

有氧运动对 CNPY2 基因调控 AKT/GSK3 β 通路改善非酒精性脂肪肝的作用研究王佳倩^{1,2}, 蒋昌君³, 彭毅⁴, 马咪⁴, 李军汉²<https://doi.org/10.12307/2025.780>

投稿日期: 2024-08-14

采用日期: 2024-10-31

修回日期: 2024-12-21

在线日期: 2025-01-11

中图分类号:

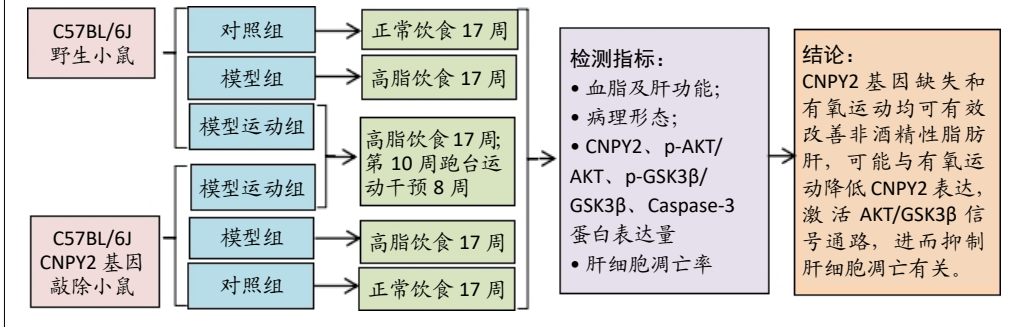
R496; R318; R575.5

文章编号:

2095-4344(2025)30-06441-08

文献标识码: B

文章快速阅读: CNPY2 基因敲除对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝具有保护作用



文题释义:

冠层FGF信号调节器2(Canopy FGF signaling regulator 2, CNPY2): 是一种新型血管生成生长因子, 广泛表达于哺乳动物身体的各种组织和器官中, 尤其是在心脏、肺和肝脏中。CNPY2可以通过促进血管生成参与肿瘤的发展; 在心血管疾病中促进细胞增殖和组织修复, 改善心脏功能, 在神经系统疾病中增强神经突生长。

细胞凋亡: 是细胞对环境的生理性和/或病理性的刺激性信号, 它涉及一系列基因的刺激、表达及调控等作用, 凋亡可被多种信号激活, 如钙稳态失调、氧化损伤、线粒体损伤等, 是为更好地适应生存环境而主动争取的一种死亡过程。

摘要

背景: 非酒精性脂肪肝是全球常见慢性肝病之一, 有氧运动被认为是非酒精性脂肪肝治疗的重要手段, 然而, 运动改善非酒精性脂肪肝的机制尚未完全明确。

目的: 旨在探讨有氧运动对非酒精性脂肪肝小鼠肝脏CNPY2介导蛋白激酶B/糖原合成酶激酶3 β 通路的影响及作用机制。

方法: 雄性CNPY2基因敲除小鼠(ko)及其同系同窝野生型小鼠(wt)各30只, 适应性喂养1周, 随机分为对照组、模型组和模型运动组, 每组10只。对照组予普通饲料喂养, 模型组和模型运动组予高脂饲料喂养, 连续17周; 模型运动组从第10周开始进行连续有氧运动干预, 直至第18周实验结束。苏木精-伊红染色和油红O染色观察小鼠肝组织病理学形态; 全自动生化仪检测小鼠血清血脂4项及肝功能水平; Western Blot法检测肝组织CNPY2、蛋白激酶B/糖原合成酶激酶3 β 通路、半胱天冬酶3(Caspase-3)蛋白表达水平; TUNEL染色检测肝细胞凋亡率。

结果与结论: ①与wt对照组比较, wt模型组肝组织CNPY2表达升高($P < 0.05$), 与wt模型组比较, wt模型运动组CNPY2表达下降($P < 0.05$); 与对照组比较, wt小鼠与ko小鼠对应的模型组肝细胞脂肪变性、脂滴增多、血脂及肝功能异常, 肝组织蛋白激酶B/糖原合成酶激酶3 β 表达下降($P < 0.05$)、Caspase-3表达升高($P < 0.05$), 肝细胞凋亡率增加($P < 0.05$); ②与模型组比较, wt小鼠与ko小鼠对应的模型运动组上述指标均有所改善; ③与wt小鼠比较, ko小鼠对应组上述指标均有所改善; ④结果说明, CNPY2基因缺失和有氧运动可有效改善非酒精性脂肪肝, 其机制可能与有氧运动降低CNPY2表达、激活蛋白激酶B/糖原合成酶激酶3 β 信号通路, 进而抑制肝细胞凋亡有关。

关键词: 脂肪肝; 高脂饮食; 肝细胞凋亡; 有氧运动; CNPY2; AKT; GSK3 β ; Caspase-3

Study on the role of aerobic exercise in regulating the CNPY2-mediated AKT/GSK3 β pathway for improving non-alcoholic fatty liverWang Jiaqian^{1,2}, Jiang Changjun³, Peng Yi⁴, Ma Mi⁴, Li Junhan²

¹School of Physical Education and Health, Longyan University, Longyan 346012, Fujian Province, China; ²School of Sports Medicine and Health, Chengdu Sport University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; ³School of Physical Education, Southwest University of Petroleum, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; ⁴School of Physical Education, Putian University, Putian 351100, Fujian Province, China

Wang Jiaqian, MS, School of Physical Education and Health, Longyan University, Longyan 346012, Fujian Province, China; School of Sports Medicine and Health, Chengdu Sport University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Corresponding author: Li Junhan, PhD, Professor, School of Sports Medicine and Health, Chengdu Sport University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

¹龙岩学院体育与健康学院, 福建省龙岩市 346012; ²成都体育学院运动医学与健康学院, 四川省成都市 610041; ³西南石油大学体育学院, 四川省成都市 610041; ⁴莆田学院体育学院, 福建省莆田市 351100

第一作者: 王佳倩, 女, 1997年生, 福建省莆田市人, 汉族, 2022年成都体育学院毕业, 硕士, 主要从事运动干预与健康促进的研究。

通讯作者: 李军汉, 博士, 教授, 成都体育学院运动医学与健康学院, 四川省成都市 610041

<https://orcid.org/0009-0003-2505-614X> (王佳倩)

基金资助: 国家自然科学基金青年基金资助项目(31900846), 项目负责人: 李军汉; 四川省科技厅自然科学基金资助面上项目(2024NSFC0644), 项目负责人: 李军汉

引用本文: 王佳倩, 蒋昌君, 彭毅, 马咪, 李军汉. 有氧运动对 CNPY2 基因调控 AKT/GSK3 β 通路改善非酒精性脂肪肝的作用研究 [J].

中国组织工程研究, 2025, 29(30):6441-6448.



