

天山雪莲对老年脂质代谢异常（气虚血瘀型）小鼠的改善作用及机制研究

贺润铖, 黄芷棋, 冯倩倩, 宁一博, 孙建宁, 张硕峰, 董世芬*

北京中医药大学中药学院 中药药理系, 北京 102488

摘要:目的 结合体内外实验研究天山雪莲 *Saussureae Involucratae Herba* 对老年脂质代谢异常（气虚血瘀型）小鼠的影响与作用机制。方法 采用高脂喂食配合力竭游泳建立拟临床老年脂质代谢异常（气虚血瘀型）小鼠模型, 设置对照组、模型组、罗格列酮组及天山雪莲低、中、高剂量（0.3、0.9、1.8 g/kg）组, 各给药组连续给药5周。检测各组小鼠葡萄糖耐量、血脂等指标; HE染色检测脂肪组织形态; 定量反转录聚合酶链式反应（quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction, qRT-PCR）法检测脂肪组织解偶联蛋白-1（uncoupling protein 1, *Ucp1*）、DNA聚合酶 γ 1（DNA polymerase γ 1, *Polg1*）基因表达; 免疫组化法检测脂肪组织UCP1的蛋白表达。体外实验进一步研究作用机制, 将棕色脂肪细胞分为对照组、罗格列酮组及天山雪莲低、中、高剂量（0.025、0.05、0.1 mg/mL）组。qRT-PCR法检测棕色脂肪细胞中 *Ucp1*、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助激活因子-1 α （peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α , *Pgc-1 α* ）、核呼吸因子1（nuclear respiratory factor 1, *Nrf1*）、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ （peroxisome proliferator-activated receptor γ , *Ppar γ* ）、PR结构域蛋白16（positive regulatory domain-containing 16, *Prdm16*）、线粒体转录因子A（mitochondrial transcription factor A, *Tfam*）、葡萄糖转运蛋白4（glucose transporter 4, *Glut 4*）的基因表达; 免疫荧光法和Mito Tracker染色检测棕色脂肪细胞 *Ucp1* 蛋白表达水平及线粒体数量。结果 与对照组比较, 模型小鼠表现对抗性减弱、舌质出现紫瘀等气虚血瘀的表征, 空腹血糖、曲线下面积（area under curve, AUC）、腹股沟白色脂肪组织（inguinal white adipose tissue, iWAT）指数及总胆固醇（total cholesterol, TC）、三酰甘油（triglyceride, TG）、低密度脂蛋白胆固醇（low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C）含量显著升高（ $P < 0.01$ ），棕色脂肪组织（brown adipose tissue, BAT）指数显著降低（ $P < 0.01$ ），BAT和iWAT白色化特征明显且 *Ucp1* 阳性细胞表达显著减少（ $P < 0.01$ ）。与模型组对比, 天山雪莲给药组小鼠血脂指标、糖代谢指标、iWAT指数显著改善（ $P < 0.01$ ），BAT指数显著升高（ $P < 0.05$ ），iWAT和BAT形态棕色化特征明显，BAT中 *Polg1*、*Ucp1* 等基因表达水平显著升高（ $P < 0.05$ 、0.01），脂肪组织中 *Ucp1* 蛋白表达水平显著升高（ $P < 0.05$ 、0.01）。体外实验中, 与对照组相比, 天山雪莲干预后棕色脂肪细胞 *Prdm16*、*Ppar γ* 、*Glut 4*、*Tfam* 基因表达水平及线粒体数量和 *Ucp1* 蛋白表达显著升高（ $P < 0.05$ 、0.01）。结论 天山雪莲通过调控脂肪可塑性, 促进白色脂肪棕色化以及棕色脂肪活化, 进而提高线粒体功能改善老年小鼠气虚血瘀型脂质代谢异常。

关键词: 天山雪莲; 气虚血瘀证; 脂质代谢异常; 脂肪可塑性; 线粒体

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)17-5433-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.17.020

Study on improving effects and mechanism of *Saussureae Involucratae Herba* in aged mice with abnormal lipid metabolism (*qi* deficiency and blood stasis syndrome)

HE Run-cheng, HUANG Zhi-qi, FENG Qian-qian, NING Yi-bo, SUN Jian-ning, ZHANG Shuo-feng, DONG Shi-fen

Department of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To study the effects and mechanisms of Tianshan Xuelian (*Saussureae Involucratae Herba*, SI) on aged mice with abnormal lipid metabolism (*qi* deficiency and blood stasis syndrome) combined *in vivo* and *in vitro* experiments. **Methods** The aged mice model of abnormal lipid metabolism (*qi* deficiency and blood stasis syndrome) were established by vigorous swimming and high-fat

收稿日期: 2022-03-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81503287)

作者简介: 贺润铖 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。Tel: 18846834623 E-mail: heruncheng0823@163.com

*通信作者: 董世芬, 女, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药防治心脑血管疾病研究。E-mail: dongshifen@bucm.edu.cn

diet. The mice were divided into control group, model group, rosiglitazone group and low, medium and high dose (0.3, 0.9, 1.8 g/kg) of SI groups, and each administrated group was orally given drugs or solvent respectively for consecutive 5 weeks. The parameters of glucose tolerance and blood lipids of the mice in each group were measured by biochemical method. And adipose tissues morphological changes were detected by HE staining. The genes expression of uncoupling protein 1 (*Ucp1*), DNA polymerase γ 1 (*Polg1*) in adipose tissue were detected using quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR). The protein expression of *Ucp1* in adipose tissue was detected by immunohistochemistry. *In vitro*, brown adipocytes were divided into five groups, including control group, low, medium and high dose (0.025, 0.05, 0.1 mg/mL) of SI groups, and rosiglitazone group, further mechanism of action. The genes expression of *Ucp1*, peroxisome proliferator-activated receptor γ (*Ppar γ*), positive regulatory domain-containing 16 (*Prdm16*), mitochondrial transcription factor A (*Tfam*), glucose transporter 4 (*Glut4*) were detected by qRT-PCR. The protein expression of *Ucp1* expression was detected by immunofluorescence. Mitochondrial Mito tracker staining was used to detect mitochondrial number changes in brown adipocytes. **Results** Compared with the control group, the model mice showed decreased resistance, purple blood stasis and other characteristics of *qi* deficiency and blood stasis in the tongue, fasting blood glucose, area under curve (AUC), inguinal white adipose tissue (iWAT) index, total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) content was significantly increased ($P < 0.01$), and the brown adipose tissue (BAT) index was significantly decreased ($P < 0.01$), the white characteristics of BAT and iWAT and the expression of *Ucp1* positive cells were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, the blood lipid index, glucose metabolism index and iWAT index were significantly improved ($P < 0.01$), BAT index was significantly increased ($P < 0.05$), iWAT and BAT morphologic browning characteristics were obvious, and the expression levels of *Polg1* and *Ucp1* genes in BAT were significantly increased ($P < 0.05$, 0.01), the expression of *Ucp1* protein in adipose tissue significantly increased ($P < 0.05$, 0.01) of mice in SI administration group. *In vitro* experiments, compared with the control group, the expression levels of *Prdm16*, *Ppar γ* , *Glut4*, *Tfam* genes, mitochondrial number and *Ucp1* protein expression in brown adipocytes after SI intervention were significantly increased ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** SI could improve abnormal lipid metabolism in aged mouse models with *qi* deficiency and blood stasis by regulating fat plasticity, and ameliorating mitochondrial dysfunction.

