

· 脂肪性肝病 ·

DOI: 10.12449/JCH251116

## 达格列净对代谢相关脂肪性肝病小鼠模型肠道菌群的影响及其机制分析

郑彩云<sup>1a</sup>, 俞丽丽<sup>1a</sup>, 田晓旭<sup>1b</sup>, 戴亨纷<sup>2</sup>

1 福建医科大学附属福清市医院 a. 临床药理学室, b. 科教科, 福州 350300

2 福建医科大学附属福州市第一总医院药学部, 福州 350009

通信作者: 戴亨纷, hengfendai2011@163.com (ORCID: 0000-0002-2037-4208)

**摘要:** **目的** 探讨达格列净对代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)小鼠肝脂代谢及肠道微生态的影响,并阐明其潜在作用机制。**方法** 50只C57雄性小鼠随机分为正常组(Control组)、2型糖尿病合并代谢相关脂肪性肝病组(MAFLD组)、达格列净组(DAPA组)、米屈胂组(THP组)、达格列净联合米屈胂组(DAPA+THP组),每组各10只。采用高脂饮食联合链脲佐菌素诱导MAFLD小鼠模型。通过组织病理学、血糖血脂等生化指标评估疗效,并利用转录组学和宏基因组学分析差异基因及菌群变化。正态分布的计量资料多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验;非正态分布的计量资料多组间比较采用Kruskal-Wallis *H*检验,两两比较采用Nemenyi检验。**结果** 组织病理学结果显示,MAFLD组小鼠表现为过量的脂质沉积,肝细胞出现脂肪样变;与MAFLD组相比,DAPA组肝细胞脂肪样变显著改善,THP组、DAPA+THP组改善效果无DAPA组明显。与Control组相比,MAFLD组空腹血糖显著升高( $P<0.05$ ),血清ALT、AST、MDA、TC、TG、LDL-C均显著升高( $P$ 值均 $<0.05$ ),HDL-C明显降低( $P<0.05$ )。与MAFLD组相比,DAPA组、THP组和DAPA+THP组血清ALT、AST显著降低( $P$ 值均 $<0.05$ )。16S rRNA测序显示,MAFLD组较Control组,小鼠肠道菌群发生显著改变,MAFLD组的 *Firmicutes*、*Lactobacillaceae* 明显增加,*Bacteroidetes*、*S24-7*和*Erysipelotrichaceae*明显减少。DAPA组、THP组和DAPA+THP组可调节上述菌群趋向正常水平。肝脏转录组学分析主要富集的代谢通路包括类固醇激素生物合成、胆汁分泌、炎性介质调节TRP(瞬时受体电位通道)、脂肪酸延伸、脂质生物代谢过程等,关联的基因主要涉及脂质代谢关键靶点 *Acot2*、*Angptl4*、*Scd2*和*Npc1l1*。**结论** DAPA可能通过类固醇激素生物合成、胆汁分泌、炎性介质调节TRP、脂肪酸延伸通路改善MAFLD,调节肠道菌群稳态。

**关键词:** 代谢相关脂肪性肝病; 胃肠道微生物组; 转录组; 达格列净; 米屈胂**基金项目:** 福建省自然科学基金(2025J011339); 福州市卫生健康科技计划(2022-S-wq1); 福建医科大学启航基金(2020QH1346)

### Effect and mechanism of dapagliflozin on gut microbiota in a mouse model of metabolic associated fatty liver disease

ZHENG Caiyun<sup>1a</sup>, YU Lili<sup>1a</sup>, TIAN Xiaoxu<sup>1b</sup>, DAI Hengfen<sup>2</sup>

1. a. Department of Clinical Pharmacy, b. Department of Science and Education, Fuqing Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350300, China; 2. Department of Pharmacy, Fuzhou First General Hospital Affiliated with Fujian Medical University, Fuzhou 350009, China

Corresponding author: DAI Hengfen, hengfendai2011@163.com (ORCID: 0000-0002-2037-4208)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of dapagliflozin on liver lipid metabolism and gut microecology in mice with metabolic associated fatty liver disease (MAFLD), and to clarify its potential mechanism. **Methods** A total of 50 male C57 mice were randomly divided into Control group, type 2 diabetes+MAFLD group (MAFLD group), dapagliflozin group (DAPA group), meldonium group (THP group), and dapagliflozin+meldonium group (DAPA+THP group), with 10 mice in each group. High-fat diet combined with streptozotocin was used to establish a mouse model of MAFLD. Treatment outcomes were assessed based on

histopathology and biochemical parameters such as blood glucose and blood lipid levels, and the transcriptomic and metagenomic analyses were used to identify differentially expressed genes and the changes in gut microbiota. A one-way analysis of variance was used for comparison of normally distributed continuous data between multiple groups, and the least significant difference *t*-test was used for comparison between two groups; the Kruskal-Wallis *H* test was used for comparison of non-normally distributed continuous data between multiple groups, and the Nemenyi test was used for comparison between two groups. **Results** Histopathological examination showed that the mice in the MAFLD group had excessive lipid deposition and hepatocyte steatosis; compared with the MAFLD group, the DAPA group had a significant improvement in hepatocyte steatosis, while the THP group and the DAPA+THP group had a less significant improvement compared with the DAPA group. Compared with the Control group, the MAFLD group had a significant increase in fasting blood glucose ( $P < 0.05$ ), significant increases in the serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), malondialdehyde, total cholesterol, triglyceride, and low-density lipoprotein cholesterol ( $P < 0.05$ ), and a significant reduction in high-density lipoprotein cholesterol ( $P < 0.05$ ). Compared with the MAFLD group, the DAPA group, the THP group, and the DAPA+THP group had significant reductions in the serum levels of ALT and AST ( $P < 0.05$ ). The results of 16S rRNA sequencing showed that compared with the Control group, the MAFLD group had significant changes in gut microbiota, with an increase in *Firmicutes* and a reduction in *Bacteroidetes*, as well as reductions in *S24-7* and *Erysipelotrichaceae* and an increase in *Lactobacillaceae*. The levels of the above flora were upregulated to normal levels in the DAPA group, the THP group, and the DAPA+THP group. The liver transcriptomic analysis showed that the enriched metabolic pathways included steroid hormone biosynthesis, bile secretion, inflammatory mediator regulation of TRP, fatty acid elongation, and lipid biodegradation processes, and the related genes mainly involved the key targets of lipid metabolism such as *Acot2*, *Angptl4*, *Scd2*, and *Npc1l1*. **Conclusion** Dapagliflozin can alleviate MAFLD through the pathways such as steroid hormone biosynthesis, bile secretion, inflammatory mediator regulation of TRP, and fatty acid elongation, as well as by regulating gut microbiota homeostasis.

