DOI:10.16016/j.2097-0927.202309152

鹅去氧胆酸通过 FXR 调控高脂饮食诱导小鼠肠道 GLP-1 表达水平改善胰岛素抵抗的作用

李鹏飞,蒋 玲,候鹏飞,董 妞,糜漫天,易 龙 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系营养与食品安全研究中心,重庆市医学营养研究中心,营养与健康重庆市重点实验室

[**摘要**] **目的** 探究鹅去氧胆酸(chenodeoxycholic acid,CDCA)通过 FXR 对高脂饮食诱导小鼠肠道 GLP-1 表达水平的影响及相关机制。**方法** C57BL/6 小鼠 40 只分为对照组(Control 组)、高脂饮食组(HFD 组)、HFD+CDCA 组、HFD+Z-Gug(FXR 拮抗剂)组、HFD+CDCA+Z-Gug 组,每组 8 只。干预 8 周,期间每周检测体质量及 24 h 摄食量。第 8 周进行口服葡萄糖耐量实验(OGTT)、腹腔葡萄糖耐量实验(IPGTT)。小鼠处死后,检测血清学指标 GLu、TG、CHO、LDL-C、HDL-C;免疫荧光检测小鼠肠道组织 GLP-1 及 FXR 表达水平;RT-qPCR 检测炎性因子 *TNF-α*、*IL-6*、*IL-1β*、*Gcg* 及 *FXR* mRNA 表达;ELISA 试剂盒检测血清 GLP-1 含量;流式细胞术检测小肠 IELs 亚群比例及 CD26/DPP4 表达水平。**结果** 与 Control 组相比,HFD 组小鼠体质量增加,血清糖脂代谢异常,口服糖耐量受损,胃肠激素分泌减弱($P<0.05$);*FXR* mRNA 及蛋白表达水平增加,*Gcg* mRNA 表达及 GLP-1 分泌水平下降($P<0.05$);肠道炎性因子 *TNF-α*、*IL-6*、*IL-1β* mRNA 表达水平升高($P<0.05$);TCRαβ$^+$ IELs、TCRαβ$^+$CD8αα$^+$ IELs 与 TCRαβ$^+$CD8αβ$^+$IELs 细胞比例增加,TCRγδ$^+$IELs 比例下降,IELs 总 CD26/DPP4 表达增加($P<0.05$)。与 HFD 组相比,HFD+CDCA 组小鼠体质量增加,口服糖耐量异常,胃肠激素分泌减弱($P<0.05$);肠组织 *FXR* mRNA 及蛋白表达增加,*Gcg* mRNA 表达及 GLP-1 分泌降低($P<0.05$);肠道炎性因子表达降低,TCRαβ$^+$IELs、TCRαβ$^+$CD8αα$^+$IELs 与 TCRαβ$^+$CD8αβ$^+$IELs 细胞比例下降,TCRγδ$^+$IELs 占 IELs 比例升高,IELs 总 CD26/DPP4 表达升高($P<0.05$),以上作用在加入 FXR 拮抗剂 Z-Gug 后被明显抑制($P<0.05$)。**结论** CDCA 可能通过激活 FXR 受体抑制肠道组织 GLP-1 表达,减少 GLP-1 分泌;同时可能抑制相关炎症因子表达调节 IELs 亚群比例,上调 CD26/DPP4 表达水平,促进 GLP-1 降解,加重胰岛素抵抗。

[**关键词**] 鹅去氧胆酸;GLP-1;FXR;IELs;CD26
[**中图法分类号**] R589.2; R966; R975.5 [**文献标志码**] A

Chenodeoxycholic acid improves insulin resistance by FXR-mediated regulation of intestinal GLP-1 in high-fat diet mice

LI Pengfei, JIANG Ling, HOU Pengfei, DONG Niu, MI Mantian, YI Long Research Center for Nutrition and Food Safety, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Health, Chongqing Medical Nutrition Research Center, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of chenodeoxycholic acid (CDCA) on the expression of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in the intestine of mice induced by high-fat diet (HFD) through farnesoid X receptor (FXR), and investigate the related mechanism. **Methods** Forty C57BL/6 mice were divided into control group, HFD group, HFD+CDCA group, HFD+Z-Gug (FXR antagonist) group, and HFD+CDCA+Z-Gug group, with 8 animals in each group. During intervention for 8 weeks, body weight and 24-hour food

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(82173505)
[**通信作者**] 易 龙,E-mail: AMU_yilong@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

intake were measured every week. At the 8th week, oral glucose tolerance test (OGTT) and intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) were conducted. After the mice were sacrificed, the serum levels of GLu, TG, CHO, LDL-C and HDL-C were detected; the expression levels of GLP-1 and FXR in intestinal tissues were detected by immunofluorescence assay; and the mRNA levels of *TNF-α*, *IL-6*, *IL-1β*, *Gcg* and *FXR* were detected by RT-qPCR; the serum level of GLP-1 was detected by ELISA, and the proportion of intraepithelial lymphocytes (IELs) subsets and the expression of CD26/DPP4 were detected by flow cytometry. **Results** Compared with the control group, the HFD group had increased body weight, abnormal serum glucose and lipid metabolism, impaired oral glucose tolerance, and weakened secretion of gastrointestinal hormones ($P<0.05$), enhanced *FXR* expression at mRNA and protein levels, declined *Gcg* mRNA level and GLP-1 secretion level ($P<0.05$), increased mRNA levels of intestinal inflammatory factors *TNF-α*, *IL-6* and *IL-1β* ($P<0.05$), raised proportions of $TCR\alpha\beta^+$ IELs, $TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\alpha^+$ IELs, and $TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\beta^+$ IELs but reduced proportion of $TCR\gamma\delta^+$IELs, and increased total CD26/DPP4 expression in IELs ($P<0.05$). Compared with the HFD group, HFD+CDCA treatment resulted in significantly increased body weight, impaired oral glucose tolerance, decreased secretion of gastrointestinal hormones, increased *FXR* mRNA and protein expression, and decreased *Gcg* mRNA expression and GLP-1 secretion ($P<0.05$); decreased proportions of $TCR\alpha\beta^+$ IELs, $TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\alpha^+$ IELs and $TCR\alpha\alpha\beta^+CD8\alpha\beta^+$ IELs but increased proportion of $TCR\gamma\delta^+$ cells in IELs, and increased expression of total CD26/DPP4 in IELs ($P<0.05$), which were significantly improved after Z-Gug intervention ($P<0.05$). **Conclusion** CDCA may inhibit the expression and secretion of GLP-1 in intestinal tissue by activating FXR, and reduce the secretion of GLP-1. At the same time, CDCA may inhibit the expression of related inflammatory factors, regulate the proportions of IELs subsets, up-regulate the expression level of CD26/DPP4, promote the degradation of GLP-1 and aggravate insulin resistance.