Abstract

BACKGROUND: Non-alcoholic fatty liver disease is one of the common chronic liver diseases in the world. Aerobic exercise is considered to be an important means for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. However, the mechanism of exercise to improve non-alcoholic fatty liver disease has not been fully clarified.

OBJECTIVE: To investigate the effects of aerobic exercise on the protein kinase B/glycogen synthase kinase-3 β pathway mediated by Canopy FGF signaling regulator 2 (CNPY2) in the liver canopy of non-alcoholic fatty liver disease mice and its mechanism.

METHODS: Thirty male CNPY2 knockout mice (ko) and thirty their litters of wild-type mice (wt) were fed adaptively for one week and randomly divided into control group, model group, and model exercise group, with 10 mice in each group. The control group was fed with ordinary diet. The model group and the model exercise group were fed with high-fat diet for 17 weeks. The model exercise group received continuous aerobic exercise intervention from week 10 until the end of the experiment at week 18. Liver histopathology was observed by hematoxylin-eosin and oil red O staining. The levels of serum lipids and liver function were detected by automatic biochemical analyzer. The expression levels of CNPY2, protein kinase B/glycogen synthase kinase-3 β pathway, and Caspase-3 protein in liver tissues were detected by Western Blotting. The apoptosis rate of hepatocytes was detected by TUNEL staining.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with wt control group, CNPY2 expression in liver tissues of wt model group was increased ($P < 0.05$), while CNPY2 expression in wt model exercise group was decreased compared with wt model group ($P < 0.05$). Compared with control group, wt mice and ko mice in model group showed steatosis, increased lipid droplets, abnormal blood lipids and liver function, decreased protein kinase B/glycogen synthase kinase-3 β expression ($P < 0.05$) and increased Caspase-3 expression ($P < 0.05$), and increased hepatocyte apoptosis rate in liver tissue ($P < 0.05$). (2) Compared with the model group, wt mice and ko mice showed improvement in the above indexes in model exercise group. (3) Compared with wt mice, the above indexes of ko mice were improved. (4) These findings indicate that CNPY2 gene deletion and aerobic exercise can effectively improve non-alcoholic fatty liver disease. The mechanism may be related to aerobic exercise reducing CNPY2 expression, activating protein kinase B/glycogen synthase kinase-3 β signaling pathway, and thus inhibiting hepatocyte apoptosis.

Key words: fatty liver; high-fat diet; hepatocyte apoptosis; aerobic exercise; CNPY2; AKT; GSK3 β ; Caspase-3

Funding: National Natural Science Foundation of China (Youth Fund Project), No. 31900846 (to LJH); Natural Science Foundation Project of Sichuan Provincial Science and Technology Department, No. 2024NSFSC0644 (to LJH)

How to cite this article: WANG JQ, JIANG CJ, PENG Y, MA M, LI JH. Study on the role of aerobic exercise in regulating the CNPY2-mediated AKT/GSK3 β pathway for improving non-alcoholic fatty liver. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(30):6441-6448.

0 引言 Introduction

非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver diseases, NAFLD) 是全球高发慢性肝病的主要来源, 全球患病率约为 25%, 目前患病率仍在持续上升^[1]。非酒精性脂肪肝包括从单一脂肪变性到非酒精性脂肪性肝炎, 被认为是代谢综合征的肝脏表现, 可引起一系列代谢相关的并发症, 甚至可进展为致命的肝硬化和 / 或肝细胞癌增加死亡率, 严重危害人类健康, 加重患者和社会经济负担^[2]。目前临床上尚未有批准专门用于治疗非酒精性脂肪肝的药物^[3], 因此寻求一个高效低廉的方法干预非酒精性脂肪肝具有重要意义。有氧运动通常被认为是非酒精性脂肪肝治疗的基石^[4], 已被证实对非酒精性脂肪肝等代谢性疾病有积极作用。有氧运动可通过调节脂肪酸代谢、肝细胞凋亡等来改善非酒精性脂肪肝^[4], 然而, 有氧运动改善非酒精性脂肪肝的机制尚未完全明确。

冠层 FGF 信号调节器 2(Canopy FGF signaling regulator 2, CNPY2) 是一种含有皂苷 B- 型域的成纤维细胞生长因子 21 调节蛋白, 在心脏、肺和肝脏广泛表达^[5-6], 越来越多的证据强调 CNPY2 在健康和疾病中具有重要功能^[6]。CNPY2 可通过促进血管生成参与肿瘤的发生发展, 还可以促进细胞增殖和组织修复, 改善心血管疾病中的心脏功能^[6-7]。CNPY2 作为新型蛋白, 目前在非酒精性脂肪肝中的研究较少。有研究表明, CNPY2 的缺失可以保护非酒精性脂肪肝小鼠肝组织免遭受肝损伤和脂肪变性, 提示 CNPY2 可能是治疗非酒精性脂肪肝的新靶点^[8]。然而, 运动是否通过介导 CNPY2 的表达影响非酒精性脂肪肝发生发展尚未完全明确。

肝细胞的凋亡数量与非酒精性脂肪肝严重程度呈正比^[9-10]。游离脂肪酸作为外部刺激影响线粒体功能, 线粒体外膜释放细胞色素 C 并激活其下游信号半胱天冬酶 3 (Caspase-3) 诱导细胞凋亡, 促进了非酒精性脂肪肝的发展^[11]。蛋白激酶 B/ 糖原合成酶激酶 3 β (protein kinase b/ glycogen synthase kinase 3 β , AKT/GSK3 β) 通路是调控凋亡的重要通路^[12]。前期研究已证实, 有氧运动可通过激活 AKT/GSK3 β 通路抑制促凋亡蛋白表达减少肝细胞凋亡, 改善非酒精性脂肪肝^[12]。当前有关 CNPY2 介导 AKT/GSK3 β 通路的研究仅在帕金森、非小细胞肺癌中报道^[13-14]。研究证实, CNPY2 可通过 AKT/GSK3 β 通路途径抑制帕金森病神经元凋亡^[14]。然而, CNPY2 与 AKT/GSK3 β 通路在非酒精性脂肪肝中的关系及有氧运动是否通过 CNPY2 介导 AKT/GSK3 β 通路改善非酒精性脂肪肝肝细胞凋亡情况, 暂无相关报道。

