DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.02.037

葛根芩连汤对2型糖尿病大鼠脂肪组织胆固醇及合成关键酶基因表达和甲基化水平影响的研究

李紫薇[1,2],刘欣宜[1,2],杨灵坤[1,2],张蒙雨[1,2],李昊天[1],陈嫦娥[1],章常华[1],彭淑红[1,2]
(1.江西中医药大学,江西 南昌 330004;2.江西省中医病因生物学重点实验室,江西 南昌 330004)

摘要:目的 探讨葛根芩连汤(Gegen qinlian decoction,GQD)对2型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus,T2DM)大鼠腹股沟脂肪组织(Inguinal white adipose tissue,iWAT)及附睾脂肪组织(Epididymal white adipose tissue,eWAT)胆固醇水平的影响,并从胆固醇合成关键酶的DNA甲基化角度探讨可能的机制。方法 实验分为5组:对照组(CON)、2型糖尿病组(T2DM)、二甲双胍组(MET)、GQD低剂量组(GQDL)、GQD高剂量组(GQDH),灌胃给药14周。分光光度计法测定组织胆固醇水平,蛋白免疫印迹法(Western blotting,WB)、荧光定量PCR法(Quantitative Real-time PCR,QPCR)和亚硫酸盐测序PCR法(Bisulfite sequencing PCR,BSP)分别用于测定基因蛋白表达、mRNA表达和甲基化水平。结果 MET和GQDH均能显著逆转T2DM中iWAT和eWAT胆固醇水平的降低;GQDL能有效逆转eWAT胆固醇水平的降低;GQDL和GQDH能够有效升高iWAT和eWAT中胆固醇合成关键酶3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶(3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase,HMGCR)蛋白表达水平,但未有效调节角鲨烯环氧化酶(Squalene epoxidase,SQLE)蛋白表达水平;给药组均未有效升高胆固醇合成关键酶基因mRNA水平;*Hmgcr*基因在iWAT和eWAT中的CAs、eWAT中的CG3甲基化与血清空腹血糖(Fasting blood glucose,FBG)、糖化血清蛋白(Glycosylated serum protein,GSP)或胰岛素有相关性,而模型组eWAT的CG3甲基化显著降低,MET组eWAT的CAs甲基化显著升高。结论 GQD能有效逆转T2DM大鼠脂肪组织胆固醇水平,可能不是通过调节胆固醇合成来实现。但GQD可能通过对HMGCR的转录后调控促进甲羟戊酸途径的非甾醇分支代谢。脂肪组织*Hmgcr*基因的CAs和CG3位点低甲基化可能与糖尿病发生密切相关。

关键词:胆固醇合成;DNA甲基化;2型糖尿病;脂肪组织
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)02-0173-09

Effects of Gegen Qinlian Decoction(葛根芩连汤) on Cholesterol, Expressions and Methylation Levels of Genes Encoding Key Enzymes of Cholesterol Synthesis in Adipose Tissue of Type 2 Diabetic Rats

LI Ziwei[1,2], LIU Xinyi[1,2], YANG Lingkun[1,2], ZHANG Mengyu[1,2], LI Haotian[1], CHEN Changè[1], ZHANG Chanhua[1], PENG Shuhong[1,2]
(1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, Jiangxi, China;
2. Jiangxi Province Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Etiopathogenisis, Nanchang 330004, Jiangxi, China)

Abstract: *Objective* To investigate the effects of Gegen Qinlian Decoction(葛根芩连汤, GQD) on cholesterol levels in inguinal adipose tissue(epididymal white adipose tissue, iWAT) and epididymal adipose tissue(epididymal white adipose tissue, eWAT) of type 2 diabetic rats and to explore the possible mechanism from the viewpoint of DNA methylation of genes encoding key enzymes of cholesterol synthesis. *Methods* Rats were divided into 5 groups: control group(CON), type 2 diabetes mellitus model group(T2DM), metformin group(MET), GQD low-dose and high-dose groups(GQDL, GQDH) which were given the corresponding medicines via gavage for 14 weeks. Choelsterol levels were determined by spectrophotometer. Western blot(WB), Quantitative Real-time PCR(QPCR) and Bisulfite sequencing PCR(BSP) were used to detect protein, mRNA expression and DNA methylation respectively. *Results* Both MET and GQDH could effectively reverse cholesterol levels of iWAT and eWAT in diabeteic rats. Moreover, GQDL could effectively reverse cholesterol levels of eWAT. GQDL and GQDH effectively elevated the

基金项目:国家自然科学基金项目(82060741);江西省主要学科学术和技术带头人培养项目(领军人才-学术类)(20232BCJ22022);江西中医药大学校级研究生创新专项(JZYC22S13);江西中医药大学中西医结合一级学科(江西省双一流学科)项目(zxyylxk20220103);江西中医药大学校级科技创新团队发展计划项目

作者简介:李紫薇(1998-),女,江西南昌人,硕士在读,研究方向:中医药防治代谢性疾病。
通讯作者:彭淑红(1975-),女,山东聊城人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中医药防治代谢性疾病及机制。E-mail: yaomoon@126.com。

protein expression levels of Hmgcr inWAT and eWAT, however, treatment groups didn't exhibit the increase of the mRNA expression of genes encoding key enzymes of cholesterol synthesis. CAs methylation of *Hmgcr* in iWAT and eWAT and CG3 methylation of *Hmgcr* in eWAT were correlated with FBG, GSP or insulin of serum. Furthermore, CG3 methylation of eWAT in T2DM group was significantly reduced, while CAs methylation of eWAT in MET group was significantly increased. *Conclusion* The effect of GQD or MET on reversing cholesterol level in adipose tissue of diabetic rats may not be achieved by regulating the biosynthesis of the cholesterol. However, GQD may promote the nonsterol branch of mevalonate pathway by post - transcriptional regulation of Hmgcr. The hypomethylation of CAs and CG3 in adipose tissue may be closely related to the progress of diabetes mellitus.

Keywords: cholesterol synthesis; DNA methylation; type 2 diabetes mellitus; adipose tissue

现代医家用《伤寒论》中经典古方葛根芩连汤(Gegen qinlian decoction, GQD)治疗肥胖型糖尿病效果甚佳,实验研究表明 GQD 可降低 2 型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者的血糖水平[1-2],改善脂肪组织胰岛素抵抗[3-4],但是其降糖的作用机制并不完全清楚。脂肪组织具有储存能量的功能,同时也是体内重要的内分泌器官,在调节血糖等方面发挥重要作用。胆固醇是构成脂肪组织的主要脂类成分之一,在参与胰岛素信号传递和葡萄糖转运过程中可能发挥重要作用[5-6]。已有研究报道高脂饮食会使小鼠性腺脂肪组织和皮下脂肪组织胆固醇水平降低[7-8]。在胆固醇合成过程中有 2 个关键限速酶,分别是 3 - 羟基 - 3 - 甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(3 - Hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A reductase, HMGCR)和角鲨烯环氧化酶(Squalene epoxidase, SQLE),调节这 2 个基因的表达可以调节胆固醇水平[9-11]。有研究报道高脂饮食可以影响肝脏 *Hmgcr* 和 *Sqle* 基因的表达[12],饮食的组成也会影响脂肪组织 *Hmgcr* 基因的表达[13]。高脂饮食是否会通过影响脂肪组织中胆固醇合成关键酶 *Hmgcr*、*Sqle* 基因表达影响脂肪组织胆固醇水平? GQD 是否通过调节 T2DM 大鼠脂肪组织胆固醇水平发挥相应的降糖效应,如何调节? 目前鲜见文献进行报道。DNA 甲基化是一种重要的表观遗传调控方式,可调控基因的转录[14-15],有研究指出 *Hmgcr* 基因甲基化水平伴随其基因表达发生变化[16]。本课题组前期研究表明,GQD 能够有效调节胰岛素抵抗大鼠脂肪组织的脂肪酸合成途径关键酶基因甲基化水平的变化[17],GQD 是否通过改变胆固醇合成关键酶基因甲基化水平影响基因表达从而发挥其相应的药效作用,尚未可知。因此,本研究从调节胆固醇合成关键酶基因表达角度探讨 GQD 对高脂饮食合并链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ)诱导的 T2DM 大鼠脂肪组织胆固醇水平的影响,并从基因甲基化的角度研究其作用机制,为 T2DM 发病及 GQD 的作用机制研究提供一定的数据支持。