**Key words:** Metabolic Associated Fatty Liver Disease; Gastrointestinal Microbiome; Transcriptome; Dapagliflozin; Meldonium

**Research funding:** Natural Science Foundation of Fujian Province (2025J011339); Fuzhou Health Science and Technology Project (2022-S-wq1); Startup Fund of Scientific Research, Fujian Medical University (2020QH1346)

代谢相关脂肪性肝病 (metabolic associated fatty liver disease, MAFLD) 作为一种常见的肝脏代谢综合征, 常见于 2 型糖尿病患者。研究表明, 60% 的糖尿病患者存在 MAFLD<sup>[1-2]</sup>。MAFLD 可进展为肝硬化和肝细胞癌, 目前尚无特效治疗方法。对于 2 型糖尿病和 MAFLD 患者来说, 降糖药物不仅可以降低血糖, 还可以缓解肝脂肪变性。钠葡萄糖共转运蛋白 2 抑制剂 (sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor, SGLT-2i) 类降糖药在降低血糖的同时, 也被发现可减少肝脂肪沉积<sup>[3-5]</sup>, 不同的 SGLT-2i 对 MAFLD 的作用也不同<sup>[6]</sup>。其中, 达格列净 (dapagliflozin, DAPA) 除降糖外<sup>[7]</sup>, 还能改善体质质量、血脂、血压和尿酸排泄<sup>[8-10]</sup>。同时, DAPA 已被证明具有肾脏保护作用且可使心血管疾病死亡率大大降低<sup>[11-12]</sup>。但 DAPA 对 2 型糖尿病合并 MAFLD 的作用机制尚未明确。米屈肼 (meldonium, THP) 是一种心血管保护药, 可以降低血液中左卡尼汀浓度, 影响脂代谢途径, 干预能量代谢, 从而影响代谢性疾病 (如糖尿病和肥胖症) 的病理过程。SGLT-2i 和 THP 作用于细胞膜表面的溶质载体超家族受体, 但其亚型不同, 具体机制仍需进一步研究<sup>[13-14]</sup>。本研究将整合肠道菌群和肝脏转录组深入探讨 DAPA 作用于 MAFLD 的机制。

## 1 材料与方法

1.1 药品与试剂 DAPA 片 [阿斯利康药业 (中国) 有限公司]、THP 和链脲佐菌素 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、柠檬酸钠缓冲液 (北京索莱宝科技有限公司)、ALT、AST、还原型谷胱甘肽 (GSH)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、TC、TG、HDL-C、LDL-C 等试剂盒均购自南京建成科技有限公司。油红 O 染色试剂盒、苏木精-伊红染色试剂盒等购自塞维尔生物公司。

1.2 仪器 离心机 (Thermo Fisher, 日本); 分光光度计 (Thermo Fisher, 德国); CKX53 型荧光显微镜 (日本奥林巴斯光学技术公司, 日本); 质谱仪 (Orbitrap Astral, 美国); 7180 型全自动生化分析仪 (日本日立公司, 日本); 转录组测序仪 (Illumina Novaseq, 美国)。

1.3 实验动物 50 只雄性 C57BL/6N 小鼠 (SPF 级, 4 周龄), 体质量 ( $18 \pm 2$ ) g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (苏) 2022-0006, 饲养于福建医科大学附属福州市第一总医院中心实验室, 实验动物使用许可证号: SYXK (闽) 2022-0003, 温度 25 °C, 相对湿度 ( $55 \pm 5$ )%, 每日光照/避光各 12 h, 自由进食、饮水。

1.4 造模与给药方法 将50只小鼠按随机数字表随机分为5组:正常组(Control组)、2型糖尿病合并MAFLD组(MAFLD组)、DAPA组、THP组、DAPA联合THP组(DAPA+THP组),每组各10只。Control组给予维持饲料喂养,其余组给予高脂饮食联合链脲佐菌素注射构建MAFLD模型。建模成功后,DAPA组小鼠给予10 mg/kg DAPA,灌胃固定于每日同一时间点,1次/d,持续6周;THP组小鼠给予50 mg/kg THP灌胃,1次/d,持续6周;DAPA+THP组小鼠同时给予10 mg/kg DAPA+50 mg/kg THP灌胃,1次/d,持续6周。建模过程中,有小鼠突发死亡,但每组小鼠均 $\geq 6$ 只,模型成功后,每组取6只进行生化检测,每组3只进行分子实验。

1.5 组织病理观察与生化指标检测 建模成功后,继续饲养8周,每周测1次空腹血糖。取新鲜粪便用于16S rRNA测序。14周后,取血清用于生化相关指标的检测。随后迅速解剖肝脏,液氮速冻,转 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱用于肝脏转录组学检测。通过HE染色和油红O染色观察肝组织形态。参照试剂盒说明书测定血清中ALT、AST、TC、TG、HDL-C、LDL-C、GSH、MDA和SOD的水平。

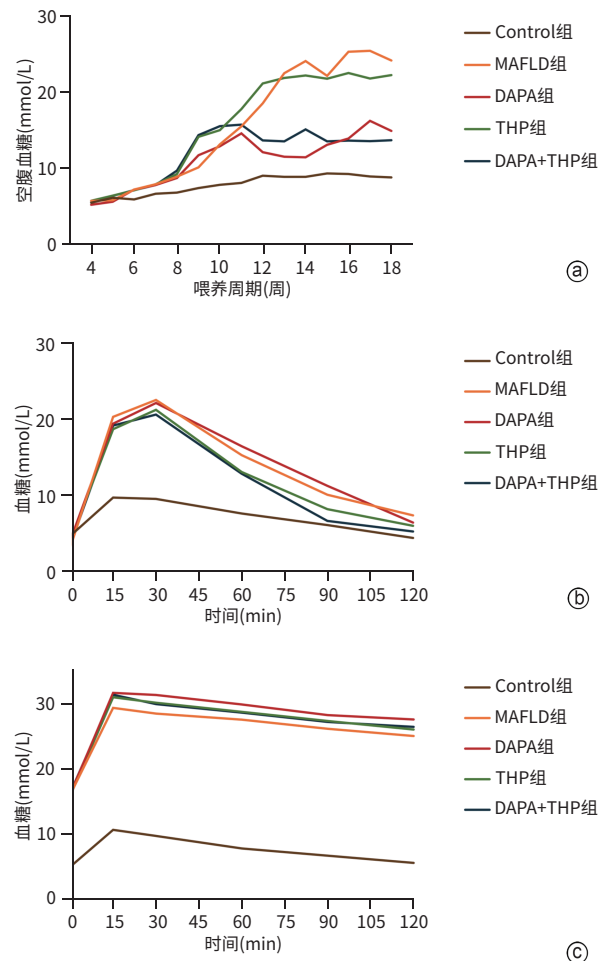
1.6 16S rRNA高通量测序 按照DNA抽提试剂盒说明书提取粪便DNA,利用琼脂糖凝胶电泳检测DNA纯度和浓度。使用338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')引物对V3~V4可变区进行PCR扩增。PCR产物经纯化后,依据Illumina MiSeq平台标准操作规程进行上机测序。

1.7 转录组学 取各组肝组织提取总RNA,经过纯化、建库后,采用第二代测序技术,基于Illumina测序平台,对这些文库进行双末端测序。最后生成原始数据,对原始数据进行治疗评估及过滤,将过滤后得到的高质量序列比对到该物种的参考基因上。根据比对结果,计算每个基因的表达量。在此基础上,进一步对样品进行表达差异分析、富集分析和聚类分析。基于基因在各个样本中的Count值进行差异表达基因筛选,使用DESeq2软件进行差异分析。将 $\log_2\text{FoldChangel}\geq 1, P<0.05$ 作为筛选标准。

