

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫 : 沒食子酸透過 miR-494-3p 與 miR-7647-3p 抑制第 2 型 *
* 名稱 : 糖尿病性脂肪肝炎之作用與機轉 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 楊繼勛
學生計畫編號： MOST 106-2813-C-040-041-B
研究期間： 106 年 07 月 01 日至 107 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指導教授： 王朝鐘

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1 年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生化微物免疫研究所

中華民國 107 年 03 月 31 日

(一) 摘要

糖尿病被認為是一種慢性代謝性疾病，主要致病原因是由於胰島素分泌不足或身體無法有效利用胰島素，使血糖濃度維持高於標準值，並導致脂肪、蛋白質及碳水化合物代謝異常。第二型糖尿病又稱為非胰島素依賴型糖尿病(non insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM)，主要由胰島素抗性或相對缺乏胰島素所造成，此類型的病患容易因肥胖或是脂肪過多造成脂肪肝等病症，若惡化可能還會導致肝硬化或肝癌的產生。

本實驗室致力於糖尿病相關副病症之研究，先前透過動物實驗以高油脂飼料(high fat diet, HFD) 餵食高血糖動物 db/db mice，成功誘導產生糖尿病副病變—糖尿病性脂肪肝炎(diabetic steatohepatitis)，並在飼養過程中持續餵食酚酸-沒食子酸(gallic acid, GA)，結果表明 GA 具有保護肝臟之作用，再利用 miRNA microarray 分析肝臟組織中 miRNA 變化差異，推測 GA 可能是透過調控 miRNA 的表現來達成調節肝臟脂肪生成與促進脂肪分解之作用。

故此研究透過細胞模式建立高糖(high glucose)與高油脂(oleic acid/palmitic acid)的環境來誘導 HepG2 cell 產生肝臟細胞內脂肪堆積之模式，模擬肝臟細胞處於第二型糖尿病中高血脂環境所誘發的脂肪肝炎，並觀察加入 GA 後之變化，再透過 oil-red O strain 觀察細胞內脂滴之變化、western blot 分析脂肪合成蛋白 FASN, SREBP1 表現與 q-PCR 分析 miR-494-3p、miR-7647-3p 及 miR-34a-5p 之變化。結果顯示 GA 能夠有效減少肝細胞內多餘的脂滴並降低 FASN, SREBP1 的蛋白表現，而原本欲做 miR-494-3p、miR-7647-3p 結果卻不如預期，因而改做同樣是先前 microarray 分析中前五名之 miR-34a-5p，發現 GA 能有效調控 miR-34a-5p，經 miRNA mimic 與 inhibitor 分析顯示調控 miR-34a-5p 可影響 FASN, SREBP1 的表現，透過 target scan 網站分析 miRNA 相關之 target genes 可能為 nfe2l2 (nrf2) 並評估 GA、miR-34a-5p 與 nfe2l2 之關聯性，推測 GA 可能透過抑制 miR-34a-5p 調控 nfe2l2 的表現進而達成護肝作用。

(二) 研究動機與目的

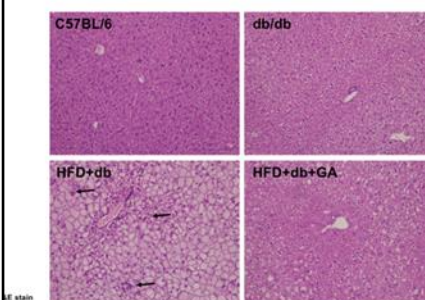
近年來在台灣依健保的資料，就醫且服藥治療的糖尿病人在 1998 年約總人口之 2.62%，但是 2003 年已攀升到 3.8%，逐年增加的幅度約為 0.2%，這個比率表明了台灣糖尿病患者急速增加，衛生署 104 年死因統計報告結果顯示國人前十大死因位居第五名的即是糖尿病，但真正的死因並非由糖尿病直接導致而成，而是因糖尿病併發而來的副病症所導致，如糖尿病視網膜病變、糖尿腎，還有糖尿病性脂肪肝(diabetic steatohepatitis)，這些疾病往往都是由糖尿病所觸發，其中糖尿病性脂肪肝若惡化恐會變成肝炎或是肝硬化，甚至肝癌。而本實驗室希望透過攝食天然中草藥的方式控制或是改善這些副病症，我們將先天性患有糖尿病的老鼠(db/db mice)餵食高油脂飲食(high fat diet)誘發其產生糖尿病性脂肪肝，飼養期間以管餵方式餵食多酚成分-沒食子酸(gallic acid)，結果發現 HFD 確實誘導小鼠糖尿病性脂肪肝，而餵食有添加 GA 這種酚酸物質的老鼠則有效保護肝臟，使其恢復成正常肝組織的模樣。利用 miRNA microarray 分析找出 miR-494-3p、miR-7647-3p 及 miR-34a-5p 可能參與在調控糖尿病性脂肪肝生成作用當中。已知 GA 具有保護肝臟的醫學功能，而 GA 同時具有調控 miRNA 表現之作用，因此本研究想要利用細胞實驗證實並探討 GA 是否會透過調控 miR-494-3p、miR-7647-3p 及 miR-34a-5p 的表現進而影響糖尿病性脂肪肝生成，並希望此次實驗之研究結果可以作為改善糖尿病性脂肪肝等相關病症的參考文獻資料。

Table 1. The plasma biochemical parameters and hepatic lipid contents in HFD-fed db/db mice

	C57BL/6	db/db	HFD+db/db	HFD+db/db+GA
AST (U/L)	139.00 ± 45.00	160.67 ± 21.18	311.33 ± 11.25 ^a	212.50 ± 42.50 ^b
ALT (U/L)	34.50 ± 1.50	87.67 ± 4.48	441.00 ± 22.47 ^a	219.50 ± 49.50 ^b
BUN	30.75 ± 3.25	30.03 ± 1.72	19.26 ± 1.27 ^a	15.50 ± 0.00 ^b
CRE (mg/dL)	0.40 ± 0.00	0.50 ± 0.17	0.60 ± 0.10 ^a	0.50 ± 0.00
UA	4.25 ± 0.35	7.70 ± 0.00	7.30 ± 0.65	5.50 ± 0.00 ^b
Cholesterol (mg/dL)	102.50 ± 21.50	139.00 ± 5.13	473.66 ± 27.88 ^a	445.50 ± 13.50 ^b
TG (mg/dL)	73.00 ± 8.00	123.00 ± 40.10	227.33 ± 17.89 ^a	144.00 ± 39.00 ^b
HDL-C (mg/dL)	52.00 ± 9.00	76.50 ± 5.50	289.30 ± 12.86 ^a	271.00 ± 0.01 ^b
LDL-C (mg/dL)	36.00 ± 11.00	22.00 ± 0.00	159.66 ± 17.67 ^a	145.50 ± 21.50
HbA1c (%)	4.65 ± 0.49	8.43 ± 0.55	8.16 ± 0.47	8.75 ± 0.21
Insulin (pg/L)	1.03 ± 0.09	5.24 ± 0.37	7.26 ± 0.83 ^a	5.20 ± 0.51 ^b

C57BL/6, C57BL/6 mice were fed with normal diet group; db/db, db/db mice were fed with normal diet group; HFD, db/db mice were fed with HFD group; Each value is expressed as the mean ± SD (*n* = 6/group). Results were statistically analyzed with ANOVA. *a*, *p* < 0.05 compared with the db/db group. *b*, *p* < 0.05 compared with the HFD+db group.

GA prevents hepatic steatosis in HFD-fed db mice



(三) 文獻回顧與探討

1. 第二型糖尿病(type II diabetes, T2DM)

第二型糖尿病(type II diabetes, T2DM) 又稱非胰島素依賴型糖尿病(noninsulin dependent diabetes mellitus, NIDDM)。在存在胰島素抵抗的情況下，如果 β 細胞能代償性增加胰島素分泌，則可維持血糖正常；當 β 細胞功能有缺陷、對胰島素抵抗無法代償時，就會發生第二型糖尿病。胰島素抵抗和胰島素分泌缺陷是第二型糖尿病發病機制的兩個要素，不同患者其胰島素抵抗和胰島素分泌缺陷所具有的重要性不同，同一患者在疾病進展過程中兩者的相對重要性也可能發生變化[1][2]。

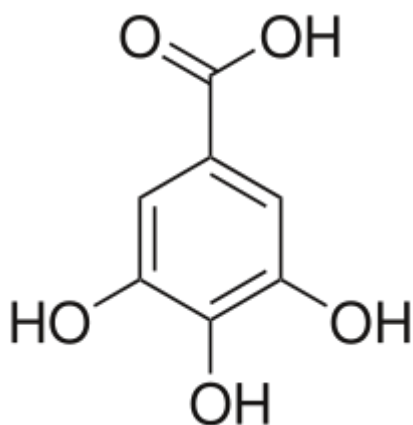
2. 糖尿病性脂肪肝炎(diabetic steatohepatitis)