[**Key words**] chenodeoxycholic acid; glucagon-like peptide-1; farnesoid X receptor; intraepithelial lymphocytes; CD26

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82173505). Corresponding author: YI Long, E-mail: AMU_yilong@tmmu.edu.cn

胰岛素抵抗是2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)、代谢综合征、高血压、高脂血症、非酒精性脂肪肝等疾病共同的病理特征。《中国2型糖尿病防治指南(2020版)》指南提示,能量摄入过多引起的胰岛素抵抗及代谢紊乱是其发病的主要诱因。肠道L细胞产生的胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1,GLP-1)是一种饮食依赖性的短肽激素,在改善胰岛素抵抗和维持血糖稳态中发挥关键调节作用[1]。CD26/DPP4是一种多功能的Ⅱ型跨膜丝氨酸肽酶,胞膜外结构具有二肽基肽酶活性。CD26/DPP4在自身免疫、糖尿病和肿瘤等方面发挥重要调节作用。作为一种广泛表达于淋巴细胞的胞外酶,CD26/DPP4参与营养物质的吸收和再循环,其对免疫系统尤其是T淋巴细胞的功能有重要影响。GLP-1主要被肠道组织中的CD26/DPP4分解[2],导致其生物半衰期短、生物利用度较低,现临床已使用其类似物防治胰岛素抵抗引起的T2DM,但仍存在药物副作用及依从性差的弊端。近年来,有研究表明,胃肠激素分泌减少、糖耐量异常及胰岛素抵抗可能与肠道的胆汁酸代谢异常有关[3-5]。前期本实验室研究发现,高脂饮食诱导的胰岛素抵抗小鼠肠道胆汁酸代谢异常,尤其是鹅去氧胆酸(chenodeoxycholic acid,CDCA)含量在高脂饮食喂养的小鼠肠道显著升高,提示CDCA可能在胰岛素抵抗的发生中起重要作用。有研究表明,CDCA是核内法尼醇X受体(farnesoid X receptor,FXR)的天然激动性配体,能够激活FXR受体参与代谢调节过程[6-7]。肠上皮间淋巴细胞(intestinal intraepithelial lymphocytes,IELs)是肠道黏膜上皮的特殊T细胞群,其不同亚群比例和表型与多种疾病(包括胰岛素抵抗引起的T2DM)发生密切相关。有研究报道,某些IELs亚群能够影响肠道L细胞分泌GLP-1水平[8-9]。本研究通过建立高脂饮食喂养的胰岛素抵抗模型,研究CDCA对肠道GLP-1表达和分泌水平的影响,并揭示肠道FXR受体表达、L细胞和IELs介导的GLP-1产生和降解相关分

子机制在高脂饮食诱导胰岛素抵抗中的作用,为胰岛素抵抗的防治提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

鹅去氧胆酸(CDCA)购自成都曼斯特生物有限公司(纯度>95%),FXR 拮抗剂孕二烯二酮(Z-Guggulsterone,Z-Gug)购自广州市云天实验室科技有限公司(纯度 98.43%)。葡萄糖(GLu)、总胆固醇(CHO)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验分组及干预方法

C57BL/6 小鼠 40 只,购自于重庆莱彼特生物科技有限公司,饲养于陆军军医大学 SPF 级动物实验中心。给予小鼠 12 h/12 h 昼夜明暗交替,自由饮食与饮水。实验分为 5 组,每组 8 只:①对照组(Control 组):给予纯化饲料(XT19008);②高脂饮食组(HFD 组):给予 45%脂肪供能比高脂饲料(XTHF45);③HFD+CDCA 组:高脂饮食干预 8 周,并按照 100 mg/(kg·d)给予 CDCA 灌胃,连续干预 8 周;④HFD+Z-Gug 组:高脂饮食干预 8 周,从第 6 周起按照 100 mg/(kg·d)给予 Z-Gug 腹腔注射 2 周;⑤HFD+CDCA+Z-Gug 组:高脂饮食干预 8 周并按照 100 mg/(kg·d)给予 CDCA 灌胃连续干预 8 周,最后 2 周给予 Z-Gug 干预。各组干预至第 8 周末,检测相应指标。每周记录各组小鼠体质量和 24 h 摄食量。实验方案如图 1 所示,该研究所有操作均符合陆军军医大学学术研究伦理审查委员会小鼠护理和使用指导原则并获得批准(AMUWEC20211008)。

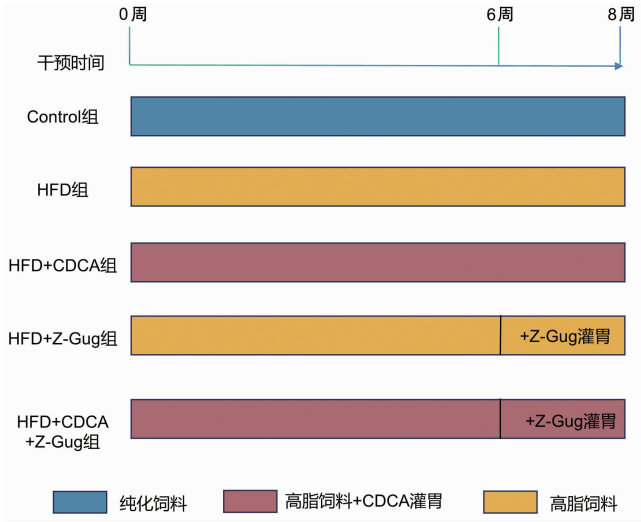


图 1 动物实验分组

1.3 口服葡萄糖耐量实验(oral glucose tolerance test,OGTT)及腹腔内葡萄糖耐量实验(intraperitoneal glucose tolerance test,IPGTT)

干预结束后,小鼠禁食 12 h,尾静脉取血测量空腹血糖,然后按照 2 g/kg 灌胃或腹腔注射葡萄糖溶液,于灌胃或腹腔注射后 15、30、60、90、120 min 分别采集各组小鼠尾静脉血,检测血糖,计算 OGTT 及 IPGTT 糖耐量曲线下面积(AUC),并计算其与 OGTT 曲线下面积差值(△AUC)。

1.4 肠道组织免疫荧光检测

取小肠组织,低温下 PBS 冲洗,取 1 cm/只小肠组织浸泡于组织固定液内固定。经石蜡包埋、抗原修复、切片后,用山羊抗兔 IgG 抗体对 FXR、GLP-1 染色,细胞核用 DAPI 染色,荧光显微镜观察。

1.5 血清生化指标检测

干预至第 13 周末,小鼠麻醉后取眼眶血,全血置于室温 2 h 后,4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min,取上层血清,检测血清中 CHO、TG、GLu、LDL-C、HDL-C 含量,操作方法参照试剂盒说明书进行。

1.6 RT-qPCR 检测

使用 Trizol 以分离总 RNA。使用 Nanodrop 分光光度计检测 RNA 浓度;逆转录以合成 cDNA,按照逆转录试剂盒 RevertAid firststrand cDNA synthesis Kit 说明书进行 RNA 逆转录,获得 cDNA,存于-20 ℃备用。使用 SYBR RT-PCR 试剂盒进行 qPCR 反应,并通过 QTower 2.2 系统(Anakytik Jena,Germany)分析结果。结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算分析目的基因的 mRNA 相对表达量,内参基因为 *β-actin*。

表 1 RT-qPCR 引物序列

基因	引物序列(5′→3′)
FXR	上游:CCGGCTAAGGAAGTGCAAAG
	下游:AAACTTGGTTGTGGAGGTCA
Gcg	上游:GCTTATAATGCTGGTGCAAG
	下游:TTCATCTCATCAGGGTCCTC
IL-6	上游:CCTCTGGTCTTCTGGAGTACC
	下游:TCTGTATCTCTCTGAAGGACTCT
IL-1β	上游:TCTGTATCTCTCTGAAGGACTCT
	下游:GCTTGGGAGTGAAGAGGTCA
TNF-α	上游:GCTTGGGAGTGAAGAGGTCA
	下游:GCTTGGGAGTGAAGAGGTCA
β-actin	上游:GTGCTATGTTCTAGACTTCG
	下游:ATGCCACAGGATTCCATACC

