

中药复方制剂结合运动对肥胖小鼠自噬的降脂机制研究

李丽艳

洛阳师范学院体育学院

DOI:10.12238/fcmr.v7i1.12523

[摘要] 目的: 探讨中药配合运动减肥的作用机制。方法: 健康C57BL/6雄性小鼠采用高脂饮食,建立肥胖小鼠模型。将小鼠随机分为正常对照组(PFD组)、肥胖模型组(HHC组)、肥胖症运动组(ENC组)和肥胖症中药组(YNC组)。YNC组灌胃6G/(kg·d)中药,ENC组进行中等强度连续平板运动。8周后,测定血清TG、TC、HDL、HL和LPL水平。用蛋白质印迹法检测肝组织中pAMPK/AMPK、pULK1/ULK1、pAkt/Akt、pmTOR/mTOR、LC II/I、p62的蛋白表达水平。结论: 运动与中药配合可改善肥胖小鼠的脂质代谢及氧化应激相关指标。运动可激活AMPK/ULK1通路,中药可通过抑制PI3K/AKT/mTOR通路激活自噬并调节脂质代谢紊乱。

[关键词] 运动; 肥胖; 中药; 自噬

中图分类号: R28 文献标识码: A

Study on the lipid-lowering mechanism of traditional Chinese medicine compound preparation combined with exercise on autophagy in obese mice

Liyan Li

School of Physical Education, Luoyang Normal College

[Abstract] Objective: Explore the mechanism of traditional Chinese medicine combined with exercise for weight loss. Method: Healthy C57BL/6 male mice were fed a high-fat diet to establish an obese mouse model. The mice were randomly divided into a normal control group (PFD group), an obesity model group (HHC group), an obesity exercise group (ENC group), and an obesity traditional Chinese medicine group (YNC group). The YNC group received 6G/(kg·d) of traditional Chinese medicine orally, while the ENC group underwent moderate intensity continuous flat exercise. After 8 weeks, serum levels of TG, TC, HDL, HL, and LPL were measured. Use Western blot to detect the protein expression levels of pAMPK/AMPK, pULK1/ULK1, pAkt/Akt, pmTOR/mTOR, LCII/I, and p62 in liver tissue. Conclusion: The combination of exercise and traditional Chinese medicine can improve lipid metabolism and oxidative stress related indicators in obese mice. Exercise can activate the AMPK/ULK1 pathway, while traditional Chinese medicine can activate autophagy and regulate lipid metabolism disorders by inhibiting the PI3K/AKT/mTOR pathway.

[Key words] sports; Obesity; Traditional Chinese Medicine; autophagy

自噬是一种细胞回收机制,负责降解处理有毒蛋白质聚集体和衰老细胞器。运动会引起功能性自噬,诱导自噬蛋白增加。自噬激活可以增强机体耐力,改善葡萄糖代谢和脂质稳态。自噬缺陷的Bcl2^{AAA}突变小鼠更容易受到高脂饮食(HFD)诱导的肥胖影响。而运动通过自噬介导调节脂代谢紊乱的潜在机制还需进一步探索。

中药复方制剂可以通过降低能量摄入、抑制脂肪的合成和存储、促进体内能量消耗等方面减肥和降低体脂。中药荷术丹苓方健脾祛湿化痰,可明显改善肥胖者症状,又能调脂,临床取得较好的疗效。机体调节自噬的主要信号通路包括AMP激活蛋白

激酶(AMPK)、雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、和sirtuin(SIRT)通路。在生物体内,活化的AMPK可以磷酸化ULK1进而激活自噬通路。生长因子响应激酶mTOR调节许多控制生长的过程,包括蛋白质合成、自噬和脂肪生成。磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)/mTOR信号通路与细胞的自噬功能相关。本研究以高脂饮食喂养建立肥胖小鼠模型,通过中药和运动干预措施,检测AMPK/ULK1和PI3K/Akt/mTOR自噬通路相关蛋白的变化,探讨中药和运动对脂代谢的影响,为中药和运动治疗肥胖的临床研究提供一定的理论依据和实验数据。

