网络出版时间:2023 - 07 - 13 16:54:54 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.R.20230713.1436.010.html

低氧/冷暴露对肥胖大鼠模型白色脂肪棕色化的影响

郜 琨,杨历新,王 叶,许海琦

摘要 目的 探究低氧/冷暴露对肥胖大鼠模型白色脂肪棕色化的影响。**方法** 通过高脂喂食构建肥胖大鼠模型并随机分为对照组、低氧组、低温组、低温低氧组,每组 10 只,观察各组大鼠体质量、体脂的变化,利用 HE 染色观察大鼠脂肪组织细胞形态变化并比较脂肪细胞面积,利用免疫荧光法、实时荧光定量 PCR 法及 Western blot 检测各组大鼠脂肪组织中过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ2(PPAR-γ2)、PR 结构域结合因子 16(PRDM16)和解偶联蛋白 1(UCP-1)基因的表达及 UCP-1 蛋白的表达。**结果** 与对照组相比,低氧组、低温组、低温低氧组大鼠体质量、体脂均降低,且低温低氧组大鼠体质量、体脂低于低氧组、低温组($P<0.05$)。与对照组相比,低氧组、低温组、低温低氧组大鼠脂肪细胞面积减小,且低温低氧组大鼠脂肪细胞面积低于低氧组、低温组($P<0.05$)。与对照组相比,低氧组、低温组、低温低氧组大鼠肩胛棕色脂肪组织 PPAR-γ2、PRDM16、UCP-1 基因表达均升高($F=378.495$、102.061、322.443,$P<0.05$),肾周白色脂肪组织 PPAR-γ2 基因表达均降低($F=4.555$,$P<0.05$),PRDM16、UCP-1 基因表达均升高($F=24.387$、163.660,$P<0.05$)。与对照组相比,低氧组、低温组、低温低氧组大鼠肩胛棕色脂肪组织与肾周白色脂肪组织 UCP-1 蛋白表达均升高($P<0.05$);与低温低氧组相比,低氧组、低温组大鼠肩胛棕色脂肪组织与肾周白色脂肪组织 UCP-1 蛋白表达均更低($P<0.05$)。**结论** 低氧/冷暴露可通过调控脂肪内 PPAR-γ2、PRDM16 通路使 UCP-1 高表达,诱导白色脂肪棕色化并影响大鼠体质量。

关键词 低氧;冷暴露;过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ2;PR 结构域结合因子;解偶联蛋白 1

中图分类号 R 363.1 +6

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2023)08 - 1274 - 06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2023.08.005

目前,肥胖是影响人类健康的重大问题,其成为了危害身体健康的头号杀手[1]。肥胖已经取代了营养不良和感染的疾病影响,与一些疾病如糖尿病[2]都有明显的相关关系。如何减控体质量已成为目前研究的热点及难点。低氧环境下的体质量减轻是近年发现的一个新的生理现象,国内外有包括长期慢性低氧和短期低氧暴露情况下关于体质量的各种观察研究。研究[3]表明,冷暴露不仅能提高棕色脂肪活性,还能高度选择性地刺激皮下脂肪解偶联蛋白 1(uncoupling protein 1,UCP-1)的表达和产热活性。还有研究[4]指出,低氧暴露可以降低体脂,冷暴露可诱导白色脂肪棕色化和棕色脂肪组织分化,但有关低氧、冷暴露后白色脂肪棕色化的生物学机制尚不完全清楚。本研究通过白色脂肪棕色化对传统调控机制 PPAR-γ2、PRDM16 和 UCP-1 表达和活性的增强效应,探究低氧/冷暴露对肥胖大鼠白色脂肪棕色化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 60 只雄性 SD 大鼠购于南京君科生物公司,生产许可证号:SCXK(苏)2018-0001,将所有大鼠放在 SPF 级动物房中饲养,均自由摄食及饮水,每 12 h 光照/12 h 黑暗,温度为 19 ~ 25 ℃,湿度为 45% ~ 55%。

