

## Fexaramine 通过激动肠道 FXR 改善小鼠非酒精性脂肪性肝病的研究

黄璐瑶<sup>1,2</sup>, 薛琼雯<sup>1,2</sup>, 罗亦轩<sup>1,2</sup>, 王紫轩<sup>1,2</sup>, 蒋嘉瑞<sup>1,2</sup>, 徐书杨<sup>1,2</sup>, 杨莉<sup>1,2</sup>,  
王峥涛<sup>1,2</sup>, 丁丽丽<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室暨国家中医药管理局中药新资源与质量评价重点实验室, 上海 201203; 2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203)

**摘要:** 非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 被认为是代谢综合征的表现, 目前已成为危害全球生命健康的慢性疾病之一, 临床上尚缺乏有效治疗药物。法尼醇 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 是近几年 NAFLD 研究的一个热门靶点, fexaramine (Fex) 是 FXR 强效选择性激动剂, 其改善 NAFLD 的作用机制尚不明确。因此, 本研究采用高脂高胆固醇饮食构建 NAFLD 小鼠模型, 使用 Fex 口服干预 6 周, 评价 Fex 对 NAFLD 小鼠糖脂代谢紊乱的改善作用, 并初步探讨其潜在的作用机制。动物实验获得上海中医药大学动物伦理委员会的批准 (批准号: PZSHUTCM210913011)。本实验研究发现, 100 mg·kg<sup>-1</sup> Fex 显著抑制 NAFLD 小鼠体重增长, 缓解胰岛素抵抗, 改善肝脏损伤和脂质累积。进一步检测 Fex 对 NAFLD 小鼠肝肠 FXR 相关靶基因影响, 并分析血清、肝脏胆汁酸谱和肝脏脂代谢相关基因变化。实验发现 Fex 激动肠道 FXR, 促进成纤维生长因子 15 (fibroblast growth factor 15, FGF15) 分泌, 抑制肝脏胆汁酸合成限速酶胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶 (cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1, CYP7A1) 的表达, 负反馈调节胆汁酸合成, 改善胆汁酸代谢紊乱; 同时, Fex 降低肝脏脂质合成和吸收、增加脂肪酸氧化, 从而改善肝脏脂代谢。本研究表明, Fex 通过激动肠道 FXR-FGF15 信号通路, 调节肝脏脂代谢, 发挥改善 NAFLD 的作用。

**关键词:** fexaramine; 非酒精性脂肪性肝病; 法尼醇 X 受体; 胆汁酸; 脂质代谢

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)11-3330-09

## Fexaramine improves non-alcoholic fatty liver disease in mice by stimulating intestinal FXR

HUANG Lu-yao<sup>1,2</sup>, XUE Qiong-wen<sup>1,2</sup>, LUO Yi-xuan<sup>1,2</sup>, WANG Zi-xuan<sup>1,2</sup>, JIANG Jia-rui<sup>1,2</sup>,  
XU Shu-yang<sup>1,2</sup>, YANG Li<sup>1,2</sup>, WANG Zheng-tao<sup>1,2</sup>, DING Li-li<sup>1,2\*</sup>

(1. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and the SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai R & D Center for Standardization of Traditional Chinese Medicines, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is considered to be a manifestation of metabolic syndrome and has become one of the chronic diseases that endanger health around the world. There is still a lack of effective therapeutic drugs in clinical practice. Farnesoid X receptor (FXR) has been a popular target for NAFLD research in recent years. Fexaramine (Fex) is a potent and selective agonist of FXR, and its mechanism of action to improve NAFLD is unclear. Therefore, in this study, a mouse model of NAFLD was constructed using a high-fat,

收稿日期: 2023-03-12; 修回日期: 2023-05-04.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82122074, 82274165).

\*通讯作者 Tel: 86-21-51322496, E-mail: nail8219@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0299

high-cholesterol diet and treated with Fex orally for 6 weeks. We evaluated the ameliorative effect of Fex on disorders of glucolipid metabolism in NAFLD mice, and preliminarily explored its potential mechanism of action. The animal experiments were approved by the Animal Ethics Committee of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (approval number: PZSHUTCM210913011). In this study, it was found that 100 mg·kg<sup>-1</sup> Fex significantly inhibited body weight gain, alleviated insulin resistance, improved liver injury and lipid accumulation in NAFLD mice. The effect of Fex on the expression of hepatic intestinal FXR and its target genes in NAFLD mice was further examined. Analysis of serum and hepatic bile acid profiles and expression related to hepatic lipid metabolism. It was found that Fex could stimulate intestinal FXR, promote fibroblast growth factor 15 (FGF15) secretion, inhibit the expression of cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1 (CYP7A1), the rate-limiting enzyme of bile acid synthesis in liver, regulate bile acid synthesis by negative feedback, and improve the disorder of bile acid metabolism. At the same time, Fex reduces liver lipid synthesis and absorption, increases fatty acid oxidation, thus improving liver lipid metabolism. This study shows that Fex can improve NAFLD by activating intestinal FXR-FGF15 signal pathway and regulating liver lipid metabolism.

**Key words:** fexaramine; non-alcoholic fatty liver disease; farnesoid X receptor; bile acid; lipid metabolism

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 也称原发性非酒精性脂肪性肝病, 是指在无酒精摄入的情况下, 由于营养、环境和遗传因素之间相互作用所引起以弥漫性肝细胞大泡性脂肪病变为主要特点的临床病理综合征<sup>[1-4]</sup>。NAFLD 通常以肝脏糖异生增加及胰岛素抵抗导致的肝脏脂质过度沉积为基础<sup>[5]</sup>, 从最初简单的肝脂肪变性发展为非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 若继续恶化还可能发展成肝硬化和肝细胞癌<sup>[6]</sup>。随着肥胖、胰岛素抵抗及代谢综合征患病人口的增加, 自 20 世纪 80 年代以来, NAFLD 患病率较以往升高约 20 倍<sup>[7]</sup>, 目前已成为全世界主要公共卫生问题之一。NAFLD 的治疗方法主要包括 3 个方面, 生活方式干预、药物治疗和减肥手术, 如胰岛素增敏剂、降脂药物, 以及减肥手术、肝脏移植等, 可以在一定程度上改善 NAFLD<sup>[8]</sup>。然而, 由于 NAFLD 诊断困难以及发病机制复杂, 目前暂时没有被批准的治疗药物。因此寻找 NAFLD 治疗的新靶点, 有助于临床药物的研发。

