

脾阳虚证大鼠棕色脂肪组织和解偶联蛋白 1 关联性的研究

吴云起¹, 唐汉庆^{2*}, 吴翠松¹, 劳传君², 庞广福²

(1. 北海市第二人民医院, 广西 北海 536000; 2. 右江民族医学院, 广西 百色 533000)

[摘要] **目的:**探讨棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)、解偶联蛋白 1(uncoupling protein 1, UCP₁)、高脂饮食和中药干预在实验动物能量代谢中的关联性和机制。**方法:**动物随机分为 4 组。每组 16 只。①对照组:普通饲料喂养, d₇₀ ~ d₉₈ 每天按 10 g·kg⁻¹体重生理盐水 ig。d₉₈ 检测刺激性产热, 观察 2 h 肛温变化曲线和温度峰值, 计算温度曲线下面积; ②阳虚组: d₄₂ 手术切除肩胛间 BAT, 余同①组; ③脾阳虚组: d₄₉ ~ d₉₈ 高脂饲料(83% 普通饲料, 15% 甘油三酯, 2% 胆固醇)喂养; 隔日 19 ℃ 环境喂养, 余同②组; ④中药组: d₇₀ ~ d₉₈ 每天按 4 g·kg⁻¹体重附子理中汤 ig。余同③组。每周测体重 1 次。以效能体重增长率、效能产热温度峰值、产热温度曲线下面积为参考指标。取 BAT 测 UCP₁ 表达量。**结果:**①效能体重增长率, 脾阳虚组与阳虚组相比体重增长减慢($P < 0.01$); 中药组与脾阳虚组相比, 体重增长加快($P < 0.01$)。②效能产热温度峰值, 脾阳虚组与阳虚组相比效能产热温度峰值升高($P < 0.01$); 中药组与脾阳虚组相比, 效能产热温度峰值升高($P < 0.01$); 中药组与脾阳虚组相比, 效能体重增长率与效能产热温度峰值变化程度呈正相关。③产热温度曲线下面积, 脾阳虚组与阳虚组相比产热曲线下面积增加($P < 0.05$); 中药组与脾阳虚组相比, 产热温度曲线下面积增加($P < 0.01$)。效能体重增长率与产热温度曲线下面积变化程度呈正相关。中药组上调 UCP₁ 表达量, 和阳虚组以及脾阳虚组相比, 差异均具有高度显著性($P < 0.01$)。**结论:**温阳健脾中药促使高脂饮食转化为 BAT 并提高其产热活性。温阳健脾中药上调 UCP₁ 在 BAT 中的表达, 通过 UCP₁ 的解偶联作用, 使 BAT 分解产热而改善阳虚畏寒的症状。

[关键词] 脾阳虚证; 棕色脂肪组织; 解偶联蛋白 1; 关联性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0206-05

Experimental Research on Relationship between Brown Adipose Tissue and Uncoupling Protein 1 in Rats with Spleen Yang Deficiency Syndrome

WU Yun-qi¹, TANG Han-qing^{2*}, WU Cui-song¹, LAO Chuan-jun², PANG Guang-fu²

(1. The Second People's Hospital of Beihai, Beihai 536000, China;

2. Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the relationship and mechanism about brown adipose tissue, uncoupling protein 1 (UCP₁), high fatty diet and Chinese herbal decoction during the process of energy metabolism. **Method:** Rats were divided into four groups ($n = 16$ each). ①Control group was fed with ordinary food, also ig given 0.9% NaCl 10 g·kg⁻¹ during d₇₀-d₉₈ daily. The ability of ISO deducing heat generating was tested on d₉₈, and the curve of the rectal temperature was monitored, and the peak within two hours and the area under the curve were determined. ②Yang deficiency syndrome group: the same procedure was carried out as the control group except removing brown adipose tissue on d₄₂. ③Spleen yang deficiency syndrome group: the same procedure was carried out as the yang deficiency syndrome group except of being fed with high fatty diet (including 83% ordinary diet, 15% triglycerides,

[收稿日期] 20100920(004)

