

茶多酚 EGCG 对小鼠棕色脂肪代谢的影响

商悦, 李毅, 陈淑珍, 甄永苏

中国医学科学院, 北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050

摘要 随着对棕色脂肪组织(BAT)在成人体内具有生物学功能的肯定,棕色脂肪已经成为当今医学研究的热点。采用动物实验、病理组织学方法及免疫组化,观察了表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对棕色脂肪代谢的影响。结果表明,在体重和鼠龄相近时,不同种属小鼠肩甲间棕色脂肪组织HE染色后的形态不同,C57BL/6脂肪细胞中的空泡大,胞浆含量少,BALB/c小鼠脂肪细胞中的空泡小,胞浆含量多,昆明小鼠居中。给昆明小鼠口服不同剂量EGCG后,150 mg/kg EGCG能降低小鼠体重的增长,降低附睾周围白色脂肪组织的重量,但没有统计学意义。同时,EGCG能降低棕色脂肪细胞内脂肪含量,增加胞浆含量,具有统计学意义($P<0.001$)。免疫组化结果表明,EGCG能增加棕色脂肪细胞内脱偶联蛋白1(UCP1)的表达,增加能量代谢。因此,不同种属小鼠的BAT具有不同的组织形态学特点,这为研究BAT小鼠的选择提供了依据;EGCG能够调节小鼠棕色脂肪的代谢功能,这为进一步研究作用机制打下了基础,同时为茶叶在脂肪代谢方面的调节提供了一种新的思路和依据。

关键词 表没食子儿茶素没食子酸酯;棕色脂肪组织;脱偶联蛋白1

中图分类号 R96

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.11.002

Effects of Tea Polyphenol EGCG on the Metabolism of Brown Adipose Tissue in Mice

SHANG Yue, LI Yi, CHEN Shuzhen, ZHEN Yongsu

Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract With recognition of biological functions of brown adipose tissue (BAT) in adults, it has become a hot topic in medical research. In the present study, the effects of (-)-Epigallocatechin-3-gallate(EGCG) on the metabolism of BAT are investigated through animal experiments, histopathological and immunohistochemical methods. The results show that there are disparities in morphology of interscapular BAT among different species of mice. Vacuoles of fat droplets in adipocytes of C57BL/6 mice are the largest, and the cytoplasmic content is the least. Vacuoles in adipocytes of BALB/c mice are the smallest, and the cytoplasmic content is the most. Vacuoles and cytoplasmic content in Kunming mice lie between those in C57BL/6 and BALB/c mice. EGCG at 150 mg/kg decreases the increment rate of body weight and reduces the weights of epididymal white adipose tissue, but there is no statistical significance after different doses of EGCG are administered p.o. to Kunming mice. EGCG significantly decreases the content of fat (shown as vacuoles in the sections) in BAT and increases the cytoplasmic content ($P<0.001$). By immunohistochemical examination, EGCG increases the expression level of uncoupling protein 1, indicating the increase of energy metabolism in BAT. Therefore, there exist diverse morphological characteristics in different inbred lines of mice, which provides the basis for selection of mice in BAT studies. EGCG may regulate the metabolism of BAT in mice, which lays the foundation for further studies of its mechanism and provides new ideas for studies of the regulation of fat metabolism by tea.

Keywords EGCG; brown adipose tissue; uncoupling protein 1

收稿日期:2014-01-20;修回日期:2014-03-05

基金项目:国家自然科学基金项目(81373437)

作者简介:商悦,主管技师,研究方向为药理学,电子信箱:shyue5775@aliyun.com;陈淑珍(通信作者),研究员,研究方向为分子药理学,电子信箱:bjcsz@imb.pumc.edu.cn

引用格式:商悦,李毅,陈淑珍,等.茶多酚EGCG对小鼠棕色脂肪代谢的影响[J].科技导报,2014,32(11):21-25.