此研究聚焦于 CNPY2 介导 AKT/GSK3 β 信号通路, 通过高脂膳食诱导非酒精性脂肪肝小鼠模型, 并进行有氧运动干预, 探讨 CNPY2 介导 AKT/GSK3 β 信号通路中的可能作用机制, 以期为非酒精性脂肪肝的运动防治和相关靶点筛选提供实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 基因敲除前后两组间比较采用独立样本 *t* 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2020 年 11 月至 2022 年 5 月在成都体育学院运动医学与健康学院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF 级 (12±1) 周龄雄性 CNPY2 基因敲除 C57/BL6J 小鼠 (ko, n=30), 体质量 (19.7±1.4) g; 同系同窝野生型小鼠 (wt, n=30), 体质量 (19.9±0.6) g。CNPY2 基因敲除小鼠由江苏集萃药康生物技术有限公司提供 (项目编号: GPS00003859), 采用 CRISPR/Cas9 技术获得基因敲除杂合子小鼠, 后由成都达硕生物公司饲养繁育, 繁育小鼠基因型通过剪尾进行 Real-time PCR 鉴定。鉴定使用引物 CNPY2 基因敲除鼠的等位基因: F1(ATG GCG GAG TCC TTA CAA AAG G) 和 R1(TCA GAG GTC CCA CGA GTT CAA TTC); 同系同窝野生型小鼠的等位基因: F2(TAG AAG GGA GTG ACC AAA GGC TG) 和 R2(TAC AAG TAG GCA ACA CCA CTT CCG)。繁殖历经 10 代, 获得满足实验需求数量小鼠, 见图 1。

小鼠饲养环境: 成都体育学院实验中心 SPF 级动物房, 许可证号: SYXK(川)2018-211, 室温恒定 20-26 °C, 湿度 45%-55%, 循环照明 (每日 9: 00 开灯, 21: 00 关灯), 自由进食饮水。动物实验过程操作经成都体育学院动物管理委员会 (成体伦理【2021】59 号) 批准实施。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

1.3.2 主要试剂与仪器 油红 O 染色试剂盒 (美国 Sigma, 货号: 01391); OCT 包埋剂 (日本 SAKURA, 货号: 4583); 苏木精-伊红染色试剂盒 (中国索莱宝, 货号: G1120); TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (中国凯基, 货号: KGA7072); PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (中国雅酶, 货号: PG112); 抗体 AKT (货号: ET1609-47-50)、抗体 P-AKTser473 (货号: ET1607-73-50)、抗体 GSK3β (货号: ET1607-71-50)、抗体 P-GSK3βser9 (货号: ET1607-54-50)、羊抗兔 (货号: HA1001)、羊抗小鼠 (货号: HA1006) 均为中国华安产品; 抗体 CNPY2 (货号: 14635-1-AP)、抗体 Caspase-3 (货号: 19677-1-AP)、抗体 β-actin (货号: CL495-66009) 均为中国三鹰产品。

动物跑台 (中国赛昂斯); 离心机 (美国赛默飞); 电泳仪 (中国百绿); 转膜仪 (中国百绿); 制冰机 (中国奥克斯曼); 显微镜 (日本奥林巴斯)。

1.3.3 喂养饲料 饲料均由江苏协同医药生物工程有限责任公司提供 [编号: 苏饲证 (2020)01006]。高脂饲料配方及供能物质: 1 份高脂饲料 =38% 维持基础料 +28% 猪油 +11.5% 酪蛋白 +10.8% 全脂奶粉 +5.6% 蔗糖 +2% 实验动物预混料 +1.9% 微晶纤维素 +1.8% 磷酸氢钙 +0.4% 石粉。

1.4 实验方法

1.4.1 实验小鼠分组及饲料喂养 小鼠常规喂养 1 周后, 按随机数字法分为对照组 (wt 小鼠、ko 小鼠, n=10)、模型组 (wt 小鼠、ko 小鼠, n=10) 和模型运动组 (wt 小鼠、ko 小鼠, n=10)。对照组小鼠给予普通饲料喂养; 模型组

和模型运动组小鼠给予 8 周高脂饮食诱导非酒精性脂肪肝 [15-16], 每组各取 2 只小鼠进行病理形态检测, 结合血脂情况, 确定非酒精性脂肪肝模型造模成功, 饲料喂养方式不变, 连续喂养至 17 周; 模型运动组从第 10 周开始进行连续有氧运动干预, 直至第 18 周实验结束 [17]。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题	
造模目的	构建非酒精性脂肪肝小鼠模型
研究问题借鉴	非酒精性脂肪肝模型通过 8 周高脂饮食诱导建立 [15-16]
有标准动物模型	
造模	
选择动物的条件	(12±1) 周龄雄性 CNPY2 基因敲除 C57BL/6J 小鼠纯合子, 体质量 (19.7±1.4) g; 同系同窝野生型小鼠, 体质量 (19.9±0.6) g
模型与所研究疾病的关系	采用 8 周高脂饮食诱导非酒精性脂肪肝模型, 其病理组织学也反映人类病理组织学, 是构建非酒精性脂肪肝较理想的模型
动物来源及品系	C57BL/6L 小鼠购于江苏集萃药康生物技术有限公司
造模技术描述	8 周高脂饮食诱导非酒精性脂肪肝
动物数量及分组	CNPY2 基因敲除小鼠 (ko) 及其同系同窝野生型小鼠 (wt) 共 60 只, 方法 随机分为 wt 对照组、ko 对照组、wt 模型组、ko 模型组、wt 模型运动组、ko 模型运动组, 每组 10 只
造模成功评价指	每组随机取 2 只小鼠解剖, 肝组织油红 O 染色出现大量红色脂滴, 病理学检测肝细胞肿胀, 空泡化, 炎性细胞聚集, 肝活检标本的肝脂肪变在 5% 以上可诊断非酒精性脂肪肝
造模后实验观察	①血脂及肝功能; ②病理形态; ③ CNPY2、P-AKT/AKT、P-GSK3β/指标 GSK3β、Caspase-3 蛋白表达量; ④肝细胞凋亡率
造模后动物处理	小鼠第 18 周运动结束后禁食禁水 24 h, 麻醉后摘取眼球取血, 取肝脏分多份, 待检测
伦理委员会批准	实验动物经成都体育学院伦理委员会审批实施 (批准号: 成体伦理【2021】59 号)

1.4.2 运动训练方案 [17] 参照小鼠身体状况, wt 模型运动组和 ko 模型运动组小鼠进行 1 周跑台渐进式适应性训练, 直至达到正式训练标准。正式训练时跑台坡度 0°, 12 m/min, 每天 1 h; 运动频率及周期: 每周 5 d, 持续 8 周; 见表 1。

表 1 | 模型运动组小鼠训练方案
Table 1 | Mouse training program in model exercise group

训练	坡度 (°)	天数	速度 (m/min)	运动时间 (min/d)
适应性训练	0	第 1 天	8	20
	0	第 2 天	9	30
	0	第 3 天	10	40
	0	第 4 天	11	50
	0	第 5 天	12	60
正式训练	0		12	60

1.4.3 样本采集处理 观察小鼠每日状态 (毛发、粪便、活跃度等), 异常及时记录, 并称量体质量及摄食量。

运动干预结束后, 小鼠禁食 24 h, 取材前称小鼠体质量, 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 20 μL/g 麻醉小鼠, 摘取眼球取血, 静置 30 min 离心, 提取上清液; 打开腹腔取

