二甲双胍对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝损伤的改善作用Δ

吴　霜[1*]，程海林[1]，刘　丹[1]，肖　婷[1]，吴兴邦[1]，李华东[2]，胡旭东[1#]（1.华中科技大学同济医学院附属武汉金银潭医院（湖北省传染病临床医学研究中心）消化科，武汉　430023；2.华中科技大学同济医学院附属武汉金银潭医院（湖北省传染病临床医学研究中心）感染科，武汉　430023）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2025）07-0837-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2025.07.12

摘　要　目的　探究二甲双胍（Met）调控磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B/血小板源性生长因子（PI3K/AKT/PDGF）信号通路对非酒精性脂肪性肝炎（NASH）大鼠肝损伤的影响。**方法**　以高糖高脂饮食饲喂大鼠构建NASH模型，造模成功后随机分为模型组（Model组）、Met低剂量组（Met-L组，100 mg/kg）、Met中剂量组（Met-M组，200 mg/kg）、Met高剂量组（Met-H组，400 mg/kg）、高剂量Met+PI3K激活剂组（Met-H+740 Y-P组，400 mg/kg Met+50 mg/kg 740 Y-P），另设对照组（Control组），每组12只。各组大鼠每天灌胃/注射相应药物1次，连续6周。分析大鼠体重和肝指数变化；观察大鼠肝组织病理损伤[评估非酒精性脂肪性肝病活动度评分（NAS）]、脂质沉积（计算油红O阳性染色面积占比）和纤维化（计算胶原沉积分数）情况；检测大鼠血清和肝组织中炎症因子[白细胞介素6（IL-6）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）]水平以及血清中脂代谢[总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）]和肝功能[天冬氨酸转氨酶（AST）、丙氨酸转氨酶（ALT）]指标水平；检测大鼠肝组织中PI3K/AKT/PDGF信号通路相关蛋白和胱天蛋白酶3（Caspase-3）蛋白表达水平。**结果**　与Control组比较，Model组大鼠体重和肝指数，血清中脂代谢和肝功能指标水平，血清和肝组织中IL-6、TNF-α水平，NAS，油红O阳性染色面积占比，胶原沉积分数，肝组织中PI3K、AKT蛋白磷酸化水平和PDGF、Caspase-3蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）；肝组织病理损伤严重，富含脂滴，胶原沉积明显。经Met干预后，大鼠上述定量指标和病理变化均显著改善（$P<0.05$），且呈剂量依赖性（$P<0.05$）。740 Y-P可显著逆转高剂量Met对大鼠上述指标的改善作用（$P<0.05$）。**结论**　Met可改善NASH大鼠肝损伤，减轻炎症反应和肝纤维化，其作用机制可能与抑制PI3K/AKT/PDGF信号通路活性有关。

关键词　二甲双胍；非酒精性脂肪性肝炎；肝损伤；脂代谢；肝纤维化；PI3K/AKT/PDGF信号通路

Improvement effect of metformin on liver injury in non-alcoholic steatohepatitis rats

WU Shuang[1], CHENG Hailin[1], LIU Dan[1], XIAO Ting[1], WU Xingbang[1], LI Huadong[2], HU Xudong[1*][1. Dept. of Gastroenterology, Wuhan Jinyintan Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology (Hubei Clinical Research Center for Infectious Disease), Wuhan 430023, China; 2. Dept. of Infection, Wuhan Jinyintan Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology (Hubei Clinical Research Center for Infectious Disease), Wuhan 430023, China]

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effects of metformin (Met) on liver injury in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) rats by regulating the PI3K/AKT/PDGF signaling pathway. **METHODS** NASH model was constructed by feeding rats with a high-glucose and high-fat diet, and assigned into Model group, Met low-dose group (Met-L group, 100 mg/kg), Met medium-dose group (Met-M group, 200 mg/kg), Met high-dose group (Met-H group, 400 mg/kg), and high dose of Met+PI3K activator group (Met-H+740 Y-P group, 400 mg/kg Met+50 mg/kg 740 Y-P), with 12 rats in each group. Another 12 rats were regarded as the Control group. Each group of rats was orally administered/injected with the corresponding medication once a day for 6 consecutive weeks. The changes in body weight and liver index of rats were recorded and analyzed. The pathological damage [evaluation of non-alcoholic fatty liver disease activity score (NAS)], lipid deposition (calculation of the proportion of oil red O-positive staining area), and fibrosis (calculation of collagen deposition score) were observed in liver tissue of rats. The levels of inflammatory factors [interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α)] in serum and liver tissue, the levels of serum lipid metabolism indicators [total cholesterol (TC), triglyceride (TG), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C)] and liver function indicators [aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT)] were measured. The expression levels of PI3K/AKT/PDGF signaling pathway-related proteins and Caspase-3 in liver tissue of rats were determined. **RESULTS** Compared with the Control group, body weight, liver index, the levels of serum lipid metabolism indicators and liver

