

基于脂肪可塑性研究大黄素对肥胖小鼠的改善作用和机制

冯倩倩, 贺润铖, 张磊, 耿杨, 赵子阳, 史浩男, 贾占红, 张硕峰, 孙建宁, 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 基于脂肪可塑性探究大黄素改善肥胖的作用和机制。方法 通过高脂饲养 8 周建立肥胖小鼠模型, 肥胖小鼠随机分为对照组、模型组、大黄素 (40、80 mg/kg) 组、CL316243 (1 mg/kg) 组和罗格列酮 (10 mg/kg) 组, 连续给药 4 周。测量各组小鼠体质量, 检测 Lee's 指数和皮下腹股沟白色脂肪组织 (inguinal white adipose tissue, iWAT)、附睾白色脂肪组织 (epididymal white adipose tissue, eWAT)、肾周白色脂肪组织 (perirenal white adipose tissue, pWAT)、肩胛区棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT) 指数, 测量肩胛骨体温; 检测口服葡萄糖耐受量、血糖曲线下面积 (area under curve, AUC) 及血清中总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察脂肪组织病理变化; 免疫组化法检测脂肪组织中棕色化相关蛋白解偶联蛋白 1 (uncoupling protein 1, UCP1) 表达; Western blotting 检测皮下 iWAT 中脂肪可塑性相关蛋白葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活剂-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α)、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)、腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-dependent/activated protein kinase, AMPK)、磷酸化 AMPK (phosphorylated AMPK, p-AMPK) 蛋白表达。结果 与模型组比较, 大黄素组小鼠体质量、Lee's 指数及皮下 iWAT、eWAT、pWAT 指数均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 肩胛区体温升高 ($P < 0.01$), 血糖和血清中 TC、TG、LDL-C 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); BAT 中 UCP1 表达显著增加 ($P < 0.001$), 皮下 iWAT 中 PGC-1 α 、PRDM16、TFAM、p-AMPK/AMPK、GLUT4 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 大黄素能够有效抑制肥胖小鼠模型的体质量增加, 改善糖脂代谢紊乱, 其机制与激活 BAT、诱导 WAT 棕色化有关。

关键词: 大黄素; 脂肪可塑性; 肥胖; 糖脂代谢; 棕色脂肪组织; 白色脂肪组织

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)04-1228-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.04.016

Effect and mechanism of emodin on obese mice based on fat plasticity

FENG Qianqian, HE Runcheng, ZHANG Lei, GENG Yang, ZHAO Ziyang, SHI Haonan, JIA Zhanhong, ZHANG Shuofeng, SUN Jianning, DONG Shifen

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 effect and mechanisms of emodin on obese mice based on fat plasticity. **Methods** An obese mouse model was established by high-fat feeding for eight weeks. The obese mice were randomly divided into control group, model group, emodin (40, 80 mg/kg) groups, CL316243 (1 mg/kg) group and rosiglitazone (10 mg/kg) group, and were administered continuously for four weeks. Body weight, Lee's index and indexes of inguinal white adipose tissue (iWAT), epididymal white adipose tissue (eWAT), perirenal white adipose tissue (pWAT) and brown adipose tissue (BAT) in scapular area were measured; Temperature in scapula of mice in each group was measured; Oral glucose tolerance, blood glucose of area under curve (AUC), and total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels in serum were detected; Hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in adipose tissue; Immunohistochemical

收稿日期: 2023-09-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503287)

作者简介: 冯倩倩, 女, 硕士研究生。E-mail: 13612143765@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

method was used to detect the expression of uncoupling protein 1 (UCP1) related to browning in adipose tissue; Western blotting was used to detect the expressions of fat plasticity related proteins glucose transporter 4 (GLUT4), peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α (PGC-1 α), positive regulatory domain-containing 16 (PRDM16), mitochondrial transcription factor A (TFAM), AMP-dependent/activated protein kinase (AMPK) and phosphorylated AMPK (p-AMPK) in iWAT. **Results** Compared with model group, body weight, Lee's index and indexes of iWAT, eWAT and pWAT in emodin group were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), while the temperature in scapular area was increased ($P < 0.01$). Blood glucose and levels of TC, TG and LDL-C in serum were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); UCP1 expression was significantly increased in BAT ($P < 0.001$), while PGC1-1 α , PRDM16, TFAM, p-AMPK/AMPK and GLUT4 protein expressions in iWAT were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Emodin can effectively inhibit the increase in body weight and improve glucose and lipid metabolism disorders in obese mouse models. Its mechanism is related to the activation of BAT and induction of browning of WAT.

Key words: emodin; fat plasticity; obese; lipid metabolism; brown adipose tissue; white adipose tissue

随着生活水平的提高,以脂质代谢异常为共同特征的相关代谢疾病(包括肥胖、糖尿病、心血管和肝脏疾病以及衰老等),发病率逐年升高,预计到2030年,我国成人超重及肥胖患病率将达到65.3%^[1]。肥胖症是常见的慢性脂质代谢性疾病,主要表现为体内脂肪含量过多、体脂分布失调以及局部脂肪沉积。肥胖的病理生理原因主要包括摄食异常、脂肪组织功能障碍、瘦素受体缺陷或其信号转导改变、肠道菌群紊乱。多数肥胖症患者存在严重的脂质代谢紊乱,并与2型糖尿病、冠心病、高血压等合并存在形成恶性循环,致使疾病加重^[2],对身心健康造成严重负担。据估算,2000—2025年,我国因肥胖导致的经济损失将达到国民生产总值的3.6%~8.7%,造成了重大的社会经济负担^[3]。因此,从改善脂质代谢角度寻找肥胖症的治疗药物具有重要意义。