[第一作者] 吴云起, 本科, 主治医师, 从事中西医结合骨科学的研究, Tel: 0779-2038081

[通讯作者] * 唐汉庆, 博士, 讲师, 从事中西医结合基础研究, Tel: 0776-2420488

2% cholesterol) from d₄₉ to d₉₈ and placed in 19 °C environment every other day. ④Chinese herbal decoction group: the same procedure was carried out as the spleen yang deficiency syndrome group except giving 4 g·kg⁻¹ ig daily with Aconitum Lizhong decoction and the body weight was measured every week. The index of the weight growth rate, the peak of temperature and the area under the temperature curve were all investigated. The content of UCP₁ was determined by using brown adipose tissue. **Result:** ①Weight growth rate: compared with yang deficiency syndrome group, weight growth rate in spleen yang deficiency syndrome group was lower ($P < 0.01$); compared with spleen yang deficiency syndrome group, weight growth rate was higher in the Chinese herbal decoction group ($P < 0.01$). ②Temperature: compared with yang deficiency syndrome group, the temperature peak of heat generating in spleen yang deficiency syndrome group was higher ($P < 0.01$); compared with spleen yang deficiency syndrome group, temperature peak of heat generating was higher in Chinese herbal decoction group ($P < 0.01$). There was a positive correlation between weight growth rate and temperature peak of heat generating. ③Area under the temperature curve: Compared with yang deficiency syndrome group, the area in spleen yang deficiency syndrome group was increased ($P < 0.01$); compared with spleen yang deficiency syndrome group, the area was increased in Chinese herbal decoction group ($P < 0.01$). There appeared a positive correlation between weight growth rate and area under the temperature curve. Compared with yang deficiency syndrome group and spleen yang deficiency syndrome group, Chinese herbal decoction group up-regulated content of UCP₁, and the difference was highly significant ($P < 0.01$). **Conclusion:** Chinese herbal decoction with function of heat generating and tonifying spleen is inclined to make high fatty diet turn into brown adipose tissue and advance its activity. Chinese herbal decoction with function of warming middle energizer and tonifying spleen can upgrade level and expression of UCP₁ in brown adipose tissue, and then make brown adipose tissue decomposed by the mechanism of uncoupling with UCP₁, finally dispelling coldness from the bodies in the rats with yang deficiency syndrome.

[**Key words**] spleen yang deficiency syndrome; brown adipose tissue; uncoupling protein 1; correlation

棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)是哺乳动物体内代谢性产热(非寒战产热, non-shivering thermogenesis, NST)的主要物质来源,解偶联蛋白1(uncoupling protein 1, UCP₁)能调控食物诱发的脂肪组织和肌肉的产热作用,从而影响能量代谢^[1-2]。UCP₁主要存在于BAT中。本实验在制备的脾阳虚大鼠模型基础上,以效能单位体重增长率、效能单位产热温度峰值、产热体温曲线下面积为指标,探索BAT、UCP₁、高脂饮食和中药干预在脾阳虚大鼠能量代谢中的关联性和机制。

1 材料

1.1 动物 新出生24 h内清洁级Wistar大鼠9窝,每窝8~12只,体重(5.7±0.7)g[中国医学科学院实验动物研究所,许可证编号SCXK(京)2007-0013],雌雄兼用。每天光照12 h,通风良好,环境温度28 °C,湿度45%。饲料来源中国医学科学院实验动物研究所。自由饮用自来水。

1.2 药物制备 附子理中汤由炮附子、党参、白术、干姜、炙甘草组成,实验所用单味药均购于北京中医

药大学国医堂。经北京中医药大学中药教研室鉴定:附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根;党参为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (franch.) Nannf. 干燥的根;白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根;干姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎;甘草为乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的根。

炮附子、党参、白术、干姜、炙甘草按照3:5:4:3:2的比例,诸药分开均先经蒸馏水浸泡30 min,炮附子先煎1 h,后纳入其余诸药,煎煮2次(40 min/次),期间将两次药液纱布过滤,合并,水浴加热浓缩至含生药量为2 g·mL⁻¹的药液,贮存于4 °C冰箱内备用。