研究表明, 肠道微生物群、胆汁酸 (bile acids, BAs)、核受体法尼醇 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 和肝脏 X 受体等均与 NAFLD 的发生发展有关<sup>[9]</sup>。FXR 作为胆汁酸代谢的关键调节因子, 在调节脂质和葡萄糖代谢以及改善炎症反应中发挥着至关重要的作用<sup>[10,11]</sup>。FXR 在肝脏和回肠中高度表达<sup>[12]</sup>, 其作为转录因子启动多种下游靶基因表达, 对胆汁酸的合成进行负反馈调节。肝脏 FXR 的激活负反馈调节肝脏胆汁酸合成限速酶胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶 (cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1, CYP7A1) 的表达, 抑制胆汁酸的合成; 肠道 FXR 激活, 促进成纤维细胞生长因子 15/19 (fibroblast growth factor 15/19,

FGF15/FGF19) 分泌, 通过肠肝循环进入肝脏中, 调控胆汁酸及糖脂代谢<sup>[13]</sup>。2016 年, 美国食品药品监督管理局批准奥贝胆酸 (obeticholic acid, OCA) 用于原发性胆汁性肝硬化的二线治疗, 加速了 FXR 激动剂的开发和临床应用。作为一种典型的甾体 FXR 激动剂和合成修饰的胆汁酸, OCA 也被开发用于治疗其他肝脏疾病, 包括 NASH<sup>[14]</sup> 和原发性硬化性胆管炎<sup>[15]</sup>。此外, FXR 激动剂 GSK2324 通过激活 FXR 减少脂质吸收和选择性减少脂肪酸合成来调控肝脏脂质代谢<sup>[16]</sup>。然而, 严重的瘙痒症和肝功能衰竭等毒副作用限制了 FXR 激动剂作为治疗药物的批准和广泛使用。设计安全、有效的 FXR 激动剂目前来说仍然是一个挑战。

Fexaramine (Fex) 是一种非胆汁酸合成活化剂, 对 FXR 具有高度的选择性, 而对孕烷 X 受体、组成型雄甾烷受体和维生素 D 受体等没有明显活性<sup>[17]</sup>。研究发现, Fex 激活肠道 FXR 促进白色脂肪组织产热和褐变, 减少肥胖和胰岛素抵抗<sup>[13]</sup>。Fex 作为肠道选择性 FXR 激动剂, 避免全身激动对机体造成的毒副作用, 提高安全性和有效性。本研究评价了 Fex 对高脂高胆固醇 (high-fat and high-cholesterol, HFHC) 饮食诱导 NAFLD 小鼠代谢表的改善作用, 并从靶向肠道和肝脏 FXR 及下游信号通路方面探讨其潜在作用机制, 旨在揭示 Fex 改善 NAFLD 的作用机制, 为 FXR 激动剂开发利用提供实验基础和理论依据。

## 材料与方法

**实验动物** SPF 级 C57BL/6J 野生型雄性小鼠, 6 周龄, 体重 (20 ± 2 g), 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 生产许可 SCXK (沪) 2017-0005。小鼠饲养于上海中医药大学实验动物中心, 使用许可 SYXK

(沪) 2021-0009, 饲养条件为: 温度 20~25 °C, 相对湿度 45%~55%, 12 h 交替照明, 饲料、饮水新鲜无污染, 小鼠自由摄食、饮水。实验方案符合相关政策且通过上海中医药大学动物伦理委员会批准, 批准号: PZSHUTCM210913011。

**药品与试剂** 高脂高胆固醇饲料 (D09100310, 美国 Research Diets Inc); fexaramine (BCP15784, 上海瀚香生物科技有限公司); 生物合成人胰岛素注射液 (丹麦诺和诺德); 蛋白酶抑制剂 (05892791001)、磷酸酶抑制剂 (04906837001) (美国 Roche 公司); 总胆固醇 (total cholesterol, TC) 试剂盒 (A111-1-1)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 试剂盒 (A110-1-1)、谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒 (C009-2-1)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒 (C010-2-1) (南京建成生物工程研究所); 小鼠 FGF15 酶联免疫试剂盒 (CSB-EL522052MO, 武汉华美生物工程技术有限公司); RIPA 蛋白裂解液 (89901)、蛋白 Marker (26616) (美国 Thermo 公司); 细胞核/细胞浆蛋白抽提试剂盒 (20126ES50, 上海翌圣生物科技股份有限公司); 葡萄糖 (MB2510-1, 大连美仑生物技术有限公司);  $\omega$  鼠胆酸 ( $\omega$ MCA)、 $\beta$  鼠胆酸 ( $\beta$ MCA)、 $\alpha$  鼠胆酸 ( $\alpha$ MCA)、牛磺  $\omega$  鼠胆酸 (T $\omega$ MCA)、牛磺  $\beta$  鼠胆酸 (T $\beta$ MCA)、牛磺  $\alpha$  鼠胆酸 (T $\alpha$ MCA)、牛磺熊去氧胆酸 (TUDCA)、牛磺胆酸 (TCA)、牛磺猪去氧胆酸 (THDCA)、牛磺去氧胆酸 (TDCA)、牛磺石胆酸 (TLCA)、牛磺鹅去氧胆酸 (TCDCA)、甘氨酸猪去氧胆酸 (GHDCA)、甘氨酸石胆酸 (GLCA)、甘氨酸鹅去氧胆酸 (GCDCA)、甘氨酸熊去氧胆酸 (GUDCA)、甘氨酸去氧胆酸 (GDCA)、甘氨酸胆酸 (GCA)、胆酸 (CA)、熊去氧胆酸 (UDCA)、鹅去氧胆酸 (CDCA)、去氧胆酸 (DCA)、石胆酸 (LCA)、猪去氧胆酸 (HDCA) (美国 Sigma 公司); FXR 鼠单克隆抗体 (sc-25309, 美国 Santa Cruz 公司); CYP7A1 兔多克隆抗体 (ab65596)、胆固醇 27-羟化酶 (cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1, CYP27A1) 兔单克隆抗体 (ab126785) (英国 Abcam 公司); GAPDH 兔单克隆抗体 (#5174)、 $\beta$ -ACTIN 兔单克隆抗体 (#4970)、LAMIN B1 兔单克隆抗体 (#13435) (美国 Cell Signaling Technology 公司); 辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG (L3012)、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG (L3032) (美国 Signalway Antibody 公司); RNA 提取试剂盒 (EZB-RN001-plus, 美国 EZBioscience 公司); Evo M-MLV 反转录试剂 (AG11706)、SYBR Green 试剂盒 (AG11701) (湖南艾科瑞生物工程有限公司)。