1 材料

1.1 实验动物

7 ~ 8 周龄雄性 SD 大鼠 90 只,SPF 级,体质量 200 ~ 230 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物合格证号 SCXK(京)2016 - 0011,于江西中医药大学实验动物中心饲养。本动物实验已通过江西中医药大学伦理委员会批准,动物福利伦理审查批准文号:JZLLSC20210464。高脂饲料 D12492(脂肪提供 60% 能量),对照饲料 D12450J,均由无锡帆泊生物技术有限公司加工制备。

1.2 实验材料

GQD 由葛根、黄连、黄芩、炙甘草按照 8∶3∶3∶2 组成。为缓解长期服用寒凉药对胃部的伤害,在配方中加入少量干姜。葛根饮片(产地湖北,批号 210316)、黄连饮片(产地四川,批号 201216)、黄芩饮片(产地辽宁,批号 200611)、炙甘草饮片(产地内蒙古,批号 200826)、干姜(产地云南,批号 200521)均购于江西江中中药饮片有限公司。按配方比例(葛根∶黄芩∶黄连∶炙甘草∶干姜 = 8∶3∶3∶2∶0.5)取各味中药饮片加入于药重 8 倍量的蒸馏水,浸泡 30 min,将药材浸透后煮沸保持 40 min,回流提取,用减压旋转蒸发仪在低温适当压力下浓缩至 1 g·mL^{-1},-20 ℃保存备用。

1.3 实验试剂

链脲佐菌素(STZ)(Sigma, Lot:wxbd4971);盐酸二甲双胍片(上海信谊天平,Lot:67200808);总胆固醇(TC)含量检测试剂盒(索莱宝,Lot:20221024);M - PER™哺乳动物蛋白抽提试剂(赛默飞,Lot:TL281708);蛋白酶抑制剂(聚合美,Lot:23BB0817w);PMSF(碧云天,Lot:ST506 - 2);磷酸酶抑制剂混合物(Abmole 生物科学,Lot:M7528);蛋白 Ladder(10 - 250 kDa)(聚合美,Lot:23MY1116LB);HMGCR 兔抗(OriGene,Lot:TA377139);SQLE 兔抗(RayBiotech,Lot:144 - 02428);β - actin(D6A8)兔抗(Cell Signaling Technology,Lot:8457);4 × SDS - PAGE 分离胶缓冲液(索莱宝,Lot:2309001);4 × SDS - PAGE 浓缩胶缓冲液(索莱宝,Lot:20220907);LB 肉汤(青岛海博生物,Lot:20220304);血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(天根,Lot:W0122);Taq 酶 Mix(Promega,Lot:0000351182);热启动 Taq 酶 Mix(Promega,Lot:0000332791);质粒小提试剂盒(天根,Lot:X0222);天漠 DNA 甲基化试剂盒(Zymo research,Lot:211126);PCR mix(带蓝色染料)(聚合美,Lot:22FB0102);零背景平末端基因克隆试剂盒(全式金,Lot:Q30519);琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根,Lot:R7207);高保真 DNA 聚合酶(聚合美,Lot:21JB0201);RNA 提取试剂盒(全式金,Lot:Q20629),反转录试剂盒(Takara,Lot:ALG2093A),荧光定量 PCR 试剂盒(聚合美,Lot:22JK2802I)。用引物设计软件 Oligo6 设计引物,由上海生工合成,序列见表 1。

1.4 实验仪器

核酸蛋白测定仪(NanoDrop - 2000,美国 Thermo 公司);化学发光凝胶成像系统(ChemiDocXRS +,美国 Bio - Rad 公司);水平电泳仪(Sub - CellGT,美国 Bio - Rad 公司);梯度 PCR 仪(Veriti,美国 ABI 公司);台式高速冷冻离心机(Centrifuge 5424R,德国 eppendorf 公司);多功能酶标仪(SPARK10M,瑞士

TECAN 公司);冷冻组织振荡研磨仪(SamplePrep Geno 2010,美国 SPEX 公司);超纯水仪(Milli - Q Advantage A10,德国 Merck Millipore 公司);落地高速离心机(LYNX6000,美国 Thermo 公司);实时荧光定量 PCR 仪(LightCycle 480 Ⅱ,瑞士 Roche 公司)。

表 1 引物序列

基因	序列号	引物类型	引物(5′-3′)	扩增片段/(bp)
β - actin	NM_031144	荧光定量	上游:CCCATCTATGAGGGTTACGC	150
			下游:TTTAATGTCACGCACGATTTC	
Hmgcr	NM_013134	荧光定量	上游:TCGTCTTCAGCACTGTCGT	130
			下游:GAACTCAGGGCAAACTTGG	
Hmgcr	NC_051337.1	甲基化	上游:AAAATAGGGATATAATTGTGTAGGTG	257
			下游:ATCCTCTCTAAAATCCCTCTACTCT	
Sqle	NM_017136	荧光定量	上游:CTGGGAGATGCGTATAACC	184
			下游:TCACAACAAAGGAATGGCT	
Sqle	NC_051342.1	甲基化	上游:GTAGTTATTTTTTGTTGGAGA	232
			下游:TTACACACTTCTTCATTCAAC	

2 实验方法

2.1 动物分组与给药

SD 雄性大鼠 90 只,适应性喂养 7 d 后,按照随机数字表法随机分为正常对照组(CON 组)10 只(给予对照饲料和正常饮水)和模型组 80 只(给予高脂饲料)。28 d 后模型组通过腹腔注射 35 mg·kg^{-1}柠檬酸缓冲液新鲜配制的 STZ 诱导 T2DM 大鼠模型,正常对照组注射同等剂量的柠檬酸盐缓冲液。分别测定造模 3、7 d 后大鼠尾尖空腹血糖,取两次尾尖空腹血糖均≥11.1 mmoL·L^{-1}的大鼠即为 T2DM 造模成功[18]。对于前两次尾尖空腹血糖≤11.1 mmoL·L^{-1}的大鼠,再次注射 10 mg·kg^{-1}柠檬酸缓冲液新鲜配制的 STZ,3 d 后再次测血糖,取血糖≥11.1 mmoL·L^{-1}的动物也纳入 T2DM 造模成功大鼠。将造模成功的 42 只大鼠分为 4 组,分别是模型组(T2DM 组)10 只、二甲双胍组(MET 组)10 只、GQD 低剂量组(GQDL 组)10 只、GQD 高剂量组(GQDH 组)12 只,正常对照组和 T2DM 组给予生理盐水,给药组 MET 组给药 200 mg·kg^{-1}·d^{-1},GQDL 组给药 5 g·kg^{-1}·d^{-1},GQDH 组给药 10 g·kg^{-1}·d^{-1},每天给药 2 次,在 14 周给药期间,T2DM 组和药物处理组仍以高脂饲料喂养,CON 组以对照饲料喂养。由于灌胃手法的问题,在给药早期,GQDL 组死亡 1 只,GQDH 组死亡 5 只。

2.2 取材

实验动物分组后持续给药 14 周,最后 1 次灌胃后禁食 12 h,戊巴比妥钠(3%)腹腔注射麻醉大鼠后打开大鼠腹腔,立即取出腹股沟脂肪组织(iWAT)和附睾脂肪组织(eWAT)并立即分成若干份,将用于提取 RNA 的脂肪组织放入含有 RNA 保护液的冻存管中,其余脂肪组织用锡箔纸包装好后标记,立即置于液氮冷冻,存于 -80 ℃冰箱备用。

2.3 IWAT 和 eWAT 胆固醇水平的测定

取 100 mg 脂肪组织放入无菌无酶的离心管中,加入异丙醇后开始用小剪刀进行反复剪碎之后在冷冻组织振荡研磨仪充分研磨,根据总胆固醇(TC)含量检测试剂盒说明书测定脂肪组织胆固醇水平。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blotting,WB)法检测 HMGCR、SQLE 蛋白表达