1.7 酶联免疫吸附实验(ELISA)

干预结束后,处死小鼠,收集血液至 1.5 mL EP 管

中,静置 30 min,12 000 r/min 离心 15 min,将血清分离至新 1.5 mL EP 管中。通过 ELISA 法检测小鼠血清 GLP-1 含量,按照试剂盒说明书进行。

1.8 肠上皮间淋巴细胞(intraepithelial lymphocytes,IELs)分离及多色流式细胞术检测

干预结束后,立即冰 PBS 中取出小鼠小肠。经剥离肠系膜及脂肪组织、清洗,将小肠剪成小块置于配好的消化液中,38 ℃ 摇床震荡 20 min(210 r/min),涡旋 20 s 后,70 μm 滤网过滤收集消化液,离心 10 min(2 000 r/min),弃上清。加入 9 mL 40% Percoll,重悬沉淀并转移至 15 mL 圆底离心管。向管底加入 70% Percoll 5 mL,水平离心 10 min(2 000 r/min),IELs 聚集于中间层。用抗 CD45、CD3、CD8β、CD8α、CD4、TCRγδ、TCRαβ IgG 抗体在 4 ℃避光染色 30 min,PBS 洗涤 2 次后,流式细胞仪(BD FCSverse)上机检测。

1.9 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 26.0 统计软件进行分析,用 Graphpad 9.2.0 软件作图。多组数据比较采用单因素方差分析,两组数据比较采用 LSD 法检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CDCA 对高脂饮食诱导小鼠体质量及摄食量的影响

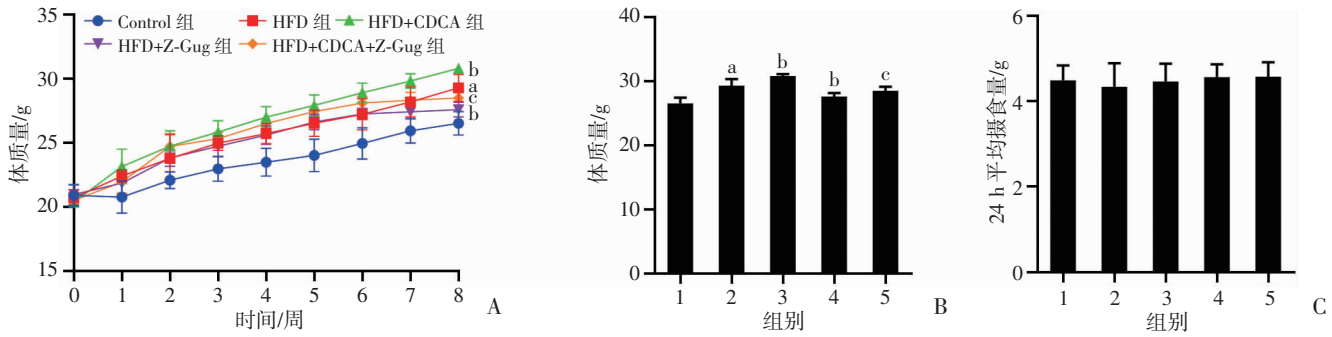
从第 2 周起至第 8 周末,HFD 组小鼠体质量较 Control 组显著增加($P<0.05$),CDCA 干预后小鼠体质量增加较 HFD 组更为明显($P<0.05$,图 2A)。Z-Gug 干预后,与 HFD、HFD+CDCA 组分别相比,HFD+Z-Gug、HFD+CDCA+Z-Gug 组小鼠体质量显著下降($P<0.05$,图 2B),提示抑制 FXR 可缓解 HFD 及 CDCA 干预导致的小鼠体质量增加。为了说明体质量变化与摄食量之间的关系,8 周干预周期内对小鼠 24 h 平均摄食量进行统计,如图 2C 所示,各组小鼠平均摄食量无明显差异。结果表明,CDCA 处理后小鼠体质量显著增加,Z-Gug 干预后能够抑制 CDCA 诱导的小鼠体质量增加,提示 CDCA 促进体质量增加的作用可能与 FXR 受体有关。

2.2 CDCA 对高脂饮食诱导小鼠血清糖脂代谢指标的影响

血清糖脂代谢指标检测发现,与 Control 组相比,HFD 组小鼠血清 TG、CHO、LDL-C、GLu 均显著增加($P<0.05$,图 3B~E),而血清 HDL-C 显著下降($P<0.05$,图 3C);CDCA 干预后,TG、CHO、LDL-C、Glu 水平较 HFD 组显著升高($P<0.05$),HDL-C 显著下降($P<0.05$);Z-Gug 干预后,与 HFD、HFD+CDCA 组相比,HFD+Z-Gug、HFD+CDCA+Z-Gug 组小鼠血清 TG、CHO、LDL-C、GLu 水平显著下降($P<0.05$),血清 HDL-C 水平明显升高($P<0.05$,图 3)。结果表明,CDCA 处理后小鼠糖脂代谢指标异常,而 Z-Gug 干预后能够明显抑制 CDCA 导致的糖脂代谢异常,提示 CDCA 导致糖脂代谢异常的作用可能与 FXR 受体有关。

2.3 CDCA 对高脂饮食诱导小鼠糖耐量的影响

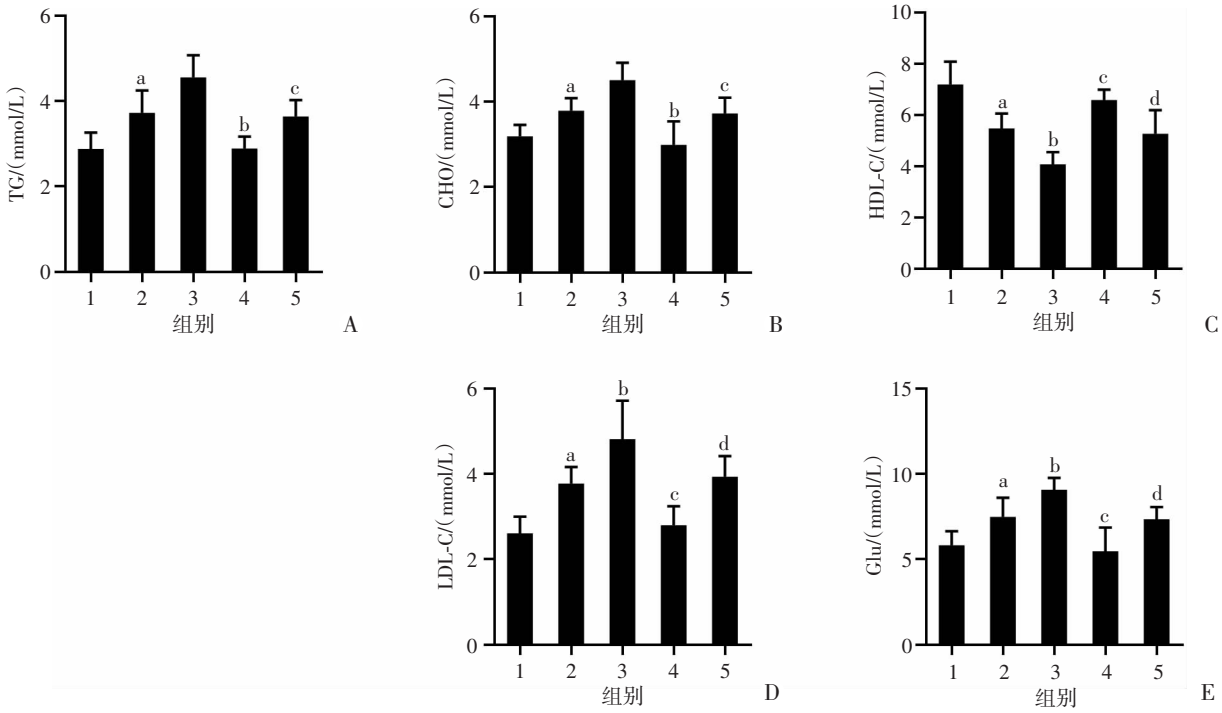
干预至第 8 周,糖耐量实验结果显示,与 Control 组相比,HFD 组小鼠出现明显糖耐量异常($P<0.05$,图 4),CDCA 干预后糖耐量异常较 HFD 组更为明显($P<0.05$),而 Z-Gug 干预后糖耐量异常得到显著改善($P<0.05$)。结果表明,CDCA 能够加剧高脂饮食诱导的小鼠糖耐量异常,而 Z-Gug 干预能够显著改善 CDCA 干预引起的糖耐量异常,提示 CDCA 导致糖耐量异常的作用可能与 FXR 受体有关。