1.8 统计学方法 采用SPSS 25.0统计软件进行数据分析。使用GraphPad Prism 8.0.1软件作图。正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD检验;非正态分布的计量资料以 $M(P_{25}\sim P_{75})$ 表示,多组间比较采用Kruskal-Wallis  $H$ 检验,进一步两两比较采用Nemenyi检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 小鼠血糖变化 与Control组相比,干预前MAFLD组、DAPA组、THP组、DAPA+THP组空腹血糖显著升高( $P$ 值均 $<0.05$ );干预后,与MAFLD组相比,DAPA组空腹血糖显著降低( $P$ 值均 $<0.05$ )(图1)。



注:a,各组小鼠空腹血糖动态变化;b,链脲佐菌素注射前糖耐量实验;c,链脲佐菌素注射后糖耐量实验。

图1 小鼠血糖的变化

Figure 1 Changes of blood glucose of mice

2.2 小鼠肝组织病理变化 HE染色显示,Control组小鼠肝细胞形态正常,细胞核居中,大小均匀;MAFLD组小鼠肝细胞内出现大量的脂滴与脂质空泡;DAPA组小鼠肝细胞边界较为清晰,形态较为正常,胞质内的脂滴数量较MAFLD组减少,提示肝脂肪变性较MAFLD组显著改善;THP组较MAFLD组中脂滴分布较稀松,但仍比DAPA组深。油红O染色结果类似,Control组小鼠肝细胞内均匀染色,橘红色脂滴较少,MAFLD组出现大面积橘红色脂滴,DAPA组较MAFLD组脂滴颜色稍浅,面积

也较少,THP组与DAPA组类似(图2)。

2.3 小鼠生化指标变化 与Control组相比,MAFLD组表现为肝功能异常,ALT、AST、TC、TG、LDL-C及MDA均显著升高( $P$ 值均 $<0.05$ ),HDL-C明显降低( $P<0.05$ )。与MAFLD组相比,DAPA组、THP组及DAPA+THP组ALT、AST均显著降低( $P$ 值均 $<0.05$ )(表1)。

2.4 小鼠肠道菌群结构变化 与MAFLD组相比,DAPA降低了小鼠肠道菌群操作分类单元(operational taxonomic units,OTU)数量,DAPA+THP组小鼠肠道微生物多样性增加(图3a、b)。Alpha多样性分析提示,Control组的Chao1、Shannon、Observed\_species、Goods\_coverage指数较其他组,有显著性差异( $P$ 值均 $<0.05$ )。各组间的

Simpon、Faith均无显著性差异(图4a、b)。Beta多样性分析说明,MAFLD组小鼠肠道菌群的组成异于Control组小鼠,DAPA与THP干预使MAFLD组小鼠肠道微生物群落发生改变(图4c、d)。

肠道菌群组成分析显示,在门水平上,各组小鼠粪便样本主要优势菌门包括厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、疣微菌门、放线菌门等,占总肠道菌群95%以上。各水平菌群变化见图5a~d。与Control组比较,MAFLD组的Firmicutes、Lactobacillaceae明显增加,Bacteroidetes、S24-7和Erysipelotrichaceae明显减少。而DAPA组、THP组和DAPA+THP组可回调以上菌群数量,其中DAPA组较THP和DAPA+THP组回调最为显著。

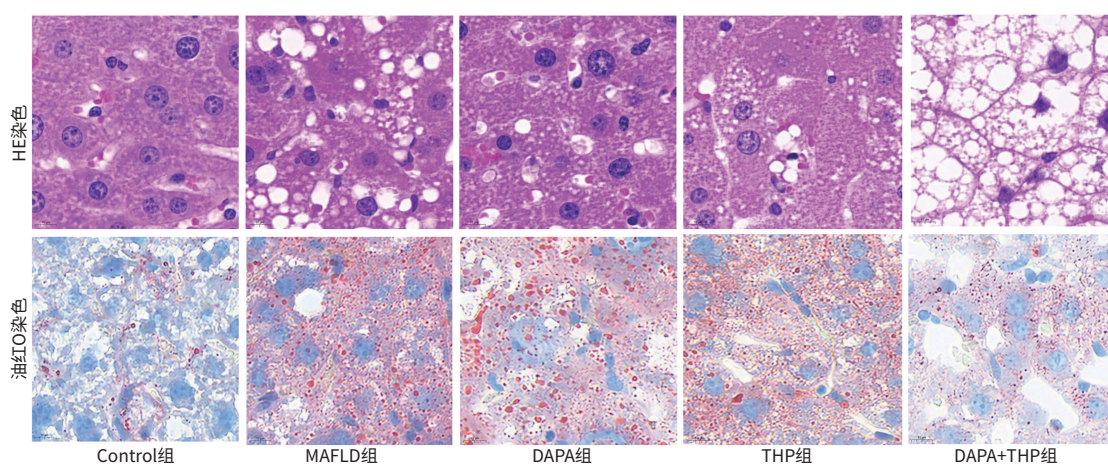


图2 小鼠肝组织HE染色及油红O染色结果( $\times 100$ )

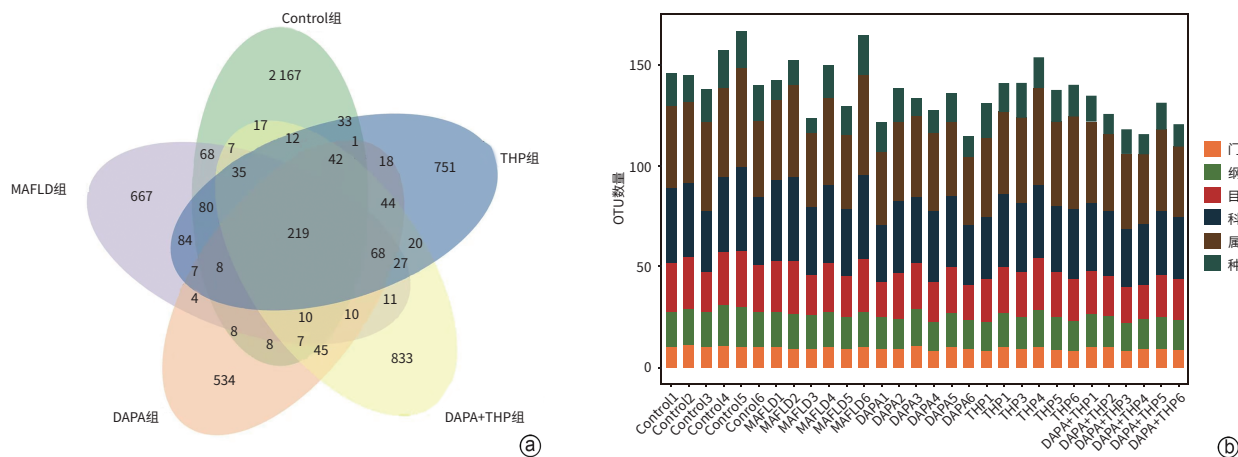
Figure 2 Staining results of HE and oil red O in liver tissues of mice ( $\times 100$ )

