

王顺意,陈思烁,于天力,等.巨噬细胞 AMPK α 1 敲除对非酒精性脂肪肝小鼠模型的影响 [J].中国比较医学杂志,2023,33(1):85-92.

Wang SY,Chen SS,Yu TL, et al. Effect of macrophage AMPK α 1 knockout on a non-alcoholic fatty liver model in mice [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 85-92.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.011

巨噬细胞 AMPK α 1 敲除对非酒精性脂肪肝 小鼠模型的影响

王顺意,陈思烁,于天力,林彩霞,王丽京,郑凌云*

(广东药科大学,生命科学与生物制药学院,广州 510006)

【摘要】目的 研究巨噬细胞特异性敲除 AMP 活化蛋白激酶 α 1 (AMPK α 1)对高脂高糖高胆固醇饮食诱导的非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)小鼠模型的影响并探讨可能的作用机制。**方法** 利用巨噬细胞特异的 cre 小鼠与 AMPK α 1^{fllox/fllox}(AMPK^{fl/fl})小鼠杂交,通过 DNA 基因型鉴定,获得巨噬细胞 AMPK α 1 敲除(AMPK ^{Δ M ϕ})鼠;给予 AMPK α 1^{fllox/fllox}和 AMPK ^{Δ M ϕ} 两种小鼠高脂高糖高胆固醇饮食(HFHC 饮食)12 周诱导 NAFLD 模型;OGTT 测定两种小鼠葡萄糖耐量,HE 染色观察两种小鼠 NAFLD 肝病理改变差异,结合油红 O 染色观察肝脂滴堆积程度;利用 GC-MS 研究两种小鼠血清脂质组学改变。**结果** DNA 基因型鉴定的凝胶电泳结果显示,AMPK α 1^{fllox/fllox}条带为 450 bp,对应野生型条带为 334 bp,lyz2-cre 条带为 700 bp,对应野生型条带为 350 bp;Western blot 结果证实 AMPK ^{Δ M ϕ} 小鼠的巨噬细胞不表达 AMPK α ,AMPK^{fl/fl}对照鼠巨噬细胞中 AMPK 表达;NAFLD 模型中,与 AMPK^{fl/fl}小鼠相比,AMPK ^{Δ M ϕ} 小鼠肝组织中更多的肝细胞出现脂肪变性,且油红 O 染色面积增多;OGTT 结果显示,与 AMPK^{fl/fl}小鼠相比,AMPK ^{Δ M ϕ} 小鼠的血糖在 15 min 时显著升高;非靶向脂质组学结果显示 AMPK ^{Δ M ϕ} 小鼠血清中丙酸及乳酸较 AMPK^{fl/fl}小鼠显著减少。**结论** 巨噬细胞 AMPK α 1 敲除促进 NAFLD 小鼠模型肝脂肪变性并下调血清丙酸和乳酸浓度。

【关键词】 AMPK;巨噬细胞;NAFLD;丙酸;乳酸

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0085-08

Effect of macrophage AMPK α 1 knockout on a non-alcoholic fatty liver model in mice

WANG Shunyi, CHEN Sishuo, YU Tianli, LIN Caixia, WANG Lijing, ZHENG Lingyun*

(College of Life Sciences and Biopharmaceuticals, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of macrophage-specific knockout of AMP-activated protein kinase α 1 (AMPK α 1) on a high fat, fructose and cholesterol diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) mouse model and to explore the possible mechanism. **Methods** Lyz2-cre mice (macrophage-specific cre mice) and AMPK α 1^{fllox/fllox} (AMPK^{fl/fl}) mice were crossed to generate macrophage-specific AMPK α 1 gene knockout (AMPK ^{Δ M ϕ}) mice by DNA genotyping. AMPK α 1^{fllox/fllox} mice and APMK ^{Δ M ϕ} mice were fed a high fat, fructose, and cholesterol diet (CHFF diet) for 12 weeks to establish the NAFLD model. Glucose tolerance was measured by an OGTT. Differences in liver pathological changes of the two kinds of mice were observed by HE staining. Accumulation of liver lipid droplets was observed by oil red O staining. Changes in serum lipomics of two kinds of mice were assessed by GC-MS. **Results** Genotyping by gel

[作者简介]王顺意(1997—),男,在读硕士研究生,研究方向:病理学与病理生理学。E-mail:wangshunyi17@163.com

[通信作者]郑凌云(1976—),女,教授,硕士生导师,研究方向:心血管炎症性疾病的分子机制及药物靶点研究。

E-mail:zhenglingyun@gdpu.edu.cn

electrophoresis showed that the AMPK α 1^{fllox/fllox} band was 450 bp, the corresponding wildtype band was 334 bp, the lyz2-cre band was 700 bp, and the corresponding wildtype band was 350 bp. Western blot confirmed that macrophages of AMPK Δ ^{M ϕ} mice did not express AMPK α . AMPK α expression was found in macrophages of AMPK^{fl/fl} control mice. In the NAFLD model, compared with AMPK^{fl/fl} mice, more hepatocytes in AMPK Δ ^{M ϕ} mice showed steatosis and an increase in the oil red O staining area. OGTT showed that, compared with AMPK^{fl/fl} mice, blood glucose of AMPK Δ ^{M ϕ} mice was increased significantly at 15 min. Non-targeted lipomics showed that the serum levels of propionic and lactic acids in AMPK Δ ^{M ϕ} mice were significantly lower than those in AMPK^{fl/fl} mice. **Conclusions** Macrophage-specific AMPK α 1 knockout promotes hepatic steatosis and downregulates serum propionic acid and lactate levels in NAFLD model mice.