1.2 方法

1.2.1 *实验动物分组* 60 只大鼠通过高脂喂食构建肥胖大鼠模型。6 周后超过普通饲料饲养大鼠平均体质量 10% 为肥胖造模成功。有 40 只大鼠建模成功,将其随机分为对照组、低氧组、低温组、低氧低温组,每组 10 只。其中对照组大鼠模型放置在正常环境中(氧浓度 21%,实验温度 >4 ℃),低氧组大鼠放置在低氧常温环境下(氧气含量为 16.2%,实验温度 >4 ℃),低温组大鼠放置在冷环境中(氧气含量为 21%,实验温度 0 ℃ ±4 ℃),低氧低温组大鼠大鼠放置在低氧/冷环境中(氧气含量为 16.2%,实验温度 0 ℃ ±4 ℃)。所有大鼠在实验期间均普通饲料饲养。

1.2.2 *测量大鼠体质量及体脂* 观察 4 组大鼠精神状态、活动情况、每周测量体质量。4 周时利用美国 Columbus 实验动物代谢和 Echo Medical Systems 体成分分析仪测量分析系统分别检测 4 组大鼠代谢

2023 - 06 - 07 接收

基金项目:青海省科技项目(编号:2016-ZJ-707)

作者单位:青海省人民医院内分泌一科,西宁 810007

作者简介:郜 琨,女,本科,副主任医师;

杨历新,男,主任医师,责任作者,E-mail:yanglx282@sina.com

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

率和体脂含量,随后大鼠禁食 18 h 后经乙醚麻醉后称体质量,眼球放血 5 ml 留取血清和分离肾周白色脂肪和肩胛棕色脂肪。各组小鼠血清样本通过 4 ℃离心后 -20 ℃保存。

1.2.3 *苏木精-伊红(HE)染色检测大鼠脂肪组织形态变化* 新鲜的大鼠肾周白色脂肪和肩胛棕色脂肪固定于 10% 的甲醛溶液,固定时间约 24 h。梯度乙醇脱水从 80% 乙醇、95% 乙醇至无水乙醇约为 4 h,组织透明后浸蜡,随后以石蜡包埋和切片厚度一般为 5 μm,常规 HE 染色。染色理想的切片在显微镜下应是细胞核与细胞质蓝红相映,色泽鲜艳,核质对比明显,核膜及核染色质颗粒清晰可见。最后利用日本 Keyence 显微镜进行观察分析。

1.2.4 *免疫荧光法检测蛋白表达* 新鲜的大鼠肾周白色脂肪和肩胛棕色脂肪经常规脱蜡水化后置于二甲苯Ⅰ、Ⅱ中浸泡,每次 10 min。采用 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,然后加入驴血清置于室温下封闭 1 h,弃驴血清并加入一抗于 4 ℃环境下孵育过夜;取出加二抗于室温下孵育 2 h,经 PBS 冲洗后采用蒸馏水冲洗 3 次,每次 5 min,加入含 DAPI 的抗淬灭封片剂,置于室温下避光反应 5 min,封片然后置于显微镜下观察。

1.2.5 *荧光定量 PCR 检测基因的表达* 利用 TRIzol 试剂分别从大鼠肩胛棕色脂肪及肾周白色脂肪中提取总 RNA。每个循环 94 ℃,变性 15 s,55 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 15 s。观察过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ2(PPAR-γ2)、PRDM16 和解偶联蛋白(UCP-1)基因的表达量,18s 核糖体 RNA(18S)作为参照。

1.2.6 *Western blot 检测脂肪蛋白表达* 利用 BCA 蛋白试剂盒分别从大鼠肩胛棕色脂肪及肾周白色脂肪中提取总蛋白,分别取各组总蛋白 30 μg,蛋白样品用 SDS-PAGE 胶进行电泳,湿法将蛋白质从凝胶转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉在室温的条件下封闭 1 h,按照说明书的方法加入一抗(1∶1 000),4 ℃孵育过夜后加入二抗 lgG(1∶3 000),室温条件下孵育 1 h,显色显影,以 β-actin 蛋白为内参计算 UCP-1 蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计处理,符合正态分布及方差齐性的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体质量、体脂比较 与对照组相比,低氧组、低温组、低温低氧组大鼠体质量、体脂率均下降($P<0.05$);与低温低氧组相比,低氧组、低温组大鼠体质量、体脂率均升高($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠体质量、体脂($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量(g)	体脂(%)
对照	10	353.03 ± 16.53	27.63 ± 6.29
低氧	10	318.67 ± 21.63 *#	21.45 ± 5.36 *#
低温	10	326.57 ± 26.96 *#	22.09 ± 6.26 *#
低温低氧	10	286.25 ± 19.62 *	13.96 ± 7.14 *
F 值		16.39	7.96
P 值		<0.05	<0.05