**实验动物分组、造模** C57BL/6J 雄性小鼠 ( $n =$

24) 适应性饲养 1 周后, 随机挑选出正常对照组 (CHOW,  $n = 8$ ), 喂食普通饲料; 剩余小鼠喂养 HFHC 饲料 (40% 脂肪、20% 果糖和 2% 胆固醇)。HFHC 饮食造模 12 周后, 将小鼠分为 NAFLD 模型组 (HFHC,  $n = 8$ )、Fex 组 (HFHC + Fex,  $n = 8$ )。将化合物 Fex ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 加入已粉碎的 HFHC 饲料中, 重新混匀塑形, 于紫外灯下消毒灭菌, 制成给药组小鼠的饲料。之后继续按照各组别对应的饲料喂食 6 周, 每周记录各组小鼠的体重、摄食量。

**葡萄糖耐量实验** 将各组小鼠空腹 12 h, 按照每只小鼠  $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量进行腹腔注射葡萄糖, 并于 0、15、30、60 和 120 min 时间点尾尖取血测定血糖值。

**胰岛素耐受实验** 将各组小鼠空腹 5 h, 之后按照每只小鼠  $0.75 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量腹腔注射胰岛素, 并于 0、15、30、60 和 120 min 时间点尾尖取血测定血糖值。

**血清生化指标** 使用异氟烷将小鼠麻醉后, 摘眼球取血, 脱颈处死后收集全血。全血于室温静置 2 h,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取上层血清, 按照试剂盒说明书, 测定小鼠血清中 TG、TC、ALT 和 AST 含量。

**肝脏病理学染色** 切取相同部位的肝大叶组织, 于通用型组织固定液中固定, 常规石蜡包埋后切片, 置于载玻片上, 脱蜡后, 按照说明书进行苏木精-伊红染色和油红 O 染色, 显微镜下观察肝脏组织的形态变化。

**胆汁酸检测** 取小鼠血清  $50 \mu\text{L}$  (肝脏  $50 \text{ mg}$ ), 加入  $300 \mu\text{L}$  冰甲醇溶液, 涡旋, 充分沉淀蛋白,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $15\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取上清, 氮气吹干, 加入 50% 甲醇溶液 (含内标  $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  胆酸  $\text{d}_4$ ) 复溶。利用液相色谱-质谱联用系统 (Shimadzu CBM-30A 高效液相色谱系统, 连接 ABSCIEX QTRAP6500 质谱系统) 进行检测, 色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 柱 ( $2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ ,  $1.8 \mu\text{m}$ ), 流动相 0.01% 甲酸-乙腈。

**实时荧光定量 PCR 实验** 取  $50 \text{ mg}$  肝脏和回肠样品, 加入  $500 \mu\text{L}$  裂解液充分匀浆, 加入氯仿混匀, 离心取上清, 等体积无水乙醇混匀并过吸附柱, 离心;  $500 \mu\text{L}$  Wash Buffer 洗涤, 离心后将吸附柱转移至灭菌离心管, 加入洗脱液, 得到 RNA。之后 RNA 浓度进行测定并逆转录。使用 QuantStudio 6 Flex 实时荧光定量 PCR 仪进行扩增反应, 根据仪器所测得的  $C_t$  值, 以 *Gapdh* 为内参基因, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算目标基因的相对表达量, 引物序列信息见表 1。

**蛋白免疫印迹检测** 小鼠肝组织加入 RIPA 溶液裂解后, 提取总蛋白 (核蛋白按照试剂盒说明书提取), BCA 法测定蛋白浓度并定量, 蛋白以 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 恒流转膜, 5% BSA 封闭。加入相应抗体 ( $1:1\ 000$  稀释), 于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  摇床孵育过夜, TBST 洗涤 3 次;

**Table 1** The primer sequences of real-time quantitative PCR. *Gapdh*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Fxr*: Farnesoid X receptor; *Fgf15*: Fibroblast growth factor 15; *Asbt*: Apical sodium-dependent bile acid transporter; *Osta*: Organic solute transporter  $\alpha$ ; *Ostf*: Organic solute transporter  $\beta$ ; *Ibap*: Intestinal bile acid-binding protein; *Cyp7a1*: Cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1; *Cyp8b1*: Cytochrome P450 family 8 subfamily B member 1; *Cyp27a1*: Cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1; *Fgfr4*: Fibroblast growth factor receptor 4; *Shp*: Small heterodimer partner; *Srebp1*: Sterol regulatory element binding transcription factor 1; *Acc*: Acetyl-CoA carboxylase; *Fasn*: Fatty acid synthase; *Mogat1*: Monoacylglycerol O-acyltransferase 1; *Pparg*: Peroxisome proliferator activated receptor gamma; *Scd1*: Stearoyl coenzyme A desaturase 1; *Fads1*: Fatty acid desaturase 1; *Cpt1*: Carnitine palmitoyl transferase 1; *Acox1*: Peroxidase acyl coenzyme A oxidase 1; *Ppara*: Peroxisome proliferator activated receptor alpha; *Mcad*: Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase; *Acs11*: Acyl-CoA synthetase long chain family member 1; *Pgc1a*: Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 alpha; *Pgc1b*: Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 beta; *Cd36*: Cluster of differentiation 3; *Fabp1*: Fatty acid binding protein 1; *Fatp5*: Fatty acid transport protein 5; *Fatp2*: Fatty acid transport protein 2; *Apob*: Apolipoprotein B; *Mttp*: Microsomal triglyceride transfer protein; *ApoE*: Apolipoprotein E