【Keywords】 AMPK; macrophages; NAFLD; propionic acid; lactic acid

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 已经成为威胁全球人类健康的主要疾病之一,其全球患病率约为 25%^[1]。NAFLD 是指非饮酒条件下,患者超过 5% 的肝细胞中存在脂肪变性^[2-3]。作为一种进行性疾病,NAFLD 可从非酒精性肝脂肪变性 (NAFL) 演变为非酒精性肝炎 (NASH),进一步发展为肝纤维化,最终导致肝硬化或肝癌^[4-5]。在 NAFLD 患者肝中,M1 型巨噬细胞为炎症因子的主要来源,激活将促进炎症的发展^[6-7]。AMP 依赖的蛋白激酶 (AMPK) 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,由 α (α 1/2) 催化亚基, β (β 1/2) 和 γ (γ 1/2/3) 两个调节亚基组成,是细胞内调节能量平衡和对代谢应激反应的能量传感器^[8]。AMPK 参与巨噬细胞线粒体脂质代谢进而调控其炎症反应^[9-10],AMPK 缺失将促进巨噬细胞 M1 型极化^[11]。但巨噬细胞特异性敲除 AMPK α 1 对 NAFLD 的作用尚未见报道。本研究利用巨噬细胞 AMPK α 1 敲除小鼠构建 NAFLD 模型,检测血糖及血清 TG 变化,观察肝病理改变及脂滴堆积程度,并利用 GC/MS 技术^[12]探究血清脂质组学改变。

1 材料和方法

1.1 实验动物

AMPK α 1^{fllox/fllox} (AMPK^{fl/fl}) 小鼠及 lyz2-cre 小鼠为 SPF 级的 C57BL/6J 背景小鼠,雄性,各 10 只,4 周龄,体重 14~15 g,购自美国 Jackson lab,购买动物卫生证书编号为 [2011A00085]。于广东省实验动物监测所进行胚胎净化,生产许可证号为 [SCXK (粤)2018-0044]。饲养于广东药科大学实验动物中心无特殊病原体 SPF 级环境,饲养许可证号为 [SYXK (粤)2017-0125],环境温度为 22~26℃,环境湿度为 50%~70%,压差 25 Pa,洁净度 10 000 级,氨浓度 15 mg/m³,照明度 150~300 Lux,定时循环照

明,8:00~20:00 为光照时间,夜间 20:00 至次日 8:00 为无照明时间。动物饲养设施配备了独立通风系统 (IVC),换气次数为每小时 10 次。小鼠日常维持饲料采购于广东省医学实验动物中心。本研究所有动物实验均通过广东药科大学动物伦理委员会审查批准许可 (gdpulacspf2021006),实验动物饲养及实验过程均按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

GAPDH 抗体 (CST, 2118S); AMPK α 抗体 (CST,2795S); Oil red (Sigma, O0625); 苏木精 & 伊红染液 (南昌雨露实验器材有限公司); 油红 O 染色液 (Sigma, O0625); 97% BSTFA+1% TMCS (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, B118473); 吡啶 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, P111512); 甲酰胺 (百灵威科技有限公司, 533032); 色谱级甲醇 (Sigma, 34860); 十九烷酸 (Sigma, N5252); 高脂高糖高胆固醇 (HFFC) 饲料 (D09100310) 购自北京博奥派克生物科技有限公司。ImageQuant LAS4000 化学发光成像仪 (General Electric, 0682345); 普通光学显微镜 (Olympus, BX43); 气相色谱与质谱联用仪 (Agilent GC/MS, 7890B)。

1.3 实验方法

1.3.1 AMPK Δ ^{M ϕ} 小鼠的基因型鉴定

以 cre-loxp 技术,将 AMPK^{fl/fl} 小鼠及 lyz2-cre 小鼠杂交获得子代,提取组织 DNA 以 PCR 的方法鉴定小鼠基因型;提取小鼠骨髓来源原代巨噬细胞 (BMDM) 蛋白以 Western blot 的方法检测 AMPK α 表达情况鉴定敲除结果,获得巨噬细胞 AMPK α 1 特异性敲除的 AMPK Δ ^{M ϕ} 小鼠。

1.3.2 NAFLD 模型

随机选取 4 周龄健康的 AMPK^{fl/fl} 和 AMPK Δ ^{M ϕ} 小鼠给予 HFFC 饮食 12 周,分组为 AMPK^{fl/fl} 对照

组、AMPK^{ΔMφ} 对照组、AMPK^{fl/fl} HFFC 组和 AMPK^{ΔMφ} HFFC 组。

1.3.3 口服葡萄糖耐量实验(OGTT)

小鼠空腹 12 h 后测定 0 min 时血糖浓度,将 100 μg/mL 的葡萄糖溶液以 20 μL/g 剂量灌胃,测定 15、30、60、120 min 的血糖浓度。

1.3.4 HE 染色

肝组织脱水并石蜡包埋后制作石蜡切片,于 65℃烘箱 30 min,二甲苯脱蜡,梯度乙醇复水,苏木素染色 1 min 30 s,流水返蓝 30 min,伊红染色 10 s。

1.3.5 油红 O 染色

肝组织蔗糖脱水后制作冰冻切片,于 60%异丙醇水溶液润洗 5 min,置于油红工作液中避光染色 30 min,于 60%异丙醇水溶液中分化,苏木素染色 1 min,流水返蓝 30 min。