与对照组比较:*$P<0.05$;与低温低氧组比较:#$P<0.05$

2.2 大鼠脂肪组织 HE 染色细胞形态及脂肪细胞面积比较 对照组大鼠脂肪组织内脂肪细胞面积较大呈不规则形状,可见大型脂滴;低氧组、低温组、低温低氧组大鼠脂肪组织内脂肪细胞面积减小且数量增多,其中低温低氧组细胞形态变化最为明显。另外,在低温低氧组大鼠肾周白色脂肪组织细胞可见有棕色化的趋势,见图 1~3。

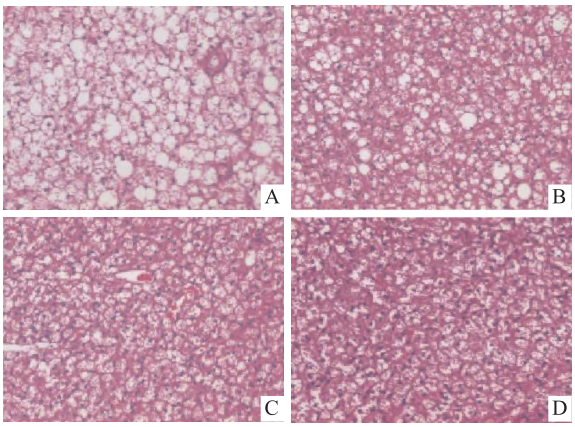

图 1 各组大鼠肩胛棕色脂肪组织细胞形态 HE 染色 ×200
A:对照组;B:低氧组;C:低温组;D:低温低氧组

2.3 大鼠脂肪组织 PPAR-γ2、PRDM16、UCP-1 基因表达 与对照组相比,低氧组、低温组、低温低氧组大鼠肩胛棕色脂肪组织 PPAR-γ2、PRDM16、UCP-1 基因表达均升高($F=378.495$、102.061、322.443,$P<0.05$),肾周白色脂肪组织 PPAR-γ2 基因表达降低($F=4.555$,$P<0.05$)、PRDM16、UCP-1 基因表达