1:Control 组;2:HFD 组;3:HFD+CDCA 组;4:HFD+Z-Gug 组;5:HFD+CDCA+Z-Gug 组;a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.01$,与 HFD 组比较;c:$P<0.01$,与 HFD+CDCA 组比较

A:各组小鼠体质量变化;B:各组小鼠第 8 周末体质量;C:各组小鼠 24 h 平均摄食量

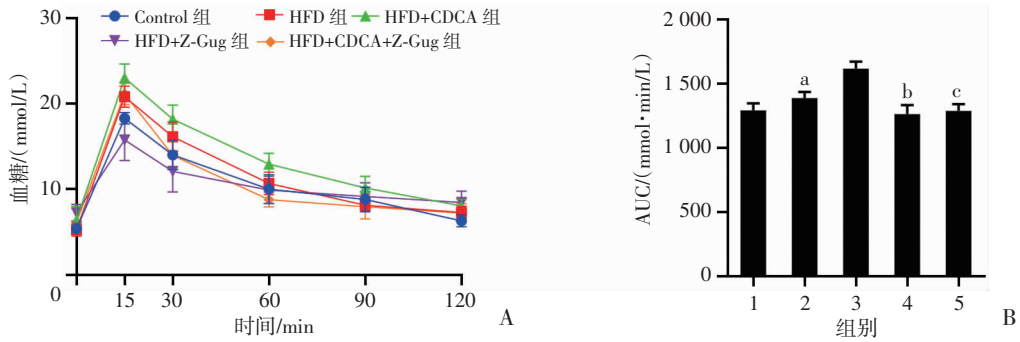
图 2 CDCA 对高脂饮食诱导小鼠体质量和摄食量的影响($n=8$)



1:Control 组;2:HFD 组;3:HFD+CDCA 组;4:HFD+Z-Gug 组;5:HFD+CDCA+Z-Gug 组

A:小鼠血清甘油三酯;a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.01$,与 HFD 组比较;c:$P<0.01$,与 HFD+CDCA 组比较;B:小鼠血清总胆固醇;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.01$,与 HFD 组比较;c:$P<0.01$,与 HFD+CDCA 组比较;C:小鼠血清高密度脂蛋白;a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与 HFD 组比较;d:$P<0.05$,与 HFD+CDCA 组比较;D:小鼠低密度脂蛋白;a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与 HFD 组比较;d:$P<0.05$,与 HFD+CDCA 组比较;E:小鼠血清葡萄糖;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与 HFD 组比较;d:$P<0.05$,与 HFD+CDCA 组比较

图 3 CDCA 对高脂饮食诱导小鼠血清糖脂代谢指标的影响($n=8$)

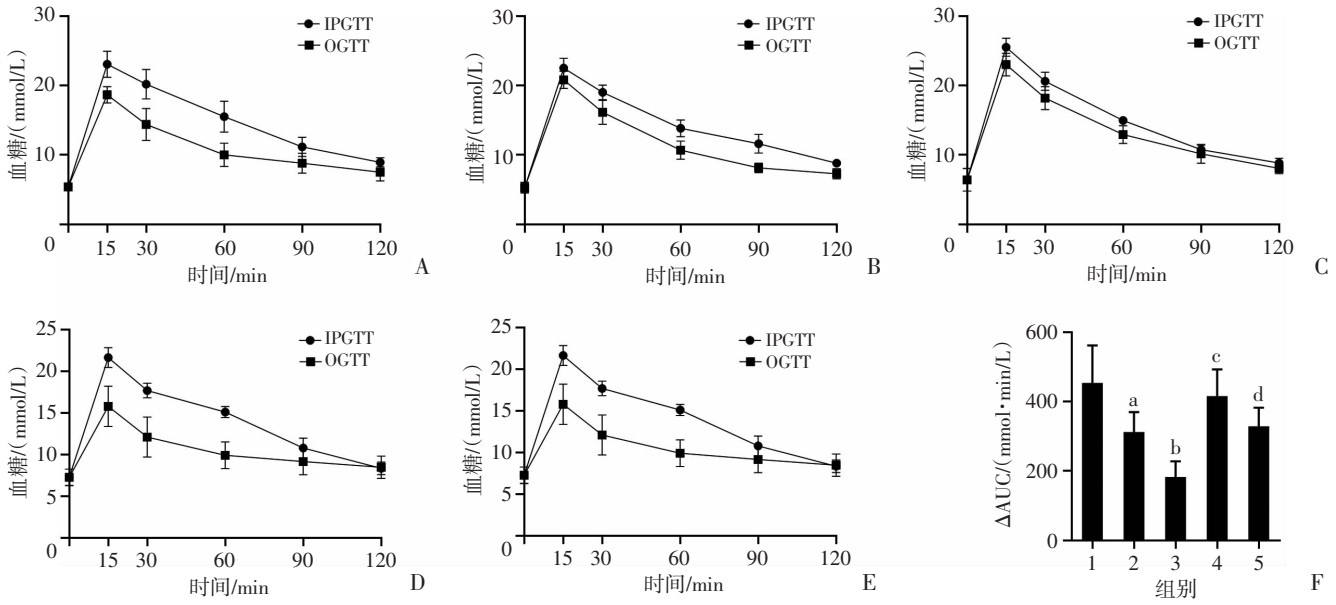


A:小鼠 OGTT 实验;B:曲线下面积统计 1:Control 组;2:HFD 组;3:HFD+CDCA 组;4:HFD+Z-Gug 组;5:HFD+CDCA+Z-Gug 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.01$,与 HFD 组比较;c:$P<0.01$,与 HFD+CDCA 组比较

图 4 CDCA 对高脂饮食诱导小鼠糖耐量的影响($n=8$)