糖尿病患者因長期處於高血糖下，使得相關大分子糖化進而氧化造成器官受損或是機能障礙，其併發症出現於腦部、眼睛、心血管、肝臟、腎臟、神經系統、脂肪肝炎、腎臟病變等[3]。其中併發症之脂肪肝炎屬於非酒性脂肪肝(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)，有研究指出常與肥胖、血脂異常、胰島素阻抗及第二型糖尿病等有關，因第二型糖尿病會造成胰島素阻抗的發生，促使胰島素代償性的分泌、胰島素敏感性下降，進而造成脂質分解(lipolysis)導致游離脂肪酸增加，而大量增加的游離脂肪酸會堆積在肝臟中，造成脂肪肝[4]。在過去研究中脂肪肝的形成與麩胺酸轉胺酶(aspartate aminotransferase, AST)及丙胺酸轉胺酶(alanine aminotransferase, ALT)的活性上升有密切關係，具研究統計在糖尿病患者中約有17%的人AST異常，33%的人ALT異常。由於ALT為較敏感的肝功能指數，所以也被當作第二型糖尿病的預測指標，同時ALT屬升糖性的一種酵素，所以也可當作為胰島素阻抗的指標[5-7]。

3. miRNA 調控糖尿病副病變之相關機制

研究指出miR-29在心肌梗塞的情況下，會抑制ECM(extracellular matrix)，使心臟纖維化[8]；相同的miR-21促進MAPK pathway導致心臟纖維化的發生[9]；miR-668會調控*WFS1*的表現，影響Wolfram Syndrome[10]；miR-27b會調節血管生成並促進傷口癒合[11]；miR-375參與MIN6 cell中葡萄糖刺激胰島素分泌的調節[12]；miR-103 and miR-107會影響胰島素敏感性[13]；miR-29a/b會誘導細胞產生胰島素抵抗[14]；miR-144抑制胰島素傳導信號中的關鍵分子*IRS1*基因[15]；miRNA-192通過抑制E-box repressors調節在腎小球中TGF- β 誘導膠原的功能[16]；miR-126會經由PI3K和MAPK pathway促使血管新生作用[17]；在缺氧的環境下，miR-210和miR92a分別促進或抑制缺血性血管新生的作用，亦會藉由調控ECs來影響動脈粥狀硬化的情形[18-20]；miR-291b-3p會調控AMPK影響脂肪合成，亦會針對p65上調節PTEN的表現，影響PI3K/Akt pathway，調節葡萄糖代謝[21-22]。

4. 沒食子酸 (gallic acid, GA)



GA 又稱五倍子酸，富含於沒食子(gallnuts)，

茶葉(tea leaves)，樹皮(bark)，綠茶(green tea)，蘋果皮(apple peels)，葡萄 (grapes)，草莓(strawberries)，鳳梨(pineapples)，香蕉(bananas)，檸檬(lemons)與紅白酒(red and white wine)當中。目前已知相關醫學功能有抗過敏(antiallergic)，抗突變(antimutagenic)，抗發炎(anti-inflammatory)與抗癌劑(anticarcinogenic agent)，而 GA 又是天然的強抗氧化劑(strong natural antioxidant)[23]。有文獻指出 GA 具有改善 APAP 所誘導的肝損傷[24]；GA 可以在缺血-再灌流的情況下降低肝毒性的產生，顯示 GA 具有保護肝臟之能力[23]；另外也有研究說明 GA 透過增加 miR-518b 的表現，造成軟骨肉瘤細胞(chondrosarcoma, SW13351 cells)的死亡與抑制細胞的轉移作用[25]；而 GA 也會增加 miR-17-3p, miR-21-5p 與 miR-421-5p 的表現，進而抑制神經瘤細胞(glioma, T98G cells)的生長，達到抑制癌症之目的[26]，顯示 GA 確實具有調控 miRNA 的作用。

5. miR-34a-5p

miR-34a-5p 相關文獻普遍在癌症研究與細胞凋亡研究上，已經有研究證明抑制 miR-34a-5p 會促使子宮內膜癌形成[27]；而在另一篇研究也有提到 miR-34a-5p 會通過 target Sirt1 增強使心肌細胞凋亡，激活 miR-34a-5p / Sirt1 / p66shc 途徑有助於 doxorubicin 誘導的心臟毒性[28]；在肝癌與氧化壓力的研究中指出 miR-34a-5p 會受到 P53 的調節，參與了氧化壓力反應進而影響肝癌的發生[29]；鮮少研究有指出 miR-34a-5p 與糖尿病性脂肪肝其相關性，但在我們之前的 microarray 分析中，miR-34a-5p 分數卻相當的高，這說明了 miR-34a-5p 在糖尿病性脂肪肝的研究中極具潛力。

(四) 研究方法及步驟

1. 誘導人類肝臟細胞株產生細胞內脂肪堆積之模式

人類肝臟細胞株 HepG2 培養於 DMEM 培養液中(pH 7.3)，培養液中含 10% fetal bovine serum (FBS)，200 mM glutamine，0.1 mM non-essential amino acids，1.5 g/L sodium bicarbonate 與 1 mM sodium pyruvate。解凍後繼代培養在 37 °C，5% CO₂ 之培養箱。每次實驗前依各實驗需求，計算不同之細胞密度，將 HepG2 細胞培養於 culture dish，待細胞型態展開後，加入 25 mM high glucose (模擬高血糖環境)，0.3 mM oleic acid (OA)與 0.15 mM palmitic acid (PA) (模擬高血脂環境)於 DMEM 培養，待反應作用 24 小時後誘導肝臟細胞產生脂質堆積，模擬糖尿病性脂肪肝的產生，期間再加入 GA 與 miRNA mimics 或 miRNA inhibitor，分析 GA 是否透過調控 miRNA 來達到抑制糖尿病性脂肪肝之產生，並探討其中之機轉變化。OA 與 PA 需事先與 BSA 混合均勻，在 37 °C 恆溫培養箱中反應 24 小時。之後移除培養液，並以 PBS 潤洗細胞 1~3 次後，進行以下分析試驗。

2. 油紅染色 (Oil red staining)

Oil red 是一種對脂質具有親和性之染劑，利用染色後呈現的紅顏色反應細胞內中性脂肪的含量。將欲染色的細胞以 PBS 沖洗 2~3 次，加入 4 % paraformaldehyde 固定 1 小時，加入 Oil Red 染劑(3 mg/mL)室溫下染色 15 分鐘，再將多餘染劑後洗去，在每盤細胞內滴入少許 PBS，以倒立式顯微鏡拍照。

3. 細胞存活測試(MTT assay)

取 1×10^5 /well 的 HepG2 cell 以不同濃度的 GA 處理後種入 96 孔盤並以加入 PBS 做為控制組培養 24 小時。之後每個 well 加入 10 μ L 之 MTT 在 37°C 下進行反應 2 小時，隨後將液體吸乾，每個 well 加入 100 μ L 之 isopropanol 後靜置 10 分鐘，將經細胞反應 MTT 所產生的 formazan 以 isopropanol 溶出，以盤式分光光度計量測 563 nm 波長測量其吸光值。

4. 西方點墨法(Western blot)

收取 HepG2 cell，加入 RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 50 mM Tris-base, pH7.5)和 protease inhibitor (100:1)在冰上研磨組織，以 10,000 rpm、4°C 離心後取上清液，取上層液定量蛋白，將定量後之蛋白取 50 μ g，以 SDS-PAGE 分析蛋白的表現，包含 FASN, SREBP1 等，再以 Fujifilm Multi Gauge 軟體定量分析。

5. RNA 萃取 (RNA Extraction)

人類肝癌細胞 HepG2 經過處理後，將細胞加入 0.5 mL Trizol，放置於室溫 5 分鐘。加入 0.2 mL 氯仿(chloroform)手搖均勻混合 30 秒，在放置於室溫 5 分鐘，以 4°C；12000 rpm 離心 15 分鐘。取到上清液到新的微量離心管，加入 Isopropanol 0.5 mL，其主要為沈澱 RNA，放置於室溫 10 分鐘，再以 4°C；12000 rpm 離心 10 分鐘。去除上清液並確定有白色沈澱物產生，加入 -20°C 酒精清洗

RNA。抽掉酒精，放置於室溫或真空離心。風乾後之 RNA 加入適當之 DEPC 水，將 RNA 樣品稀釋並利用吸光值 260/280 比值(1.8-2.0 ; 1 O.D = 40 ng/ μ L)，定量並進行稀釋為 1 μ g/ μ L 進行逆轉錄聚合酶鏈式反應。

6. 逆轉錄聚合酶鏈式反應 (Reverse transcription PCR)