1.3 试剂 异丙肾上腺素注射液:上海天丰药厂,批号20080511;肝素钠注射液:天津生物化学制药有限公司,批号20060406;丙三醇:分析纯,北京化工厂,批号20060406;UCP₁抗体(兔抗大鼠UCP₁):Phoenix Biotech Corporation,美国凤凰公司,批号20090113;HRP标记兔抗山羊IGG: Santa Cruze公

司,美国,批号 090818;正常兔血清:北京中山生物技术有限公司,批号 20081013;浓缩型 SABC 试剂盒:武汉博士德生物工程有限公司,批号 81513;SDS-PAGE 凝胶试剂盒:北京博奥森生物技术公司,批号 081012。

1.4 仪器 电子分析天平(AE160 型,Mettler 公司,瑞士);生物机能实验系统及其温度传感器(BL-420E⁺,成都泰盟科技有限公司);标准温度计(上海医用仪表厂)。

2 方法

2.1 分组处理 按体重均衡原则,取中间体重分为 4 组。每组 16 只。①对照组:普通饲料喂养,d₇₀~d₁₀₅每天按 10 g·kg⁻¹体重 ig 生理盐水;d₉₈检测适应性产热,观察 2 h 肛温变化曲线和肛温峰值,计算肛温曲线下面积(以 0℃为基点,肛温高度值为纵坐标,时间为横坐标,肛温曲线与基线间的面积代表 2 h 产热和持续时间的累积效应,能客观地反映产热总效果)。d₁₀₅取肩胛间棕色脂肪组织检测 UCP₁的相对表达量。②阳虚组:d₄₂手术切除肩胛间棕色脂肪,余同①组。③脾阳虚组:d₄₉~d₁₀₅高脂饲料(83%普通饲料,15%甘油三酯,2%胆固醇)喂养;隔日 19℃环境喂养,余同②组。④中药组:d₇₀~d₁₀₅每天按 4 g·kg⁻¹体重 ig 附子理中汤,余同③组。

2.2 指标检测

2.2.1 体重增长率 d₄₂和 d₁₀₅禁食 12 h 称量体重,d₄₂的体重记为 W₄₂,d₁₀₅的体重记为 W₁₀₅,用下面公式计算:

体重增长率 = (W₁₀₅ - W₄₂)/W₄₂ × 100%

2.2.2 产热测定 参考 Maria CF 方法。大鼠适宜环境温度(28℃)下检测异丙肾上腺素刺激产热。实验前将大鼠置于实验环境中模拟实验操作以适应实验条件 2 d,每天 3~4 h,第 3 天正式实验。BL-420E⁺生物机能实验系统重新调零、定标。乙醚麻醉,仰卧固定,取少量甘油润滑温度传感器探头,肛门内(25 mm)连接 BL-420E⁺生物机能实验系统换能器,作尾静脉头皮针(针头肝素化)穿刺并固定。然后尾静脉注射异丙肾上腺素(106 μg·kg⁻¹,生理盐水稀释到 0.5 mL),观察并记录大鼠肛温变化,记录时间 2 h。

2.2.3 Western blot 法测定 UCP₁ 的表达量 将样品与缓冲液按 3:1 体积比混合,100℃水浴 5 min,立即插入冰浴中,待样品冷却后每孔加样 20 μL 进行

SDS-PAGE 电泳,转入硝酸纤维素膜,并封闭,加一抗(兔抗大鼠 UCP₁,封闭稀释,1:250),置小平皿中摇床摇 2 h 后 4℃过夜,再与 1:400 稀释的 HRP 标记兔抗山羊二抗室温孵育 1 h,采用底物化学发光法进行显色,用 GDS-8000 凝胶成像分析系统定量分析各条带平均吸光度(A),测定 UCP₁ 表达量。

