

江西建昌帮阴附片和阳附片对阳虚小鼠棕色脂肪组织的影响

凡若楠, 钟凌云*, 于武华, 童恒力, 邓小燕
(江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的:观察棕色脂肪组织(BAT),细胞,蛋白以及相应基因在大黄混悬液所致阳虚模型小鼠中的表达情况,探讨建昌帮特色附子炮制品的产热机制。方法:随机选取20只小鼠,雌雄各半,作为正常雌、雄组,其余80只小鼠灌服大黄混悬液(质量浓度 $0.25\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$)建立阳虚模型,造模结束后随机分为模型雌、雄组,生附片雌、雄组,阴附片雌、雄组以及阳附片雌、雄组,每组10只。按照小鼠组别给予相应药液,灌胃2周($1.54\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),正常组和模型组给予等体积蒸馏水。灌胃结束后,采集小鼠肩胛处BAT,进行苏木素-伊红(HE)染色观察BAT细胞变化;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测解偶联蛋白1(UCP1)及其mRNA的表达。结果:与同性别正常组比较,模型组的BAT比重显著降低($P<0.01$);雌性小鼠中生附片组和阴附片组的BAT比重较模型组显著增加($P<0.01$),而雄性小鼠各给药组与模型组相比则无显著性差异。与同性别正常组比较,模型组小鼠BAT的细胞有许多散在分布的空泡,由于空泡较大,可观察到的细胞较少;与同性别模型组比较,生附片组小鼠BAT细胞可见细胞空泡减少,细胞较小并且排列紧密,阳附片组中BAT细胞的密度也明显增加,阴附片组BAT细胞中空泡相对减少,但细胞无显著增加。同性别小鼠之间比较,模型组与正常组的UCP1表达水平相比具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$);在雌性小鼠中,阳附片组较模型组的UCP1表达水平显著升高($P<0.05$),雄性小鼠的各给药组较同性别模型组均有显著差异($P<0.05$),其中阳附片的显著性最优。模型组较同性别正常组的UCP1 mRNA相对表达量显著下降($P<0.05, P<0.01$);在雌性小鼠中,与模型组比较,阳附片组、生附片组和阴附片组的UCP1 mRNA相对表达量显著升高($P<0.05, P<0.01$),与阳附片组比较,生附片组和阴附片组的UCP1 mRNA相对表达量有显著性差异($P<0.05$);在雄性小鼠中,与模型组比较,阳附片组的UCP1 mRNA相对表达量显著升高($P<0.01$),生附片组、阴附片组则无显著性差异,生附片组和阴附片组的UCP1 mRNA相对表达量与阳附片组比较有显著性差异($P<0.05$)。结论:生附片、阴附片和阳附片对大黄所致的阳虚证均有明显改善作用,机制可能为促进UCP1蛋白及其mRNA的表达、增强BAT的活性,且阳附片效果最好。

[关键词] 阴附片; 阳附片; 棕色脂肪组织(BAT); 解偶联蛋白1(UCP1); 阳虚证; 蛋白免疫印迹法; 聚合酶链式反应(PCR); 附子

[中图分类号] R22;R692;R28;R96;R943.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2020)14-0072-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201060

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200326.1005.001.html>

[网络出版日期] 2020-3-26 11:38

Effect of Yinfulpian and Yangfulpian on Brown Adipose Tissue of Yang Deficiency Mice

FAN Ruo-nan, ZHONG Ling-yun*, YU Wu-hua, TONG Heng-li, DENG Xiao-yan
(School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the expression of brown adipose tissue (BAT), cells, proteins and corresponding genes in Yang deficiency model mice induced by Rhei Radix et Rhizoma suspension, and to explore the thermogenesis of processed products of Aconiti Lateralis Radix Praeparata with Jianchang faction characteristics. **Method:** Twenty mice, half male and half female, were randomly selected as the normal female and male groups. And the other 80 mice were administrated with Rhei Radix et Rhizoma suspension (the

[收稿日期] 20191105(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860703,81660663)