Primer	Sequence (5'-3')	Primer	Sequence (5'-3')
<i>Gapdh</i> -F	AGGTCGGTGTGAACGGATTG	<i>Pparg</i> -R	GAGAGGTCCACAGAGCTGATT
<i>Gapdh</i> -R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	<i>Scd1</i> -F	TTCTTGCATACTCTGGTGC
<i>Fxr</i> -F	CTGGCATCTATGAACTCAGGC	<i>Scd1</i> -R	CGGGATTGAATGTTCTTGTCGT
<i>Fxr</i> -R	CCATTCGCGGCTTCTTTGT	<i>Fads1</i> -F	AGCACATGCCATAACAACCATC
<i>Fgf15</i> -F	ATGGCGAGAAAGTGAACGG	<i>Fads1</i> -R	TTCCGCTGAACCACAAAATAGA
<i>Fgf15</i> -R	CTGACACAGACTGGGATTGCT	<i>Cpt1</i> -F	CTCCGCTGAGCCATGAAG
<i>Asbt</i> -F	GTCTGTCCCCAAATGCAACT	<i>Cpt1</i> -R	CACCAGTGATGATGCCATTCT
<i>Asbt</i> -R	CACCCATAGAAAACATCACCA	<i>Acox1</i> -F	TCCAGACTTCCAACATGAGGA
<i>Osta</i> -F	AGATGCGGCTCCTTGAATTA	<i>Acox1</i> -R	CTGGGCGTAGGTGCCAATTA
<i>Osta</i> -R	TGGCTGCTTCTTCGATTCTG	<i>Ppara</i> -F	AGAGCCCCATCTGTCTCTCTC
<i>Ostf</i> -F	CTTCCAGGAGACGTGATTGAAA	<i>Ppara</i> -R	ACTGGTAGTCTGCAAAAACAAA
<i>Ostf</i> -R	CCTCCGAAGTCTGGTGATAGTTG	<i>Mcad</i> -F	AGGGTTAGTTTTGAGTTGACGG
<i>Ibap</i> -F	CTTCCAGGAGACGTGATTGAAA	<i>Mcad</i> -R	CCCCGCTTTTGTATATCCG
<i>Ibap</i> -R	CCTCCGAAGTCTGGTGATAGTTG	<i>Acs11</i> -F	TGCCAGACTGATTGACATTC
<i>Cyp7a1</i> -F	GCTGTGGTAGTGAGCTGTTG	<i>Acs11</i> -R	GGCATAACCAGAAAGTGGTGAG
<i>Cyp7a1</i> -R	GTTGTCCAAAGGAGGTTACC	<i>Pgc1a</i> -F	AAGTGTGGAAGTCTCTGGAAGT
<i>Cyp8b1</i> -F	CACGGGGATGTCTTCACGG	<i>Pgc1a</i> -R	GGGTATCTTGGTTGGCTTTATG
<i>Cyp8b1</i> -R	TGAGCACCAGTCTTTTGCATAG	<i>Pgc1b</i> -F	TCCTGTAAAAGCCCGGAGTAT
<i>Cyp27a1</i> -F	CCAGGCACAGGAGAGTACG	<i>Pgc1b</i> -R	GCTCTGGTAGGGGACAGTGA
<i>Cyp27a1</i> -R	GGGCAAGTGCAGCACATAG	<i>Cd36</i> -F	ATGGGCTGTGATCGGAACTG
<i>Fgfr4</i> -F	GCTCGGAGGTAGAGGTCTTGT	<i>Cd36</i> -R	GTCTTCCCAATAAGCATGTCTCC
<i>Fgfr4</i> -R	CCACGCTGACTGGTAGGAA	<i>Fabp1</i> -F	TGAAGGCAATAGGTCTGCC
<i>Shp</i> -F	TGGGTCCCAAGGAGTATGC	<i>Fabp1</i> -R	GTCATGGTCTCCAGTTCCGA
<i>Shp</i> -R	GCTCCAAGACTTCACACAGTG	<i>Fatp5</i> -F	TTCGAAAGAACCAACCCTTCT
<i>Srebp1</i> -F	TGGGTCCCAAGGAGTATGC	<i>Fatp5</i> -R	GCGTCGTACATTCGCAACAA
<i>Srebp1</i> -R	GCTCCAAGACTTCACACAGTG	<i>Fatp2</i> -F	TCCTCCAAGATGTGCGGTACT
<i>Acc</i> -F	TCTGACTCAGTGATTCTTCGCA	<i>Fatp2</i> -R	TAGGTGAGCGTCTCGTCTCG
<i>Acc</i> -R	CCCATAAACATCAGCCAGTTGT	<i>Apob</i> -F	AAGCACCTCCGAAAGTACGTG
<i>Fasn</i> -F	CAAACCTCAGAAGGACCAACA	<i>Apob</i> -R	CTCCAGCTCTACCTTACAGTTGA
<i>Fasn</i> -R	GTAGGAGGATTATCCCGTTGTG	<i>Mttp</i> -F	TCTCACAGTACCCGTTCTT
<i>Mogat1</i> -F	TGACCCGGCTATTCCGTGA	<i>Mttp</i> -R	TCTTCTCCGAGAGACATATCC
<i>Mogat1</i> -R	CTGGGCTGAGCAATACAGTTC	<i>ApoE</i> -F	CTGACAGGATGCCTAGCCG
<i>Pparg</i> -F	TCGCTGATGCACTGCCTATG	<i>ApoE</i> -R	CGCAGGTAATCCCAAGAGC

加入辣根过氧化物酶偶联的二抗 (1:5 000 稀释) 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 最后加入 ECL 发光试剂进行显影。使用 ImageJ 软件对蛋白条带图像灰度分析, 以目标蛋白与内参蛋白的比值进行相对定量分析。

**小鼠 FGF15 酶联免疫检测** 按照酶联免疫试剂盒说明书进行操作, 配制标准曲线, 依此向孔中加入 100  $\mu$ L 标准品溶液和待测样本溶液, 孵育 2 h 后, 弃去液体并加入 100  $\mu$ L 生物素标记抗体工作液, 加入辣根

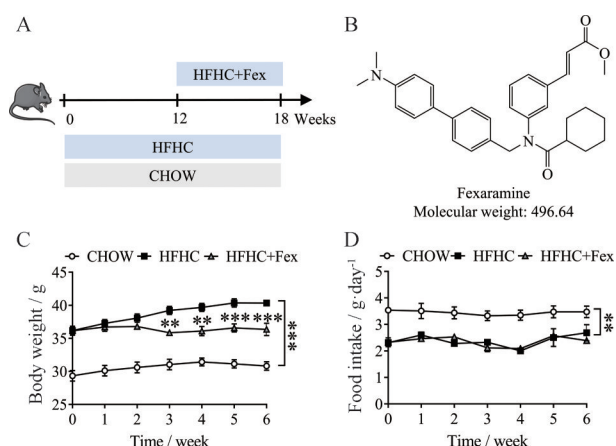
过氧化物酶标记亲和素工作液孵育 1 h, 最后加入显色液, 于酶标仪 450 nm 波长检测吸光度值, 计算 FGF15 含量。

**统计学处理** 使用 GraphPad Prism 8.4.3 软件进行统计学处理, 实验结果均以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用方差分析 (one way ANOVA),  $P < 0.05$  认为具有统计学意义。\* $P < 0.05$  为显著, \*\* $P < 0.01$  为非常显著, \*\*\* $P < 0.001$  为极其显著。

## 结果

### 1 Fexaramine对NAFLD小鼠体重和摄食量的影响

如图1A, HFHC饮食诱导小鼠12周, Fex (图1B) 干预6周。每周检测各组小鼠体重, 图1C显示, HFHC组小鼠体重持续增加, Fex处理3周后, 小鼠体重显著下降并持续至第6周, 与HFHC组具有显著性差异。并且相较于HFHC组小鼠, Fex组小鼠的摄食量并未因药物加入产生差异(图1D), 说明在不影响摄食量的情况下, Fex可以抑制NAFLD小鼠的体重增长。