1 实验动物和方法

健康c57bl/6雄鼠SPF级, 4-6周龄, 体重14-16g, 购自维通利华动物技术有限公司, 证书号125000800288957。经过一周的适应性喂养后, 小鼠被分为正常饮食组(LT, n=6)和高脂肪饮食组(HT, n=25)。高脂肪饮食的比例为(48%脂肪, 22%蛋白质, 30%碳水化合物)。饲养环境为室温18~26℃, 湿度45%±10%, 光照12h/D, 免费饮水。第8周末, HT组体重超过LT组20%者判定为肥胖小鼠。

小鼠分为正常对照组(PFD组, n=6)、肥胖模型组(HHC组, n=6)、肥胖运动组(ENC组, n=6)和肥胖中药组(YNC组, n=6)。ENC组小鼠采用有氧耐力平板运动干预8周。正式运动阶段, 小鼠进行有氧耐力运动, 跑步速度为60%-80%V02max强度, 60min/次。将中药液用乙醇或水回流, 所得液体混合、过滤、离心, 得到精制液, 用旋转蒸发器浓缩至1g/ml的浓度, 然后灌装灭菌。YNC组小鼠灌胃中药溶液6G/(kg·d), 灌胃8周。PFD组、HHC组和ENC组分别用等体积生理盐水灌注。

荷丹苓方用药依据: 荷丹苓方成人剂量包括荷叶15克、黄芪15克、茯苓20克、山楂10克、绞股蓝10克。YNC组小鼠按6g/(kg·d)的中剂量灌胃中药溶液, 持续8周。在最后一次运动和灌胃后, 小鼠禁食24小时, 然后称重并通过腹膜内注射4ml/kg戊巴比妥麻醉。从小鼠的主动脉中取血, 并称重肾周和附睾脂肪垫的重量。

1.1 实验试剂

TC检测盒(产品编号: a111-1-1)、TG检测盒(商品编号: a113-1-3)、HDL检测盒(产品编号: a112-1-1)、总脂肪酶检测盒(货编号: a067-1)购自南京建诚生物有限公司; 抗mTOR抗体(编号ab109268)、抗AMPK α 1抗体(编号: ab32047)、p-ULK1(s555)(编号5869t)、1c3a/b(编号12741t)、p62抗体(编号ab109012)、抗mTOR抗体(编号ab134903)、HRP绵羊抗兔IgG购自博德生物股份有限公司; AMPK α 2(磷酸t172)抗体(编号: ab133448)、抗kt1(磷酸473)抗体(名称: ab81283)和抗kt1抗体(编号为: bm1612)购自Abcam; SDS-PAGE凝胶制备试剂盒购自京彩生物股份有限公司; BCA蛋白定量试剂盒购自诺沃赞生物有限公司。

2 实验测试

2.1 Lee's指数的确定

用3%水合氯醛麻醉小鼠, 固定后四肢完全伸展。准确测量小鼠从鼻子到尾巴的长度, 即身体长度。公式: Lee's指数=体重(g)^{1/3}/体长(mm)。

2.2 血脂指标和总脂肪酶检测

采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血脂指标, 严格按照ELISA检测程序检测TC、TG和HDL。总脂肪酶的测定采用ELISA法测定肝脂酶和脂蛋白脂肪酶。

2.3 蛋白质印迹试验

首先称量蛋白质样品, 在4℃下离心, 弃上清液。然后根据组织重量加入裂解物, 用超声波研磨机粉碎, BCA试剂盒测定蛋白质浓度。再制备浓缩凝胶和分离凝胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。蛋白质经过恒压电泳分离后, 转到预先经过甲醇激活的