Δ **基金项目**　武汉市知识创新专项项目（No.2022020801010588）；武汉市医学科研项目（No.WY22A05）

＊ **第一作者**　主治医师，硕士。研究方向：消化肝病。E-mail：yt0viv@163.com

通信作者　主任医师。研究方向：消化肝病。E-mail：xyhut41@163.com

function indicators, the levels of IL-6 and TNF-α in serum and liver tissue, the NAS, the proportion of oil red O-positive staining area, the collagen deposition fraction, and the levels of phosphorylated PI3K and AKT proteins, as well as the expression levels of PDGF and Caspase-3 proteins in liver tissue, were all significantly increased ($P<0.05$). The liver tissue showed severe pathological damage, characterized by an abundance of lipid droplets and pronounced collagen deposition. After the intervention with Met, the aforementioned quantitative indicators and pathological changes in rats were significantly improved in a dose-dependent manner ($P<0.05$). 740 Y-P could reverse the improvement effects of high dose of Met on the above indexes of rats ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Met can improve liver damage, and alleviate inflammatory reactions and liver fibrosis of NASH rats, the mechanism of which may be associated with inhibiting PI3K/AKT/PDGF signaling pathway.

KEYWORDS metformin; non-alcoholic steatohepatitis; liver damage; lipid metabolism; liver fibrosis; PI3K/AKT/PDGF signaling pathway

非酒精性脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis，NASH）是在没有酒精滥用的情况下发展起来的晚期脂肪性肝病，也是最常见的慢性肝病[1]。根据“多重打击”理论可知，肝脂肪变性使肝细胞对其他打击敏感，导致肝细胞出现损伤和纤维化，进而发展为NASH[2]。运动和饮食改变是NASH常见的辅助性治疗方式，但效果一般，目前尚无治疗NASH的特效药物。因此，迫切需要开发安全有效的药物用于治疗NASH。

二甲双胍（metformin，Met）是治疗2型糖尿病的一线药物[3]，相关研究显示，Met可通过调控非酒精性脂肪性肝病大鼠的肠道菌群结构，增加有益菌的丰度，改善脂代谢和肝损伤[4]；还可通过调控AMP活化的蛋白质激酶-过氧化物酶体增殖物激活受体γ辅助激活因子1α轴抑制炎症反应，减轻败血症小鼠的肝损伤[5]。此外临床研究显示，Met联合辛伐他汀可改善非酒精性脂肪性肝病合并2型糖尿病患者的脂代谢水平[6]。由此可见，Met在治疗肝病方面显示出巨大潜力。

磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B（phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B，PI3K/AKT）信号通路与非酒精性脂肪性肝病中的脂代谢和炎症反应密切相关，研究表明，调节PI3K/AKT信号通路可以逆转肝细胞坏死、炎症反应和氧化应激诱导的肝损伤[7]。血小板源性生长因子（platelet-derived growth factor，PDGF）是间质细胞（如成纤维细胞）的生长刺激因子，过表达的PDGF能够促进胶原的产生和沉积，而降低PDGF水平能够有效地改善肝组织的纤维化[8]。相关研究发现，调控PI3K/AKT/PDGF信号通路活性，可影响代谢相关脂肪性肝病小鼠的肝脂肪变性和纤维化发展[9]。目前，尚不清楚Met能否通过调控PI3K/AKT/PDGF信号通路发挥对NASH的改善作用。基于此，本研究通过构建NASH大鼠模型，探究Met调控PI3K/AKT/PDGF信号通路对NASH大鼠肝损伤的影响，以期为Met治疗NASH提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有1645050型电泳仪（广州维基科技有限公司）、GenoSens S2 Pro型一体式凝胶成像仪（上海勤翔科学仪器有限公司）、卓越400型全自动生化分析仪（西安天隆科技有限公司）、SpectraMax i3x型多功能酶标仪[美谷分子仪器（上海）有限公司]、Ⅸ3-ICSI/IMSI型倒置荧光显微镜[仪景通光学科技（上海）有限公司]、ES-300型组织包埋机（上海聚慕医疗器械有限公司）、CX23型光学显微镜[桂宁（上海）实验器材有限公司]。