脂肪具有可塑性特点。脂肪组织是一类具有高度动态变化的内分泌器官,在能量代谢稳态维持过程具有重要作用。哺乳动物的脂肪组织主要由白色脂肪组织(white adipose tissue, WAT)、棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)及米色脂肪组织组成。WAT可将机体过剩的能量以三酰甘油(triglycerides, TG)形式在体内积聚;BAT是一种产热组织,能够通过加快脂肪的氧化产热,促进机体的能量代谢和消耗,人体50 g BAT(<0.1%体重)最多可利用超过20%的基础热量。WAT细胞被药物诱导或冷暴露刺激后“褐变”产生棕色样脂肪细胞,也就是米色脂肪细胞,获得棕色化的表型特征,改善因肥胖引起的代谢紊乱^[4-7],是目前广受关注的对抗肥胖、糖尿病的治疗方法。大黄素是一种天然蒽醌苷元,是大黄中的主要成分,国内外研究发现,大黄素具有抗糖尿病、抗肥胖、抗骨质疏松、

抗癌等药理作用^[8-9]。课题组前期研究发现,大黄素为三黄泻心汤改善肥胖的主要有效成分之一,进一步研究发现大黄素可有效抑制肥胖,并且与调节脂肪组织小分子代谢物有关,推测脂肪组织是大黄素改善肥胖的关键作用位置。因此,本研究深入探究大黄素对脂肪可塑性的影响以及改善肥胖的作用及机制,旨在为肥胖治疗提供新的思路。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性C57BL/6J小鼠48只,6周龄,体质量(20 \pm 2)g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2019-0010。小鼠饲养于北京中医药大学屏障环境动物实验室(温度20~24℃、相对湿度50%~70%、明暗12h/12h),使用许可证号SYXK(京)2020-0033。动物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(批准号BUCM-4-2021102003-4054)。

1.2 药品与试剂

大黄素(质量分数为95.0%,批号T17011F127680)、马来酸罗格列酮(质量分数为99%,批号S17088)购自上海源叶生物科技有限公司; β 3-肾上腺素受体激动剂CL316243(批号C5795)购自美国Sigma-Aldrich公司;D12492高脂饲料购自斯贝福(北京)生物技术有限公司;羧甲基纤维素钠(sodium carboxyl methyl cellulose, CMC-Na,批号S14016)购自上海源叶生物科技有限公司;葡萄糖(批号20201028)购自北京百瑞极生物科技有限公司;血糖试纸(批号06454038022)购自瑞士Roche公司;TG试剂盒(批号20211102)、总胆固醇(total cholesterol, TC)试剂盒(批号20220114)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)试剂盒(批号20220114)、高密度脂蛋白胆

固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 试剂盒 (批号 20220114) 购自南京建成生物工程研究所; 解偶联蛋白 1 (uncoupling protein 1, UCP1) 抗体 (批号 23673-1-AP)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活剂-1 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 抗体 (批号 66369-1-Ig)、线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 抗体 (批号 22586-1-AP)、葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 抗体 (批号 66846-1-Ig) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; PR 结构域蛋白 16 (positive regulatory domain-containing 16, PRDM16) 抗体 (批号 PA5-20872) 购自赛默飞世尔科技公司; 腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-dependent/activated protein kinase, AMPK) 抗体 (批号 GR284787-18)、磷酸化 AMPK (phosphorylated AMPK, p-AMPK) 抗体 (批号 GR3357969-1)、 β -actin 抗体 (批号 GR3371313-1) 购自英国 Abcam 公司; 4%多聚甲醛固定液 (批号 20210118) 购自北京百瑞极生物技术有限公司; 无水乙醇 (批号 100092683)、二甲苯 (批号 10023418)、中性树胶 (批号 10004160)、正丁醇 (批号 1000521090) 购自国药集团化学试剂有限公司; 苏木素-伊红 (HE) 染液套装 (批号 G1003)、柠檬酸 (pH6.0) 抗原修复液 (批号 G1202)、EDTA 抗原修复液 (pH9.0, 批号 G1203)、EDTA 抗原修复液 (pH 8.0, 批号 G1206)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA, 批号 G5001)、超净快干封片胶 (批号 G1404)、组化试剂盒 DAB 显色剂 (批号 G1211) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; PVDF 膜 (批号 R0BB30223) 购自德国 Merck Millipore 公司; 山羊抗小鼠 Ig 二抗 (批号 ZB-2301)、山羊抗兔 Ig 二抗 (批号 ZB-2305) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 细胞组织快速裂解液 RIPA (批号 080320200921)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 120320210419) 购自上海碧云天生物科技有限公司。

1.3 仪器

LOT480134 型血糖仪 (瑞士 Roche 公司); 5810R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); TiS50 型红外热像仪 (美国 Fluke 公司); 蛋白电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司); Donatello 脱水机、Giotto 染色机 (意大利 DIAPATH 公司); JB-P5 型包埋机、JB-L5 型冻台 (武汉俊杰电子有限公司); RM2016 型病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司); KD-P 型组织摊片机 (浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);

TSY-B 型脱色摇床 (武汉赛维尔生物科技有限公司); DS-U3 型成像系统、Eclipse E100 型正置光学显微镜 (日本 Nikon 公司); Epoch 酶标仪 (美国 Bio Tek 公司); Amersham Imager 680 型超灵敏多功能成像仪 (美国 Cellular Technology 公司); FBZ2001-up-p 型标准试剂型纯水仪 (青岛富勒姆科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