表1 小鼠生化指标情况

Table 1 Biochemical indicators of mice

指标	Control组	MAFLD组	DAPA组	THP组	DAPA+THP组	H值	P值
ALT(U/L)	85.34 (84.43 ~ 85.48)	87.33 (86.66 ~ 87.81) <sup>1)</sup>	85.04 (84.81 ~ 85.40) <sup>2)</sup>	85.01 (84.02 ~ 85.72) <sup>2)</sup>	82.56 (81.60 ~ 83.59) <sup>1)2)</sup>	24.15	$<0.001$
AST(U/L)	16.02 (15.90 ~ 16.15)	17.21 (16.97 ~ 17.35) <sup>1)</sup>	16.21 (15.64 ~ 16.43) <sup>2)</sup>	16.09 (15.84 ~ 16.43) <sup>1)2)</sup>	15.93 (15.66 ~ 16.23) <sup>2)</sup>	20.81	0.001
GSH( $\mu$ mol/L)	65.63 (48.96 ~ 112.15)	10.42 (8.33 ~ 50.69)	54.34 (53.91 ~ 75.17)	85.42 (59.20 ~ 107.12)	53.13 (50.95 ~ 55.99)	9.37	0.053
MDA(nmol/mL)	29.39 (18.91 ~ 44.65)	261.28 (244.65 ~ 325.51) <sup>1)</sup>	41.12 (30.52 ~ 53.25) <sup>2)</sup>	318.91 (299.37 ~ 353.25) <sup>1)</sup>	26.99 (15.49 ~ 30.64)	23.53	$<0.001$
SOD(U/mL)	19.88 (19.13 ~ 21.85)	18.62 (14.31 ~ 21.42)	22.06 (20.65 ~ 23.82) <sup>2)</sup>	19.48 (18.91 ~ 20.38)	25.14 (23.73 ~ 26.42) <sup>1)2)</sup>	19.35	0.001
TC(mmol/L)	6.89 (6.63 ~ 7.19)	8.81 (8.28 ~ 10.06) <sup>1)</sup>	7.27 (6.59 ~ 7.63) <sup>2)</sup>	9.82 (9.50 ~ 10.19) <sup>2)</sup>	7.05 (6.70 ~ 8.46) <sup>2)</sup>	20.37	0.001
TG(mmol/L)	0.96 (0.89 ~ 0.97)	1.56 (1.49 ~ 1.63) <sup>1)</sup>	1.07 (0.90 ~ 1.14) <sup>2)</sup>	1.04 (0.75 ~ 1.18) <sup>1)</sup>	0.77 (0.73 ~ 0.78) <sup>2)</sup>	18.16	0.001
HDL-C(mmol/L)	3.37 (3.14 ~ 3.44)	2.38 (2.21 ~ 2.59) <sup>1)</sup>	3.00 (2.81 ~ 3.03)	2.84 (2.53 ~ 3.49)	2.52 (2.45 ~ 3.09)	14.43	0.006
LDL-C(mmol/L)	4.62 (4.47 ~ 4.99)	7.59 (7.11 ~ 8.27) <sup>1)</sup>	4.89 (4.64 ~ 5.14)	4.62 (4.53 ~ 4.72)	6.19 (6.00 ~ 6.45)	22.79	0.000 1

注:与Control组比较,1) $P<0.05$ ;与MAFLD组比较,2) $P<0.05$ 。



注:a, OTU数;b,各水平微生物分类单元数统计图。

图3 小鼠肠道菌群生物信息学分析

Figure 3 Bioinformatics analysis of the intestinal flora in mice

依据在所有样本中平均丰度排名前50的菌属数据,绘制聚类热图。与Control组相比,MAFLD组的肠道菌群发生改变,经过DAPA、THP干预后,上述菌群丰度得到了回调(图5e)。通过LEfSe线性判别分析,确定不同组中的潜在生物标志物,各组差异菌群如图5f所示。

预测的KEGG二级代谢通路主要涉及氨基酸、碳水化合物、辅因子、维生素、萜类化合物、聚酮类化合物、脂类和能量等代谢。结合MetaCyc功能预测表明,与氨基酸、核苷、核苷酸、辅因子、辅基、电子载体、维生素等的生物合成途径相关联。

**2.5 肝脏转录组学分析** 相关性分析显示,MAFLD组与Control组小鼠基因表达水平存在差异。PCA分析除THP外,未见明显异常的离群样本,且不同组间比较与相关性分析类似。分析肝脏mRNA表达量差异,DAPA组与MAFLD组共有1356个差异基因,其中DAPA组比MAFLD组上调基因有1042个,下调基因有314个。与MAFLD组相比,THP组显著上调的基因有531个,显著下调的基因有606个(图6)。

肝脏mRNA差异基因功能富集分析中,GO富集筛选各组之间各层面最显著的10个功能,主要有生物代谢过程、细胞组成层面、分子功能层面的富集。KEGG富集分析显示,与MAFLD相关的主要代谢通路包括类固醇激素生物合成、胆汁分泌、炎性介质调节TRP(瞬时受体电位通道)、脂肪酸延伸、脂肪酸消化吸收、甘油酯代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、胆固醇代谢等。富集到以上通路的关键基因主要有Acot2、Angptl4、Scd2、Npc1l1。

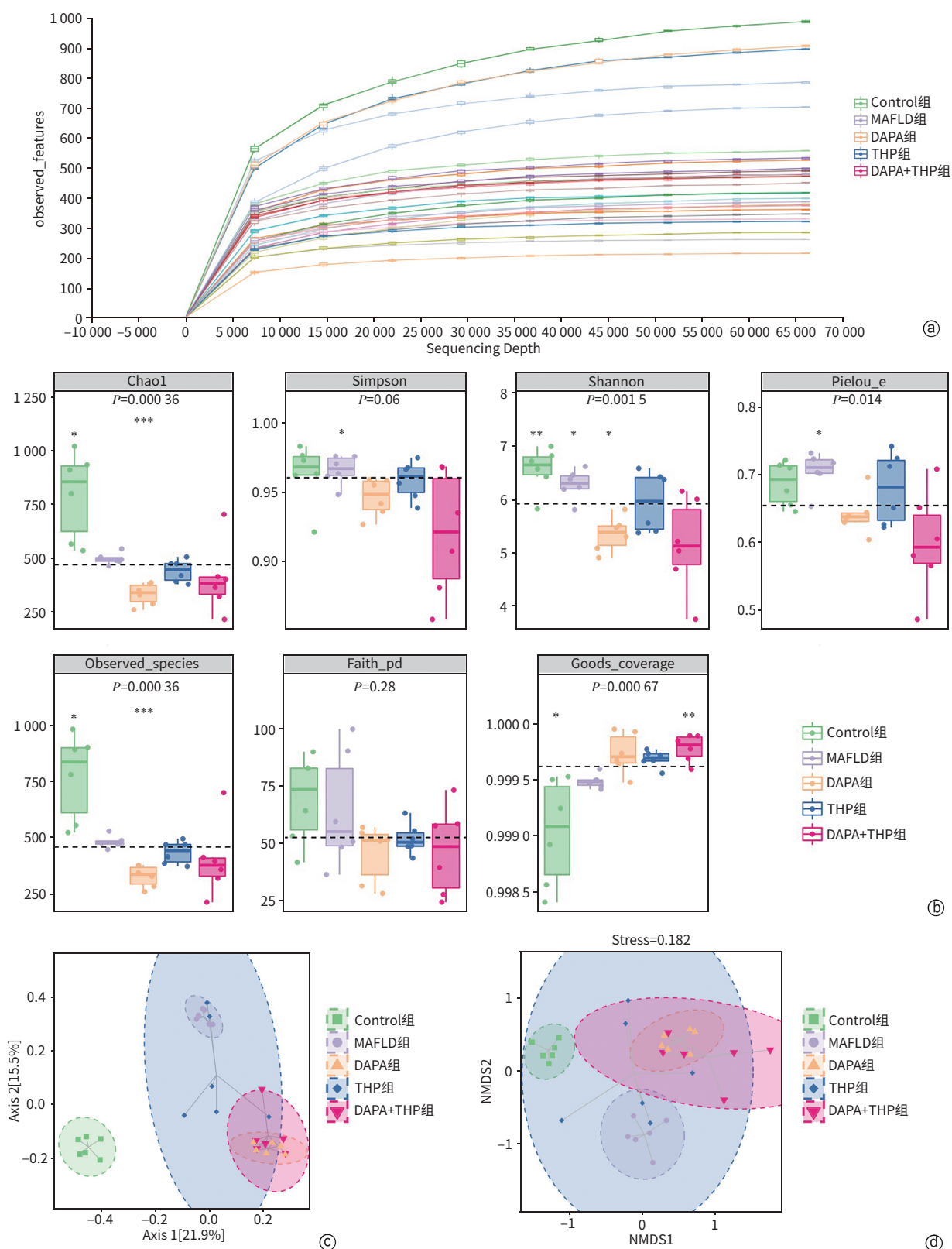
肠道菌群与肝脏相关转录因子表达的关联性分析显示,MAFLD组vs Control组中Plin4、Mogat1与Allobaculum