1.2 主要药品与试剂

Met（批号657-24-9，纯度≥99.98%）购自美国MCE公司；PI3K激活剂740 Y-P（批号Y648850）购自阿拉丁控股集团有限公司；苏木精-伊红（HE）染色试剂盒（批号ZY7070）购自上海泽叶生物科技有限公司；油红O染色试剂盒（批号PCM-K-003）购自上海中乔新舟生物科技有限公司；Masson染色试剂盒（批号60532ES58）购自翌圣生物科技（上海）股份有限公司；甘油三酯（triglyceride，TG）、总胆固醇（total cholesterol，TC）、低密度脂蛋白胆固醇（low-density lipoprotein cholesterol，LDL-C）、丙氨酸转氨酶（alanine aminotransferase，ALT）、天冬氨酸转氨酶（aspartate aminotransferase，AST）、白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）试剂盒（批号分别为BC0620、BC1980、BC5330、BC1550、BC1560、SEKM-0007、SEKM-0034）均购自北京索莱宝科技有限公司；兔源PI3K、磷酸化PI3K（p-PI3K）、AKT、磷酸化AKT（p-AKT）、PDGF、胱天蛋白酶3（Caspase-3）、β-肌动蛋白（β-actin）抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗（批号分别为ab302959、ab304351、ab8805、ab8933、ab178409、ab184787、ab8226、ab302644）均购自英国Abcam公司。

1.3 实验动物

本研究动物为SPF级雄性SD大鼠，体重为（190±20）g，购自武汉有度生物科技有限公司，动物生产许可证号为SCXK（鄂）2021-0025。将大鼠单独饲养于通风鼠笼中（相对湿度60%，温度25 ℃，12 h明暗循环）。本研究经武汉有度生物科技有限公司动物实验中心伦理审查委员会审核批准，伦理批号为2021-11-158。

2 方法

2.1 造模

大鼠适应性喂养7 d后，分为造模组（n=63）和对照组（Control组，n=15）。造模组大鼠参考文献方法建立NASH模型[10]：大鼠以高糖高脂饮食[含20%蛋白质、35%碳水化合物（包括18%蔗糖、10%麦芽糖糊精、7%淀粉）、45%脂质]饲喂，Control组大鼠以基础日粮饲喂，6周后，随机挑选3只造模组大鼠与3只Control组大鼠进行指标检测。若造模组大鼠相关指标（肝指数、组织病理变化、血清炎症因子水平）显著异于Control组，则视为造模成功。

2.2 分组与给药

将造模成功的剩余大鼠随机分为模型组（Model组）、Met低剂量组（Met-L组）、Met中剂量组（Met-M组）、Met高剂量组（Met-H组）、高剂量Met+PI3K激活剂组（Met-H+740 Y-P组），每组12只。Met-L组、Met-M组、Met-H组大鼠分别灌胃100、200、400 mg/kg的Met[11]，每天1次，连续6周。Met-H+740 Y-P组大鼠在每次灌胃400 mg/kg Met后，尾静脉注射50 mg/kg的740 Y-P[12]。Control组和Model组大鼠除灌胃等体积的生理盐水替代Met外，其他处理方式同药物干预组。

2.3 体重及肝指数检测

末次给药后对所有大鼠禁食不禁水12 h，称重后腹腔注射戊巴比妥钠（30 mg/kg）麻醉大鼠并进行腹主动脉采血，血样保存备用；处死大鼠后，取肝脏并称重，计算肝指数（肝指数＝肝脏质量/体重×100%）；肝脏称重结束后，保存备用。

2.4 血清中炎症因子及生化指标水平检测

取“2.3”项下血样以3 000 r/min离心15 min，取上层血清备用；一部分血清用于检测炎症因子（IL-6、TNF-α）水平，一部分血清用于检测脂代谢（TC、TG、LDL-C）和肝功能（AST、ALT）指标水平，具体方法按试剂盒说明书操作。

2.5 肝组织中炎症因子水平检测

取“2.3”项下肝组织适量，加入预冷的生理盐水进行匀浆，按照试剂盒说明书方法检测大鼠肝组织中炎症因子（IL-6、TNF-α）水平。

2.6 肝组织病理变化观察

各组随机取6只大鼠的部分肝组织（剩余部分用于脂质沉积检测），置于10%甲醛溶液中固定24 h；经脱水、包埋、切片（5 μm）后，取部分切片（剩余切片用于纤维化检测）进行HE染色，封片后，采用光学显微镜观察大鼠肝组织病理变化并进行非酒精性脂肪性肝病活动度评分（non-alcoholic fatty liver disease activity score，NAS）[13]。

2.7 肝组织脂质沉积观察

取“2.6”项下各组6只大鼠剩余肝组织适量，经包埋、切片（4 μm）、油红O染色、60%异丙醇冲洗后，以苏木精复染，封片后，采用倒置荧光显微镜观察大鼠肝组织脂质沉积情况，并采用Image-pro Plus 6.0软件分析油红O阳性染色面积占比。

2.8 肝组织纤维化观察

取“2.6”项下剩余肝组织切片，置于60 ℃条件下烤片过夜，再以二甲苯、梯度乙醇脱蜡至水；经Masson染料依次染色后，以中性树胶封片，采用光学显微镜观察大鼠肝组织纤维化情况，并采用Image-pro Plus 6.0软件计算胶原沉积分数（胶原沉积分数＝视野下胶原纤维化面积/总面积×100%）。

