

盐酸小檗碱对高脂喂养大鼠棕色脂肪组织 *PGC-1 α* 及 *UCP-1* 基因表达的影响^{*}

喻日成, 范元硕, 罗建华^{**}
(贵州省人民医院 内分泌科, 贵州 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 探讨盐酸小檗碱对高脂喂养的 SD 大鼠棕色脂肪组织解偶联蛋白-1 (*UCP-1*)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助激活因子 (*PGC-1 α*) 基因表达的影响。方法: 6 周龄 SD 雄性大鼠 24 只, 随机分为对照组、高脂喂养组及盐酸小檗碱组, 高脂喂养组及盐酸小檗碱组大鼠给与高脂饮食, 第 6 周时盐酸小檗碱组大鼠灌胃盐酸小檗碱, 对照组和高脂喂养组大鼠灌喂等体积生理盐水; 实验第 24 周时, 取大鼠肩胛部位棕色脂肪组织行 HE 染色观察各组大鼠组织学变化, 应用 Real-Time RT-PCR 及 Western blot 检测棕色脂肪组织 *UCP-1*、*PGC-1 α* mRNA 及蛋白表达。结果: 对照组大鼠棕色脂肪组织 HE 染色可见脂肪细胞体积小、大小均匀, 而高脂喂养组脂肪细胞体积大、不均匀、细胞间有融合, 盐酸小檗碱组棕色脂肪细胞体积较高脂组明显缩小、细胞分布均匀; 高脂喂养组大鼠肩胛棕色脂肪组织 *UCP-1*、*PGC-1 α* mRNA 及蛋白表达水平较对照组下降, 而盐酸小檗碱组较高脂喂养组水平上调。结论: 盐酸小檗碱改善肥胖大鼠的胰岛素抵抗与上调大鼠棕色脂肪组织 *UCP-1*、*PGC-1 α* 的基因表达有关。

[关键词] 盐酸小檗碱; 解偶联蛋白-1; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助激活因子; 棕色脂肪组织; 高脂喂养; 大鼠, Sprague-Dawley

[中图分类号] R589.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)08-0908-04
DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.08.008

Effect of Berberine Hydrochloride on *PGC-1A/UCP-1* Gene Expression in Brown Adipose Tissue of Rats Fed with High-Fat Diet

YU Richeng, FAN Yuanshuo, LUO Jianhua

(Department of Endocrinology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of berberine hydrochloride on *PGC-1 α /UCP-1* gene expression in brown adipose tissue (BAT) of rats fed with high-fat diet. **Methods:** 24 male Sprague-Dawley (SD) rats (6 weeks) were divided into 3 groups including control group, high fat diet group (HFD group) and berberine hydrochloride group (BH group). The two experiment groups were both fed with high fat diet, BH group was given berberine hydrochloride, control group and HFD group were given saline water equal to subject's volume. At 24 weeks, scapular brown adipose tissue was stained with HE to observe histological changes of rats' tissues of all groups; the expressions of *UCP-1*, *PGC-1 α* mRNA genes and protein were analyzed by Real-Time RT-PCR and Western blot. **Results:** HE staining of brown adipose tissue from control group showed small adipocyte with uniform in size, while adipocytes were big and non-uniform in size with cell fusion in HFD groups; brown adipocyte from BH group was significantly smaller than that of HFD group with equally distributed cells. Expressions of *UCP-1*, *PGC-1 α* mRNA genes and protein from brown adipocyte cells of HFD group was lower than control

^{*}[基金项目] 贵州省人民医院国家自然科学基金培育基金[黔科合平台人才(2018)5764-05]
^{**} 通信作者 E-mail: luojianhua_gy@163.com
网络出版时间: 2019-08-27 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190827.1841.008.html>

group, while BH group showed up-regulated expressions of *UCP-1*, *PGC-1α* mRNA genes and protein than HFD group. **Conclusion:** These results suggest that berberine hydrochloride remarkably improved obesity rats' insulin resistance and enhanced expressions of *UCP-1*, *PGC-1α* mRNA genes of brown adipocyte tissue of high fat diet fed rats.

