

• 实验研究 •

左卡尼汀通过增加UCP1和p-AKT的表达活化高脂血症大鼠棕色脂肪细胞的研究

吕璇, 许静, 王 绚*

南京医科大学附属儿童医院 药学部, 江苏 南京 210008

摘要: **目的** 探讨左卡尼汀对高脂喂养大鼠棕色脂肪的影响及其相关机制。**方法** 将30只SD大鼠随机分为对照组、模型组和左卡尼汀低、中、高剂量(100、200、300 mg/kg)组, 每组各6只。每日ig给药, 治疗12周后称重、处死大鼠, 收集血清和棕色脂肪组织, 检测血清相关生化指标, 测定棕色脂肪组织中解偶联蛋白1(UCP1)和磷酸化AKT(p-AKT)的表达水平。**结果** 与模型组相比, 左卡尼汀100、200、300 mg/kg组的总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)明显降低, 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)明显升高($P < 0.05$); 左卡尼汀100、200 mg/kg组的体质量明显降低, 棕色脂肪组织(BAT)质量、BAT质量/体质量明显升高($P < 0.05$)。与模型组相比, 左卡尼汀100、200 mg/kg组BAT中UCP1 RNA明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组相比, 左卡尼汀组100、200、300 mg/kg组BAT中UCP1和p-AKT蛋白表达明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 、 0.01), 且呈剂量相关性。**结论** 左卡尼汀具有降脂和促进棕色脂肪活化的作用, 这可能与增加棕色脂肪组织中UCP1和p-AKT的表达有关。

关键词: 左卡尼汀; 棕色脂肪组织; 解偶联蛋白1; 磷酸化AKT**中图分类号:** R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2019)12-3501-05**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.12.001Activation of *L*-evocarnitine on brown adipocytes in hyperlipidemic rats by increasing the expression of UCP1 and p-AKT

LÜ Xuan, XU Jing, WANG Xuan

Department of Pharmacy, Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China

Abstract: Objective To investigate the effects of *L*-evocarnitine on brown adipose tissue in obese rats and its related mechanism. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into control group, model group, and *L*-evocarnitine (100, 200, and 300 mg/kg) groups. Each group had 6 cases, and ig administration with drugs per day. After 12 weeks of treatment, rats were sacrificed for collection of serum and brown adipose tissue. The expression levels of uncoupling protein 1 (UCP1) and phosphorylated AKT (p-AKT) in brown adipose tissue were determined. **Results** Compared with the model group, TC and TG in *L*-evocarnitine 100, 200, and 300 mg/kg groups were significantly decreased ($P < 0.05$), but HDL-C in *L*-evocarnitine 100 and 200, 300 mg/kg groups was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the body weight in *L*-evocarnitine 100, 200 mg/kg groups were significantly decreased ($P < 0.05$), but BAT weight and BAT weight/body weight were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, UCP1 RNA in *L*-evocarnitine 100 and 200 mg/kg groups was increased, with significant difference ($P < 0.05$). Compared with the model group, UCP1 and p-AKT protein in *L*-evocarnitine 100, 200, and 300 mg/kg groups were significantly increased ($P < 0.05$ and 0.01), with dose-dependent. **Conclusion** *L*-evocarnitine can reduce lipid and promote activation of brown adipose tissue, which may be related to its increasing expression of UCP1 and p-AKT in brown adipose tissue.

Key words: *L*-evocarnitine; brown adipose tissue; uncoupling protein 1; p-AKT

收稿日期: 2019-08-23

基金项目: 南京市卫生青年人才培养工程第三层次资助项目(QRX17173); 南京药学会常州四药医院药学科研基金资助项目(2019YX026)**作者简介:** 吕璇, 主管药师, 硕士, 主要从事医院药学研究。E-mail: lx_seu@163.com***通信作者** 王 绚, 主管药师, 硕士, 主要从事医院药学研究。E-mail: xuan_jeanne@163.com

