过程中发生的氧化应激主要是由于肝脏中增加的氧化反应，如线粒体的脂肪酸氧化和过氧化反应，当抗氧化物质不能满足需要时， 便可导致ROS 在肝脏的蓄积， 引起氧化应激反应，加速NAFLD的发展. 氧化应激还可增加机体脂质过氧化产物及多种细胞因子的释放，在NAFLD发生和发展的过程中起着重要的作用[45]。MDA是毒力较强的脂质过氧化产物，其可严重破坏机体细胞膜的结构，使细胞发生肿胀和坏

死。有研究发现, NAFLD患者的体内MDA的含量明显增高，并且与肝组织的炎性坏死和纤维化程度呈正相关[46]。由此可见， 氧化应激和脂质过氧化反应在

NAFLD的发病过程中起着重要的作用. 而机体内的SOD可清除氧自由基，减轻脂质过氧化反应，是体内主要的抗氧化物质，SOD活力的大小与机体抗氧化的能力密切相关。

国外学者发现二甲双胍可通过影响线粒体的功能而减少ROS的生成[47]。在本实验中，用油酸诱导的NAFLD细胞模型中MDA浓度明显升高而SOD活力却明显降低，提示NAFLD细胞中存在氧化与抗氧化代谢水平的失衡。当给予二甲双胍干预后，细胞内的MDA浓度下降而SOD活力明显增加，提示二甲双胍可改善NAFLD的氧化应激水平，这可能是其用于NAFLD治疗的作用机制之一。

## 5.4 二甲双胍在**NAFLD**治疗中的作用

目前NAFLD的发病机制尚未完全阐明，但“二次打击”学说已经被广泛接受[48-49]。第一次打击是以IR 为中心，引起单纯的肝脂肪变性；第二次打击是在

IR持续存在的基础上发生氧化应激等反应引起的肝脏坏死性炎症和纤维。IR贯穿于“二次打击”的始终。研究表明，几乎所有的NAFLD患者都存在肝脏和周围组织的IR，IR是NAFLD发生、发展的关键因素，其严重程度与NAFLD的病情进展相关[50]。

存在IR的患者常伴有血胰岛素水平升高以及脂肪组织FFA释放增加的现象，同时伴有TG、LDL-C升高，HDL-C降低的现象，FFA释放水平增加除了能引起脂质在肝细胞的沉积之外还能加重高胰岛素血症和IR。在肝脏内由于TG的长期增高以及IR，导致脂肪酸氧化水平降低，线粒体功能发生障碍进一步加剧脂肪堆积。有研究表明，二甲双胍能够通过参与糖脂代谢来改善胰岛素的敏感性，并可以有效抑制炎性因子TNFα及瘦素的表达[51]从而延缓肝纤维化的发展，因此二甲双胍能够预防和治疗NAFLD。二甲双胍的主要作用靶点是通过肝激酶B1( LKB1)激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK) , AMPK可参与调节体内多种糖脂代谢以及生物氧化等过程.。二甲双胍活化AMPK可使脂肪酸合成酶表达减少，从而降低脂肪酸和胆固醇的水平。AMPK还具有抑制与脂肪酸合成有关的转录因子SREBP-1c

的基因表达。除外，二甲双胍还存在不依赖于AMPK的其他途径[52]，还需要通过实验深一步的探究。

二甲双胍已被证实为AMPK的激活剂，而AMPKα的活化可通过激活PPARα和PPARγ的复合激活子1(PGC-1)增加小鼠骨骼肌细胞的脂肪酸氧化[15]。在人类的骨骼肌细胞中，二甲双胍可以增加PGC-1α的表达[16]，但涉及的具体通路及机制尚未完全明确。本实验中我们发现对给予NAFLD细胞模型二甲双胍干预后，模型组细胞中PGC-1α的基因及蛋白质表达水平均有所升高，因此我们推测二甲双胍可能通过活化细胞内调节因子AMPKα从而激动PGC-1α基因的表达，以增加脂酶的活性和提高胰岛素的敏感性，在调节肝脏的脂肪代谢功能和改善肝细胞脂肪变性等方面具有显著的效果。

目前对于NAFLD 的治疗尚无特别有效的药物，生活方式干预仍是治疗

NAFLD的主要手段。二甲双胍可通过改善IR从而有效调节体内糖脂代谢.，还可改善肝脏血清酶学指标，同时对肝脏脂肪变性、气球样变和NAFLD活动评分也一定作用。二甲双胍作为一种安全有效的药物在NAFLD尤其是合并代谢综合征的临床治疗中有着广泛的发展前景.