茶叶(tea, *camelliasinensis*)是世界范围内深受人们喜爱的饮品之一,分为绿茶、红茶、半发酵茶。绿茶中的主要生物学活性成分为茶多酚,表没食子儿茶素没食子酸酯((-)-Epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是茶多酚的主要成分之一^[1]。EGCG对肿瘤、肥胖、糖尿病、和心血管疾病均具有一定的防治作用^[2,3],经常饮用富含EGCG的绿茶可能降低肥胖的发生率,减轻体重和减少脂肪的储备。EGCG也是脂质吸收的强烈抑制因子^[4]。

肥胖已经成为世界范围内的一个重要的健康问题,以脂肪组织增生和脂肪组织肥大特点。脂肪组织一般分为棕色脂肪(brown adipose tissue, BAT)和白色脂肪(white adipose tissue, WAT)两种,棕色脂肪主要用来进行能量代谢,白色脂肪主要是储备脂质^[5]。以往普遍认为,BAT只在小哺乳动物(如啮齿类)和人类婴儿期具有重要的代谢功能,成人体内BAT没有太大的功能^[6]。但是,2004年,氟脱氧葡萄糖-正电子发射断层摄影(fluorodeoxyglucose-positron emission tomography, FDG-PET)技术研究结果表明,成人体内存在具有活性的BAT^[7],随后有研究采用组织切片技术和免疫组化方法进一步证实成人纵膈脂肪组织为棕色脂肪组织,成人体内BAT的活性又得到了进一步证实^[8,9],研究还进一步表明,人体内BAT的量与体重指数(body mass index, BMI)呈负相关,显示出BAT在人体能量平衡调节中起重要作用^[10]。美国国立卫生研究院(NIH)国家人类基因组研究中心主任 Francis Collins于2013年3月26日和11月12日在NIH网站发表博客,两次提到BAT,认为BAT是肥胖治疗的新靶点。因此,对棕色脂肪的研究已经成为医学研究的热点之一。

EGCG对肥胖的调节作用主要集中在高脂饮食小鼠或大鼠的研究,而以BAT作为EGCG调节肥胖的靶点在PUBMED上未见相关文献。本文采用动物实验、病理组织学方法和免疫组化法,研究EGCG对小鼠棕色脂肪和白色脂肪组织的调节作用。

1 实验材料

1.1 药品与试剂

EGCG(江西绿康天然产物有限公司,批号:D98-120602),抗体UCP1(Abcam公司,英国,批号:ab23841),辣根过氧化物酶标记兔二抗(PV-9001)、二氨基联苯胺(DAB)浓缩型试剂盒、柠檬酸盐缓冲液ZLI-9065(0.01 mol/L, pH值6.0)、PBS磷酸盐缓冲液ZLI-9062(0.01 mol/L, pH值7.2~7.4)均购自北京中杉金桥生物公司,脱水、染色试剂均为哈尔滨格林标本技术开发有限公司开发的格林绿色环保试剂。

1.2 实验动物

昆明小鼠和C57BL/6小鼠,18~22 g,雄性,体重均一,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,SPF级,动物合格证号:SCXK-2012-10001;BALB/c小鼠,18~22 g,雄性,由中国人民解放军军事医学科学院试验动物中心提供,SPF级,动物合格证号:SCXK-1(2012-10004)。所有动物实验都通过

北京协和医学院医药生物技术研究动物中心批准后进行。实验过程中,所有动物都饲养在封闭的无病原体的环境中,室温(24±1)℃,湿度(50±10)%,按标准操作给予水和饲料,昼夜节律。

1.3 仪器

冰冻切片(Cryotome E, Thermo公司,美国),脱水机(Microom Stp120, Thermo公司,美国),包埋机(Histocentre 3, Thermo公司,美国),切片机(Shandon Finess325, Thermo公司,美国),捞片机(Digital Section Flotation Bath TLZ11, Thermo公司,美国),烤片机(Slimline Digital Hotplate TLZ11, Thermo公司,美国),染色机(Varistain Gemini ES, Thermo公司,美国),显微镜(Leica DM1000, Leica公司,德国)。

2 实验方法

2.1 动物分组和给药

32只昆明小鼠随机分为4组,即对照组、EGCG 50 mg/kg、EGCG 100 mg/kg、EGCG 150 mg/kg组,每组8只,每组动物分别灌胃,给予生理盐水及对应剂量的EGCG,每周给药5次,共给药15次,最后一次给药后4 h处理。