**Figure 1** Effects of fexaramine (Fex) on body weight and food intake in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) mice. A: Experimental diagram; B: Chemical structure; C: Body weight; D: Food intake.  $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs HFHC. HFHC: High-fat and high-cholesterol

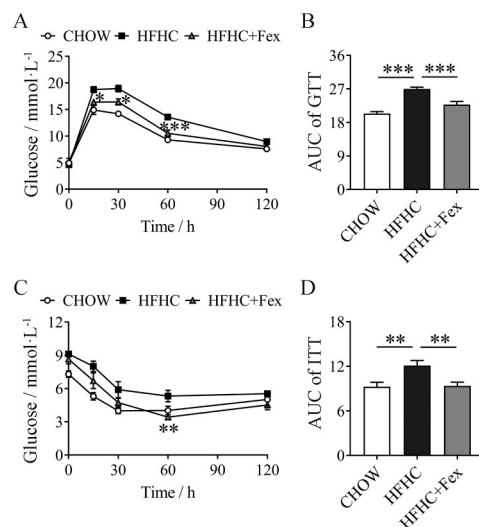
### 2 Fexaramine对NAFLD小鼠葡萄糖代谢的影响

通过血糖稳态的研究发现, 当腹腔注射葡萄糖溶液后, 相较于CHOW组, HFHC组小鼠的血糖在30 min内显著上升, 并在之后的时间内缓慢降低(图2A)。根据葡萄糖耐量(glucose tolerance test, GTT)的曲线下面积, 结果表明给予Fex干预能够显著改善NAFLD小鼠的葡萄糖耐量(图2B)。

当腹腔注射胰岛素溶液后, 与CHOW组相比, HFHC组小鼠血糖下降缓慢, 给予Fex干预60 min后, 血糖降低明显(图2C)。根据胰岛素耐受(insulin tolerance test, ITT)的曲线下面积, 结果表明Fex可明显改善NAFLD小鼠的胰岛素抵抗(图2D)。综上所述, Fex能够调节NAFLD小鼠的糖代谢。

### 3 Fexaramine对NAFLD小鼠血清生化指标和肝脏病理学的影响

实验结果如图3A~D所示, 与HFHC组相比, Fex能够显著降低血清TC、TG、ALT、AST的含量, 改善NAFLD小鼠肝脏损伤。此外, 图3E显示, Fex能够显著降低NAFLD小鼠的肝重与体重比值。肝脏HE染



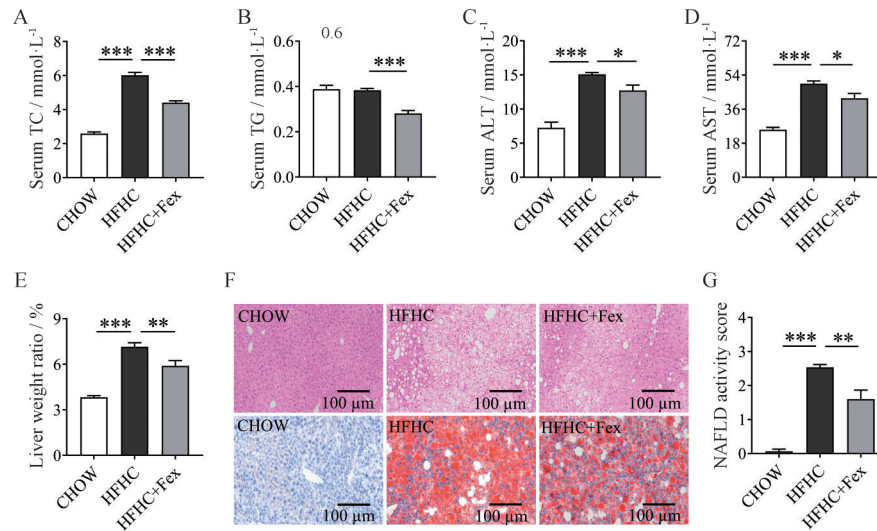
**Figure 2** Effects of Fex on glucose metabolism in NAFLD mice. A: Glucose tolerance test (GTT); B: Area under the curve of GTT; C: Insulin tolerance test (ITT); D: Area under the curve of ITT.  $n = 6-8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs HFHC

色表明, Fex减少NAFLD小鼠肝脏脂肪空泡大小, 改善脂肪肝气球样病变; 油红染色结果表明, 与HFHC组对比, 给予Fex后肝脏脂滴减小(图3F)。图3G病理切片评分进一步分析表明Fex显著减少NAFLD小鼠肝脏脂质堆积, 改善肝脂肪变性。

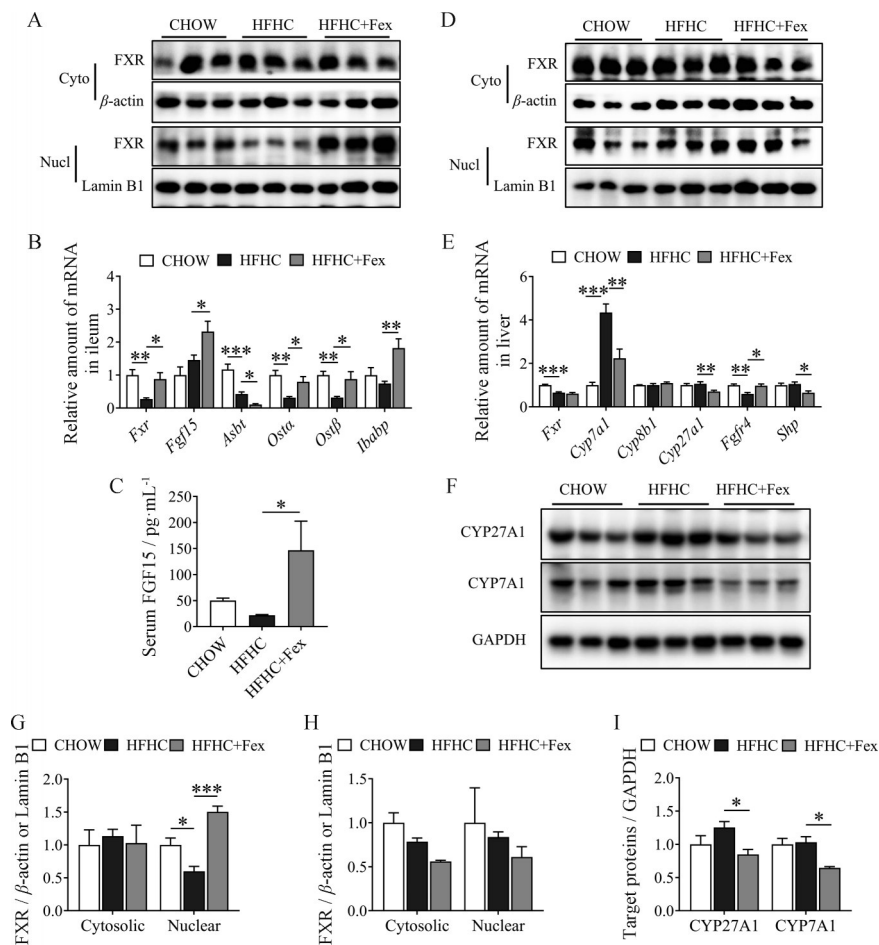
### 4 Fexaramine对NAFLD小鼠肝脏和肠道FXR相关靶基因表达的影响