2.9 肝组织中PI3K/AKT/PDGF信号通路相关蛋白和Caspase-3蛋白表达检测

取各组另外6只大鼠的肝组织适量，加入预冷的蛋白裂解液充分反应，离心取上清液，并采用BCA法对总蛋白进行定量。蛋白经变性处理后，采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白并将其转移到PVDF膜上；以5%脱脂奶粉封闭后，加入p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、PDGF、Caspase-3、β-actin一抗（稀释比例均为1∶1 000）在4 ℃下孵育过夜；以TBST洗膜后，加入二抗（稀释比例为1∶1 000）室温孵育1 h。经ECL显影后，进行凝胶成像，以目的蛋白与内参β-actin的灰度值比值表示蛋白的表达水平，以p-PI3K与PI3K、p-AKT与AKT蛋白的表达水平比值表示PI3K、AKT蛋白的磷酸化水平。

2.10 统计学方法

采用SPSS 24.0软件进行统计分析，计量资料（均符合正态分布）以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步组间两两比较采用SNK-q检验。检验水准α=0.05。

3 结果

3.1 大鼠体重和肝指数检测结果

如表1所示，相较于Control组，Model组大鼠体重和肝指数均显著升高（P<0.05）；相较于Model组，Met-L组、Met-M组、Met-H组大鼠体重和肝指数均显著降低，且呈剂量依赖性（P<0.05）；相较于Met-H组，Met-H+740 Y-P组大鼠体重和肝指数均显著升高（P<0.05）。

表1 各组大鼠体重、肝指数比较（$\bar{x}\pm s$，n=12）

组别	体重/g	肝指数/%	组别	体重/g	肝指数/%
Control组	457.41±16.72	2.57±0.20	Met-M组	543.11±10.53^{bc}	3.10±0.22^{bc}
Model组	594.60±15.43^{a}	4.02±0.24^{a}	Met-H组	502.46±12.18^{bcd}	2.83±0.19^{bcd}
Met-L组	572.30±11.09^{b}	3.58±0.20^{b}	Met-H+740 Y-P组	581.02±13.12^{e}	3.88±0.26^{e}

a：与Control组比较，P<0.05；b：与Model组比较，P<0.05；c：与Met-L组比较，P<0.05；d：与Met-M组比较，P<0.05；e：与Met-H组比较，P<0.05。

3.2 大鼠血清中生化指标水平检测结果

如表2所示，相较于Control组，Model组大鼠血清中脂代谢和肝功能指标水平均显著升高（$P<0.05$）；相较于Model组，Met-L组、Met-M组、Met-H组大鼠血清中脂代谢和肝功能指标水平均显著降低，且呈剂量依赖性（$P<0.05$）；相较于Met-H组，Met-H+740 Y-P组大鼠血清中脂代谢和肝功能指标水平均显著升高（$P<0.05$）。

表2 各组大鼠血清中生化指标水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	TC/（mmol/L）	TG/（mmol/L）	LDL-C/（mmol/L）	ALT/（U/L）	AST/（U/L）
Control组	1.65±0.14	0.58±0.04	0.20±0.01	35.14±3.42	76.21±7.41
Model组	3.18±0.20^{a}	1.21±0.10^{a}	0.59±0.05^{a}	81.52±7.16^{a}	190.08±18.20^{a}
Met-L组	2.79±0.22^{b}	1.01±0.08^{b}	0.50±0.04^{b}	66.91±7.04^{b}	159.26±16.17^{b}
Met-M组	2.27±0.23^{bc}	0.85±0.09^{bc}	0.43±0.04^{bc}	57.63±6.81^{bc}	127.22±13.78^{bc}
Met-H组	1.81±0.20^{bcd}	0.67±0.07^{bcd}	0.32±0.03^{bcd}	44.50±5.02^{bcd}	105.46±11.47^{bcd}
Met-H+740 Y-P组	3.01±0.29^{e}	1.16±0.13^{e}	0.54±0.05^{e}	78.43±8.69^{e}	181.90±17.65^{e}

a：与Control组比较，$P<0.05$；b：与Model组比较，$P<0.05$；c：与Met-L组比较，$P<0.05$；d：与Met-M组比较，$P<0.05$；e：与Met-H组比较，$P<0.05$。

3.3 大鼠血清和肝组织中炎症因子水平检测结果

如表3所示，相较于Control组，Model组大鼠血清和肝组织中IL-6、TNF-α水平均显著升高（$P<0.05$）；相较于Model组，Met-L组、Met-M组、Met-H组大鼠血清和肝组织中IL-6、TNF-α水平均显著降低，且呈剂量依赖性（$P<0.05$）；相较于Met-H组，Met-H+740 Y-P组大鼠血清和肝组织中IL-6、TNF-α水平均显著升高（$P<0.05$）。

