

针刺对肥胖大鼠脂肪蓄积及瘦素表达的影响*

★ 李小林 习丹 刘仁毅 巫国辉 (江西省人民医院 南昌 330006)

摘要:目的:观察针刺对肥胖大鼠脂肪蓄积及瘦素表达的影响,探讨针刺减肥的治疗机理。方法:60 只 SD 大鼠造模后随机分为正常对照组、肥胖对照组及针刺治疗组。观察各组大鼠针刺治疗前后的体重及 Lee's 指数。针刺治疗后取各组大鼠脂肪组织常规免疫组化染色检测瘦素表达,组织染色后体视学方法测量体密度、数密度及表面积密度。结果:治疗后,针刺治疗组体重、Lee's 指数与正常对照组无差异,与肥胖对照组相比明显减低($P < 0.01$)。治疗后,针刺治疗组瘦素表达及脂滴体密度、表面积密度、数密度与肥胖对照组相比明显下降($P < 0.01$),与正常对照组相比无差异。结论:针刺治疗能显著降低肥胖大鼠升高的瘦素表达,减少肥胖大鼠已增加的脂肪蓄积量。

关键词:针刺疗法;肥胖;大鼠;脂肪蓄积;瘦素表达

中图分类号:R 246 **文献标识码:**B

肥胖是一种复杂的多危险因素所致慢性能量代谢性疾病,同时也是心脑血管疾病、老年病、高血压、糖尿病甚至部分肿瘤等多种慢性疾病的危险因素;严重危害人们身心健康^[1]。对于肥胖日前国内外尚无较好的药物治疗,而针刺对肥胖患者的临床减肥疗效已得到肯定。针刺对肥胖的治疗机理至今尚未明了,极大地制约了针刺减肥的临床推广应用。针刺治疗肥胖对脂肪细胞的形态功能学改变目前未见报道,本文观察了针刺对肥胖大鼠脂肪蓄积及瘦素表达的影响,以探讨针刺减肥的治疗机理。

1 材料与方法

1.1 动物分组与造模 取清洁级雄性 SD 大鼠 60 只(江西医学院实验动物中心提供),体重 55~76 g。随机分为二组。正常对照组 20 只,基础饲料喂养;造模组 40 只,高脂饲料喂养,高脂饲料配方如表 1 所示。造模期间,各组大鼠自由摄食、饮水,食水每日更换。3 个月,造模组大鼠间体重无明显差异,体重超过正常组大鼠体重 10% 以上的肥胖大鼠再随机将分为二组:肥胖对照组及针刺治疗组,每组 20 只。造模成功后,各组大鼠均改用基础饲料喂养,自由摄食、饮水。

表 1 饲料的配方及所含能量 /g·100g⁻¹

组别	蛋白质	脂肪	碳水化合物	混合无机盐	复合维生素	纤维素	总能量/KJ
高脂饲料	10.00	35.00	49.35	3.50	1.00	8.00	2 164.80
基础饲料	10.00	8.22	63.90	3.50	1.00	13.38	1 546.32

1.2 针刺治疗 每日将各组大鼠均放入大鼠固定器中固定 15 分钟,但仅针刺组行针刺治疗。针刺治疗时以 75% 酒精消毒一侧后三里(相当于足三里)、内庭穴,以 36 号美容针(0.19 mm×10 mm,苏州医疗用品厂)分别刺入 5 mm 和 3 mm 深度,然后接通电针仪(G6805 型,青岛华声仪器厂),频率 10 Hz,强度 1.5 V,连续波,每次治疗 10 分钟,每日 1 次,连续治疗 15 天,左右侧轮流取穴。实验前后观察大鼠体重、体长及 Lee's 指数[=体重 3/2(g)/体长(cm)×10³]。

1.3 瘦素表达 各组大鼠禁食过夜,次日经 10% 水合氯醛

腹腔麻醉后(0.3 mL/100g)开胸,4℃ 4% 多聚甲醛灌注固定后迅速分离肾周脂肪。脂肪组织 4% 多聚甲醛固定 12~24 小时,常规石蜡包埋、切片,片厚 6 μm,行常规免疫组织化学 SABC 染色,一抗为兔抗大鼠瘦素抗体(工作浓度 1:100,武汉博士德公司),37℃ 孵育 1 小时后,4℃ 过夜。即用型 SABC 试剂盒(武汉博士德公司)按说明操作。DAB-H₂O₂ 显色,脱水,透明,封片,镜下观察。计算机图像分析系统(CMIAS-8)半定量检测各组瘦素蛋白表达,含量用积分光密度(integral optical density, IOD)表示。