显著负相关;Slc7a7、Hck与Bilophila显著正相关、与Candidatus Arthromitus显著负相关;Nqo1与Desulfovibrio显著正相关;Mmp8、Bmp8b与Lactobacillus显著正相关。DAPA组vs MAFLD组中,Hsp90aa1、Slc22a5、Acot2与Helicobacter显著负相关;Npc1l1、Gadd45g与瘤胃球菌(Ruminococcus)显著负相关;Angptl4与Ruminococcus、颤螺菌(Oscillospira)显著负相关;Scd2与Coprococcus显著负相关;Pdk4、Ttc39c与Bilophila显著负相关,Rock1与Bacteroides显著正相关(图7)。

### 3 讨论

本研究整合肠道菌群测序和肝脏转录组分析,深入探讨DAPA通过调控肠肝轴中肠道菌群-宿主代谢互作网络对MAFLD小鼠模型的治疗作用及其可能的通路靶点。证实了DAPA在改善糖代谢紊乱和肝脂肪变性方面的显著疗效。DAPA能显著降低MAFLD小鼠的空腹血糖水平,这与SGLT-2i的经典药理作用机制相符。组织病理学观察显示,MAFLD小鼠肝细胞胞质内有大量脂滴沉积,这与临床MAFLD患者的肝脏病理改变一致。DAPA干预后肝脂肪变性程度显著减轻,其效果明显优于THP单药治疗组,这提示SGLT-2i可能具有独立于其降糖作用之外的直接肝脏保护效应。有研究表明,SGLT-2i可通过激活AMPK信号通路抑制肝脂质新生,同时促进脂肪酸 $\beta$ 氧化来减少肝内脂质堆积<sup>[15]</sup>。此外,DAPA还可能通过调节脂肪组织功能,增加脂联素分泌,进而改善肝脏胰岛素敏感性和脂质代谢<sup>[16]</sup>。

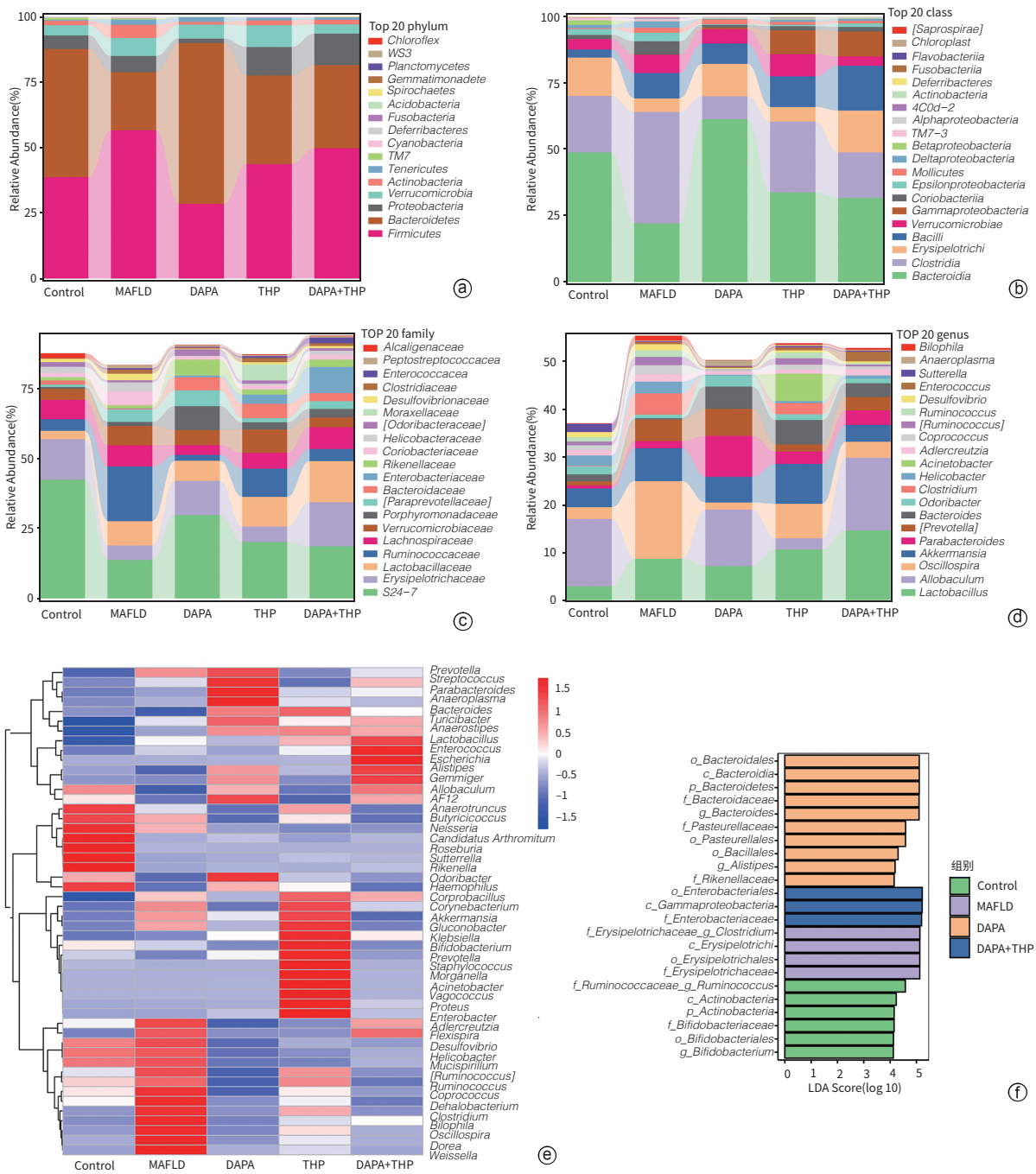
本文结果显示,DAPA联合THP干预后小鼠肝脂肪变性未见逆转效果,相关生化指标的改善程度与DAPA单