逆轉錄聚合酶鏈式反應試劑使用 Promega GoScript Reverse Transcription System，RNA 總量不超過 5 μ g，加入 1 μ L random primer 以及 Nuclease-free water 調整體積為 5 μ L，加熱 75 $^{\circ}$ C ; 5 分鐘後，稍微 spin down 後，在立即置於冰上。製備反應所需之溶液含 4 μ L Goscript 5X reaction buffer，2 μ L MgCl₂，1 μ L PCR Nucleotide Mix Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor，0.2 μ L GoScript Reverse Transcriptase，使總體為 20 μ L 均勻混合，避免劇烈震盪。在 25 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘，目的為了使 RNA 與 Primer 進行黏合作用，42 $^{\circ}$ C 反應 1 小時進行反轉錄作用，在 70 $^{\circ}$ C 反應 15 分鐘降溫至 4 $^{\circ}$ C，保存 -20 $^{\circ}$ C 備用進行即時聚合酶鏈式反應(Q-PCR)。

7. 基因轉染 (Transfection)

T-Pro Non-liposome transfection Reagent 轉染試劑，為一種轉染效率高且低細胞毒性之真核細胞轉染試劑。T-Pro Non-liposome transfection Reagent 是藉由其本身陽離子與 DNA 形成聚合型態分子，來提升轉染效率且不具有細胞毒性。將萃取的質體與 T-Pro Non-liposome transfection Reagent II 以 1 : 2 的比例進行基因之轉殖。以六公分培養皿為例，取 15 μ g 質體 DNA 加入 5 mL 不含血清及抗生素之細胞培養基均勻混合。取 30 μ L 的 T-Pro Non-liposome transfection Reagent II 加入上述 DNA 混合物進行混合，經均勻混合後於室溫下靜置 15 分鐘。再將混合液均勻滴於培養皿內(含有細胞及血清培養液)，前後左右均勻搖晃之方式使其均勻混合，將轉染後之細胞置於 37 $^{\circ}$ C 含有 5% CO₂ 的培養箱中培養，經 18 至 48 小時後利用 Q-PCR 或西方點墨法確認轉染及表現效率。

8. miRNA 標的基因測試(luciferase assay)

本實驗使用的各個不同長度 nfe2l2 promoter 質體(plasmid)，所有的 nfe2l2 promoter 片段(3.2 kb，1.7 kb，0.5 kb PGL3-basic vector)都接在 PGL3-basic vector 上。上述的質體都接有螢火蟲的螢光基因(firefly luciferase)，藉著測量螢光強度就可以得知 nfe2l2 promoter 表現的情形。本實驗同時轉染 pRL-CMV vector (Promega)當作 internal control。pRL-CMV vector 上帶有另一種螢光基因(Renilla luciferase)，且其具備 CMV immediate early enhancer/promoter 區段，故在轉染進細胞後，不需經由藥物刺激就可以發出螢光，因而可以用來作為本次實驗 nfe2l2 promoter 螢光強度的基準點(internal control)。本實驗的目的在於觀察不同長度 nfe2l2 promoter 在人類肝臟細胞內的表現情形。為了讓每個 well 內的細胞都轉染到相同重量(2 ng/well)的 DNA 量，較小片段的質體會補上 Vector DNA (PGL3-basic)一起進行轉染。將相同 mole 的不同長度 nfe2l2 promoter DNA 片段(3.2 kb，1.7 kb，0.5 kb PGL3-basic vector)以及 pRL-CMV-vector 分別溶解在 DMEM 內(DMEM 不含血清及 抗生素，每種 DNA 片段的溶液總體積為 1600 μ L)，再和相同體積稀釋過的 lipofectamine (88 μ L lipofectamine + 1512 μ L DMEM)

混合，於室溫下放置 30 分鐘。接著，加入 12.8 mL DMEM 混合均勻後，於每個 well 內加入 680 μ L 混合液培養 6 小時，再於每個 well 內加入 160 μ L 含有 50% FBS 的 DMEM (最終 FBS 濃度為 10%)繼續培養 8-10 個小時，之後再置換為正常的培養液(DMEM with 10% FBS, penicillin 100 μ g/mL, streptomycin 100 unit/mL) 培養兩天。待時間到達，吸除培養液，並依實驗需要分別加入 25 mM high glucose 與 oleic acid / palmitic acid (O/P)的 DMEM 培養，期間再分別加入 GA 與 miRNA mimics 或 miRNA inhibitor 刺激 6 小時。待藥物作用的時間到達後，每個 well 以 PBS 清洗兩次，之後於每個 well 內加入 250 μ L passive lysis buffer，搖晃約 15 分鐘後，以刮勺將細胞刮離 well 底部，並將樣本保存在-20°C 等待進一步進行螢光酶的分析測定。接著再以 Dual-luciferase assay system (Promega)的試劑組來反應偵測螢光，將從-20°C回溫至室溫的樣本取 20 μ L，加入 LarII 100 μ L 混合後以 topcount 儀器偵測 firefly luciferase 活性，再加入 100 μ L stop 與 Glo reagent 來偵測 Renilla luciferase 活性而得到結果。

(五) 實驗結果

誘導 HepG2 cell 產生肝臟細胞內脂肪堆積

首先種 5×10^5 個/well HepG2 cell 於 6-well 盤中，待 24 小時貼盤後，分別加入 25 μM High glucose、300 μM Oleic acid、150 μM Palmitic acid 與 20% BSA，培養 24 小時後以 oil-red O strain 觀察細胞內脂滴變化。

OA 為單元不飽和脂肪酸，存在於動植物體內，是人體脂肪組織中最豐富的脂肪酸；PA 為飽和脂肪酸，在自然界中分布很廣。以 OA 與 PA 混合誘導細胞，除了能夠減少 OA 或 PA 使用的劑量，減少細胞毒性，更能夠成功誘導細胞內脂肪堆積。經染色後的觀察可以看到(Fig. 1)，單獨加入 OA 或單獨加入 PA 得組別就可以使細胞產生多餘的脂滴，而將 OA 與 PA 一起混入的組別(O/P)，細胞內的脂滴產生最多，額外加入的 High glucose 亦使細胞長時間處於高糖環境，以此種方式模擬人類於糖尿病高糖環境下脂肪肝的環境，再進行以下實驗。

建立 Gallic Acid (GA)有效濃度

取 1×10^5 /well 的 HepG2 cell 以 10 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM GA 處理後種入 96 孔盤，並以加入 PBS 做為控制組培養 24 小時後，以 MTT assay 測其細胞存活率。

由結果可以得知 GA 對於細胞存活影響不大(Fig. 2)，在高濃度時以 100 μM 的劑量最為穩定，故後續實驗以 100 μM 為最高劑量(GA-H)，50 μM 為中劑量(GA-M)，10 μM 為低劑量(GA-L)。

GA 對於高糖高脂環境下的肝細胞之影響

將 5×10^5 個/well HepG2 cell 種於 6-well 盤中，待 24 小時貼盤後，分別加入 25 μM High glucose, 300 μM Oleic acid, 150 μM Palmitic acid, 20% BSA，再分別混以三個不同濃度的 GA 培養 24 小時後以 oil-red O strain 觀察細胞內脂滴變化。

經染色後可看到(Fig. 3) High glucose + OA+ PA 的組別(H+O/P)細胞內脂滴變多，而混以 10 μM , 50 μM , 100 μM GA 後細胞內的脂滴均有下降趨勢，其中以 100 μM GA 組 (GA-H)下降最明顯。說明 GA 能有效減少肝細胞內多餘的脂滴，並具有保護肝細胞之功效。

GA 處理下肝細胞內分子機制

將細胞以 GA 處理後，用 RIPA 裂解取得蛋白，後再定量進行 Western blot 測試，觀察其 SREBP-1 及 FASN 蛋白表現。

結果表明 HG+O/P 能增加 SREBP-1 與 FASN 的表現(Fig. 4A)，促使肝細胞產生過多脂肪，而加入 GA 後能有效降低 SREBP-1 與 FASN 的表現，這說明了 GA 可能透過降低脂肪合成蛋白的表現來達到保護肝細胞的作用。為了想了解 GA 是

否是透過調控 miRNA 進而達到護肝作用，我們在之前 miRNA microarray 分析中，原本鎖定了 miR-494-3p、miR-7647-3p，但由於這兩 miRNA 的結果不如預期，故而轉鎖定同樣是 microarray 分析結果中的前五名，miR-34a-5p。

加藥過後的細胞經 24 小時培養後萃取 RNA 並透過 real-time PCR 測量其內源性 miRNA 的表現量。結果表明高糖高脂誘導的組別會提升 miR-34a-5p 的表現量，而 GA 能有效使 miR-34a-5p 恢復水平，這說明了 GA 能夠調控 miR-34a-5p，亦說明了 miR-34a-5p 可能參與了脂肪代謝途徑(Fig. 4B)。

miR-34a-5p 的表現對於肝細胞脂肪合成代謝機制的影響

為了確定 miR-34a-5p 是否參與脂肪代謝途徑，我們將 miR-34a-5p inhibitor 或是 mimic 送入細胞內，利用 real-time PCR 測量其 miRNA 表現量，並透過 oil-red O stain 觀察細胞內脂滴變化，再利用 western blot 檢測其 FASN 與 SREBP-1 蛋白表現量。