2.2 取材和固定

给药结束时,采用戊巴比妥钠麻醉、放血,然后剖取肩胛间棕色脂肪组织和附睾旁白色脂肪组织,固定于甲醛钙液(10 mL甲醛和1 g无水氯化钙配成100 mL溶液)中,用于病理组织学检查。

2.3 病理切片观察

从固定液中取出脂肪组织切片,HE染色,光学显微镜观察,主要观察脂肪滴大小变化。由同一病理学实验者按单盲法完成观察,并采用Leica QW3图像分析系统进行分析。

2.4 冰冻切片及油红染色

参考文献[11]方法,将冰冻切片进行油红O染色。具体方法如下,取BALB/c小鼠的棕色脂肪组织制成10 μm厚的冰冻切片,将其浸入60%磷酸三乙酯溶液中,在油红O液中染15 min,然后将切片在60%磷酸三乙酯溶液中洗15~30 s,蒸馏水洗,苏木素染色1 min,自来水洗5 min,甘油胶冻(甘油35 mL,明胶5 g,蒸馏水65 mL)封固。

2.5 免疫组织化学

首先将组织切片脱蜡水化,加入枸橼酸盐进行热抗原修复,高压灭活抗原,修复3 min,自然冷却到40℃以下。PBS洗2 min,3次。3% H₂O₂去离子水孵育10 min,阻断内源性过氧化物酶。PBS洗2 min,3次。3% BSA封闭非特异性位点20 min,然后加入一抗UCP1(1:500,体积比),4℃过夜。PBS洗2 min,3次。加PV9001试剂1,于37℃孵育20 min, PBS洗2 min,3次。加PV9001试剂2,于37℃孵育30 min, PBS洗2 min,3次。DAB显色,苏木素复染,中性树脂胶封片,镜检,采用Leica QW3图像分析系统拍照。

2.6 统计学分析

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $\alpha=0.05$ 。组间差异显著性分析

采用 *t* 检验。

3 实验结果

3.1 不同种属小鼠相同体重下棕色脂肪组织学特点

将昆明小鼠、C57BL/6 小鼠以及 BALB/c 小鼠的肩胛间的棕色脂肪组织经甲醛钙固定液固定后,用 HE 染色在光镜下进行观察。3 种小鼠肩胛间的棕色脂肪组织大体上观察均为

棕色,HE 染色结果表明,棕色脂肪组织主要由脂肪细胞构成,脂肪细胞内散在大小不均的脂滴,染色过程中由于酒精和二甲苯的作用,脂滴被溶解成空泡状,因此称为多泡脂肪细胞,核基本成圆形(图 1)。在相同放大倍数的情况下,3 种动物中,C57BL/6 小鼠棕色脂肪细胞内的大空泡相对最多,而 BALB/c 小鼠的大空泡最少,多为小泡脂肪细胞,昆明小鼠居中。因此选择空泡大小居中的昆明小鼠进行进一步实验。

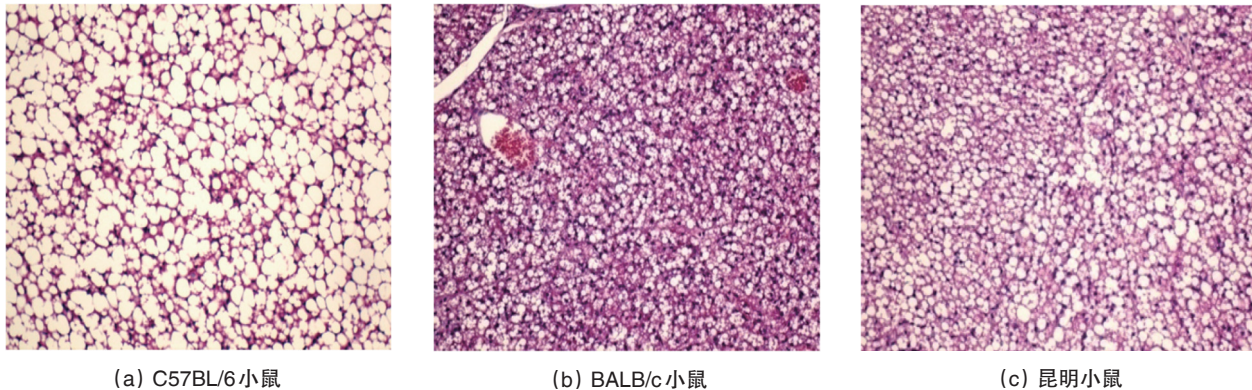


图 1 不同动物棕色脂肪组织 HE 染色后的特点(200×)