根据文献报道, Fex通过激动肠道FXR促进脂肪组织褐变, 从而改善肥胖和胰岛素抵抗<sup>[13]</sup>。本研究通过检测回肠FXR蛋白水平, 发现Fex促进FXR入核, 增加其核内表达(图4A、G)。进一步检测回肠FXR靶基因, 发现Fex显著增加*Fxr*、*Fgf15*、*Osta*、*Ostf*、*Ibapb*基因的表达(图4B), 促进胆汁酸转运; 降低顶端钠依赖性胆汁酸转运蛋白(apical sodium-dependent bile acid transporter, ASBT)的表达, 抑制胆汁酸重吸收。同时, 图4C显示Fex增加了血清中FGF15的含量。

在肝脏组织中, 与HFHC组相比, Fex干预对肝脏FXR蛋白表达没有显著影响(图4D、H)。FXR通过调控酶的转录活性, 调节胆汁酸合成, 图4E、F、I显示, Fex能够显著降低肝脏胆汁酸合成限速酶CYP7A1、CYP27A1的基因和蛋白表达。回肠肠细胞分泌的FGF15与肝细胞表面成纤维细胞生长因子受体4(fibroblast growth factor receptor 4, FGFR4)特异性结合<sup>[18,19]</sup>, 从而发挥代谢调控功能。给予Fex后, FGF15释放增加, 通过血液循环进入肝脏, 结合并增加*Fgfr4*基因表达(图4E)。以上结果说明, Fex对肝脏FXR没有调控作用, 而是选择性激动肠道FXR, 促进FGF15



**Figure 3** Effect of Fex on hepatic lipid accumulation in NAFLD mice. A: Serum level of total cholesterol (TC); B: Serum level of triglyceride (TG); C: Serum level of alanine aminotransferase (ALT); D: Serum level of aspartate aminotransferase (AST); E: Liver and body weight ratio; F: Representative images of HE staining and oil red O staining of liver; G: The quantitative results of NAFLD.  $n = 5-8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$



**Figure 4** Effects of Fex on the expression of FXR-related target genes in NAFLD mice. A: Protein levels of FXR in ileum; B: Expression of FXR-related target genes in the ileum; C: The level of FGF15 in serum; D: Protein levels of FXR in liver; E: Expression of FXR-related target genes in the liver; F: Protein levels of bile acid synthase in liver; G: Statistical results of gray value of FXR in ileum; H: Statistical results of gray value of FXR in liver; I: Relative expression of CYP7A1/CYP27A1 protein.  $n = 5-8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

释放, 随后下调肝脏胆汁酸合成相关酶的表达, 负反馈抑制胆汁酸合成。

### 5 Fexaramine 对 NAFLD 小鼠胆汁酸代谢的影响

肠道 FXR 的激活促进 FGF15 释放入血, 通过门静脉循环到肝脏中, 负反馈调节胆汁酸代谢<sup>[20]</sup>。利用 LC-MS 检测胆汁酸变化, 发现与 HFHC 组相比, Fex 能够降低 NAFLD 小鼠血清和肝脏胆汁酸水平 (图 5A、C), 其中胆汁酸 T $\alpha$ MCA、T $\beta$ MCA、TCA、TCDCA、THDCA 的降低最为明显 (图 5B、D)。这表明 Fex 减小 NAFLD 小鼠胆汁酸池, 改变血清和肝脏胆汁酸的含量及组成比例, 减少胆汁酸在体内的过度蓄积。同时, 以上结果间接证实肠道 FXR 被激动而发挥下游的调控功能。

### 6 Fexaramine 对 NAFLD 小鼠肝脏脂代谢的影响

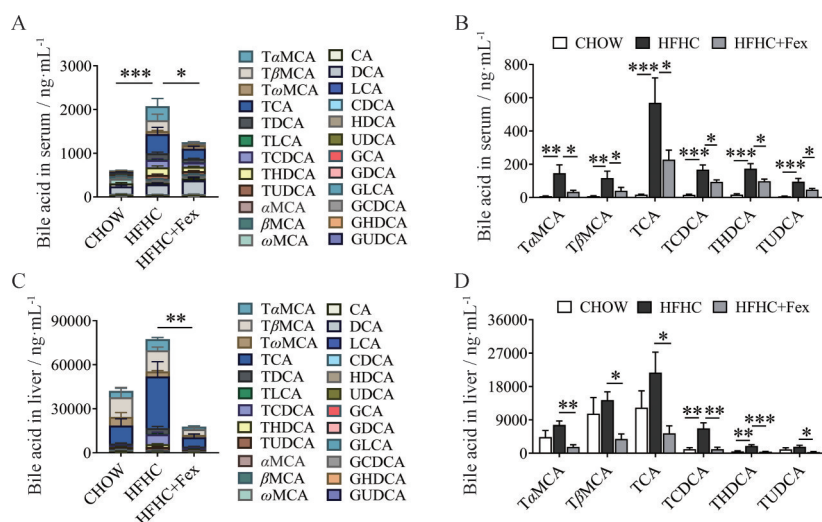
FGF15 进入肝脏后, 不仅可以调节胆汁酸代谢, 还能够调控肝脏的脂质代谢<sup>[21]</sup>。肝脏的脂质代谢通常与脂质的合成、脂肪酸的氧化吸收等相关, 图 6A 显示, 与 HFHC 组相比, Fex 显著降低肝脏脂质合成关键酶 *Srebp1*、*Acc*、*Fans*、*Mogat1*、*Pparg* 以及脂肪酸合成酶 *Scd1*、*Fads1* 基因表达。图 6B 显示 Fex 显著抑制 *Cd36*、*Fabp1* 基因表达, 减少脂肪酸吸收。此外, Fex 显著增加脂肪酸氧化相关基因 *Cpt1*、*Acox1*、*Ppara*、*Mcad*、*Acs11* 和 *Pgc1a* 的表达 (图 6C), 并显著上调 *Apob*、*Mttp*、*Apoe* 基因表达 (图 6D), 促进极低密度脂蛋白的分泌。