取 40 只 C57BL/6J 小鼠喂食高脂饲料, 另取 8 只小鼠喂食普通饲料作为对照组。造模 8 周后, 将造模小鼠按体质量随机分为模型组, 大黄素 (40、80 mg/kg) 组, CL316243 (1 mg/kg) 组和罗格列酮 (10 mg/kg) 组。大黄素组和罗格列酮组 ig 给药 (20 mL/kg), 1 次/d, 连续给药 4 周; 取材前 3 d, CL316243 组 ip 给药 (10 mL/kg), 1 次/d, 连续 3 d; 对照组、模型组 ig 等体积 CMC-Na 溶液。

2.2 体质量的测定

给药期间每周监测各组小鼠体质量的变化, 考察大黄素对模型小鼠肥胖程度的影响。

2.3 Lee's 指数的测定

药物连续干预 4 周后, 称定小鼠体质量, 精确测量小鼠体长 (鼻尖至肛门的距离), 计算 Lee's 指数。Lee's 指数为评价小鼠肥胖程度的指标。

$$\text{Lee's 指数} = \sqrt{\text{体质量} \times 1000} / \text{体长}$$

2.4 红外热像仪测量小鼠肩胛骨皮肤温度

末次给药前 1 d 脱去小鼠背部肩胛骨处的毛发, 第 2 天各组小鼠的肩胛骨皮肤温度由红外热像仪 (Fluke TiS50 THERMAL IMAGER) 在安静状态下测定, 并用特定的软件包 (Smart view 4.3) 分析。

2.5 口服葡萄糖耐量实验 (oral glucose tolerance test, OGTT)

使用 OGTT 研究高脂饮食小鼠体内的葡萄糖代谢情况。药物连续干预 4 周后, 小鼠在禁食不禁水 12 h 的情况下, 采用剪尾法取血, 用血糖仪试纸法测定小鼠血糖。ig 50%葡萄糖 (2 g/kg), 测定 ig 后 0、30、60、90、120 min 血糖值, 绘制 OGTT 时间曲线图, 并采用近似梯形方法计算曲线下面积 (area under curve, AUC)。实验结束小鼠放回笼子, 保证充足的饮水和食物。

2.6 血清血脂水平检测

给药结束后, 小鼠禁食不禁水 12 h, 麻醉取血约 1 mL, 3 500 r/min 离心 10 min, 分离血清。按照

试剂盒说明书测定各组小鼠血清中 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 的含量。

2.7 脂肪组织形态观察和脂肪指数的测定

取血后，解剖分离皮下腹股沟白色脂肪组织 (inguinal white adipose tissue, iWAT)、附睾白色脂肪组织 (epididymal white adipose tissue, eWAT)、肾周白色脂肪组织 (perirenal white adipose tissue, pWAT)、BAT，观察各组小鼠 iWAT、eWAT、pWAT、BAT 大小、厚度和颜色，称定质量，计算脂肪指数。

脂肪指数 = 脂肪质量 / 体质量

2.8 HE 染色检测脂肪组织形态

用 4% 多聚甲醛固定 iWAT、BAT，梯度脱水，石蜡包埋，制备成 2~3 μm 厚的组织薄片，HE 染色，中性树胶封片，于显微镜下观察并拍照。

2.9 免疫组化法检测 UCP1 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，滴加 3% 双氧水溶液，避光室温孵育 25 min，PBS 洗涤 3 次，滴加山羊血清封闭 1 h。滴加 UCP1 抗体 (1 : 500)，将切片放入湿盒内 4 °C 孵育过夜。滴加二抗，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，于显微镜下观察并拍照，通过 Image-Pro Plus 6.0 软件处理数据。

2.10 Western blotting 检测脂肪棕色化相关蛋白表达

取各组小鼠的 iWAT，加入细胞组织快速裂解液裂解，提取蛋白，采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度，蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，于 5% 脱脂牛奶中封闭后，分别加入 PGC-1α、PRDM16、TFAM、AMPK、

p-AMPK、GLUT4 和 β-actin 抗体，4 °C 孵育过夜；TBST 洗涤 3 次，加入二抗，37 °C 摇床孵育 2 h；TBST 洗涤后，加入 ECL 化学发光试剂显影，Image J 软件分析条带灰度值。

2.11 统计学分析

图片使用 Image J 软件进行处理，实验数据采用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行统计，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，对于正态数据，多组间数据比较采用单因素方差分析法 (One-way ANOVA)，组间两两比较采用 LSD。