# **6** 结论

## 6.1 、用20µg/ml油酸诱导L-02细胞可成功构建NAFLD细胞模型。

## 6.2 、PGC-1α表达水平降低可能在NAFLD的发病过程中起着重要的作用。

## 6.3 、二甲双胍可改善NAFLD细胞模型内的氧化应激水平。

## 6.4 、二甲双胍通过调节细胞内PGC-1α的表达及氧化应激水平从而减少脂肪堆积可能是用于非酒精性脂肪肝治疗的分子机制之一。

参考文献

[1]. 周一帆, 谌力贞, 戴倩. 非酒精性脂肪肝与胰岛素抵抗及血脂异常的研究[J]． 数理医药学杂志, 2007, (6): 36．

[2]. Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis(NASH): where are we now and where are we going[J]. Gut, 2002, 50(5): 585-588.

[3]. Kim HJ, Kim HJ, Lee KE, et a1. Metabolic significance of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese, nondiabetic adults[J]. Arch lntem Med, 2004, 164(19): 2169-2175.

[4]. Vega RB, Huss JM, Kelly DP, et a1. The coactivator PGC-1 cooperates withperoxisome proliferator-activated receptorαin transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. Mol Cel Bio1, 2000, 20: 1868-1876.

[5]. Koo SH, Satoh H, Herzig S, et al. PGC-1 promotes insulin resistance in liverthrough PPAR-alpha-dependent induction of TRB-3. [J]. NatMed, 2004, 10: 530-534.

[6]. Zhang Y, Castelani LW, Sinai CJ, et a1. Peroxisome proliferator-activatedreceptor-gamma coactivator 1alpha(PGC—lalpha)regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. Genes Dev, 2004, 18: 157-169.

[7]. Okolo P, Diehl AM. Nonalcoholic steatohepatitis and focal fatty liver. In: FeldmanM, Sleisenger MH, Scharschmidt BF, editors. Sleisenger & Fordtran' s gastrointestinal and liver diseases. Philadelphia: WB Saunders; 1998. p. 1215-20.

[8]. Idilman R, Mizrak D, Corapcioglu D, et a1. Clinical trial: insulin-sensitizing agentsmay reduce consequences of insulin resistance in individuals with non-alcoholic steatohepatitis [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2008 Jul, 28(2): 200-8．

[9]. Loomba R, Lutchman G, Kleiner D E, et a1. Clinical trial: pilot study of metformin

For the treatment of non-alcoholic steatohepatitis[J]. Aliment Pharmaco1 Ther, 2009, 29: 172-82．

[10]. Nar A, Gedik O. The effect of metformin on leptin in obese patients with type 2 diabetes mellitus and nonalcoholic fatty liver disease[JJ]. Acta Diabetol, 2009 Jun, 46(2): 113-8.

[11]. Haukeland J W, Konopski Z, et al. Metformin in patients with non-alcoholic fattyliver disease: a randomized, controlled trial [J]. Scand J Gastroenterol, 2009, 44(7): 853-60.

[12]. Omer Z, Cetinkalp S, Akyildiz M, et a1. Efficacy of insulin-sensitizing agents innonalcoholic fatty liver disease[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2010 Jan, 22(1): 18-23.

[13]. Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS, et a1. The antidiabetic drug metforminactivates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. Diabetes. 2002 Aug; 51(8): 2420-2425.

[14]. Liu Y, Wan Q, Guan Q, Gao L, et a1. High-fat diet feeding impairs both theexpression and activity of AMPKa in rats' skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Jan 13; 339(2): 701-707.

[15]. Woo JL, Mina K, Hye-Sun P, et al. AMPK activation increases fatty acid oxidationin skeletal muscle by activating PPARαand PGC-1. Biochem Biophys Res Commun , 2006, 340: 291-295.

[16]. Masataka Suwa, Toru Egashira, Hiroshi Nakano, et al. Metformin increases thePGC-1 protein and Aoxidative enzyme activities possibly via AMPK phosphorylation in skeletal muscle in vivo. J Appl Physiol. 2006 Dec; 101(6): 1685-92.