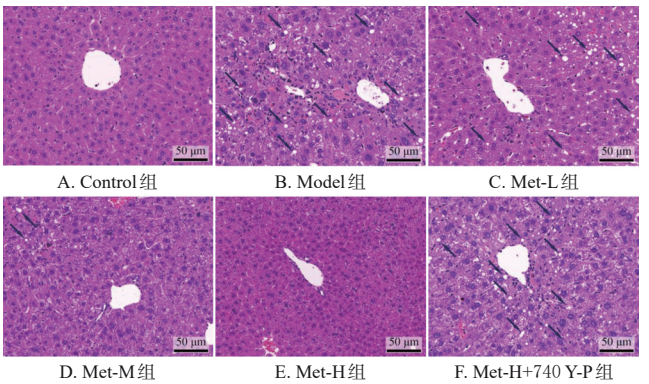
表3 各组大鼠血清和肝组织中炎症因子水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=12$，ng/L）

组别	血清		肝组织	
	IL-6	TNF-α	IL-6	TNF-α
Control组	53.91±5.24	54.22±3.07	96.45±10.31	112.10±11.25
Model组	125.88±10.30^{a}	87.14±5.47^{a}	193.50±16.17^{a}	213.17±18.39^{a}
Met-L组	105.17±8.69^{b}	79.32±4.12^{b}	169.51±12.38^{b}	188.65±14.43^{b}
Met-M组	86.69±8.20^{bc}	69.62±5.23^{bc}	144.20±11.18^{bc}	161.32±13.50^{bc}
Met-H组	67.31±7.45^{bcd}	60.43±4.03^{bcd}	123.50±9.26^{bcd}	135.84±15.29^{bcd}
Met-H+740 Y-P组	117.62±12.34^{e}	75.10±6.16^{e}	178.31±15.41^{e}	196.49±16.33^{e}

a：与Control组比较，$P<0.05$；b：与Model组比较，$P<0.05$；c：与Met-L组比较，$P<0.05$；d：与Met-M组比较，$P<0.05$；e：与Met-H组比较，$P<0.05$。

3.4 大鼠肝组织病理变化观察结果

如图1所示，Control组大鼠肝细胞分布均匀、排列规则、结构完整，NAS为（0.17±0.01）分。Model组大鼠肝细胞内可见脂肪空泡，肝细胞排列紊乱且出现炎症细胞浸润现象，NAS[（6.83±0.72）分]相较于Control组显著升高（$P<0.05$）。Met-L组、Met-M组、Met-H组大鼠相较于Model组，肝细胞内脂肪空泡数均明显减少，肝细胞均有序排列，炎症细胞浸润程度均减轻，NAS[分别为（5.16±0.58）、（3.83±0.45）、（2.50±0.20）分]均显著降低，且呈剂量依赖性（$P<0.05$）。Met-H+740 Y-P组大鼠相较于Met-H组，肝组织病理损伤更重，NAS[（6.33±0.65）分]显著升高（$P<0.05$）。



A. Control组　B. Model组　C. Met-L组

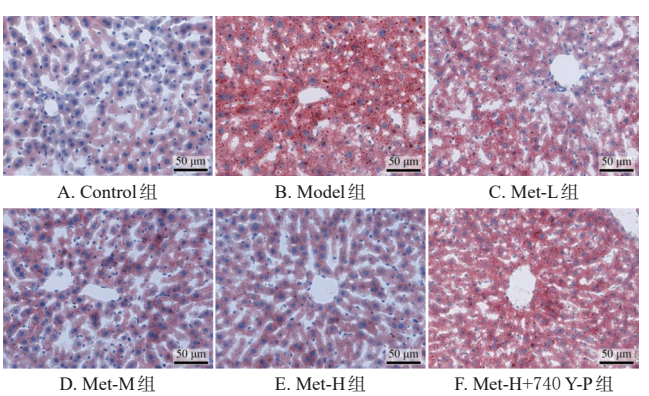
D. Met-M组　E. Met-H组　F. Met-H+740 Y-P组

箭头：脂肪空泡。

图1 各组大鼠肝组织病理变化的显微图（HE染色）

3.5 大鼠肝组织脂质沉积观察结果

如图2所示，Control组大鼠肝组织含有少量脂滴，油红O阳性染色面积占比为（1.50±0.10）%。相较于Control组，Model组大鼠肝组织富含脂滴，呈鲜红色，油红O阳性染色面积占比[（13.33±1.21）%]显著升高（$P<0.05$）。相较于Model组，Met-L组、Met-M组、Met-H组大鼠肝组织脂滴数量均减少，油红O阳性染色面积占比[分别为（10.67±1.04）%、（7.34±0.68）%、（4.83±0.37）%]均显著降低，且呈剂量依赖性（$P<0.05$）。相较于Met-H组，Met-H+740 Y-P组大鼠肝组织脂滴数量增多，油红O阳性染色面积占比[（11.17±0.99）%]显著升高（$P<0.05$）。



