

针刺对肥胖大鼠脂肪组织 β -肾上腺素能受体基因表达的影响

刘志诚¹ 孙凤岷² 赵东红³ 张中成¹ 孙志¹ 吴海涛¹ 洪承铨¹ 朱苗花¹ 李朝军³

摘要 目的:探讨针刺对肥胖大鼠机体褐色脂肪组织 β -肾上腺素能受体(β -AR)基因表达水平的作用。方法:观察针刺治疗前后肥胖大鼠肥胖指标和褐色脂肪组织 β -AR 基因表达的变化。结果:肥胖大鼠肥胖指标显著高于正常大鼠,而褐色脂肪组织 β -AR 基因表达水平明显低于正常大鼠。相关指标显示,肥胖指标与褐色脂肪组织 β -AR 基因表达水平呈负相关。针刺可使肥胖大鼠褐色脂肪组织 β -AR 基因表达水平明显回升。结论:褐色脂肪组织 β -AR 基因表达异常低下可能是产生肥胖的重要因素。针刺促进褐色脂肪组织 β -AR 基因表达可能是针刺减肥的细胞分子机制之一。

关键词 肥胖症 针灸疗法 基因表达 针灸效应 受体,肾上腺素能 β 针灸效应

近年研究表明,肥胖是由特定的生化因子引起的一系列进食调控和能量代谢紊乱的疾病,发病过程十分复杂。肥胖症的治疗至今未见明显突破,理想的、无毒副作用的减肥药正在探索之中。针灸治疗肥胖及其并发症的方法疗效持久、无毒副作用,深受广大肥胖症患者的欢迎^[1]。本文就针灸对肥胖机体脂肪组织 β -肾上腺素能受体(β -AR)基因表达的影响进行探讨,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验性肥胖大鼠模型的制作:1月龄刚断乳 SD 雄性大鼠,体重 50~70g,由南京军区总医院实验动物中心提供。将大鼠随机分成两组。一组用普通饲料喂养 4 个月,作为普食饲料组。另一组用自制高脂致肥饲料喂养 4 个月,作为高脂饲料组。所有大鼠在造模期间自由摄食和饮水,饲料和水每日更换 1 次。大鼠肥胖判断标准:凡经高脂饲料喂养 4 个月后,SD 雄性大鼠的体重超过普食饲料喂养大鼠体重的 20% 作为实验性肥胖大鼠^[2]。

1.2 实验步骤:以普通全价鼠饲料喂养的大鼠作为正常对照组,简称正常组(6 只)。将造模成功的实验性肥

胖大鼠随机分为两组,一组不做任何治疗,为模型对照组,简称对照组(6 只);另一组给予针刺治疗,为针刺治疗组,简称针刺组(6 只)。

分别将针刺组大鼠放入固定器中,取一侧“后三里”(相当于足三里)和“内庭”穴,用 32 号 1 寸毫针,分别刺入 5mm 和 3mm 深度,然后接通电针仪(电针综合治疗仪 G6805-Ⅲ 型,福建省医疗器械厂生产),采用频率 10Hz、强度 1.5V 连续波,每次刺激 10 分钟,每日 1 次,连续 14 天,左右侧交替取穴。

各组大鼠实验期间均采用普通全价鼠饲料喂养,自由摄食和饮水,每日更换饲料和水。针刺组大鼠给予针刺期间,正常组和对照组大鼠分别每天放入大鼠固定器中适应 15 分钟,持续 14 天。实验前后观察大鼠摄食量、饮水量、大小便、体重、体长及 Lee's 指数 $[\sqrt{\text{体重(g)}/\text{体长(cm)}} \times 10^3]$ 等。

实验结束后,禁食过夜,次日断头处死,采集全血,静置分离血清, -20℃ 保存待测,迅速分离心包、肾周和附睾等部位脂肪,称重并记录。同时迅速分离肩胛间和颈背的褐色脂肪组织,用预冷的磷酸缓冲盐溶液清洗,在平皿冰浴中剪成小碎块,同时将液氮倒在褐色脂肪组织上,使之结成块,移至标记好冻存管中,放入液氮罐中保存。次日分别将冻成块的褐色脂肪组织放入乳钵中研磨成粉状,供 RNA 抽提。

1.3 检测方法

总 RNA 抽提:按照德国 BM 公司 Tripure 分离试剂盒说明书的操作步骤,提取褐色脂肪组织的总 RNA。用甲醛琼脂糖凝胶电泳法鉴定 RNA 的完整性,紫外分光光度法确定 RNA 的量和纯度。

逆转录:取 1 μ g RNA 逆转录合成 cDNA。逆转录反应按照美国 Promega 公司提供的逆转录系统试剂盒说明书进行。逆转录产物 -70℃ 冰箱保存备用。