[17]. Nikolic N, Rhedin M, Rustan AC, et al. Overexpression of PGC-1αIncreases FattyAcid Oxidative Capacity of Human Skeletal Muscle Cells. Biochem Res Int. 2012; 2012: 714074.

[18]. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. Science. 2005 Dec 9; 310(5754): 1642-6.

[19]. 杨林辉, 陈东风. 油酸诱导培养肝细胞脂肪变性模型的建立[J]. 重庆医学, 2007, 36(8): 698-700.

[20]. 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒性脂肪性肝病诊疗指南[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2010, 19(6): 483-487.

[21]. Ratziu V, Caldwell S, Neuschwander-Tetri B A. Therapeutic trials in nonalcoholic steatohepatitis: insulin sensitizers and related methodological issues[J]. Hepatology, 2010, 52(6): 2206-2215.

[22]. MaraíJoséGómez -Lechón, MaraíTeresa Donato, Alicia Martníez -Romero, et al. A humanhepatocellularinvitromodelto investigatesteatosis[J]. Chem Biol Interact, 2007, 165(2): 106-116.

[23]. Hui Wang, Ping-Kei Chan, Si-Yuan Pan. Et al. ERp57 is Up-Regulated in FreeFatty Acids-Induced Steatatic L-02 Cells and Human Nonalcoholic Fatty Livers[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2010, 110: 1447-1456.

[24]. Boden G, Cheung P, Stein TP, et a1. FFA cause hepatic insulin resistance byinhibiting insulin suppression of glycogenolysis[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002 Jul; 283(1): E12-9.

[25]. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin singalling and the regulation of glucose and lipidmetabolism[J]. Nature, 2001, 414(6865): 795-806.

[26]. Bradbury MW, Berk PD. Lipid metabolism in hepaticsteatosis[J]. Clin live Dis, 2004, 8(2): 639-641.

[27]. Jump BD, Botolon D, Wang Y, et al. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription[J]. J Nutr, 2005, 135(11): 2503.

[28]. Wang H, Kouri G, Wollheim CB. ER stess and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipotoxicity[J]. J Cell Sci, 2005, 118(17): 3905.

[29]. FAN Jian-gao, ZENG Ming-de(范建高, 曾民德). Fatty Liver Disease(脂肪性肝病)[M]. Beijing: People'S Medical Publishing House, 2005.

[30]. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. J Clin Invest. 2004 Jul; 114(2): 147-52.

[31]. Rodgers JT, Lerin C, Puigserver P. Metabolic adaptations through the PGC-1 a and SIRTI pathways [JJ]. FEBS Letters, 2008(1), 582: 46-53.

[32]. Suh S, Jeong IK, Kim MY, et al. Effects of resistance training and aerobic exercise on insulin sensitivity in overweight korean adolescents; a controlled randomized trial[J]. Diabetes Metab J , 2011, 35 ( 4); 418 X26.

[33]. Hsieh MC, Lin KD, Tien KJ, et al. Common polymorphisms of the peroxisomeproliferator-activated receptor-gamma (Pro12Ala) and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (Gly482Ser) and the response to pioglitazone in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Metabolism , 2010 , 59 ( 8 ): 1139-1144.

[34]. Rogge MM. The role of impaired mitochondria) lipid oxidation in obesity〔J]. BiolRes Nurs, 2009, 10(4): 356一73.

[35]. Bai XP, Li HL. Effects of fenofibrate on the expression of peroxisome proliferator activated-gamma coactivator-1 a in skeletal muscle of rats infused with intralipid[J]. Zhonghua Yixue Zazhi, 2010, 90(40); 285G-2859.

[36]. Yuzefovych L, Wilson G, Rachek L. Differential regulation of PGC-1 alpha

Expression in rat liver and skeletal muscle in response to voluntary running

〔J]. Am J Physiol Endocrinol Metab , 2010 , 299 ( 6 ):1096-1105.

[37]. Wu Z, Boss O. Targeting PGC- 1 alpha to control energy homeostasis[J]. Expert Opin Ther Targets, 2007, 11 ( 10 ): 1329- 1338.

[38]. Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, et al. PGC- 1alpha deficiency causes multisystem energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis[J]. PloS Biol, 2005, 3: e101.