肥胖是全球性的公共卫生问题之一,糖尿病、脂肪肝、心血管疾病如高脂血症、高血压等代谢性疾病^[1],甚至癌症都与之相关^[2],是重要的致病因素,给社会造成了巨大的负担。在哺乳动物体内,脂肪组织根据形态、功能不同分为白色脂肪组织(WAT)和棕色脂肪组织(BAT)。WAT即通常所说的脂肪组织,由白色脂肪细胞组成,主要功能是储存脂肪;BAT是一种产热器官,富含线粒体和毛细血管而呈棕色,能帮助机体消耗能量,维持代谢平衡。在人体内BAT含量远远少于WAT,并且随着年龄增长BAT逐渐减少^[3]。解偶联蛋白1(UCP1)是棕色脂肪组织活化的标志分子^[4],基于棕色脂肪组织治疗肥胖已成为研究热点。左卡尼汀又被称为左旋肉碱,是人体正常生理活动中所必需的营养成分,能改善心肌细胞代谢,广泛应用于心血管病的治疗。同时,左卡尼汀还可用于治疗脂肪性肝病,降低肝内脂肪蓄积,充分发挥保肝及调脂作用^[5]。因此本研究采用左卡尼汀干预高脂大鼠,考察其降脂作用以及探讨其对棕色脂肪的作用机制,为肥胖相关代谢性疾病的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康成年SD大鼠30只,体质量220~250 g,由南京医科大学实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(苏)2018-0005。提供充足的水和饲料,适应性饲养1周后实验。

1.1.2 药物与试剂 左卡尼汀口服液(东北制药集团沈阳第一制药有限公司,产品批号180544,规格1 g/支);高脂饲料(胆固醇0.5%、猪油5%、蛋黄粉15%、基础饲料79.5%);总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒(货号F002-1、F001-1、F003-1)购于南京建成生物工程研究所;Trizol试剂购于南京化学试剂有限公司;逆转录试剂盒(1708890)、real time-PCR试剂购于Bio-Rad公司(美国);UCP1(sc-293418)、p-AKT(sc-135650)、AKT(sc-5298)单克隆抗体都购于Santa Cruz公司(美国); β -actin(A5441)一抗购于Sigma公司(美国);辣根过氧化物酶标记的二抗(01334)购于CST公司(美国)。

1.2 方法

1.2.1 剂量设置 左卡尼汀人体推荐剂量为50 mg/kg,根据《保健食品安全性实验方法实用操作手册》^[6]关于受试物剂量的设定,以人体推荐量的5倍为其

中的1个剂量组,按等差或等比另设两个剂量组,所以左卡尼汀高剂量设置为300 mg/kg,依次中低剂量为200、100 mg/kg。设置对照组、模型组和左卡尼汀低、中、高剂量(100、200、300 mg/kg)组,共5个组,每组6只。

1.2.2 模型建立 在实验环境下大鼠喂饲基础饲料7 d,然后尾尖取血,测定血清TC、TG、HDL-C水平。根据血清TC水平,进行随机分组。实验组在给予高脂饲料的同时口服ig不同剂量的左卡尼汀,模型组给予等体积生理盐水,对照组正常喂食普通饲料,给予等体积生理盐水。连续给药12周。定期对各组大鼠进行称定质量(2次/周),模型组和对照组比较,TC、TG升高及(或)HDL-C降低,差异有显著性则造模成功。

1.2.3 提取棕色脂肪组织 于干预12周后将大鼠禁食12 h,称定质量后ip 3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉大鼠,腹主动脉取血,收集血清,取血结束后,分离肩胛部棕色脂肪组织,称量肩胛部棕色脂肪组织的质量,放入冻存管置于-80℃低温冰箱中冻存备用。

1.2.4 Real time-PCR分析 棕色脂肪组织中UCP1的RNA测定采用Real time-PCR法,具体为:精密称取30 mg棕色脂肪组织,采用Trizol法提取总RNA并纯化,跑电泳。电泳确定条带后定量调平,每组各取2 μ g进行逆转录合成cDNA,之后进行Real time-PCR,全程以 β -actin为内参。DNA扩增条件为:95℃预变性2 min,95℃变性10 s,60℃退火30 s,72℃延伸35 s,循环次数34次,最后72℃条件下再延伸5 min,检测结果用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析。引物序列采用NCBI gene-bank上公布的基因序列,UCP1 mRNA引物:正向5'-GAAGGTCGGTGTGAACGGATT-3',反向5'-TTGGTGATACATGGACATCGCA-3'; β -actin mRNA引物:正向5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3',反向5'-TTTGATGTCACGCACGATTTC-3'。

1.2.5 Western blotting测定蛋白表达水平 棕色脂肪组织中UCP1、p-AKT的蛋白测定采用Western blotting法,具体为:准确称取1 g棕色脂肪组织,用组织裂解液充分碾磨后,离心收集上清蛋白提取液,收集后定量调平,每组各取50 μ g进行SDS-PAGE凝胶电泳,电泳完成后转膜,5%脱脂奶粉37℃封闭1 h,加相应一抗UCP1(1:500)、p-AKT(1:500)、AKT(1:500)、 β -actin(1:1 000)孵