1.3.6 GC-MS 非靶向代谢组学

(1)样品制备:将小鼠麻醉后以毛细采血管对小鼠眼眶静脉采血,室温静置 5 min,4℃ 5000 r/min 离心 15 min,取上层血清置于-80℃待用。取小鼠血清 50 μL,加入 10 μL 的 1 mg/mL 的十九烷酸甲醇溶液,加入 250 μL 萃取溶液(水 v:甲醇 v:氯仿 v=2:5:2),混匀后 4℃静置 20 min,13 300 r/min 离心 15 min,取 200 μL 上清于新的 1.5 mL EP 管中,真空干燥,加入 80 μL 甲氧胺吡啶(15 mg/mL),37℃ 孵育 90 min,加入 80 μL 的含 1% TMCS 的 BSTFA 溶液,70℃孵育 60 min,样品转移至微量反应瓶中,上机。

(2)气相色谱-质谱条件:色谱条件:Agilent HP-5 MS 石英毛细管柱,进样体积为 1 μL,模式为不分流进样,载气为 He(1 mL/min),进样口 260℃,传输线 240℃,程序为:初始 60℃(1 min),8℃/min 至 100℃(保持 5 min),15℃/min 至 170℃(保持 5 min),10℃/min 至 210℃(保持 5 min),15℃/min 升温至 350℃(保持 5 min),运行条件为 350℃,7 min。质谱条件:离子源(230℃),四级杆(150℃),离子化方式为 EI,电子轰击能量为 70 eV,离子扫描模式为全扫描模式,溶剂延迟为 12 min。

1.4 统计学方法

本研究中病理图像数据用 Image pro plus 6.0 图像分析软件进行统计,实验数据主要用 Graphpad prism 9.0 进行分析及可视化。GC-MS 结果均用 Agilent Masshunter Qualitative Analysis B. 07.00 定性软件和 NIST 14. L 数据库对混标进行定性分析得到

化合物信息,用 Agilent Masshunter 定量分析 B. 07.01 根据混标化合物表对化合物定量分析,结果用 Simca Version 14.1.0.2047 进行 PCA 分析获得 VIP>1 及 P<0.05 的化合物,KEGG 在线数据库比对获得 KEGG ID,在 Metaboanalyst 5.0 在线进行富集分析及通路分析。P<0.05 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 AMPK^{ΔMφ} 小鼠基因型鉴定

对小鼠脚趾组织抽提 DNA 后,以 PCR 的方法鉴定 AMPK^{ΔMφ} 小鼠基因型,PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,根据电泳结果 PCR 扩增产物长度判断基因型。

如图 1A 所示,对比 DL1000 DNA Marker 条带,LYZ2-cre 条带为 700 bp,野生型条带为 350 bp。AMPKα1^{fllox/fllox} 条带为 450 bp,野生型条带为 334 bp。如图 1B 所示,与 AMPK^{fl/fl} 对照组小鼠相比,AMPK^{ΔMφ} 小鼠敲除巨噬细胞 AMPKα1 后,巨噬细胞 AMPKα 不表达,说明巨噬细胞特异性敲除 AMPKα1 的 AMPK^{ΔMφ} 小鼠构建成功。

2.2 小鼠口服葡萄糖耐量(OGTT)检测

给予 AMPK^{fl/fl} 小鼠及 AMPK^{ΔMφ} 小鼠高脂高胆固醇高糖饮食(HFFC)12 周后进行口服葡萄糖耐量检测。如图 2 所示,饥饿 12 h 后 AMPK^{fl/fl} 小鼠组空腹血糖(9.33±0.97) mmol/L,AMPK^{ΔMφ} 组小鼠组(7.46±1.34) mmol/L,两者无统计学差异(P>0.05)。两种小鼠血糖在灌胃葡萄糖溶液后迅速升高,15 min 时达到峰值,随后逐渐下降,在 120 min 时基本恢复空腹时血糖水平,两组小鼠血糖变化规律基本一致。15 min 时 AMPK^{fl/fl} 组小鼠血糖(17.5±3.5) mmol/L,AMPK^{ΔMφ} 组小鼠血糖(22.5±1.9) mmol/L,两者有显著差异(P<0.05),提示巨噬细胞特异性敲除 AMPKα1 在 NAFLD 诱导后出现糖耐量异常。

2.3 血清甘油三酯(TG)检测

为探究巨噬细胞特异性敲除 AMPK 对 HFFC 饮食下小鼠体内脂质代谢的变化,我们检测小鼠血清甘油三酯(TG)水平,如图 3 所示,与对照组 AMPK^{fl/fl} 组小鼠相比,AMPK^{ΔMφ} 组小鼠血清甘油三酯水平显著提高(P<0.05)。

2.4 HFFC 饮食小鼠肝组织病理学观察

如图 4 所示,小鼠肝 HE 染色可以发现,AMPK^{fl/fl} 组小鼠肝出现轻微的小空泡样变性,但肝基本结构正常,小叶结构完整。AMPK^{ΔMφ} 组小鼠肝