Key words: *Saussurea involucrate* (Kar. et Kir.) Sch. -Bip.; *qi* deficiency and blood stasis syndrome; abnormal lipid metabolism; adipose plasticity; mitochondria

随着中国老龄人口数量快速增加,老年病已经严重影响老年人的健康和生活质量^[1]。气虚血瘀是老年病常见的病因病机,是诱发血脂异常、破坏能量稳态的重要因素,临床表现为疲倦乏力、少气懒言、唇爪青紫、舌紫等证候特征^[2]。在临床上,通过对脂质代谢异常患者进行中医证型分析,表明气虚血瘀型是常见证型之一^[3-5]。脂肪组织是体内重要的内分泌和储能器官,深入参与机体能量代谢,具有可塑性,与机体维持能量稳态具有密切的关系^[6]。

天山雪莲是菊科植物天山雪莲 *Saussurea involucrate* (Kar. et Kir.) Sch. -Bip. 的干燥地上部分,生长在海拔 4000 m 左右的山区,主要分布在阿尔泰山脉、天山山脉附近^[7]。天山雪莲性温,味微苦,具有温肾助阳、通经活血等功效,现代研究表明其具有抗炎镇痛、调血脂、抗肥胖、抗氧化等作用。在临床上,以天山雪莲为主药的复方雪莲通脉丸对气虚血瘀证患者有着良好的疗效^[8-9],研究表明天山雪莲及其多种有效成分如金合欢素^[10]、高车前素^[11]等能够调控脂质代谢过程,但具体机制尚未阐明。因此,本研究通过体内高脂饮食配合力竭游泳建立

老年脂质代谢异常(气虚血瘀型)小鼠模型和体外棕色脂肪细胞实验相结合,研究天山雪莲对老年脂质代谢异常(气虚血瘀型)小鼠的血脂、脂肪可塑性、线粒体功能的影响及其作用机制。

1 材料

1.1 动物

60 只 6 月龄 SPF 级 C57BL/6J 小鼠,雌雄各半,体质量(28.6±2.2)g; 8 周龄 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 12 只,雌雄各半,体质量(19.2±1.4)g; 棕色脂肪间充质干细胞取自于 8 只 2 日龄雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠。所有小鼠由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,生产许可证号 SCXK(京)2019-0010,使用许可证号 SYXK(京)2016-0038。动物饲养于温度(25±2)℃、湿度(50±10)%的屏障环境内,自由进食饮水,每日光照 12 h,实验通过北京中医药大学医学与实验动物伦理委员会批准许可(BUCM-4-2020120103-4155)。

1.2 药品与试剂

1.2.1 药品 天山雪莲经北京中医药大学吴浩忠老师鉴定为菊科植物天山雪莲 *S. involucrate* (Kar. et

Kir.) Sch. -Bip.的干燥地上部分。称取天山雪莲 60.0 g, 剪碎, 加 800 mL 水, 浸泡 1 h, 煎煮 30 min, 滤过; 药渣同法再煎煮 2 次, 合并滤液, 浓缩至稠浸膏, 冷冻干燥, 即为天山雪莲提取物 (16.90 g), 得率为 28.16%。采用《中国药典》2020 年版一部中天山雪莲质量标准项下方法测定指标性成分含量, 天山雪莲提取物中芦丁质量分数为 4.59%, 绿原酸质量分数为 4.78%。罗格列酮 (批号 Y05F9C54480) 购于上海源叶生物科技有限公司。

1.2.2 动物实验试剂 总胆固醇 (total cholesterol, TC) 试剂盒 (批号 20210122)、三酰甘油 (triacylglycerol, TG) 试剂盒 (批号 20210122)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 试剂盒 (批号 20210122)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 试剂盒 (批号 20210103) 购于南京建成生物工程研究所产品; RNA 裂解液 (批号 G3013)、Servicebio® RT First Strand cDNA Synthesis Kit (批号 G3330)、2×SYBR Green qPCR Master Mix (none ROX) (批号 G3320)、柠檬酸 (pH 6.0) 抗原修复液 (批号 G1202)、DAB 显色剂 (批号 G0002)、苏木素 (HE) 染液 (批号 G0115)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA, 批号 G5001) 购于索莱宝生物科技有限公司; 山羊抗兔 HRP 标记 (批号 GB23303) 购于 Servicebio 公司; 抗解耦蛋白-1 (uncoupling protein 1, Ucp1) 抗体 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 批号 A2320)。

1.2.3 细胞实验试剂 PBS 缓冲液 (美国 CORNING 公司, 批号 14019011)、II 型胶原酶 (北京拜尔迪生物技术有限公司, 批号 2202404)、DMEM 高糖培养基 (美国 SIGMA 公司, 批号 RNB7483)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 浙江天杭生物科技股份有限公司, 批号 20010506)、胰岛素 (美国 SIGMA 公司, 批号 19D287)、3,3',5'-三碘甲腺原酸 (3,3',5'-triiodo-L-thyronine sodium salt, T3, 美国 SIGMA 公司, 批号 WXBC9483V)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX, 美国 SIGMA 公司, 批号 # STBF2497V)、吡啶美辛 [奥默生物技术 (上海) 有限公司, 批号 53-86-1]、青霉素-链霉素混合液 (P/S, 美国 Corning 公司, 批号 30002297)、山羊抗小鼠免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) - 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) (北京索莱宝科技

有限公司, 批号 20200822)、ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI (美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号 11)、山羊血清 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 20191113)、4%组织细胞固定液 (北京百瑞极生物科技有限公司, 批号 20210118); 10% FBS 培养基, 含 DMEM 高糖培养基、10% FBS、1% P/S; 诱导分化培养基, 含 DMEM 高糖培养基、10% FBS、1% P/S、20 nmol/L 胰岛素、1 nmol/L T3、0.125 mmol/L 吡啶美辛、5 mol/L 地塞米松、0.5 mmol/L IBMX; 生长分化培养基, 含 DMEM 高糖培养基、10% FBS、1% P/S、20 nmol/L 胰岛素, 1 nmol/L T3。

1.3 仪器

EPOCH 酶标仪 (美国 BioTek 公司)、血糖仪 (强生医疗器械有限公司, One Touch Ultra Easy)、实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司, StepOne Plus)、HERACELL 150i 二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司)、AE200 型倒置显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司)、ECLIPSE Ti 激光共聚焦显微镜 (日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 动物造模、分组及给药 60 只 6 月龄 SPF 级 C57BL/6J 小鼠适应性喂养 3 d 后, 通过喂食高脂饲料结合力竭游泳构建老年脂质代谢异常 (气虚血瘀型) 小鼠模型。造模小鼠给予高脂饲料喂养, 均喂养至实验周期结束。力竭游泳造模共持续 10 d, 每天 8:00 时进行 1 次力竭游泳。当小鼠出现体质量降低、对抗性减弱、精神倦怠、毛发干燥、大便增加并出现大便便溏、小鼠舌质紫瘀等表征时表明老年气虚血瘀模型造模成功^[12]。将造模成功的小鼠, 随机分为模型组, 天山雪莲低、中、高剂量 (0.3、0.9、1.8 g/kg) 组和罗格列酮 (10 mg/kg) 组, 每组 12 只, 雌雄各半。另设 12 只 8 周龄 SPF 级 C57BL/6J 小鼠为对照组, 雌雄各半, 给予普通饲料喂养。

天山雪莲给药剂量设置依据:《中国药典》2020 年版收录天山雪莲的成人用量为 3~6 g, 成人体质量按照 70 kg 计算得出小鼠的给药剂量分别为 0.3、0.9、1.8 g/kg, 其中 0.9 g/kg 相当于人的临床等效量。对照组和模型组小鼠每天 ig 给予饮用水。各给药组按照相应剂量 (用蒸馏水配制) 给药, 每天 ig 1 次, 连续 ig 给药 5 周。

2.1.2 葡萄糖耐受量的测定 药物连续干预 5 周

后,禁食 12 h,通过剪尾法取血,按照 2 g/kg 体重量 ip 葡萄糖,检测 0 min 及注射葡萄糖后的 30、60、90、120 min 小鼠血糖值,绘制葡萄糖耐量-时间曲线图,通过近似梯形法计算曲线下面积 (area under curve, AUC)。