以上结果表明, Fex 通过降低肝脏脂质合成、增加脂肪氧化、降低脂肪酸吸收以及促进极低密度脂蛋白分泌, 改善肝脏脂质代谢, 减少脂肪在肝脏的堆积。

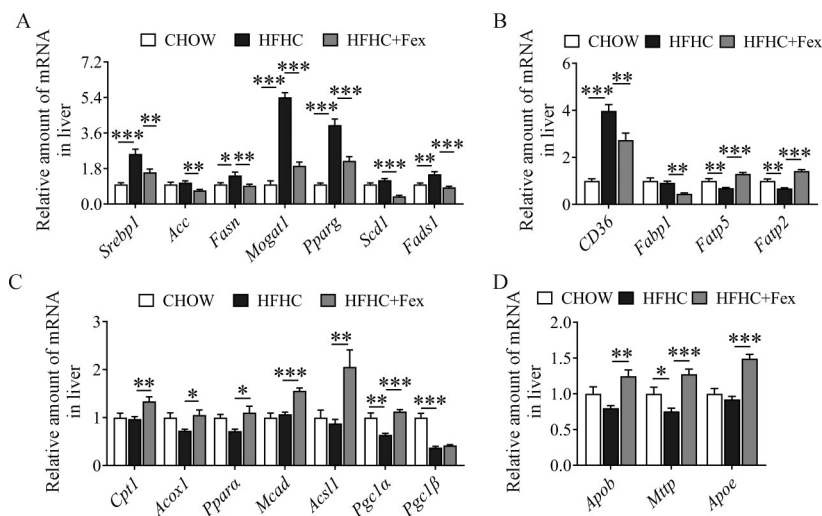
### 讨论

NAFLD 是指体内过多的脂肪以 TG 形式堆积在肝脏中, 随后表现为糖、脂代谢的紊乱, 其与肥胖、糖尿病等多种代谢性疾病密切相关。目前大量文献报道, FXR 激活后通过抑制肝脏脂质合成、影响糖异生、减少肝细胞脂肪变性等改善 NAFLD<sup>[22,23]</sup>。因此, 随着糖脂代谢异常相关疾病发病率的升高, FXR 的激动剂作为候选药物被开发用于治疗 NAFLD。与正常饮食小鼠相比, HFHC 饮食显著增加了小鼠肝脏 TC、TG 水平, 明显促进 NAFLD 的发生发展。本研究表明, Fex 降低 NAFLD 小鼠血脂水平, 减少肝脏脂质堆积, 改善糖脂代谢紊乱。Fex 是 FXR 肠道选择性激动剂, 进一步基于 FXR 激动活性探讨其作用机制。

FXR 在调节胆汁酸合成和肠肝循环中发挥着重要的作用。机体在摄食后胆汁酸的分泌增加, FXR 作为胆汁酸代谢相关的核受体, 能够响应体内胆汁酸相关信号的变化。肝脏 FXR 激活诱导小异二聚体伴侣受体 (small heterodimer partner, SHP) 表达增加, 下调胆汁酸合成限速酶 CYP7A1 表达, 负调控胆汁酸的从头合成<sup>[24]</sup>; 肠道 FXR 激活促进 FGF15 分泌, 随后结合



**Figure 5** Effects of Fex on bile acid metabolism in NAFLD mice. A: The composition of bile acids in serum; B: Individual taurine-conjugated bile acids levels in serum; C: The composition of bile acids in liver; D: Individual taurine-conjugated bile acids levels in liver.  $n = 5-8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . T $\alpha$ MCA: Tauro- $\alpha$ -muricholic acid; T $\beta$ MCA: Tauro- $\beta$ -muricholic acid; T $\omega$ MCA: Tauro- $\omega$ -muricholic acid; TCA: Taurocholic acid; TDCA: Taurodeoxycholic acid; TLCA: Taurolithocholic acid; TCDCA: Taurochenodeoxycholic acid; THDCA: Taurohyodeoxycholic acid; TUDCA: Tauroursodeoxycholic acid;  $\alpha$ MCA:  $\alpha$ -Muricholic acid;  $\beta$ MCA:  $\beta$ -Muricholic acid;  $\omega$ MCA:  $\omega$ -Muricholic acid; CA: Cholic acid; DCA: Deoxycholic acid; LCA: Lithocholic acid; CDCA: Chenodeoxycholic acid; HDCA: Hyodeoxycholic acid; UDCA: Ursodeoxycholic acid; GCA: Glycocholic acid; GDCA: Glycodeoxycholic acid; GLCA: Glycolithocholic acid; GCDCA: Glycochenodeoxycholic acid; GHDCa: Glycohyodeoxycholic acid; GUDCA: Glycoursodeoxycholic acid



**Figure 6** Effects of Fex on hepatic lipid metabolism in NAFLD mice. A: Expression of hepatic lipid synthesis-related genes; B: Expression of liver fatty acid absorption-related genes; C: Expression of hepatic fatty acid oxidation-related genes; D: Expression of very low-density lipoprotein secretion related gene.  $n = 5-8, \bar{x} \pm s. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001$

肝细胞受体 FGFR4 和  $\beta$ -Klotho 以抑制 CYP7A1 转录<sup>[25]</sup>, 调节肝脏胆汁酸代谢。FXR/SHP 和 FXR/FGF19/FGFR4 通路是胆汁酸合成的主要负调控路径。此外, FXR 通过负反馈抑制 ASBT, 增加有机溶质转运蛋白  $\alpha$  和  $\beta$  的表达, 调节胆汁酸的转运<sup>[26]</sup>。本研究表明, Fex 激动肠道 FXR, 促进下游 FGF15 的分泌, FGF15 通过肠肝循环进入肝脏中, 与 FGFR4 受体结合, 作用于胆汁酸合成代谢途径的关键酶 CYP7A1 和 CYP27A1, 负反馈调控胆汁酸合成, 减少胆汁酸在肝脏的积聚, 调节胆汁酸代谢。此外, 胆汁酸合成减少间接证实 Fex 激动肠道 FXR 而发挥下游的调控功能。