3 结果

3.1 大黄素对肥胖小鼠体质量和 Lee's 指数的影响

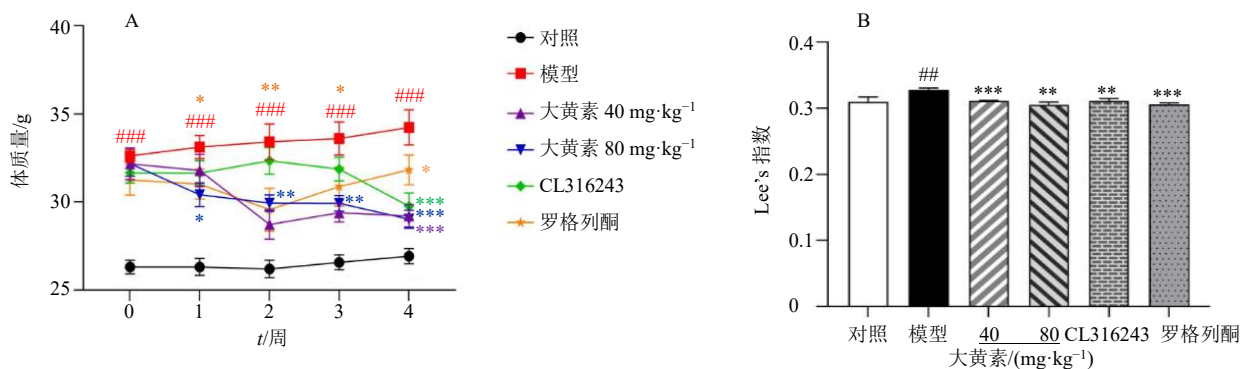
如图 1 所示，与对照组比较，模型组小鼠体质量和 Lee's 指数均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)；与模型组比较，给药 4 周时大黄素各剂量组体质量和 Lee's 指数均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)，表明大黄素可显著改善小鼠肥胖程度。

3.2 大黄素对肥胖小鼠肩胛骨体温的影响

如图 2 所示，与对照组比较，模型组 BAT 周围的皮肤温度显著降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，大黄素 (40 mg/kg) 组 BAT 周围的皮肤温度显著升高 ($P < 0.01$)，表明大黄素能促进肥胖小鼠的 BAT 产热，激活 BAT 功能。

3.3 大黄素对肥胖小鼠脂肪组织形态和脂肪指数的影响

与对照组比较，模型组小鼠 iWAT、eWAT、pWAT 明显增大、增厚；与模型组比较，大黄素各剂量组 iWAT、eWAT、pWAT 明显变小、变薄，更褐色，有棕色化趋势，BAT 无明显变化，表明大黄



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同。
$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 1 大黄素对肥胖小鼠体质量 (A) 和 Lee's 指数 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of emodin on body weight (A) and Lee's index (B) of obese mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

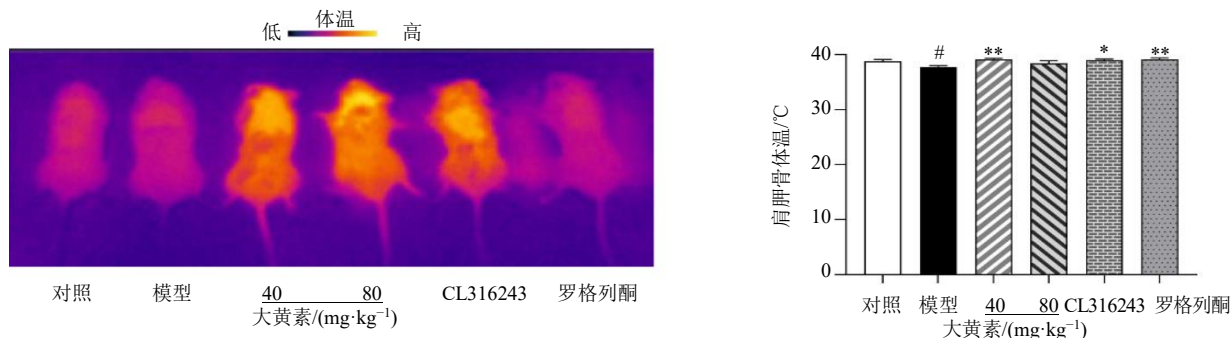


图2 大黄素对肥胖小鼠肩胛骨体温的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effect of emodin on scapular temperature of obese mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

素能有效减少肥胖小鼠的白色脂肪沉积, 促进 WAT 棕色化。

如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组 iWAT、eWAT、pWAT 指数均显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 大黄素 (40、80 mg/kg) 组 iWAT、eWAT、pWAT 指数均显著降低 ($P < 0.001$), 表明大黄素能有效减少肥胖小鼠的白色脂肪沉积。

3.4 大黄素对肥胖小鼠口服葡萄糖代谢的影响

如图 3 所示, 葡萄糖耐量实验中, 与对照组比较, 模型组空腹血糖及 AUC 显著升高 ($P < 0.05$ 、

0.01、0.001); 与模型组比较, 大黄素 (40 mg/kg) 组空腹血糖显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 大黄素 (40、80 mg/kg) 组 AUC 降低但无显著性差异。

3.5 大黄素对肥胖小鼠血脂的影响

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 TC、LDL-C 和 HDL-C 水平均显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001); 与模型组比较, 大黄素 (40、80 mg/kg) 组血清中 TG、TC、LDL-C 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 表明大黄素能改善肥胖小鼠的脂质代谢紊乱。

表 1 大黄素对肥胖小鼠脂肪指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of emodin on adipose index of obese mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	iWAT 指数	eWAT 指数	pWAT 指数
对照	—	0.004 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.002 ± 0.001
模型	—	0.016 ± 0.002 ^{###}	0.034 ± 0.005 ^{###}	0.014 ± 0.002 ^{###}
大黄素	40	0.008 ± 0.001 ^{***}	0.018 ± 0.002 ^{***}	0.006 ± 0.002 ^{***}
	80	0.009 ± 0.001 ^{***}	0.016 ± 0.002 ^{***}	0.005 ± 0.001 ^{***}
CL316243	1	0.006 ± 0.001 ^{***}	0.010 ± 0.002 ^{***}	0.004 ± 0.001 ^{***}
罗格列酮	10	0.009 ± 0.001 ^{***}	0.020 ± 0.002 ^{***}	0.006 ± 0.001 ^{***}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$, 下表同。

^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group, same as below tables.