2.1.3 取材 给药周期结束后,动物禁食 12 h,不禁水,麻醉后摘眼球取血,静置 2 h 后,3500 r/min 离心 10 min 分离血清,分离的血清-80 °C 保存。获取小鼠腹股沟白色脂肪组织 (inguinal white adipose tissue, iWAT) 和棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT),精确称质量后,部分固定于 4% 组织固定液中,部分存放于-80 °C 冰箱。

2.1.4 脂肪组织指数的测定 精确称取小鼠 iWAT、BAT 质量后,按公式分别计算 iWAT、BAT 指数。

iWAT 指数=iWAT 质量/体质量

BAT 指数=BAT/体质量

2.1.5 血脂相关指标检测 按照试剂盒说明书测定血清中 TC、TG、LDL-C、HDL-C 的含量。

2.1.6 HE 染色检测脂肪组织形态 用 4% 多聚甲醛固定 iWAT、BAT,取出依次梯度脱水,石蜡包埋,切片,HE 染色,中性树胶封片,显微镜镜检,通过 Image Pro Plus 6.0 软件进行平均光密度分析。

2.1.7 免疫组织化学染色检测脂肪组织 UCP1 的蛋白表达 石蜡切片进行常规脱蜡,将 iWAT、BAT 切片放在抗原修复缓冲液中进行修复,在 iWAT、BAT 切片上滴加 3% 双氧水溶液,避光室温孵育 25 min, PBS 洗 3 次,在切片上滴加山羊血清封闭 1 h。在切片上滴加稀释好的 UCP1 抗体溶液 (1:500),将切片放入湿盒内 4 °C 过夜。滴加稀释好的二抗,37 °C 孵育 20 min, DAB 显色,苏木素复染 3 min,常规脱水,中性树胶封片。通过 Image-ProPlus 6.0 软件处理数据。

2.2 体外实验

2.2.1 棕色脂肪细胞的培养及分组 通过胶原酶消化法获取棕色脂肪组织的血管基质部分 (stromal vascular fraction, SVF),进一步诱导分化获得棕色脂肪细胞。

(1) 细胞培养:取 8 只 2 日龄雄性 C57BL/6J 小鼠在 75% 乙醇中消毒;无菌手术器械从小鼠肩胛骨中间取出 SVF, PBS 缓冲液冲洗,剪碎,消化;消化后,加入与消化液等量的完全培养基,混悬,离心;离心后吸弃上清,加入含 10% FBS DMEM 完全培养基,通过 100 μm 细胞筛,滤液 1200 r/min

离心 5 min;离心后吸弃上清,加入含 10% FBS DMEM 完全培养基,重悬,接种在 60 mm² 培养皿中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养,8 h 后进行换液,洗去未贴壁细胞。之后每隔 1 d 更换培养基。待细胞生长至 90% 以上,进行诱导及分化。将含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基替换为棕色脂肪细胞诱导培养基,诱导 48 h 后,将棕色脂肪细胞诱导液替换为生长分化培养液,分化培养时每隔 1 d 换 1 次液,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 6 d 后取材。

(2) 分组:将棕色脂肪细胞分为对照组,天山雪莲低、中、高剂量 (0.025、0.050、0.100 mg/mL) 组和罗格列酮 (1 μmol/L) 组,给药组使用分化生长培养液配制为相应浓度含药培养液,现用现配。对照组给予等体积载体 (PBS 溶液)。

2.2.2 免疫荧光检测棕色脂肪细胞 Ucp1 的蛋白表达 将细胞按照 1×10⁵ 个/mL 接种在含有细胞爬片的 24 孔板中,诱导分化并按照各组剂量给药;给药处理后, PBS 缓冲液冲洗,4% 组织细胞固定液固定细胞;0.1% Triton X-100 透化,冲洗;10% 山羊血清封闭后,与 UCP1 (1:200) 抗体 4 °C 孵育过夜;使用含有 FITC 的山羊抗兔二抗标记细胞,孵育后用含 DAPI 的甘油封片;激光扫描共聚焦荧光显微镜检测,并通过 Image Pro Plus 6.0 软件计算平均光密度。

2.2.3 Mito Tracker 染色法检测棕色脂肪细胞线粒体数量 将细胞按照 1×10⁵ 个/mL 接种在含有细胞爬片的 24 孔板中,诱导分化并按照各组剂量给药,分化第 8 天收集细胞并进行线粒体 Mito Tracker 染色。用不含血清及酚红的生长培养基将其稀释至 100 nmol/L,用 PBS 缓冲液洗细胞,加入 Mito Tracker 染料,37 °C 孵育 15 min,4% 组织细胞固定液固定细胞,室温下用 0.1% Triton X-100 透化 10 min,含 DAPI 的甘油封片,通过激光扫描共聚焦荧光显微镜检测线粒体染色情况,并通过 Image Pro Plus 6.0 软件计算平均光密度。

2.3 qRT-PCR 法检测脂肪组织和棕色脂肪细胞相关基因表达

利用 TRIzol 试剂提取总 RNA,微核酸分析仪测定浓度和纯度。采用 Prime Script TMRT 试剂将 RNA 逆转录为 cDNA。加入 SYBR Green、引物及 cDNA 模板,进行 qRT-PCR 反应。引物序列见表 1。

表1 相关引物序列
Table 1 Primers sequence

目的基因	引物序列 (5'-3')	目的基因	引物序列 (5'-3')
<i>Ucp1</i>	正向 CTCTACGACTCAGTCCAAGAG	<i>Nrf1</i>	正向 TGTTTGGCGCAGCACCTTT
	反向 CATTAAAGCCGGCTGAGATCTTG		反向 CGCAGACTCCAGGTCTTCCA
<i>Prdm16</i>	正向 CAGCACGGTGAAGCCATTC	<i>Glut 4</i>	正向 ATAGGGAGCAGAAACCCAAGG
	反向 GCGTGCATCCGCTTGTG		反向 AGGGTGAGTGAGGCATTTTCT
<i>Pgc-1α</i>	正向 CCCTGCCATTGTTAAGACC	<i>Polg1</i>	正向 CGCTTCTGCATCAGCATCCA
	反向 TGCTGCTGTTCTGTTTTC		反向 ACTGCACTGAAAAAGGCGAC
<i>Pparγ</i>	正向 TTTCAAGGGTGCCAGTTT	<i>β-actin</i>	正向 ACTCCTATGTGGGTGACGAGG
	反向 GAGGCCAGCATCGTGTAG		反向 CACACGCAGCTCATTGTAGAAG
<i>Tfam</i>	正向 GAAGAACGCATGGAGGAGAG		
	反向 TTCTGGGGAGAGTTGCAGTT		

2.4 统计学处理

统计学处理采用 SAS 8.2 软件进行, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示实验数据, 对于正态分布数据, 多组间比较采用单因素方差分析法 (ANOVA), 两两比较采用 LSD 法, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