PVDF膜上。然后将第一抗体(pAMPK稀释比1:5000, AMPK稀释比1:3000, pmTOR稀释比1:500, mTOR稀释比1:10000, pULK1稀释比1:1000)在4℃下孵育过夜。用辣根过氧化物酶标记二抗, 用ECL化学发光法洗涤和显影膜, 并进行分析和扫描。

3 数据处理

实验数据采用SPSS 20.0统计软件进行分析。数据以平均值±标准差(mean±SD)表示, 通过单因素方差分析比较多组之间的平均值。P<0.05被视为具有统计学意义的差异。

4 结果和分析

4.1 各组小鼠身体成分的变化

表1 运动和中药对附睾、肾周脂肪垫和Lee's指数的影响

分组	附睾和肾周脂肪垫	Lee's指数
PFD	0.49±0.16	331.46±10.85
HHC	2.32±0.15**	349.37±10.26**
ENC	0.94±0.16**	329.68±9.59**
YNC	1.06±0.17**	330.12±6.96**

注: 代表组与PFD组之间存在显著差异, #p<0.05, ##p<0.01; 与HHC组相比有显著性差异, *p<0.05, **表示p<0.01。

高脂饲料喂养8周, 肥胖小鼠建模成功后分组, 开始进行中药和运动的干预实验。运动和中药干预后, 每周称一次小鼠体重。结果发现, 从第二周开始, 与PFD组相比HHC组小鼠体重持续上升(P<0.05)。小鼠在经过8周中药和运动干预之后, ENC组和YNC组小鼠与HHC组相比体重增加量减慢, 并且ENC组和YNC组小鼠体重与HHC组比较均存在显著性差异(P<0.05)。研究结果表明运动和中药可显著减少高脂饮食引起的体重增加。

与PFD组比较, HHC组小鼠附睾和肾周脂肪垫重量增加, Lee's指数增加, 有显著性差异(P<0.01)。与HHC组比较, ENC组和YNC组小鼠附睾和肾周脂肪垫重量减少, Lee's指数减少, 有显著性差异(P<0.01)。结果表明运动和中药可以通过减低内脏的脂肪量降低体重。

表2 各组血清TC、TG、HDL、LPL、HL浓度变化对比

分组	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL(mmol/L)	LPL(U/mL)	HL(U/mL)
PFD	25.93±4.01	8.63±1.69	5.58±1.8	10.52±2.03	7.11±1.77
HHC	70.71±8.37**	23.67±3.7**	1.55±0.76**	5.66±0.57**	3.04±0.87**
ENC	50.34±3.78**	14.47±3.01**	3.95±1.81**	9.6±0.06**	6.12±0.46**
YNC	48.14±6.05**	12.47±1.81**	4.3±1.79**	9.19±0.91**	6.04±0.81**

注: 代表与PFD组比较有显著性差异, #p<0.05, ##代表P<0.01; 代表与HHC组比较有显著性差异, *P<0.05, **代表P<0.01。

4.2 各组小鼠血脂、肝脂酶和脂蛋白脂酶的变化

与PFD组相比, HHC组TC和TG显著升高, HDL显著降低(p<0.01)。与HHC组相比, ENC和YNC组的TC和TG显著降低, HDL显著升高(p<

0.01)。与PFD组相比,HHC组HL和LPL活性显著降低($p<0.01$ 或 $p<0.05$)。与HHC组相比,enc组和YNC组的HL和LPL活性显著升高($p<0.01$ 或 $p<0.05$)。