我們將 miR-34a-5p inhibitor 送入以高糖高脂誘導的肝細胞內，確定其抑制物能降低 miR-34a-5p 的表現(Fig. 5A)，並觀察其細胞，發現抑制 miR-34a-5p 的表現能減少細胞內的脂滴(Fig. 5B、5C)，且能夠降低 FASN 與 SREBP-1 的表現(Fig. 6)。而將 miR-34a-5p mimic 送入以高糖高脂誘導的肝細胞內，發現增加 miR-34a-5p 的表現會使細胞產生過多的脂滴(Fig. 7)，並會增加 FASN 與 SREBP-1 的表現(Fig. 8)。

這說明 miR-34a-5p 的表現確實對於調控肝細胞脂肪代謝途徑有著相當重要的影響，其機制可能是透過某個 target gene 而影響下游 FASN 與 SREBP-1 的表現，進而調控肝細胞脂肪堆積的變化。

尋找 miR-34a-5p 影響肝細胞脂肪合成代謝之 target genes

我們透過 *Computational Medicine Center* 預測 miR-34a-5p 可能的 target genes，並鎖定了 nfe2l2 (nrf2)，因多有文獻指出 nfe2l2 可能參與多種抗氧化途徑，且亦有文獻指出調控 nfe2l2 可增加非酒精性脂肪肝炎之抗氧化能力，使之有恢復趨向[30-31]，故我們推測 nfe2l2 可能為 miR-34a-5p 之 target gene。

透過 *Computational Medicine Center* 預測 nfe2l2 與 miR-34a-5p 之結合位(Fig. 9A)，並利用 luciferase assay 分析 HG+O/P 誘導下 miR-34a-5p 調控 nfe2l2 的 promotor 的情形，並以 miR-34a-5p mimic 與 inhibitor 驗證其效果，結果表明，miR-34a-5p mimic 確實能夠造成 nfe2l2 的 luciferase activity 較低，但加入 GA 後則能夠增加其 luciferase activity (Fig. 9B)；而在 HG+O/P 模擬糖尿病的環境下，則能夠發現 nfe2l2 的 luciferase activity 降低，再加入 GA 的組別之後 nfe2l2 的 luciferase activity 卻有上升的現象(Fig. 9C)，根據之前的 data 已經證明 GA 會抑制 miR-34a-5p 表現，進而影響的 nfe2l2 的基因表達。而在在 HG+O/P 誘導下，加入 miR-34a-5p inhibitor 的組別則證實此一結果。推測 miR-34a-5p 是透過抑制 nfe2l2 的表現，降低肝臟細胞代謝脂質作用，進而造成肝臟細胞內脂肪堆積現象。

(六) 實驗數據

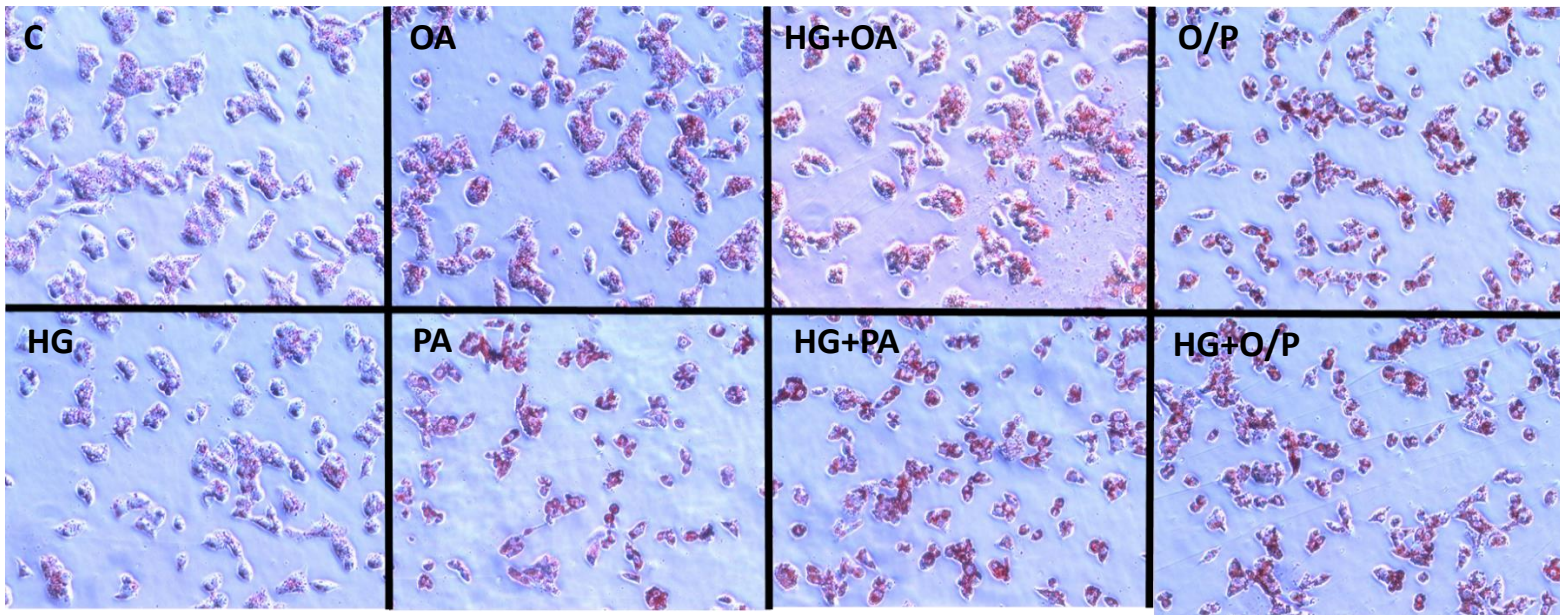


Figure 1. Oleic acid combined with Palmitic acid can promote excessive lipid droplets generation in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with high glucose(HG) 、OA were treated with oleic acid only 、PA were treated with palmitic acid only 、HG+ OA were treated with high glucose and oleic acid 、HG+ PA were treated with high glucose and palmitic acid 、O/P were treated with oleic acid + palmitic acid 、HG+O/P were treated with high glucose + OA+ PA , and analysis with oil-red O stain.

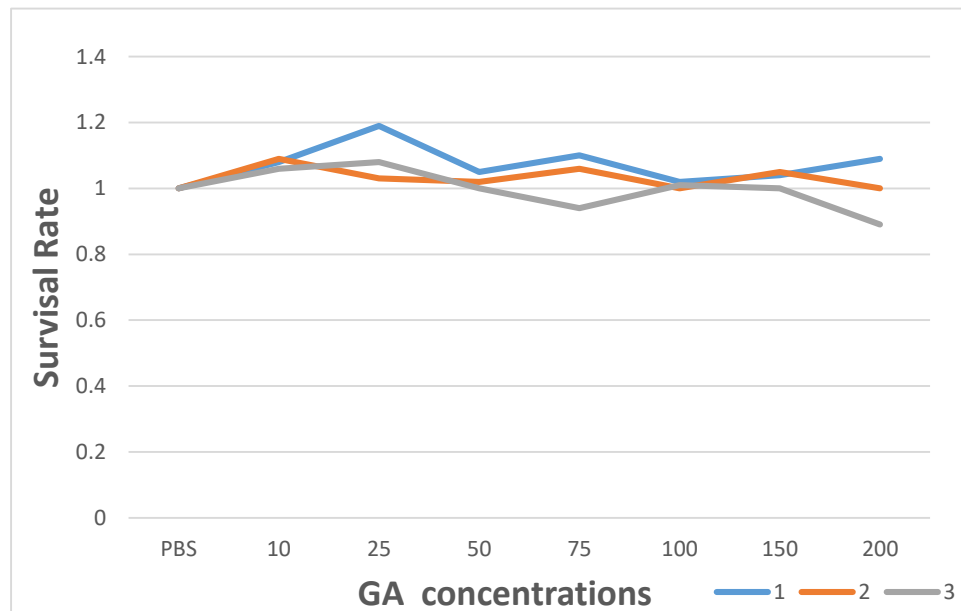


Figure 2. Survival curves influenced by different gallic acid concentrations . HepG2 cells were treated with 10 μM 、25 μM 、50 μM 、75 μM 、100 μM 、150 μM 、200 μM gallic acid , and analysis with MTT assay.

