

不同强度电针对单纯性肥胖大鼠脂肪组织 C-反应蛋白、白细胞介素 6 基因表达的影响

刘祖丽¹ 唐成林^{2*} 余 敏¹ 侯懿烜¹ 郗 婕¹ 刘仁建¹

(1. 重庆医科大学中医药学院, 重庆市渝中区医学院路 1 号, 400016; 2. 重庆医科大学科研处)

基金项目: 重庆市卫生局资助项目(07-2-63); 重庆市九龙坡区科委资助项目(06370302)

* 通讯作者: cytcl996@163.com, (023) 68485555

[摘要] **目的** 观察电针对单纯性肥胖大鼠脂肪组织 C-反应蛋白(CRP)、白细胞介素 6(IL-6) 表达的影响, 并比较不同强度电针刺激的减肥效应差异。 **方法** 用普通鼠饲料喂养的 SD 雄性大鼠 10 只作为对照组; 用高脂饲料喂养制作肥胖大鼠模型, 并将造模成功的肥胖大鼠 30 只随机分为模型组、针刺 1 组、针刺 2 组, 每组 10 只。针刺 1 组、针刺 2 组针刺一侧足三里和三阴交穴, 并分别施以强度为 1V 和 2V 的电针刺激, 每次治疗 10min, 每日 1 次, 连续治疗 14d。分别计算各组大鼠治疗前后的 Lee's 指数, 实验室检测大鼠胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C), 并采用 RT-PCR 技术测定脂肪组织 CRP、IL-6 基因 mRNA 表达水平。 **结果** 治疗后两个针刺组大鼠 Lee's 指数、脂肪组织 CRP、IL-6 基因 mRNA 表达以及 TC 和 TG 含量与模型组比较均有明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且针刺 2 组大鼠较针刺 1 组下降更为明显($P < 0.05$)。两个针刺组 LDL-C、HDL-C 的含量与模型组比较均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但针刺 1 组与针刺 2 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。 **结论** 针刺能降低肥胖大鼠脂肪组织 CRP、IL-6 基因表达, 改善肥胖大鼠机体的炎症反应状态, 且 2V 电针刺激比 1V 电针刺激效果更好。

[关键词] 电针; 肥胖症; C-反应蛋白; 白细胞介素 6; 刺激强度

Effect of Different Intensities of Electroacupuncture on the Expression of C-reactive Protein and Interleukin-6 in Adipose Tissues of Simple Obesity Rats

LIU Zuli¹, TANG Chenglin², YU Min¹, HOU Yixuan¹, Gao Jie¹, LIU Renjian¹

(1. College of Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; 2. Scientific Research Department, Chongqing Medical University)

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect of electroacupuncture on the expression of C-reactive protein (CRP) and interleukin-6 (IL-6) in adipose tissues of rats with simple obesity and compare the difference of different intensities of electroacupuncture for weight loss. **Methods** Ten male SD rats on normal diet were taken as the control group in the experiment. The obesity rat models were made by high fat diet and the 30 successful models were randomized into model group, acupuncture group I, and acupuncture group II, with 10 in each. The acupuncture group I and II were treated with electroacupuncture at unilateral Zusanli (ST 36) and Sanyinjiao (SP 6), and stimulated by 1V and 2V respectively, 10min each time, once a day, 14 days in succession. Lee's indices of all groups before and after treatment were calculated respectively, total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were determined, and the expression of CRP and IL-6 mRNA in adipose tissues were detected by RT-PCR technique. **Results** After electroacupuncture, Lee's indices, expression of CRP and IL-6 mRNA in adipose tissues, the content of TC and TG of acupuncture groups were significantly decreased in comparing with the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the decrease in the acupuncture group II was more significant than in the acupuncture group I ($P < 0.05$). The content of LDL-C and HDL-C of acupuncture groups was statistically different from that of the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but there was no statistical difference between acupuncture group I and II ($P > 0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture decreases the expression of CRP and IL-6 mRNA in adipose tissues and improves the inflammatory state of obese rats, in addition, 2V stimulation produces better effect than 1V stimulation.