取 30 mg 脂肪组织和 3 颗小钢珠,加入 200 μL 配制好的裂解液(裂解液:PMSF:蛋白酶抑制剂:磷酸酶抑制剂 = 100∶1∶1∶1),在冷冻组织振荡研磨仪中充分研磨,取出小钢珠后 4 ℃ 12 000 r/min,离心 10 min,用预冷后的 1 mL 注射器小心吸取中间水相层,采用 BCA 法检测蛋白浓度;各组样本用总蛋白 25 μg 上样,采用 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS - PAGE)分离蛋白,湿转法(270 mA、60 min)将蛋白转移至 PVDF 膜上;再用含 5% 脱脂牛奶的 1 × TBST 在室温下封闭 1.5 h 后,洗涤,加入一抗[HMGCR(1∶1000)、SQLE(1∶1000)],4 ℃下摇床孵育过夜;1 × TBST 清洗 5 次后,加入二抗[辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体(1∶10 000)],室温下孵育 1 h;洗涤 3 次后,加化学发光试剂 ECL 显影,置于化学发光凝胶成像仪中拍照;采用 Image Lab 软件分析蛋白条带灰度值,以 β - actin 为内参,对目的蛋白进行半定量分析。

2.5 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 法(Quantitative Real - time PCR,QPCR)检测 *Hmgcr*、*Sqle* 基因的表达

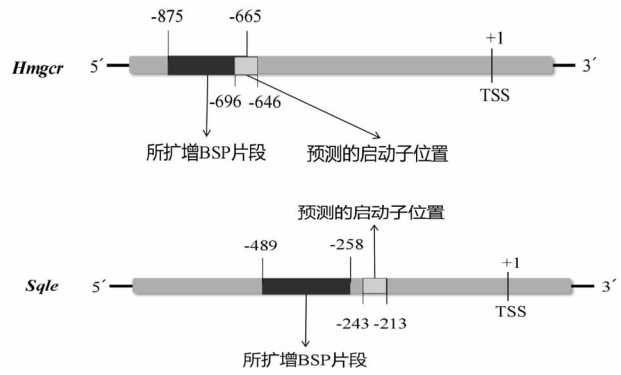
用 RNA 提取试剂盒按说明书提取脂肪组织 RNA,用 Nanodrop 2000 测定 RNA 浓度。用 cDNA 反转录试剂盒合成 cDNA。加 2 ng 的 cDNA 样本于荧光定量试剂体系中,于罗氏 480 Ⅱ 系统中进行 qPCR。以 *β - actin* 作为内参基因,计算 *Hmgcr* 和 *Sqle* 表达,具体参照文献[17,19]的方法。

2.6 亚硫酸氢盐测序 PCR 法(Bisulfite sequencing PCR,BSP)检测 *Hmgcr*、*Sqle* 基因 DNA 甲基化频率

2.6.1 *Hmgcr* 和 *Sqle* 基因扩增片段的确定及 C 位点说明 利用 Methyl Primer Express Software v1.0 软件分别找到大鼠 *Hmgcr* 和 *Sqle* 基因上 CG 岛,以转录起始位点(Transcription start site,TSS)为 +1,并在网站 https://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html 进行启动子预测。*Hmgcr* 的 CG 岛位于(-800,+765),所扩增 *Hmgcr* 的 BSP 片段(-875,-665),包含 CG 岛的侧翼区和部分 CG 岛,预测的 *Hmgcr* 启动子位于(-696,-646)位置,如图 1 所示。*Sqle* 的 CG 岛位于(-1648,+43),所扩增 *Sqle* 的 BSP 片段(-489,-258),位于 CG 岛,预测的 *Sqle* 启动子位于(-243,-193)位置,如图 1 所示。本文中 Total C 指该片段总 C;non - CG 又称为 CH(H 包含 A、T、C),指总的 CH。CGs、CAs、CTs、CCs 分别表示总 CG、总 CA、总 CT、总 CC;CG1 表示该片段第 1 个 CG 位点,依次类推。

2.6.2 脂肪组织 DNA 提取及重亚硫酸氢盐处理 取 100 mg 脂肪组织放入 1.5 mL 的无菌无酶离心管中,加入 4 ~ 5 颗小钢珠后在冷冻组织振荡研磨仪中充分研磨,按血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取脂肪组织 DNA。核酸蛋白测定仪测定 DNA 的纯度和浓度,琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。提取 DNA 后根据 EZ - DNA 甲基化试剂盒说明书步骤进行 DNA 重亚硫酸氢盐处理,处理后的 DNA 置于 -20 ℃冰箱备用。

2.6.3 *Hmgcr*、*Sqle* 基因片段 PCR 扩增和纯化 所扩增基因的 BSP 片段扩增条件均如下。第 1 次 PCR 扩增体系 20 μL:无



注:TSS:转录起始位点;BSP:重亚硫酸盐处理 PCR 测序片段。

图 1 所扩增 BSP 片段与转录起始位点的相对位置

菌无酶水 6.6 μL,甲基化 DNA 模板 2 μL,上下游引物各 0.7 μL,PCR Mix 10 μL。反应条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,64 ℃退火 30 s 每次循环降 1 ℃,72 ℃延伸 30 s,共 35 个循环;72 ℃后延伸 10 min。第 2 次 PCR 反应体系 25 μL:无菌无酶水 6.5 μL,第 1 次 PCR 产物 2 μL,上下游引物各 0.5 μL,PCR Buffer 12.5 μL,高保真 DNA 聚合酶 0.5 μL,dNTPs 2.5 μL。反应条件:95 ℃预变性 2 min;95 ℃变性 25 s,55 ℃退火 25 s,68 ℃延伸 15 s,共 35 个循环;68 ℃后延伸 5 min。琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段特异性,若出现非特异性条带,按琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书将目标条带切胶进行 DNA 回收纯化。

2.6.4 TA 克隆及阳性克隆检测 将第 2 次 PCR 产物克隆至 Blunt Zero 载体。挑取 10 个白色克隆菌落加入到含氨苄青霉素的液体培养基振荡培养 5 h。克隆检测反应体系 20 μL:无菌无酶水 8 μL,菌液 1 μL,上下游引物各 0.5 μL,PCR mix (With Blue Dye)10 μL。反应条件:95 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 25 s,58 ℃退火 25 s,72 ℃延伸 15 s,共 35 个循环;72 ℃后延伸 5 min。阳性克隆菌液继续培养 12 h 用于质粒提取。

2.6.5 质粒提取及质粒测序 将过夜培养的细菌按质粒提取试剂盒说明书提取质粒。所提取的质粒送至上海生工生物工程公司测序。

2.7 统计学处理

采用 SPSS 25.0 进行统计学分析,统计数据均以表示。通过 *Shapiro – Wilk* 检验,进行参数正态分布分析。符合正态性分布的各组间比较采用单因素方差分析,不符合正态分布的两组间采用非参数 *Mann – Whitney U* 检验。使用 *Spearman* 相关系数进行相关性分析,$P \leqslant 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 GQD 对大鼠 iWAT 和 eWAT 中胆固醇水平的影响

iWAT 和 eWAT 中胆固醇水平如表 2 所示,与 CON 组相比,T2DM 组的 iWAT 中胆固醇水平降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);与 T2DM 组相比,MET 组、GQDH 组大鼠 iWAT 中胆固醇水平升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);在 eWAT 中,与 CON 组相比,T2DM 的 eWAT 中胆固醇水平降低,差异具有统计学意义($P<0.01$);与 T2DM 组相比,MET 组、GQDL 组和 GQDH 组大鼠 eWAT 中胆固醇水平升高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。

3.2 GQD 对大鼠 iWAT 和 eWAT 中 HMGCR、SQLE 蛋白表达量的影响

在 iWAT 中,与 CON 组相比,T2DM 组的 HMGCR 蛋白表达水平显著降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);与 T2DM 组相比,GQDL、GQDH 组的 HMGCR 蛋白表达水平显著升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);在 eWAT 中,与 CON 组相比,T2DM 组的 HMGCR 蛋白表达水平有下降的趋势,但差异无统计学意义($P=0.075$);与 T2DM 组相比,GQDL、GQDH 组的 HMGCR 蛋白表达水平显著升高,差异具有统计学意义($P=0.05$),见表 3、图 2。