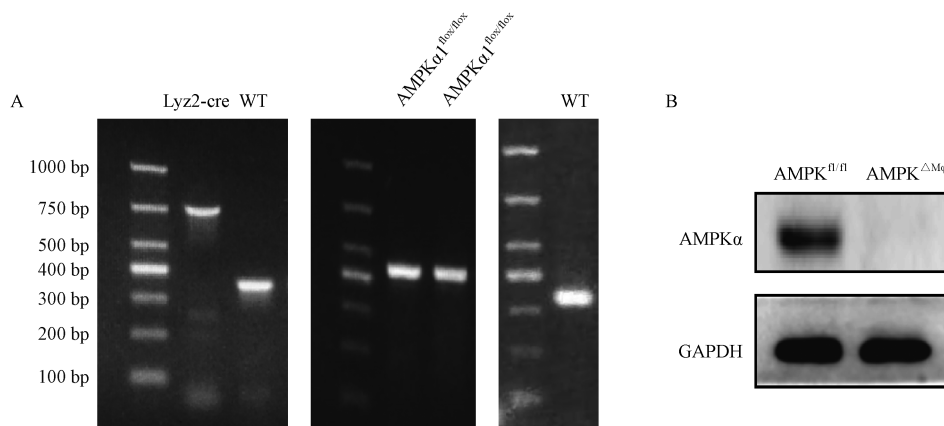
基本结构不清晰,肝小叶结构紊乱,肝出现严重的弥漫性空泡样变性,空泡增大,部分肝索结构消失,肝细胞细胞核偏移至细胞边缘,肝细胞大小不均一,部分肝细胞体积膨大,核膜边界不清晰。油红染色结果显示,AMPK^{fl/fl}组小鼠肝细胞中堆积的红色脂滴数量少、体积小,与对照组 AMPK^{fl/fl}组小鼠相比,AMPK^{ΔMφ}组小鼠肝细胞内红色脂滴数量明显增多($P < 0.01$),体积变大,颜色较为鲜艳,说明 AMPK^{ΔMφ}组小鼠肝细胞脂质沉积多于 AMPK^{fl/fl}组小鼠。

2.5 NAFLD 小鼠血清代谢组学分析

基于 GC-MS 对样品进行分析,将混标原始数据

导入 Agilent Masshunter Qualitative Analysis B.07.00 定性软件,获得 249 个峰信号化合物,如图 5 总 TIC 结果,各峰在保留时间上可见有良好的重现性,各组代谢轮廓存在一定差异。

如图 6A 所示,各组小鼠血清代谢物在 PCA 图上能较好的分离,并且组内可以很好的聚合起来, $R^2X[2] = 0.302$ 。如图 6B 所示,对 PCA 模型进行 Hotelling's T^2 检验所有样本检验值均明显低于 T^2 (95%),PCA 模型拟合度较高。基于 PCA 模型建立有监督的 PLS-DA 模型及 HFFC 组两组间 OPLS-DA 模型对 249 个差异化合物进行分析。如图 6C 所示,PLS-DA 各组之间可以很好的分离开来, $R^2X[2] =$

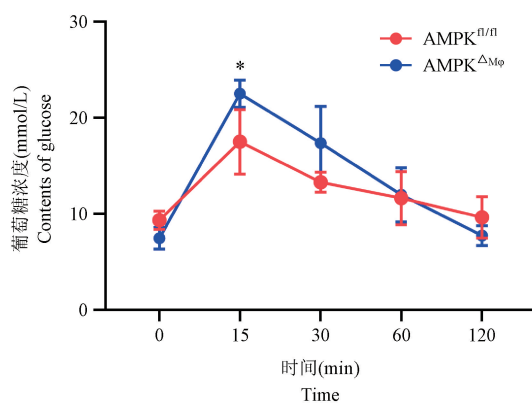


注:A:小鼠组织 DNA 琼脂糖凝胶电泳显影图;B:小鼠骨髓来源原代巨噬细胞 AMPK α 的蛋白质印迹图。

图 1 小鼠基因型鉴定结果

Note. A, DNA agarose gel electrophoresis development diagram of mouse tissue. B, Western blot of AMPK α in primary macrophages derived from mouse bone marrow.

Figure 1 The results of mouse genotype identification

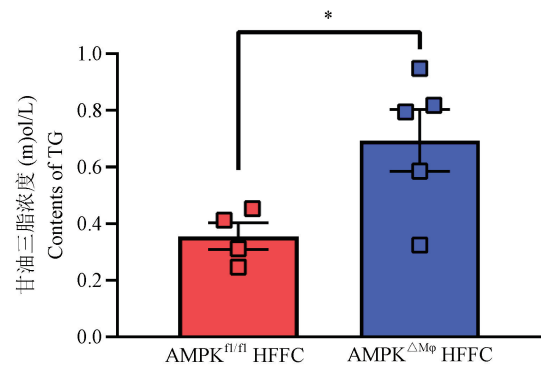


注:小鼠血糖水平各时间段结果。与 AMPK^{fl/fl} 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 2 巨噬细胞 AMPK 敲除对 HFFC 饮食小鼠口服葡萄糖耐量的影响($n = 5$)

Note. Results of blood glucose levels in mice at different time periods. Compared with AMPK^{fl/fl} group, * $P < 0.05$.

Figure 2 Effects of AMPK knockout in macrophages on oral glucose tolerance (OGTT) in HFFC-fed mice

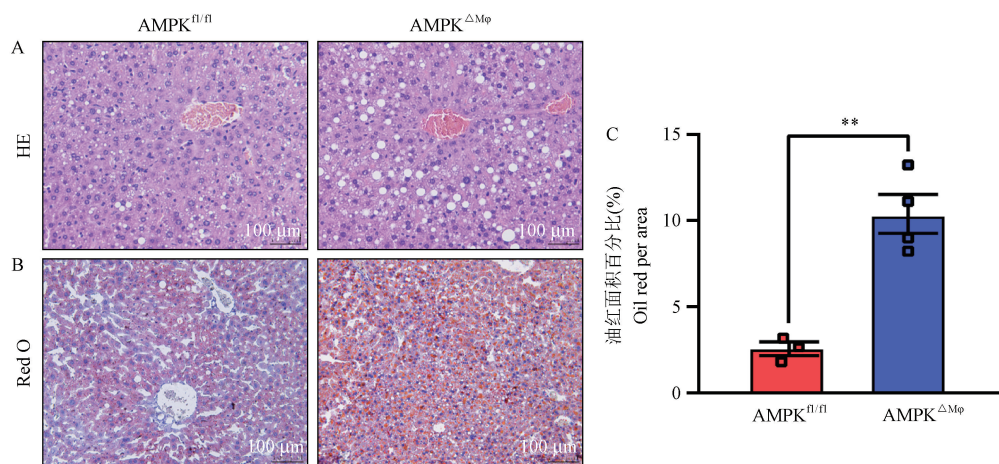


注:血清甘油三酯水平检测结果。与 AMPK^{fl/fl} 组比, * $P < 0.05$ 。

图 3 巨噬细胞 AMPK 敲除对 HFFC 饮食小鼠血清甘油三酯水平($n = 4$)

Note. Test results of serum triglyceride level. Compared with AMPK^{fl/fl} group, * $P < 0.05$.