1.4 脂肪细胞脂滴形态学观察 靛酚酚-锂胭脂常规染色,伊红复染。体视学方法测量体积密度(V_v),数密度(N_v),表面积密度(S_v);以观察脂肪细胞脂滴数量、大小、充盈度,评价脂肪细胞脂肪蓄积状况。

1.5 统计学分析 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 Spss10.0 统计软件进行分析,各组间均值比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 针刺对肥胖大鼠体重、Lee's 指数的影响 见表 2。

表 2 各组大鼠治疗前后体重、体长及 Lee's 指数($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重/g	体长/cm	Lee's 指数
正常对照组	20	348.81±5.42	24.34±0.49	289.31±6.21
肥胖对照组	20	359.39±5.13	24.60±0.49	289.12±6.19
肥胖对照组	20	498.96±18.46	24.55±0.39	323.10±6.07
针刺治疗组	20	506.73±15.64	24.72±0.44	322.65±6.98
针刺治疗组	20	502.49±12.27	24.55±0.60	324.06±8.26
针刺治疗组	20	424.21±8.16*△	24.71±0.49	304.19±6.73*△

注:*与治疗前相比 $P < 0.05$;△与肥胖对照组相比 $P < 0.01$ 。

针刺前后各组大鼠体重、体长及 Lee's 指数如表 2 所示。治疗前正常对照组与肥胖对照组、针刺治疗组相比,体重及 Lee's 指数差异均有显著统计学意义;针刺治疗组治疗后体重及 Lee's 指数,与正常对照组相比差异无统计学意义,与肥胖对照组相比差异有显著统计学意义;与治疗前相比差异有统计学意义。

2.2 针刺对脂肪细胞瘦素表达及脂肪蓄积的影响 见表 3。

* 江西省卫生厅中医药科研基金资助项目(NO.2002A05)

表3 脂肪细胞瘦素表达及脂滴体密度、表面积密度、数密度 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IOD	Vv	Sv	Nv
正常对照组	20	137.849 5 $\pm$ 8.450 1 $^{\Delta}$	0.087 9 $\pm$ 0.029 7 $^{\Delta}$	0.247 4 $\pm$ 0.068 7 $^{\Delta}$	0.168 6 $\pm$ 0.067 7 $^{\Delta}$
肥胖对照组	20	182.818 5 $\pm$ 8.701 8*	0.191 6 $\pm$ 0.078 7*	0.570 4 $\pm$ 0.226 4*	0.306 3 $\pm$ 0.128 1*
针刺治疗组	20	153.242 2 $\pm$ 9.486 2	0.092 9 $\pm$ 0.036 7	0.266 8 $\pm$ 0.115 6	0.151 9 $\pm$ 0.081 6

注:与针刺治疗组相比,* $P<0.01$, $^{\Delta}P>0.05$ 。

针刺治疗前后各组大鼠脂肪细胞瘦素表达及脂滴体密度、表面积密度、数密度见表3。可见,针刺治疗组瘦素积分光密度及脂滴体密度、表面积密度、数密度,与肥胖对照组相比差异有显著统计学意义,与正常对照组相比差异无统计学意义。

3 讨论

肥胖严重影响现代人类身心健康。针刺治疗肥胖的临床效果显著,同时患者神经、内分泌、消化功能及能量代谢得以改善^[2]。针刺对下丘脑中枢的调整作用可能是针刺减肥关键性因素之一。下丘脑中含有促进食欲与能量正平衡的物质,又含有抑制食欲与能量负平衡的物质,它们相互调节,形成复杂的、功能重叠的食欲中枢调节网络^[3]。下丘脑中枢调节网络主要接受的外周能量储备信号是瘦素(leptin);它由脂肪细胞分泌,被认为是机体营养状态与下丘脑调节中枢这一反馈调节环节的信号使者^[4,5]。大量肥胖的研究致力于瘦素与下丘脑调节的相互关系^[6-8]。

瘦素通过与下丘脑尤其是弓状核受体结合,影响中枢肥胖调节网络,可调节神经肽Y(NPY)、增食欲素(orexin)等及其mRNA的表达,继而引发下游分子网络的改变,改变自主神经活动,改变激素分泌量和作用,通过使动物摄食减少及能量消耗增加,减少体内能量储备,导致体重下降,避免肥胖的发生^[9,10]。瘦素作为肥胖发病的主要因素已被广泛认可^[9,11,12,13],对体重的调节作用及其重要性一开始就受到广泛关注^[9]。其分子量为16KD,由脂肪细胞ob基因编码合成,释放入血^[10],由Pellemounter 1995年在小鼠体内发现^[14]。其编码基因-ob基因在利用基因突变的各种肥胖动物模型有意识寻找ob基因及其表达产物过程中,由Zhang 1994年首先在小鼠定位克隆鉴定,并见文于“Nature”^[15];随后ob基因也被定位于第七号染色体上^[16]。不仅正常生理状态下,血浆瘦素与体脂含量高度正相关,反映体脂状态^[9];而且肥胖患者血清瘦素水平也直接与体重指数及肥胖相关^[17]。以前探讨针刺减肥机理的研究基本围绕针刺对下丘脑中枢的调整作用;针刺治疗肥胖后脂肪细胞形态及瘦素分泌的改变鲜见报道。