A. Control组　B. Model组　C. Met-L组

D. Met-M组　E. Met-H组　F. Met-H+740 Y-P组

图2 各组大鼠肝组织脂质沉积的显微图（油红O染色）

3.6 大鼠肝组织纤维化观察结果

如图3所示，Control组大鼠肝组织无纤维化现象，胶原沉积分数为0。相较于Control组，Model组大鼠肝组织出现明显蓝色胶原纤维沉积，胶原沉积分数[（15.21±1.42）%]显著升高（$P<0.05$）。相较于Model组，Met-L组、Met-M组、Met-H组大鼠肝组织纤维化程度均减轻，胶原沉积分数[分别为（12.06±1.15）%、（9.55±1.00）%、（6.73±0.54）%]均显著降低，且呈剂量依赖性（$P<0.05$）。相较于Met-H组，Met-H+740 Y-P组大鼠肝组织纤维化程度加重，胶原沉积分数[（14.45±1.37）%]显著升高（$P<0.05$）。

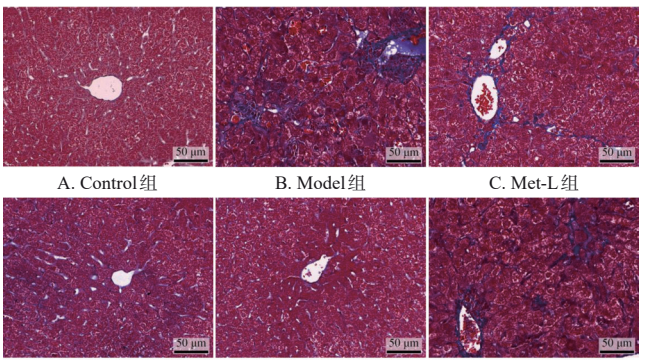
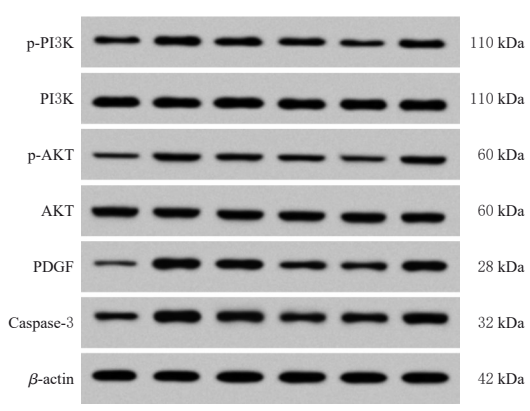


图3　各组大鼠肝组织纤维化的显微图（Masson染色）

3.7　大鼠肝组织中PI3K/AKT/PDGF信号通路相关蛋白和Caspase-3蛋白表达水平检测结果

如图4、表4所示，相较于Control组，Model组大鼠肝组织中PI3K、AKT蛋白磷酸化水平和PDGF、Caspase-3蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。相较于Model组，Met-L组、Met-M组、Met-H组大鼠肝组织中PI3K、AKT蛋白磷酸化水平和PDGF、Caspase-3蛋白表达水平均显著降低，且呈剂量依赖性（$P<0.05$）。相较于Met-H组，Met-H+740 Y-P组大鼠肝组织中PI3K、AKT蛋白磷酸化水平和PDGF、Caspase-3蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。



A：Control组；B：Model组；C：Met-L组；D：Met-M组；E：Met-H组；F：Met-H+740 Y-P组。

图4　大鼠肝组织中PI3K/AKT/PDGF信号通路相关蛋白和Caspase-3蛋白表达的电泳图

表4　各组大鼠肝组织中PI3K/AKT/PDGF信号通路相关蛋白和Caspase-3蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT	PDGF/β-actin	Caspase-3/β-actin
Control组	0.41±0.04	0.33±0.04	0.22±0.04	0.53±0.04
Model组	0.82±0.08^{a}	0.71±0.07^{a}	1.05±0.10^{a}	1.21±0.11^{a}
Met-L组	0.74±0.07^{b}	0.62±0.06^{b}	0.86±0.08^{b}	1.04±0.10^{b}
Met-M组	0.63±0.06^{bc}	0.55±0.05^{bc}	0.67±0.07^{bc}	0.93±0.09^{bc}
Met-H组	0.51±0.06^{bcd}	0.43±0.04^{bcd}	0.50±0.06^{bcd}	0.80±0.07^{bcd}
Met-H+740 Y-P组	0.79±0.08^{e}	0.68±0.07^{e}	0.91±0.09^{e}	1.18±0.10^{e}

a：与Control组比较，$P<0.05$；b：与Model组比较，$P<0.05$；c：与Met-L组比较，$P<0.05$；d：与Met-M组比较，$P<0.05$；e：与Met-H组比较，$P<0.05$。