[第一作者] 凡若楠,在读硕士,从事中药炮制、饮片质量标准与炮制机制研究,E-mail:624119122@qq.com

[通信作者] *钟凌云,博士,教授,从事中药炮制传承、饮片质量标准与炮制机制研究,Tel:0791-87118716,E-mail:ly1638163@163.com

content of $0.25 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) to establish Yang deficiency model, after the model was established, they were randomly divided into the model female and male groups, female and male groups of Shengfupian, female and male groups of Yinfupian, female and male groups of Yangfupian, 10 mice in each group. Mice were intragastric administrated with corresponding medical solution for two weeks ($1.54 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) according to groups. Normal group and model group were given equal volume distilled water. After administration, BAT of scapular region of mice was collected and the changes of BAT cells were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression of uncoupling protein 1 (UCP1) and its mRNA were detected by Western blot and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with the normal group of the same sex, the proportion of BAT in the model group decreased significantly ($P<0.01$). Compared with the model group of the same sex, the proportion of BAT in female mice from Shengfupian and Yinfupian groups increased significantly ($P<0.01$), while there was no significant difference between each administration group and model group in the male mice. Compared with normal mice of the same sex, there were many scattered vacuoles in BAT cells of the model group, and fewer cells could be observed due to larger vacuoles. Compared with the model group of the same sex, BAT cells in mice from the Shengfupian group showed fewer vacuoles, smaller cells and tight arrangement, the density of BAT cells in mice from the Yangfupian group also increased significantly, while the vacuoles in BAT cells of mice from the Yinfupian group decreased relatively and the cells did not increase significantly. Compared with the same sex mice, the expression level of UCP1 in the model group and the normal group was statistically significant ($P<0.05$, $P<0.01$). In the female mice, the expression level of UCP1 in Yangfupian group was significantly higher than that in the model group ($P<0.05$), each administration group of male mice was significantly different from that of the model group of the same sex ($P<0.05$), of which Yangfupian was the most significant. The relative expression of UCP1 mRNA in the model group was significantly lower than that in the normal group of the same sex ($P<0.05$, $P<0.01$). In the female mice, compared with the model group, the relative expression levels of UCP1 mRNA in Yangfupian group, Shengfupian group and Yinfupian group increased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$), compared with Yangfupian group, the relative expression levels of UCP1 mRNA in Shengfupian and Yinfupian were also significantly different ($P<0.05$). In the male mice, compared with the model group, the relative expression of UCP1 mRNA in Yangfupian group was significantly increased ($P<0.01$), but there was no significant difference in Shengfupian group and Yinfupian group, in addition, compared with Yangfupian group, the relative expression of UCP1 mRNA in Shengfupian group and Yinfupian group had significant difference ($P<0.05$). **Conclusion:** Shengfupian, Yinfupian and Yangfupian all have obvious improvement on Yang deficiency syndrome induced by Rhei Radix et Rhizoma suspension. The mechanism may be to promote the expression of UCP1 protein and its mRNA and enhance the activity of BAT. And the effect of Yangfupian is the best.

[Key words] Yinfupian; Yangfupian; brown adipose tissue (BAT); uncoupling protein 1 (UCP1); Yang deficiency syndrome; Western blot; polymerase chain reaction (PCR); Aconiti Lateralis Radix Praeparata

脂肪组织是生物体最大的能量储存库,参与能量代谢,是维持生命活动的基础^[1-2]。生物体中有多种脂肪组织,主要分为棕色脂肪组织(BAT)和白色脂肪组织(WAT),两者的功能大为不同,其中BAT主要通过非颤栗性产热的方式消耗能量,产生热量,对维持动物的体温和能量代谢平衡起着重要的作用^[3-4]。中医学通过现代科学对阳虚证的研究认为,其临床症状主要表现为形寒肢冷、精神萎靡、脏