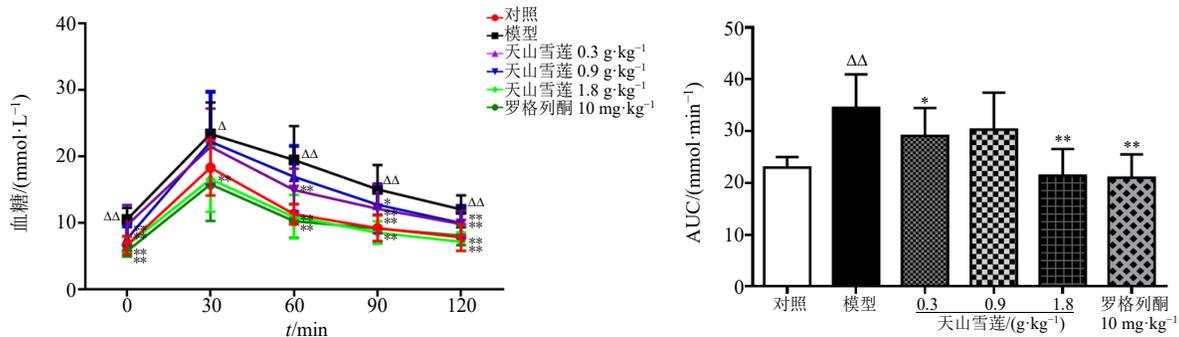
3.1 老年脂质代谢异常 (气虚血瘀型) 小鼠模型建立

与对照组比较, 喂食高脂饲料并进行力竭游泳的老年小鼠出现活动性差、对抗性减弱、精神萎靡、大便略增加、力竭游泳时间缩短等表征, 舌质较对

照组出现紫瘀。

3.2 天山雪莲对老年脂质代谢异常小鼠葡萄糖耐量的影响

葡萄糖耐量实验中, 与对照组相比, 模型组小鼠的空腹血糖及 AUC 显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 天山雪莲 0.3、0.9、1.8 g/kg 组小鼠的空腹血糖, 葡萄糖注射后 60、90、120 min 血糖值显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01); 天山雪莲 0.3、1.8 g/kg 组小鼠 AUC 显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 表明天山雪莲可改善老年脂质代谢异常小鼠的糖耐量, 见图 1。



与对照组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 图 2~5、7 同
 $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as fig. 2~5, 7

图 1 天山雪莲对老年脂质代谢异常小鼠葡萄糖耐量及 AUC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 1 Effects of *Saussureae Involucratae Herba* on glucose tolerance and AUC of aged mice with abnormal lipid metabolism ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

3.3 天山雪莲对老年脂质代谢异常小鼠血脂指标的影响

与对照组相比, 模型组小鼠血清 TC、TG、LDL-C 含量显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 天山雪莲 0.3、1.8 g/kg 组小鼠血清 TC 含量明显降低 ($P < 0.01$); 天山雪莲 0.9、1.8 g/kg 组小鼠血清 TG 含量明显降低 ($P < 0.01$), 见图 2。

3.4 天山雪莲对老年脂质代谢异常小鼠脂肪比重的影响

与对照组相比, 模型组小鼠 BAT 指数显著减少 ($P < 0.01$), iWAT 指数明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 天山雪莲 0.9 g/kg 组小鼠 BAT 指数明显升高 ($P < 0.05$), 天山雪莲 1.8 g/kg 组小鼠 iWAT 指数明显降低 ($P < 0.01$), 见图 3。

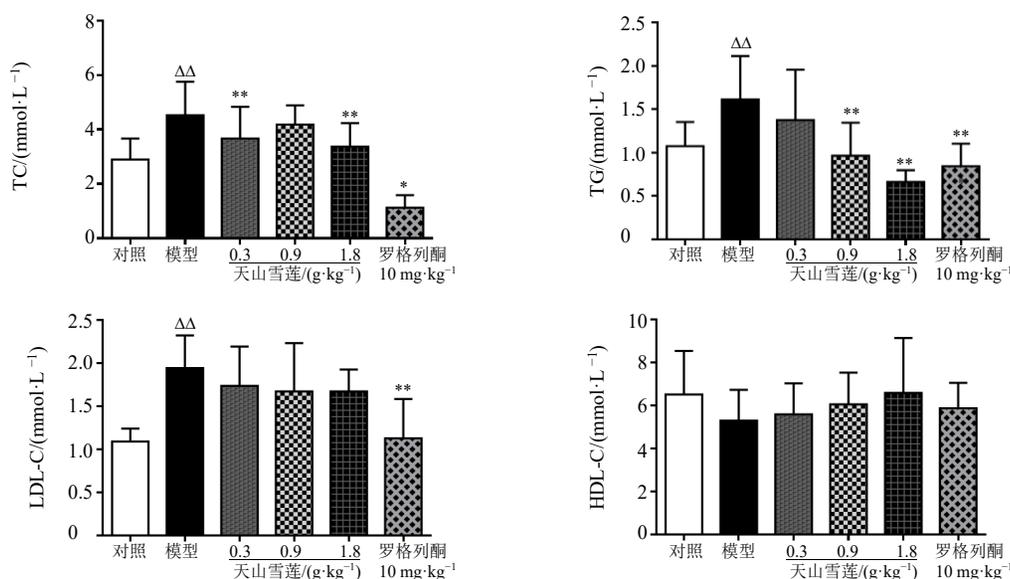


图 2 天山雪莲对老年脂质代谢异常小鼠血脂指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 2 Effect of *Saussureae Involucratae Herba* on blood lipid indexes of aged mice with abnormal lipid metabolism ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

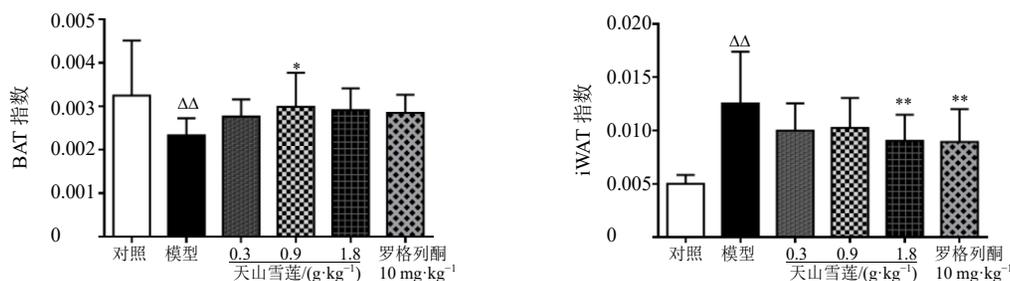


图 3 天山雪莲对老年脂质代谢异常小鼠 BAT 指数和 iWAT 指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 3 Effects of *Saussureae Involucratae Herba* on BAT index and iWAT index of aged mice with abnormal lipid metabolism ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

3.5 天山雪莲对老年脂质代谢异常小鼠脂肪组织棕色化基因表达的影响

qRT-PCR 检测结果表明,在 BAT 中,与模型组相比,天山雪莲 0.3、0.9、1.8 g/kg 组 *Ucp1* 基因表达明显增加 ($P < 0.05$ 、 0.01),过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助激活因子-1 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α , *Pgc-1 α*) 基因表达无显著性差异 ($P > 0.05$),见图 4。在 iWAT 中,与模型组相比,天山雪莲给药组 *UCP1*、*Pgc-1 α* 基因表达具有增加趋势但无显著性差异 ($P > 0.05$),见图 4。

3.6 天山雪莲对老年脂质代谢异常小鼠脂肪组织线粒体生物合成基因表达的影响

结果表明,在 BAT 中,与模型组相比,天山雪

莲 0.3、1.8 g/kg 组 DNA 聚合酶 $\gamma 1$ (DNA polymerase $\gamma 1$, *Polg1*) 基因表达明显增加 ($P < 0.05$),线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, *Tfam*) 基因表达无显著性差异 ($P > 0.05$),见图 5。在 iWAT 中,与模型组相比,天山雪莲给药组 *Polg1*、*Tfam* 基因表达无显著性差异 ($P > 0.05$),见图 5。

3.7 天山雪莲对老年脂质代谢异常小鼠脂肪形态的影响

HE 染色结果显示,与对照组比较,模型组小鼠皮下 iWAT 较为松散,脂肪细胞直径较大,细胞核被挤至细胞一侧呈薄环状,白色脂肪细胞特征明显。与模型组小鼠比较,天山雪莲 0.3、0.9、1.8 g/kg 组小鼠皮下白色脂肪组织细胞变小,并呈现多室,脂肪细胞具有棕色化趋势。