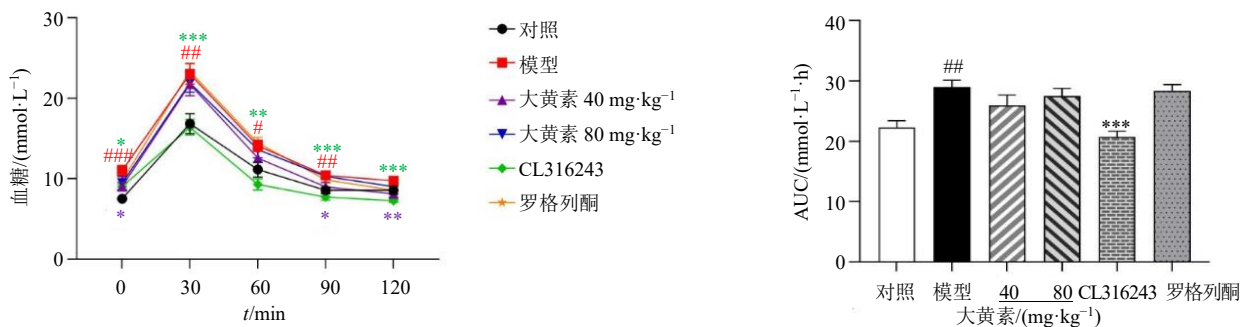


图3 大黄素对肥胖小鼠葡萄糖耐量及 AUC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Effect of emodin on glucose tolerance and AUC of obese mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

表2 大黄素对肥胖小鼠血脂的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of emodin on blood lipid of obese mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	0.54 ± 0.04	3.05 ± 0.22	0.52 ± 0.06	2.97 ± 0.21
模型	—	0.65 ± 0.03	4.80 ± 0.23 ^{###}	1.26 ± 0.13 ^{###}	3.66 ± 0.13 ^{##}
大黄素	40	0.44 ± 0.05 ^{**}	3.85 ± 0.32 ^{**}	0.54 ± 0.06 ^{***}	3.50 ± 0.07
	80	0.46 ± 0.05 [*]	4.04 ± 0.22 [*]	0.57 ± 0.06 ^{***}	3.31 ± 0.18
CL316243	1	0.38 ± 0.05 ^{***}	3.90 ± 0.23 [*]	0.60 ± 0.06 ^{***}	3.01 ± 0.14 ^{**}
罗格列酮	10	0.52 ± 0.07	3.91 ± 0.25 [*]	0.50 ± 0.05 ^{***}	3.41 ± 0.09

3.6 大黄素对肥胖小鼠脂肪组织病理变化的影响

如图4所示,与对照组比较,模型组小鼠 iWAT 细胞直径明显变大,较为松散, WAT 细胞特征明显;与模型组比较,大黄素(40、80 mg/kg)组小鼠 iWAT 细胞体积变小,排列更致密,形态趋向 BAT 细胞。

与对照组比较,模型组小鼠 BAT 细胞直径较大,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 WAT 细胞;与模型组比较,大黄素(40、80 mg/kg)组小鼠 BAT 细胞增多,排列紧密,细胞间毛细血管丰富,具有较为明显的 BAT 细胞形态特征。

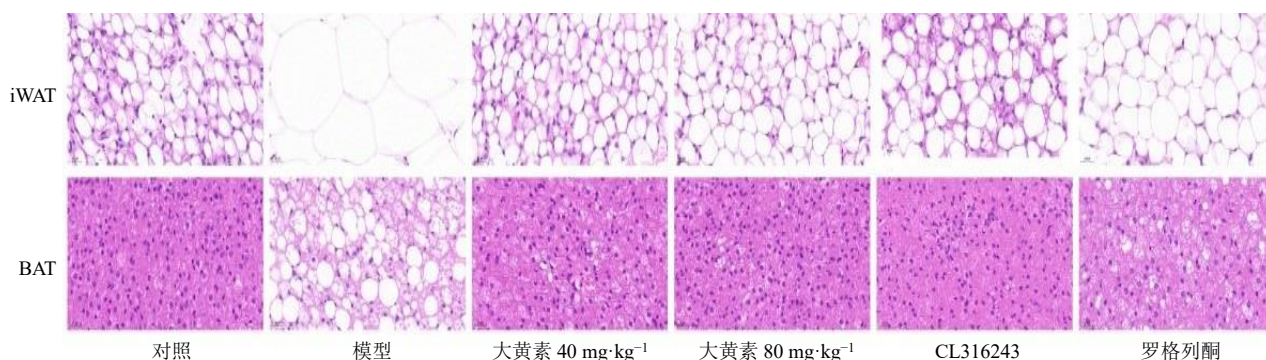


图4 大黄素对肥胖小鼠脂肪组织病理变化的影响 (HE, ×400)

Fig. 4 Effect of emodin on pathological change of adipose tissue in obese mice (HE, × 400)

3.7 大黄素对肥胖小鼠脂肪组织中 UCP1 表达的影响

如图5所示,与对照组比较,模型组 iWAT 中 UCP1 阳性细胞表达减少但无显著性差异;与模型组比较,大黄素(40、80 mg/kg)组小鼠 UCP1 阳性细胞表达增多但无显著性差异。

