

· 实验研究 ·

电针对中枢 *Stat5* 敲除所致肥胖小鼠瘦素水平和下丘脑 *Kctd15*、*Sh2b1* mRNA 的影响

洪浩, 卢圣锋, 傅淑平, 偶晨, 朱冰梅* (南京中医药大学第二临床医学院, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 观察电针对中枢 *Stat5* 条件性敲除 *Stat5* Nestin-Cre (*Stat5*NKO)肥胖小鼠下丘脑 *Kctd15*、*Sh2b1* 基因表达的影响。方法 20 只肥胖的 *Stat5*NKO 小鼠随机分为肥胖组和电针组, 每组 10 只; 10 只 *Stat5**fl/fl* 小鼠作为正常组。其中电针组选取单侧后三里、内庭穴进行针刺治疗, 每日 1 次, 双侧交替进行, 每次 30 min, 韩氏电针仪频率 2/15 Hz, 疏密波, 6 d 为 1 个疗程, 共治疗 4 个疗程。运用 ELISA 法检测血清中瘦素(Leptin)含量, qPCR 技术检测下丘脑中肥胖相关基因 *Kctd15*、*Sh2b1* mRNA 的表达。结果 与正常组小鼠比较, 肥胖组小鼠体质量明显增加($P<0.01$)伴随血清 Leptin 含量升高($P<0.05$), 下丘脑 Leptin 水平下降($P<0.05$), 同时下丘脑 *Kctd15*、*Sh2b1* mRNA 表达下调($P<0.05\sim0.01$); 与肥胖组小鼠比较, 电针组小鼠的体质量明显下降($P<0.01$), 血清 Leptin 含量降低($P<0.01$), 且下丘脑 Leptin 水平回升($P<0.01$), *Kctd15*、*Sh2b1* mRNA 表达水平上调($P<0.01$)。结论 电针可能通过调节 Leptin 水平并促进 *Kctd15*、*Sh2b1* 表达, 实现对 *Stat5*NKO 小鼠的减肥效应。

关键词:肥胖; 电针; 瘦素; *Kctd15*; *Sh2b1*

中图分类号: R245 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2016)01-0035-03

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2016.0035

Effects of Electro-acupuncture on Serum Leptin Content and Expression of *Kctd15* and *Sh2b1* mRNA in Hypothalamus in *Stat5*-knockout Induced Obese Mice

HONG Hao, LU Sheng-feng, FU Shu-ping, OU Chen, ZHU Bing-mei*

(The Second Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effect of electro-acupuncture on central conditional knockout *Stat5* Nestin-Cre obese mice (*Stat5*NKO) and detect how the obesity related genes, *Kctd15* and *Sh2b1*, are involved. **METHODS** 20 obese *Stat5*NKO mice were randomly divided into two groups: obese model group ($n=10$) and electro-acupuncture (EA) group ($n=10$); 10 *Stat5**fl/fl* mice were randomly selected and fed with ordinary forage as normal control group. EA group was treated with electro-acupuncture at Housanli and Neiting points for 30 min, with bilateral alternates, by Han' electro-acupuncture apparatus at 2/15 Hz. 6 d was a period of treatment, with a total of 4 courses of treatment. Serum Leptin content was measured by ELISA, and the levels of *Sh2b1* and *Kctd15* mRNA in hypothalamus were detected by qPCR. **RESULTS** Compared with *Stat5**fl/fl* mice, *Stat5*NKO mice gained body weight significantly ($P<0.01$), accompanied with increased serum Leptin level ($P<0.05$), decreased hypothalamic Leptin level ($P<0.05$), as well as *Kctd15* and *Sh2b1* mRNA expressions ($P<0.05\sim0.01$); Compared with *Stat5*NKO mice, EA group decreased body weight ($P<0.01$) and serum Leptin mRNA level ($P<0.01$). The hypothalamic Leptin level was elevated ($P<0.01$), and the expressions of *Kctd15* and *Sh2b1* mRNA were returned to normal level ($P<0.01$). **CONCLUSION** The weight-loss effect of electro-acupuncture on *Stat5*NKO obese mice may be related to the regulation of the expression of Leptin, *Kctd15* and *Sh2b1*.