与对照组比较,模型组小鼠 BAT 细胞直径较

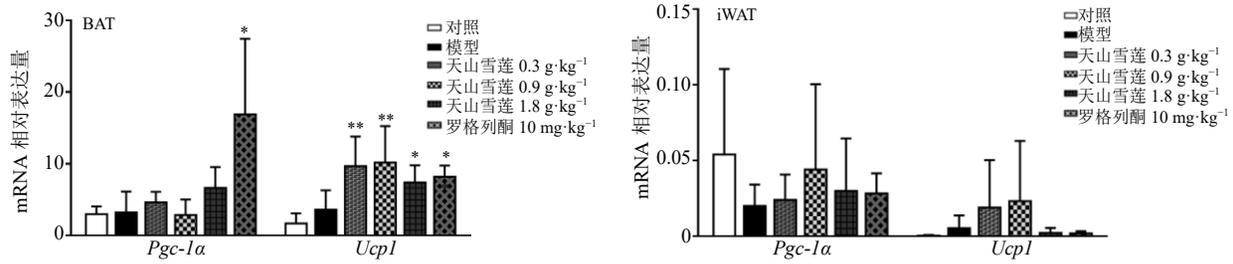


图4 天山雪莲对老年脂质代谢异常小鼠BAT和iWAT中Ucp1、Pgc-1α mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 4 Effects of *Saussureae Involucratae Herba* on mRNA expression of *Ucp1* and *Pgc-1α* in BAT and iWAT of aged mice with abnormal lipid metabolism ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

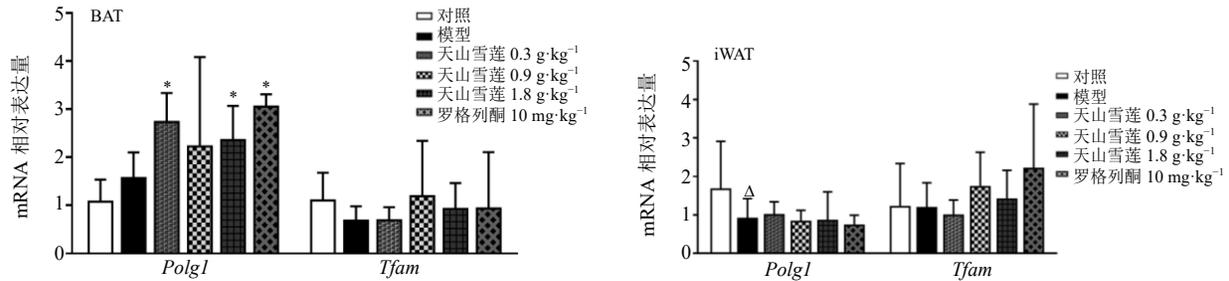


图5 天山雪莲对老年脂质代谢异常小鼠BAT和iWAT中线粒体相关基因Polg1、Tfam mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 5 Effect of *Saussureae Involucratae Herba* on mRNA expression of mitochondrial related genes *Polg1* and *Tfam* in BAT and iWAT of aged mice with abnormal lipid metabolism ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

大，组织中具有单一空泡状脂滴的细胞明显增多，细胞形态更加趋向于白色脂肪细胞。与模型组比较，天山雪莲 0.3、0.9、1.8 g/kg 组小鼠棕色脂肪组织较为紧密，细胞分布增多，细胞呈现多室，细胞之间可以看到丰富致密的毛细血管，具有较为明显的棕色脂肪细胞形态特征，见图 6。

3.8 天山雪莲对老年脂质代谢异常小鼠脂肪组织 Ucp1 蛋白表达的影响

脂肪组织免疫组化结果显示，在皮下 iWAT 中，与对照组比较，模型组小鼠 Ucp1 阳性细胞表达明

显减少 ($P < 0.01$)。与模型组比较，天山雪莲 0.3、0.9、1.8 g/kg 组小鼠 Ucp1 阳性细胞表达明显增多 ($P < 0.05, 0.01$)。

与对照组比较，模型组小鼠 BAT 中 Ucp1 阳性细胞表达明显减少 ($P < 0.01$)。与模型组比较，天山雪莲 0.3、0.9、1.8 g/kg 组小鼠中 Ucp1 阳性细胞表达明显增多 ($P < 0.05, 0.01$)，见图 7。

3.9 天山雪莲对棕色脂肪细胞标志物基因及 Ucp1 蛋白表达的影响

qRT-PCR 结果表明，与对照组相比，天山雪

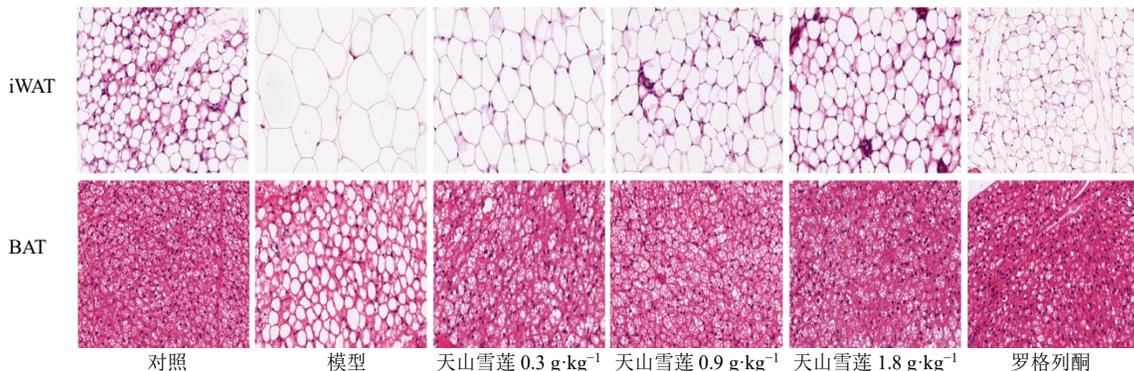


图6 天山雪对老年脂质代谢异常小鼠脂肪组织形态的影响 (HE 染色, $\times 400$)

Fig. 6 Effect of *Saussureae Involucratae Herba* on morphology of adipose tissue in aged mice with abnormal lipid metabolism (HE staining, $\times 400$)

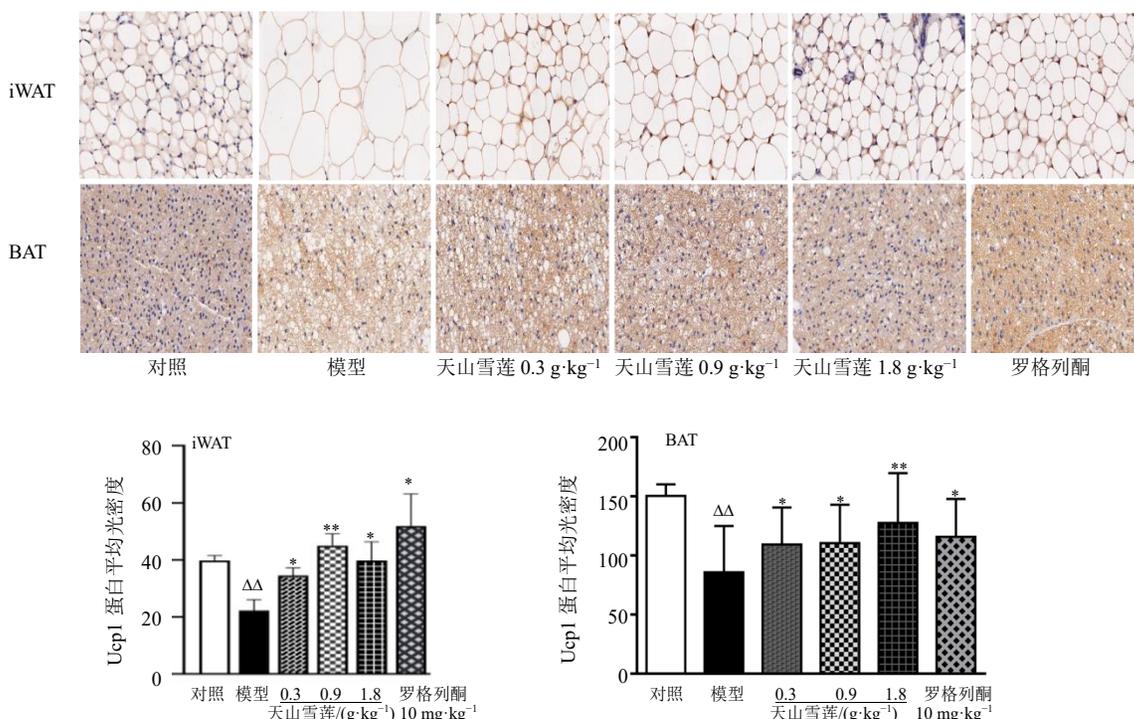
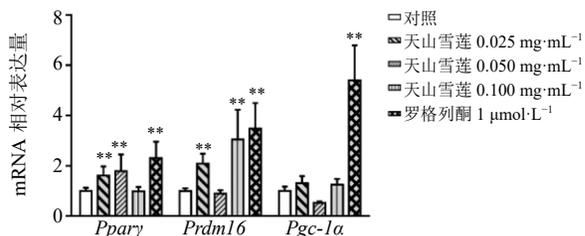