与对照组比较,模型组小鼠 BAT 中 UCP1 阳性细胞表达显著减少 ($P < 0.01$);与模型组比较,大黄素(40、80 mg/kg)组 UCP1 阳性细胞表达显著增多 ($P < 0.001$)。

3.8 大黄素对肥胖小鼠 iWAT 中脂肪可塑性相关蛋白表达的影响

如图6所示,与对照组比较,模型组 iWAT 中 PRDM16、p-AMPK/AMPK 和 GLUT4 蛋白表达水平平均显著降低 ($P < 0.01, 0.001$), PGC-1 α 、TFAM 蛋白表达水平降低但无显著性差异;与模型组比较,大黄素(40、80 mg/kg)组 PRDM16、p-AMPK/AMPK

和 GLUT4 蛋白表达水平平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 大黄素(80 mg/kg)组 PGC-1 α 、TFAM 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。

4 讨论

肥胖对患者身心健康和社会经济产生重大影响,因此研究改善肥胖症的药物作用及分子机制具有重要意义。为进一步研究大黄素改善肥胖的药效作用及机制,采用高脂饲料喂养建立肥胖模型,研究大黄素对肥胖程度、糖脂代谢、组织形态变化及脂肪可塑性相关蛋白表达的影响。皮下 iWAT 细胞较小并具有更大的分化潜力,因此常被用来作为 WAT 棕色化的重要研究部位^[10];啮齿类动物大部分 BAT 位于背部肩胛区域^[11]。因此,本研究对皮下 iWAT 及肩胛部 BAT 进行重点关注。本研究发现,大黄素可降低肥胖小鼠体质量、Lee's 指数、肩胛骨体温、WAT 指数及 iWAT 细胞大小,表明大黄素可改善小鼠肥胖程度,促进 BAT 产热,改善 WAT、

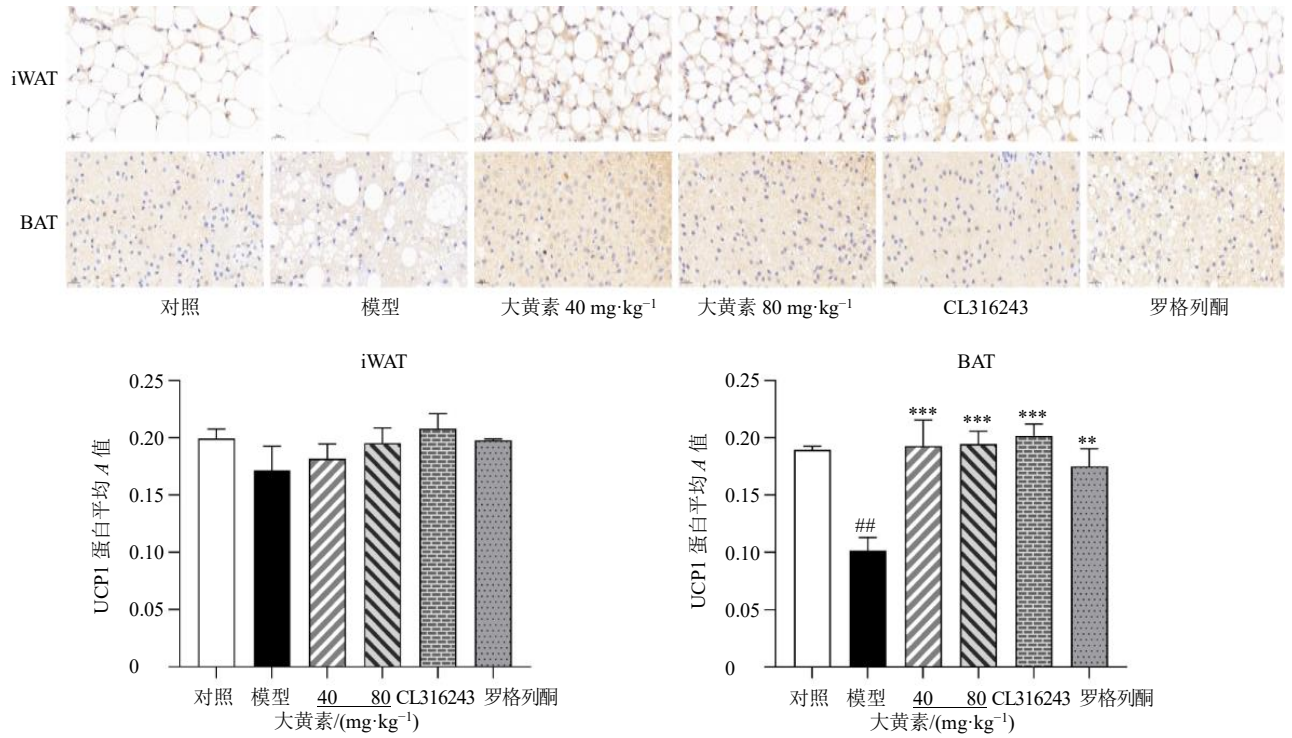


图 5 大黄素对肥胖小鼠 iWAT 和 BAT 中 UCP1 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 5 Effect of emodin on UCP1 protein expression in iWAT and BAT of obese mice (immunohistochemistry, × 400)