[**Key words**] berberine hydrochloride; uncoupling protein-1; peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator; brown adipose tissue; high fat diet; rats, Sprague-Dawley

脂肪组织在能量的代谢中具有起重要作用,白色脂肪组织储存甘油三酯、通过脂解后提供脂肪酸,棕色脂肪组织通过激活解偶联蛋白-1(*UCP-1*)及线粒体 β 氧化分解脂肪酸提供热量^[1-2]。*UCP-1*、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助因子(*PGC-1α*) 在棕色脂肪组织中表达丰富,可作为辅助因子与过氧化物酶体增殖物激活受体 γ(*PPAR-γ*) 和甲状腺受体 β(*TRβ*) 结合、并作用于 *UCP-1* 启动子,与肥胖的发生关系密切^[3-4]。现代药理研究表明,盐酸小檗碱不仅具有解热、抗炎的作用,还具有改善胰岛素抵抗的作用^[5-6]。目前盐酸小檗碱改善胰岛素抵抗的机制尚不明确,本研究观察盐酸小檗碱对肥胖大鼠棕色脂肪组织形态及功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

6 周龄 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 24 只,初始体质量 70 ~ 80 g,中南大学湘雅医学院动物中心提供;RNA 提取试剂盒 (QIAGEN),逆转录试剂盒 (Applied Biosystems), LightCycler® TaqMan® Master (Roche), *UCP-1* 一抗 (Santa Cruz), *PGC-1α* 一抗 (acam),辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (nta Cruz)。

1.2 方法

1.2.1 分组 SD 雄性大鼠随机分为对照组、高脂喂养组及盐酸小檗碱组,每组 8 只。对照组大鼠喂基础饲料 (蛋白质 22%, 脂肪 12%, 碳水化合物 66%)、高脂喂养组和盐酸小檗碱组大鼠喂高脂饲料 (蛋白质 9%, 脂肪 66%, 碳水化合物 25%), 6 周后盐酸小檗碱组加入 200 mg/(kg · d) 盐酸小檗碱灌胃,均喂养 24 周,乙醚麻醉后断头处死,取肩胛部位的棕色脂肪组织保存于 -80 ℃ 用于后续研究,每组取 4 只大鼠肩胛部位棕色脂肪组织用 4% 多聚甲醛固定、行常规 HE 染色。

1.2.2 *UCP-1* 及 *PGC-1α* mRNA 表达 (1) 总

RNA 制备,取 -80 ℃ 保存的棕色脂肪组织剪碎,加入 TRIzol 1 mL 充分匀浆,按 QIAGEN 试剂盒说明书介绍的方法提取总 RNA,采用 Nanodrop ND1000 测定 RNA 的浓度。(2) cDNA 合成,按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,每个反应体系含 RNA 1 μg、10 × RT 缓冲液 2 μL、dNTP 0.8 μL、随机引物 2 μL、逆转录酶 1 μL,总反应体系 20 μL;反应条件 25 ℃ 10 min,37 ℃ 120 min,85 ℃ 5 min,4 ℃ 后取出样品,-20 ℃ 保存。(3) PCR 扩增,PCR 总反应体系 10 μL,含 cDNA 模板 2 μL、TaqMan® Master 5 μL、ddH₂O 2.5 μL、引物 0.5 μL (序列见表 1)。PCR 反应条件 95 ℃ 10 min,95 ℃ 10 s、60 ℃ 1 min、72 ℃ 20 s,40 个循环,72 ℃ 5 min。每个 qPCR 重复 3 次,以 *GAPDH* 作为内参照基因,目的基因的相对表达量通过公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

表 1 Real-time PCR 引物
Tab. 1 Real-time PCR primers

基因	正义链	反义链
<i>GAPDH</i>	GTATGACTCTACCCACGGCAAAT	TTCCCGTTGATGACCAGCTT
<i>UCP-1</i>	TGGCGTGCCGGTATTCA	TGGCTTTGTGCTTGCAATTCT
<i>PGC-1α</i>	TTGAAGAGCGCCGTGTGA	TTCTGTCCGCGTTGTGTCA

1.2.3 *UCP-1*、*PGC-1α* 蛋白表达 (1) 大鼠棕色脂肪组织总蛋白提取,取 -80 ℃ 保存的大鼠棕色脂肪组织适量,加入 RIPA 裂解液 1 mL,充分匀浆后提取总蛋白,通过 BCA 方法测量蛋白浓度。(2) 检测 *UCP-1*、*PGC-1α* 蛋白表达,将蛋白样品 40 μg 加入 10% SDS-PAGE 点样孔,100 V 电压电泳 2 h,凝胶转 PVDF 膜,5% 的脱脂牛奶封闭,*UCP-1*、*PGC-1α* 及 β-actin 一抗 4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗 3 次,加辣根过氧化物酶酶标记的二抗常温下 30 min,TBST 洗 3 次;化学发光法显影、定影,将胶片进行扫描拍照,用凝胶图象处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计学软件进行分析处理,计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间均数的比