出肝脏并称质量, 计算肝指数, 肝指数 = 肝脏质量 (g)/ 体质量 (g); 4 °C 生理盐水冲洗, 切多份, 部分浸泡 4 g/L 多聚甲醛固定, 便于石蜡包埋, 部分锡箔纸包埋, 置液氮低温保存, 待 Western Blot 检测、冰冻切片等。

1.4.4 血液生化检测 眼球血室温静置半小时, 离心, 提取上清液, 检测血脂 4 项: 总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白, 肝功能 2 项: 丙氨酸氨基转氨酶、天门冬氨酸氨基转氨酶, 反映血脂代谢肝功能指标。

1.4.5 蛋白免疫印迹 (Western Blot) 检测 在离心管内加入 200 μL 裂解液 (蛋白酶抑制剂 1 : 50 加入裂解液), 取 20 mg 肝组织置于该离心管, 剪刀剪碎研磨, 置于 4 °C 冰箱至少 30 min, 使其充分裂解, 于 12 000 r/min 离心 10 min, 提取上清总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度并通过添加裂解液和 SDS PAGE 蛋白上样缓冲液配平至同一浓度, 蛋白加热变性 (95 °C, 20 min), 置于 -20 °C 冰箱待用。

配置不同浓度 PAGE 凝胶, 上样 (40 μg 10 μg/μL)、电泳分离 (90 V 1.5 h)、转膜 (200 mA 1 h)、封闭 (2 h), TBST 配置一抗 AKT(1 : 2 000)、p-AKT(1 : 1 000)、GSK3β(1 : 2 000)、p-GSK3β(1 : 1 000)、CNPY2(1 : 1 000)、Caspase-3(1 : 500)、β-actin(1 : 3 000), 孵一抗 4 °C 冰箱过夜, 次日, 室温孵育对应二抗 2 h (兔抗 1 : 10 000, 鼠抗 1 : 5 000), TBST 洗涤 (3 次 10 min/次), 显色, 曝光 (ECL 显色液), 实验重复 3 次, Image J 计算灰度值。

1.4.6 小鼠肝脏病理形态检测

苏木精 - 伊红染色: 常规固定、脱水、浸蜡包埋、切片脱蜡、染色、透明封固, 显微镜采集图像, 400 倍镜下观察, Image Pro plus 6.0 分析病理情况, 并根据肝细胞脂肪变性所占的面积进行评分, 分为 0, 1, 2, 3, 4 分 5 级, 0 分含脂滴的肝细胞面积最小, 4 分含脂滴的肝细胞面积最大 [18]。

油红 O 染色: 常规固定、脱水、OTC 包埋、冰冻切片、油红染色、苏木复染、封固, 显微镜采集图像, 400 倍镜下观察, Image Pro plus 6.0 分析病理情况, 并计算出每个视野中脂滴的平均吸光度值, 以吸光度值 /μm² 表示 [18]。

1.4.7 TUNEL 检测肝细胞凋亡 按照凋亡检测试剂盒说明书操作, 切片脱蜡、透明、封闭、制阳性片、连接、标记、显色、复染、封固, 荧光显微镜下快速观察凋亡情况, 显微镜采集图像, 400 倍镜下观察, Image J 计算肝细胞凋亡率。

1.5 主要观察指标 ①小鼠体质量及肝指数; ②血脂及肝功能; ③病理形态; ④ CNPY2、p-AKT/AKT、p-GSK3β/GSK3β、Caspase-3 蛋白表达量; ⑤肝细胞凋亡率。

1.6 统计学分析 采用 Image J 进行 Western Blotting 条带分析, Image Pro plus 6.0 进行病理情况分析, GraphPad Prism 9.0 进行作图, SPSS 27.0 进行数据处理。计量资料

均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验, 基因敲除前后两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。实验的统计学方法已经成都体育学院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验有效样本量 50 只, 初始入选 60 只小鼠, 第 9 周造模检测处死 8 只, 有氧运动过程中跑台死亡 2 只, 余下 50 只全部纳入结果分析。

2.2 各组小鼠基本情况、体质量及肝指数结果 各组小鼠身体发育情况、毛发、粪便、活跃度均良好。

2.2.1 体质量 实验初期, 各组小鼠初始体质量差异无显著意义 ($P > 0.05$)。第 9 周: 在 wt 小鼠和 ko 小鼠各自组内, 模型组较对照组小鼠体质量均显著增加 ($P < 0.05$); wt 小鼠和 ko 小鼠对应组相比, ko 小鼠体质量显著降低 ($P < 0.05$)。第 18 周: 每组小鼠体质量均有所增加。在 wt 小鼠和 ko 小鼠各自组内, 模型组较对照组小鼠体质量均显著增加 ($P < 0.05$); wt 模型运动组较 wt 模型组体质量显著降低 ($P < 0.05$), ko 模型运动组较 ko 模型组小鼠体质量差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。wt 小鼠和 ko 小鼠对应组相比, ko 组小鼠体质量显著降低 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 | 各组小鼠体质量及肝指数结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=8-9$)
Table 2 | Results of body weight and liver index of mice in each group

指标	小鼠类型	对照组	模型组	模型运动组
初始体质量 (g)	wt 小鼠	19.73±0.54	20.13±0.65	20.01±0.56
	ko 小鼠	19.35±1.90	19.98±1.65	19.80±0.58
第 9 周体质量 (g)	wt 小鼠	26.38±0.88	34.56±1.45 ^a	35.53±4.12
	ko 小鼠	21.22±0.61 ^c	24.38±1.83 ^{ac}	24.48±1.61 ^c
第 18 周体质量 (g)	wt 小鼠	29.13±1.22	50.45±2.67 ^a	41.93±2.23 ^b
	ko 小鼠	22.52±0.62 ^c	28.14±4.63 ^{ac}	27.10±2.76 ^c
第 18 周肝指数 (g/g)	wt 小鼠	0.028±0.002	0.037±0.005 ^a	0.026±0.002 ^b
	ko 小鼠	0.026±0.001	0.029±0.003	0.028±0.003

表注: wt 小鼠 = 野生 C57/BL6J 小鼠, ko 小鼠 = CNPY2 基因敲除 C57/BL6J 小鼠; 同期与对照组比较, ^a $P < 0.05$, 同期与模型组比较, ^b $P < 0.05$, 与 wt 小鼠比较, ^c $P < 0.05$ 。

2.2.2 肝指数 结果显示: 第 18 周 wt 模型组较 wt 对照组小鼠肝指数显著升高 ($P < 0.05$); wt 模型运动组较 wt 模型组小鼠肝指数显著下降 ($P < 0.05$); ko 小鼠组间肝指数无显著差异。wt 小鼠与 ko 小鼠对应组相比, ko 模型组小鼠肝指数降低, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 各组小鼠血清生化指标结果