[39]. Louet JF, Hayhurst G, Gonzalez FJ, et al. The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4αand cAMP-response elementbinding protein (CREB). J Biol Chem, 2002, 277(41).

[40]. Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, et al. Restoration of insulin-sensitiveglucosetransporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(7): 3820-5.

[41]. Caton PW, Nayuni NK, Kieswich J, et al. Metformin suppresses hepaticgluconeogenesis through induction of SIＲT1 and GCN5[J]. J Endocrinol, 2010, 205: 97.

[42]. Yoneda M, Hotta K, Nozaki Y, et a1. Association between PPARGCl A polymorphisms and the occurrence of nonalcoholic fatty liver disease(NAFLD). BMC Gastroenterol, 2008, 8: 27.

[43]. Estall J L, KahnM, CooperM P, et al. Sensitivity of lipid metabolism and insulinsignaling to genetic alterations in hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coac-tivator-1 alpha expression. [J]. Diabetes, 2009, 58: 1499-1508.

[44]. 时昭红, 张介眉, 林丽莉, 等. 葱白提取物对脂肪变性肝细胞模型PPAR-α 及PGC- 1表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26( 9) : 2042- 2045.

[45]. Pessayre D. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol Hepatol2007; 22 Suppl 1: S20-S27.

[46]. Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, et al. Systemic markers of lipid peroxidation andantioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. Am J Gastroenterol 2005; 100: 850-855.

[47]. MurphyM P. Howmitochondriaproducereactiveoxygenspecies. Biochem J, 2009, 417(1): 1-13.

[48]. 曾民德. 脂肪肝发病机制及其"二次打击"假设[J]. 中华消化杂志, 2002, 22(3):

167-168.

[49]. Perez M, Gonzdles L, Olarte R, et a1. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with insulin resistance in a young Hispanic population[J]. Prey Med, 2011, 52(2): 174-177.

[50]. Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, et al. Non- alcoholic fatty liver disease and themetabolic syndrome: an update[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(2): 185-192.

[51]. 沈勤炎. 二甲双胍缓释片不同联合用药方案治疗2型糖尿病成本-效果分析[J]. 中国医院用药评价与分析. 2008, 8(7): 522 523.

[52]. Zhang S. Lin X. Brickman WJ. et al. Association of plasma leptin concentrations with adiposity measurements in rural Chinese adolescents[J]. J Clin Endocrinol Metab. 2009.94(9): 3497-3504.

附 录

个人简介

程靖，女，汉族，1988年3月出生于安徽省砀ft县。2005年6月毕业于濉溪县第二中学。2005-2010年就读于安徽医科大学临床医学专业。2010-2011年本科毕业后在安医附院参加住院医师规范化培训一年。2011年考入安徽医科大学第一附属医院攻读临床营养学方向硕士学位，导师蒋建华副教授。在课题研究方面，采用L-02细胞建立NAFLD模型，观察不同浓度二甲双胍对NAFLD细胞模型PGC-1α基因及蛋白质表达的影响，以及PGC-1α的表达与肝脏细胞脂肪堆积、线粒体损伤的关系。

科研情况

胰岛素抵抗状态下肝脏PGC-1α表达异常在NAFLD中的作用（安徽省自然科学基金研究项目, No. 11040606M200）

攻读硕士学位期间发表的论文

程靖, 蒋建华. 二甲双胍对非酒精性脂肪肝细胞模型PGC-1α及脂质表达的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(3).

致谢

值此论文完成之际，首先向我尊敬的导师蒋建华主任医师在三年研究生期间学习方面给予我的细心指导和严格教诲、生活方面给予我的无私关怀，蒋老师丰富的工作经验、严谨的治学态度是我一生学习的榜样！

感谢安医医科大学副校长朱启星教授，给予我良好的实验室场所，并给予我无私的指导与帮助，使我能够顺利完成实验！

感谢安徽医科大学第一附属医院内分泌科王长江、章秋主任医师，感谢公共卫生学院胡传来教授，感谢学科系所有老师对我的培养，让我在专业理论与实践方面有了提高！

十分感谢于俊峰、周成藩、叶良平、张宝、管石侠、侯丽丽、张家祥、唐芸、王峰、查皖生、陈艳丽等老师和同学在这期间给予的热心指导和真诚的帮助； 感谢为我提供帮助的所有研究生！