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

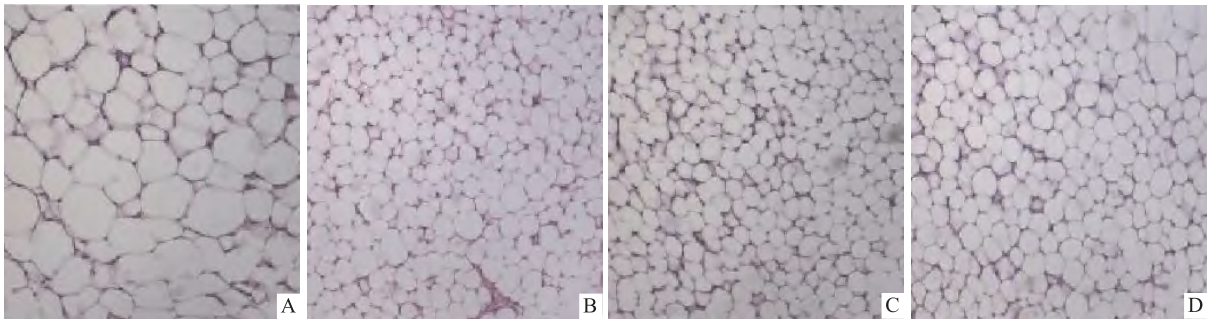

图 2 各组大鼠肾周白色脂肪组织细胞形态 HE 染色 ×200

A:对照组;B:低氧组;C:低温组;D:低温低氧组

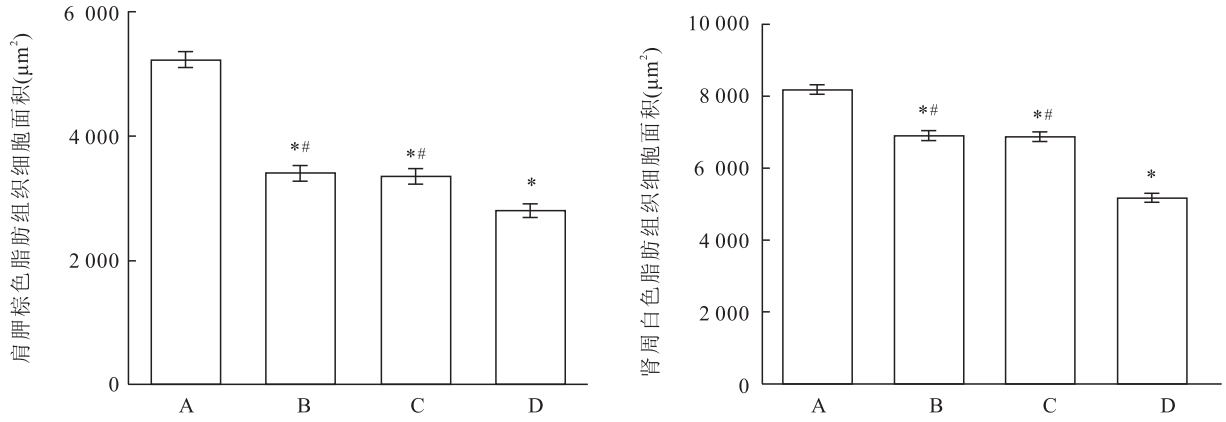

图 3 各组大鼠脂肪面积比较

A:对照组;B:低氧组;C:低温组;D:低温低氧组;与对照组比较:$^{*}P<0.05$;与低温低氧组比较:$^{\#}P<0.05$

均升高($F=24.387$、163.660,$P<0.05$)。与低温低氧组相比,低氧组、低温组大鼠肩胛棕色脂肪组织 PPAR-γ2、PRDM16、UCP-1 基因表达均更低;低氧组、低温组大鼠肾周白色组织 PPAR-γ2 基因表达更高,PRDM16、UCP-1 基因表达更低($P<0.05$)。见图 4、5。