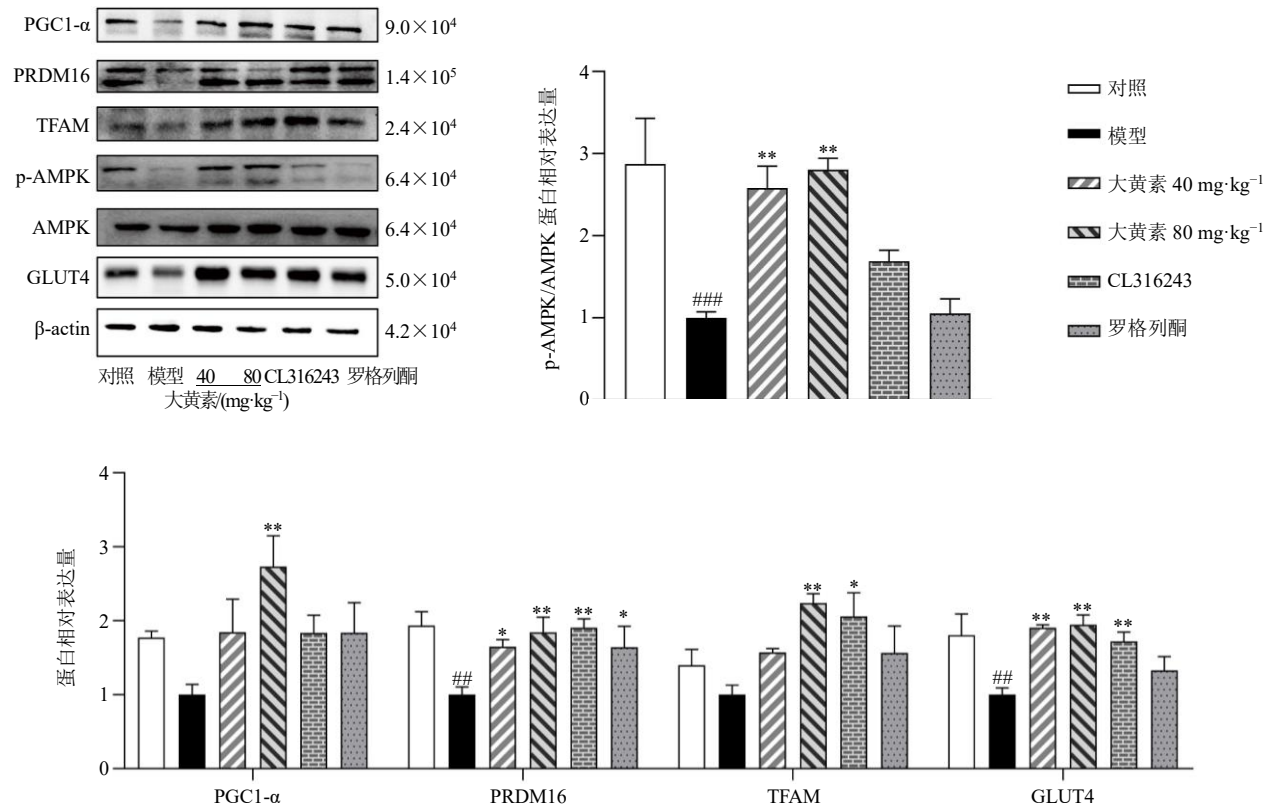


图 6 大黄素对肥胖小鼠 iWAT 中 PGC-1α、PRDM16、p-AMPK/AMPK、TFAM 和 GLUT4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of emodin on PGC-1α, PRDM16, p-AMPK/AMPK, TFAM and GLUT4 protein expressions in iWAT of obese mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

BAT 指数和形态。大黄素显著降低血糖、TC、TG、LDL-C 水平,表明大黄素可以改善糖脂代谢紊乱。

研究发现,不同的脂肪细胞中糖代谢靶点 GLUT4 的功能强度表达不一,在胰岛素的刺激下较大的脂肪细胞中 GLUT4 转位和扩散都明显弱于较小脂肪细胞^[12]。本研究结果显示,与模型组比较,大黄素组皮下 iWAT 细胞明显变小, GLUT4 表达显著增加,表明大黄素可促进 GLUT4 表达,改善糖代谢。UCP1、PRDM16 是重要的脂肪棕色化相关蛋白。UCP1 是一种特殊的线粒体蛋白,介导 BAT 产热过程。UCP1 在线粒体内膜上形成质子通道,内膜胞质侧的 H⁺可经此通道返回线粒体基质,使氧化磷酸化解偶联而不合成三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP),质子浓度梯度储存的能量以热能形式释放^[13]。因此, BAT 细胞的 UCP1 活动被认为是一种很有前途的对抗肥胖和代谢疾病的策略。PRDM16 近年来被发现具有激活 BAT 特异性的生热程序、提高其线粒体密度、促进 UCP1 的表达、增加能量消耗的作用^[14]。同时,当 WAT 中异位表达 UCP1 和 PRDM16 时,可作为识别 WAT 细胞出现米色脂肪细胞的标志^[15]。此外, PRDM16 也被证明是罗格列酮诱导褐变效应所必须的蛋白^[16]。PRDM16 能够诱导 UCP1 以及其他棕色基因的表达,同时抑制包括抵抗素在内的特定 WAT 基因^[17]。本研究中,大黄素显著回调 iWAT 中 PRDM16 蛋白表达,表明大黄素可促进 WAT 棕色化,激活 BAT。