2.3.1 血脂代谢指标 在 wt 小鼠和 ko 小鼠各自组内, 模型组较对照组小鼠血清总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白均显著升高 ($P < 0.05$), 高密度脂蛋白显著降低 ($P < 0.05$); 模型运动组较模型组小鼠血清总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白均显著降低 ($P < 0.05$), wt 模型运动组小鼠

高密度脂蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)，ko 模型运动组小鼠高密度脂蛋白表达升高，但差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。wt 小鼠与 ko 小鼠对应组相比，ko 模型组较 wt 模型组小鼠血清总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白均显著降低 ($P < 0.05$)，高密度脂蛋白显著升高 ($P < 0.05$)；ko 模型运动组较 wt 模型运动组小鼠血清总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白均显著降低 ($P < 0.05$)，高密度脂蛋白差异无显著性意义 ($P > 0.05$)，见图 2。

2.3.2 肝功能指标 在 wt 小鼠和 ko 小鼠各自组内，模型组较对照组小鼠血清丙氨酸氨基转氨酶、天门冬氨酸氨基转氨酶均显著升高 ($P < 0.05$)；模型运动组较模型组小鼠血清丙氨酸氨基转氨酶、天门冬氨酸氨基转氨酶均显著降低 ($P < 0.05$)。wt 小鼠和 ko 小鼠对应组相比，ko 模型组较 wt 模型组血清丙氨酸氨基转氨酶显著降低 ($P < 0.05$)；其他对应组比较差异无显著意义 ($P > 0.05$)，见图 2。

2.4 各组小鼠肝组织病理形态结果

2.4.1 苏木精 - 伊红染色 结果显示：在 wt 小鼠和 ko 小鼠各自组内，对照组肝细胞形态规整，结构清晰无病变；模型组较对照组肝细胞排列紊乱、伴肿胀空泡，炎性浸润及脂肪性变显著 ($P < 0.05$)；模型运动组较模型组肿胀空泡、炎性浸润、脂肪性变情况显著改善 ($P < 0.05$)。wt 小鼠和 ko 小鼠对应组相比，ko 组较 wt 组肝细胞结构空泡化、炎性细胞浸润、脂肪性变情况显著改善 ($P < 0.05$)，见图 3。

2.4.2 油红 O 染色 结果显示：在 wt 小鼠和 ko 小鼠各自组内，对照组仅有少量脂肪颗粒，模型组较对照组出现严重脂质沉积，且细胞核被脂滴挤至边缘，脂滴密度显著升高 ($P < 0.05$)，模型运动组较模型组脂滴密度显著下降 ($P < 0.05$)。wt 小鼠和 ko 小鼠对应组相比，ko 组较 wt 组脂滴密度均显著下降 ($P < 0.05$)，见图 4。

2.5 各组小鼠肝组织蛋白表达结果 由图可知，在 wt 小鼠组内，模型组较对照组 CNPY2 表达显著升高 ($P < 0.05$)，模型运动组较模型组 CNPY2 表达显著降低 ($P < 0.05$)；ko 组小鼠 CNPY2 基因敲除几乎不表达。在 wt 小鼠和 ko 小鼠各自组内，模型组较对照组 p-AKT/AKT、p-GSK3 β /GSK3 β 表达均显著降低 ($P < 0.05$)，Caspase-3 表达均显著升高 ($P < 0.05$)；模型运动组较模型组 p-AKT/AKT、p-GSK3 β /GSK3 β 表达均显著升高 ($P < 0.05$)，Caspase-3 表达均显著降低 ($P < 0.05$)。wt 小鼠与 ko 小鼠对应组相比，ko 组较 wt 组 p-AKT/AKT、p-GSK3 β /GSK3 β 表达均显著升高 ($P < 0.05$)，Caspase-3 表达均显著降低 ($P < 0.05$)，见图 5。

2.6 各组小鼠肝组织 TUNEL 检测结果 结果可见，蓝色为正常细胞核，绿色为凋亡细胞核 (箭头标记处为例)。在 wt 小鼠和 ko 小鼠各自组内，模型组较对照组呈现较多凋亡细胞核，肝细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)；模型运动组细胞凋亡数量有所减少，肝细胞凋亡率显著下降 ($P <$

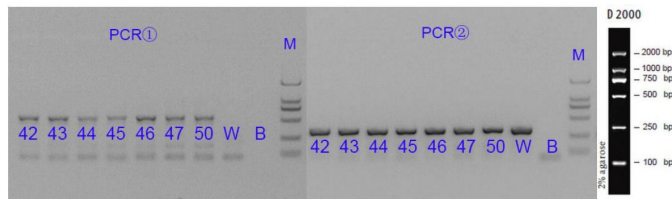
0.05)。wt 小鼠与 ko 小鼠对应组相比，ko 组较 wt 组凋亡数量减少，肝细胞凋亡率显著下降 ($P < 0.05$)，见图 6。

3 讨论 Discussion

非酒精性脂肪肝是与代谢功能障碍相关疾病的肝脏表现，其特征在肝脏中脂肪的积累，还包括病理性脂肪肝变性和放射性弥漫性脂肪肝及血脂代谢和肝功能紊乱^[19]，在非酒精性脂肪肝动物模型中会表现出肥胖、胰岛素抵抗、脂肪变性、小叶内炎症、肝细胞气球样变，血脂代谢异常等^[20]。马晓月等^[21-22]汇总不同品系小鼠造模时长，发现多数品系小鼠 8 周即可构建非酒精性脂肪肝模型。参照已有文献^[27]，此次实验选用品系倾向于发展肥胖的 C57/BL6J 小鼠，采用 8 周高脂饮食诱导 C57/BL6J 小鼠构建非酒精性脂肪肝模型^[16, 23-24]。结果显示，wt 小鼠和 ko 小鼠的模型组相较于对照组，出现体质量增大，肝组织出现脂肪变性并伴随炎症浸润、大量脂质沉积、布满脂滴，与过往研究一致^[23-24]，提示此次实验非酒精性脂肪肝小鼠模型构建成功。小鼠喂养至第 18 周，wt 小鼠和 ko 小鼠的模型组相较于对照组出现体型体质量增大、毛发无光泽杂乱、行动迟缓等表象；肝组织出现脂肪变性空泡，脂质沉积，脂滴广泛分布，细胞核被脂滴挤至边缘；血脂代谢紊乱及肝功能受损，提示非酒精性脂肪肝在无干预情况下，体内脂肪蓄积，严重程度随喂养周期的延长而加重，与过去研究一致^[21]。

过往研究报道，肝细胞凋亡是诱导非酒精性脂肪肝肝损伤的重要病理性过程，在肝脏脂质堆积、炎症等发生的过程中，肝细胞凋亡数量明显增多，且肝细胞凋亡的数量与非酒精性脂肪肝的严重程度呈正比^[25]，因而抑制肝细胞凋亡是治疗非酒精性脂肪肝的重要突破口^[3]。肝细胞凋亡牵涉多个信号通路，可由多种效应引起，其具体机制尚未明确。Caspase-3 是一种促凋亡蛋白，已被证实与非酒精性脂肪肝肝细胞损伤程度呈正比^[26]。AKT/GSK3 β 通路具有丝氨酸 / 苏氨酸激酶活性，磷酸化后可通过抑制促凋亡因子，调控细胞凋亡，是抑制肝细胞凋亡的经典信号通路^[27]。