Figure 3 Serum triglyceride levels in macrophage AMPK knockout HFFC diet mice

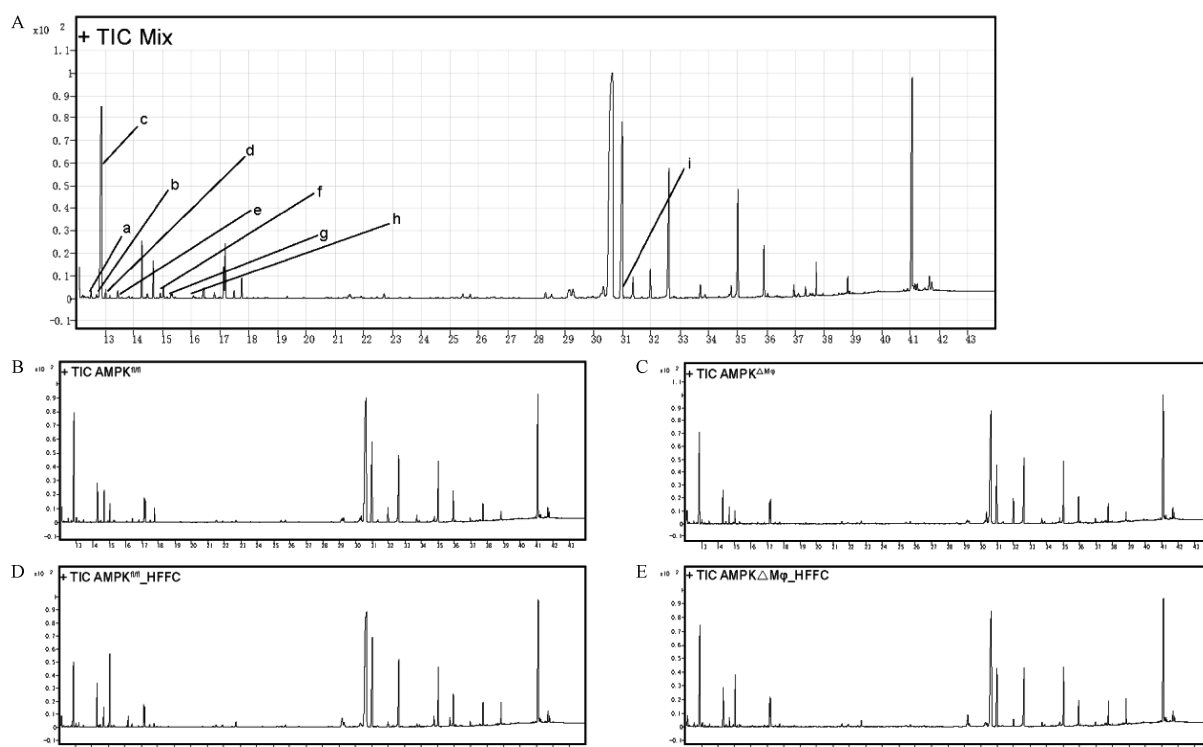


注:A:小鼠肝组织 HE 染色结果;B:小鼠肝组织油红 O 染色结果;C:油红 O 染色面积统计图。与 AMPK^{fl/fl} 组相比, * $P < 0.01$ 。

图 4 巨噬细胞敲除 AMPK 小鼠肝病理结果 ($n=3$)

Note. A, HE staining results of mouse liver tissue. B, Results of oil red O staining in mouse liver. C, Statistical diagram of oil red O staining area. Compared with AMPK^{fl/fl} group, * $P < 0.01$.

Figure 4 Pathological results of liver in macrophage knockout AMPK mice



注:A:混标(a:Propanoic acid;b:N,N-Diethylglycine;c:D-Lactic acid;d:Glycolic acid;e:Tridecane;f:(R)-3-Hydroxybutanoic acid;g:(4-Hydroxyphenyl)-2-(methylamino) ethanol;h: Ethene;i: 9-Hexadecenoic acid;B: AMPK^{fl/fl} 对照组;C: AMPK^{ΔMφ} 对照组;D: AMPK^{fl/fl} HFFC 组;E: AMPK^{ΔMφ} HFFC 组。

图 5 小鼠血清 GC-MS 总离子流图(TICs) ($n=5$)

Note. A, Mixed standard (a, Propanoic acid. b, N,N-Diethylglycine. c, D-Lactic acid. d, Glycolic acid. e, Tridecane. f, (R)-3-Hydroxybutanoic acid. g, (4-Hydroxyphenyl)-2-(methylamino) ethanol. h, Ethene. i, 9-Hexadecenoic acid. B, AMPK^{fl/fl} control group. C, AMPK^{ΔMφ} control group. D, AMPK^{fl/fl} HFFC group. E, AMPK^{ΔMφ} HFFC group.