腑功能减退等^[5],与人的能量代谢减弱,机体反应性低下息息相关。

附子作为“温阳要药”,能够峻补诸脏之阳气,从能量代谢角度可阐释为促进生物体的能量代谢,增加产热^[6];也有研究表明,一些温热药能够作用于BAT,促进相关产热蛋白的表达,增强能量代谢,改善阳虚症状^[7]。附子是否能够作用于BAT,在机体内如何发挥药效,相关机制还尚未明确。笔者推测

附子可能通过调节能量代谢组织——BAT来缓解阳虚的症状,结合本课题组前期所研究的附子炮制品——阴附片和阳附片,本实验拟从BAT的角度阐释阴附片和阳附片温阳产热的机制,为这一特色炮制饮片的临床应用提供可靠的理论依据。

1 材料

Q-5000型紫外分光光度计(美国Quwell公司),WD-9413A型凝胶成像分析仪和DYCP-31F型琼脂糖水平电泳仪(北京市六一仪器厂),MF43型显微镜(广州市明美光电技术有限公司),Prism 7500型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国ABI公司),3K18型离心机(德国Sigma公司),JY-SCZ2+型双垂直电泳槽(北京君意华鑫科技有限公司)。

聚偏二氟乙烯(PVDF)转印膜和化学发光试剂盒(ECL)(美国密理博公司,批号分别为IPVH00010,WBKLS0050),内参一抗[抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体]和目标蛋白一抗[抗解偶联蛋白1(UCP1)抗体](英国Abcam公司,批号分别为ab181602,ab209483),二抗[辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(Goat anti-Rabbit IgG)(H+L),北京天德悦生物科技有限责任公司,批号S004F],RNA分离试剂(美国Invitrogen公司,批号15596026),无RNA酶的DNA酶(RQ1 RNase-free DNase,美国Promega公司,批号M6101),西班牙琼脂糖和SolarGelRed核酸染料(北京Solarbio科技有限公司,批号分别为YZQZT,G5560)。盐附子药材购自江西盱江生态科技有限公司,批号20180405,经江西中医药大学龚千锋教授鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* 子根的加工品,产地为四川江油;生姜、大黄饮片均购自江西盱江生态科技有限公司,批号分别为20180315,20180412,经江西中医药大学张寿文教授鉴定,依次为姜科植物姜 *Zingiber officinale* 的新鲜根茎、蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* 的干燥根和根茎,产地分别为广州佛山、甘肃礼县,以上药材与饮片均符合2015年版《中国药典》(一部)的相关要求。

昆明种小鼠100只,雌雄各半,体质量(15±2)g,购自江西中医药大学动物实验中心,合格证号SCXK(赣)2018-003,经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号JZLLSC2019-0102。

2 方法与结果

2.1 药物炮制及药液制备

2.1.1 阳附片 取盐附子药材,搅拌洗净,刮去外

皮,切成3 mm厚片,置容器内加水浸漂7 d,每日需早晚换水,漂至口尝味淡为度,捞起。摊开翻晒至全干。取净白中砂放入锅内炒至滑利,倒入药片,不断翻炒,至药片断面鼓起,变白黄色为度,取出,筛去砂子及灰屑,摊凉,即得^[8]。取炮制好的阳附片适量,分别加10,6倍量水煎煮2次,每次约30 min,合并2次水煎液,通过减压浓缩至生药质量浓度为0.1 g·mL⁻¹,放入冰箱冷藏备用^[9]。

2.1.2 阴附片 取盐附子药材适量,搅拌洗净,浸漂7 d,漂至口尝微咸为度,取出晒干。用生姜汁闷润,以透心为度,取出。入木甑内,待锅中水沸,隔水坐锅,用武火蒸至药材熟透,口尝无或微有麻舌感时,停火取出,日摊夜闷至约七成干,内外水分均匀时,切成薄片,晾晒至干,筛去灰屑即得,损耗55%。阴附片水煎液制备方法同2.1.1项。