较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肩胛棕色脂肪组织 HE 染色

光镜下可见对照组大鼠肩胛间棕色脂肪组织内的细胞小而均匀,高脂喂养组大鼠棕色脂肪组织内的细胞大小不一,结构紊乱,盐酸小檗碱组的棕

色脂肪细胞排列较高脂喂养组整齐,细胞大小较均匀。见图 1。

2.2 大鼠肩胛棕色脂肪组织 $UCP-1$ 、 $PGC-1\alpha$ 基因表达

Real Time RT-PCR 及 Western Blot 结果显示,高脂喂养组大鼠肩胛棕色脂肪组织 $UCP-1$ 、 $PGC-1\alpha$ 基因表达水平显著低于对照组,而盐酸小檗碱组 $UCP-1$ 、 $PGC-1\alpha$ 基因表达水平较高脂模型组明显上调($P < 0.05$)。见图 2。

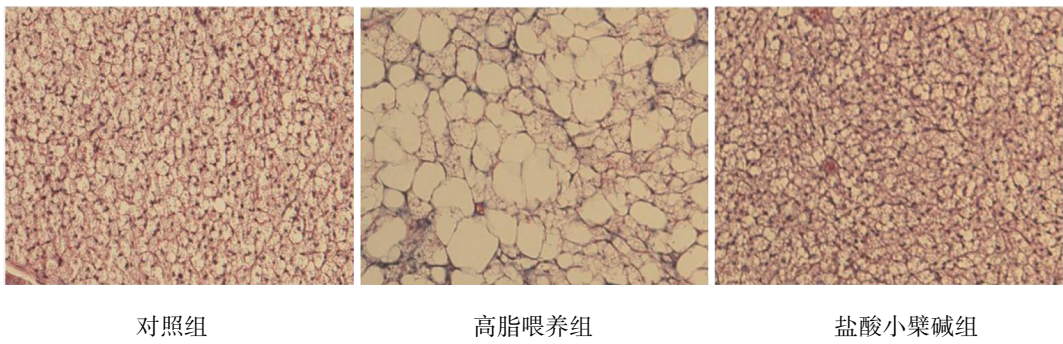
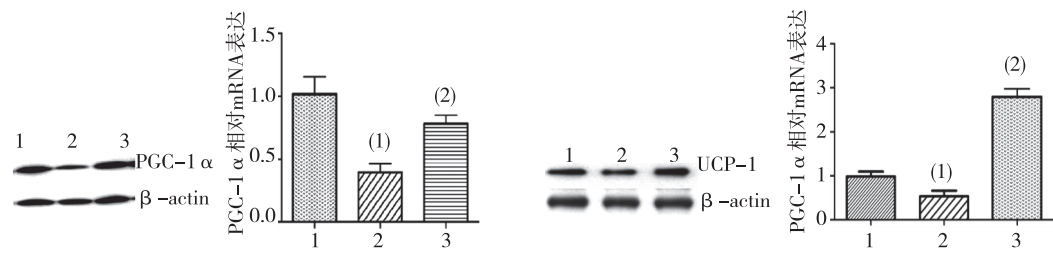


图 1 各组大鼠肩胛棕色脂肪组织学(HE, $\times 400$)

Fig. 1 HE staining of scapula brown adipose tissue of rats each group under light microscope



注:1 为对照组,2 为高脂喂养组,3 为盐酸小檗碱组;⁽¹⁾与对照组比较 $P < 0.05$,⁽²⁾与高脂喂养组比较 $P < 0.05$ 。

图 2 大鼠肩胛棕色脂肪组织 $UCP-1$ 、 $PGC-1\alpha$ 基因表达

Fig. 2 Expression of $UCP-1$ and $PGC-1\alpha$ genes in brown adipose tissue of scapula in rats

3 讨论

肥胖的发病机制复杂,研究发现脂肪组织的功能与肥胖的发生密切相关。棕色脂肪组织由棕色脂肪细胞及血管构成,含有丰富的线粒体,受交感神经支配,既往认为人类的棕色脂肪组织只存在新生儿阶段,但新近研究发现在成年人中亦存在有功能的棕色脂肪组织^[7]。棕色脂肪组织线粒体内膜上 $UCP-1$ 表达丰富,通过氧化脂肪酸产热,在寒冷环境中维持体温、或消耗机体摄取的过多能量,维持体内能量代谢平衡^[8-9]。 $PGC-1\alpha$ 是能量代谢途径中众多转录因子的共激活因子,能诱导棕色脂肪

组织中 $UCP-1$ 的高表达^[10]。本研究结果表明,高脂喂养的大鼠肩胛部位的棕色脂肪组织的结构发生明显的改变,细胞大小不一、排列紊乱,而且高脂喂养的大鼠肩胛部位的脂肪组织 $UCP-1$ 、 $PGC-1\alpha$ mRNA 和 $UCP-1$ 、 $PGC-1\alpha$ 蛋白表达明显下调,因此推测棕色脂肪组织的结构及功能的改变与大鼠的肥胖发生相关。