图7 天山雪莲对老年脂质代谢异常小鼠 Ucp1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$, 免疫组织化学染色, $\times 400$)

Fig. 7 Effect of *Saussureae Involucratae Herba* on expression of Ucp1 protein in aged mice with abnormal lipid metabolism ($\bar{x} \pm s, n = 12$, immunohistochemical staining, $\times 400$)

莲 0.025、0.050 mg/mL 组中棕色脂肪分化相关基因过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , *Ppar γ*) 的 mRNA 表达水平显著增加 ($P < 0.01$), 天山雪莲 0.025、0.100 mg/mL 组中 PR 结构域蛋白 16 (positive regulatory domain-containing 16, *Prdm16*) mRNA 表达显著增加 ($P < 0.01$), *Pgc-1 α* mRNA 表达无显著性差异 ($P > 0.05$), 见图 8。Ucp1 免疫荧光结果表明, 与对照组相比, 天山雪莲 0.025 mg/mL 组可显著增加棕色脂肪细胞特异性蛋白 Ucp1 表达 ($P < 0.05$),



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 图 9~11 同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as fig. 9-11

图8 天山雪莲对棕色脂肪细胞 *Ppar γ* 、*Prdm16*、*Pgc-1 α* 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effects of *Saussureae Involucratae Herba* on mRNA expression of brown adipocyte *Ppar γ* , *Prdm16* and *Pgc-1 α* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表明天山雪莲可能具有促进棕色脂肪细胞分化, 激活 BAT 的作用, 见图 9。

3.10 天山雪莲对棕色脂肪细胞线粒体生物发生相关基因及数量的影响

qRT-PCR 结果表明, 与对照组比较, 天山雪莲 0.025 mg/mL 组线粒体生物发生相关基因 *Tfam* mRNA 表达水平显著增加 ($P < 0.05$), 核呼吸因子 1 (nuclear respiratory factor 1, *Nrf1*) mRNA 表达无显著性差异 ($P > 0.05$); 葡萄糖代谢相关基因葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, *Glut 4*) mRNA 表达水平显著增加 ($P < 0.05$), 见图 10。

线粒体 Mito Tracker 染色结果表明, 与对照组相比, 天山雪莲 0.025、0.100 mg/mL 组均可显著增加棕色脂肪细胞线粒体数量 ($P < 0.05$), 表明天山雪莲具有一定增加棕色脂肪线粒体数量的作用, 见图 11。表明天山雪莲可能具有促进棕色脂肪细胞线粒体生物发生, 促进葡萄糖摄取的作用。

4 讨论

随着年龄的增长, 人体逐渐衰老, 各项生理机能随之下降, 尤其脾胃的运化功能下降明显使水谷精微不能被人体正常吸收利用而化为痰、浊、膏、脂, 在体内积累, 发展为脂质代谢异常、肥胖等^[13]。

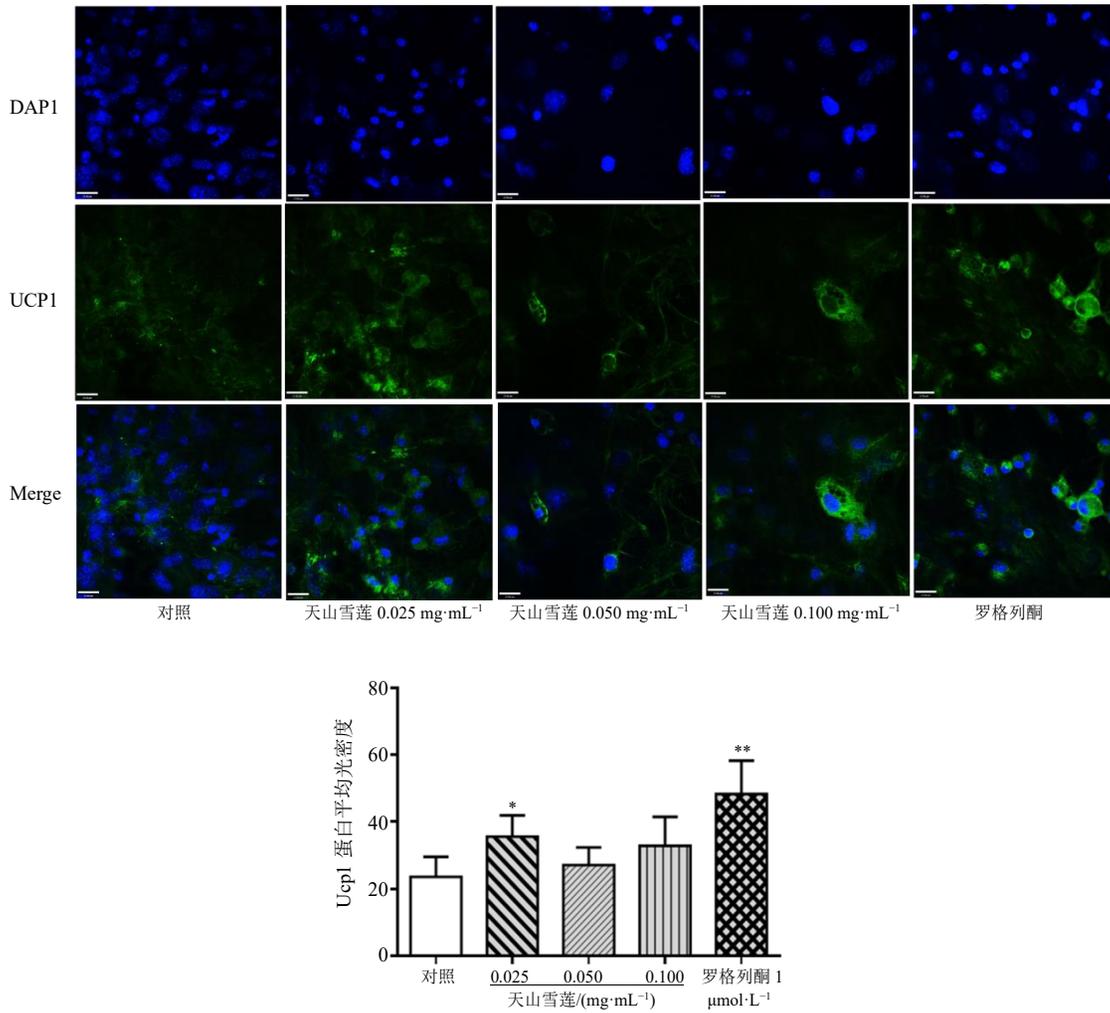


图9 棕色脂肪细胞 Ucp1 蛋白免疫荧光染色 (×400) 及平均光密度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Immunofluorescence staining (× 400) and mean optical density of Ucp1 protein in brown adipocytes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