2.1.3 生附片 取盐附子药材适量,搅拌洗净,浸漂7 d,漂至口尝微咸为度,取出,切薄片,晒干,即得。生附片水煎液的制备同2.1.1项。

2.1.4 大黄混悬液 将大黄打粉,过六号筛,取大黄粉末25 g,加水100 mL搅匀,即得。

2.2 动物分组与造模 小鼠适应性喂养3 d后,随机选取10只雌性和10只雄性小鼠作为正常组,灌服等体积蒸馏水,剩余80只小鼠作为模型组,采用苦寒泻下法造模^[10],灌服大黄混悬液12 d,从第2天开始,出现垫料浸湿、小鼠便溏、畏冷抱团等现象,造模结束后小鼠出现体质量下降、精神萎靡、毛发枯槁、轻微脱肛等现象,初步证实建立阳虚模型成功,结合BAT中UCP1指标的检测,说明BAT产热的功能减弱,表明造模成功。造模结束后,将小鼠按体质量随机分为模型雄性组、模型雌性组、生附片雄性组、生附片雌性组、阳附片雄性组、阳附片雌性组、阴附片雄性组和阴附片雌性组,按组别给予小鼠灌服相应药液,每天灌胃剂量均为1.54 g·kg⁻¹(按照成人最大用药量换算)。每组小鼠每日灌胃给药1次,定量喂食,连续2周。

2.3 药理指标的检测

2.3.1 小鼠BAT的比重 按照上述方法给药结束后,实验前1 d禁食不禁水12 h,各组术前预防性给药,2 h后进行眼眶取血,然后取肩胛间棕色脂肪组织(BAT)和附睾白色脂肪组织(WAT),分别称质量,计算比重。

2.3.2 观察小鼠中BAT细胞的变化 采用苏木素-伊红(HE)染色方法进行观察。将一部分BAT组织放入10%甲醛溶液中,常规石蜡包埋,60℃烤片

2 h,使用透明剂和体积分数分别为95%,85%,75%的乙醇进行脱蜡,依次使用苏木素、伊红溶液进行染色,使用上述体积分数乙醇、透明剂依次使组织脱水透明,最后用中性树胶封固。

2.3.3 检测小鼠BAT中UCP1蛋白的表达 采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测UCP1,将加入预冷裂解液的组织样品充分研磨,离心处理(转速13 000 r·min⁻¹,4℃,离心半径81 mm,下同)10 min;吸取上清蛋白样品30 μg,加入十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液(4×),97℃加热6 min变性,室温冷却后离心,进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分析。将电泳后的蛋白转移到PVDF膜上,加入封闭液,在室温下封闭0.5 h,加入一抗(用封闭液稀释,抗GAPDH抗体稀释1万倍,抗UCP1抗体稀释5 000倍),室温孵育1 h,孵育后用洗涤缓冲液(TBST)漂洗3次。加入稀释5 000倍的二抗,室温孵育1 h,孵育后用TBST漂洗3次。将混合均匀的ECL发光液滴在PVDF膜上,室温孵育1 min后进行检测,使用Quantity One v4. 6. 6软件对其进行吸光度分析,正常组与GAPDH的吸光度比值记为1。

2.3.4 小鼠BAT中UCP1基因表达的检测 采用实时荧光定量PCR法检测,使用美国国立生物技术信息中心(NCBI)Primer设计内参基因GAPDH和UCP1基因引物,由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。GAPDH(NM_001289726.1)引物序列选择为正向5'-AATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC-

3',反向5'-AGGTCAATGAAGGGGTCGTTG-3';UCP1(NM_009463.3)的引物序列设定为正向5'-TCTTCAGGGCTGAGTCCTTT-3',反向5'-GGCTGAGAAGATCTTGACCC-3';二者引物长度分别为114,118 bp。以经RQ1 RNase-free DNase处理的总RNA为模板,按反转录试剂盒进行cDNA的合成,取合成好的样品按照实时荧光定量PCR试剂盒说明书进行操作,每个样品管中取总RNA 2 μL用于cDNA合成,反应条件为30℃孵化10 min,42℃孵化60 min,99℃孵化5 min,4℃孵化5 min。然后进行PCR反应,反应条件为95℃预变性3 min;94℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,共进行35次循环;72℃延伸10 min。采用相对定量的方法,用2^{-ΔΔC_t}表示倍数变化,计算公式为ΔC_t=C_t目的基因-C_t内参基因;ΔΔC_t=ΔC_t处理样本-ΔC_t对照样本。