2.4 CDCA 对高脂饮食诱导小鼠胃肠激素分泌的影响

为了进一步探究胃肠激素 GLP-1 在 CDCA 加重 HFD 喂养小鼠胰岛素抵抗中的作用,本研究开展了腹腔葡萄糖糖耐量实验(IPGTT),利用 IPGTT 与 OGTT 曲线下面积之差进行比较评价胃肠激素分泌量,研究结果提示(图 5),与 Control 组相比,HFD 组小鼠胃肠激素分泌量显著降低($P<0.05$),HFD+CDCA 组小鼠胃肠激素分泌量显著低于 HFD 组($P<0.05$);而 Z-Gug 干预后,则能缓解 CDCA 引起的胃肠激素分泌下降($P<0.05$)。结果表明,CDCA 能够显著抑制高脂饮食诱导的小鼠胃肠激素分泌,加重 HFD 诱导的胰岛素抵抗,该作用可能与 FXR 受体有关。



A:Control 组小鼠 OGTT 与 IPGTT 检测结果;B:HFD 组小鼠 OGTT 与 IPGTT 检测结果;C:HFD+CDCA 组小鼠 OGTT 与 IPGTT 检测结果;D:HFD+Z-Gug 组小鼠 OGTT 与 IPGTT 检测结果;E:HFD+CDCA+Z-Gug 组小鼠 OGTT 与 IPGTT 检测结果;F:各组间 ΔAUC 统计结果 1:Control 组;2:HFD 组;3:HFD+CDCA 组;4:HFD+Z-Gug 组;5:HFD+CDCA+Z-Gug 组;a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与 HFD 组比较;d:$P<0.01$,与 HFD+CDCA 组比较

图 5 CDCA 对高脂饮食诱导小鼠胃肠激素分泌的影响

2.5 CDCA 高脂饮食诱导小鼠肠道组织 FXR 和 GLP-1 表达的影响

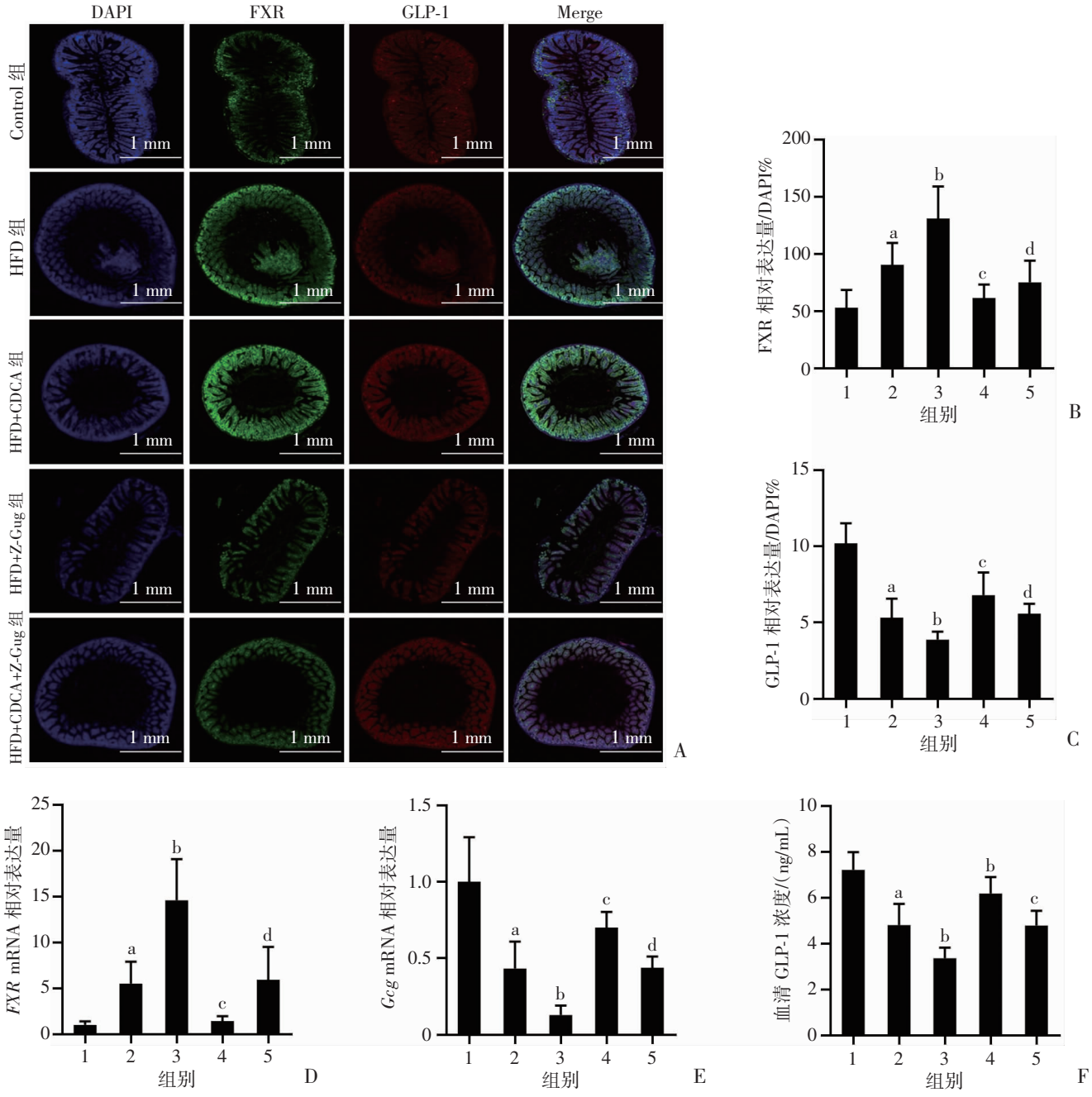
通过免疫荧光、RT-qPCR 及 ELISA 法分别对小鼠肠道 FXR 受体表达及 GLP-1 分泌水平进行检测,结果提示,与 Control 组相比,HFD 组肠道 FXR 受体蛋白($P<0.05$,图 6A、B)和 mRNA($P<0.05$,图 6D)表达水平明显增加,GLP-1 表达和分泌水平($P<0.05$,图 6C、F)及 *Gcg* mRNA($P<0.05$,图 6E)明显降低;CDCA 干预后,肠道 FXR 受体 mRNA 及蛋白表达水平较 HFD 组升高更为明显($P<0.05$,图 6A、B、D),而 *Gcg* mRNA 与 GLP-1 表达和分泌水平较 HFD 组明显下降($P<0.05$,图 6C、E、F);Z-Gug 干预后,与 HFD、HFD+CDCA 组相比,HFD+Z-Gug 与 HFD+CDCA+Z-Gug 组小鼠肠道 FXR 受体表达显著下降($P<0.05$,图 6A、B),*Gcg* mRNA 与 GLP-1 分泌水平显著增加($P<0.05$,图 6C、E、F)。结果表明,CDCA 可能通过促进肠道 FXR 表达进而抑制 GLP-1 表达和分泌。

2.6 CDCA 对高脂饮食诱导小鼠肠道炎性因子表达的影响

通过 RT-qPCR 法对小鼠肠道组织促炎因子 *TNF-α*、*IL-6*、*IL-1β* mRNA 表达水平进行检测,结果显示,HFD 组小鼠肠道组织 *TNF-α*、*IL-6*、*IL-1β* mRNA 水平显著高于 Control 组,CDCA 干预后表达下降,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 7)。Z-Gug 干预后,与 HFD、HFD+CDCA 组相比,HFD+Z-Gug、HFD+CDCA+Z-Gug 组炎性因子 *TNF-α*、*IL-6*、*IL-1β* mRNA 表达增加。结果表明,CDCA 能够有效缓解高脂饮食引起的肠道炎症反应,该作用可能与 FXR 受体有关。