Key Words electroacupuncture; obesity; C-reactive protein (CRP); interleukin-6 (IL-6); intensity of stimulation

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

肥胖症是指身体内所含的脂肪组织超出了维持单纯性肥胖是指以肥胖为主要临床症状, 可伴有代正常生理功能的比例, 是一种常见的代谢症候群^[1]。代谢方面的障碍, 但无明显神经、内分泌系统方面的疾

病。近年研究发现,脂肪组织可产生多种炎性反应因子,这些炎性反应因子可导致机体发生慢性低度炎症反应,并能促进代谢综合征、胰岛素抵抗及心血管疾病的发生和进展^[2]。目前有关针刺减肥的效应机理尚在深化研究之中,除了针刺直接影响脂代谢过程外,是否对其相关因素有影响,值得研究探讨。本实验旨在通过针刺肥胖大鼠足三里、三阴交穴后,观察大鼠脂质代谢指标及脂肪组织C-反应蛋白(CRP)、白细胞介素6(IL-6)基因mRNA表达的变化,从基因水平上探讨针刺减肥与机体炎症反应之间的联系及不同强度针刺的效应差异。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用刚断乳的健康SD雄性大鼠70只,清洁级,体重60~100g,由重庆医科大学实验动物中心提供(实验动物许可证号:SCXK渝20050002)。

1.2 主要试剂与仪器

RNA抽提试剂、随机引物与RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司;CRP、IL-6引物由南京金瑞生物科技有限公司合成;AU2700全自动生化分析仪购自日本Olympus公司;S1000扩增仪、GelDocXR凝胶成像仪购自美国Bio-Rad公司;SDZ-II型电针仪购自苏州医疗用品厂有限公司。

1.3 造模及分组方法

将70只大鼠采用随机数字表法分为两组,正常对照组(对照组)10只,用普通饲料喂养;其他60只用自制高脂致肥饲料喂养,共喂养30d。凡经高脂饲料喂养30d后大鼠的体重超过普通饲料喂养大鼠体重的20%作为实验性肥胖大鼠,依此鉴别造模是否成功。本实验最终得到所需肥胖大鼠30只。将造模成功的实验性肥胖大鼠根据随机数字表法分为模型组、针刺1组、针刺2组,每组10只。实验期间,对照组给予普通饲料喂养,其余3组均饲以高脂饲料。

1.4 实验方法

针刺取穴方法均参照《实验针灸学》^[3]。①针刺1组:将大鼠捆绑于自制的固定器中,取一侧足三里和三阴交穴,用0.25mm×15mm毫针分别刺入约7mm和4mm,平补平泻后,两穴均接通SDZ-II型全能脉冲电疗仪,采用频率10Hz、强度1V连续波,每次治疗10min,每日1次,连续治疗14d,左右侧轮换取穴。②针刺2组:电针刺激强度为2V,其余方法、取穴、治疗时间等均同针刺1组。③对照组、模型组:用同样方式每日将大鼠捆绑于自制的固定器中,捆绑时间

同针刺组,余不作处理。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 大鼠体重、体长和Lee's指数的测定 测量大鼠治疗前后的体重、体长,并据此计算其Lee's指数[$\text{Lee's 指数} = \text{体重}(\text{g})^{1/3} \times 10^3 / \text{体长}(\text{cm})$],其数值大小反映大鼠体脂含量]。

1.5.2 生化指标的检测 实验结束后,各组大鼠禁食过夜,次日各组大鼠经麻醉后心脏取血,收集血液样本,分离血清,采用全自动生化分析仪检测血胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。