2.3.5 统计分析 采用SPSS 19.0软件进行处理,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,经方差齐性分析后,使用单因素方差分析,以P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠BAT比重的影响 与同性别正常组相比,模型组的BAT比重显著降低(P<0.01);雌性小鼠中生附片组和阴附片组较模型组BAT比重显著增加(P<0.01),生附片组和阴附片组的BAT比重与阳附片组比较也有显著性差异(P<0.05),而雄性小鼠各给药组与模型组相比则无显著性差异,见表1。

表1 各附子炮制品对阳虚小鼠热性的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of processed products of Aconiti Lateralis Radix Praeparata on heat properties of Yang deficiency mice($\bar{x}\pm s$)

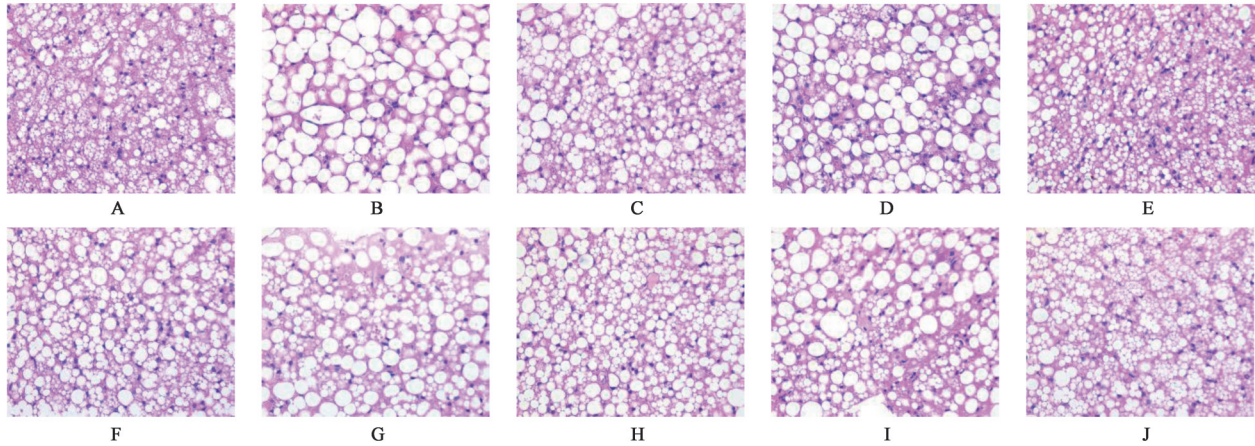
组别	剂量/g·kg ⁻¹	BAT比重(n=6)/%	UCP1蛋白表达量(n=3)	UCP1 mRNA相对表达量(n=3)
正常雄性	-	0.61±0.10	1±0	1.12±0.54
正常雌性	-	0.54±0.10	1±0	1.29±1.10
模型雄性	-	0.41±0.07 ²⁾	0.68±0.11 ¹⁾	0.04±0.01 ²⁾
模型雌性	-	0.40±0.05 ²⁾	0.61±0.13 ²⁾	0.05±0.01 ¹⁾
生附片雄性	1.54	0.42±0.04	1.02±0.10 ³⁾	0.17±0.07 ⁵⁾
生附片雌性	1.54	0.51±0.08 ^{4,5)}	0.80±0.20	0.16±0.06 ^{3,5)}
阴附片雄性	1.54	0.43±0.11	1.05±0.27 ³⁾	0.19±0.09 ⁵⁾
阴附片雌性	1.54	0.51±0.03 ^{4,5)}	0.79±0.02	0.15±0.03 ^{3,5)}
阳附片雄性	1.54	0.47±0.06	1.07±0.15 ³⁾	0.38±0.12 ⁴⁾
阳附片雌性	1.54	0.42±0.05	0.95±0.07 ³⁾	0.26±0.02 ⁴⁾