2.3 统计学处理 温度峰值和温度曲线下面积为观察指标,Graph-Pad Prism version 4.0 统计软件计算曲线下面积。①基础分析:以 $\bar{x} \pm s$ 表示各组结果,SPSS 13.0 软件包进行统计学分析,组间差异的显著性用 *t* 检验判断。*P* < 0.05 有统计学意义。②效能单位分析:以各组均值中最小者(*M*_{min})为基准,最大者(*M*_{max})为上限,数据按 $[x_i = (X_i - M_{min}) / (M_{max} - M_{min})]$ 转换为效能单位(*x_i*),均数间差异的显著性用 *t* 检验判断。*P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 效能单位体重增长率及效能单位产热温度峰值 效能单位体重增长率:脾阳虚组与阳虚组相比体重增长减慢(*P* < 0.01);中药组与脾阳虚组相比,体重增长加快(*P* < 0.01)。效能单位产热温度峰值:脾阳虚组与阳虚组相比效能单位产热温度峰值有增高趋势;中药组与脾阳虚组相比效能单位产热温度峰值升高(*P* < 0.01)。见表 1。

3.2 产热体温曲线下面积及 UCP₁ 表达量 产热体温曲线下面积:脾阳虚组与阳虚组相比产热曲线下面积有增加趋势;中药组与脾阳虚组、阳虚组相比,产热曲线下面积增加(*P* < 0.01)。UCP₁ 表达量:脾阳虚组和阳虚组相比,UCP₁ 表达量有升高趋势。中药组与脾阳虚组、阳虚组相比,UCP₁ 表达量提高(*P* < 0.01)。见表 2。

表 1 效能单位体重增长率及效能单位产热温度峰值($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量	效能单位体重	效能单位产热
	/g·kg ⁻¹	增长率/%	温度峰值/℃
对照	-	1.672 ± 0.412	38.00 ± 0.232
阳虚	-	1.151 ± 0.408	36.58 ± 0.212
脾阳虚	-	0.961 ± 0.398 ²⁾	36.61 ± 0.213
附子理中汤	4	1.326 ± 0.411 ⁵⁾	37.89 ± 0.220 ⁵⁾

注:与阳虚组相比¹⁾*P* < 0.05,²⁾*P* < 0.01,³⁾*P* < 0.001;与脾阳虚组相比⁴⁾*P* < 0.05,⁵⁾*P* < 0.01,⁶⁾*P* < 0.001(表 2 同)。

4 讨论

ISO 是非特异性 β 受体激动剂,通过受体刺激脂肪组织产热,最主要的产热机制为 β₃ 受体激活线

表 2 产热体温曲线下面积及 UCP₁表达量(A) ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	产热体温曲线下面积	UCP ₁ 表达量
对照	-	1 014. 51 ± 95. 41	0. 682 ± 0. 264
阳虚	-	978. 11 ± 93. 59	0. 464 ± 0. 196
脾阳虚	-	980. 12 ± 93. 62	0. 535 ± 0. 214
附子理中汤	4	998. 02 ± 94. 45 ^{2, 5)}	0. 652 ± 0. 235 ^{2, 5)}

粒体解偶联蛋白产热,次要机制为β₁受体激活增强心脏收缩耗氧产热^[1],此外,ISO收缩皮肤血管减少散热。适应性产热低下是阳虚证共有的特征,以ISO刺激动物产热效能,以温度为客观量化指标,观察各组动物体温的变化,结合动物体重变化,探索产热-体重变化-中药干预之间的关联性,可以验证脾阳虚动物纳呆、消瘦乏力、形寒肢冷的外部表现^[2-5]。

4.1 采用附子理中汤作为干预的反证药物 近年来,国内许多单位都在脾阳虚证研究中采用附子理中汤作为治疗性反证药物,证明该方是比较好的治疗复方^[6-9]。从脾阳虚的发病因素来说,其中有一部分是由于肾阳先虚,命门火衰不能温煦脾土,使脾阳亦虚。虽然,脾阳虚衰用理中汤来温运脾阳,健脾益气,是治疗脾阳虚的传统方剂,但是附子作为温里扶阳药,现代药理研究已证明它对离体肠管运动起抑制作用并能提高能量代谢率,长期医疗实践也证明附子能温补脾肾之阳,本着先后天同补的原则,本实验采用理中汤加附子来温脾阳的同时稍顾及肾阳,以达未病先防的目的。