Fig. 1 Characteristics of brown adipose tissue from different lines of mice after HE staining (200×)

3.2 棕色脂肪组织油红染色结果

油红 O 为脂溶性染料,可以特异性地使组织内的中性脂肪着色成鲜艳的橙色。病理取材时,将小鼠肩胛间棕色脂肪组织及附近的白色脂肪组织各取一部分,进行 HE 染色和油红 O 染色,以进一步确定 HE 染色中的空泡确实为脂肪滴。

图 2 结果表明,HE 染色中脂肪空泡较大的部分为白色脂肪组织,而空泡较小的部分为棕色脂肪组织(图 2(a));油红 O 染色结果表明,橙色呈片状的部分为白色脂肪组织,点状密集区为棕色脂肪组织,二者界限分明。昆明小鼠棕色脂肪组织周边存在界限分明的白色脂肪组织。

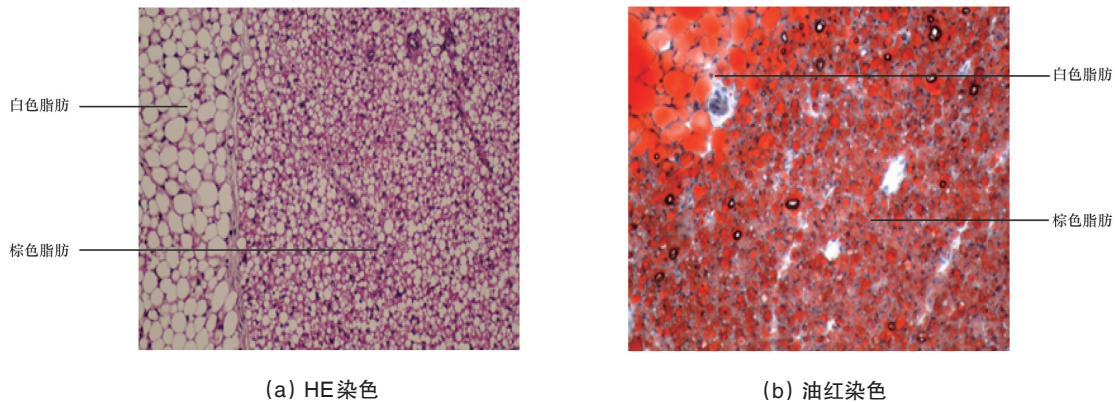


图 2 小鼠肩胛间棕色脂肪染色结果(200×)

Fig. 2 Staining of interscapular brown adipose tissue from mice (200×)

3.3 EGCG 对小鼠体重的影响

昆明小鼠在正常喂食情况下口服不同剂量 EGCG,同时进行体重观察。

图 3 结果表明,50 mg/kg 和 100 mg/kg EGCG 不影响小鼠体重的增加,而 150 mg/kg EGCG 的小鼠体重增加较对照组缓慢,但不存在统计学差别($P>0.05$)。

3.4 EGCG 对棕色脂肪形态的影响

昆明小鼠按不同剂量口服 EGCG 后,取棕色脂肪组织进行 HE 染色,并观察给药后棕色脂肪组织的形态变化。如图 4 所示,对照组脂肪细胞内的空泡相对较大,细胞浆被挤到边缘,给药后随着 EGCG 剂量的增加,大空泡相对减小,小空泡相对增多,胞浆成分受挤压减小,相对增加。