引物设计与合成:根据 AR cDNA 序列,设计合成了扩增 AR cDNA 的引物。引物由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列分别为:ARf 5'-AGTGGGACTCCTCGTAATG-3'; ARr 5'-CGCTTAGCTACGACGAAC-3', 扩增长度 444bp。选用 β -肌动蛋白(β -actin) cDNA 的引物作为内参照。 β -actin f 5'-CGTAAAGACCTCTATGCCAA-3'; β -actin r 5'-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970923)

1 南京中医药大学第二临床医学院针研所针灸临床研究室,南京市汉中门 282 号(210029)

2 南京人口管理学院

3 南京师范大学

收稿日期:2003-01-10;修回日期:2003-02-21

AGCCATGCCAAATGTGTCAT-3', 扩增长度 473bp。

PCR 扩增反应: 按照美国 Promega 公司提供的 PCR 扩增反应体系以及步骤进行。

产物分析: 取 5 μ l PCR 反应产物在 1.2% 琼脂糖甲醛凝胶电泳 1h, 应用美国 Bio-Rad 公司 GDS-800 型凝胶成像系统扫描定量并拍摄电泳条带的灰度, 以确定扩增物的相对量。对 AR mRNA 表达分析时, 以同样条件扩增的 AR cDNA 与 β -actin cDNA 比值表示样品 AR mRNA 表达变化的差异。

放射免疫测定法: 瘦素(LP)和胰岛素(INS)检测药盒由上海第二军医大学神经生物学教研室提供, 采用放射免疫法(RIA)用 SN695BY 计数器(上海日环仪器厂生产)测定血清 LP 和 INS 的含量。

1.4 统计学方法: 实验数据采用 SPSS 统计软件进行分析, 组间比较采用 *t* 检验, 相关分析采用多元相关分析。

2 结果

2.1 针刺对实验性肥胖大鼠肥胖指标的影响: 表 1 示, 肥胖大鼠体重和 Lee's 指数均显著高于正常大鼠水平(P 均 < 0.01), 针刺后, 肥胖大鼠体重和 Lee's 指数显著回降(P 均 < 0.01), 与对照组比较, 差异具有显著性($P < 0.01$)。

2.2 针刺对肥胖大鼠不同部位脂肪量的影响比较: 表 2 示, 对照组三部位脂肪量均显著高于正常组水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 针刺组三部位脂肪量均低于对照组水平, 经统计学处理差异均具有显著性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 说明针刺具有减肥作用。

2.3 针刺对肥胖大鼠脂肪组织 β -AR 基因表达的影响: 表 3 示, 对照组大鼠褐色脂肪组织 β -AR 基因表达相对密度值显著降低, 与正常组比较, 差异有非常显著性($P < 0.01$); 针刺组大鼠褐色脂肪组织 β -AR 基因表达的相对密度值显著增高, 与对照组比较, 差异有非常显著性($P < 0.01$), 与正常组比较, 差异无显著性。

2.4 肥胖指标与褐色脂肪组织 β -AR 基因表达水平的相关性分析: 表 4 示, 大鼠褐色脂肪组织 β -AR 基因表达水平与体重、Lee's 指数和体脂量均呈负相关。

2.5 针刺对肥胖大鼠血清 LP 和 INS 含量的影响: 表 5 示, 对照组大鼠 LP 和 INS 含量均较正常组明显升高($P < 0.05$); 针刺组大鼠血清 LP 和 INS 含量均较对照组明显回降, INS 与对照组比较, 差异具有显著性($P < 0.01$)。

3 讨论

近年的研究表明, 肥胖的发生与遗传基因、环境因素、膳食结构等多种因素有关, 其中决定的因素是基

表 1 各组体重、体长和 Lee's 指数的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重(g)	体长(cm)	Lee's 指数
正常组	6	刺激前 383.81 $\pm$ 29.77	24.24 $\pm$ 0.72	299.80 $\pm$ 4.02
		刺激后 398.15 $\pm$ 29.35	24.28 $\pm$ 0.70	302.99 $\pm$ 4.14
对照组	6	刺激前 519.02 $\pm$ 30.32	25.12 $\pm$ 0.52	320.04 $\pm$ 3.69
		刺激后 516.33 $\pm$ 30.21 $\Delta\Delta$	25.19 $\pm$ 0.51	318.48 $\pm$ 3.68 $\Delta\Delta$
针刺组	6	刺激前 519.64 $\pm$ 30.31	25.10 $\pm$ 0.52	320.30 $\pm$ 4.26
		刺激后 440.21 $\pm$ 28.16 $\Delta^* \Delta^{\#}$	25.19 $\pm$ 0.42	301.99 $\pm$ 4.16 $\Delta^* \Delta^{\#}$

与本组刺激前比较, $* P < 0.01$; 与正常组刺激后比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与对照组刺激后比较, $\Delta^{\#} P < 0.01$