注:a,稀疏曲线;b,Alpha多样性指数(与其他组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ );c,PCoA分析二维排序图;d,NMDS二维排序图。

图4 小鼠肠道菌群多样性分析

Figure 4 Analysis of the diversity of intestinal flora in mice



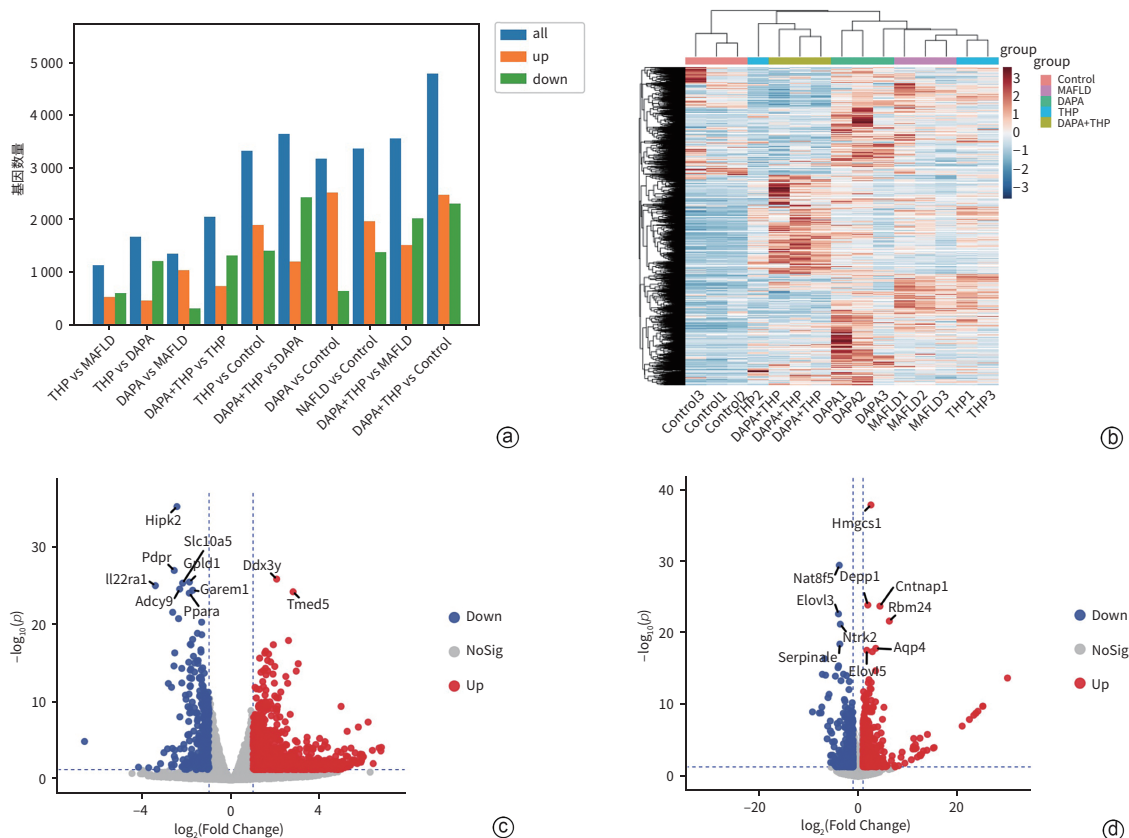
注:a, 排名前 20 菌群门类;b, 排名前 20 菌群纲类;c, 排名前 20 菌群科类;d, 排名前 20 菌群种类;e, 各组物种组成热图;f, 差异菌群。

图 5 小鼠肠道菌群的组成成分及差异分析

Figure 5 Analysis of the components and differences of the intestinal microbiota in mice

药组无明显差异。THP作为一种临床上常用于调节能量代谢的药物,其与DAPA联合应用未能表现出协同效应,反而疗效有所减弱,这一现象值得深入探讨。结合既往文献,DAPA主要通过抑制NADPH(还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)氧化酶活性、减少活性氧生成,从而缓解氧化应激所致的肝细胞损伤,改善ALT、AST及MDA等指

标<sup>[17]</sup>;而THP侧重于改善细胞能量代谢、减轻线粒体功能障碍,其在糖脂代谢调控方面的作用相对有限<sup>[18]</sup>。因此,两药联用未能显著增效,原因可能与THP在糖脂代谢层面的作用较弱、未能与DAPA在代谢通路上形成有效互补有关;另一方面,也可能与两者在体内药代动力学特性、受体亲和力或信号通路交叉等方面存在尚未明确的相互作用



注:a.每个比较组的基因表达量差异;b.热图;c,DAPA vs MAFLD;d,THP vs MAFLD。

图6 小鼠mRNA表达量差异分析

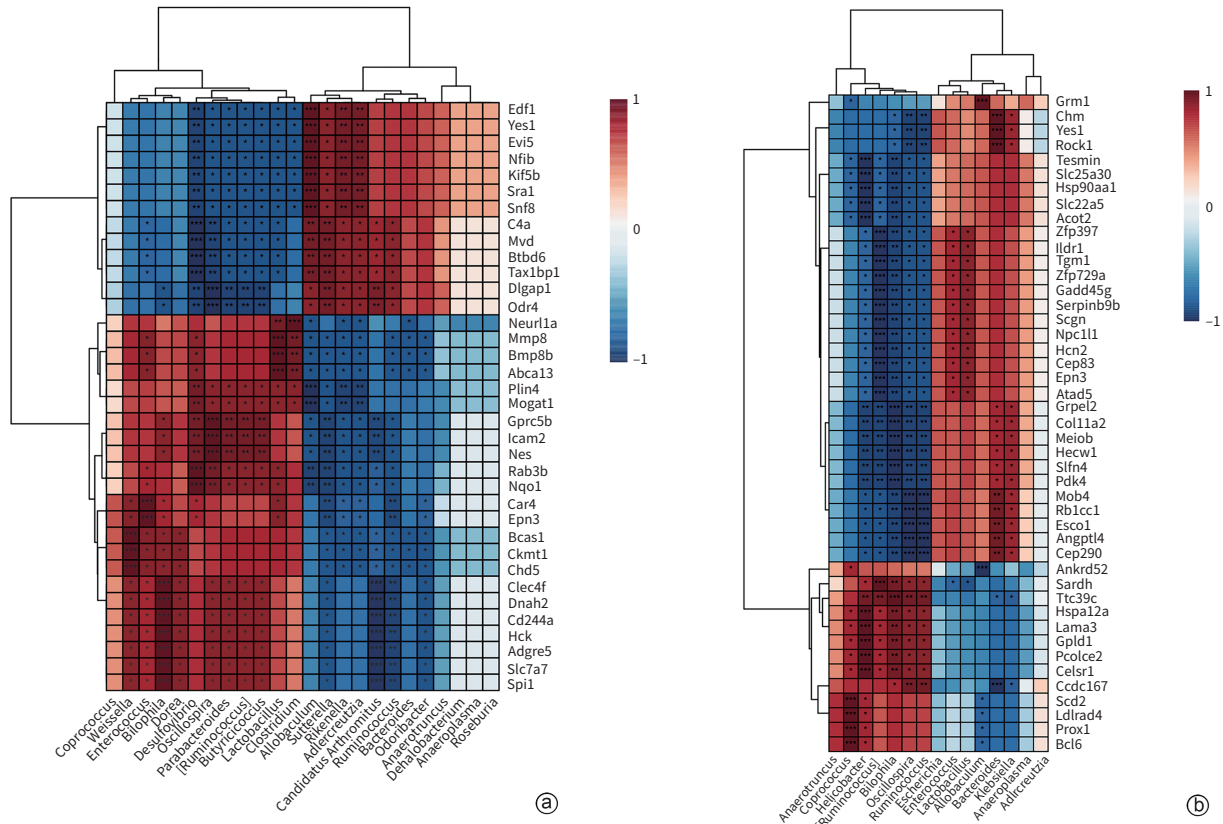
Figure 6 Analysis of differences in mRNA expression levels in mice