表 2 GQD 对大鼠 iWAT 和 eWAT 中胆固醇水平的影响($n=7\sim10$,$\bar{x}\pm s$)

组别	iWAT 胆固醇	eWAT 胆固醇
CON	143.7 ± 81.1	156.1 ± 36.4
T2DM	78.8 ± 35.9 *	92.0 ± 25.9 **
MET	143.4 ± 89.5 #	165.2 ± 57.8 ##
GQDL	105.2 ± 41.3	168.3 ± 64.8 ##
GQDH	126.3 ± 56.7 #	206.4 ± 99.9 ##

注:* 与空白组比较,$P<0.05$;** 与空白组比较,$P<0.01$;# 与 T2DM 组比较,$P<0.05$;## 与 T2DM 组比较,$P<0.01$。

表 3 GQD 对大鼠 iWAT 和 eWAT 中 HMGCR 蛋白水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	iWAT	eWAT
CON	3	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
T2DM	3	0.5 ± 0.3 *	0.6 ± 0.2
MET	3	1.0 ± 0.9	0.8 ± 0.2
GQDL	3	2.0 ± 2.0 #	1.1 ± 0.4 #
GQDH	3	1.1 ± 0.3 #	1.6 ± 0.4 #

注:* 与空白组比较,$P<0.05$;# 与 T2DM 组比较,$P<0.05$。

在 iWAT 中,与 CON 组相比,T2DM 组的 SQLE 蛋白表达水平显著降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);MET 组、GQDL 组和 GQDH 组 SQLE 蛋白表达水平与 T2DM 组的差异均无统计学意义($P>0.05$);在 eWAT 中,T2DM 的 SQLE 蛋白表达水平与 CON 组的差异均无统计学意义($P>0.05$);MET 组、GQDL 组和 GQDH 组 SQLE 蛋白表达水平与 T2DM 组的差异也均无统计学意义($P>0.05$),见表 4、图 3。

表 4 GQD 对大鼠 iWAT 和 eWAT 中 SQLE 蛋白水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	iWAT	eWAT
CON	3	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
T2DM	3	0.7 ± 0.0 *	0.9 ± 0.1
MET	3	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.5
GQDL	3	1.1 ± 0.5	0.7 ± 0.3
GQDH	3	1.3 ± 0.3	1.0 ± 0.3

注:* 与空白组比较,$P<0.05$。

3.3 GQD 对大鼠 iWAT 和 eWAT 中 *Hmgcr*、*Sqle* 基因表达量的影响

在 iWAT 中,与 T2DM 组相比,GQDL 组、GQDH 组 *Hmgcr* 基因表达量有上升的趋势但差异无统计学意义($P=0.08$,$P=0.06$)。在 eWAT 中,与 T2DM 组相比,GQDL 组 *Hmgcr* 基因表达量有下降的趋势但差异无统计学意义($P=0.08$),GQDH 组 *Hmgcr* 基因表达量降低,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 5。

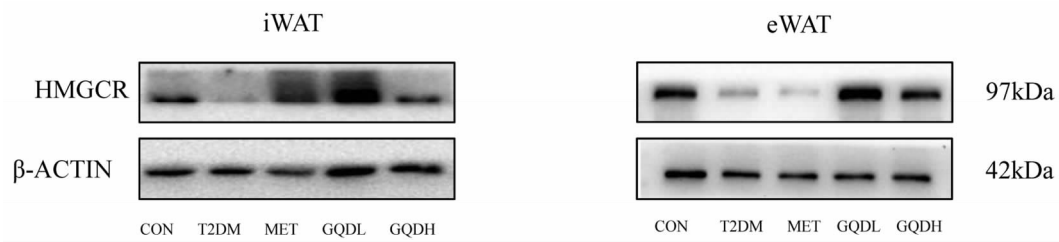


图 2 GQD 对大鼠 iWAT 和 eWAT 中 HMGCR 蛋白表达水平的影响($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

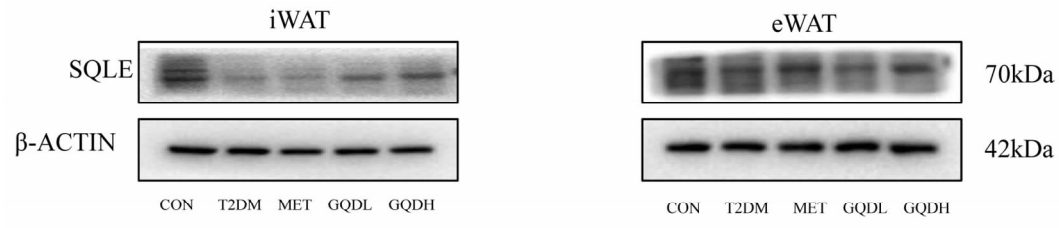


图 3 GQD 对大鼠 iWAT 和 eWAT 中 SQLE 蛋白表达水平的影响($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

表 5 GQD 对 T2DM 大鼠 iWAT 和 eWAT 中 *Hmgcr* 基因表达量的影响($n=7\sim10$,$\bar{x}\pm s$)

组别	iWAT	eWAT
CON	1.1 ± 1.1	4.5 ± 6.7
T2DM	0.9 ± 0.9	5.6 ± 4.8
MET	1.1 ± 0.8	3.3 ± 3.9
GQDL	1.9 ± 1.5	2.0 ± 1.1
GQDH	1.2 ± 0.6	0.6 ± 0.5#

注:#与 T2DM 组比较,$P<0.05$。

在 iWAT 和 eWAT 中,T2DM 的 *Sqle* 基因表达量与 CON 组的差异均无统计学意义($P>0.05$);MET 组、GQDL 组和 GQDH 组 *Sqle* 基因表达量与 T2DM 组的差异也均无统计学意义($P>0.05$),见表 6。

表 6 GQD 对 T2DM 大鼠 iWAT 和 eWAT 中 *Sqle* 基因表达量的影响($n=7\sim10$,$\bar{x}\pm s$)

组别	iWAT	eWAT
CON	0.6 ± 0.3	0.7 ± 0.2
T2DM	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.5
MET	0.6 ± 0.3	1.1 ± 0.7
GQDL	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.1
GQDH	0.6 ± 0.3	0.8 ± 0.5

3.4 GQD 对大鼠 iWAT 的 *Hmgcr*、*Sqle* 基因甲基化的影响

在 iWAT 中 *Hmgcr*、*Sqle* 基因甲基化如表 7 和 8 所示,与 CON 组比较,T2DM 组 *Hmgcr* 基因 CAs 位点甲基化水平有降低趋势,但差异未达到统计学意义($P=0.08$);T2DM 组 *Sqle* 基因各位点甲基化水平与空白对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);MET 组、GQDL 组和 GQDH 组 *Hmgcr* 基因、*Sqle* 基因各位点甲基化与 T2DM 组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

3.5 GQD 对大鼠 eWAT 的 *Hmgcr*、*Sqle* 基因甲基化的影响

在 eWAT 中 *Hmgcr* 基因甲基化如表 9 所示,与 CON 组相比,T2DM 组 *Hmgcr* 基因的 CG3 甲基化水平下降,差异具有统计学意义($P<0.05$),CAs 位点甲基化水平有降低趋势,差异未达到统计学意义($P=0.09$)。与 T2DM 组相比,MET 组 *Hmgcr* 基因 CH、CAs 甲基化水平上升,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

在 eWAT 中 *Sqle* 基因甲基化如表 10 所示,T2DM 组 *Sqle* 基因各位点甲基化与 CON 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),GQDL 组 *Sqle* 基因 CGs 甲基化水平与 T2DM 组相比有上升的趋势但差异无统计学意义($P=0.06$);Met 组、GQDH 组 *Sqle* 基因各位点甲基化水平与 T2DM 组比较,差异均无统计学