4　讨论

随着人们饮食和作息等生活方式的改变，非酒精性脂肪性肝病的发病率不断上升，且并发症复杂多样。非酒精性脂肪性肝病经历了从单纯性脂肪变性逐渐发展为NASH的过程，整个过程的发病机制较为复杂，包括脂代谢失调、氧化应激、炎症反应和肠道微生物群失衡。Met作为抗糖尿病药物，已被广泛使用，近年来研究表明，Met不仅具有抗炎作用[14]，还可调控非酒精性脂肪性肝病的脂代谢[15]。由此可见，Met可能对NASH具有改善作用。本研究通过构建NASH大鼠模型发现，Met能有效降低NASH大鼠肝指数，并减轻肝损伤。

体重减轻对于改善NASH至关重要，相关文献指出，患者体重降低4%左右可以减轻肝脂肪变性现象[16]。TC、TG和LDL-C是血脂的组成部分，也是反映脂代谢的重要指标[17]。AST和ALT是反映肝功能的重要指标，当肝脏发生炎症反应或氧化应激时，肝细胞中的AST和ALT就会被释放入血[18]。本研究结果显示，NASH大鼠体重和血清中TC、TG、LDL-C、AST、ALT水平均显著升高，提示NASH大鼠脂代谢紊乱、肝功能异常；经Met干预后，大鼠体重和上述指标水平均显著降低，表明Met能够调节脂代谢、改善肝损伤。此外，NASH与肝脏中的炎症反应密切相关，一些炎症因子可通过作用于肝脏，诱发局部炎症反应进而导致肝细胞凋亡和肝纤维化[19]。IL-6是炎症反应的直接促进因子，其可通过促进脂质在肝脏中的集聚影响脂代谢，最终导致脂肪肝形成；TNF-α由巨噬细胞等免疫细胞产生，可直接促进脂质增加，还可加速其他炎症因子的释放，最终造成肝组织损伤[19]。本研究结果显示，Met能有效降低NASH大鼠血清和肝组织中的炎症因子水平，提示Met具有抗炎作用，这与Feng等[20]的研究结论一致。

研究发现，调节PI3K/AKT信号通路可改善非酒精性脂肪性肝病大鼠的氧化应激和炎症反应[21]。PDGF在各种细胞反应（包括增殖和肌动蛋白重组）中起着关键作用，其可影响肝脏、肾脏等器官的纤维化进展[22]。PDGF的高表达可促进胶原的产生和沉积[23]。Ye等[9]研究指出，PI3K、AKT、PDGF蛋白表达量的变化与脂肪性肝病小鼠的肝脂肪变性和纤维化发展有关。此外抑制肝细胞凋亡可以改善NASH相关的肝损伤，而Caspase-3是凋亡途径的调节因子[24]。本研究结果显示，NASH大鼠肝组织中PI3K、AKT蛋白磷酸化水平和PDGF、Caspase-3蛋白表达水平均显著升高，这提示NASH大鼠肝损伤与PI3K/AKT/PDGF信号通路相关蛋白异常表达有关。经Met干预后，大鼠肝组织中上述指标水平均逆转，由此推测，Met可能通过抑制PI3K/AKT/PDGF信号通路活性，发挥改善NASH的作用。为了验证该推测，本研究在高剂量Met干预治疗的基础上，尾静脉注射

PI3K激活剂740 Y-P，结果显示，Met对PI3K/AKT/PDGF信号通路的抑制作用可被740 Y-P逆转。

综上所述，Met可改善NASH大鼠肝损伤，减轻炎症反应和肝纤维化，其作用机制可能与抑制PI3K/AKT/PDGF信号通路活性有关。

参考文献

[1] LIN Z B，YANG P J，HU Y F，et al. Ring finger protein 13 protects against nonalcoholic steatohepatitis by targeting STING-relayed signaling pathways[J]. Nat Commun，2023，14(1)：6635.

[2] XU X H，POULSEN K L，WU L J，et al. Targeted therapeutics and novel signaling pathways in non-alcohol-associated fatty liver/steatohepatitis（NAFL/NASH）[J]. Signal Transduct Target Ther，2022，7(1)：287.

[3] FORETZ M，GUIGAS B，VIOLLET B. Metformin：update on mechanisms of action and repurposing potential[J]. Nat Rev Endocrinol，2023，19(8)：460-476.

[4] 李瑞芳，卜淑蕊. 二甲双胍对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病大鼠肠道菌群的影响[J]. 中华消化杂志，2020，40(12)：861-867.

[5] SONG H，ZHANG X J，ZHAI R Q，et al. Metformin attenuated sepsis-associated liver injury and inflammatory response in aged mice[J]. Bioengineered，2022，13(2)：4598-4609.