2.7 CDCA 对高脂饮食诱导小鼠肠上皮间淋巴细胞(IELs)不同亚群比例及 CD26/DPP4 表达的影响

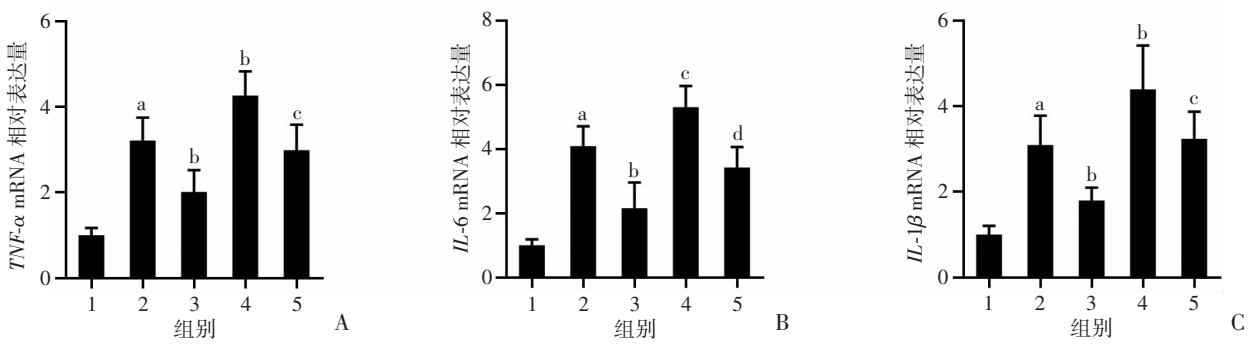
通过流式细胞术检测小鼠肠道 IELs 数量及各亚群比例变化(图 8A),结果显示,各组间肠道 IELs 细胞数量无明显改变(图 8B)。进一步对 IELs 各亚群比例进行分析,HFD 处理后,$TCR\alpha\beta^+$IELs、$TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\alpha^+$IELs 与 $TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\beta^+$IELs 在 IELs 中的比例显著升高($P<0.05$,图 8C、E、F),$TCR\gamma\delta^+$IELs 在 IELs 中比例显著下降($P<0.05$,图 8D),IELs 总 CD26/DPP4 表达水平显著升高($P<0.05$,图 8G);CDCA 干预后,$TCR\alpha\beta^+$IELs、$TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\alpha^+$IELs 与 $TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\beta^+$IELs 在 IELs 中的比例较 HFD 组显著下降($P<0.05$,图 8C、E、F),而 $TCR\gamma\delta^+$IELs 在 IELs 中的比例及 IELs 总 CD26/DPP4 表达显著升高($P<0.05$,图 8D、G)。Z-Gug 干预后,对 IELs 数量、亚群及 CD26 表达均无明显作用。结果表明,CDCA 可能通过调节 IELs 亚群比例,上调 CD26/DPP4 表达水平,加速 GLP-1 降解,进而加重高脂饮食诱导的糖尿病进程。



1:Control 组;2:HFD 组;3:HFD+CDCA 组;4:HFD+Z-Gug 组;5:HFD+CDCA+Z-Gug 组

A:各组小鼠肠道组织免疫荧光检测;B:FXR 相对表达量($n=8$);a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与 HFD 组比较;d:$P<0.01$,与 HFD+CDCA 组比较;C:GLP-1 相对表达量($n=8$);a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 HFD 组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 HFD+CDCA 组比较;D:*FXR* mRNA 相对表达量($n=8$);a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与 HFD 组比较;d:$P<0.01$,与 HFD+CDCA 组比较;E:*Gcg* mRNA 相对表达量($n=8$);a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与 HFD 组比较;d:$P<0.01$,与 HFD+CDCA 组比较;F:血清 GLP-1 浓度($n=6$);a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 HFD 组比较;c:$P<0.05$,与 HFD+CDCA 组比较