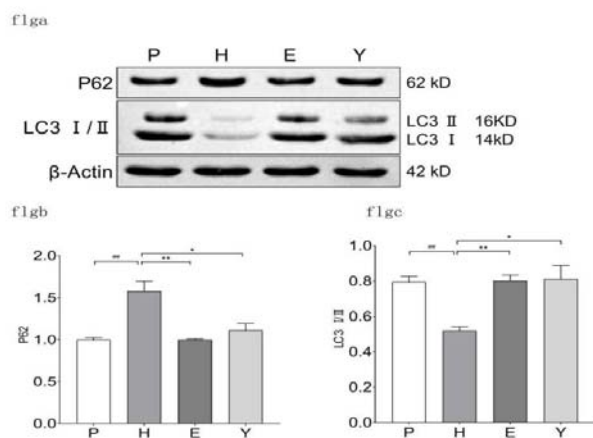


图1 运动和中药对自噬标志物蛋白p62和LC3II/LC3I比值的影响

注:P代表PFD组,H代表HHC组,E代表ENC组,Y代表YNC组。PFD组与 $\#p<0.05$ 、 $\#p<0.01$ 之间存在显著差异;与HHC组相比有显著性差异,* $p<0.05$,**表示 $p<0.01$ 。

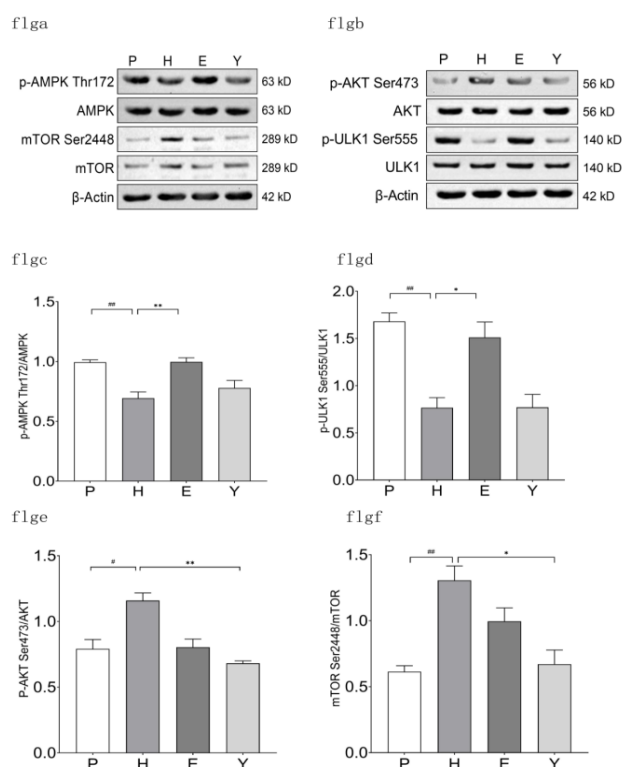


图2 运动和中药对自噬途径蛋白pAMPK/AMPK、pmTOR/mTOR、pULK1/ULK1和pAKT/AKT的影响

注:P代表PFD组,H代表HHC组,E代表ENC组,Y代表YNC组。PFD组与 $\#p<0.05$ 、 $\#p<0.01$ 之间存在显著差异;表示与HHC组相比存在显著差异,* $p<0.05$,**表示 $p<0.01$ 。

4.3自噬途径标志蛋白LC3 II/LC3 I和p62表达的变化

Western blot结果显示,与PFD组相比,HHC组的p62显著增加,LC3 II/LC3 I比值显著降低($p<0.01$)。与HHC组相比,ENC和YNC组的p62显著下降,LC3 II/LC3 I比值显著升高($p<0.01$ 或 $p<0.05$)。结果表明,肥胖小鼠的自噬活性降低,而运动和中药增加了肥胖小鼠的自体吞噬活性。