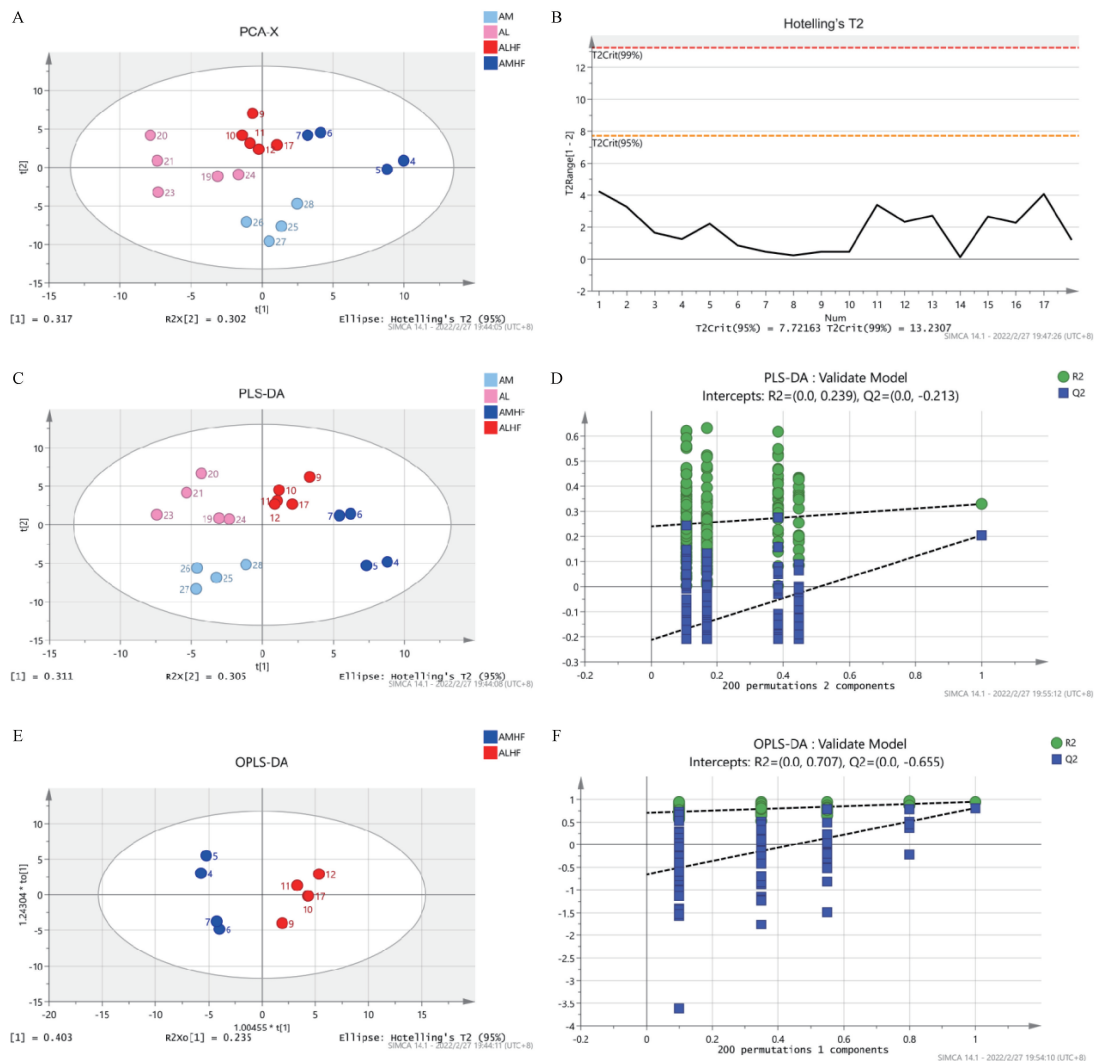
Figure 5 Mouse serum GC-MS total ion current map (TICs)

0.305。将 PLS-DA 结果进行 200 次的置换检验,图 6D 可见,Q2 与 Y 轴交点低于 0,PLS-DA 模型具有较好的拟合度,模型可靠性及预测性强。将 PLS-DA 模型的 AMHF 组($AMPK^{N/N}$ + HFFC 组)及 ALHF 组($AMPK^{\Delta M\phi}$ + HFFC 组)进行 OPLS-DA 分析结果显示(图 6E), $R^2X[1]=0.235$,两组可以很好的分离,组内聚合度较高,OPLS-DA 模型进行 200 次置换检验结果显示(图 6F),Q2 与 Y 轴交点明显低于 0,说明模型可靠。

如表 1 所示,以 OPLS-DA 模型进行 VIP 预测差异化合物,得到 $VIP>1$ 共 15 个化合物。其中 $P<$

0.05 的差异化合物中,(R)-3-羟基丁酸、对辛弗林、乙烯发生上调($FC>0$),丙酸、N,N-二乙基甘氨酸、D-乳酸、羟基乙酸、十三烷、9-十六碳烯酸发生下调($FC<0$)。

进一步对筛选化合物进行富集分析(图 7A)这些差异化合物的相关代谢通路主要包括半乳糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、酮体的合成和降解、丁酸代谢、果糖和甘露糖代谢、丙酮酸代谢及丙酸代谢。对差异化合物进行基因-化合物网络分析,如图 7B 所示,包括 *ACSL1*、*GUSB*、*ABHD6*、*DECRI*、*SLC16A1*、*GCG*、*CAT*、*LDHD*。在 genecards 在线综合



注:A:主成分分析(PCA);B:PCA 分析的 Hotelling's T2 检验;C:PCA 分析结果的偏最小二乘回归分析(PLS-DA);D:PLS-DA 分析的置换检验;E:HFFC 下的 $AMPK^{N/N}$ 组(AMHF)及 $AMPK^{\Delta M\phi}$ 组(ALHF)的正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA);F:OPLS-DA 分析的置换检验。

图 6 小鼠肝组织代谢轮廓分析

Note. A, Principal component analysis (PCA). B, Hotelling's T2 test for PCA analysis. C, Partial least squares regression analysis (PLS-DA) for PCA analysis results. D, Permutation test for PLS-DA analysis. E, Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) of $AMPK^{N/N}$ group (AMHF) and $AMPK^{\Delta M\phi}$ group (ALHF) under the action of HFFC. F, Permutation test of the OPLS-DA analysis.