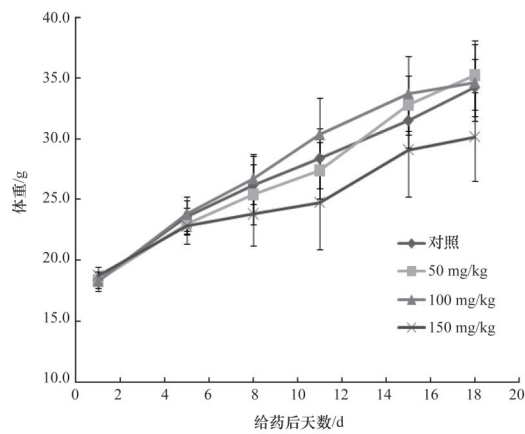


图3 不同剂量EGCG对昆明小鼠体重的影响($n=8$)
Fig. 3 Body weights of Kunming mice after different doses of EGCG treatment ($n=8$)

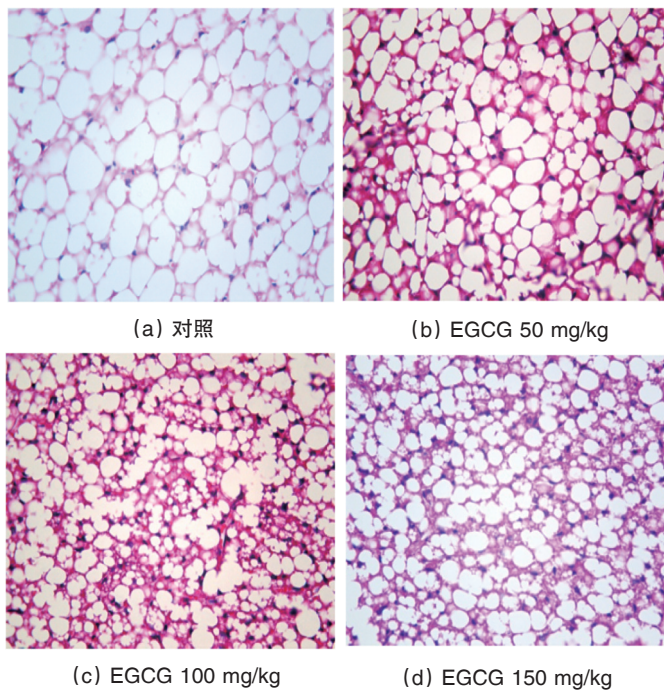


图4 EGCG对棕色脂肪组织形态学的影响(400×)
Fig. 4 Morphological changes of interscapular brown adipose tissue in mice treated with EGCG (400×)

3.5 EGCG对脂肪组织影响

给昆明小鼠口服不同剂量EGCG后,对附睾白色脂肪重量以及肩胛间棕色脂肪HE染色后的空白面积进行分析。以空白面积大小代表脂肪含量进行半定量分析,采用Leica QW3图像分析系统,结果列于表1。对比发现,150 mg/kg EGCG能够降低附睾脂肪组织的重量,但和对照相比,没有统计学差异($P>0.05$)。但是,EGCG能够明显降低棕色脂肪组织内的空白面积,与对照相比,3个剂量组均存在显著的统计学差别($P<0.001$)。

表1 EGCG对脂肪组织的影响($n=8$)

Table 1 Effect of EGCG on adipose tissue ($n=8$)

组别	剂量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	动物数/只		附睾白色 脂肪/g	棕色脂肪 空白面积/%
		开始	结束		
对照	—	8	8	0.292±0.104	83.81±5.3
EGCG	50	8	8	0.311±0.055	74.02±2.79***
EGCG	100	8	8	0.316±0.073	66.45±5.94***
EGCG	150	8	8	0.239±0.096	62.87±3.53***

注:*** $P<0.001$ 与对照相比较。

3.6 EGCG对UCP1表达的影响

棕色脂肪参与能量代谢需要UCP1的参与,因此本研究采用免疫组化的方法进一步观察了EGCG对棕色脂肪组织中UCP1表达的影响。如图5所示,胞浆中褐色颗粒为UCP1阳性,随着EGCG剂量的增加,褐色颗粒逐渐加深,表明随着EGCG剂量增加,UCP1表达也逐渐增加。