表 7 GQD 对 T2DM 大鼠 iWAT 的 *Hmgcr* 基因甲基化的影响($\bar{x}\pm s$) 单位:%

组别	n	TotalC	CH	CAs	CTs	CGs	CCs	CG1	CG2	CG3
CON	6	1.3 ± 0.8	0.7 ± 0.5	1.3 ± 1.0	0.0 ± 0.0	6.4 ± 5.4	0.4 ± 1.0	3.8 ± 5.9	11.4 ± 12.2	4.2 ± 6.5
T2DM	6	1.4 ± 1.2	0.4 ± 0.4	0.4 ± 0.6	0.8 ± 1.5	10.5 ± 9.8	0.0 ± 0.0	9.1 ± 11.9	17.5 ± 17.3	5.0 ± 8.4
MET	6	1.3 ± 1.0	0.6 ± 0.8	1.1 ± 1.3	0.3 ± 0.6	8.5 ± 5.7	0.0 ± 0.0	5.6 ± 6.2	18.0 ± 12.8	1.9 ± 4.5
GQDL	6	0.8 ± 0.7	0.6 ± 0.6	0.5 ± 1.3	1.0 ± 1.1	2.9 ± 3.8	0.3 ± 0.8	2.4 ± 5.8	6.4 ± 7.2	0.0 ± 0.0
GQDH	6	1.4 ± 1.1	0.8 ± 1.0	0.5 ± 0.7	1.0 ± 1.2	7.0 ± 4.2	1.1 ± 1.7	9.4 ± 7.6	11.7 ± 11.0	0.0 ± 0.0

表 8 GQD 对 T2DM 大鼠 iWAT 的 *Sqle* 基因甲基化的影响($\bar{x}\pm s$) 单位:%

组别	n	TotalC	CH	CAs	CTs	CGs	CCs
CON	6	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.3
T2DM	6	0.3 ± 0.6	0.4 ± 0.7	1.0 ± 1.8	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.3
MET	6	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.3	0.3 ± 0.7	0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.6	0.0 ± 0.0
GQDL	6	0.3 ± 0.4	0.3 ± 0.4	0.2 ± 0.5	0.5 ± 0.8	0.1 ± 0.3	0.3 ± 0.4
GQDH	6	0.4 ± 0.3	0.4 ± 0.4	0.9 ± 1.3	0.4 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.5

表 9 GQD 对 T2DM 大鼠 eWAT 的 *Hmgcr* 基因甲基化的影响($\bar{x} \pm s$) 单位:%

组别	n	TotalC	CH	CAs	CTs	CGs	CCs	CG1	CG2	CG3
CON	6	2.3 ±0.5	0.6 ±0.5	1.0 ±1.0	0.0 ±0.0	19.1 ±9.5	0.4 ±0.9	25.4 ±15.4	23.7 ±15.3	8.2 ±7.9
T2DM	6	2.1 ±0.7	0.3 ±0.4	0.1 ±0.3	0.3 ±0.6	19.8 ±7.5	0.5 ±0.8	25.0 ±15.4	34.5 ±18.7	0.0 ±0.0 *
MET	6	2.7 ±1.4	1.1 ±0.6 #	1.3 ±1.1 #	0.5 ±0.8	17.7 ±12.9	1.4 ±2.3	16.9 ±15.5	34.5 ±23.3	1.8 ±4.7
GQDL	6	1.6 ±1.5	0.6 ±0.7	0.7 ±0.9	0.6 ±1.5	11.1 ±10.5	0.6 ±1.0	16.9 ±19.3	16.1 ±18.7	0.0 ±0.0
GQDH	6	2.0 ±0.5	0.5 ±0.3	0.4 ±0.4	0.2 ±0.5	16.6 ±6.3	1.2 ±1.1	23.2 ±18.8	26.6 ±9.2	0.0 ±0.0

注:* 与空白组比较,$P < 0.05$;# 与 T2DM 组比较,$P < 0.05$。

表 10 GQD 对 T2DM 大鼠 eWAT 的 *Sqle* 基因甲基化的影响($\bar{x} \pm s$) 单位:%

组别	n	TotalC	CH	CAs	CTs	CGs	CCs
CON	6	0.3 ±0.3	0.3 ±0.2	0.5 ±0.8	0.0 ±0.0	0.8 ±0.9	0.3 ±0.5
T2DM	6	0.2 ±0.3	0.2 ±0.3	0.3 ±0.5	0.3 ±0.5	0.2 ±0.4	0.1 ±0.3
MET	6	0.4 ±0.5	0.4 ±0.5	1.5 ±2.1	0.0 ±0.0	0.5 ±1.2	0.1 ±0.2
GQDL	6	0.9 ±1.1	0.8 ±1.0	1.6 ±1.9	0.1 ±0.3	1.4 ±1.9	0.8 ±1.3
GQDH	6	0.9 ±0.4	0.2 ±0.3	0.6 ±1.1	0.0 ±0.0	0.6 ±1.4	0.1 ±0.3

意义($P > 0.05$)。

3.6 大鼠 iWAT 和 eWAT 中 *Hmgcr*、*Sqle* 基因甲基化频率与基因表达量及各生理生化指标相关性

3.6.1 大鼠 iWAT 和 eWAT 中 *Hmgcr* 基因甲基化频率与基因表达量及各生理生化指标相关性 在 iWAT 的 *Hmgcr* 基因中,CAs 位点甲基化水平与糖化血清蛋白(Glycosylated serum protein,GSP)、空腹血糖(Fasting blood glucose,FBG)呈显著负相关,而与乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase,LDH)、α-羟基丁酸脱氢酶(α-Hydroxybutyric acid dehydrogenase,HBDH)、同型半胱氨酸(Homocystine,HCY)呈显著正相关;CH 位点与组织 *Hmgcr* mRNA 呈显著正相关。在 eWAT *Hmgcr* 基因的甲基化中,CCs 位点与血清胰岛素呈显著负相关;CG3 位点与 FBG、GSP 呈显著负相关,而与组织 *Hmgcr* mRNA、血清胰岛素和 HCY 呈显著正相关;CAs 位点与 LDH、HBDH、HCY 呈显著正相关,见表 11、表 12。

3.6.2 大鼠 iWAT 和 eWAT 中 *Sqle* 基因甲基化频率与各生理生化指标相关性 在 iWAT 的 *Sqle* 基因的甲基化中,TotalC、CGs 位点与 LDH、HBDH 呈强显著性负相关;CH 和 CAs 位点与血清胰岛素呈显著负相关;而 CAs 位点还与 LDH、HBDH 呈显著负相关。在 eWAT 中,*Sqle* 基因各位点甲基化与生理生化指标之间差异均无统计学意义,见表 13、表 14。

4 讨论

脂肪组织不仅是储存胆固醇的重要组织[20],其胆固醇水平也可能与肥胖密切相关[21],敲除胆固醇输出蛋白 ABCA1 的基因[22],会使脂肪细胞质膜胆固醇水平增加,而体质量和附睾脂肪量下降[23],也有报道指出饮食诱导的肥胖小鼠性腺脂肪和皮下脂肪胆固醇水平显著下降[7]。本研究利用高脂饲料 + STZ 诱导的 T2DM 大鼠 iWAT 和 eWAT 胆固醇水平有显著降低,与文献报道一致。二甲双胍和 GQD 能有效降低血清胆固醇水平[24-25],但对脂肪组织胆固醇水平的影响鲜少报道。本研究发现二甲双胍和高剂量 GQD 能有效升高这两种脂肪组织的胆固醇水平。细胞胆固醇,尤其是膜胆固醇水平与胰岛素刺激的葡萄糖摄取可能有紧密的联系[26],因此推测,二甲双胍和葛根芩连汤可能通过提高脂肪组织胆固醇水平来发挥降低血糖的作用,从而达到治疗糖尿病的效用。这也可能是二甲双胍和 GQD 能有效降低 db/db 小鼠体质量[25,27]、降低肥胖小鼠脂肪组织质量和脂肪细胞体积[8]的重要原因。