表 2 各组不同部位脂肪量比较(g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	心包脂肪	肾周脂肪	附睾脂肪
正常组	6	0.55 $\pm$ 0.21	3.48 $\pm$ 2.12	2.69 $\pm$ 1.02
对照组	6	0.89 $\pm$ 0.17 Δ	7.78 $\pm$ 2.11 $\Delta\Delta$	5.58 $\pm$ 1.77 $\Delta\Delta$
针刺组	6	0.57 $\pm$ 0.11 $\Delta^{\#}$	4.46 $\pm$ 0.76 $\Delta^{\#}$	3.26 $\pm$ 0.78 $\Delta^{\#}$

与正常组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与对照组比较, $\Delta^{\#} P < 0.05$, $\Delta^{\#} P < 0.01$ 。表 3、表 5 同

表 3 各组脂肪组织 β -AR 基因表达水平的 RT-PCR 分析($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	β -AR(灰度值)	β -Actin(灰度值)	β -AR/ β -Actin
正常组	6	33.02 $\pm$ 6.06	105.26 $\pm$ 21.03	0.323 $\pm$ 0.068
对照组	6	15.87 $\pm$ 5.54 $\Delta\Delta$	93.23 $\pm$ 24.16	0.168 $\pm$ 0.047 $\Delta\Delta$
针刺组	6	37.39 $\pm$ 5.12 $\Delta^{\#}$	91.46 $\pm$ 22.21	0.425 $\pm$ 0.082 $\Delta^{\#}$

表 4 肥胖指标与褐色脂肪组织 β -AR 基因表达水平的相关分析

	体 重	Lee's 指数	体脂量
相关系数	-0.503	-0.695	-0.521
<i>P</i> 值	< 0.05	< 0.01	< 0.05

表 5 实验各组血清 LP 和 INS 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LP(ng/ml)	INS(μ IU/ml)
正常组	6	12.66 $\pm$ 2.56	91.65 $\pm$ 36.75
对照组	6	17.32 $\pm$ 3.08 Δ	175.32 $\pm$ 69.16 Δ
针刺组	6	14.26 $\pm$ 1.82	79.61 $\pm$ 24.63 $\Delta^{\#}$

因。由于体重的相对稳定涉及很多功能活动调节, 从基因水平看, 体重调节是由一个相对庞大的基因组决定的。肥胖病的发生尚与生活行为方式、摄食行为、嗜好、胰岛素反应以及社会心理因素相互作用有关。我们以往的工作显示, 肥胖大鼠血清 LP 和 INS 水平异常升高, 而下丘脑 LP 和 INS 水平以及瘦素受体(OB-R)基因表达异常低下。说明肥胖机体 LP 和 INS 血脑转运异常, 胰岛素受体(INSR)和 OB-R 基因表达缺陷可能是产生瘦素抵抗(LR)和 INS 抵抗(IR)及肥胖的重要原因^[3]。

目前认为,褐色脂肪组织(BAT)是哺乳动物体内高度特化的产热器官,是进行非战栗性产热的主要部位。已知解偶联蛋白(UCP)的作用是作为脂肪酸阴离子运载体,将不能透过线粒体膜的脂肪酸阴离子由线粒体内转运到线粒体外。脂肪酸阴离子在线粒体外通过与 H^+ 结合而重新进入线粒体,并被再氧化成脂肪酸阴离子,如此重复而导致由物质氧化形成的线粒体内膜两侧 H^+ 浓度梯度被消除,ADP不能磷酸化生成ATP,结果使呼吸作用与氧化磷酸化作用解偶联,使产能转化为产热,释放的能量以热能的形式释放出来,而不是形成ATP^[4~7]。实验证明,UCP基因水平的调节在UCP含量和BAT产热调节中起着决定作用,是BAT产热调节中心。机体产热与能量平衡、代谢、体重调节有重要关系。UCP基因表达水平受中枢神经核团、交感神经、神经内分泌等多因素的调控。这种作用主要是去甲肾上腺素(NA)和肾上腺素(Ad)与脂肪组织存在的 β -AR结合产生的生物学效应,即刺激UCP mRNA的转录,还可刺激UCP mRNA的翻译,使机体产热量增多,耗能增加,基础代谢率增高^[8]。

我们以往的研究显示,肥胖患者植物神经平衡指数异常低下,交感神经介质NA、Ad和多巴胺(DA)浓度异常低下,而反映副交感神经功能的指标唾液淀粉酶(S-Am)和全血乙酰胆碱酯酶(AChE)异常增高。与此同时,肥胖患者血浆cAMP异常低下^[9,10]。动物实验表明,肥胖大鼠褐色脂肪体积增大、充盈,脂滴大,胞质内线粒体明显减少而线粒体基质电子密度增高,嵴不能清楚显现,间质毛细管减少,说明肥胖大鼠褐色脂肪组织产热功能异常低下,这与我们观察到的肥胖患者基础代谢率低下相一致^[11,12]。