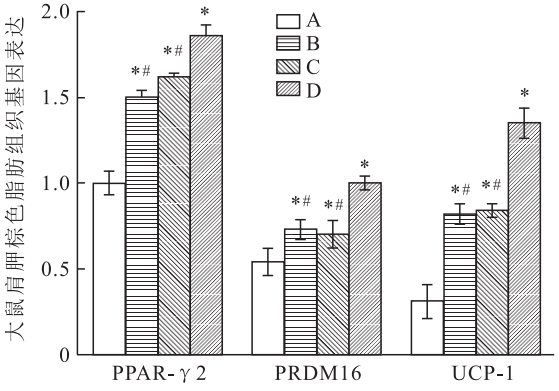

图 4 大鼠肩胛棕色脂肪组织 PPAR-γ2、PRDM16、UCP-1 基因表达

A:对照组;B:低氧组;C:低温组;D:低温低氧组;与对照组比较:$^{*}P<0.05$;与低温低氧组比较:$^{\#}P<0.05$

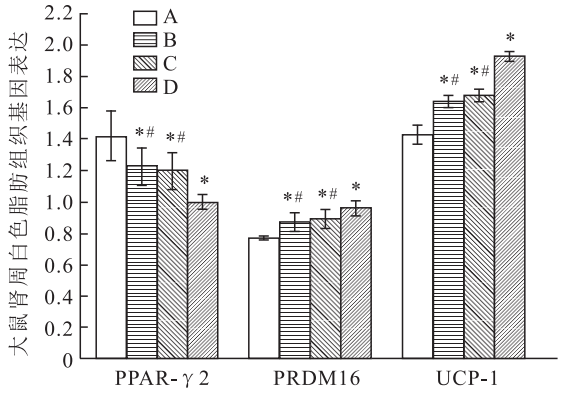

图 5 大鼠肾周白色脂肪组织 PPAR-γ2、PRDM16、UCP-1 基因表达

A:对照组;B:低氧组;C:低温组;D:低温低氧组;与对照组比较:$^{*}P<0.05$;与低温低氧组比较:$^{\#}P<0.05$

2.4 大鼠脂肪组织 UCP-1 蛋白表达 与对照组相比,低氧组、低温组、低温低氧组大鼠肩胛棕色脂肪组织与肾周白色脂肪组织 UCP-1 蛋白表达均升高($P<0.05$);与低温低氧组相比,低氧组、低温组大鼠肩胛棕色脂肪组织与肾周白色脂肪组织 UCP-1 蛋白表达均降低($P<0.05$),见图 6~10。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