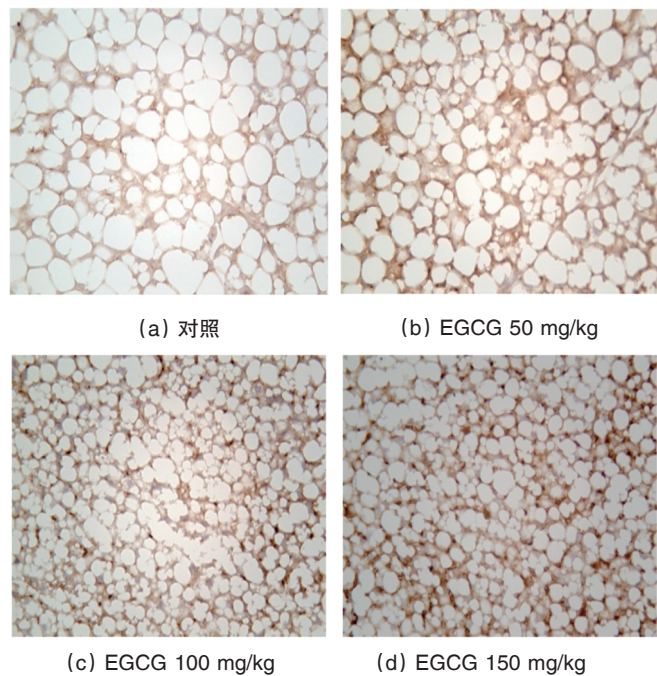


图5 EGCG对棕色脂肪组织中UCP1表达的影响(400×)
Fig. 5 Variation of UCP1 expression level in interscapular brown adipose tissue in mice treated with EGCG (400×)

4 讨论

EGCG具有调节脂肪代谢的作用^[12]。C57BL/6小鼠在高脂饮食过程中在经EGCG(20 mg/kg)处理后,体重较高脂饮食对照组明显减轻,小鼠肝脏细胞中的脂肪浸润减少,血液中的总胆固醇、低密度脂蛋白中的胆固醇、以及甘油三酯均明显降低^[13]。但是,EGCG调节脂肪代谢的机制至今仍未阐明。通过实验发现,EGCG在一定剂量下可以延缓正常饮食小鼠体重的增加,减轻附睾周围白色脂肪的重量,这进一步

证明EGCG具有调节脂肪代谢的功能。通过一系列实验,本文从棕色脂肪的角度初步探讨EGCG调节脂肪代谢的机制。

棕色脂肪是哺乳动物机体抵御寒冷和肥胖的有效器官,它通过能量代谢达到抵御寒冷和减肥的目的,白色脂肪增加是引起肥胖的直接原因。近来研究表明,机体内BAT主要来源于myf5阳性的肌成纤维细胞^[14,15]。BAT主要依赖于解偶联蛋白1的活化产生热量,UCP1是特异性存在于棕色脂肪细胞中的一种线粒体蛋白,将线粒体氧化磷酸化脱偶联后,代谢脂肪酸,产生能量,这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^[16,17]。

通过研究发现,不同品系的小鼠肩胛间BAT内脂肪细胞均为多泡脂肪细胞,脂肪滴大小不一,但脂肪滴大小存在品系差异。C57BL/6小鼠和BALB/c小鼠尽管均为纯系小鼠,在相同周龄和相同性别情况下,棕色脂肪细胞内HE染色后空泡大小存在明显差别,昆明小鼠处于两者之间。油红染色结果进一步表明切片HE染色后的空泡确实为脂肪滴。

由于EGCG具有调节脂肪代谢的功能,观察了不同剂量EGCG处理昆明小鼠后棕色脂肪的病理形态学改变。结果表明,经EGCG治疗后,小鼠棕色脂肪细胞内脂滴减小,细胞浆含量增加;同时,免疫组化结果表明,EGCG能增加UCP1的表达,由于UCP1是棕色脂肪能量代谢的必须蛋白,因此,EGCG可能能够动员棕色脂肪组织进行能量代谢。如果延长EGCG的给药时间或增加剂量,EGCG对BAT的功能可能进一步增强,从而达到减肥的目的。本实验对EGCG在棕色脂肪的调节方面进行了初步研究,以后仍需对它的作用机制进行进一步的研究。本研究可能为绿茶、茶多酚或EGCG对脂肪代谢的调节提供另一种新证据。