用有关。

肠道菌群分析结果显示,MAFLD小鼠的肠道微生物生态失衡,表现为厚壁菌门/拟杆菌门比例升高,这一发现与临床MAFLD患者的菌群特征高度吻合<sup>[19]</sup>。深入分析发现,在科水平上,MAFLD小鼠肠道中具有抗炎作用的S24-7菌科和丹毒丝菌科显著减少,而可能与炎症反应相关的乳杆菌科菌群增加。DAPA干预后能够显著改善某些菌群失衡,特别是恢复S24-7菌科的丰度,这一菌科被认为与肠道屏障功能维护密切相关<sup>[20]</sup>。肠道菌群失衡可通过破坏肠黏膜屏障,导致内毒素易位,激活肝脏Kupffer细胞,进而引发肝脏炎症和胰岛素抵抗<sup>[21]</sup>。DAPA可能通过调节肠道菌群结构,减少内毒素入血,从而减轻肝脏炎症反应。此外,肠道菌群代谢产生的短链脂肪酸也被认为是连接肠道和肝脏代谢的重要媒介,DAPA可能通过增加产短链脂肪酸菌群的丰度,激活肝脏PPAR(过氧化物酶体增殖物激活受体) $\gamma$ 信号通路,进而改善肝脂质代谢<sup>[22]</sup>。

DAPA改善MAFLD小鼠的机制主要与类固醇激素生物合成、胆汁分泌、炎性介质调节TRP通道和脂肪酸

延伸等关键代谢通路有关。其中,Angptl4作为脂蛋白脂肪酶的抑制因子,通过抑制外周组织脂蛋白脂肪酶活性和减少肝脏对循环游离脂肪酸的摄取来减轻肝脂质堆积<sup>[23]</sup>。同时,本研究发现,Angptl4的表达水平与肠道中的*Ruminococcus*和*Oscillospira*丰度呈显著负相关( $P<0.05$ ),这一现象可能反映了机体在MAFLD状态下为维持代谢稳态而产生的代偿性调节机制<sup>[24]</sup>。Acot2通过水解长链脂酰-CoA生成游离脂肪酸和CoA,这一过程不仅能够减少脂毒性中间产物的积累,还可能通过调节PPAR $\alpha$ 信号通路影响线粒体 $\beta$ 氧化过程<sup>[25]</sup>。研究发现,在MAFLD病理过程中,Acot2表达异常会导致肝细胞内脂酰-CoA堆积,进而诱发内质网应激和线粒体功能障碍<sup>[26]</sup>。对Acot2的调控作用提示,DAPA可能通过重塑脂肪酸代谢网络,减轻脂毒性对肝细胞的损伤。在肠道胆固醇代谢方面,DAPA可显著下调Npc111的表达<sup>[27]</sup>。Npc111作为肠道胆固醇吸收的关键转运蛋白,其表达抑制可以减少肠道胆固醇吸收,降低肝脏胆固醇负荷。Npc111的表达与*Ruminococcus*丰度呈显著负相关( $P<0.05$ ),提示DAPA可能通过改变这类产短链脂肪酸菌的



注:a,MAFLD组 vs Control组;b,DAPA组 vs MAFLD组;★P<0.05;★★P<0.01;★★★P<0.001。

图7 小鼠肠道差异菌群与肝脏转录因子表达关联性分析

Figure 7 Correlation analysis of intestinal differential microbiota and liver transcription factor expression in mice

丰度来调节胆固醇代谢<sup>[28]</sup>。在肝脂质代谢方面,DAPA治疗显著抑制了Scd2的表达。Scd2是单不饱和脂肪酸合成的限速酶,其下调可以减少油酸等单不饱和脂肪酸的合成,改善肝脏胰岛素敏感性<sup>[29-30]</sup>。

综上所述,本研究发现,DAPA可能通过多靶点、多通路协同作用改善2型糖尿病合并MAFLD的病理进程。在肠道层面,DAPA通过重塑肠道菌群结构,维护肠道屏障功能,减少内毒素易位;在肝脏层面,DAPA通过调控胆汁酸代谢、脂肪酸延伸和炎症反应等关键通路,改善肝脂质代谢和胰岛素敏感性。这些发现为理解SGLT-2i的肠肝轴保护机制提供了新的依据,也为开发基于“微生物群-宿主代谢”互作网络的MAFLD治疗策略提供了重要线索。

**伦理学声明:** 本研究方案于2024年8月18日经福建医科大学实验动物伦理委员会审批,批号:IACUCFJMU 2024-Y-2092,符合实验动物管理与使用准则。

**利益冲突声明:** 本文不存在任何利益冲突。

**作者贡献声明:** 郑彩云负责设计课题和论文框架,起草论文;郑彩云和俞丽丽负责实验操作,研究过程的实施;

俞丽丽和田晓旭负责数据收集,统计学分析;郑彩云和戴亨纷负责论文修改和绘制图表;戴亨纷负责拟定写作思路,指导撰写文章并最后定稿。

#### 参考文献:

- [1] YOUNOSSI ZM, LOOMBA R, RINELLA ME, et al. Current and future therapeutic regimens for nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Hepatology*, 2018, 68(1): 361-371. DOI: 10.1002/hep.29724.
- [2] YOUNOSSI Z, TACKE F, ARRESE M, et al. Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Hepatology*, 2019, 69(6): 2672-2682. DOI: 10.1002/hep.30251.
- [3] YABIKU K, MUTOH A, MIYAGI K, et al. Effects of oral antidiabetic drugs on changes in the liver-to-spleen ratio on computed tomography and inflammatory biomarkers in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Clin Ther*, 2017, 39(3): 558-566. DOI: 10.1016/j.clinthera.2017.01.015.
- [4] DONG YJ, LV QG, LI SY, et al. Efficacy and safety of glucagon-like peptide-1 receptor agonists in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2017, 41(3): 284-295. DOI: 10.1016/j.clinre.2016.11.009.
- [5] NEWSOME PN, BUCHHOLTZ K, CUSI K, et al. A placebo-controlled trial of subcutaneous semaglutide in nonalcoholic steatohepatitis[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(12): 1113-1124. DOI: 10.1056/NEJ-Moa2028395.
- [6] RAJ H, DURGIA H, PALUI R, et al. SGLT-2 inhibitors in non-alcoholic fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic re-