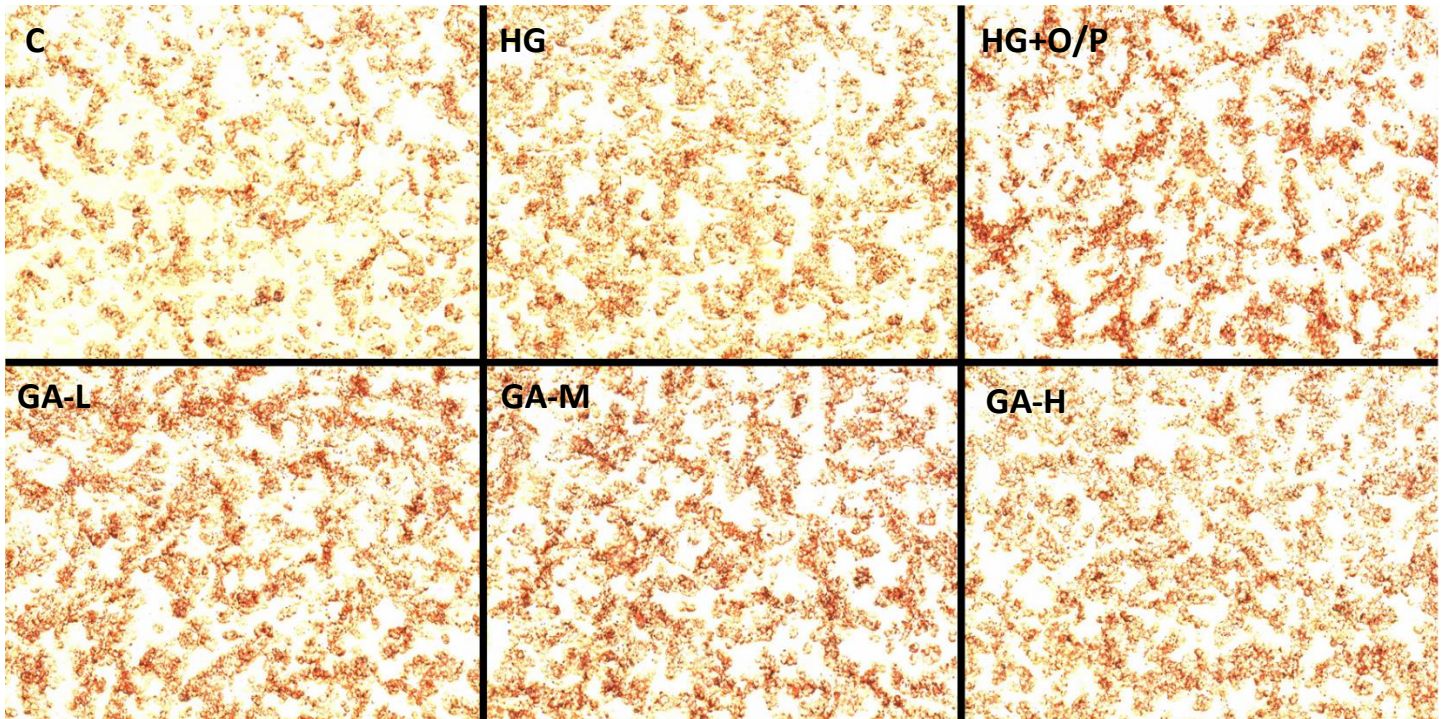


Figure 3. GA reduced excess lipid droplets in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with high glucose(HG) 、 O/P were treated with oleic acid (OA)+ palmitic acid (PA) 、 HG+O/P were treated with high glucose + OA+ PA 、 GA-L were treated with high glucose + OA+ PA+ 10 μ M gallic acid 、 GA-M were treated with high glucose + OA+ PA+ 50 μ M gallic acid 、 GA-H were treated with high glucose + OA+ PA+ 100 μ M gallic acid, and analysis with oil-red O stain.

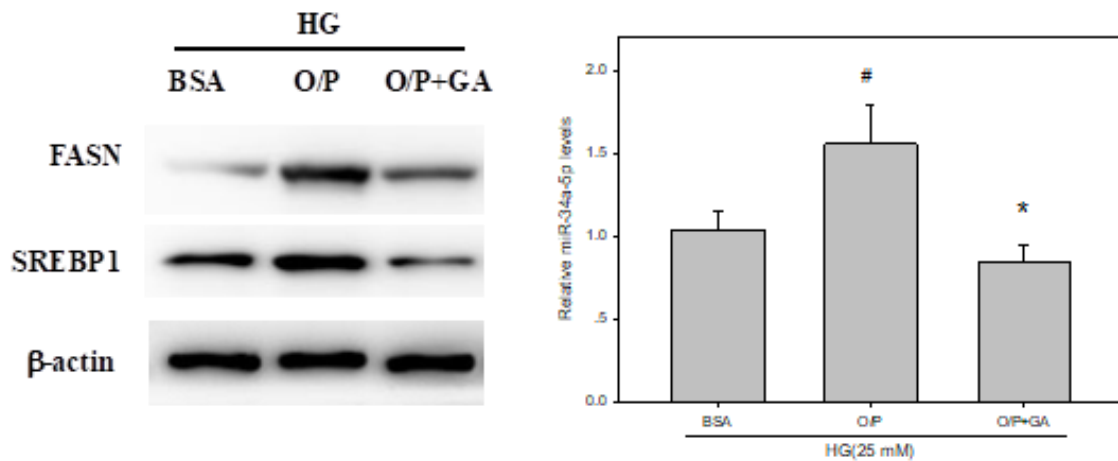


Figure 4. GA reduced the expression of miR-34a-5p ameliorates HG+O/P-induced lipid accumulation in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with GA in the presence of oleic acid/palmitic acid and 25 mM high glucose. A, western blotting analysis of SREBP1 and FASN. B, real-time PCR analysis of miR-34a-5p expression. n=3 independent experiments. [#], p<0.05 were compared with HG control group. ^{*}, p<0.05 were compared with HG+O/P group.

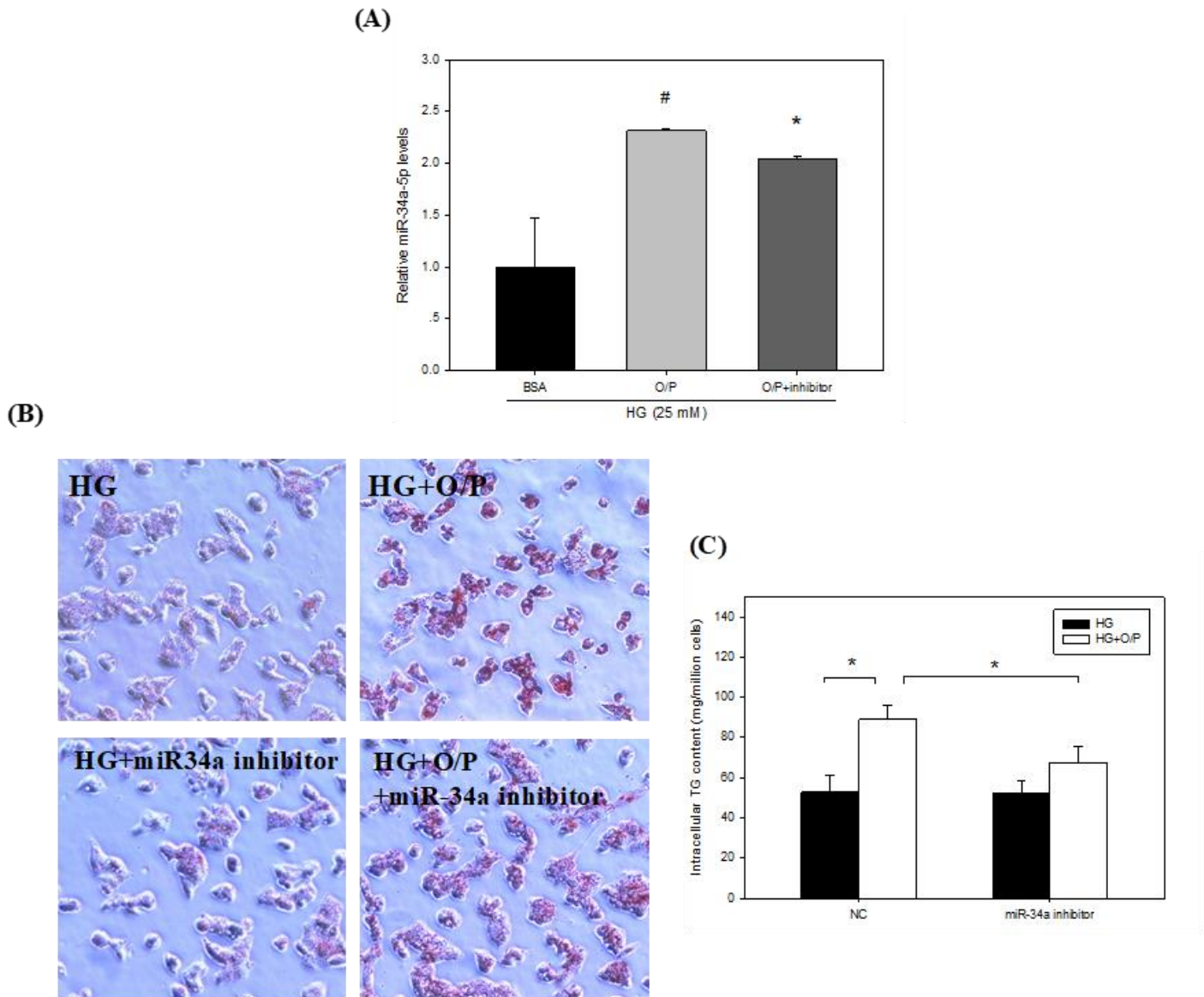


Figure 5. Suppression of miR-34a-5p expression ameliorates HG+O/P-induced lipid accumulation in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with the mixture of oleic acid/palmitic acid (2:1) and 25 mM high glucose for 24 hr in DMEM containing 10% FBS, followed by transfection with a miR-34a-5p inhibitor or NC for 48 hr in the presence of oleic acid/palmitic acid and 25 mM high glucose. A, real-time PCR analysis of miR-34a-5p expression. B, oil Red O staining. C, intracellular triglyceride content. n=3 independent experiments. *, p<0.05 were compared with HG control group. a, p<0.05 were compared with HG control group. b, p<0.05 were compared with HG+O/P group.