5 结论

不同品系小鼠的BAT具有不同的组织形态学特点,这为研究BAT小鼠的选择提供了依据;同时,EGCG能够调节小鼠棕色脂肪的代谢功能,这为进一步研究其作用机制打下了基础,也为茶叶在脂肪代谢方面的调节提供了一种新的思路 and 依据。

参考文献(References)

- [1] 陈淑珍,甄永苏. 茶多酚的分子作用靶点及其在抗肿瘤药物实验治疗中的作用[J]. 药学报, 2013, 48(1): 1-7.
Chen Shuzhen, Zhen Yongsu. Molecular targets of tea polyphenols and its roles of anticancer drugs in experimental therapy[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2013, 48(1): 1-7.
- [2] 罗居东,薛姣,葛欣,等. PPAR α 活化增加肿瘤细胞对EGCG的敏感性的机制[J]. 科技导报, 2013, 31(27): 21-26.
Luo Judong, Xue Jiao, Ge Xin, et al. Mechanism of sensitizing effect of PPAR α activation on epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in cancer cells [J]. Science & Technology Reviews, 2013, 31(27): 21-26.
- [3] Kim J, Kim H S, Quon M J. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate[J]. Redox Biology, 2014, 2: 187-195.
- [4] Chan C Y, Wei L, Castro-Muñozledo F, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks 3T3-L1 adipose conversion by inhibition of cell proliferation and suppression of adipose phenotype expression[J]. Life Sciences, 2011, 89(21): 779-785.
- [5] Rosenwald M, Wolfrum C. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes[J]. Adipocyte, 2014, 3(1): 4-9.
- [6] Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch[J]. Nature, 2008, 454(7207): 961-967.
- [7] Truong M T, Erasmus J J, Munden R F, et al. Focal FDG uptake in mediastinal brown fat mimicking malignancy: A potential pitfall resolved on PET/CT[J]. American Journal of Roentgenology, 2004, 183(4): 1127-1132.
- [8] Silva F J, Holt D J, Vargas V, et al. Metabolically active human brown adipose tissue derived stem cells[J]. Stem Cells, 2014, 32(2): 572-581.
- [9] Gilsanz V, Hu H H, Kajimura S. Relevance of brown adipose tissue in infancy and adolescence[J]. Pediatric Research, 2012, 73(1): 3-9.
- [10] 黄海艳,钱淑文,汤其群. 诱导性产热脂肪的性质、诱导因素及潜在临床应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(9): 1259-1271.
Huang Haiyan, Qian Shuwen, Tang Qiqun. Characterization of the inducible thermogenic adipose tissue and its potential application in treatment of obesity and related complications[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2013, 35(9): 1259-1271.
- [11] Prats C, Gomez-Cabello A, Nordby P, et al. An optimized histochemical method to assess skeletal muscle glycogen and lipid stores reveals two metabolically distinct populations of type I muscle fibers[J]. Plos One, 2013, 8(10): e77774.
- [12] Zhou J, Farah B L, Sinha RA, et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, stimulates hepatic autophagy and lipid clearance[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87161.
- [13] Byun J K, Yoon B Y, Jhun J Y, et al. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates both obesity and autoinflammatory arthritis aggravated by obesity by altering the balance among CD4⁺ T-cell subsets[J]. Immunology Letters, 2014, 157(1): 51-59.
- [14] Ohno H, Shinoda K, Ohyama K, et al. EHMT1 controls brown adipose cell fate and thermogenesis through the PRDM16 complex[J]. Nature, 2013, 504(7478): 163-167.
- [15] Kajimura S, Seale P, Kubota K, et al. Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP- β transcriptional complex[J]. Nature, 2009, 460(7259): 1154-1158.
- [16] Okamatsu-Ogura Y, Fukano K, Tsubota A, et al. Thermogenic ability of uncoupling protein 1 in beige adipocytes in mice[J]. Plos One, 2013, 8(12): e84229.
- [17] Stier A, Bize P, Hahold C, et al. Mitochondrial uncoupling prevents cold-induced oxidative stress: A case study using UCP1 knockout mice[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2014, 217(4): 624-630.

(编辑 田恬)