4.4自噬途径对AMPK/ULK1和AKT/mTOR蛋白表达的影响

Western blot结果显示,与PFD组相比,HHC组的pAMPK/AMPK和pULK1/ULK1显著降低($p<0.01$ 或 $p<0.05$)。与HHC组相比,ENC组的pAMPK/AMPK和pULK1/ULK1显著增加($p<0.01$ 或 $p<0.05$)。与HHC组相比,YNC组pAMPK/AMPK和pULK1/ULK1增加,但无显著差异。与PFD组相比,HHC组的pAKT/AKT和pmTOR/mTOR显著增加($p<0.01$ 或 $p<0.05$)。与HHC组相比,YNC组的pAKT/AKT和pmTOR/mTOR显著降低($p<0.01$ 或 $p<0.05$)。与HHC组相比,ENC组的pAKT/AKT和pmTOR/mTOR降低,差异不显著。实验结果表明,运动促进了AMPK/ULK1通路蛋白的活性和自噬。中药可以通过抑制AKT/mTOR通路蛋白的活性来促进自噬。

5 讨论

5.1运动增强HL和LPL的活性,改善脂质代谢

在本实验中,经过8周的有氧耐力运动后,肥胖小鼠的体重显著下降,肾周和附睾脂肪垫的重量下降,表明有氧耐力锻炼可以减轻体重,降低内脏脂肪含量,改善身体的代谢状态。运动组与肥胖组相比TC和TG降低,HDL升高,LPL和HL升高。有研究表明,中等强度的运动可以通过增加载脂蛋白A5 α 和肝脏X受体 α 蛋白的表达来提高HL和LPL的活性,并上调PPAR,从而达到降脂作用^[1]。这与本研究的结果一致,有氧运动可以提高LPL和HL,调节和改善脂质代谢紊乱。

5.2运动通过AMPK/ULK1通路,增强自噬活性

LC3以无活性形式游离于胞质中,首先被蛋白酶Atg4裂解产生LC3-I,随后与磷脂酰乙醇胺结合,LC3-I转化为LC3-II形式,附着在吞噬细胞膜的一侧。LC3II/LC3I常被用作反应自噬活性的检测指标^[2]。P62是LC3-II底物特异性受体,自噬过程中P62蛋白数量不断减少,P62与细胞自噬活性呈负相关。本实验中肥胖组与普通组相比,LC3II/LC3I降低,P62升高,表明高脂饮食抑制自噬活性。运动组比肥胖组LC3II/LC3I升高,P62降低,表明运动逆增加因肥胖导致的自噬活性降低。

运动期间细胞ROS和NAD⁺的增加会导致AMPK激活,进而激活自噬机制。AMPKThr-172可以在运动过程中通过在Ser-555上直接磷酸化ULK1来激活它。研究表明,单次急性运动会增加野生型小鼠骨骼肌中的自噬活性,但不会增加AMPK α 2-/-小鼠的自噬活性。因为运动后自噬活性增加是由AMPK α 2与sestrins2和3的关联增加而引起的^[3]。本实验中肥胖组AMPKThr-172/AMPK、ULK1ser555/ULK1比普通组低,说明高脂饮食抑制了AMPK/ULK1通路,降低了ULK1的磷酸化。运动组与肥胖组相比,AMPKThr-172/AMPK升高、ULK1ser555/ULK1升高、LC3II/LC3I升高、P62降低,表明运动通过激活AMPK/ULK1通路,使ULK1磷酸化增加,

增强了自噬活性。运动可以通过自噬介导防治HFD诱导的脂代谢紊乱。

5.3 中药升高LPL、HL降低血脂

中药配方的多草药制剂可以实现协同效应,降低单一植物化学物质的毒性,药物配方中的多样性,可同时作用于多靶点,达到祛病的目的。中药荷术丹苓方包括荷叶、黄芪、茯苓、绞股蓝、山楂五味中药。荷叶碱可激活PGC1 α /PPAR α 通路,引起参与脂肪酸氧化的Acox1和Fgf21上调,改善肥胖小鼠的脂质分布^[4]。黄芪甲苷可通过降低脂肪细胞Toll-like信号通路中TLR4、MyD88、TRAF6的表达而达到降低血脂的作用^[5]。研究显示茯苓多糖可以显著升高肥胖大鼠肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性,显著降低丙二醛含量,提高细胞的抗氧化能力^[6]。中药影响血脂代谢的因素和信号通路比较复杂,调节脂代谢紊乱的潜在机制仍有待于进一步深入研究。