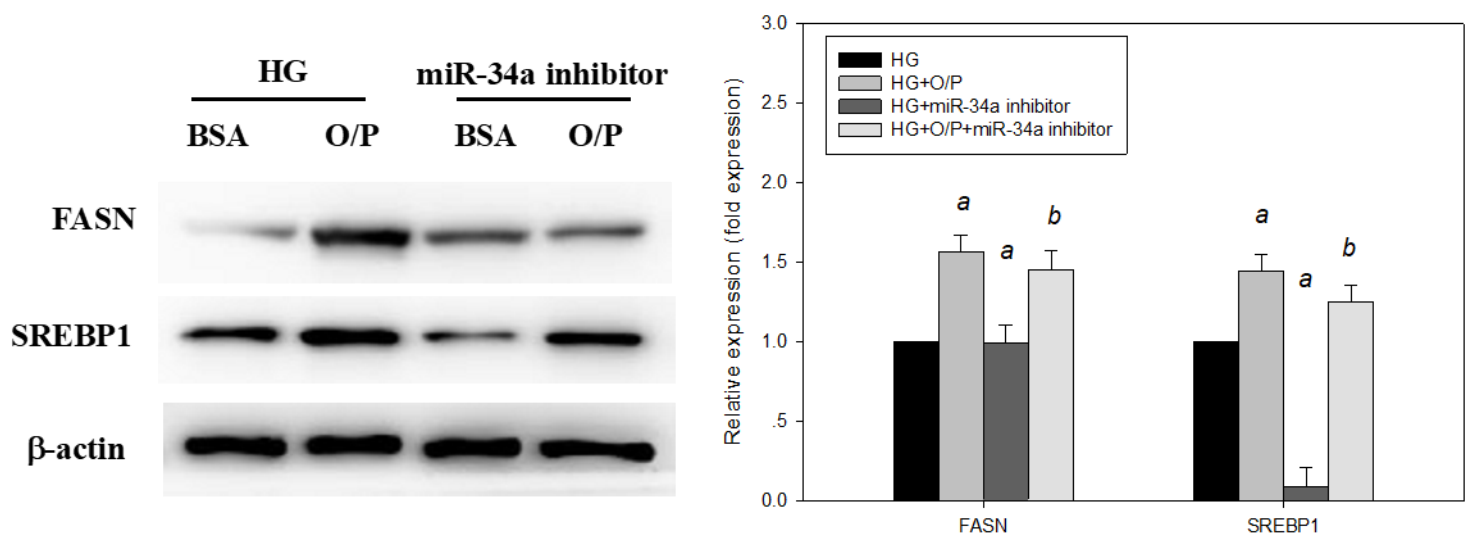


Figure 6. Suppression of miR-34a-5p ameliorates HG+O/P-induced lipid relative protein expression in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with the mixture of oleic acid/palmitic acid (2:1) and 25 mM high glucose for 24 hr in DMEM containing 10% FBS, followed by transfection with a miR-34a-5p inhibitor or NC for 48 hr in the presence of oleic acid/palmitic acid and 25 mM high glucose. Western blotting analysis of SREBP1 and FASN. n=3 independent experiments. *, p<0.05 were compared with HG control group. a, p<0.05 were compared with HG control group. b, p<0.05 were compared with HG+O/P group.

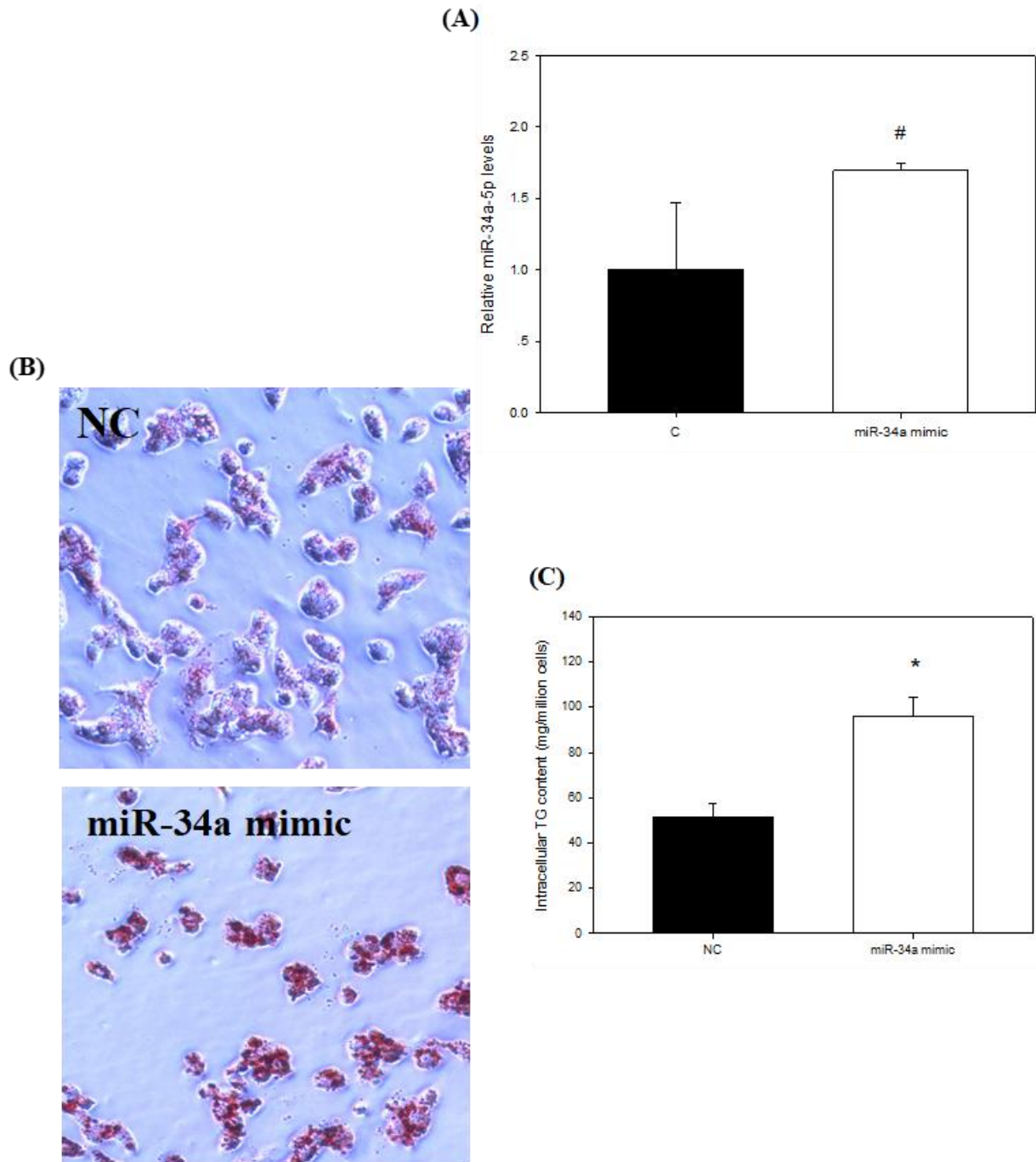


Figure 7. Enhance of miR-34a-5p expression induced lipid accumulation in HepG2 cells. HepG2 cells were transfected with a miR-34a-5p mimic or NC for 48 hr. A, real-time PCR analysis of miR-34a-5p expression. B, oil Red O staining. C, intracellular triglyceride content. n=3 independent experiments. *, p<0.05 were compared with HG control group.