AMPK 是机体内最重要的代谢调控蛋白之一,在机体能量水平下降时被激活,通过磷酸化一系列下游因子促进分解代谢、抑制合成代谢,从而维持能量平衡。AMPK 被证明在调节米色脂肪组织和 BAT 的代谢方面具有重要意义。在脂肪细胞中, AMPK 的激活能够促使蛋白激酶 A 磷酸化甘油三酯脂肪酶和激素敏感性脂肪酶,这些酶可促进细胞内脂肪分解,分解的产物游离脂肪酸是非颤抖产热过程中必要的底物^[18]。AMPK 的敲除会对 WAT 棕色化功能造成明显影响,当 AMPK α 1 被敲除后, WAT 中 UCP1 表达水平剧烈下降^[19]; AMPK β 1 敲除小鼠 WAT 中 PGC-1 α 蛋白表达减少^[20],而 AMPK 激动剂能够诱导 WAT 棕色化发生,上调 UCP1 的表达^[21]。此外,研究发现, AMPK 可通过作用于肾上腺素能神经系统影响 BAT 产热,也可通过促进 PRDM16 启动子区的去甲基化促进 PRDM16 表达,进而促进 BAT 生成^[22]。给予去甲肾上腺素或

CL316243 刺激后, AMPK β 1 促进 PGC-1 α 的表达同时增加 PRDM16 的活性^[20]。本研究中,在大黄素的作用下, iWAT 中 p-AMPK/AMPK、PGC-1 α 、PRDM16 表达上调,表明大黄素可激活 AMPK,促进 WAT 棕色化,从而改善肥胖。

综上,本研究基于脂肪可塑性探讨了大黄素改善肥胖症的作用及相关机制,证实了大黄素可在给药 4 周后有效抑制肥胖模型小鼠的肥胖程度,改善糖脂代谢紊乱,其机制与激活 BAT,诱导 WAT 棕色化有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 金小琴,刘斌,刘昊源,等.基于肠道菌群探讨参苓白术散治疗肥胖的作用机制[J].中医学报,2023,38(8):1732-1738.
- [2] 王晓翠.基于温病湿热理论的代谢综合征相关性研究[D].济南:山东中医药大学,2021.
- [3] 吴正雪,闫文月,刘维,等.近10年中药治疗肥胖症作用机制的实验研究进展[J].中医儿科杂志,2022,18(3):95-100.
- [4] Wang W S, Seale P. Control of brown and beige fat development [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(11): 691-702.
- [5] Rosell M, Kaforou M, Frontini A, et al. Brown and white adipose tissues: Intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014, 306(8): E945-E964.
- [6] Rosenwald M, Perdikari A, Rüllicke T, et al. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(6): 659-667.
- [7] 石越.竹节参总皂苷对高脂诱导的脂肪细胞胰岛素抵抗的干预作用及其分子机制[D].宜昌:三峡大学,2021.
- [8] 韩思琪,哈伟,师彦平.大黄及其有效成分抗炎作用的研究进展[J].中草药,2023,54(1):303-316.
- [9] Wang Y J, Huang S L, Feng Y, et al. Emodin, an 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, regulates adipocyte function *in vitro* and exerts anti-diabetic effect in ob/ob mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(9): 1195-1203.
- [10] 杨丹兰,唐艺嘉,罗邢洋,等.脂肪产热机制及减重代谢手术后脂肪的变化[J].中华肥胖与代谢病电子杂志,2021,7(2):129-133.
- [11] Mo Q X, Salley J, Roshan T, et al. Identification and characterization of a supraclavicular brown adipose tissue in mice [J]. *JCI Insight*, 2017, 2(11): e93166.
- [12] Xu F, Chen R, Ma C, et al. Electroacupuncture improves

- insulin sensitivity in high-fat diet-induced insulin resistant rats by activating sirt1 and glut4 in quadriceps femoris [J]. *Acta Endocrinol*, 2020, 16(3): 280-287.
- [13] Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: Function and physiological significance [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(1): 277-359.
- [14] Kissig M, Ishibashi J, Harms M J, *et al.* PRDM16 represses the type I interferon response in adipocytes to promote mitochondrial and thermogenic programming [J]. *EMBO J*, 2017, 36(11): 1528-1542.
- [15] Spiegelman B M. Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: Toward new therapeutics for metabolic disease [J]. *Diabetes*, 2013, 62(6): 1774-1782.
- [16] Seale P, Bjork B, Yang W L, *et al.* PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch [J]. *Nature*, 2008, 454(7207): 961-967.
- [17] Vernochet C, Peres S B, Davis K E, *et al.* C/EBPalpha and the corepressors CtBP1 and CtBP2 regulate repression of select visceral white adipose genes during induction of the brown phenotype in white adipocytes by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(17): 4714-4728.
- [18] Kudo M, Yamagishi Y, Suguro S, *et al.* L-Citrulline inhibits body weight gain and hepatic fat accumulation by improving lipid metabolism in a rat nonalcoholic fatty liver disease model [J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 9(9): 4893-4904.
- [19] Zou T D, Wang B, Yang Q Y, *et al.* Raspberry promotes brown and beige adipocyte development in mice fed high-fat diet through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) $\alpha 1$ [J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 55: 157-164.
- [20] Wan Z X, Root-McCaig J, Castellani L, *et al.* Evidence for the role of AMPK in regulating PGC-1 alpha expression and mitochondrial proteins in mouse epididymal adipose tissue [J]. *Obesity*, 2014, 22(3): 730-738.
- [21] Daval M, Diot-Dupuy F, Bazin R, *et al.* Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(26): 25250-25257.
- [22] Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Functions of estrogen and estrogen receptor signaling on skeletal muscle [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2019, 191: 10537.

[责任编辑 李亚楠]