[6] 吕春卉，李大炜，王小洁，等. 二甲双胍联合辛伐他汀治疗非酒精性脂肪性肝病合并2型糖尿病患者疗效研究[J]. 实用肝脏病杂志，2022，25(1)：50-53.

[7] YU Y J，ZHOU S Z，WANG Y，et al. Leonurine alleviates acetaminophen-induced acute liver injury by regulating the PI3K/AKT signaling pathway in mice[J]. Int Immunopharmacol，2023，120：110375.

[8] XU X Y，GENG Y，XU H X，et al. *Antrodia camphorata*-derived antrodin C inhibits liver fibrosis by blocking TGF-beta and PDGF signaling pathways[J]. Front Mol Biosci，2022，9：835508.

[9] YE Q，LIU Y，ZHANG G J，et al. Deficiency of gluconeogenic enzyme PCK1 promotes metabolic-associated fatty liver disease through PI3K/AKT/PDGF axis activation in male mice[J]. Nat Commun，2023，14(1)：1402.

[10] EMAN E，HEMAT E，HANAA H，et al. Effects of berberine on high-fat/high-sucrose-induced nonalcoholic steatohepatitis in experimental rats[J]. Tanta Med J，2019，47(2)：80.

[11] 岳亚光，檀薇薇，王文川，等. 二甲双胍经Nrf2-Gpx4通路抑制铁死亡并减轻非酒精性脂肪性肝病大鼠的肝损伤[J]. 中国病理生理杂志，2021，37(10)：1848-1857.

[12] 李彩艳，王东枝，张冰，等. 基于瘦素介导的PI3K/AKT通路探讨二甲双胍对脑卒中相关性肺炎大鼠肺损伤的作用机制[J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2024，22(9)：1604-1609.

[13] 彭晓娟，钟绿，吴楚添，等. 青钱柳多糖和青钱柳黄酮对非酒精性脂肪性肝病合并2型糖尿病模型大鼠血液代谢指标及肝脏病变的影响[J]. 中国病理生理杂志，2021，37(10)：1838-1847.

[14] BHARATH L P，NIKOLAJCZYK B S. The intersection of metformin and inflammation[J]. Am J Physiol Cell Physiol，2021，320(5)：C873-C879.

[15] RUAN G Y，WU F Q，SHI D B，et al. Metformin：update on mechanisms of action on liver diseases[J]. Front Nutr，2023，10：1327814.

[16] GUO M D，ZHU C H，FU R Z，et al. Ginsenoside Rk3 regulates nonalcoholic steatohepatitis by modulation of intestinal flora and the PI3K/AKT signaling pathway in C57BL/6 mice[J]. J Agric Food Chem，2023，71(24)：9370-9380.

[17] SONG J，QIU H R，DU P，et al. Polyphenols extracted from Shanxi-aged vinegar exert hypolipidemic effects on OA-induced HepG2 cells via the PPARα-LXRα-ABCA1 pathway[J]. J Food Biochem，2022，46(2)：e14029.

[18] 郭威，李三强，宋晓改，等. L-谷氨酰胺对急性酒精肝损伤小鼠的保护作用机制研究[J]. 中国临床药理学杂志，2020，36(13)：1812-1814.

[19] DUAN Y M，PAN X F，LUO J Y，et al. Association of inflammatory cytokines with non-alcoholic fatty liver disease[J]. Front Immunol，2022，13：880298.

[20] FENG Y Y，WANG Z J，PANG H. Role of metformin in inflammation[J]. Mol Biol Rep，2023，50(1)：789-798.

[21] LI J D，WANG T Q，LIU P P，et al. Hesperetin ameliorates hepatic oxidative stress and inflammation via the PI3K/AKT-Nrf2-ARE pathway in oleic acid-induced HepG2 cells and a rat model of high-fat diet-induced NAFLD[J]. Food Funct，2021，12(9)：3898-3918.

[22] WALLACE S J，TACKE F，SCHWABE R F，et al. Understanding the cellular interactome of non-alcoholic fatty liver disease[J]. JHEP Rep，2022，4(8)：100524.

[23] WANG Y F，WANG P Y，YU Y B，et al. Hepatocyte Ninjurin2 promotes hepatic stellate cell activation and liver fibrosis through the IGF1R/EGR1/PDGF-BB signaling pathway[J]. Metabolism，2023，140：155380.

[24] WANG S，CHEN B H，DU R L，et al. An herbal formulation "Shugan xiaozhi decoction" ameliorates methionine/choline deficiency-induced nonalcoholic steatohepatitis through regulating inflammation and apoptosis-related pathways[J]. J Ethnopharmacol，2024，329：118127.

（收稿日期：2024-10-12　修回日期：2025-02-08）

（编辑：唐晓莲）