方剂药理学的研究表明,附子理中汤主要具有调节肠道运动,增强体力和耐寒能力、镇痛和提高免疫力的作用:①调节肠道运动。附子理中丸混悬液可抑制离体十二指肠的自发活动。明显拮抗肾上腺素引起的回肠运动抑制和ACh引起的回肠痉挛;②显著增强脾虚动物的体力和耐寒能力^[10],提高脾虚动物的免疫功能^[11]。因此,本课题实验研究选定附子理中汤作为脾阳虚证治疗性反证药物。

4.2 脾阳虚证效能产热温度峰值和产热体温曲线下面积的改变 从效能产热温度峰值和产热体温曲线下面积变化情况分析,效能产热温度峰值和产热体温曲线下面积的变化趋势是一致的,产热体温曲线下面积是以0℃为基点,体温值为纵坐标,时间为横坐标,是体温值曲线与横坐标间的面积,代表实验时间内产热总效应,客观反映了动物的产热能力^[12]。上述结果表明切除BAT后的阳虚大鼠产热

能力下降,对于脾阳虚大鼠,虽然高脂饮食使脂解加强,游离脂肪酸增多,产热物质增加,但是产热能力仍然低于正常对照组。附子理中汤增强了脾阳虚大鼠的产热能力,改善了脾阳虚里寒的状态。这是附子理中汤“温阳”作用的结果。

4.3 脾阳虚证体重改变的特征与意义 脾阳虚存在产热低下和消化吸收功能不良表现,由于后者的原因,使能量物质得不到补充,加剧了前者的严重程度,而产热低下又使阳虚症状更甚,在“产热低下”和“消化吸收功能障碍”之间形成了恶性循环,中药干预阻断了这一恶性循环。从本实验的体重增长率指标检测结果看,阳虚组、脾阳虚组体重增长率均较对照组低($P < 0.01$),说明两组动物由于消化吸收功能不良,体重较正常动物减轻;脾阳虚组和阳虚组相比,体重增长率降低,但无明显统计学意义;中药干预后,中药组和脾阳虚组的体重增长率比较,中药组的体重比脾阳虚组的体重增加明显($P < 0.01$),说明中药增强了脾阳虚动物消化吸收功能,使动物能量储备大于能量消耗,能量代谢处于正平衡,表现为体重增加。这是附子理中汤恢复“脾主运化”功能的体现。

4.4 BAT,UCP₁与脾阳虚的关系 人和哺乳动物体中的脂肪组织分为棕色脂肪组织BAT和白色脂肪组织(white adipose tissue,WAT)。WAT主要是通过甘油三酯贮存能量,而BAT则通过产热来消耗能量,近来一些研究指出,成人脂肪组织中有大量的棕色脂肪细胞分布并表达UCP₁。1961-1964年,发现啮齿类动物能利用体内棕色脂肪组织,在寒冷刺激、休眠、摄食诱导、营养不足(低蛋白质)时,产生热量维持体温^[1]。BAT细胞表面密布交感神经纤维。几乎每个BAT细胞都直接与毛细血管接触,与其产热功能相匹配。BAT细胞内线粒体多而大,嵴狭窄而密集,线粒体内膜上有大量嘌呤核苷结合位点,这些特征是BAT产热的结构基础。BAT代谢产热作用很强,不仅具有御寒功能,而且还会燃烧多余脂肪和糖分,产生热量,防止体内储存过多的脂肪^[2]。因此,BAT对于维持动物的体温和能量平衡起重要作用,对幼龄哺乳动物尤为重要,动物切除肩胛间BAT后,产热减少,其部分机制在于能量物质脂肪储备减少,这和中医学脾失健运,气血生化匮乏导致机体失去濡养、脏腑功能减退的认识一致。