那 GQD 和二甲双胍是如何调控脂肪组织胆固醇水平的呢?胆固醇从头合成,又称甲羟戊酸途径,是组织胆固醇的来源之一,而 HMGCR 和 SQLE 是胆固醇合成的关键酶[28-29],其相关基因的改变与糖尿病有着极大的关联[30-31],本研究发现,在蛋白水平上,低剂量和高剂量的GQD能够有效升高T2DM

表 11 iWAT 的 *Hmgcr* 基因甲基化频率与各生理生化指标相关性

Hmgcr	FBG		GSP		Insulin		LDH		HBDH		HCY		*Hmgcr* mRNA	
	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值
TotalC	−0.037	0.848	−0.263	0.160	−0.137	0.470	0.018	0.923	0.014	0.943	0.079	0.680	0.256	0.197
CGs	0.062	0.746	−0.217	0.249	−0.286	0.126	−0.174	0.357	−0.175	0.356	0.031	0.873	0.026	0.898
CH	−0.227	0.227	−0.194	0.303	0.132	0.488	0.232	0.217	0.227	0.228	0.188	0.319	0.458	0.016 *
CAs	−0.362	0.050 *	−0.400	0.028 *	0.218	0.247	0.384	0.036 *	0.364	0.048 *	0.397	0.030 *	0.320	0.103
CCs	−0.144	0.448	−0.178	0.345	−0.021	0.910	−0.153	0.419	−0.152	0.424	0.087	0.647	0.341	0.082
CTs	0.181	0.339	0.188	0.321	−0.101	0.594	−0.065	0.735	−0.052	0.783	−0.273	0.144	0.209	0.295
CG1	0.278	0.137	−0.263	0.160	−0.457	0.011 *	−0.236	0.209	−0.237	0.207	−0.175	0.356	0.035	0.864
CG2	0.006	0.974	−0.030	0.876	−0.096	0.615	−0.056	0.769	−0.053	0.782	−0.020	0.917	0.090	0.656
CG3	−0.030	0.874	−0.272	0.146	−0.071	0.711	−0.004	0.983	−0.033	0.864	0.118	0.535	−0.191	0.339

注:采用 *Spearman* 相关性分析,ρ 表示相关系数,P 表示显著性;FBG. 空腹血糖;GSP. 糖化血清蛋白;Insulin. 胰岛素;LDH. 乳酸脱氢酶;HBDH. α-羟基丁酸脱氢酶;HCY. 同型半胱氨酸;* $P < 0.05$,* * $P < 0.01$。

表 12 eWAT 的 *Hmgcr* 基因甲基化频率与各生理生化指标相关性

Hmgcr	FBG		GSP		Insulin		LDH		HBDH		HCY		*Hmgcr* mRNA	
	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值
TotalC	0.000	1.000	−0.076	0.691	0.109	0.568	0.222	0.239	0.217	0.249	0.212	0.261	−0.132	0.529
CGs	0.139	0.463	−0.042	0.825	0.011	0.952	0.074	0.696	0.078	0.684	0.114	0.550	−0.105	0.618
CH	−0.220	0.243	0.052	0.787	0.081	0.672	0.232	0.217	0.214	0.257	0.242	0.197	0.010	0.963
CAs	−0.327	0.077	−0.063	0.741	0.334	0.071	0.476	0.008 **	0.437	0.016 *	0.375	0.041 *	0.101	0.631
CCs	0.187	0.322	0.116	0.542	−0.425	0.019 *	−0.237	0.207	−0.244	0.194	0.060	0.753	−0.214	0.305
CTs	0.102	0.590	0.032	0.866	0.013	0.944	0.147	0.438	0.167	0.379	−0.128	0.499	0.099	0.636
CG1	0.077	0.684	0.000	1.000	0.002	0.992	−0.181	0.339	−0.160	0.397	0.053	0.780	−0.303	0.140
CG2	0.209	0.268	−0.025	0.897	−0.078	0.683	0.229	0.224	0.208	0.271	−0.021	0.913	0.000	1.000
CG3	−0.453	0.012 *	−0.378	0.039 *	0.414	0.023 *	0.174	0.358	0.186	0.326	0.465	0.010 **	0.422	0.036 *

注：采用 *Spearman* 相关性分析，ρ 表示相关系数，*P* 表示显著性；FBG. 空腹血糖；GSP. 糖化血清蛋白；Insulin. 胰岛素；LDH. 乳酸脱氢酶；HBDH. α－羟基丁酸脱氢酶；HCY. 同型半胱氨酸；* *P* < 0.05，** *P* < 0.01。

表 13 iWAT 中 *Sqle* 基因甲基化频率与各生理生化指标相关性

Sqle	FBG		GSP		Insulin		LDH		HBDH		HCY		*Hmgcr* mRNA	
	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值
Total C	0.281	0.133	0.163	0.391	−0.359	0.052	−0.477	0.008 **	−0.497	0.005 **	−0.344	0.062	−0.034	0.880
CH	0.281	0.132	0.111	0.558	−0.406	0.026 *	−0.132	0.488	−0.164	0.388	−0.219	0.244	−0.165	0.463
CGs	−0.043	0.821	0.265	0.157	0.052	0.783	−0.488	0.006 **	−0.497	0.005 **	−0.278	0.138	−0.038	0.866
CAs	0.344	0.062	0.093	0.626	−0.414	0.023 *	−0.407	0.025 *	−0.394	0.031 *	−0.280	0.134	−0.033	0.884
CTs	−0.017	0.927	0.167	0.379	0.066	0.728	−0.165	0.385	−0.215	0.254	−0.040	0.834	−0.224	0.316
CCs	0.166	0.380	0.011	0.956	−0.285	0.127	−0.316	0.089	−0.338	0.068	−0.243	0.196	0.128	0.572

注：采用 *Spearman* 相关性分析，ρ 表示相关系数，*P* 表示显著性；FBG. 空腹血糖；GSP. 糖化血清蛋白；Insulin. 胰岛素；LDH. 乳酸脱氢酶；HBDH. α－羟基丁酸脱氢酶；HCY. 同型半胱氨酸；* *P* < 0.05，** *P* < 0.01。

表 14 eWAT 中 *Sqle* 基因甲基化频率与各生理生化指标相关性

Sqle	FBG		GSP		Insulin		LDH		HBDH		HCY		*Hmgcr* mRNA	
	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值	ρ	P 值
Total C	−0.143	0.409	0.133	0.483	0.078	0.683	−0.129	0.496	−0.164	0.387	0.176	0.351	0.108	0.641
CH	−0.151	0.450	0.206	0.276	0.083	0.662	−0.109	0.566	−0.141	0.457	0.162	0.391	0.007	0.977
CGs	−0.118	0.426	−0.098	0.607	0.111	0.559	−0.273	0.144	−0.294	0.115	0.119	0.533	0.013	0.954
CAs	−0.210	0.533	0.156	0.409	−0.036	0.848	−0.237	0.208	−0.257	0.170	0.042	0.826	0.096	0.678
CTs	0.290	0.265	0.142	0.455	0.186	0.324	0.060	0.752	0.024	0.900	0.094	0.621	0.037	0.875
CCs	−0.143	0.120	0.163	0.390	0.047	0.803	0.225	0.232	0.176	0.353	−0.075	0.693	−0.405	0.068

注：采用 *Spearman* 相关性分析，ρ 表示相关系数，*P* 表示显著性；FBG. 空腹血糖；GSP. 糖化血清蛋白；Insulin. 胰岛素；LDH. 乳酸脱氢酶；HBDH. α－羟基丁酸脱氢酶；HCY. 同型半胱氨酸；* *P* < 0.05，** *P* < 0.01。