特别感谢出席论文答辩的各位专家教授！感谢家人给予我的理解和支持！

**综述**

**二甲双胍用于NAFLD治疗的作用机制**

Mechanisms Involved in the treatment of Metformin Against Nonalcoholic Fatty Liver Disease

**摘要：**二甲双胍不仅是一种降糖药物而且对改善胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)

有重要的作用。目前很多临床研究证实二甲双胍在治疗非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)中有显著的疗效。二甲双胍对NAFLD肝脏的保护机制可能是由于下调炎症反应和保护线粒体功能。现就二甲双胍用于

NAFLD治疗的可能作用机制作一综述。**关键词**：非酒精性脂肪肝病二甲双胍

Abstrct: Metformin appears to be both an antihyperglycemic drug and a therapeutic tool for the treatment of insulin resistance. Many clinical studies have demonstrated that the treatment with metformin is effective to NAFLD. The liver-protective mechanisms of metformin in NAFLD may be attributed to the downregulation of the inflammatory response and protection of mitochondrial function. We reviews the possible mechanisms of metformin for the treatment of NAFLD.

**Key words**: Non-alcoholic fatty liver disease Metformin

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除外酒精和其他明确的肝损害因素所致的，以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变性为病理特征的临床综合征。目前被认为是一种与胰岛素抵抗(IR)和遗传易感性密切相关的代谢应激性肝损伤[1]。NAFLD患者经常伴有胰岛素抵抗有关的代谢紊乱如肥胖、葡萄糖耐量受损、2型糖尿病、高血压等。因此，对于NAFLD的治疗关键在于改善胰岛素抵抗。二甲双胍作为一种胰岛素增敏剂其降糖作用主要是通过降低肝脏葡萄糖的输出、增加外周组织对胰岛素介导的葡萄糖的应用、降低体重和血清游离脂肪酸水平和抵抗免疫抑制等途径[2]。二甲双胍作为一种降血糖药物可以在不刺激胰岛素分泌的基础上改善胰岛素抵抗和高胰岛素血症，还可以直接作用于胰岛

素靶细胞如肝脏细胞、脂肪细胞、肌肉细胞等，通过受体后机制增加胰岛素的敏感性，因而二甲双胍也被用于非酒精性脂肪肝的治疗。本文将就其用于NAFLD治疗的可能作用机制加以综述。

**1二甲双胍的的临床应用及作用机制**

1.1临床应用

二甲双胍作为临床一线口服降糖药，其不仅降糖作用显著而且还可以减轻体重、降低血脂，并且不会导致低血糖反应，所以二甲双胍被广泛使用。二甲双胍除了被用于治疗高血糖症和糖尿病外，其在治疗多囊卵巢综合症、代谢综合征、非酒精性脂肪肝方面也有显著地疗效[3]。另外，二甲双胍在改善动脉粥样硬化、心血管保护、改善微循环等方面也起到积极作用。有研究表明二甲双胍对多种癌症都具有抗肿瘤作用，包括前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌和结肠癌等[4]。二甲双胍具有多种抗肿瘤的生物活性，它能够促进肿瘤细胞凋亡而且可抑制肿瘤细胞的增殖、增强肿瘤对化疗药物的敏感性. 二甲双胍的临床应用前景广阔，还有许多新的领域的应用需要我们进一步去探索。

1.2作用机制

二甲双胍发挥作用主要通过两种途径：降低内源性高胰岛素血症和活化腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)。二甲双胍的作用机制主要有以下五个方面：1)减少糖异生作用，改善胰岛素敏感性，从而降低内源性高胰岛素血症；2)特异性地作用于AMPK；3)发挥抗炎作用；4)通过影响细胞周期发挥抗肿瘤作用；5)发挥免疫保护作用[ 5]。二甲双胍或其他AMPK激活剂可通过AMPK调节糖异生有关基因表达[ 6]，但作用机制尚不完全明确，有可能是通过活化AMPK从而抑制葡萄糖、胆固醇、甘油三酯的生成[7]和激活脂肪酸的氧化[8]。二甲双胍激活AMPK可能涉及三个机制：1)使AMPK 的

α亚单位的苏氨酸残基（Thr172）磷酸化从而变构激活AMPK[9]；2）通过蛋白磷酸酶和激活AMPK磷酸化下游的几个目标阻止Thr172的脱磷酸化，从而激活产生ATP的分解代谢如脂肪酸β氧化和糖酵解；3）抑制细胞内高度依赖三磷酸腺