KEY WORDS: obesity; electro-acupuncture; Leptin; *Kctd15*; *Sh2b1*

针刺减肥作用已经得到医学界广泛认可, 涉及多种机制, 然而它是通过何种关键途径来发挥作用, 至今尚未有定论^[1]。目前公认机体能量代谢平衡紊乱是肥胖最主要原因, 当能量摄取超过能量消耗时, 多余的能量便贮存于脂肪组织, 导致肥胖形成。中

枢神经系统, 特别是下丘脑的弓状核、室旁核、腹内侧核、背内侧核和外侧区等组成饮食和能量代谢的网状环路, 共同完成对摄食行为的调节。上述脑区特定神经元内的瘦素(Leptin)受体可以与穿过血脑屏障的瘦素结合, 激活下游信号转导通路, 发挥抑制

收稿日期: 2015-09-12; 修稿日期: 2015-11-18

基金项目: 国家自然科学基金(81273838); 高等学校博士学科点专项科研基金(20123237110001); 江苏省教育厅重大项目(11KJA360003)

作者简介: 洪浩(1987-), 女, 安徽庐江人, 南京中医药大学 2013 级博士研究生。* 通信作者: zhubm64@hotmail.com

食欲、促进能量消耗的作用^[2],从而参与机体能量代谢平衡的调控。为进一步从分子水平探讨针刺减肥起效的中枢作用机制,我们以 *Stat5*NKO 肥胖小鼠为肥胖模型进行了以下实验。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及分组 *Stat5*NKO 肥胖小鼠由美国国立卫生研究院(NIH)Dr.Henninghausen 实验室惠赠并在南京中医药大学实验动物中心繁殖,20 只 *Stat5*NKO 肥胖小鼠随机分为模型组(肥胖组)和模型+电针组(电针组),每组 10 只;10 只 *Stat5**fl/fl* 小鼠作为正常对照组(正常组)。

1.1.2 主要仪器与试剂 全自动酶标仪(BioTek),紫外可见分光光度计(德国 Eppendorf BioPhotometer),基因扩增仪 MJ-mini(BIO-RAD 公司),实时荧光定量 PCR 仪(MX3000P,Stratagene 公司),Trizol(Invitrogen 公司,15596018);反转录试剂盒(First Strand cDNA Synthesis Kit,Thermo 公司,#K1612);Real-time PCR 试剂盒(Promega 公司,A6002);引物(上海捷瑞生物工程有限公司,20120625);小鼠瘦素 ELISA 试剂盒(CRYSTAL CHEM INC 公司,#90030)。

1.2 实验方法

1.2.1 模型制备 *Stat5**fl/fl* 和 *Stat5*NKO 小鼠从 4 周开始喂养全价 SPF 级鼠饲料至 12 周开始针刺,肥胖的标准以肥胖组的平均体质量超过正常组体质量的 20% 为准^[3],造模成功率为 50%。

1.2.2 干预方法 所有组清醒小鼠均固定后,参照《实验针灸学》常用实验动物针灸穴位选取单侧后三里、内庭^[3]穴位后,针入 2~4 mm,得气后,接电针(韩氏电针仪 100,0.4~0.6 mA,2/15 Hz)30 min,疏密波,以肢体微微颤动为度。针具为一次性无菌中研太和针灸针,规格为 Φ0.18 mm×10 mm。每天 1 次。治疗 6 d 休息 1 d,共治疗 30 次。

1.2.3 标本处理 针刺治疗结束后处死小鼠,置于冰盘上快速剥离下丘脑,迅速放入液氮冷冻;同时收集血液静置 2 h 后,3 500 r/min,4 ℃ 离心 5 min,吸取上清-80 ℃ 冰箱冷冻保存备用。

1.3 指标检测

1.3.1 下丘脑和血清中 Leptin 含量的检测 从液氮中取出下丘脑组织,迅速加入 200 μL 1×PBS 并用玻璃匀浆器匀浆后,4 ℃,12 000 r/min,离心 15 min,收集上清;另从-80 ℃ 冰箱取出血清融化,所

有下丘脑和血清样本均稀释 20 倍备用。严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作完毕后,立即在全自动酶标仪上进行 450 nm/630 nm 双端读数,测定 OD 值,根据标准曲线来计算血清中瘦素的含量。