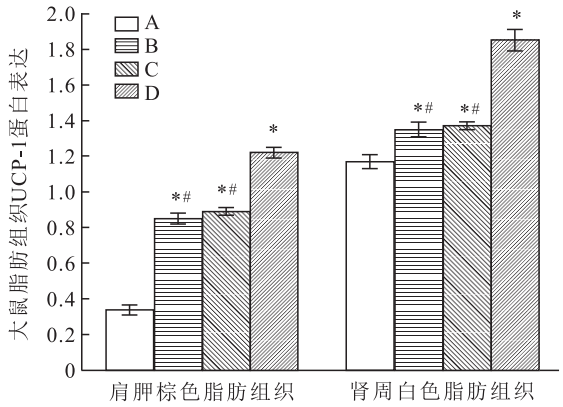

图6 大鼠脂肪组织 UCP-1 蛋白表达

A:对照组;B:低氧组;C:低温组;D:低温低氧组;与对照组比较:$^{*}P<0.05$;与低温低氧组比较:$^{\#}P<0.05$

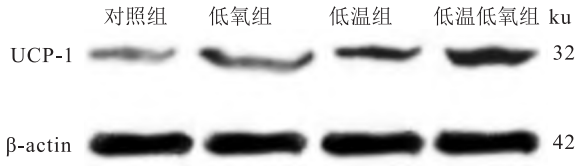

图7 大鼠肩胛棕色脂肪组织 UCP-1 蛋白表达

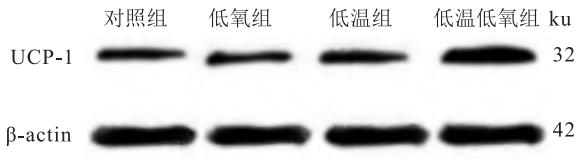

图8 大鼠肾周白色脂肪组织 UCP-1 蛋白表达

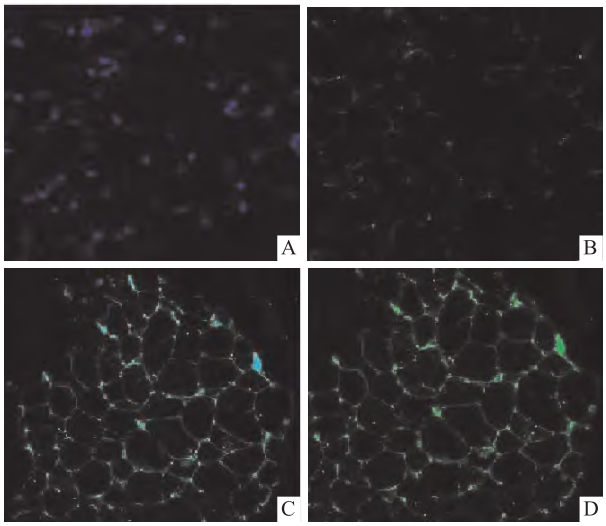

图9 大鼠肩胛棕色脂肪组织 UCP-1 免疫荧光染色

A:对照组;B:低氧组;C:低温组;D:低温低氧组;绿色荧光:UCP-1 蛋白;蓝色荧光:DAPI

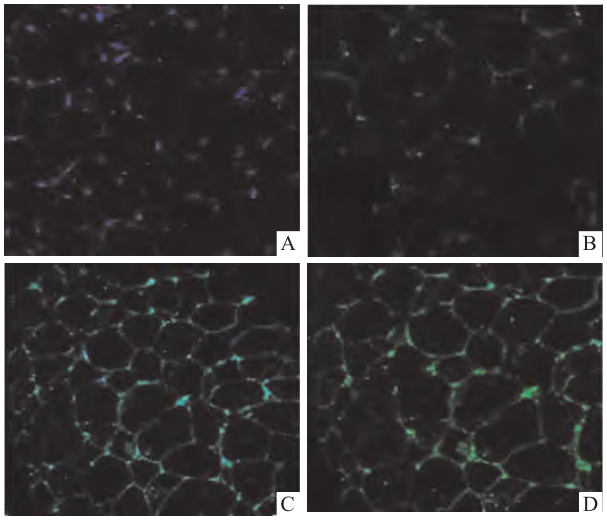

图10 大鼠肾周白色脂肪组织 UCP-1 免疫荧光染色

A:对照组;B:低氧组;C:低温组;D:低温低氧组;绿色荧光:UCP-1 蛋白;蓝色荧光:DAPI

3 讨论

肥胖是目前威胁人类健康的重大问题,对于如何减控体质量成为目前研究热点及难点。低氧环境下的体质量减轻是近年发现的一个新的生理现象。研究发现,世居高原的藏族群体除体质量较轻、体型较匀称外,经筛查该群体 EGLN1 基因和与脂代谢密切相关的 PPARA 基因表达也明显降低[5]。本研究通过高脂喂食构建肥胖大鼠模型,结果显示,与对照组相比,低氧组、低温组、低温低氧组大鼠体质量、体脂均降低,且低温低氧组大鼠体质量、体脂低于低氧组、低温组,探究了低氧/冷暴露对肥胖大鼠模型白色脂肪棕色化的影响机制。

对于短期的高山跋涉和低氧训练减重等机制的研究结果虽然不一致,但都显示出了短期低氧暴露对减重和脂代谢的促进作用。有研究报道高山跋涉[6]和低氧训练[7]过程中体质量降低主要由体脂率降低所致。国内格日力 等[8]的研究显示平原人暴露在海拔 3.5 km 以上高原环境后体质量将降低,且与常氧环境比较,自然高原环境和人工模拟氧暴露更易致体质量和体脂含量下降,减脂效果更好。有研究者通过免疫组化揭示了白色脂肪与棕色脂肪生理活动的差异,白色脂肪的主要功能是将体内多余的能量以三酰甘油的形式储存起来,可以消耗能量热,调节体温[9-10]。调控体内白色脂肪与棕色脂

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

肪的含量与比例可消耗机体多余的能量并促进局部甚或全身的脂肪消耗。与白色脂肪棕色化、棕色脂肪代谢主要相关的经典基因有脂形成基因 PPAR-γ2、解偶联蛋白 UCP-1、脂肪分化的辅激活基因 PRDM16 等。在脂肪组织内,基因 PRDM16 可与 PPAR-γ2 结合使 UCP1 高表达,观察特定环境下三种基因的不同表达,可推断出白色脂肪棕色化及棕色脂肪内脂代谢的动态变化过程。