CNPY2 作为新型蛋白，HONG 等^[8]研究发现，CNPY2 缺失可以保护非酒精性脂肪肝小鼠肝脏免受细胞损伤和炎症的攻击，维持代谢稳态。在另一项肝癌的研究中，CNPY2 的缺失激活了 GSK3 β 的磷酸化，抑制肝癌细胞生长^[7]。ZHAO 等^[28]在脑梗死模型中发现，小檗碱通过下调 CNPY2 信号通路可减轻脑缺血再灌注损伤诱导的神经元凋亡。CHU 等^[14]在帕金森模型中发现，CNPY2 通过 AKT/GSK3 β 途径抑制神经元凋亡。通过以上的研究结果，以及结合课题组前期的研究结果推测，CNPY2 可能通过介导细胞凋亡的途径影响非酒精性脂肪肝的发生发展，且 AKT/

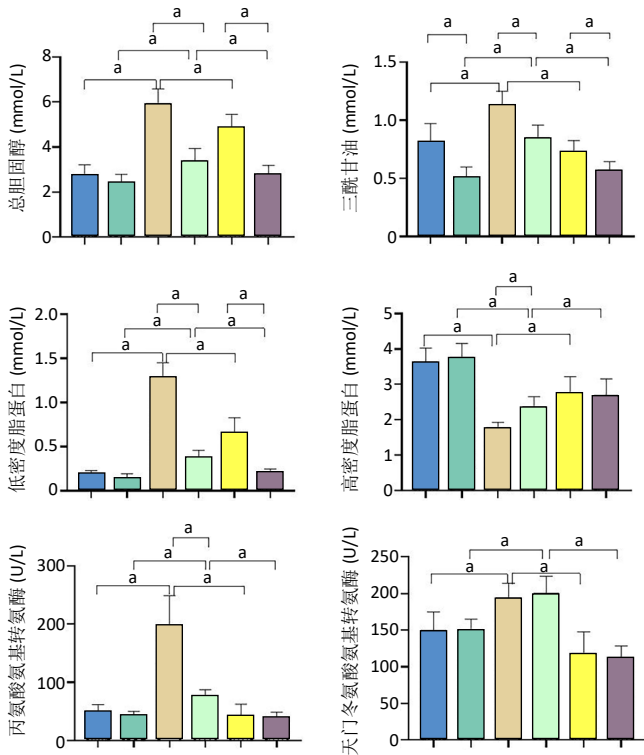


图注：数字为小鼠 id 尾号；PCR ①为 ko 小鼠（基因敲除）；PCR ②为 wt 小鼠（野生型）；W 为野生型 C57/BL6J 小鼠；B 为 negative 空白对照组；M 为 Marker。

图 1 | 基因敲除小鼠电泳图

Figure 1 | Electrophoresis gel of gene-knockout mice

■ wt 对照组 ■ ko 对照组 ■ wt 模型组 ■ ko 模型组 ■ wt 模型运动组 ■ ko 模型运动组



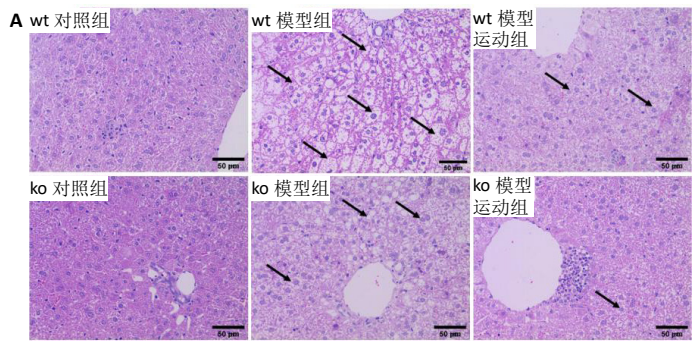
图注：^a $P < 0.05$ 。wt：野生型小鼠；ko：基因敲除小鼠。

图 2 | 第 18 周各组小鼠血清生化指标

Figure 2 | Serum biochemical indexes of mice in each group at week 18

GSK3 β 通路可能参与其中。此次研究结果显示：wt 小鼠高脂饮食诱导的模型组 CNPY2 表达量显著上调，AKT/GSK3 β 通路活性显著降低，Caspase-3 表达水平和肝细胞凋亡率显著升高；与 wt 小鼠比较，ko 小鼠模型组 AKT/GSK3 β 通路活性显著升高，Caspase-3 表达水平和肝细胞凋亡率显著下降。提示 CNPY2 介导 AKT/GSK3 β 通路参与高脂饮食诱导非酒精性脂肪肝的形成，CNPY2 基因的缺失减缓非酒精性脂肪肝发生发展，与过去研究结果一致^[8]。

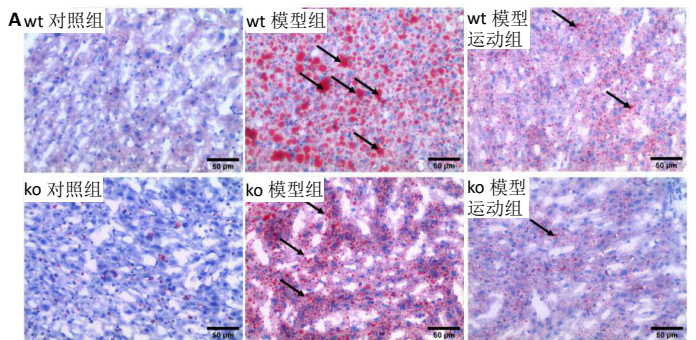
研究证实，有氧运动是影响非酒精性脂肪肝患者脂质代谢的重要因素，可减少游离脂肪酸，减少肝脏脂肪的合成，改善血脂异常^[4, 29]。此外，研究也证实了有氧运动对非酒精性脂肪肝病理组织形态有可逆性的影响，可有效改善肝组织形态结构和微结构^[30]。刘倩倩等^[31]研究发现，规律且适宜强度的有氧运动对高脂诱导非酒精性脂



图注：图 A 为苏木精 - 伊红染色结果，标尺为 50 μ m，箭头指向为肝组织空泡化、炎症浸润；B 为病理积分统计图，^a $P < 0.05$ 。wt：野生型小鼠；ko：基因敲除小鼠。