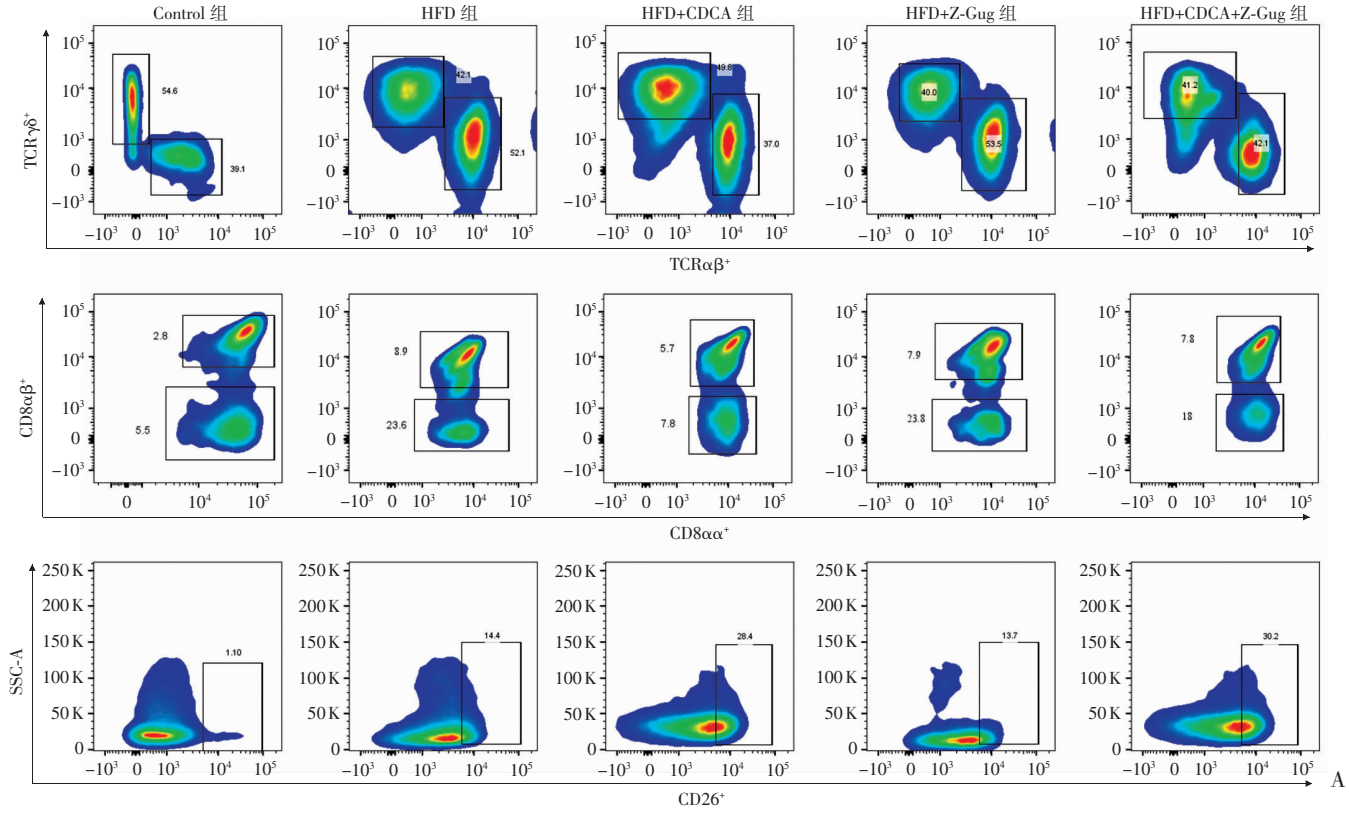
图 6 CDCA 对高脂饮食诱导小鼠 GLP-1 和 FXR 表达的影响



1:Control 组;2:HFD 组;3:HFD+CDCA 组;4:HFD+Z-Gug 组;5:HFD+CDCA+Z-Gug 组

A:各组间 *TNF-α* mRNA 相对表达量($n=6$);a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.01$,与 HFD 组比较;c:$P<0.05$,与 HFD+CDCA 组比较;B:各组间 *IL-6* mRNA 相对表达量($n=6$);a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与 HFD 组比较;d:$P<0.05$,与 HFD+CDCA 组比较;C:各组间 *IL-1β* mRNA 相对表达量($n=6$);a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 HFD 组比较;c:$P<0.01$,与 HFD+CDCA 组比较

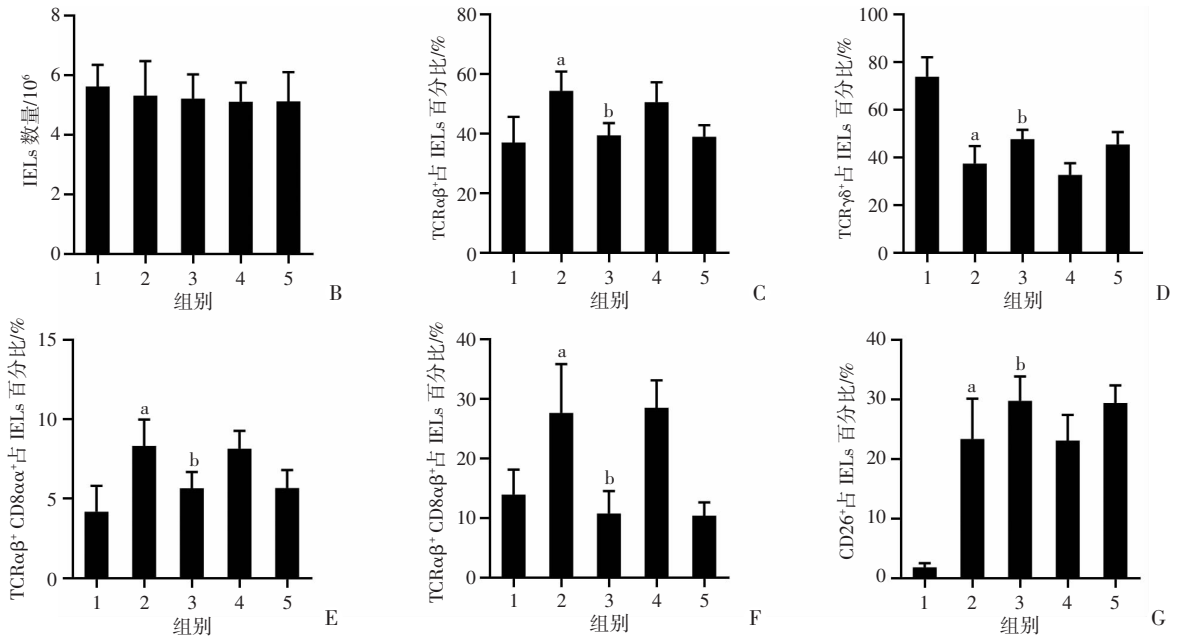
图 7 CDCA 对高脂饮食诱导小鼠肠道炎性因子表达的影响



A:各组间 IELs 亚群比例及 CD26 表达变化($n=8$)

图 8 CDCA 对高脂饮食诱导小鼠肠上皮间淋巴细胞(IELs)不同亚群比例及 CD26/DPP4 表达的影响

(图 8B~G 续下页)



1:Control 组;2:HFD 组;3:HFD+CDCA 组;4:HFD+Z-Gug 组;5:HFD+CDCA+Z-Gug 组

B:各组间 IELs 数量变化;C:各组间 TCRαβ⁺IELs 比例变化;a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.01$,与 HFD 组比较;D:各组间 TCRγδ⁺IELs 比例变化;a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 HFD 组比较;E:各组间 TCRαβ⁺CD8αα⁺IELs 比例变化;a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.01$,与 HFD 组比较;F:各组间 TCRαβ⁺CD8αβ⁺IELs 比例变化;a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.01$,与 HFD 组比较;G:各组间 CD26 表达情况;a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 HFD 组比较

续图 8 CDCA 对高脂饮食诱导小鼠肠上皮间淋巴细胞(IELs)不同亚群比例及 CD26/DPP4 表达的影响($n=8$)

3 讨论

世界卫生组织统计资料表明,我国胰岛素抵抗相关的慢病患者人数已占全球人数的 30%,成为影响居民健康的重大公共卫生问题之一[10-11]。本研究发现,CDCA 能激活 FXR 受体,抑制 GLP-1 分泌。GLP-1 是由肠道 L 细胞分泌的短肽激素,具有能够刺激增强胰岛素分泌、抑制胰高血糖素分泌、维持糖耐量稳态等生物学作用[1]。GLP-1 主要被肠道组织中的 CD26/DPP4 分解[2]。近年来,已有大量研究表明胆汁酸能够作为信号分子参与肠道内分泌、炎症及调节脂类、糖类代谢,参与机体能量代谢[12-13]。CDCA 是肠道组织 FXR 受体的天然配体,研究发现 CDCA 具有参与调节肠道组织营养代谢的生理作用[14-16]。本研究利用 CDCA 及 FXR 受体拮抗剂 Z-Gug 对高脂喂养小鼠模型进行干预研究发现,CDCA 能够通过激活 FXR 受体上调其表达,抑制 *Gcg* 基因表达降低肠道组织 GLP-1 分泌水平,引起胰岛素抵抗,对于深入认识 CDCA 对肠道组织营养代谢的调节作用提供了新的依据。

本研究发现,CDCA 能通过调节 *TNF-α* 表达,促进 IELs CD26/DPP4 表达,促进 GLP-1 分解。有研究发现,胆汁酸以及次级胆汁酸具有抑制肠道炎症反应、调节肠道免疫等功能,对预防和治疗慢性疾病引起的炎症具有一定疗效[13]。本实验通过 RT-qPCR 技术检测肠道炎性因子,提示 CDCA 能缓解高脂饮食诱导的肠道炎症因子分泌,调节肠道炎症反应,这与 WARD 等[17]利用小鼠发现胆汁酸能够使肠道炎性因子 *TNF-α*、*IL-6*、*IL-1β* 分泌水平下降的结果一致。黏膜免疫系统包含了体内最大的免疫细胞储存库[18],其中肠上皮内的免疫淋巴细胞被称为肠上皮内淋巴细胞(IELs)[19]。小肠中肠上皮细胞与 IELs 细胞的比例约为 10∶1,这个比例在结肠中较低[20-22]。肠道中 IELs 可分为 TCR⁺和 TCR⁻亚群[18]。TCR⁺ IELs 可分为诱导型(TCRαβ⁺CD8αβ⁺)和天然型(TCRαβ⁺ CD8αα⁺、TCRγδ⁺ CD8αα$^{+/-}$) IELs。部分 IELs 亚型及其功能紊乱在 T2DM 等多种疾病发生中起重要作用[18]。本实验通过流式细胞术分析 IELs 发现,CDCA 干预对小鼠 IELs 数量无影响,但能够调节高脂饮食诱导的 IELs 亚群比例,尤其使 TCRαβ⁺CD8αα⁺与 TCRαβ⁺CD8αβ⁺IELs 比例下降,上调 TCRγδ⁺ IEls 比例,同时使 IELs 总体 CD26/DPP4 表达水平增加。MAVROPOULOS 等[23]在研究中发现抗 *TNF-α* 干预能够增加 CD26/DPP4 酶活性及表达,本研究结果与其研究结果一致。因此,CDCA 可能通过调节高脂诱导的小鼠肠道 *TNF-α* 表达水平,改善 IELs 亚群比例失调,并上调 CD26/DPP4 表达水平,加速 GLP-1 分解,加重胰岛素抵抗。