PPAR-γ 是一种配体激活的转录因子,参与多种代谢过程中的基因调控,PPAR-γ 活化能增加胰岛素敏感脂肪细胞数量,促进线粒体生成,增加 UCP-1 表达,在脂肪组织分化中起着重要作用[11-13]。UCP-1 是棕色脂肪组织发挥产热活性最重要的分子。UCP-1 对机体维持体温非常重要,尤其是在啮齿类动物、新生儿和成年人群体,且其水平与肥胖相关的产热功能密切相关,是棕色脂肪细胞形成和活性评价的一个重要指标[14-15]。PRDM16 可看作是棕色脂肪分化的辅激活因子,可调控 PPARα、CtBP、PGC-1α、PPAR-γ 等的转录活性,诱导棕色脂肪特有基因的表达,同时使白色脂肪的基因关闭。PPAR-γ 是 PRDM16 的受体,一些人体研究[16]显示,人体白色脂肪分化为棕色脂肪主要依赖 PRDM16。PRDM16 的表达又会促进白色脂肪中 UCP1 的表达,即白色脂肪棕色化,从而促进向棕色脂肪的分化[17]。所以 PRDM16 通过调控 PPAR-γ 并激活相关转录功能可刺激棕色脂肪细胞的形成,在促进脂肪细胞分化过程中发挥重要作用。

该研究显示短期低氧或寒冷环境下肥胖小鼠体脂率均降低,白色脂肪组织中的基因 PPAR-γ2 表达下调、PRDM16 与 UCP-1 表达上调,考虑为低氧或寒冷可能促进了 PPAR-γ2 与 PRDM16 的结合,并抑制了前体细胞向白色脂肪细胞的转化。在棕色脂肪组织中 PPAR-γ2 与 PRDM16 的表达上调,而 UCP-1 表达上调差异更显著,表明棕色脂肪细胞形成明显增加,棕色脂肪组织代谢加快,产热活性加大,低氧/冷暴露环境加深加快了这一过程。

综上所述,低氧/冷暴露可通过调控脂肪内 PPAR-γ2、PRDM16 通路使 UCP-1 高表达,诱导白色脂肪棕色化并影响大鼠体质量。

参考文献

[1] 郝唯蔚,徐世侠,胡婷婷. 年龄与代谢综合征的关系及防治对策[J]. 解放军保健医学杂志,2007(1):21-3.

[2] Diaf M, Benchikh H, Bennour I, et al. The relationship between body mass index, blood pressure, and atherosclerosis risk factors in type 1 and 2 diabetic patients from northwestern Algeria[J]. Endocr Regul,2022,56(3):190-200.

[3] Cheng L, Wang J, An Y, et al. Mulberry leaf activates brown adipose tissue and induces browning of inguinal white adipose tissue in type 2 diabetic rats through regulating amp-activated protein kinase signalling pathway[J]. Br J Nutr,2022,127(6):810-22.

[4] 何 婷,杨历新,王 叶,等. 低氧/冷暴露对肥胖大鼠白色脂肪中 UCP-1 表达的影响[J]. 贵州医药,2019,43(12):1851-3.

[5] Sen P, Qadri S, Luukkonen P K, et al. Exposure to environmental contaminants is associated with altered hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Hepatol,2022,76(2):283-93.

[6] Szymczak R K, Grzywacz T, Ziemann E, et al. Prolonged sojourn at very high altitude decreases sea-level anaerobic performance, anaerobic threshold, and fat mass[J]. Front Physiol,2021,12:743535.

[7] Guardado I M, Ureña B S, Cardenosa A C, et al. Effects of strength training under hypoxic conditions on muscle performance, body composition and haematological variables[J]. Biol Sport,2020,37(2):121-9.

[8] 格日力, 吴 德,杨辉惶, 等. 平原人急进暴露高海拔地区导致体重下降[J]. 生理学报, 2010(6):541-6.

[9] Bauters D, Cobbaut M, Geys L, et al. Loss of ADAMTS5 enhances brown adipose tissue mass and promotes browning of white adipose tissue *via* CREB signaling[J]. Mol Metab,2017,6(7):715-24.

[10] Leu S Y, Tsai Y C, Chen W C, et al. Raspberry ketone induces brown-like adipocyte formation through suppression of autophagy in adipocytes and adipose tissue[J]. J Nutr Biochem,2018,56:116-25.

[11] Razzoli M, Emmett M J, Lazar M A, et al. β-Adrenergic receptors control brown adipose UCP-1 tone and cold response without affecting its circadian rhythmicity[J]. FASEB J,2018,32(10):5640-6.