有研究表明, $UCP-1$ 基因敲除小鼠易发生高脂饮食诱导的肥胖、并出现肥胖相关代谢紊乱如胰岛素抵抗和高脂血症^[11]。现代药理研究表明小檗碱具有改善胰岛素抵抗、纠正脂质紊乱,促进胰岛素分泌等作用,认为小檗碱可能通过调节类固醇结合元件结合蛋白、PPAR- γ 等基因的转录从而改善糖

尿病仓鼠的胰岛素抵抗^[12], 还有研究发现小檗碱能激活能量代谢感应器 AMPK, 启动脂肪酸氧化和糖酵解, 改善胰岛素抵抗^[13]; 亦有认为 *UCP-1*、*PGC-1 α* 基因的表达增加与能量消耗密切相关^[14]。目前国内外尚未见有关小檗碱对棕色脂肪组织 *UCP-1*、*PGC-1 α* 基因的表达影响的相关报道, 本研究结果发现盐酸小檗碱能改善高脂喂养大鼠肩胛棕色脂肪组织的结构紊乱, 推测这种改变可能与盐酸小檗碱提高大鼠肩胛棕色脂肪组织 *UCP-1*、*PGC-1 α* 的表达有关, 但其具体机制有待于进一步的研究。

综上, 盐酸小檗碱具有抗炎, 调节能量代谢, 纠正脂代谢紊乱等多重作用, 其通过影响肥胖大鼠棕色脂肪组织的结构及功能改善肥胖大鼠的胰岛素抵抗, 为其在临床中的应用提供了一定的理论依据。

4 参考文献

[1] AHMADIAN M, DUNCAN R E, VARADY K A, et al. Adipose overexpression of desnutrin promotes fatty acid use and attenuates diet-induced obesity [J]. *Diabetes*, 2009, 58(4): 855 – 866.

[2] SUNG S C, JIN Y H, IN J H, et al. Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders [J]. *Front Endocrinol*, 2016, 7(30): 1 – 16.

[3] ULDRY M, YANG W, ST-PIERRE J, et al. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation [J]. *Cell Metab*, 2006, 3(5): 333 – 341.

[4] FOURNIER B I, MURRAY B, GUTZWILLER S, et al. Blockade of the activin receptor IIb activates functional brown adipogenesis and thermogenesis by inducing mitochondrial oxidative metabolism [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(14): 2871 – 2879.

[5] ZHANG H, SHAN Y, WU Y, et al. Berberine suppresses LPS-induced inflammation through modulating Sirt1/NF- κ B signaling pathway in RAW264. 7 cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 52: 93 – 100.

[6] YE L, LIANG S, GUO C, et al. Inhibition of M1 macrophage activation in adipose tissue by berberine improves insulin resistance [J]. *Life Sci*, 2016, 166: 82 – 91.

[7] NEDERGAARD J, BENGTTSSON T, CANNON B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 293(2): 444 – 452.

[8] JUAN A P. Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome [J]. *World J Diabetes*, 2016, 7(19): 483 – 514.

[9] JOGESHWAR M, APARNA B, KIMBERLY N S. Classification of therapeutic and experimental drugs for brown adipose tissue activation: potential treatment strategies for diabetes and obesity [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2016, 12(4): 414 – 428.

[10] RODGERS J T, LERIN C, GERHART-HINES Z, et al. Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(1): 46 – 53.

[11] WANG G X, ZHAO X Y, LIN J D. The brown fat secretome: metabolic functions beyond thermogenesis [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(5): 231 – 237.

[12] LI G S, LIU X H, ZHU H, et al. Berberine-improved visceral white adipose tissue insulin resistance associated with altered sterol regulatory element-binding proteins, liver X receptors, and peroxisome proliferator-activated receptors transcriptional programs in diabetic hamsters. *biol* [J]. *Pharm Bull*, 2011, 34(5): 644 – 654.

[13] LU J, CAO Y, CHENG K, et al. Berberine regulates neurite outgrowth through AMPK-dependent pathways by lowering energy status [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 334(2): 194 – 206.

[14] WU M V, BIKOPOULOS G, HUNG S, et al. Thermogenic capacity is antagonistically regulated in classical brown and white subcutaneous fat depots by high fat diet and endurance training in rats: impact on whole-body energy expenditure [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(49): 34129 – 34140.

(2019-05-25 收稿, 2019-08-10 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵 毅