以往,形态学研究局限于定性描述。体视学技术的应用为形态学研究由单纯定性观察走向定量研究提供了客观的量化指标。体视学是由二维结构信息定量推导三维结构信息的科学,是生物形态学定量研究的重要方法^[18]。体密度、表面积密度和数密度是体视学中重要参数。以细胞质为包容空间,脂滴的体密度是指单位体积内脂滴所占体积百分比;表面积密度是指单位体积内脂滴表面积大小;数密度则反映单位面积或体积内脂滴个数。结合体密度、表面积密度和数密度能很好地反映脂肪蓄积情况。

本研究应用免疫组化、体视学等技术方法,从细胞、分子

水平观察了针刺对脂肪细胞瘦素分泌及脂肪蓄积的影响,结果表明治疗前针刺治疗组及肥胖对照组大鼠相比正常对照组明显肥胖,针刺治疗组治疗后体重及Lee's指数较治疗前明显下降,临床效果显著。同时观察到,针刺治疗组瘦素表达明显低于肥胖对照组,与正常对照组接近;而脂滴体密度、表面积密度及数密度也明显低于肥胖对照组。针刺治疗后肥胖明显缓解,瘦素表达量下降,脂肪蓄积量减少。我们推测针刺治疗肥胖可能通过影响脂肪细胞瘦素分泌,进而反馈调节下丘脑中枢食欲调节网络,减少脂肪蓄积达到减肥效果。

参考文献

- [1] Grundy SM, and Barnett JP. The pathogenesis of obesity: a perspective for the 1990s[J]. Disease - a - Month, 1990,36:641~731
- [2] 刘志诚,孙凤岷,王沂争,等. 针刺治疗单纯性肥胖胃肠实热型患者的良性调整作用探讨[J]. 中国中西医结合杂志. 1995,15:137~140
- [3] Kalra SP, Dube MG, Pu S, et al. Interacting appetite regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight[J]. Endocr Rev. 1999,20:68~100
- [4] Compfield LA, Smith FL, Guisez Y, et al. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks[J]. Science. 1995,269: 546~549
- [5] Tartaglia LA, Dembski M, Weng M, et al. Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor[J]. OB-R. Cell. 83: 1 263~1 271
- [6] Kalra SP, Dube MG, Pu S, et al. Interacting appetite - regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight[J]. Endocr Rev. 1999, 20:68~100
- [7] Yarnell DO, Knight DS, Hamilton, et al. Localization of leptin receptor immunoreactivity in the lean and obese Zucker rat brain[J]. Brain Res. 1998,785:80~92
- [8] Schwartz M, Seeley R. Neuroendocrine responses to starvation and weight loss[J]. New Engl J Med. 1997,336:1 802~1 805
- [9] Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. Weight - reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene[J]. Science. 1995, 269:543~546
- [10] Clement K, Vaisse C, Lahlou N, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction[J]. Nature. 1998,392:398~401
- [11] Crowley VE, Yeo GS, O'Rahilly S. Obesity therapy: altering the energy intake - and - expenditure balance sheet[J]. Nat Rev Drug Discov. 2002, 1:276~286
- [12] McMinn JE, Baskin DG, Schwartz MW. Neuroendocrine mechanisms regulating food intake and body weight[J]. Obes Rev. 2000, 1:37~46
- [13] Frederich RC, Lollmann B, Hamann A, et al. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity[J]. J Clin Invest. 1995, 96:1 658~1 663
- [14] Pellemounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice[J]. Science. 1995, 269:540~543
- [15] Zhang Y., Proenca R., Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. Nature. 1994, 372:425~432
- [16] Geffroy S, De Vos P, Staels B, et al. Localization of the human OB gene (OBS) to chromosome 7q32 by fluorescence in situ hybridization[J]. Genomics. 1995, 28:603~604
- [17] Banks WA, Lebel CR. Strategies for the delivery of leptin to the CNS. J Drug Target[J]. 2002, 10:297~308
- [18] 申洪,沈忠英. 实用生物体视学技术[M]. 广州:中山大学出版社, 1991.64~198

(收稿日期:2006-03-02)