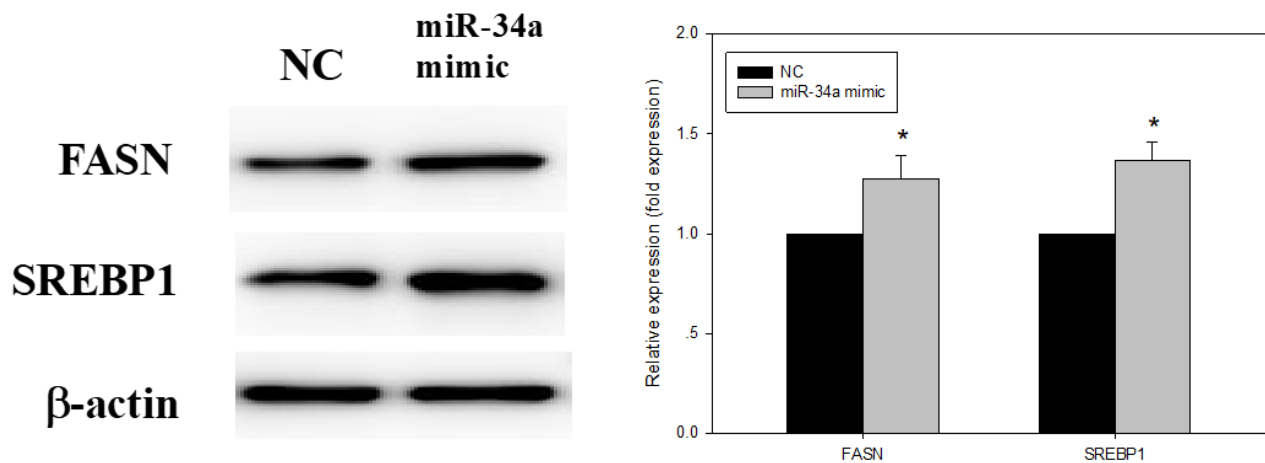


Figure 8. Enhance of miR-34a-5p expression induced HG+O/P-induced lipid relative protein expression in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with the mixture of oleic acid/palmitic acid (2:1) and 25 mM high glucose for 24 hr in DMEM containing 10% FBS, followed by transfection with a miR-34a-5p mimic or NC for 48 hr. Western blotting analysis of SREBP1 and FASN. n=3 independent experiments. *, p<0.05 were compared with NC control group.

(A)

Predicted target binding site on 3'-UTR of nfe2l2

Computational Medicine Center
Thomas Jefferson University

Back to main page

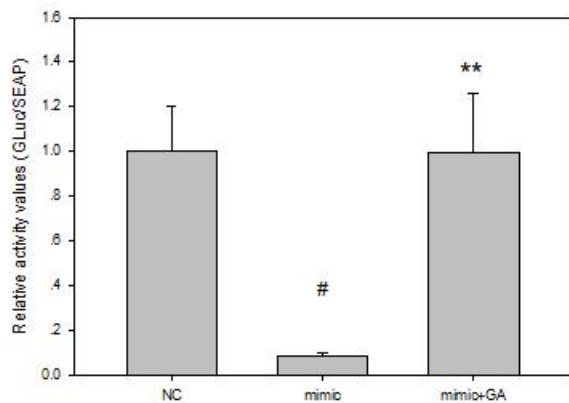
Genome: Mus musculus | mRNA | miRBase 18 (Nov. 2011), ENSEMBL 65 (Dec. 2011) and RNA22v2.0
Gene: Nfe2l2 | ENSMUSG0000015839 | Internal | Ensembl Link | Transcript accessed 10 time(s) since 7/2/2014
Gene description: nuclear factor, erythroid derived 2, like 2 [Source: MGI Symbol; Acc: MGI:108420]
External Links: The Human Protein Atlas | Allen Institute for Brain Science | FAcTA+ | Gene Expression Atlas | Gene External References

Transcript: ENSMUST00000102672 | Ensembl Link
RNA22-predicted Binding Sites: Show All Outlines | Hide All Outlines | Export Predictions as Table
Filter Shown Binding Sites: using these Filtering Options
mmu-miR-34a-5p: 2119 | Jump to line containing this prediction

RNA22 options applied:
G-U wobbles in seed region: permitted / unlimited
Bulges in seed region: permitted / at most one bulge allowed
Sensitivity 63%/Specificity 61% used

Gene Name: Nfe2l2	miRNA: mmu-miR-34a-5p
2119	2141
GTAACATGCGAGAATTATAGCCA	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTGT
TGTTGGT-CGATTCGTGACGGT	

(B)



(C)

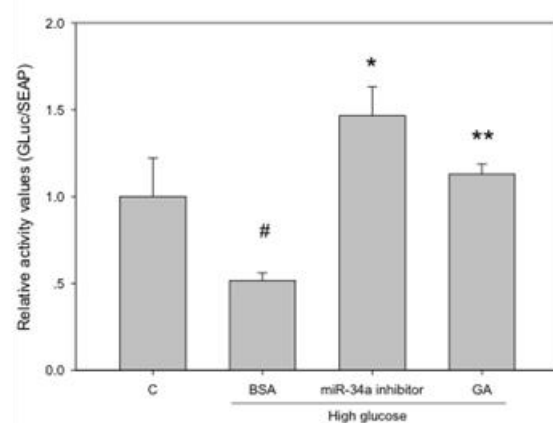


Figure 9. Overexpression of miR-34a significantly reduced the luciferase activity of nfe2l2 in HepG2 cells. A, bioinformatics-predicted binding sites of miR-34a-5p in the 3'-UTR of nfe2l2. B, luciferase activity in HepG2 cells co-transfected with a miR-34a mimic and pEZX-MT05-nfe2l2-3'UTR. C, luciferase activity in HepG2 cells co-transfected with a miR-34a inhibitor and pEZX-MT05-nfe2l2-3'UTR. n=3 independent experiments. *, p<0.05 were compared with control group.

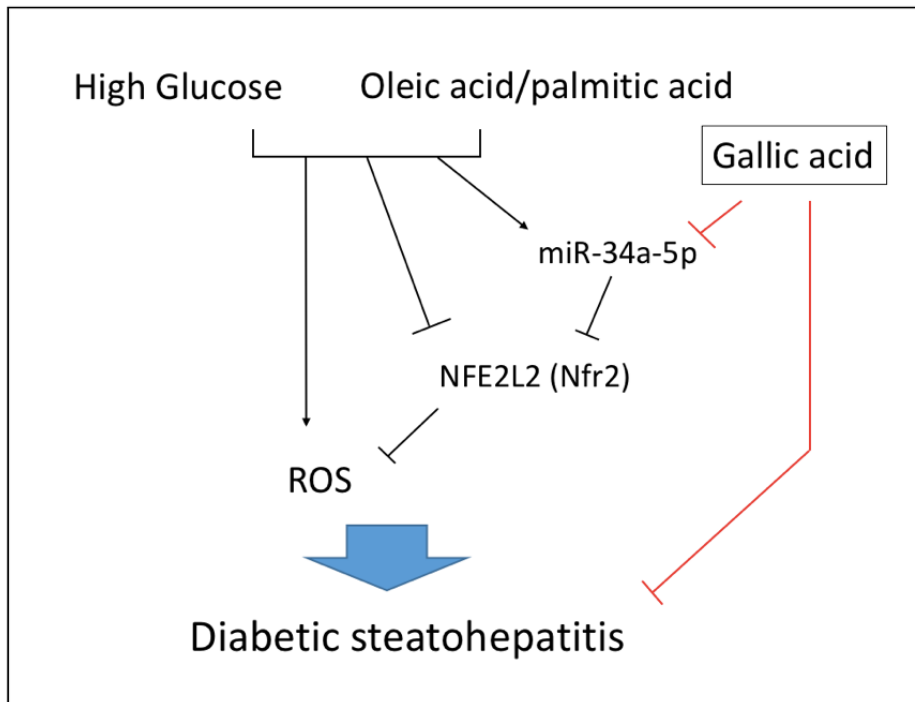


Figure 10. Summary of Gallic acid regulated miR-34a-5p expression and ameliorates high glucose and oleic acid/palmitic acid-induced lipid accumulation in HepG2 cells.