图 3 | 第 18 周各组小鼠肝组织苏木精 - 伊红染色结果

Figure 3 | Hematoxylin-eosin staining results of liver tissue of mice at week 18

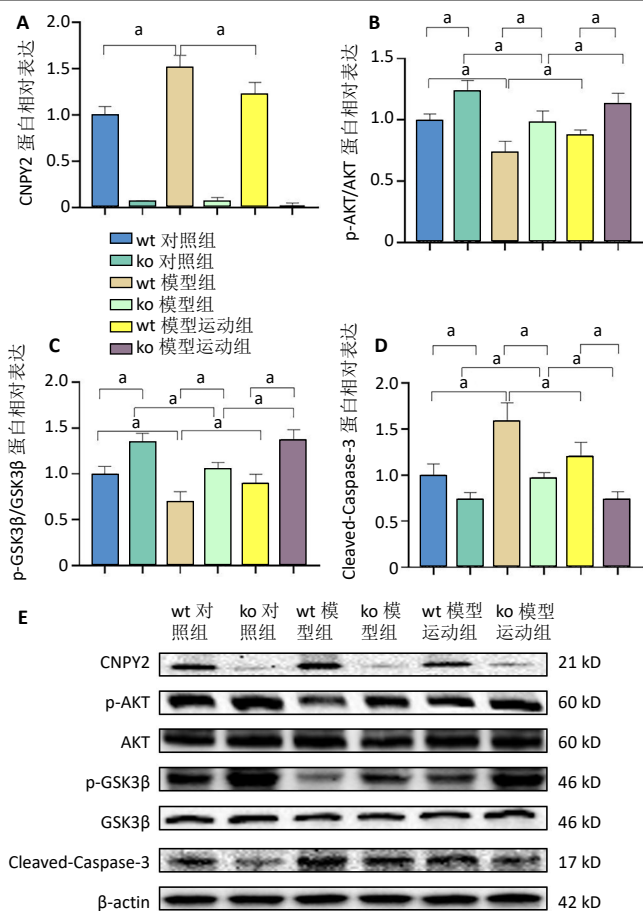


图注：图 A 为油红 O 染色结果，尺为 50 μ m，箭头指向为脂滴；B 为脂滴吸光度统计图，^a $P < 0.05$ 。wt：野生型小鼠；ko：基因敲除小鼠。

图 4 | 第 18 周各组小鼠肝组织油红 O 染色结果

Figure 4 | Oil red O staining results of mouse liver tissue in each group at week 18

肪肝具有积极的干预作用。此次实验中小鼠的运动强度参考以往研究^[17]，进行 8 周的有氧运动干预，结果显示与模型组相比，模型运动组小鼠毛发及活跃度较好，体质量及肝指数下降，肝组织肿胀、炎症脂质堆积减轻，血脂代谢紊乱及肝功能受损情况有明显改善，与 ZENG 等^[32]



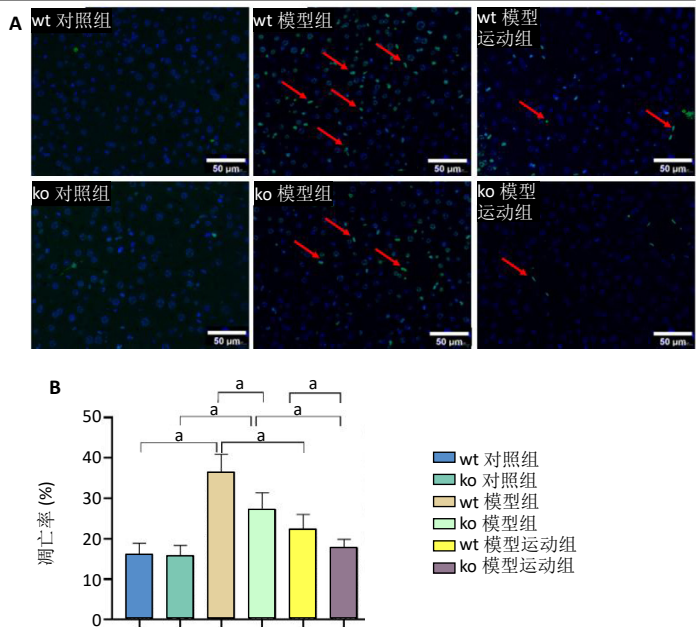
图注：图 A-D 为各组蛋白表达量统计比较，^a*P* < 0.05。图 E 为蛋白条带。CNPY2：冠层 FGF 信号调节器 2；p-AKT：磷酸化蛋白激酶 B；AKT：蛋白激酶 B；p-GSK3β：磷酸化糖原合成酶激酶 3β，GSK3β：糖原合成酶激酶 3β；Cleaved-Caspase-3：活化天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3。wt：野生型小鼠；ko：基因敲除小鼠。

图 5 | 各组小鼠肝组织蛋白表达结果

Figure 5 | Results of liver tissue protein expression in each group of mice

研究一致，提示有氧运动能够改善非酒精性脂肪肝小鼠肝脏病理形态学结构，促进脂肪分解，减少脂类物质，提高肝脏功能。

有氧运动可通过多种途径介导凋亡，发挥保护作用^[30]。研究证实，有氧运动可减轻非酒精性脂肪肝诱导的线粒体功能障碍，通过减少从线粒体释放激活凋亡的启动子来减弱 Caspase-3 的表达抑制凋亡^[30]。前期研究发现，有氧运动可通过增强 AKT/GSK3β 通路的表达抑制 Caspase-3，减少肝细胞凋亡，对非酒精性脂肪肝小鼠产生保护作用^[12]。但有氧运动是否通过 CNPY2 介导 AKT/GSK3β 通路调控非酒精性脂肪肝肝细胞凋亡，暂不明了。此次研究结果显示，wt 小鼠模型运动组相较于模型组 CNPY2 表达显著减少，AKT/GSK3β 通路活性显著上调；Caspase-3 表达和肝细胞凋亡率显著降低。与 wt 小鼠比较，ko 小鼠模型运动组 AKT/GSK3β 通路活性显著升高，Caspase-3 表达水平和肝细胞凋亡率显著下降。提示



图注：图 A 小鼠肝组织 TUNEL 染色显微镜观察结果，标尺为 50 μm，箭头指向为凋亡细胞核（绿色）；B 为凋亡率统计图，^a*P* < 0.05。wt：野生型小鼠；ko：基因敲除小鼠。

图 6 | 第 18 周小鼠肝组织 TUNEL 检测结果

Figure 6 | Results of TUNEL detection in mouse liver tissue at week 18

CNPY2 介导 AKT/GSK3β 通路在有氧运动中干预非酒精性脂肪肝的发生发展。

综上，CNPY2 介导 AKT/GSK3β 通路参与高脂饮食诱导非酒精性脂肪肝的形成。CNPY2 基因缺失和有氧运动可有效改善非酒精性脂肪肝，其机制可能与有氧运动降低 CNPY2 表达，激活 AKT/GSK3β 通路，进而抑制肝细胞凋亡有关。