注:与同性别正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与同性别模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01,与同性别阳附片组比较⁵⁾P<0.05。

3.2 对BAT细胞形态和数量的影响 在荧光显微镜下观察发现,与同性别正常组小鼠比较,模型组小鼠BAT的细胞有许多散在分布的空泡,由于空泡

较大,可观察到的细胞较少。同时,与同性别模型组比较,生附片组小鼠BAT细胞可见细胞空泡减少,细胞较小并且排列紧密;阳附片组中BAT细胞

的密度也明显增加;阴附片组BAT细胞中空泡相对减少,但细胞无显著增加。见图1。

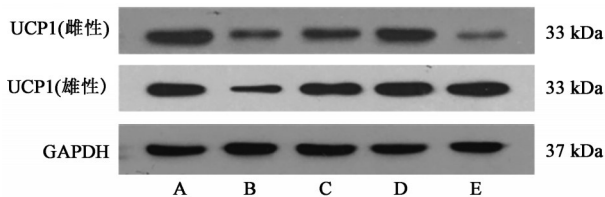


A. 正常雌性组;B. 模型雌性组;C. 生附片雌性组;D. 阴附片雌性组;E. 阳附片雌性组;F. 正常雄性组;G. 模型雄性组;H. 生附片雄性组;I. 阴附片雄性组;J. 阳附片雄性组

图1 各组小鼠的BAT细胞形态观察(HE, ×400)

Fig. 1 Observation on BAT cell morphology of mice in each group(HE, ×400)

3.3 对BAT中特异性蛋白UCP1表达的影响 同性别小鼠之间比较,模型组较正常组的UCP1蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),表明造模成功。在雌性小鼠中,阳附片组较模型组的UCP1蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),生附片组和阴附片组均有上调趋势,但无统计学意义;在雄性小鼠中,各给药组的UCP1蛋白表达水平均较模型组显著升高($P < 0.05$),其中阳附片的显著性最优。见表1和图2。



A. 正常组;B. 模型组;C. 生附片组;D. 阳附片组;E. 阴附片组

图2 各组小鼠UCP1蛋白表达的SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE of UCP1 protein expression of mice in each group

3.4 对BAT中UCP1 mRNA相对表达的影响 同性别小鼠之间比较,模型组较正常组的UCP1 mRNA相对表达量显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),表明造模成功。在雌性小鼠中,与模型组相比,阳附片组、生附片组和阴附片组的UCP1 mRNA相对表达量显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与阳附片相比,生附片和阴附片的UCP1 mRNA相对表达量也有显著性差异($P < 0.05$)。在雄性小鼠中,与模型组相比,阳附片组的UCP1 mRNA相对表达量显著升高($P < 0.01$),生附片组、阴附片组则均无显著性差异;生

附片组和阴附片组的UCP1 mRNA相对表达量与阳附片组比较也有显著性差异($P < 0.05$)。见表1。

4 讨论

建昌帮作为江西两大药帮之一,具有非常完整的炮制体系,其炮制品不仅融百家之长,还创有独特之法。关于附子,2015年版《中国药典》主要记载了3种炮制品,但在《建昌帮中药炮制全书》中还记载了另外2种独特的附子炮制品及其用法,即经炮制后阴附片多用于女性体虚者,阳附片多用于男性体虚者。因此,本实验将小鼠进行雌雄分组,并加入生附片组来比较这2种附子炮制品的温热之性。

目前,BAT是代谢类疾病研究的热点对象,对维持能量平衡代谢和体温有着重要作用,主要作用机制为其细胞表面密布交感神经纤维,当中枢神经感受到变化后,释放去甲肾上腺素,通过激活 β_3 肾上腺素能受体通路作用于BAT细胞,促进细胞内甘油三酯水解,这一脂解作用会激活UCP1发生质子渗漏现象,从而产生热量以便维持正常体温^[11-13]。阳虚证的患者主要表现为畏冷腹泻、手脚冰冷,说明体内产生的热量不足以供给身体所需,造模时小鼠有畏冷抱团、持续性便溏的现象。现代研究表明,通过基因敲除技术使小鼠BAT中UCP1基因失活后,小鼠对寒冷不耐受^[14];通过手术将小鼠肩胛处BAT切除后复制阳虚模型^[15],结果发现BAT的功能会下降。因此,无论是从形态学观察还是BAT相关指标的测定,都表明本研究的小鼠阳虚模型造模成功。