(七) 討論

隨著國人飲食習慣的改變,從早期的粗茶淡飯,轉變為高油高脂高糖的飲食,使得國人罹患糖尿病的比率年年增高,衛生署 104 年及 105 年死因統計報告都顯示國人前十大死因第五名是糖尿病,但死亡人數比率 105 年卻比 104 年增加 4.3%,這說明了如何治療或改善糖尿病的課題將越來越重要,而在本研究中我們所針對的是糖尿病性脂肪肝炎,這也是糖尿病最容易併發的副病症。在小鼠實驗中,我們發現 gallic acid 可有效保護肝組織,但其機制原理我們希望透過細胞實驗來了解,首先建立了高糖(high glucose)與高油脂(oleic acid/palmitic acid)的環境下誘導 HepG2 cell 產生肝臟細胞內脂肪堆積的模式,模擬肝臟細胞處於第二型糖尿病中高血脂環境所誘發的脂肪肝炎,並觀察加入 GA 後之變化,透過 oil-red 染色,western blot 結果發現,GA 能夠有效減少肝細胞內多餘的脂滴,降低脂肪合成蛋白 FASN, SREBP1 表現,並證明 GA 是通過抑制 miR-34a-5p 來調控 nfe2l2 進而達成護肝作用。

已有文獻指出,連續 16 週經由管餵給予小鼠 GA 100 mg/kg/day 之後,GA 可以改善 HFD 所誘導的一系列代謝途徑,包括脂質代謝,葡萄糖代謝(糖分解與糖質新生),氨基酸代謝,膽鹼代謝與腸道微生物相關代謝等現象,證明 GA 可以改善 HFD 誘導的 NAFLD 小鼠中葡萄糖和脂質體內平衡的受損[30],但是文章中卻未指出 GA 是透過什麼樣機制達到保護肝臟的作用。

有證據指出 GA 可以降低 OA 所誘導的 Chang liver cell 中的 steatosis 現象,抑制細胞中過多 TG 的堆積,且指出可能是與抗氧化作用相關。文章中也說明 GA 能夠降低細胞因子表現(cytokine levels),並能夠調節與脂質代謝有關酵素的表現,包含 mRNA level 與 protein level [31]。

本研究中首先證明了 GA 能夠有效的改善在高糖環境下(high glucose),經由高脂狀態(oleic acid/palmitic acid)所誘導的 steatosis 現象,而此模式也充分模擬了糖尿病性脂肪肝炎的形成模式,未來可以當作一分析糖尿病性脂肪肝炎的平台。而本篇中清楚的解釋 GA 透過抑制 miR-34a-5p 的表達,改善肝細胞中的脂質堆積現象,並找出 miR-34a-5p 下游的 target gene,相信此一機制未來對於釐清糖尿病性脂肪肝炎的形成將會有所幫助,而如何保護 nfe2l2 並利用 nfe2l2 達到保護肝臟,抑制糖尿病性脂肪肝炎,將是我們未來研究的首要目標。

而我們接下來想要嘗試不同於之前 db/db mice 實驗動物之模式,採用高脂飲食+低劑量 STZ 誘導產生第二型糖尿病方式,配合 miRNA mimic 與 miRNA inhibitor,說明即使是不同誘導模式下所產生的糖尿病性脂肪肝炎,仍然不減 miR-34a-5p 在其中所扮演的重要性。而我們也相信糖尿病性脂肪肝炎的形成應是多個基因或是多個 miRNA 調控而形成,因此我們會以此研究計畫為基礎,嘗試了解其他 miRNA 在糖尿病性脂肪肝炎所扮演的角色,希望能作為改善糖尿病性脂肪肝等相關病症的參考文獻資料。

(七) 參考資料

1. Hoang Van Tong, Nguyen Kim Luu, Ho Anh Son, Nguyen Van Hoan, Trinh Thanh Hung, Thirumalaisamy P Velavan, Nguyen Linh Toan. Adiponectin and pro-inflammatory cytokines are modulated in Vietnamese patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Investigation* 8, 295-305 (2017).
2. Roberts CK, Hevener AL, Barnard RJ. Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training. *Compr Physiol* 2013;3:1–58.
3. Brownlee, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615-1625. (2005)
4. Vozarova, B. *et al.* High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 1889-1895 (2002).
5. Nannipieri, M. *et al.* Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes. *Diabetes care* 28, 1757-1762 (2005).
6. Hanley, A. J. G. *et al.* Elevations in markers of liver injury and risk of type 2 diabetes. *Diabetes* 53, 2623-2632 (2004).
7. Ellis, G., Goldberg, D., Spooner, R. & Ward, A. Serum enzyme tests in diseases of the liver and biliary tree. *American journal of clinical pathology* 70, 248-258 (1978).
8. van Rooij, E. *et al.* Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 13027-13032 (2008).
9. Care, A. *et al.* MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nature Med.* 13, 613-618 (2007).
10. Zsuzsanna Elek, Nóra Németh, Géza Nagy, Helga Németh, Anikó Somogyi, Nóra Hosszufalusi, Mária Sasvári-Székely, Zsolt Rónai. Micro-RNA Binding Site Polymorphisms in the WFS1 Gene Are Risk Factors of Diabetes Mellitus. *journal*(2015)
11. Jie-Mei Wang, Jun Tao, Dan-Dan Chen, Jing-Jing Cai, Kaikobad Irani, Qinde Wang, Hong Yuan, and Alex F. Chen. MicroRNA miR-27b Rescues Bone Marrow-Derived Angiogenic Cell Function and Accelerates Wound Healing in Type 2 Diabetes Mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Jan; 34(1): 99–109.(2014)
12. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. *Nature.* Nov 11; 432(7014):226-30. (2004)
13. Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, Zavolan M, Heim MH, Stoffel M. *Nature.* Jun 8; 474(7353):649-53. (2011)
14. He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol.* Nov; 21(11):2785-94. (2007)

15. Dwi Setyowati Karolina, Arunmozhiarasi Arumugam, Subramaniam Tavintharan, Michael T. K. Wong, Su Chi Lim, Chee Fang Sum, Kandiah Jeyaseelan. MicroRNA 144 Impairs Insulin Signaling by Inhibiting the Expression of Insulin Receptor Substrate 1 in Type 2 Diabetes Mellitus. *journal* (2011)
16. Kato M1, Zhang J, Wang M, Lanting L, Yuan H, Rossi JJ, Natarajan R. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. *Proc Natl Acad Sci USA*.104(9):3432-7. (2007)
17. Zernecke, A. et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci. Signal*. 2, ra81 (2009).
18. Bonauer, A. et al. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science* 324, 1710-1713 (2009).
19. van Solingen, C. et al. Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med*. 13, 1577-1585 (2009).
20. Harris, T. A., et al. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 1516-1521 (2008).
21. Xiangyu Meng, Jun Guo, Weiwei Fang, Lin Dou, Meng Li, Xiuqing Huang, Shutong Zhou, Yong Man, Weiqing Tang, Liqing Yu, and Jian Li. Liver MicroRNA-291b-3p Promotes Hepatic Lipogenesis through Negative Regulation of Adenosine 5-Monophosphate (AMP)-activated Protein Kinase. *January 5* (2016)
22. Xiangyu Meng, Jun Guo, Weiwei Fang, Lin Dou, Meng Li, Xiuqing Huang, Shutong Zhou, Yong Man, Weiqing Tang, Liqing Yu, and Jian Li. Hepatic MiR-291b-3p
23. Mediha Canbek M., et al. The effect of gallic acid on kidney and liver after experimental renal ischemia/reperfusion injury in the rats. *Afr. J. Pharm. Pharmacol*. 5, 1027-1033 (2011).
24. Rasool MK., et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of gallic acid in paracetamol-induced liver damage in mice. *J. Pharm. Pharmacol*. 62, 638-643 (2010).
25. Liang W., et al. Gallic acid induces apoptosis and inhibits cell migration by upregulating miR-518b in SW1353 human chondrosarcoma cells. *Int. J. Oncol*. 44, 91-98 (2014)
26. Paolini A., et al. Gallic acid exerts a protective or an anti-proliferative effect on glioma T98G cells via dose-dependent epigenetic regulation mediated by miRNAs. *Int. J. Oncol*. 46, 1491-1497 (2015)
27. Rie Ibusuki, Hirofumi Uto, Kohei Oda, AkiLifen Liu, Xin Chen, Ying Zhang, Yanrong Hu, Xiaoqing Shen, and Weipei Zhu. Long non-coding RNA TUG1 promotes endometrial cancer development via inhibiting miR-299 and miR-34a-5p Oncotarget.

8(19): 31386–31394.(2017)

28. Jie-Ning Zhu, Yong-Heng Fu, Zhi-qin Hu, Wen-Yu Li, Chun-Mei Tang, Hong-Wen Fei, Hui Yang, Qiu-xiong Lin, De-Ming Gou, Shu-Lin Wu and Zhi-Xin Shan corresponding author. Activation of miR-34a-5p/Sirt1/p66shc pathway contributes to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Sci Rep.* 7: 11879.(2017)

29. Yong Wan, Ruixia Cui, Jingxian Gu, Xing Zhang, Xiaohong Xiang, Chang Liu, Kai Qu and Ting Lin. Identification of Four Oxidative Stress-Responsive MicroRNAs, miR-34a-5p, miR-1915-3p, miR-638, and miR-150-3p, in Hepatocellular Carcinoma. *Oxid Med Cell Longev.* 5189138.(2017)

30. Chao J, Huo TI, Cheng HY, Tsai JC, Liao JW, Lee MS, Qin XM, Hsieh MT, Pao LH, Peng WH. Gallic acid ameliorated impaired glucose and lipid homeostasis in high fat diet-induced NAFLD mice. *PLoS One.* 9: e96969. (2014).

Yuanyuan Wei, Dong Yan, Zhong Wang, Haji Akber Aisa. Effect and mechanism of gallic acid on oleic acid-induced steatosis in the Chang liver cell NAFLD model. *Int J Clin Exp Med* 9: 12669-12677. (2016)