苷（adenosine triphosphate, ATP）供应的代谢过程，如蛋白质和脂肪酸的合成、糖异生、胆固醇的生物合成等[4]。

**2二甲双胍与NAFLD**

2.1二甲双胍治疗NAFLD的临床研究

目前有许多临床试验已经证实二甲双胍在NAFLD的治疗中起着积极的作用。这些研究大多已评估不同剂量二甲双胍对肝脏代谢、生化指标及组织学的影响。2001年，Marchesini[10]等进行了第一次非随机对照研究，他们选择20名非糖尿病NASH患者并给予二甲双胍治疗（每天1.5克，持续4个月），结果他们观察到与单纯饮食治疗组相比药物治疗组患者的胰岛素抵抗、转氨酶水平及肝脏形态学均明显改善。但是，这项研究的局限性在于没有进行后续的活组织切片检查，因此不能对组织学改善的程度进行评价。另外一项研究将36名NASH患者随机分成单纯饮食治疗组和饮食+二甲双胍（每天1.7克，持续6个月）治疗组，研究者发现两组患者肝脏炎症坏死及纤维化程度并无差异，但是二甲双胍干预组患者血清转氨酶、胰岛素抵抗水平明显改善[11]。以上研究显示二甲双胍对NASH患者肝脏炎症及胰岛素抵抗均有明显效果，但是这些研究中的患者人数均较少。但是一项包含74例研究对象的随机对照实验也证实了同样的结果[12]。另外两个研究结果却发现二甲双胍治疗后对肝脏组织学和生化指标水平均未见明显改善[13-14]。一项包含50例处于NAFLD早期的非糖尿病肥胖患者的随机对照研究[15]评估

了在饮食干预的基础上加用二甲双胍（1克/天）治疗的效果，结果研究者发现饮食控制联合二甲双胍干预组肝脏脂肪变性的程度与单纯饮食治疗组相似，但二甲双胍治疗组空腹血糖、胰岛素抵抗水平有所改善。一项研究对象为173例年轻患者

（年龄8–17岁）的大型多中心、随机和安慰剂对照研究(Treatment of Nonalcoholic Liver Disease in Children, TONIC)[16]涉及了10所大学临床研究中心，所有患者经活检证实为NAFLD并随机接受二甲双胍（1克/天），维生素E或安慰剂治疗96周。研究表明与安慰剂组相比二甲双胍并不能降低血清ALT水平和改善肝脏组织学。最近的一项荟萃分析[17]发现在非酒精性脂肪肝患者中安慰剂组和二甲双胍治疗组比较肝脏组织学并无明显差异，但二甲双胍可显著降低体重和改善胰岛素抵

抗。

总的来说，这些研究大多是研究小规模的患者人群，包括了处于各个阶段的非酒精性脂肪肝病患者及合并有糖尿病或非糖尿病患者，使用不同的二甲双胍剂量，肝脏活检对肝脏组织学检查的限制及药物治疗前后活检时间点的可变性均能影响实验结果。尽管二甲双胍用于NAFLD治疗的临床研究的结果不尽一致，但许多研究均提示二甲双胍有改善NAFLD患者代谢功能的作用。为进一步客观正确评价二甲双胍在NAFLD治疗中的效果，还需要更多大样本、长期的深入研究。

2.2二甲双胍治疗NAFLD的作用机制

二甲双胍的主要作用部位是肝脏和骨骼肌。在肝脏，二甲双胍可通过提高胰岛素受体酪氨酸激酶的活性，减少肝糖产生[18]。而在骨骼肌，二甲双胍可增加胰岛素受体的数量、亲和力，还可以增加胰岛素从毛细血管到组织的转运，促进胰岛索在组织中发挥作用，改善IR。在骨骼肌中二甲双胍还可以通过激活

AMPK促进GLUT4基因的表达，促进组织对葡萄糖的摄取和利用。通过对高脂饮食诱导的NAFLD动物模型的研究发现二甲双胍可逆转肝脏脂肪变性、肝肿大和其他肝脏异常[19]，但是二甲双胍却不可减少肝脏细胞的凋亡。所以二甲双胍治疗NAFLD的分子机制还有待进一步研究。