1.3.2 下丘脑 *Kctd15*、*Sh2b1* 的表达 下丘脑总 RNA 提取具体步骤严格按照 Trizol 试剂说明书操作。得到总 RNA,采用二步法进行 RNA 逆转录后取 150 ng 的 cDNA 作为模板,加入 10 μL 2×SYBR Green qPCR Mix,上下游引物各 0.5 μL(10 μmol/L),引物从 PubMed 中通过 Nucleotide 查找获得序列后由上海捷瑞生物工程有限公司合成,序列及长度见表 1,其中 *Gapdh* 为内参。用无酶水补齐总体积后 Real-time PCR 法检测 mRNA 的表达。最终以 Delta-delta *Ct* 值来计算基因拷贝数。

表 1 基因引物及序列

基因	序列(5'→3')	长度/bp
<i>Gapdh</i>	F:GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	251
	R:ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA	
<i>Kctd15</i>	F:CGCTTAACGCACACGGCAGC	172
	R:GCACGGGTGCGTTGGCTTTG	
<i>Sh2b1</i>	F:ACCCAAGAAGTGAGGCCGGGAG	204
	R:GGGTCACGGGAGGTGCTCCG	

1.4 统计学处理

运用 SPSS17.0 统计软件,检测结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间差异的显著性采用单因素方差分析,齐性检验后 LSD 法进行组间两两比较, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠治疗前后体质量

在针刺过程中,分别记录各组小鼠禁食 6 h 后的体质量作为统计数据。与正常组比较,肥胖组的平均体质量超过正常组的 20%,具有统计学意义($P < 0.01$),而电针组与肥胖组相比,无统计学意义($P > 0.05$)。针刺 4 周结束后,电针组体质量明显低于肥胖组($P < 0.01$)。见表 2。

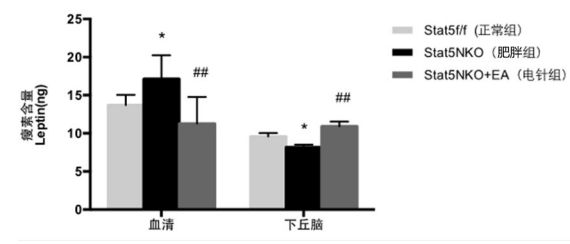
表 2 各组小鼠体质量针刺前后的比较($\bar{x} \pm s$, g , $n = 10$)

组别	针刺前	针刺后
正常组	25.04±2.07	26.96±1.61
肥胖组	31.08±2.17**	33.07±2.93**
电针组	32.33±2.14**	28.82±3.82##

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与肥胖组比较,## $P < 0.01$ 。

2.2 针刺前后血清和下丘脑中 Leptin 含量的变化 正常组小鼠的血清 Leptin 含量为(13.69±1.36)ng/mL,而肥胖组的血清 Leptin 含量为(17.14

± 3.09 ng/mL, 高于正常组 ($P < 0.05$); 但是电针组的血清 Leptin 含量则显著下降 ($P < 0.01$), 仅有 (11.28 ± 3.50) ng/mL。下丘脑中 Leptin 变化正好与外周相反, 肥胖组 Leptin 水平比正常组显著降低 ($P < 0.05$), 而电针组 Leptin 含量则显著增加 ($P < 0.01$), 提示电针可以促进外周血液中的 Leptin 向中枢转运。见图 1。

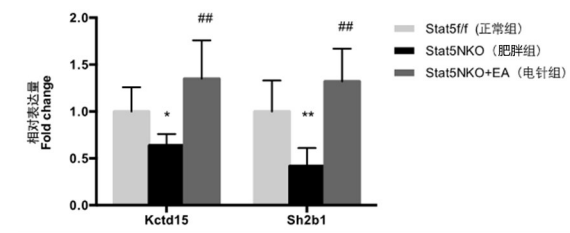


注:与正常组比较, * $P < 0.05$; 与肥胖组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 1 3 组小鼠血清和下丘脑中瘦素含量比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

2.3 下丘脑 *Kctd15*、*Sh2b1* 的 mRNA 表达结果

与正常组比较, 肥胖组下丘脑中 *Kctd15*、*Sh2b1* 的 mRNA 表达均降低 ($P < 0.05 \sim 0.01$); 与肥胖组比较, 电针组下丘脑中 *Kctd15*、*Sh2b1* mRNA 的表达则明显回升 ($P < 0.01$)。见图 2。



注:与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与肥胖组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 2 3 组小鼠下丘脑中 *Kctd15*、*Sh2b1* 基因 mRNA 表达差异比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