- view[J]. World J Diabetes, 2019, 10(2): 114-132. DOI: 10.4239/wjdv10.i2.114.
- [7] FERRANNINI E, RAMOS SJ, SALSALI A, et al. Dapagliflozin monotherapy in type 2 diabetic patients with inadequate glycemic control by diet and exercise: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. Diabetes Care, 2010, 33(10): 2217-2224. DOI: 10.2337/dc10-0612.
- [8] DHILLON S. Dapagliflozin: A review in type 2 diabetes[J]. Drugs, 2019, 79(10): 1135-1146. DOI: 10.1007/s40265-019-01148-3.
- [9] BAYS HE, SARTIPY P, XU J, et al. Dapagliflozin in patients with type II diabetes mellitus, with and without elevated triglyceride and reduced high-density lipoprotein cholesterol levels[J]. J Clin Lipidol, 2017, 11(2): 450-458. e1. DOI: 10.1016/j.jacl.2017.01.018.
- [10] SUJK DLS, VAN BAAR MJB, VAN BOMMEL EJM, et al. SGLT2 inhibition and uric acid excretion in patients with type 2 diabetes and normal kidney function[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2022, 17(5): 663-671. DOI: 10.2215/CJN.11480821.
- [11] JAIKUMKAO K, PONGCHAIDECHA A, CHUEAKULA N, et al. Dapagliflozin, a sodium-glucose co-transporter-2 inhibitor, slows the progression of renal complications through the suppression of renal inflammation, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in prediabetic rats[J]. Diabetes Obes Metab, 2018, 20(11): 2617-2626. DOI: 10.1111/dom.13441.
- [12] WIVIOTT SD, RAZ I, BONACA MP, et al. Dapagliflozin and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes[J]. N Engl J Med, 2019, 380(4): 347-357. DOI: 10.1056/NEJMoa1812389.
- [13] LIEPINS E, KUKA J, SVALBE B, et al. Effects of long-term mildronate treatment on cardiac and liver functions in rats[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2009, 105(6): 387-394. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2009.00461.x.
- [14] HMELNICKIS J, PUGOVICS O, KAZOKA H, et al. Application of hydrophilic interaction chromatography for simultaneous separation of six impurities of mildronate substance[J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48(3): 649-656. DOI: 10.1016/j.jpba.2008.06.011.
- [15] DE NICOLA L, GABBAI FB, GAROFALO C, et al. Nephroprotection by SGLT2 inhibition: Back to the future? [J]. J Clin Med, 2020, 9(7): 2243. DOI:10.3390/jcm9072243.
- [16] XU L, NAGATA N, NAGASHIMADA M, et al. SGLT2 inhibition by empagliflozin promotes fat utilization and browning and attenuates inflammation and insulin resistance by polarizing M2 macrophages in diet-induced obese mice[J]. EBioMedicine, 2017, 20: 137-149. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.05.028.
- [17] KUSMINSKI CM, MCTERNAN PG, SCHRAW T, et al. Adiponectin complexes in human cerebrospinal fluid: Distinct complex distribution from serum[J]. Diabetologia, 2007, 50(3): 634-642. DOI: 10.1007/s00125-006-0577-9.
- [18] TAHARA A, TAKASU T. Therapeutic effects of SGLT2 inhibitor ipragliflozin and metformin on NASH in type 2 diabetic mice[J]. Endocr Res, 2020, 45(2): 147-161. DOI: 10.1080/07435800.2020.1713802.
- [19] WANG JX, RAHIMNEJAD S, ZHANG YY, et al. Mildronate triggers growth suppression and lipid accumulation in largemouth bass (*Micropogonias undulatus*) through disturbing lipid metabolism[J]. Fish Physiol Biochem, 2022, 48(1): 145-159. DOI: 10.1007/s10695-021-01040-6.
- [20] BOURSIER J, MUELLER O, BARRET M, et al. The severity of non-alcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota[J]. Hepatology, 2016, 63(3): 764-775. DOI: 10.1002/hep.28356.
- [21] LIU RX, HONG J, XU XQ, et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention[J]. Nat Med, 2017, 23(7): 859-868. DOI: 10.1038/nm.4358.
- [22] HSU CL, SCHNABL B. The gut-liver axis and gut microbiota in health and liver disease[J]. Nat Rev Microbiol, 2023, 21(11): 719-733. DOI: 10.1038/s41579-023-00904-3.
- [23] CANFORA EE, JOCKEN JW, BLAAK EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity[J]. Nat Rev Endocrinol, 2015, 11(10): 577-591. DOI: 10.1038/nrendo.2015.128.
- [24] SYLVERS-DAVIE KL, DAVIES BSJ. Regulation of lipoprotein metabolism by ANGPTL3, ANGPTL4, and ANGPTL8[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2021, 321(4): E493-E508. DOI: 10.1152/ajpendo.00195.2021.
- [25] WANG BH, JIANG XY, CAO M, et al. Altered fecal microbiota correlates with liver biochemistry in nonobese patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. Sci Rep, 2016, 6: 32002. DOI: 10.1038/srep32002.
- [26] HUNT MC, TILLANDER V, ALEXSON SEH. Regulation of peroxisomal lipid metabolism: The role of acyl-CoA and coenzyme A metabolizing enzymes[J]. Biochimie, 2014, 98: 45-55. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.12.018.
- [27] MA S, SHI S, XU BH, et al. Host serine protease ACOT2 assists DENV proliferation by hydrolyzing viral polyproteins[J]. mSystems, 2024, 9(1): e00973-23. DOI: 10.1128/msystems.00973-23.
- [28] ALTMANN SW, DAVIS HR Jr, ZHU LJ, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption[J]. Science, 2004, 303(5661): 1201-1204. DOI: 10.1126/science.1093131.
- [29] SHEN F, ZHENG RD, SUN XQ, et al. Gut microbiota dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2017, 16(4): 375-381. DOI: 10.1016/S1499-3872(17)60019-5.
- [30] GUTIÉRREZ-JUÁREZ R, POCAI A, MULAS C, et al. Critical role of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) in the onset of diet-induced hepatic insulin resistance[J]. J Clin Invest, 2006, 116(6): 1686-1695. DOI: 10.1172/JCI26991.

收稿日期: 2025-06-16; 录用日期: 2025-09-05

本文编辑: 王莹

引证本文: ZHENG CY, YU LL, TIAN XX, et al. Effect and mechanism of dapagliflozin on gut microbiota in a mouse model of metabolic associated fatty liver disease[J]. J Clin Hepatol, 2025, 41(11): 2300-2309.

郑彩云, 俞丽丽, 田晓旭, 等. 达格列净对代谢相关脂肪性肝病小鼠模型肠道菌群的影响及其机制分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2025, 41(11): 2300-2309.