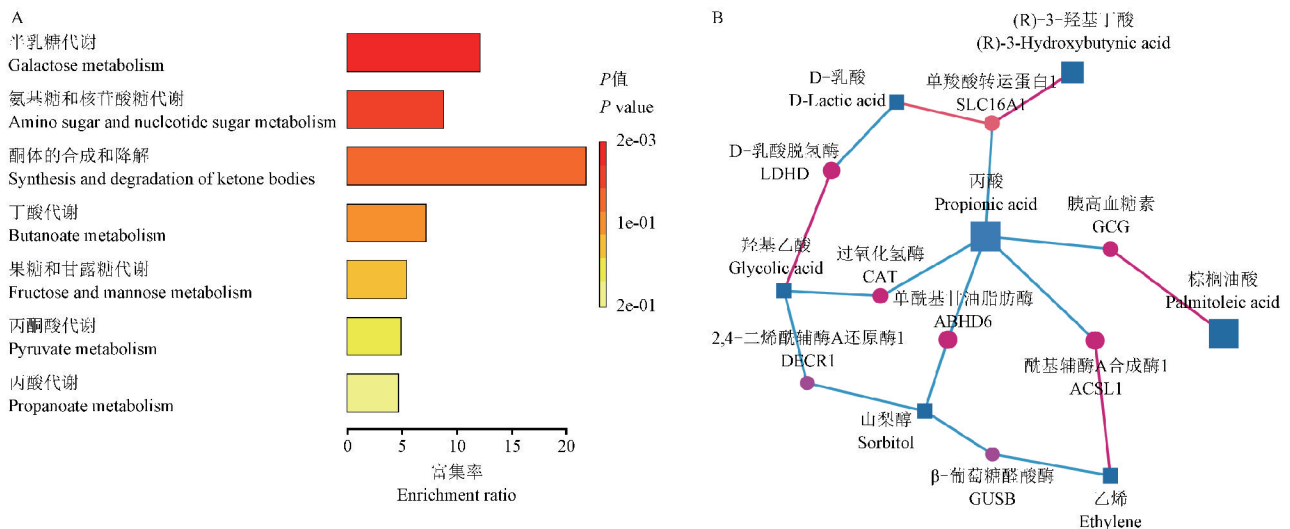
Figure 6 Metabolic profile analysis of mouse liver tissue

表 1 HFFC 饮食下 AMPK^{fl/fl} 组及 AMPK^{ΔMφ} 组小鼠血清差异代谢物
Table 1 Differential metabolites in serum of mice in AMPK^{fl/fl} group and AMPK^{ΔMφ} group under HFFC diet

序号 No.	保留时间 (min) RT	化学式 Formula	代谢产物 Metabolites	变量重要性 值 VIP	P 值 P value	差异倍数 FC	KEGG 数据库 编号 KEGG ID
1	12.550	C ₃ H ₆ O ₂	丙酸 Propanoic acid	5.31845	0.0012	-0.9180	C00163
2	12.738	C ₆ H ₁₃ NO ₂	N,N-二乙基甘氨酸 N,N-diethylglycine	5.30942	0.0012	-0.9134	C16647
3	12.900	C ₃ H ₆ O ₃	D-乳酸 D-lactic acid	5.31058	0.0012	-0.9135	C00256
4	13.201	C ₂ H ₄ O ₃	羟基乙酸 Glycolic acid	6.02812	0.4136	-1.4901	C00160
5	13.307	C ₁₃ H ₂₈	十三烷 Tridecane	6.02454	0.0066	-1.4890	C13834
6	13.363	C ₄ H ₁₀ O ₂	1,3-丁二醇 1,3-butanediol	1.83364	0.0605	-4.9295	C20335
7	15.059	C ₄ H ₈ O ₃	(R)-3-羟基丁酸 (R)-3-hydroxybutanoic acid	3.12239	0.0172	0.7987	C01089
8	15.315	C ₉ H ₁₃ NO ₂	对辛弗林 1-(4-hydroxyphenyl)-2-(methylamino) ethanol	4.05680	0.0000	4.5892	C04548
9	16.197	C ₂ H ₄	乙烯 Ethene	2.28625	0.0000	5.2032	C06547
10	30.303	C ₆ H ₁₂ O ₆	D-半乳糖 D-galactose	1.85337	0.2832	0.1300	C00124
11	30.678	C ₈ H ₁₅ NO ₆	N-乙酰基-D-氨基葡萄糖 N-acetyl-D-glucosamine	1.87295	0.2774	0.1314	C00140
12	30.722	C ₈ H ₁₅ NO ₆	N-乙酰基-D-甘露糖胺 N-acetyl-D-mannosamine	1.84885	0.2822	0.1300	C00645
13	31.385	C ₆ H ₁₄ O ₆	D-山梨糖醇 D-sorbitol	1.43863	0.2806	0.4358	C00794
14	31.716	C ₆ H ₁₃ NO ₅	鲨肌胺 Scyllo-Inosamine	1.14330	0.0786	-3.3772	C01214
15	32.304	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	9-十六碳烯酸 9-hexadecenoic acid	3.78824	0.0114	-3.0101	C08362

注:RT:保留时间;VIP:变量重要性;FC:Fold of change。

Note. RT, Retention time. VIP, Variable importance for the projection. FC, Fold of change.