3 讨论

已有研究表明, 中枢 *Stat5* 条件性敲除后, 小鼠由于缺失 STAT5, 对 GM-CSF 的敏感性降低, 导致摄食增加进而诱发肥胖^[4]。这与肥胖分型中胃火炽热、食欲旺盛所致肥胖有相似之处, 故我们将该模型引入肥胖研究领域。本课题组前期研究也表明针刺可以通过诱导 UCP1 表达促进白色脂肪棕色化实现减肥效应^[3]。

血清瘦素 (Leptin) 被认为是一种由脂肪组织分泌的信号, 可以跨过血脑屏障, 结合位于中枢神经系统, 特别是下丘脑内特定神经元细胞上的瘦素受体, 激活下游信号通路 (包括位于弓状核上的 *Agrp*、*Npy* 和 *POMC* 神经元等^[5], 前 2 者激活可以促进食

欲, 而后者激活可以抑制食欲), 发挥调节食欲, 调节能量代谢, 减少脂肪含量的功能, 从而使人和动物的体脂保持相对稳定。经研究证实大多数肥胖患者血清瘦素水平比非肥胖者高, 肥胖且瘦素缺乏者仅占 5%, 因此推测肥胖者普遍存在瘦素抵抗, 瘦素抵抗是导致肥胖的主要原因。

Kctd15^[6] 属于钾通道四聚体结构蛋白家族的一员, 它可以抑制在脂肪发育过程中起重要作用的一个转录因子 AP2, 从而影响肥胖。AP2 是由脂肪组织分泌的脂肪因子可以调节肝脏的糖代谢, 研究已证实肥胖人群体内具有显著升高的循环 AP2 水平^[7]。*Sh2b1* 是适配信号蛋白家族的成员之一, 含有 SH2 和 pH 2 个特异性的结构域, 可以与多种受体结合, 比如 JAK2, TrkA, IR, IGF1, IRS 等。研究发现 *Sh2b1* 缺失的小鼠将导致严重的瘦素抵抗, 摄食增加进而肥胖^[8]。本实验中肥胖组小鼠的 *Kctd15* 表达下调, Leptin 增加, 引起瘦素抵抗, 导致肥胖; 而下调 *Sh2b1* 后, 由于摄食增加而加剧肥胖; 针刺足三里、内庭后, 上调 *Kctd15*、*Sh2b1* 的表达, 从而逆转这一过程。基于以上结果推断针刺可能通过调节丘脑 *Kctd15*、*Sh2b1* 的 mRNA 表达, 参与抑制脂肪发育和改善瘦素抵抗机制, 从而发挥其良好的减肥效应。

参考文献:

- [1] Cho SH, Lee JS, Thabane L, et al. Acupuncture for obesity: a systematic review and meta-analysis[J]. Int J Obes (Lond), 2009, 33(2): 183-196.
- [2] 于月, 尤佳, 杨柳, 等. 瘦素信号转导通路在能量代谢平衡中的作用机制[J]. 生命科学, 2013, 25(2): 169-175.
- [3] Yu Y, You J, Yang L, et al. Leptin receptor signaling in energy homeostasis[J]. Chin Bull Life Sci, 2013, 25(2): 169-175.
- [4] Shen W, Wang Y, Lu SF, et al. Acupuncture promotes white adipose tissue browning by inducing UCP1 expression on DIO mice[J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14: 501.
- [5] Lee JY, Muenzberg H, Gavrilova O, et al. Loss of cytokine-STAT5 signaling in the CNS and pituitary gland alters energy balance and leads to obesity[J]. PLoS One, 2008, 3(2): e1639.
- [6] Myers J, Olson DP. Central nervous system control of metabolism[J]. Nature, 2012, 491(7424): 357-363.
- [7] Zarelli VE, Dawid IB. Inhibition of neural crest formation by *Kctd15* involves regulation of transcription factor AP-2[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(8): 2870-2875.
- [8] Cao H, Sekiya M, Ertunc ME, et al. Adipocyte lipid chaperone AP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production[J]. Cell Metab, 2013, 17(5): 768-778.
- [9] De Lartigue G, Ronveaux CC, Raybould HE. Deletion of leptin signaling in vagal afferent neurons results in hyperphagia and obesity[J]. Mol Metab, 2014, 3(6): 595-607.

(编辑: 董宇 杨巍敏)