本文结果显示,肥胖大鼠具有多食、多饮、体重、Lee's指数和体脂均显著增高的特征,与此同时,肥胖大鼠褐色脂肪组织 β -AR基因表达水平显著低于正常大鼠水平,即肥胖大鼠褐色脂肪组织 β -AR转录水平异常低下。相关分析显示,大鼠褐色脂肪组织 β -AR基因表达水平与体重、Lee's指数和体脂量均呈负相关。说明BAT、 β -AR基因表达水平异常低下, β -AR数目减少,交感神经递质与 β -AR结合的生物学效应减弱,即产热量减少、耗能减少,必将导致肥胖的发生。

我们采用针灸治疗肥胖症及其并发症取得了良好的疗效,并在针灸减肥作用机理方面做了一系列的探讨,提出了针灸减肥的神经及神经体液作用机制^[12]。本文显示,肥胖大鼠经针刺治疗后,体重、Lee's指数和体脂量均显著回降,说明针刺具有良好的减肥效应。同时肥胖大鼠异常升高的血清LP和INS水平明显回

降,而褐色脂肪组织 β -AR基因表达水平明显回升。说明针刺对肥胖机体具有降低外周LP和INS的含量,纠正LR和IR的作用,还具有促进褐色脂肪组织 β -AR基因表达的作用。

综上所述,肥胖机体外周LP和INS含量异常升高和褐色脂肪组织 β -AR基因表达异常低下可能是产生肥胖的重要原因。针刺对肥胖机体外周LP和INS水平的良性调整作用以及促进褐色脂肪组织 β -AR基因表达可能是针刺减肥的细胞分子作用的重要方面。

参考文献

- 1 Liu ZC, Sun FM, Li J, et al. Study of the therapeutic effect of acupuncture on 1134 cases of simple obesity. The International Journal of Acupuncture, 1998, 2(2): 1-9.
- 2 刘志诚, 孙凤岷, 韩燕, 等. 针刺治疗单纯性肥胖症的实验研究. 针刺研究, 1998, 23(1): 69-75.
- 3 刘志诚, 孙凤岷, 赵东红, 等. 针刺对单纯性肥胖瘦素和胰岛素抵抗的影响. 中医药学刊, 2003, 21(1): 40-43.
- 4 Nisoli E, Tonello C, Curruba MO. Nerve growth factor, β -adrenergic receptor and uncoupling protein 1 expression in rat brown fat during postnatal development. Neurosci Lett, 1998, 246: 5-8.
- 5 Shimabukuro M, Zhou YT, Lee Y. Induction of uncoupling protein 2 mRNA by troglitazone in the pancreatic islets of Zucker diabetic fatty rats. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 237: 359-361.
- 6 Vidal-Puig A, Solaues G, Grucic D, et al. UCP₃: An uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 235: 79-82.
- 7 Loweel BB, Flier JS. Brown adipose tissue, β_3 -adrenergic receptors and obesity. Annu Rev Med, 1997, 48: 307-316.
- 8 Klaus S, Cassard-Doulcier AM, Champigny O, et al. Brown adipose tissue and the uncoupling protein UCP: cellular and molecular studies. In: Carey C, Florant GL, Wunder BA, et al. Life in the cold: Ecological, Physiological, and Molecular Mechanisms. Colorado: Westview Press, 1993: 381-388.
- 9 刘志诚, 肖少卿, 赵银龙, 等. 针灸减肥与植物神经功能的关系. 中国康复医学杂志, 1989, 4(6): 30-35.
- 10 刘志诚, 孙凤岷, 申冬珠, 等. 从植物神经功能和血浆环核苷酸含量变化研究针灸减肥作用. 中西医结合杂志, 1991, 11(2): 83-86.
- 11 刘志诚, 孙凤岷, 王耿, 等. 针刺对肥胖大鼠作用的形态学观察. 针刺研究, 1999, 24(4): 307-310.
- 12 刘志诚, 孙凤岷. 针灸治疗单纯性肥胖症临床和机理研究. 中华中西医结合杂志, 2001, 1(4): 16-18.

关于发展中华中医药学会会员的通知

为了加强学会与会员的联系,促进中医药学术交流和整体学术水平的提高,我会现在全国范围内发展会员。凡具有中级以上职称的中医药工作者,自愿填写入会申请登记表,即可入会(已在各省中医药学会入会者,不要重复入会)。入会者需交1张2寸照片、费用350元(5年会费300元,注册费50元)、职称证书复印件、1~3篇代表性学术文章寄至北京市樱花东路甲4号,中华中医药学会学术部高扬收。邮政编码:100029,电话:(010)64212828。