本实验中中药组与肥胖组相比,TG、TC降低,HDL升高,LPL、HL升高,表明中药可以通过升高LPL和HL的活性,促进TG和TC的代谢,调节脂代谢紊乱。

5.4 中药通过抑制PI3K/Akt/mTOR,促进自噬活性

本实验中药物组比肥胖组LC3II/LC3I比率升高,P62降低,表明中药增加自噬标记物的含量,细胞自噬活性增加。激酶mTOR是自噬的主要负调节因子,接收来自不同信号转导途径的信号。PI3K是一种广泛分布于细胞质中的磷脂酰肌醇激酶,可以被多种细胞外信号激活,如激素、生长因子和细胞因子,从而将磷脂酰肌醇4,5-二磷酸转化为磷脂酰肌醇3,4,5-三磷酸,该磷脂酰肌醇与AktN端的PH结构域结合。Akt最终通过从细胞膜附近转移到细胞质而被激活。m-TOR作为PI3K/Akt的关键下游信号,在磷酸化后被激活^[7]。

本实验中,药物组比肥胖组pAKT/AKT降低,pmTOR/mTOR降低、LC3II/LC3I升高、P62降低,表明中药通过抑制AKT磷酸化,抑制mTOR活性,上调自噬标记物表达水平,激活自噬,减轻细胞脂质累积和损伤。

6 结论

此次研究中运动和中药都可以升高总脂酶,改善肥胖大鼠的脂代谢和氧化应激相应指标。实验还进一步表明了运动可能

通过激活AMPK/ULK1通路,而中药可能通过抑制PI3K/AKT/mTOR通路来增强自噬活性,从而减少细胞脂质沉积及TC含量,调节脂代谢紊乱。这些结果为中药和运动减肥的临床应用提供了参考。

[基金项目]

河南省科技攻关项目资助,项目编号:202102310919。

[参考文献]

[1]Kwon SM,Park HG,Jun JK,etal. Exercise,but not quercetin,ameliorates inflammation,mitochondrial biogenesis,and lipid metabolism in skeletal muscle after strenuous exercise by high-fat diet mice[J].J Exerc Nutrition Bio-chem,2014,18(1):51-60.

[2]阮凌,王光华,吴荣平,等.运动强度与高脂饮食模型大鼠脂代谢紊乱和氧化应激的相关性[J].中国组织工程研究,2023,(8):1149-1155.

[3]Ro SH,Semple IA,Park H,etal.Sestrin2 promotes Unc-51-like kinase 1 mediated phosphorylation of p62/sequestosome-1[J].FEBS J,2014,281:3816-3827.

[4]ZHANG C,DENG J,LIU D,etal.Nuciferine ameliorates hepatic steatosis in high-fat diet / streptozocin-induced diabetic mice through a PPAR α /PPAR γ coactivator-1 α pathway[J].Brit J Pharmacol,2018,175(22):4218-4228.

[5]杨柳,熊小平,马国斌,等.黄芪甲苷通过Toll-like受体通路对Hep G2高脂细胞脂质积累的抑制作用[J].中国现代药物应用,2022,22(16):184-188.

[6]姜悦航,张越,王妍妍,等.茯苓多糖提取物调控CYP2E1及NF-KB炎症通路改善小鼠酒精性肝病[J].中国中药杂志,2022,47(1):2022-2029.

[7]Wang B.-j.,Zheng W.-l.,Feng N.-n.,etal.The Effects of Autophagy and PI3K/ AKT/m-TOR Signaling Pathway on the Cell-Cycle Arrest of Rats Primary Sertoli Cells Induced byZearale none[J].Toxins,2018,10:(10):398-401.

作者简介:

李丽艳(1973--),女,汉族,河南省洛阳人,硕士研究生,讲师,研究方向:运动营养。