大鼠 iWAT 和 eWAT 中 HMGCR 蛋白表达水平，而未能有效升高脂肪组织中 SQLE 蛋白表达水平，二甲双胍对 HMGCR、SQLE 蛋白水平均无显著影响。甲羟戊酸途径由超过 20 步的反应构成，其中 HMGCR 催化了胆固醇合成过程的第 3 步反应甲羟戊酸的生成，SQLE 催化了第 9 步反应即角鲨烯向单氧角鲨烯的生成[32]。甲羟戊酸途径不仅合成胆固醇及甾醇中间体（HMGCR 和 SQLE 均参与此过程），还合成非甾醇中间体（被称作甲羟戊酸途径的非甾醇分支，而 HMGCR 参与此分支，SQLE 不参与），如异戊烯基二磷酸/焦磷酸、香叶基二磷酸－焦磷酸（GPP）、法尼基二磷酸或焦磷酸（Farnesyl diphosphate/pyrophosphate，FPP）和香叶基双磷酸/焦磷酸盐（Geranylgeranyl diphosphate/pyrophosphate，GGPP）等，这些非甾醇类异戊二烯对正常细胞功能至关重要，如小 GTPases 的异戊二烯化（法尼酰化或香叶基－香叶基化）和异戊烯基化 tRNA 的合成。此外，FPP 和 GGPP 被用于合成其他必需的非甾类异戊二烯，如泛醌－10 和血红素（电子传输）、多萜醇（天冬酰胺连接的糖蛋白合成）。其中 GGPP 能与稳定 HMGCR 的 UbiA 异戊二烯基转移酶结构域含蛋白－1（UbiA prenyltransferase domain－containing protein－1，UBIAD1）结合，导致 UBIAD1 与 HMGCR 的解离，便于 HMGCR 的内质网相关的降解过程（ER－associated degradation，ERAD）[33]。本研究发现 GQD 能有效上调 HMGCR 蛋白水平，但对 SQLE 的蛋白水平无显著影响，这提示 GQD 可能参与调节了脂肪组织甲羟戊酸途径的非甾醇分支的代谢，但不影响胆固醇和甾醇中间体的合成。因此 GQD 可能不是通过调节胆固醇的合成来上调组织胆固醇水平。但 GQD 可能通过上调 HMGCR 蛋白水平促进脂肪组织非甾醇中间体 GGPP 的合成，来反馈抑制 HMGCR 蛋白水平，这也反映了组织对于胆固醇合成的严密调控。当然，GQD 还可能通过上调其他非甾醇中间体如 GPP、FPP 等发挥作用，但具体发挥怎样的作用，如何起作用，与 GQD 上调胆固醇水平的具体关系是什么，目前并

不清楚,未来需要进一步研究。有意思的是,二甲双胍并不能有效升高 SQLE 和 HMGCR 蛋白水平,提示二甲双胍可能与 GQD 的调控机制不同。我们进一步探讨了 GQD 是否通过调节 HMGCR 和 SQLE 的转录水平发挥作用,有意思的是,在转录水平上,二甲双胍和低剂量 GQD 对 *Hmgcr* 和 *Sqle* mRNA 水平均无显著影响,而高剂量 GQD 能有效降低了 T2DM 大鼠 eWAT 中 *Hmgcr* mRNA 水平。这说明,GQD 对 eWAT 的 HMGCR 蛋白水平的上调作用并不是通过调节其转录水平实现的。高剂量 GQD 能有效降低 T2DM 大鼠 eWAT 的 *Hmgcr* mRNA 水平,这可能与高剂量 GQD 组的高胆固醇水平有关,因为高胆固醇水平会反馈抑制 *Hmgcr* 基因的转录[9]。另外,在 iWAT 中,低剂量和高剂量 GQD 尽管对 *Hmgcr* mRNA 水平无显著影响,但是与 T2DM 组比较,都有升高 *Hmgcr* mRNA 水平的趋势($P=0.08$,$P=0.06$),这提示在 iWAT 中 GQD 通过一定程度促进 *Hmgcr* 基因转录来上调其组织中 HMGCR 蛋白水平。这些结果也表明不同的脂肪组织即使相同基因,其表达调控的模式也可能不同。综上所述,GQD 可能未促进脂肪组织胆固醇的合成,但可能主要通过转录后调控升高 HMGCR 蛋白水平,进而可能调节甲羟戊酸途径的非甾醇分支代谢。

DNA 甲基化是调控基因转录的重要表观遗传学修饰[34]。本研究中,T2DM 组 iWAT 中 *Hmgcr* 基因 CAs 位点甲基化水平比 CON 组有降低趋势($P=0.09$),其甲基化水平与 FBG 和 GSP 均呈显著负相关;T2DM 组 eWAT 中 *Hmgcr* 基因 CAs 位点甲基化水平比 CON 组也有降低趋势($P=0.08$),甲基化水平与 FBG 呈一定负相关($\rho=-0.327$,$P=0.077$),与血清胰岛素水平呈一定正相关($\rho=0.334$,$P=0.071$);eWAT 中 *Hmgcr* 基因 CG3 位点甲基化水平比 CON 组显著降低($P<0.05$),且这些位点甲基化水平与 FBG 和 GSP 呈显著负相关,与血清胰岛素水平呈显著正相关。因此,提示这些位点的低甲基化可能与糖尿病的发生发展密切相关。但是这些位点与糖尿病发生发展的具体因果关系,目前并不清楚。二甲双胍能有效升高 eWAT 中 *Hmgcr* 基因 CH 和 CAs 位点的甲基化水平,这与前人报道的二甲双胍能促进一些基因的高甲基化一致[35],这也可能是二甲双胍有效治疗糖尿病的作用机制之一。然而,GQD 对两种脂肪组织的 *Hmgcr* 和 *Sqle* DNA 甲基化水平没有显著调节作用,提示 GQD 对这两种组织的两个基因甲基化影响不明显。此外,尽管 iWAT 中的 *Hmgcr* 基因 CG1 位点、*Sqle* 基因的 CH、CAs 位点、eWAT 中的 *Hmgcr* 基因 CCs 位点甲基化均与血清胰岛素水平呈显著负相关,但是这些位点甲基化水平在各组之间并无显著差异,提示这些位点的甲基化可能与糖尿病发生发展并不紧密相关。

本研究在分析 *Hmgcr* 和 *Sqle* DNA 甲基化与生理生化指标相关性分析时还发现,iWAT 和 eWAT 中 *Hmgcr* 基因 CAs 位点、eWAT 中的 CG3 位点甲基化水平均与血清 HCY 呈显著正相关。HCY 是机体甲基重要的活性供体 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine,SAM)代谢的重要产物之一,血清高 HCY 伴随相关基因的高甲基化[36]。此外,iWAT 和 eWAT 中 *Hmgcr* 基因 CAs 位点甲基化与血清 LDH 和 HBDH 均呈显著正相关,有研究者报道结肠癌患者血清高 LDH 水平伴随解旋酶样转录因子(Helicase-like transcription factor,HLTF)和增生性息肉蛋白 1(Hyperplastic polyposis 1, HPP1)基因的高甲基化[37],这提示了 LDH 与一些基因高甲基化的关系。尽管鲜少有 HBDH 与 DNA 甲基化关系的报道,但是 HBDH 是利用 α-酮酸为底物测得的 LDH1 和 LDH2 所反映出的活性,与 LDH 密切相关[38],因此其与相关基因位点甲基化水平与 LDH 表现类似是可能的。有意思的是,iWAT 中 *Sqle* 基因的 Total C、CGs 和 CAs 位点甲基化均与 LDH 和 HBDH 呈显著负相关,这可能是因为不同基因在不同组织中其甲基化的模式并不相同。当然关于血清 LDH 和 HBDH 水平与 DNA 甲基化具体因果关系,目前并不清楚,相信随着对 DNA 甲基化与表型功能关系研究的深入,这些疑惑终将会被解答。

此外,本研究结果还显示 iWAT 的 *Hmgcr* 基因 CH 位点甲基化与该基因 mRNA 水平呈正相关,eWAT 的 *Hmgcr* 基因 CG3 位点甲基化与该基因 mRNA 水平呈正相关。然而,二甲双胍和 GQD 对这些位点的甲基化水平均无显著影响,这就提示这两类药物对脂肪组织 *Hmgcr* 的转录调控不是通过影响其甲基化来实现。

总之,本次研究发现二甲双胍和高剂量 GQD 均能够有效逆转高脂饲料+STZ 诱导的 T2DM 大鼠 iWAT 和 eWAT 中胆固醇水平的降低,但这种调节作用可能不是通过调节胆固醇合成来实现的。但 GQD 可能通过对 HMGCR 的转录后调控来促进甲醛戊酸途径的非甾醇分支代谢。*Hmgcr* 基因在 iWAT 和 eWAT 中的 CAs 位点低甲基化、在 eWAT 中 CG3 位点的低甲基化可能与糖尿病发生发展密切相关,而二甲双胍能有效升高 eWAT 中 *Hmgcr* 基因的 CAs 位点甲基化水平,这也许是二甲双胍发挥治疗糖尿病作用的机制之一。

参考文献

[1] 周琦, 朱向东, 仝小林, 等. 葛根芩连汤对 2 型糖尿病模型大鼠胰岛细胞 IRS-2/PI3K-Akt 通路的影响[J]. 中医杂志, 2018, 59(11): 973-977.