1.5.3 RT-PCR检测脂肪组织CRP、IL-6基因mRNA表达 大鼠附睾部位脂肪组织在液氮下研磨,按TakaRa试剂说明书提取脂肪组织的总RNA,紫外分光光度计测定总RNA的浓度和纯度,OD260/OD280比值在1.8~2.0之间。逆转录反应体系总体积为10μl:5×Buffer 2μl,逆转录酶0.5μl,Oligo dt Primer 0.5μl(50μM),随机引物0.5μl(100μM),总RNA 2μl,无菌水4.5μl。步骤:37℃ 15min,85℃ 5s终止反应,逆转录产物-20℃保存备用。引物设计:CRP上游引物:5'-TCAAAGAAGC-CACTGGAAGCC-3',下游引物:5'-CAGGCCCTACTGCAATAC-3',PCR产物为160bp;IL-6上游引物:5'-CAGACCAGTATATACCACTTC-3',下游引物:5'-ATATCCAGTTTGGAAGCATCC-3',PCR产物为187bp;内参GAPDH上游引物:5'-TGTTTCGTCATGGGTGTGAACC-3',下游引物:5'-AAGGCCATGCCACTGAGCTTC-3',产物为310bp。PCR反应体系(50μl)为:Taq酶0.25μl,10×PCR Buffer 5μl,MgCl₂ 3μl(25mM),dNTP 4μl,cDNA 1μl,上下游引物各1μl,蒸馏水34.75μl。PCR扩增条件:94℃预变性3min,94℃ 30s,58℃ 30s,72℃ 1min,30个循环,72℃延伸5min。取等体积PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳,结束后用凝胶成像系统分析仪扫描,Quantity One软件对条带进行灰度分析,以目的条带与内参条带的灰度比值代表目的基因mRNA的表达水平。

1.6 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析进行多组间的比较,两组数据之间的比较采用LSD-t检验;方差非齐性时采用秩和检验。

2 结果

2.1 针刺对肥胖大鼠Lee's 指数的影响

表1 示,治疗前各组大鼠Lee's 指数均明显高于对照组($P<0.01$),表明造模成功。治疗后针刺组大鼠 Lee's 指数与模型组比较有统计学意义($P<0.01$),针刺2组大鼠Lee's 指数较针刺1组亦明显下降($P<0.05$)。

表1 各组大鼠Lee's 指数比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	鼠数	治疗前	治疗后
对照组	10	268.66 $\pm$ 9.35	284.24 $\pm$ 11.13
模型组	10	333.88 $\pm$ 13.42▲	348.30 $\pm$ 9.75▲
针刺1组	10	329.96 $\pm$ 9.81▲	323.42 $\pm$ 6.80★
针刺2组	10	328.08 $\pm$ 7.47▲	315.68 $\pm$ 5.98★△

注:与同时时间点对照组比较,▲ $P<0.01$;与同时时间点模型组比较,★ $P<0.01$;与同时时间点针刺1组比较,△ $P<0.05$

2.2 针刺对肥胖大鼠脂肪组织CRP、IL-6 基因mRNA 表达的影响

表2 示,与对照组相比,模型组脂肪组织CRP、IL-6 基因mRNA 表达水平显著增高($P<0.01$);与模型组相比,针刺组脂肪组织CRP、IL-6 基因 mRNA 表达则降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且针刺2组较针刺1组降低更多($P<0.05$)。

表2 各组大鼠脂肪组织CRP、IL-6 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	鼠数	CRP	IL-6
对照组	10	0.45 $\pm$ 0.18	0.56 $\pm$ 0.17
模型组	10	0.87 $\pm$ 0.23▲	0.89 $\pm$ 0.13▲
针刺1组	10	0.68 $\pm$ 0.14★	0.73 $\pm$ 0.15★
针刺2组	10	0.53 $\pm$ 0.16★★△	0.60 $\pm$ 0.11★★△

注:与对照组比较,▲ $P<0.01$;与模型组比较,★ $P<0.05$,★★ $P<0.01$;与针刺1组比较,△ $P<0.05$

2.3 针刺对肥胖大鼠血清脂质含量的影响

表3 示,针刺组大鼠TC 和TG 含量较模型组明显降低($P<0.01$),且针刺2组低于针刺1组($P<0.05$);针刺组LDL-C 含量比模型组明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),HDL-C 的含量均较模型组升高($P<0.01$),但针刺1组与针刺2组间LDL-C、HDL-

C 含量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

现代医学认为,肥胖是由于能量代谢平衡失调,热量摄入多于消耗,致使脂肪合成增加。中医理论认为,肥胖是机体脏腑气血阴阳功能失调,导致水湿、痰浊、膏脂等盛于体内所致,其发生主要与脾胃的功能失调相关。李东垣《脾胃论》说:“脾胃俱旺,则能食而肥;脾胃俱虚,则不能食而瘦或少食而肥,虽肥而四肢不举”,认为“脾胃旺”的人能食而肥;《丹溪心法》进一步指出“肥人多湿痰”。因此,治疗肥胖以调理脾胃、升清降浊为大法,故针刺减肥多以脾胃经腧穴为主。本研究选用足三里、三阴交穴,正是针对肥胖症脾虚胃盛、痰湿壅滞的病机而定。