育过夜, 洗涤后加入相应二抗 (1:2 000) 孵育 2 h, 洗涤 3 次后 ECL 发光, 曝光压片, 显影并定影, 扫描仪扫描图片后采用 Image J 计算每个条带的荧光强度值, 每组实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

本研究所有数据处理均采用 SPSS 18.0 统计学软件, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数比较采用单因素方

差分析, 行组间 t 检验。

2 结果

2.1 左卡尼汀对大鼠血清相关生化指标的影响

与对照组相比, 模型组 TC、TG 明显升高, HDL-C 明显降低 ($P < 0.05$), 表明建模成功。与模型组相比, 左卡尼汀 100、200、300 mg/kg 组的 TC、TG 明显降低, HDL-C 明显升高 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 左卡尼汀对大鼠血清相关生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of levocarnitine on serum biochemical parameters in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TC/(mmol L ⁻¹)	TG/(mmol L ⁻¹)	HDL-C/(mmol L ⁻¹)
对照	—	1.36 ± 0.11	0.13 ± 0.03	0.78 ± 0.07
模型	—	1.62 ± 0.09 [#]	0.28 ± 0.02 [#]	0.54 ± 0.06 [#]
左卡尼汀	100	1.32 ± 0.08 [*]	0.15 ± 0.03 [*]	0.67 ± 0.05 [*]
	200	1.25 ± 0.09 [*]	0.14 ± 0.02 [*]	0.69 ± 0.06 [*]
	300	1.18 ± 0.08 [*]	0.13 ± 0.03 [*]	0.70 ± 0.04 [*]

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

2.2 左卡尼汀对大鼠体质量和 BAT 质量的影响

与对照组比较, 模型组体质量明显升高, BAT 质量、BAT 质量/体质量降低 ($P < 0.05$), 表明建模

成功。与模型组相比, 左卡尼汀 100、200 mg/kg 组的体质量明显降低, BAT 质量、BAT 质量/体质量明显升高 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 左卡尼汀对大鼠体质量和 BAT 质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of levocarnitine on body and brown adipose tissue weight in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g	BAT 质量/g	BAT 质量/体质量
对照	—	431.53 ± 17.42	0.64 ± 0.04	0.148 ± 0.008
模型	—	512.78 ± 13.54 [#]	0.56 ± 0.03 [#]	0.109 ± 0.009 [#]
左卡尼汀	100	397.25 ± 10.49 [*]	0.61 ± 0.05 [*]	0.153 ± 0.007 [*]
	200	384.89 ± 8.75 [*]	0.65 ± 0.02 [*]	0.176 ± 0.006 [*]

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

2.3 左卡尼汀对大鼠 BAT 中 UCP1 RNA 的影响

与对照组比较, 模型组 BAT 中 UCP1 RNA 明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 左卡尼汀 100、200 mg/kg 组 BAT 中 UCP1 RNA 明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1、表 3。

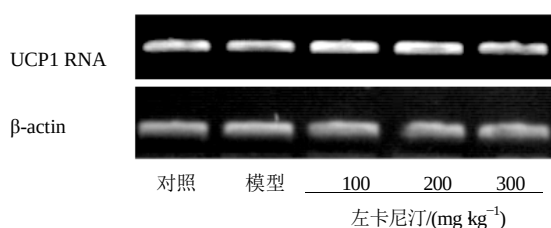


图 1 左卡尼汀对大鼠 BAT 中 UCP1 RNA 的影响

Fig. 1 Effects of levocarnitine on UCP1 RNA in RAT of rats

表 3 左卡尼汀对大鼠 BAT 中 UCP1 RNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of levocarnitine on UCP1 RNA in RAT of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	UCP1 RNA 表达水平
对照	—	0.76 ± 0.10
模型	—	0.57 ± 0.06 [#]
左卡尼汀	100	1.38 ± 0.09 [*]
	200	1.19 ± 0.05 [*]
	300	0.78 ± 0.16

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

2.4 左卡尼汀对大鼠 BAT 中 UCP1 蛋白的影响

与对照组比较,模型组 BAT 中 UCP1 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比,左卡尼汀 100、200、300 mg/kg 组 BAT 中 UCP1 蛋白表达明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01),且呈剂量相关性,见图 2、表 4。