注:A:差异代谢物通路富集分析结果;B:基因-差异化合物网络分析结果。

图 7 差异代谢物通路富集分析及基因-化合物通路分析

Note. A, Results of pathway enrichment analysis of differential metabolites. B, Results of gene-differential compound network analysis.

Figure 7 Differential metabolite pathway enrichment analysis and gene-compound pathway analysis

数据库及 NCBI gene 数据库查询可以发现, *ACSL1* 编码长链脂肪酸辅酶 A 连接酶的同工酶, 在脂质生物合成及脂肪酸代谢中发挥关键作用, 相关途径包括脂肪酸 β -氧化和 PPAR α 调节脂质代谢。 *GUSB* 编码葡萄糖醛酸酶 β , 在葡萄糖苷酸分解代谢中起作用。 *ABHD6* 启用酰基甘油酯酶活性, 参与酰基甘油分解代谢过程。 *DECR1* 编码蛋白参与不饱和脂肪酸烯醇辅酶 A 酯的 β -氧化。 *SLC16A1* 编码一种单羧酸盐转运蛋白, 相关代谢途径包括丙酮酸代谢及 TCA 循环反应, 在高脂饮食中影响营养吸收、白色脂肪及体重增加, 同时也对血糖稳态产生影响。 *GCG* 编码胰高血糖素的前体蛋白, 胰高血糖素在葡萄糖代谢中起重要作用, 通过增加糖异生和减少糖酵解来调节血糖。 *CAT* 编码过氧化氢酶, 是机体抵御氧化应激的关键抗氧化酶, 保护细胞免受过氧化氢的毒性作用, 其相关代谢途径包括嘌呤代谢及 DNA 损伤反应。 *LDHD* 编码乳酸脱氢酶 D, 相关代谢途径为乳酸分解代谢, 位于线粒体中。

3 讨论

HFFC 饮食诱导的 NAFLD 模型中, 巨噬细胞 AMPK α 1 敲除促进肝脂质沉积。 OGTT 结果显示巨噬细胞 AMPK α 1 敲除小鼠糖耐量受损, 且血清甘油三酯(TG)水平上调, 提示巨噬细胞 AMPK α 1 敲除可加重 NAFLD 引起的小鼠糖脂代谢异常, 推测可能由于肝细胞损伤加重, AMPK α 1 敲除的巨噬细胞向 M1 极化而产生促炎细胞因子, 持续炎症刺激导致肝细胞胰岛素抵抗。 组织学检测结果进一步证实, 巨噬细胞 AMPK α 1 敲除促使肝细胞中脂滴增多, 肝脂肪变性加重, 考虑到肝脂肪变性可引起全身糖脂代谢异常, 在小鼠模型的血清非靶向脂质组学研究中, 对筛选出的 15 个化合物进行富集分析, 可以发现与 AMPK^{fl/fl} 小鼠相比, 巨噬细胞 AMPK α 1 敲除小鼠血清中丙酸及乳酸下调。 有报道指出, 在饮食中添加丙酸可以降低肝和血中的脂肪酸含量^[13], 据此推测 NAFLD 模型中巨噬细胞 AMPK 敲除小鼠血清丙酸及乳酸下调可能与肝脂肪变性加重有关。 但血清中丙酸含量与炎症之间的具体机制未见报道, 我们尚不明确。

综上所述, 我们初步证实, 巨噬细胞 AMPK α 1 敲除导致 NAFLD 小鼠模型口服糖耐量受损, 血清甘油三酯上调, 肝脂肪变性, 以及血清中丙酸与乳酸水平下调, 血清代谢物的差异变化与基因 *ACSL1*、

GUSB、*ABHD6*、*DECR1*、*SLC16A1*、*GCG*、*CAT*、*LDHD* 有关, 具体机制有待进一步探究。

参考文献:

- [1] Younossi Z, Koenig A, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. *Hepatology*, 2016, 64(1): 73-84.
- [2] Sanyal A, Brunt E, Kleiner D, et al. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Hepatology*, 2011, 54(1): 344-353.
- [3] Cobbin E, Akhlaghi F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)-pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters [J]. *Drug Metab Rev*, 2017, 49(2): 197-211.
- [4] Zhang X, Ji X, Wang Q, et al. New insight into inter-organ crosstalk contributing to the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Protein Cell*, 2018, 9(2): 164-177.
- [5] Friedman S, Neuschwander-tetri B, Rinella M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 908-922.
- [6] Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(10): 709-721.
- [7] 杨仁国, 贺微微, 罗婷婷. miR-29b-3p 靶向 IGF1 调控非酒精性脂肪肝脂质代谢及肝纤维化 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(1): 66-72.
- [8] Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(7): 1776-1783.
- [9] Rodríguez-Prados JC, Través PG, Cuenca J, et al. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation [J]. *J Immunol*, 2010, 185(1): 605-614.
- [10] O'neill LAJ, Hardie DG. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation [J]. *Nature*, 2013, 493(7432): 346-355.
- [11] Nawrocki A, Rajala M, Tomas, et al. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(5): 2654-2660.
- [12] 巴哈古力·阿卜都热合曼, 阿布力克木·毛拉尤甫, 买吾拉尼江·依孜布拉等. 异常黑胆质证 2 型糖尿病大鼠模型的血浆代谢组学研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(8): 16-21.
- [13] Demigné C, Morand C, Levrat MA, et al. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes [J]. *Br J Nutr*, 1995, 74(2): 209-219.

[收稿日期] 2022-05-20