IL-6 作为前炎性细胞因子,不仅由免疫系统的单核/巨噬细胞产生和分泌,而且也由脂肪细胞产生^[4]。CRP 作为一种非特异炎症标志物,是重要的机体防御分子,由肝脏产生并分泌。它的表达受其他炎症因子的调控,如IL-6、IL-1、IL-8 和肿瘤坏死因子- α TNF- α 等,其中与IL-6 关系最为密切^[5]。CRP 的生物学作用是通过激活补体导致细胞裂解,与淋巴细胞、单核细胞受体结合,使淋巴细胞活化,分泌淋巴因子,参与体内各种炎症反应^[6]。在最初的研究中,人们并没有从肥胖和糖尿病患者中发现细菌、衣原体和病毒感染的证据,却发现体脂含量与炎症反应因子的水平显著相关^[7]。本实验结果也显示,模型组大鼠血清中TC、TG 和LDL-C 的含量均异常升高,与模型组CRP、IL-6 基因表达水平均显著升高是一致的,说明肥胖大鼠的脂质含量与炎症反应密切相关;针刺组血清TC、TG 和LDL-C 含量均降低,脂肪组织IL-6、CRP 基因表达下降,说明针刺能有效降低肥胖大鼠炎症反应的水平,改善肥胖大鼠异常的脂肪代谢过程,脂质代谢的紊乱可能与机体的炎症反应有关。肥胖者脂肪细胞增生、肥大,过度分泌IL-6、IL-1、TNF- α 、Pal-1 等炎症因子,导致CRP 水平升高^[8]。有研究表明,17 岁~36 岁超重肥胖者机体可能存在炎症指标IL-6、CRP 的异常,且

表 ³ 各组大鼠血清脂质含量比较(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)					
组别	鼠数	TC	TG	HDL-C	LDL-C
对照组	10	1.48 $\pm$ 0.25	0.84 $\pm$ 0.14	2.08 $\pm$ 0.19	0.65 $\pm$ 0.15
模型组	10	3.02 $\pm$ 0.16 $\blacktriangle\blacktriangle$	1.92 $\pm$ 0.38 $\blacktriangle\blacktriangle$	1.66 $\pm$ 0.09 $\blacktriangle\blacktriangle$	0.87 $\pm$ 0.21 $\blacktriangle$
针刺1组	10	2.34 $\pm$ 0.13 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\star$	1.47 $\pm$ 0.12 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\star$	1.83 $\pm$ 0.15 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\star$	0.63 $\pm$ 0.18 $\star$
针刺2组	10	2.08 $\pm$ 0.27 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\star$	1.23 $\pm$ 0.24 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\star$	1.79 $\pm$ 0.11 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\star$	0.52 $\pm$ 0.13 $\star\star$

注:与对照组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,★ $P<0.05$,★★ $P<0.01$;与针刺1组比较,△ $P<0.05$

与肥胖关系密切^[9]。与其他疾病引起的CRP升高所不同的是,肥胖患者CRP水平仍<10mg/L,属于低度炎症的水平。机体往往存在低度的炎症反应,而脂肪细胞为炎症的产生基地,脂肪细胞分泌的IL-6和TNF- α 是刺激肝脏合成CRP的主要细胞因子,肥胖患者产生这些调节因子增多,如此形成恶性循环,导致肥胖患处于持续的炎症状态。其机制有可能是脂肪因子和急性期反应蛋白产生增多,打破了正常的下丘脑-垂体-肾上腺轴、垂体-性腺轴、交感神经系统及细胞因子间级联反应调节的平衡,导致机体发生慢性炎症反应^[10]。本实验中,模型组的CRP、IL-6基因表达水平均异常升高,说明肥胖大鼠处于明显的炎症反应状态中。针刺治疗后,与模型组相比,针刺组大鼠脂肪组织CRP、IL-6基因mRNA表达水平明显降低,表明针刺能有效降低肥胖大鼠脂肪组织CRP、IL-6基因mRNA表达水平。而肥胖大鼠最终体重减少、脂代谢改变,可能与降低大鼠CRP、IL-6基因表达的水平,改善了肥胖大鼠机体的炎症反应有关。