[12] Castro É, Vieira T S, Oliveira T E, et al. Adipocyte-specific mTORC2 deficiency impairs BAT and iWAT thermogenic capacity without affecting glucose uptake and energy expenditure in cold-acclimated mice[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2021, 321(5):E592-605.

[13] Scheel A K, Espelage L, Chadt A. Many ways to rome: exercise, cold exposure and diet-do they all affect BAT Activation and WAT browning in the same manner? [J]. Int J Mol Sci,2022,23(9):4759.

[14] Kagawa Y, Ozaki-Masuzawa Y, Hosono T, et al. Garlic oil suppresses high-fat diet induced obesity in rats through the upregulation of UCP-1 and the enhancement of energyn expenditure[J]. Exp Ther Med,2020,19(2):1536-40.

[15] Xu Y, Yu T, Ma G, et al. Berberine modulates deacetylation of PPARγ to promote adipose tissue remodeling and thermogenesis *via* AMPK/SIRT1 pathway[J]. Int J Biol Sci,2021,17(12):3173-

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

87.

[16] Wang Q, Li H, Tajima K, et al. Post-translational control of beige fat biogenesis by PRDM16 stabilization [J]. Nature, 2022, 609 (7925):151 - 8.

[17] Seo Y J, Kim K J, Choi J, et al. Spirulina maxima extract reduces obesity through suppression of adipogenesis and activation of browning in 3T3-L1 cells and high-fat diet-induced obese mice [J]. Nutrients, 2018, 10(6):712.

Effect of hypoxia/cold exposure on white fat browning in a rat model of obesity

Gao Kun, Yang Lixin, Wang Ye, Xu Haiqi

(*Dept of Endocrinology, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining* 810007)

Abstract ***Objective*** To investigate the effect of hypoxia/cold exposure on white fat browning in an obese rat model. ***Methods*** Obese rat model was constructed by high-fat feeding and randomly divided into control group, hypoxic group, low-temperature group and low-temperature hypoxic group, with 10 rats in each group. The changes of body weight and body fat were observed, and the morphological changes of rat adipose tissue cells were observed using HE staining and compared with the area of adipocytes. The expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ2 (PPAR-γ2), PR structural domain binding factor 16 (PRDM16) and uncoupling protein 1 (UCP-1) gene and the expression of UCP-1 protein in the adipose tissue of rats were examined by immunofluorescence, real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot. ***Results*** Compared with the control group, the body weight and body fat of rats in the hypoxic, hypothermic and cryogenic hypoxic groups were reduced, and the body weight and body fat of rats in the hypothermic hypoxic group were lower than those in the hypoxic and cryogenic groups ($P < 0.05$). Compared with the control group, the adipocyte area of rats in the hypoxia, hypothermia and low-temperature hypoxia groups was reduced, and the adipocyte area of rats in the low-temperature hypoxia group was lower than that in the hypoxia and low-temperature groups ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of PPAR-γ2, PRDM16 and UCP-1 genes all increased in the scapular brown adipose tissue ($F = 378.495$, 102.061, 322.443, $P < 0.05$) and decreased in the perirenal white adipose tissue ($F = 4.555$, $P < 0.05$) in the hypoxic, hypothermic and low-temperature hypoxic groups of rats, PRDM16 and UCP-1 gene expression all increased ($F = 24.387$, 163.660, $P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of UCP-1 protein in scapular brown adipose tissue and perirenal white adipose tissue of rats in the hypoxic, hypothermic and low-temperature hypoxic groups increased ($P < 0.05$); UCP-1 protein expression was lower in scapular brown adipose tissue and perirenal white adipose tissue of rats in the hypoxic and hypothermic groups compared to the hypothermic hypoxic group ($P < 0.05$). ***Conclusion*** Hypoxia/cold exposure can induce white adipose browning and affect the body weight of rats by modulating the intra-adipose PPAR-γ2 and PRDM16 pathways which lead to high UCP-1 expression.

Key words hypoxia; cold exposure; peroxisome proliferator-activated receptor γ2; PR structural domain binding factor; uncoupling protein 1

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net