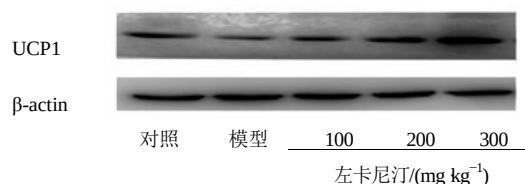


图 2 左卡尼汀对大鼠 BAT 中 UCP1 蛋白的影响

Fig. 2 Effects of levocarnitine on UCP1 protein in BAT of rats

表 4 左卡尼汀对大鼠 BAT 中 UCP1 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effects of levocarnitine on UCP1 protein in BAT of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	UCP1 蛋白表达水平
对照	—	1.32 ± 0.08
模型	—	0.56 ± 0.10 [#]
左卡尼汀	100	1.23 ± 0.04 [*]
	200	1.44 ± 0.05 [*]
	300	1.81 ± 0.03 ^{**}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

2.5 左卡尼汀对大鼠 BAT 中 p-AKT 蛋白的影响

与对照组比较,模型组 BAT 中 p-AKT 表达明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比,左卡尼汀 100、200、300 mg/kg 组 BAT 中 p-AKT 蛋白表达明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01),且呈剂量相关性,见图 3、表 5。

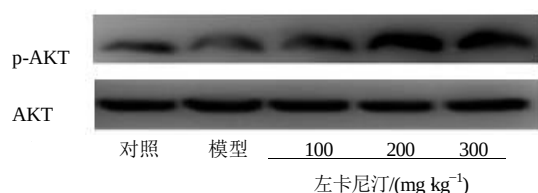


图 3 左卡尼汀对大鼠 BAT 中 p-AKT 蛋白的影响

Fig. 3 Effects of levocarnitine on p-AKT protein in BAT of rats

3 讨论

我国是全球肥胖人口“名列前茅”的国家,如何预防肥胖被称为 21 世纪全球面临的重大公共卫生挑战。肥胖不仅影响美观,更是高血压、糖尿病

表 5 左卡尼汀对大鼠 BAT 中 p-AKT 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effects of levocarnitine on p-AKT protein in BAT of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	p-AKT/AKT 蛋白表达水平
对照	—	1.06 ± 0.11
模型	—	0.68 ± 0.06 [#]
左卡尼汀	100	1.25 ± 0.12 [*]
	200	1.87 ± 0.05 ^{**}
	300	1.83 ± 0.04 ^{**}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

等慢性疾病的重要独立危险因素。目前对于肥胖的治疗主要有 4 种方式,分别为饮食方式重塑、增加体育锻炼、口服药物和外科手术治疗^[7]。其中改变饮食结构和锻炼对于患者来说较难坚持,而外科手术治疗并发症较高,因此仍然有必要开发新的药物治疗肥胖。目前市场上已经有治疗肥胖的相关药物,但副作用均较大,同时许多药物可以引起肝肾毒性,因此不被推广。

棕色脂肪组织作为肥胖治疗的新靶点受到越来越多的关注,而 UCP1 是棕色脂肪组织活化的标志性蛋白,通过介导解偶联作用,减少 ATP 产生,促进体内能量消耗,起降脂作用。研究表明特异性敲除棕色脂肪组织中 UCP1 基因可引起小鼠肥胖^[8-11],因此研究 UCP1 在肥胖中的作用具有积极的意义。

左卡尼汀是食物的组成成份,广泛存在于自然界中,被认为是类维生素的营养素,安全性高。动物实验及临床研究显示补充肉碱可抑制高脂血症血脂水平的升高^[12-13],还可改善血液透析及糖尿病患者的高脂血症^[14-15]。

AKT 在调控细胞生长方面起关键作用,近年来的研究表明,高脂饮食能够导致 AKT 通路表达的下调^[16-17],同时,AKT 磷酸化是胰岛素信号通路中的关键分子,而肥胖导致胰岛素抵抗已被证实^[18],所以本研究猜想 AKT 蛋白是否参与左卡尼汀引起棕色脂肪组织的活化。

本研究发现,高脂喂养大鼠经左卡尼汀干预后血清的 TC、TG 降低, HDL-C 升高,体质量降低,同时 BAT 质量/体质量升高,说明左卡尼汀能降低血脂水平,增加棕色脂肪组织相对含量。为进一步证实左卡尼汀促进棕色脂肪组织活化的作用,分别从核酸和蛋白水平检测 BAT 活化标志分子 UCP1 的表达,结果显示 UCP1 表达上调,同时 AKT 蛋白