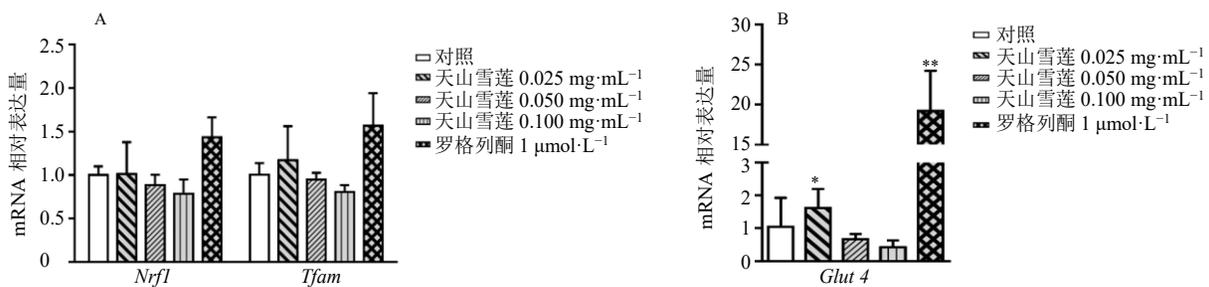


图10 天山雪莲对棕色脂肪细胞线粒体生物发生 (A) 及葡萄糖代谢 (B) 相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effects of *Saussureae Involucratae Herba* on expression of genes related to mitochondrial biogenesis and glucose metabolism in brown adipocytes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

机体的衰老导致血脂代谢异常的风险大幅度上升, 伴随着 TG、LDL 水平升高, HDL 水平下降, 脂质代谢异常会干扰脂肪细胞的正常生理功能, 影响脂肪因子的分泌^[14-15]。本研究中, 造模小鼠出现活动性差、精神萎靡、舌质紫瘀等表征, 血脂指标 TC、

TG、LDL-C 含量显著升高, iWAT 指数上升、状态松散且细胞直径较大, BAT 指数下降、形态“白色化”, 表明老年脂质代谢异常(气虚血瘀证型)小鼠造模成功。

心脑血管疾病是全球发病率和死亡率最高的疾

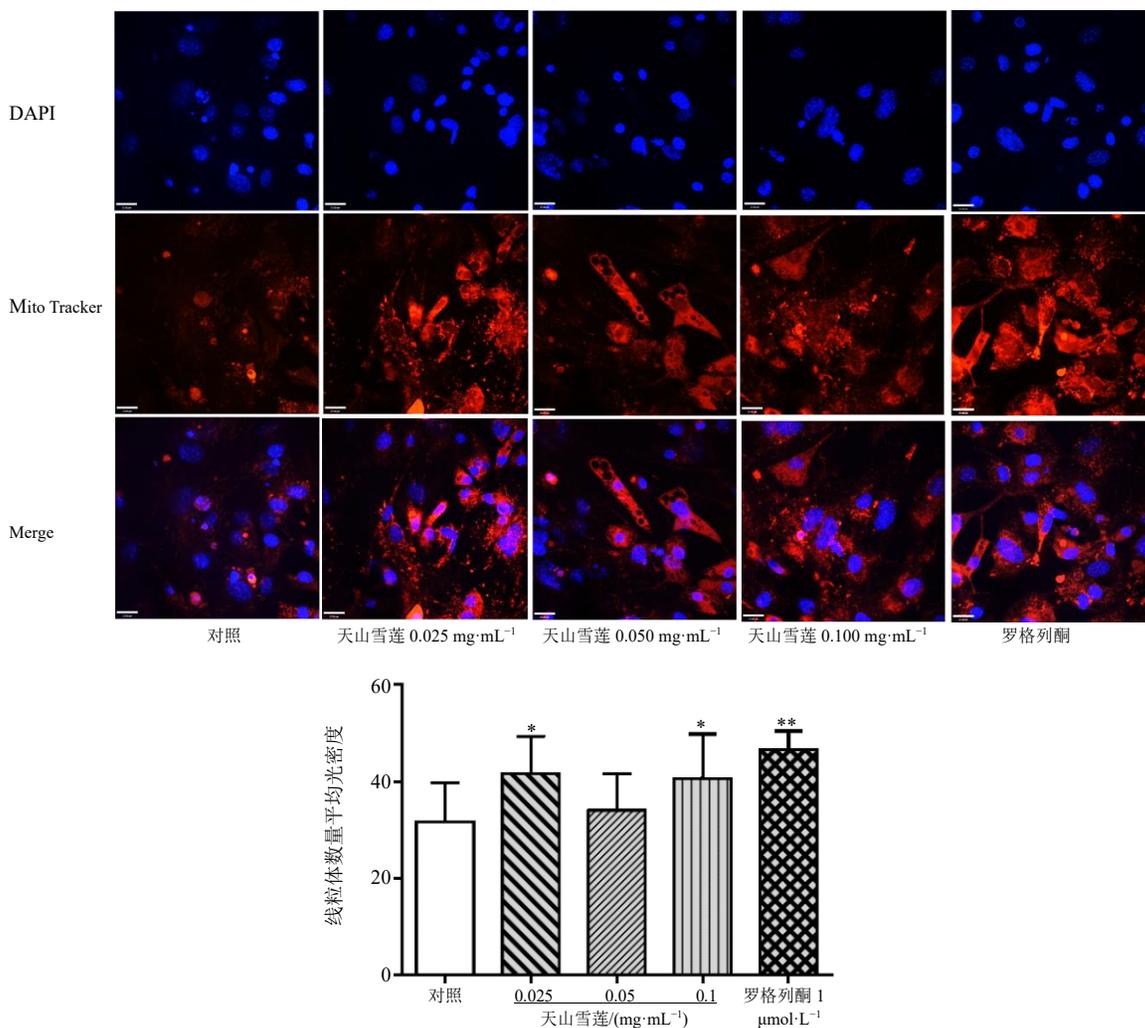


图 11 棕色脂肪细胞线粒体 Mito Tracker 染色 (×400) 及平均光密度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Mito Tracker staining (× 400) and average optical density of mitochondria in brown adipocytes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

病之一,且风险随着年龄的增长而增加,血脂异常是心脑血管疾病重要发生因素之一^[16]。本研究中,天山雪莲能显著降低老年脂质代谢异常小鼠血清中 TC、TG 含量;降低注射葡萄糖后不同时间段血糖值以及 AUC;上调脂肪细胞葡萄糖代谢基因 *Glut 4* 表达水平,表明天山雪莲对血脂异常具有改善作用,维持脂质稳态。天山雪莲改善脂质代谢异常的机制与调节脂肪可塑性和线粒体功能障碍具有密切的关系。

衰老会引起脂肪组织组成和分布发生变化,进而影响机体代谢,打破全身能量稳态,引起代谢并发症的逐渐发展。在哺乳动物中,脂肪在能量稳态方面发挥着核心作用。脂肪组织分为 WAT、BAT、米色脂肪组织,分别负责不同功能。白色脂肪细胞由单室脂滴占据大部分细胞体积,负责在营养过剩时以 TG 的形式储存多余的能量,WAT 过度累积是肥胖的标志^[17]。与 WAT 相比,棕色脂肪细胞由多

脂脂滴、中央细胞核和高密度线粒体构成,线粒体富含的铁元素使组织呈褐色。Ucp1 是棕色脂肪组织中高表达蛋白,存在于线粒体内膜,能够利用脂肪酸破坏质子梯度,使二磷酸腺苷不能磷酸化为三磷酸腺苷,能量以热能的形式释放^[18-21]。因此,BAT 不仅能调节体温功能,而且能够维持能量稳态和消耗过量营养物质,以防止肥胖和脂质代谢紊乱。脂肪具有可塑性,在寒冷、药物刺激下 WAT 会发生棕色化,上调 *Pgc-1α*、*Ucp1* 等产热基因的表达,增强产热作用;而当机体 β-肾上腺素能信号受损、衰老,BAT 会发生白化,产热功能降低,机体能量消耗减少。米色脂肪是一种特殊的脂肪细胞,干细胞与白色脂肪细胞相同,但具有棕色脂肪细胞特征,同样能够发挥产热的作用^[22]。在衰老的过程中,人体内的 BAT 质量和活性会随之下降,主要表现为 BAT 活性显著降低、标志性产热基因 *Ucp1* 表达丧失。