[2] 刘莲萱, 张会永, 庞琳琳, 等. 葛根芩连汤治疗 2 型糖尿病研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(2): 83-87.

[3] 罗新新, 朱水兰, 李冰涛, 等. 葛根芩连汤激活 PPARγ 上调脂联素和 GLUT4 表达改善脂肪胰岛素抵抗[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23): 4641-4648.

[4] 杨霞,朱向东,王志刚,等.葛根芩连汤治疗 2 型糖尿病的研究进展[J].慢性病学杂志,2022,23(5):717-720.

[5] LAY S L, KRIEF S, FARNIER C, et al. Cholesterol, a cell size-dependent signal that regulates glucose metabolism and gene expression in adipocytes [J]. J Biol Chem, 2001, 276 (20): 16904-16910.

[6] PARPAL S, KARLSSON M, THORN H, et al. Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control [J]. J Biol Chem, 2001, 276 (13): 9670-9678.

[7] GRZYBEK M, PALLADINI A, ALEXAKI V I, et al. Comprehen-

sive and quantitative analysis of white and brown adipose tissue by shotgun lipidomics[J]. Mol Metab, 2019, 22: 12 - 20.
[8] 王琳琳, 胡可佳. 葛根芩连汤对肥胖小鼠的脂质代谢的作用及其机制研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2021, 16(7): 1231 - 1236, 1243.
[9] LUO J, YANG H Y, SONG B L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(4): 225 - 245.
[10] PAULAZO M A, SODERO A O. SIRT - 1 activity sustains cholesterol synthesis in the brain[J]. Neuroscience, 2021, 476: 116 - 124.
[11] SUN H S, LI L, LI W, et al. p53 transcriptionally regulates SQLE to repress cholesterol synthesis and tumor growth[J]. EMBO Rep, 2021, 22(10): e52537.
[12] KIM S, SOHN I, AHN J I, et al. Hepatic gene expression profiles in a long - term high - fat diet - induced obesity mouse model[J]. Gene, 2004, 340(1): 99 - 109.
[13] WANG S, MATTHAN N R, WU D Y, et al. Lipid content in hepatic and gonadal adipose tissue parallel aortic cholesterol accumulation in mice fed diets with different omega - 6 PUFA to EPA plus DHA ratios[J]. Clin Nutr, 2014, 33(2): 260 - 266.
[14] HE L, HUANG H, BRADAI M, et al. DNA methylation - free *Arabidopsis* reveals crucial roles of DNA methylation in regulating gene expression and development[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 1335.
[15] PITTELLA - SILVA F. Targeting DNA methylation as an epigenetic leukocyte counting tool[J]. Clin Chem, 2022, 68(5): 613 - 615.
[16] BRULPORT A, VAIMAN D, BOU - MAROUN E, et al. Hepatic transcriptome and DNA methylation patterns following perinatal and chronic BPS exposure in male mice[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 881.
[17] 陈永强, 龚淑芳, 黄鑫, 等. 葛根芩连汤对胰岛素抵抗大鼠脂肪组织 FASN 酶活性及其基因表达和甲基化水平影响的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(2): 398 - 405.
[18] 李娟娥, 王磊, 秦灵灵, 等. 自发性 2 型糖尿病啮齿类动物模型研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 267 - 271.
[19] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real - time quantitative PCR and the 2(- Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402 - 408.
[20] LA ROSE A M, BAZIOTI V, WESTERTERP M. Adipocyte membrane cholesterol regulates obesity[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38(4): 687 - 689.
[21] YU B L, ZHAO S P, HU J R. Cholesterol imbalance in adipocytes: a possible mechanism of adipocytes dysfunction in obesity[J]. Obes Rev, 2010, 11(8): 560 - 567.
[22] WANG J, XIAO Q Q, WANG L Y, et al. Role of *ABCA*1 in cardiovascular disease[J]. J Pers Med, 2022, 12(6): 1010.
[23] CUFFE H, LIU M X, KEY CC C, et al. Targeted deletion of adipocyte Abca1 (ATP - binding cassette transporter A1) impairs diet - induced obesity[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38(4): 733 - 743.
[24] HU D, GUO Y H, WU R R, et al. New insight into metformin - induced cholesterol - lowering effect crosstalk between glucose and cholesterol homeostasis via ChREBP (carbohydrate - responsive element - binding protein) - mediated PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) regulation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021, 41(4): e208 - e223.
[25] 柳荣, 王佳慧, 杨霞, 等. 加味葛根芩连汤对 2 型糖尿病 db/db 小鼠 FXR/SHP/PPARα 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(20): 1 - 8.
[26] BARRIENTOS G, SÁNCHEZ - AGUILERA P, JAIMOVICH E, et al. Membrane cholesterol in skeletal muscle: a novel player in excitation - contraction coupling and insulin resistance[J]. J Diabetes Res, 2017, 2017: 3941898.
[27] 关晓文, 梁永林, 朱向东, 等. 葛根芩连汤对 2 型糖尿病 db/db 小鼠胰腺组织 PERK/ATF4/CHOP 信号通路的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2024, 31(1): 97 - 103.
[28] NGUYEN C, SAINT - POL J, DIB S, et al. 25 - Hydroxycholesterol in health and diseases[J]. J Lipid Res, 2024, 65(1): 100486.
[29] 杨帆. C—Myc 通过转录激活 SQLE 促进胆固醇合成以及细胞增殖[D]. 北京: 中国医学科学院, 2021.
[30] DING J Z, REYNOLDS L M, ZELLER T, et al. Alterations of a cellular cholesterol metabolism network are a molecular feature of obesity - related type 2 diabetes and cardiovascular disease[J]. Diabetes, 2015, 64(10): 3464 - 3474.
[31] YING S, SUN Y M, LIU X M, et al. Effect of ScrF I polymorphism in the 2nd intron of the *HMGCR* gene on lipid - lowering response to simvastatin in Chinese diabetic patients[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 363(2): 395 - 398.
[32] DEBOSE - BOYD R A. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol - accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase[J]. Cell Res, 2008, 18(6): 609 - 621.
[33] FAULKNER R, JO Y. Synthesis, function, and regulation of sterol and nonsterol isoprenoids[J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 1006822.
[34] 张淼, 杨露露, 贾岩龙, 等. DNA 甲基化和组蛋白甲基化修饰的表观遗传调控作用研究进展[J]. 生物技术通报, 2022, 38(7): 23 - 30.
[35] ZHONG T, MEN Y, LU L, et al. Metformin alters DNA methylation genome - wide via the H19/SAHH axis[J]. Oncogene, 2017, 36(17): 2345 - 2354.
[36] WANG S D, WANG X, ZHAO Y, et al. Homocysteine - induced disturbances in DNA methylation contribute to development of stress - associated cognitive decline in rats[J]. Neurosci Bull, 2022, 38(8): 887 - 900.
[37] PHILIPP A B, NAGEL D, STIEBER P, et al. Circulating cell - free methylated DNA and lactate dehydrogenase release in colorectal cancer[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 245.
[38] 余杏, 卢孝东, 王永卿, 等. 急性白血病患者血清中 LDH 和 HBDH 水平检测的临床意义[J]. 吉林大学学报(医学版), 2012, 38(5): 942.