磷酸化,提示左卡尼汀可能通过 p-AKT/UCP1 通路激活棕色脂肪组织。有趣的是,左卡尼汀对大鼠棕色脂肪组织 UCP1 RNA 的表达呈现反量效关系,可能与转录后调控或蛋白稳定性有关,当然具体的机制还需要进一步研究。

综上所述,左卡尼汀能够降脂减重,调节异常血脂状态,活化棕色脂肪组织,这可能是其通过升高 p-AKT 和 UCP1 表达实现的,为左卡尼汀在以棕色脂肪组织为靶点治疗肥胖等代谢性疾病的应用提供实验依据。

参考文献

- [1] 李路娇. 代谢正常型肥胖研究进展 [J]. 中国糖尿病杂志, 2016, 8(2): 68-71.
- [2] 戚光, 冯立勇, 梁洪. 肥胖和运动与肿瘤关联研究进展 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 25(22): 1611-1614.
- [3] Beranger G E, Karbiener M, Barquissau V. *In vitro* brown and "brite"/"beige" adipogenesis: human cellular models and molecular aspects [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(5): 905-914.
- [4] Soler-Vázquez M C, Mera P, Zagmutt S, *et al.* New approaches targeting brown adipose tissue transplantation as a therapy in obesity [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 155: 346-355.
- [5] 朱宏明, 刘青, 房志仲. 左卡尼汀的药理及临床应用研究进展 [J]. 天津药学, 2014, 26(4): 58-63.
- [6] 林飞主, 胡宇驰. 保健食品安全性实验方法实用操作手册 [M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 2015.
- [7] Chung A Y, Strassle P D, Schlottmann F, *et al.* Trends in utilization and relative complication rates of bariatric procedures [J]. *J Gastrointest Surg*, 2019, 23(7): 1362-1372.
- [8] Saito M. Human brown adipose tissue: regulation and anti-obesity potential [J]. *Endocr J*, 2014, 61(5): 409-416.
- [9] Sugimoto S, Nakajima H, Kodo K, *et al.* Miglitol increases energy expenditure by upregulating uncoupling protein 1 of brown adipose tissue and reduces obesity in dietary-induced obese mice [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2014, 11(1): 14.
- [10] Lee Y H, Jung Y S, Choi D. Recent advance in brown adipose physiology and its therapeutic potential [J]. *Exp Mol Med*, 2014, 46: e78.
- [11] Jia C, Kim K J, Koh E J, *et al.* Gelidium elegans regulates the AMPK-PRDM16-UCP-1 pathway and has a synergistic effect with orlistat on obesity-associated features in mice fed a high-fat diet [J]. *Nutrients*, 2017, 9(4): 342.
- [12] Janzen N, Hofmann A D, Schmidt G, *et al.* Non-invasive test using palmitate in patients with suspected fatty acid oxidation defects: disease-specific acylcarnitine patterns can help to establish the diagnosis [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2017, 12(1): 187.
- [13] 李文川, 高良奎, 李浩航, 等. 左卡尼汀通过激活 Nrf2/HO-1 途径减轻大鼠肝脏热缺血再灌注损伤 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2017, 23(2): 121-125.
- [14] Fukami K, Yamagishi S I, Sakai K, *et al.* Effects of switching from oral administration to intravenous injection of l-carnitine on lipid metabolism in hemodialysis patients [J]. *Clin kidney J*, 2014, 7(5): 470-474.
- [15] 赵韶静, 曾艳, 李正东, 等. 左卡尼汀对大鼠糖尿病肾病的保护作用分析 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2019, 24(3): 278-282.
- [16] Saben J L, Boudoures A L, Asghar Z, *et al.* Maternal metabolic syndrome programs mitochondrial dysfunction via germline changes across three generations [J]. *Cell Rep*, 2016, 16(1): 1-8.
- [17] 李斌, 范源, 李鑫. 基于 PI3K/Akt 信号通路的中药治疗 2 型糖尿病胰岛素抵抗研究进展 [J]. 中成药, 2017, 39(1): 151-154.
- [18] Albury-Warren T M, Pandey V, Spinel L P, *et al.* Prediabetes linked to excess glucagon in transgenic mice with pancreatic active AKT1 [J]. *J Endocrinol*, 2016, 228(1): 49-59.