通过¹⁸F-FDG-PET/CT成像检测发现BAT活性在青春期和性成熟期间增加,而在60岁以上的个体活性很难检测到^[20]。而米色脂肪细胞形成能力也随之下降,导致产热功能受损,具体机制仍不清楚,有研究表明在衰老的过程中棕色化基因如*Ppar γ* 、*Prdm16*等表达水平会下降^[23]。因此通过激活BAT功能和诱导WAT褐化是一种抵抗衰老引起的肥胖和代谢疾病的潜在治疗方法。

BAT和米色脂肪细胞中丰富的线粒体是机体维持能量代谢的关键,在代谢超载情况下能够通过非耦合呼吸产热对抗脂质代谢失常,防止肥胖、高血糖和糖尿病等疾病的发生^[24]。线粒体功能障碍是衰老引起脂肪组织变化的主要原因之一。线粒体功能障碍引发的肥胖会进一步恶化线粒体功能,脂肪在体内调控失衡会引起炎症,导致活性氧的产生增加,引起氧化应激,最终进一步导致线粒体功能障碍,此外肥胖状态下过多的营养供应会打破正常的线粒体呼吸链和克氏循环,最终加剧肥胖的情况^[23,25]。线粒体功能障碍包括线粒体DNA突变增加、线粒体生物合成下降、葡萄糖转运抑制进而引起多种与衰老相关疾病如肥胖、2型糖尿病等^[26]。脂肪组织中存在大量线粒体,而线粒体在脂肪细胞分化、BAT产热、调节胰岛素敏感性等方面发挥重要作用。膳食天然化合物诱导脂肪重塑和改善线粒体功能障碍以维持机体代谢稳态是具有潜力的治疗方法^[27]。

本研究发现天山雪莲能够显著改善老年脂质代谢异常小鼠的血脂情况及血糖稳态,其机制可能是通过调节脂肪可塑性和改善线粒体功能障碍。天山雪莲给药后能够诱导iWAT棕色化、激活BAT、降低iWAT指数、升高BAT指数、改善脂肪组织状态,在动物和细胞水平上表明能上调棕色脂肪标志基因*Prdm16*、*Ppar γ* 及*Pgc-1 α* 表达水平,增加UCP1蛋白和基因的表达。天山雪莲对线粒体功能障碍的改善作用是通过增强线粒体合成基因*Tfam*的表达、葡萄糖代谢相关基因*Glut 4*表达和增加线粒体数量实现的。综上所述,天山雪莲能够通过改善脂质代谢、脂肪可塑性、线粒体功能障碍等多方面来综合调节老年小鼠的脂质代谢异常。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 刘厚莲. 世界和中国人口老龄化发展态势 [J]. 老龄科学研究, 2021, 9(12): 1-16.
[2] 王治宽, 王发渭. 从气虚血瘀论治老年病 [J]. 中国医

药学报, 2004, 19(6): 359-361.

- [3] 李端阳. 调脂消斑通脉方干预血脂异常边缘升高(气虚兼血瘀质)的临床观察 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2020.
- [4] 韦峰, 梁海燕. 原发性血脂异常及心血管危险分级与中医证候相关研究 [J]. 实用中医内科杂志, 2016, 30(10): 1-3.
- [5] 刘旭东, 钟小雪, 吴海芳, 等. 基于复杂系统熵聚堆方法的1019例血脂异常的中医证候研究 [J]. 北京中医药, 2017, 36(12): 1085-1091.
- [6] Parra-Peralbo E, Talamillo A, Barrio R. Origin and development of the adipose tissue, a key organ in physiology and disease [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 786129.
- [7] 商国懋, 王文颖. 维吾尔族习用药材天山雪莲 [J]. 首都医药, 2014, 21(13): 41.
- [8] 秦汉, 胡志希, 李琳, 等. 雪莲通脉丸对冠心病气虚血瘀证小鼠血管内皮细胞功能相关指标ET-1、NO、ACE的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(2): 25-28.
- [9] 陈小兵, 任小娟, 张秀芬, 等. 雪莲通脉丸治疗气虚血瘀证后循环缺血性眩晕的临床观察 [J]. 天津中医药大学学报, 2019, 38(3): 244-246.
- [10] Liou C J, Wu S J, Chen L C, et al. Acacetin from traditionally used *Saussurea involucreta* Kar. et Kir. suppressed adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and attenuated lipid accumulation in obese mice [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 589.
- [11] Wu X C, Xu J. New role of hispidulin in lipid metabolism: PPAR α activator [J]. *Lipids*, 2016, 51(11): 1249-1257.
- [12] 张伟健, 刘宏, 苏薇薇, 等. 高脂饲料结合力竭游泳的气虚血瘀证动物模型的构建及评价 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2020, 59(2): 131-136.
- [13] 康诵清. 益脉颗粒治疗老年高脂血症气虚血瘀证的临床疗效观察 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2015.
- [14] Liu H H, Li J J. Aging and dyslipidemia: A review of potential mechanisms [J]. *Ageing Res Rev*, 2015, 19: 43-52.
- [15] Singer K, Lumeng C N. The initiation of metabolic inflammation in childhood obesity [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(1): 65-73.
- [16] Yandrapalli S, Gupta S, Andries G, et al. Drug therapy of dyslipidemia in the elderly [J]. *Drugs Aging*, 2019, 36(4): 321-340.
- [17] Roncari D A, Hamilton B S. Cellular and molecular factors in adipose tissue growth and obesity [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1993, 334: 269-277.
- [18] Lidell M E, Betz M J, Enerbäck S. Brown adipose tissue and its therapeutic potential [J]. *J Intern Med*, 2014, 276(4): 364-377.

- [19] Fedorenko A, Lishko P V, Kirichok Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP₁ uncoupling in brown fat mitochondria [J]. *Cell*, 2012, 151(2): 400-413.
- [20] Yang J, Zhang H L, Parhat K, *et al.* Molecular imaging of brown adipose tissue mass [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9436.
- [21] Yang J, Yang J, Ran C Z. Spectral unmixing imaging for differentiating brown adipose tissue mass and its activation [J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2018, 2018: 6134186.
- [22] Kotzbeck P, Giordano A, Mondini E, *et al.* Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation [J]. *J Lipid Res*, 2018, 59(5): 784-794.
- [23] Singh R, Barrios A, Dirakvand G, *et al.* Human brown adipose tissue and metabolic health: Potential for therapeutic avenues [J]. *Cells*, 2021, 10(11): 3030.
- [24] Michurina S S, Stafeev I S, Menshikov M Y, *et al.* Mitochondrial dynamics keep balance of nutrient combustion in thermogenic adipocytes [J]. *Mitochondrion*, 2021, 59: 157-168.
- [25] Das M, Saucedo C, Webster N J G. Mitochondrial dysfunction in obesity and reproduction [J]. *Endocrinology*, 2021, 162(1): bqaa158.
- [26] Macêdo A P A, da Silva A S R, Muñoz V R, *et al.* Mitochondrial dysfunction plays an essential role in remodeling aging adipose tissue [J]. *Mech Ageing Dev*, 2021, 200: 111598.
- [27] Lee J H, Park A, Oh K J, *et al.* The role of adipose tissue mitochondria: Regulation of mitochondrial function for the treatment of metabolic diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19):4924.

[责任编辑 潘明佳]