此次实验还存在一定的局限性：由于基因鼠数量限制，未设立对照运动组，缺少小鼠在正常状态下运动组，相关蛋白表达及病理组织形态的差异。为进一步证实 CNPY2 介导 AKT/GSK3β 通路在有氧运动下防治非酒精性脂肪肝作用机制，后续会完善相关实验进行验证。

作者贡献：王佳倩负责文章构思撰写、分子实验及数据整理，蒋昌君、彭毅、马咪负责小鼠喂养干预、分子实验操作、数据整理统计，李军汉负责研究设计、论文指导及质量控制。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：文章撰写遵守了《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] CAO L, AN Y, LIU H, et al. Global epidemiology of type 2 diabetes in patients with NAFLD or MAFLD: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 2024;22(1):101.
- [2] MELLEMKJAER A, KJAER MB, HALDRUP D, et al. Management of cardiovascular risk in patients with metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Eur J Intern Med.* 2024;122:28-34.
- [3] YANG Z, WANG L. Current, emerging, and potential therapies for non-alcoholic steatohepatitis. *Front Pharmacol.* 2023;14:1152042.
- [4] YANG Y, LI X, LIU Z, et al. Moderate Treadmill Exercise Alleviates NAFLD by Regulating the Biogenesis and Autophagy of Lipid Droplet. *Nutrients.* 2022;14(22):4910.
- [5] HATTA K, GUO J, LUDKE A, et al. Expression of CNPY2 in mouse tissues: quantification and localization. *PLoS One.* 2014;9(11):e111370.
- [6] CHEN KQ, ZHANG YQ, WANG ZB, et al. Progress in Research on CNPY2 in Diseases. *Mini Rev Med Chem.* 2024;24(4):391-402.
- [7] HONG F, LIN CY, YAN J, et al. Canopy Homolog 2 contributes to liver oncogenesis by promoting unfolded protein response-dependent destabilization of tumor protein P53. *Hepatology.* 2022;76(6):1587-1601.
- [8] HONG F, LIU B, WU BX, et al. CNPY2 is a key initiator of the PERK-CHOP pathway of the unfolded protein response. *Nat Struct Mol Biol.* 2017;24(10):834-839.
- [9] SCHWABE RF, LUEDDE T. Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(12):738-752.
- [10] SHOJAIE L, IORGA A, DARA L. Cell Death in Liver Diseases: A Review. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):9682.
- [11] HOSSEINI SP, FARIVAR S, REZAEI R, et al. Fibroblast growth factor 2 reduces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in in-vitro Non-Alcoholic Fatty Liver Disease model. *Daru.* 2023;31(1):29-37.
- [12] 王佳倩, 李亚龙, 蒋昌君, 等. 有氧运动对 AKT/GSK3 β 介导非酒精性脂肪肝病细胞凋亡的影响 [J]. *卫生研究*, 2023,52(2):246-252.
- [13] DOU Y, LEI J Q, GUO SL, et al. The CNPY2 enhances epithelial-mesenchymal transition via activating the AKT/GSK3 β pathway in non-small cell lung cancer. *Cell Biol Int.* 2018;42(8):959-964.
- [14] CHU M, LIU H, XIONG Z, et al. Canopy Fibroblast Growth Factor Signaling Regulator 2 (CNPY2) Inhibits Neuron Apoptosis in Parkinson's Disease via the AKT/GSK3 β Pathway. *Curr Neurovasc Res.* 2021;18(1):102-112.
- [15] VAN HERCK MA, VONGHIA L, FRANCQUE SM. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-A Starter's Guide. *Nutrients.* 2017;9(10):1072.
- [16] 潘磊, 张金彪, 崔荣岗, 等. 非酒精性脂肪肝 C57BL/6 小鼠模型的建立 [J]. *中国组织工程研究*, 2016,20(40):6054-6059.
- [17] MARQUES CM, MOTTA VF, TORRES TS, et al. Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in high-fat fed C57BL/6 mice. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43(5):467-475.
- [18] 张树玲, 李军汉, 王佳倩, 等. 有氧运动干预非酒精性脂肪肝小鼠肝脏 JAK2/STAT5 信号通路的变化 [J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(17):2690-2695.
- [19] MAKRI E, GOULAS A, POLYZOS SA. Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis and Emerging Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Arch Med Res.* 2021;52(1):25-37.
- [20] AVTANSKI D, PAVLOV VA, TRACEY KJ, et al. Characterization of inflammation and insulin resistance in high-fat diet-induced male C57BL/6J mouse model of obesity. *Animal Model Exp Med.* 2019;2(4):252-258.
- [21] 马晓月, 李钦钦, 陆华贞, 等. 非酒精性脂肪肝病动物模型及细胞模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023,33(6):120-127.
- [22] KOHLI R, FELDSTEIN AE. NASH animal models: are we there yet?. *J Hepatol.* 2011;55(4):941-943.
- [23] FANG T, WANG H, PAN X, et al. Mouse models of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): pathomechanisms and pharmacotherapies. *Int J Biol Sci.* 2022;18(15):5681-5697.
- [24] FLESSA CM, NASIRI-ANSARI N, KYROU I, et al. Genetic and Diet-Induced Animal Models for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Research. *Int J Mol Sci.* 2022;23(24):15791.
- [25] GAUTHERON J, GORES GJ, RODRIGUES CMP. Lytic cell death in metabolic liver disease. *J Hepatol.* 2020;73(2):394-408.
- [26] ZHANG Y, LIU Y, LIU X, et al. Exercise and Metformin Intervention Prevents Lipotoxicity-Induced Hepatocyte Apoptosis by Alleviating Oxidative and ER Stress and Activating the AMPK/Nrf2/HO-1 Signaling Pathway in db/db Mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:2297268.
- [27] HAN JW, ZHAN XR, LI XY, et al. Impaired PI3K/Akt signal pathway and hepatocellular injury in high-fat fed rats. *World J Gastroenterol.* 2010;16(48):6111-6118.
- [28] ZHAO L, LI H, GAO Q, et al. Berberine Attenuates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury Induced Neuronal Apoptosis by Down-Regulating the CNPY2 Signaling Pathway. *Front Pharmacol.* 2021;12:609693.
- [29] COOK JJ, WEI M, SEGOVIA B, et al. Endurance exercise-mediated metabolic reshuffle attenuates high-caloric diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol.* 2022;27(4):100709.
- [30] HU Z, ZHANG H, WANG Y, et al. Exercise activates Sirt1-mediated Drp1 acetylation and inhibits hepatocyte apoptosis to improve nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis.* 2023;22(1):33.
- [31] 刘倩倩, 秦智, 侯改霞, 等. 有氧运动对 NAFLD 大鼠肝细胞线粒体结构功能的影响 [J]. *中国体育科技*, 2016,52(5):75-82+97.
- [32] ZENG Y, ZHANG X, LUO W, et al. Effect of exercise intervention on clinical parameters in patients with non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2024;36(1):1-12.

(责任编辑: ZLJ, WZH, ZN, QY)