FXR 调节糖脂代谢的机制复杂, 涉及胆汁酸、肠道菌群等多靶点, 并且与组织特异性、疾病类型和病理状态有关。肝脏 FXR-SHP 的激活可以降低脂质合成关键转录因子甾醇调节元件结合蛋白 1c (sterol regulatory element binding protein-1c, SREBP-1c) 表达, 调控脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FAS)、乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl CoA carboxylase, ACC) 等表达降低肝脏脂质合成<sup>[27]</sup>。肠道 FXR-FGF15 激活, 增加肝脏的脂肪酸氧化以及抑制脂肪酸合成, 提高代谢率, 改善葡萄糖和脂质的平衡<sup>[28]</sup>; FGF15 分泌增加能够抑制 CREB-PGC-1 $\alpha$  途径抑制肝脏糖异生基因表达, 影响肝脏葡萄糖的生成<sup>[23]</sup>。此外, FXR 还可以通过影响肠道微生物和其他靶点调节糖脂代谢, 研究报道激活 FXR 增加成纤维生长因子 21 的表达以促进肝脏中脂肪酸氧化, 或改变肠道菌群结构, 调控膜受体 G 蛋白偶联胆汁酸受体 5, 维持代谢稳态<sup>[29,30]</sup>。在本研究中, Fex 激活肠道 FXR, 抑制 NAFLD 小鼠肝脏脂质合成和吸收,

促进脂肪酸氧化, 这与报道相符。Fex 调控肠道 FXR-FGF15 信号通路, 而不是激活肝脏 FXR, 通过介导“肠-肝轴”减少脂肪酸合成和摄取, 增加脂肪酸氧化等降低肝脏脂质水平, 从而改善肝脏脂肪变性, 维持机体代谢稳态。

综上所述, Fex 对 NAFLD 具有显著的改善作用, 其作用机制是通过激动肠道 FXR, 促进 FGF15 分泌增加, 调节肝脏脂质代谢, 减少肝脏脂质堆积并改善胆汁酸代谢紊乱。这些结果可能为 Fex 改善 NAFLD 作用提供新的见解, 并为治疗 NAFLD 实现 FXR 靶向药物的开发及临床合理应用提供参考。

**作者贡献:** 黄璐瑶、丁丽丽和杨莉设计实验; 黄璐瑶、薛琼雯、罗艺轩、王紫轩、蒋嘉瑞和徐书杨进行实验数据采集与分析; 丁丽丽和王峥涛修改论文、提供基金支持。

**利益冲突:** 无利益冲突。

## References

- [1] Diehl AM, Day C. Cause, pathogenesis, and treatment of non-alcoholic steatohepatitis [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377: 2063-2072.
- [2] Eslam M, George J. Genetic contributions to NAFLD: leveraging shared genetics to uncover systems biology [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17: 40-52.
- [3] Mitra S, De A, Chowdhury A. Epidemiology of non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases [J]. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5: 16.
- [4] Pappachan JM, Babu S, Krishnan B, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: a clinical update [J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2017, 5: 384-393.

- [5] Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. *Nat Med*, 2018, 24: 908-922.
- [6] Anstee OM, Reeves HL, Kotsiliti E, et al. From NASH to HCC: current concepts and future challenges [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16: 411-428.
- [7] Farrell GC, Wong VW, Chitturi S. NAFLD in Asia--as common and important as in the West [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10: 307-318.
- [8] Ding LL, Zhang E, Yang Q, et al. Vertical sleeve gastrectomy confers metabolic improvements by reducing intestinal bile acids and lipid absorption in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118: e2019388118.
- [9] Collins SL, Stine JG, Bisanz JE, et al. Bile acids and the gut microbiota: metabolic interactions and impacts on disease [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21: 236-247.
- [10] Fiorucci S, Rizzo G, Donini A, et al. Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders [J]. *Trends Mol Med*, 2007, 13: 298-309.
- [11] Chavez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, et al. Bile acid control of metabolism and inflammation in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152: 1679-1694.
- [12] Yang ZX, Shen W, Sun H. Effects of nuclear receptor FXR on the regulation of liver lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatol Int*, 2010, 4: 741-748.
- [13] Fang S, Suh JM, Reilly SM, et al. Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance [J]. *Nat Med*, 2015, 21: 159-165.
- [14] Younossi ZM, Ratziu V, Loomba R, et al. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2019, 394: 2184-2196.
- [15] Kowdley KV, Vuppalanchi R, Levy C, et al. A randomized, placebo-controlled, phase II study of obeticholic acid for primary sclerosing cholangitis [J]. *J Hepatol*, 2020, 73: 94-101.
- [16] Clifford BL, Sedgeman LR, Williams KJ, et al. FXR activation protects against NAFLD *via* bile-acid-dependent reductions in lipid absorption [J]. *Cell Metab*, 2021, 33: 1671-1684.
- [17] Downes M, Verdecia MA, Roecker AJ, et al. A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR [J]. *Mol Cell*, 2003, 11: 1079-1092.
- [18] Xie MH, Holcomb I, Deuel B, et al. FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4 [J]. *Cytokine*, 1999, 11: 729-735.
- [19] Wang M, Zhang JY, Wang YW, et al. FGFR4: a promising therapeutic target for liver cancer [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 1832-1844.
- [20] Schumacher JD, Guo GL. Pharmacologic modulation of bile acid-FXR-FGF15/FGF19 pathway for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2019, 256: 325-357.
- [21] Kim YC, Seok S, Zhang Y, et al. Intestinal FGF15/19 physiologically repress hepatic lipogenesis in the late fed-state by activating SHP and DNMT3A [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 5969.
- [22] Watanabe M, Houten SM, Wang L, et al. Bile acids lower triglyceride levels *via* a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113: 1408-1418.
- [23] Potthoff MJ, Boney-Montoya J, Choi M, et al. FGF15/19 regulates hepatic glucose metabolism by inhibiting the CREB-PGC-1 $\alpha$  pathway [J]. *Cell Metab*, 2011, 13: 729-738.
- [24] Goodwin B, Jones SA, Price RR, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis [J]. *Mol Cell*, 2000, 6: 517-526.
- [25] Inagaki T, Choi M, Moschetta A, et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis [J]. *Cell Metab*, 2005, 2: 217-225.
- [26] Duan XY, Hu JP. Recent advances in drug development targeting bile acids transporters and related disease [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 3576-3586.
- [27] Mencarelli A, Renga B, D'Amore C, et al. Dissociation of intestinal and hepatic activities of FXR and LXR $\alpha$  supports metabolic effects of terminal ileum interposition in rodents [J]. *Diabetes*, 2013, 62: 3384-3393.
- [28] Fu L, John LM, Adams SH, et al. Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes [J]. *Endocrinology*, 2004, 145: 2594-2603.
- [29] Al-Aqil FA, Monte MJ, Peleteiro-Vigil A, et al. Interaction of glucocorticoids with FXR/FGF19/FGF21-mediated ileum-liver crosstalk [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864: 2927-2937.
- [30] Pathak P, Xie C, Nichols RG, et al. Intestine farnesoid X receptor agonist and the gut microbiota activate G-protein bile acid receptor-1 signaling to improve metabolism [J]. *Hepatology*, 2018, 68: 1574-1588.