有研究表明,刺激强度的不同会引起针刺效应的改变,如陈楚洵等^[11]发现重手法针刺心肌缺血再灌注损伤大鼠的疗效要优于轻手法针刺。本实验结果也表明,2V电针刺激对肥胖大鼠体重、脂质代谢及炎症反应的改善效果更好,这可能与此刺激强度在机体内产生的生物效应有关。由此认为,在治疗肥胖症的过程中还要考虑选择适宜的刺激参数,以提高治疗效率和效果。

综上所述,针刺能有效降低肥胖大鼠的体重,改善肥胖大鼠的脂代谢功能,且不同强度电针刺激对肥胖大鼠的相关指标有不同的影响,2V电针刺激治疗肥胖较1V电针刺激效果更明显。

参考文献

- [1]Poirier P, Giles TD, Bray GA, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism[J]. *Circulation*, 2006, 113(6): 898-918.
- [2]张奕, 刘戈力. 慢性炎症反应与儿童肥胖及代谢综合征[J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2009, 29(Suppl): 63-65.
- [3]余曙光, 郭义. 实验针灸学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009: 150-151.
- [4]Pedersen BK, Bruunsgaard H. Possible beneficial role of exercise in modulating low-grade inflammation in the elderly[J]. *Scand J Med Sci Sports*, 2003, 13(1): 56-62.
- [5]杨照勇, 荣海钦. C-反应蛋白与代谢综合征[J]. *国外医学内分泌学分册*, 2004, 24(3): 173-175.
- [6]Wang HW, Wu Y, Chen Y, et al. Polymorphism of structural forms of C-reactive protein[J]. *In J Mol Med*, 2002, 9(6): 665-671.
- [7]苏磊, 修玲玲, 肖海鹏. 炎症反应——肥胖和胰岛素抵抗的重要特征[J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2008, 28(6): 410-412.
- [8]王一丹, 杨万松. CRP与代谢综合征[J]. *实用心肺脑血管病杂志*, 2007, 15(6): 482-485.
- [9]王朝讯, 裴海成, 金红梅, 等. 超重和肥胖者血清TNF- α 、IL-6及CRP与肥胖的关系[J]. *天津医学杂志*, 2007, 35(5): 332-334.
- [10]Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease[J]. *Circ Res*, 2005, 96(9): 939-949.
- [11]陈楚洵, 林亚平, 周国祥, 等. 不同强度针刺“内关”对心肌缺血再灌注损伤大鼠血清IMA及下丘脑、脊髓5-HT表达的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2009, 29(6): 56-59.

(收稿日期: 2010-10-25; 修回日期: 2011-01-12)

[编辑: 崔京艳]

(上接第669页)

参考文献

- [1]陈灏珠. 实用内科学[M]. 12版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1472-1473.
- [2]中国中西医结合学会心血管专业委员会. 冠心病中医辨证标准[J]. *中国中西医结合杂志*, 1991, 11(5): 257.
- [3]中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则(第1辑)[M]. 1993: 41.
- [4]国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[S]. 南京: 南京大学出版社. 1994: 18-19.

- [5]张晓星, 龚恬, 张立平. 冠心病从肾论治[J]. *新中医*, 2008, 40(5): 3-4.
- [6]朱晋鸣, 戴小华. 冠心病从脾论治浅析[J]. *安徽中医学院学报*, 2008, 27(2): 1-3.
- [7]周杰, 周健民, 蔡鸿彦. 冠心病从肝论治研究[J]. *长春中医药大学学报*, 2008, 24(5): 507-508.
- [8]陈锋, 王文文. 再探冠心病从肺论治[J]. *现代中西医结合杂志*, 2002, 11(6): 547-547.

(收稿日期: 2010-07-28; 修回日期: 2010-11-29)

[编辑: 崔京艳]