2.2.1 AMPK是细胞内参与糖脂代谢的关键酶，AMPK的活化能够促进脂肪酸的氧化，改善IR、高胰岛素血症和高血脂症，同时能抑制炎症反应。活化的

AMPK不仅可以减少肝脏脂肪酸合成的限速酶乙酰辅酶A羧化酶(ACC)基因的表达还能灭活ACC的活性。核转录因子固醇调节元件结合蛋白-1(sterol regulatory element binding protein-1, SREBP-1)是调节脂肪合成的转录因子，可激活脂肪酸合成酶(FAS)及其他脂质代谢相关基因的转录，促进肝脏内脂质的合成。活化的

AMPK还可减少SREBP-1的表达，下调其靶基因FAS及其他脂质代谢相关基因在肝细胞内的表达，从而抑制脂质在肝脏的堆积并促进脂肪酸的氧化。而二甲双胍参与糖脂代谢的分子机制在于磷酸化AMPK从而激活AMPK相关的级联反应[20-21]。二甲双胍可通过激活AMPK减少肝内脂肪的蓄积，提高了肝脏对胰岛素的敏感性，延缓NAFLD的发生和发展。

2.2.2 TNF-α作为一种促炎细胞因子，不仅在机体组织损伤、炎性反应等过程中发挥重要作用，也是肝脏内抑制胰岛素信号传导的关键物质。在正常情况下其主要由脂肪组织产生，其血清水平与机体脂肪含量密切相关。Hui等[22]研究发现，通过抑制血清中高水平的TNF-α，可改善NAFLD机体的状态。大量研究[18、23]发现TNF-α可促进IR，影响肝脏内糖脂代谢，导致肝脂肪变性，从而促进NAFLD的形成和发展。而给予ob／ob小鼠TNF抗体治疗后可使其肝脏组织学明显改善，胰岛素敏感性增强，肝内脂肪酸含量下降，血清丙氨酸转氨酶(ALT)水平明显降低[24]。在临床研究中[25]，伴有肥胖的NASH患者肝脏中TNF-α及其受体p55mRNA的表达量明显高于伴有肥胖的非NASH患者，且与肝纤维化程度呈正相关。因此认为，TNF-α参与肝脏IR和脂质代谢异常的发生，是介导肝脏损伤及NAFLD进展的重要细胞因子。在NAFLD模型小鼠中，二甲双胍可以逆转肝脏肿大、脂质沉积和ALT异常，也能降低TNF-α表达[26]。大量研究发现二甲双胍可通过抑制TNF-α的表达从而减少脂质在肝脏的沉积及ATP耗竭[27]，并可有效地改善机体的

IR水平，从而在NAFLD的治疗中发挥积极的作用。

2.2.3最近一些研究结果还显示，二甲双胍对NAFLD的治疗作用不仅可通过直接抑制脂肪的合成，也可以通过调节多种脂肪细胞因子的合成。例如二甲双胍可通过诱导脂联素的合成从而激活AMPK，降低脂肪酸的合成并且增加游离脂肪酸的β-氧化和，从而预防和改善脂质在肝脏的沉积。二甲双胍还可以通过减少

cAMP的生成、降低MAPK和PKA的活性，从而抑制儿茶酚胺诱导的脂肪分解[28]。目前有许多药物对NAFLD的治疗有一定的作用。但是目前尚无特效、作用

肯定的药物，对NAFLD患者仍需要进行综合治疗。二甲双胍通过参与糖脂代谢，增强胰岛素敏感性，调节多种细胞因子和转录因子的的表达及活性等作用阻止肝脏脂肪变性，延缓单纯性脂肪肝向脂肪性肝炎、肝纤维化发展的过程，因此可有效防治NAFLD的发生和发展。尤其是对于合并肥胖、2型糖尿病等胰岛素抵抗综合征的NAFLD患者，可在检测肝功能水平的基础上长期应用二甲双胍治疗。

参考文献

[1]. 范建高. 非酒精性脂肪性肝病研究进展. 中华糖尿病杂志, 2009, 11(1)增刊: 22.

[2]. Anisimov, V. N., Metformin for aging and cancer prevention. Aging (Albany NY), 2010, 2, (11), 760-774.

[3]. Kourelis, T. V.; Siegel, R. D., Metformin and cancer: new applications for an old drug. Med Oncol, 2011 .