综上,本研究通过建立高脂饮食喂养的小鼠胰岛素抵抗模型,发现 CDCA 可能通过激活 FXR 抑制肠道

L 细胞 GLP-1 分泌,同时调节肠道 IELs 细胞亚群比例及上调 CD26/DPP4 表达加速 GLP-1 分解,引起胰岛素抵抗。本研究为防治胰岛素抵抗提供了新的干预靶点和科学依据。

参考文献:

[1] D'ALESSIO D. Is GLP-1 a hormone: whether and when? [J]. J Diabetes Investig, 2016, 7(Suppl 1): 50-55. DOI: 10.1111/jdi.12466.

[2] VINCENZO F, MANFREDI T, CARMINE C, *et al*. CD26: a multi-purpose pharmacological target [J]. Curr Clin Pharmacol, 2014, 9(2): 157-164. DOI: 10.2174/1574884708666131111201654.

[3] LEFEBVRE P, CARIOU B, LIEN F, *et al*. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation [J]. Physiol Rev, 2009, 89(1): 147-191. DOI: 10.1152/physrev.00010.2008.

[4] THOMAS C, GIOIELLO A, NORIEGA L, *et al*. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis [J]. Cell Metab, 2009, 10(3): 167-177. DOI: 10.1016/j.cmet.2009.08.001.

[5] SUN L L, PANG Y Y, WANG X M, *et al*. Ablation of gut microbiota alleviates obesity-induced hepatic steatosis and glucose intolerance by modulating bile acid metabolism in hamsters [J]. Acta Pharm Sin B, 2019, 9(4): 702-710. DOI: 10.1016/j.apsb.2019.02.004.

[6] TU H, OKAMOTO A Y, SHAN B. FXR, a bile acid receptor and biological sensor [J]. Trends Cardiovasc Med, 2000, 10(1): 30-35. DOI: 10.1016/S1050-1738(00)00043-8.

[7] SUN L L, XIE C, WANG G, *et al*. Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin [J]. Nat Med, 2018, 24(12): 1919-1929. DOI: 10.1038/s41591-018-0222-4.

[8] HE S, KAHLES F, RATTIK S, *et al*. Gut intraepithelial T cells calibrate metabolism and accelerate cardiovascular disease [J]. Nature, 2019, 566(7742): 115-119. DOI: 10.1038/s41586-018-0849-9.

[9] WONG C K, YUSTA B, KOEHLER J A, *et al*. Divergent roles for the gut intraepithelial lymphocyte GLP-1R in control of metabolism, microbiota, and T cell-induced inflammation [J]. Cell Metabolism, 2022, 34(10): 1514-1531. DOI: 10.1016/j.cmet.2022.08.003.

[10] WANG M, HU R Y, GONG W W, *et al*. Trends in prevalence of gestational diabetes mellitus in Zhejiang Province, China, 2016-2018 [J]. Nutr Metab, 2021, 18(1): 12. DOI: 10.1186/s12986-020-00539-8.

[11] WANG Z J, WU Y, WU J H, *et al*. Trends in prevalence and incidence of type 2 diabetes among adults in Beijing, China, from 2008 to 2017 [J]. Diabet Med, 2021, 38(9): e14487. DOI: 10.1111/dme.14487.

[12] ARIFUZZAMAN M, WON T H, LI T T, *et al*. Inulin fibre promotes microbiota-derived bile acids and type 2 inflammation [J]. Nature, 2022, 611(7936): 578-584. DOI: 10.1038/s41586-022-05380-y.

[13] VÍTEK L. Bile acid malabsorption in inflammatory bowel disease [J]. Inflamm Bowel Dis, 2015, 21(2): 476-483. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000193.

[14] WOLF P G, DEVENDRAN S, DODEN H L, *et al*. Berberine alters gut microbial function through modulation of bile acids [J]. BMC Microbiol, 2021, 21(1): 24. DOI: 10.1186/s12866-020-02020-1.

[15] ISER J H, SALI A. Chenodeoxycholic acid: a review of its pharmacological properties and therapeutic use [J]. Drugs, 1981, 21(2): 90-119. DOI: 10.2165/00003495-198121020-00002.

[16] TINT G S, SALEN G, SHEFER S. Effect of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid on cholesterol and bile acid metabolism [J]. Gastroenterology, 1986, 91(4): 1007-1018. DOI: 10.1016/0016-5085(86)90708-0.

[17] WARD J B J, LAJCZAK N K, KELLY O B, *et al*. Ursodeoxycholic acid and lithocholic acid exert anti-inflammatory actions in the colon [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2017, 312(6): G550-G558. DOI: 10.1152/ajpgi.00256.2016.

[18] OLIVARES-VILLAGÓMEZ D, VAN KAER L. Intestinal intraepithelial lymphocytes: sentinels of the mucosal barrier [J]. Trends Immunol, 2018, 39(4): 264-275. DOI: 10.1016/j.it.2017.11.003.

[19] CHEROUTRE H, LAMBOLEZ F, MUCIDA D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes [J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(7): 445-456. DOI: 10.1038/nri3007.

[20] POUSSIER P, EDOUARD P, LEE C, *et al*. Thymus-independent development and negative selection of T cells expressing T cell receptor alpha/beta in the intestinal epithelium: evidence for distinct circulation patterns of gut- and thymus-derived T lymphocytes [J]. J Exp Med, 1992, 176(1): 187-199. DOI: 10.1084/jem.176.1.187.

[21] SUZUKI S, SUGAHARA S, SHIMIZU T, *et al*. Low level of mixing of partner cells seen in extrathymic T cells in the liver and intestine of parabiotic mice: its biological implication [J]. Eur J Immunol, 1998, 28(11): 3719-3729. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199811)28:113719:AID-IMMU3719>3.0.CO;2-O.

[22] MASOPUST D, CHOO D, VEZYS V, *et al*. Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium [J]. J Exp Med, 2010, 207(3): 553-564. DOI: 10.1084/jem.20090858.

[23] MAVROPOULOS J C, CUCHACOVICH M, LLANOS C, *et al*. Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy augments dipeptidyl peptidase Ⅳ activity and decreases autoantibodies to GRP78/BIP and phosphoglucose isomerase in patients with rheumatoid arthritis [J]. J Rheumatol, 2005, 32(11): 2116-2124.

(收稿:2023-09-28;修回:2023-12-12)

(编辑 邓强庭)