4.5 脾阳虚证BAT和UCP₁的改变 解偶联蛋白

家族 (UCPs) 有五大类, 存在于 BAT 的是 UCP_1 。BAT 线粒体内膜特异性表达的 UCP_1 是决定 BAT 功能的关键因素^[2]。 UCP_1 是一种线粒体的质子转运蛋白, 可调节 H^+ 的跨膜转运, 消除 H^+ 在线粒体内膜两侧的电化学梯度, 解除呼吸链氧化磷酸化和 ATP 合成的偶联, 即发生“质子漏”现象, 从而使氧化还原反应过程中释放的能量不能被用来合成 ATP, 而是转化为热量散发出来, 即产热而不产能, 此为 UCP_1 的解偶联作用机制。有报道通过基因敲除技术, 使小鼠 UCP_1 基因失活后, 其对寒冷不耐受^[13-14], 这至少说明先天禀赋不足是脾阳虚发生的原因之一。综上, 附子理中汤温阳健脾, 对模型动物有复健作用, 亦反证了该动物模型属脾阳虚证型。

4.6 小结 上述实验结果可概括如下: ①阳虚大鼠和脾阳虚大鼠均有能量代谢衰减的表现, 如效能产热温度峰值下降和产热体温曲线下面积减小, UCP_1 表达减少, 体重增长率降低。②温阳健脾中药 (附子理中汤) 促使高脂饮食转化为 BAT, 增加了能量储备, 提高 BAT 产热活性; 同时增加 UCP_1 在 BAT 中的表达量, 然后, 通过 UCP_1 的解偶联作用, 使 BAT 分解产热而改善脾阳虚畏寒的症状。③本实验主要从 BAT 和 UCP_1 改变来探讨脾阳虚, 仅是提供了某种视角, 脾阳虚证的本质研究是一个复杂的课题, 用局部组织或指标变化来解释产热仍显薄弱, 应从全方位综合考虑, 要考虑吸收能量、应用能量等方面的变化, 这也是今后研究的努力方向。

[参考文献]

[1] Smith G, Jack C, Henry C, et al. The fine structure of human atherosclerotic lesions [J]. Am J Pathol, 1961, 38 (3): 263.

[2] Heaton G M, Wagenvoord R J, Kemp A Jr, et al. Brown-adipose-tissue mitochondria: photo affinity labeling of the regulatory site of energy dissipation[J]. Eur J Biochem, 1978, 82 (2): 515.

[3] Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance [J]. Physiological Review, 2004, 84(1): 277.

[4] Kondratiev T V, Blyhre E S P, Simonsen Q, et al. Cardiovascular effects of epinephrine during rewarming from hypothermia in an intact animal model [J]. Journal of Applied Physiology, 2006, 100(2): 457.

[5] 王勇, 李文靖, 杨雪, 等. 低脂饮食对甲状腺机能低下大鼠适应性刺激产热的影响[J]. 航天医学与医学工程 (北京), 2008, 21(2): 108.

[6] 张颖, 姜首彦. 附子理中丸临床用药方案研究[J]. 首都医药, 2007, 14(11): 53.

[7] 黄鹤洁. 附子理中丸儿科应用 4 则[J]. 中国现代医药杂志, 2006, 8(12): 123.

[8] 全允梅, 赵时雨, 杨明, 等. 附子理中口服液治疗脾胃虚寒证 108 例[J]. 河南中医, 1993, 13(4): 177.

[9] 闫凤兰. 人参健脾丸和附子理中丸治疗慢性肠炎[J]. 石河子科技, 1999, (5): 51.

[10] 李东安, 王普民, 贾冬, 等. 附子理中丸的药理作用研究[J]. 中成药, 1990, 12(5): 25.

[11] 胡隐恒, 周京滋, 符胜光, 等. 脾虚泄泻动物模型的复制及附子理中丸的调整作用[J]. 上海中医药杂志, 1981, (8): 44.

[12] Madden C J, Morrison S F. Endogenous activation of spinal 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors contributes to the thermoregulatory activation of brown adipose tissue [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008, 298(3): R 776.

[13] Nisoli E. Protein 1 expression in rat brown fat during postnatal development [J]. Neurosci Lett, 1998, 246 (1): 5.

[14] Rippe C, Berger K, Böiers C, et al. Effect of high-fat diet, surrounding temperature, and enterostatin on uncoupling protein gene expression [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000, 279(2): E 293.

[责任编辑 聂淑琴]