[4]. Dowling R J, Goodwin P J, Stambolic V. Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment. BMC Med, 2011, 9, 33.

[5]. Papanas N, Maltezos E, Mikhailidis D P. Metformin and cancer: licence to healExpertOpinInvestigDrugs, 2010, 19, (8), 913-917.

[6]. Miller R A, Birnbaum M J. An energetic tale of AMPK-independent effects of metformin. J Clin Invest, 2010, 120, (7), 2267-2270.

[7]. Grisouard J, Timper K, Radimerski T M, et al. Mechanisms of metformin action on glucose transport and metabolism in human adipocytes. Biochem Pharmacol, 2010, 80, (11), 1736-1745.

[8]. Kaser S, Ebenbichler C F, Tilg H. Pharmacological and non-pharmacological treatment of non-alcoholic fatty liver disease. Int J Clin Pract, 2010, 64, (7), 968-983.

[9]. Foretz M, Hebrard S, Leclerc J, et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. J Clin Invest, 2010, 120, (7), 2355-2369.

[10]. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, et al. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. Lancet. 2001 Sep 15; 358(9285): 893-4.

[11]. Uygun A, Kadayifci A, Isik AT, et al. Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. Aliment Pharmacol Ther. 2004 Mar 1; 19(5): 537-44.

[12]. Idilman R, Mizrak D, Corapcioglu D, et al. Clinical trial: Insulin-sensitizing agents may reduce consequences of insulin resistance in individuals with non-alcoholic steatohepatitis. Aliment. Pharmacol. Ther. 2008, 28, 200–208.

[13]. Haukeland J W, Konopski Z, Eggesbo H B, et al. Metformin in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized, controlled trial. Scand. J. Gastroenterol. 2009, 44, 853–860.

[14]. Shields W W, Thompson K E, Grice G A, et al. The Effect of Metformin and Standard Therapy versus Standard Therapy alone in Nondiabetic Patients with Insulin Resistance and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH): A Pilot Trial. Ther. Adv. Gastroenterol. 2009, 2, 157–163.

[15]. Garinis G A, Fruci B, Mazza A, et al. Metformin versus dietary treatment in nonalcoholic hepatic steatosis: A randomized study. Int. J. Obes. 2010, 34, 1255–1264.

[16]. Lavine J E, Schwimmer J B, Molleston J P, et al. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children: TONIC trial design. Contemp. Clin. Trials 2010, 31, 62–70.

[17]. Musso G, Cassader M, Rosina F, et al. Impact of current treatments on liver disease, glucose metabolism and cardiovascular risk in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A systematic review and meta-analysis of randomised trials. Diabetologia 2012, 55, 885–904.

[18]. Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, et al. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. Nat Med, 2000, 6: 998-1003.

[19]. Duvnjak M, Tomasic V, Gomercic M, et al. Therapy of nonalcoholic fatty liver disease: current status. J Physiol Pharmacol, 2009, 60 Suppl 7, 57-66.

[20]. Musi N, Hirshman MF, Nygren J, et al. Metformin increases AMP activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes[J]. Diabetes,

2002, 51(7):2074-81.

[21]. Zhou G, Myers R, Li Y, et a1. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J Clin Invest, 2001, 108: 1167～1174.

[22]. Hui J M, Hodge A, Farrell G C, et al. Beyond insulin resistance in NASH: TNF alpha or adiponectinHepatology, 2004, 40: 46-54.

[23]. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, et a1. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-αfunction[J]. Nature, 1997, 389(6651): 610-614.

[24]. Li Z, Yang S, Lin H, et a1. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2003 Feb; 37(2): 343-50.

[25]. Crespo J, Cayon A, Fernández -Gil P, et a1. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. Hepatology. 2001 Dec; 34(6): 1158-63.

[26]. Kohjima M, Higuchi N, Kato M, et al. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2008, 21: 507-511.

[27]. Meuillet EJ, Wiernsperger N, Mania-Farnell B, et al. Metformin modulates insulin receptor signaling in normal and cholesterol-treated human hepatoma cells (HepG2). Eur J Pharmacol. 1999 Jul 21; 377(2-3): 241-52.

[28]. Zhang S, Liu X, Brickman WJ, et al. Association of plasma leptin concentrations with adiposity measurements in rural Chinese adolescents[J]. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2009, 94: 3497-3504.