本研究结果显示,阳虚证的小鼠会出现能量代

谢紊乱、发冷抱团、便血便溏、活动减少、垫料浸湿的现象。模型组小鼠不论雌性还是雄性,其BAT比重均有所下降,产热发挥重要作用的UCP1蛋白及其mRNA表达较低,给药组较同性别模型组小鼠的一般状况明显好转,活动增多,进食量增加,且雄性小鼠较雌性小鼠活泼。其中,与同性别模型组比较,雌性小鼠中阳附片和生附片的细胞空泡减少,阴附片也略有减少;在雄性小鼠中,生附片组、阴附片组和阳附片组较模型组细胞数量都有显著性增加;对于UCP1蛋白表达而言,雌性小鼠中阳附片组与模型组比较明显升高,雄性也是如此,且生附片组和阴附片组在雄性小鼠中的效果也较模型组显著升高;雌性小鼠中3个给药组的UCP1 mRNA相对表达量都较同性别模型组均有显著性差异,其中阳附片的差异最显著,雄性小鼠中只有阳附片组的UCP1 mRNA相对表达量较模型组有显著差异。综上所述,说明生附片、阴附片和阳附片对大黄所致的阳虚证均有明显改善作用,机制可能与促进UCP1蛋白及其mRNA表达,增强BAT活性有关;并且阳附片效果最好。

小鼠无论雌性还是雄性,阳附片对阳虚证的改善效果都极为显著,阴附片和生附片效果相差不大。这一结果与传统用法不太一致,笔者推测这可能与附子的炮制方法有关。阳附片是经砂炒后制备得到,火力旺盛,使得药物热性大,为“纯阳之药”,能更好的激活BAT;而阴附片是蒸制出来的,为“阳中之阴药”;生附片则只进行了净制和切制处理。这3种附子饮片都有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛的功效,其中生附片因毒性原因在临床中使用较少,由本研究结果可知,阳附片的补火助阳效果较优于阴附片,故建议在实际临床应用中,阳附片用于阳虚较严重者,阴附片用于阳虚较轻或体质较弱者。

因中药具有多成分、多靶点的作用特点,不能单一地认为阴附片和阳附片仅作用于BAT,后续将对可能存在的其他调节机制及其有效成分进行深入研究,从整体进行分析,以利于更加全面地反映阴附片和阳附片的用药特点,为这些特色炮制饮片的临床应用提供可靠的实验依据。

[参考文献]

[1] 任雪平. 脂肪组织的生物学功能[J]. 商丘师范学院

学报,2013,29(12):87-89.

- [2] 周红文,刘超,陈家伟. 脂肪组织的内分泌功能[J]. 国外医学·内分泌学分册,2002,22(1):34-36.
- [3] 王晓玲,朱敏. 人棕色脂肪细胞的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志,2016,43(1):103-107.
- [4] GUILHERME A, PEDERSEN D J, HENRIQUES F, et al. Neuronal modulation of brown adipose activity through perturbation of white adipocyte lipogenesis [J]. *Mol Metab*, 2018, 16: 116-125.
- [5] 卢文丽,方肇勤. 阳虚证动物模型诊断指标与评析[J]. 上海中医药杂志,2005,39(4):42-46.
- [6] 孙产仁. 中医学的阴气、阳气概念辨析[J]. 中华中医药杂志,2005,20(11):645-647.
- [7] 马晓丰,刘杨,张三国,等. 中药寒热相关药性和抑制脂肪酸合酶能力关系的探索[J]. 中国科学院大学学报,2012,29(5):699-706.
- [8] 范崔生全国名老中医药专家传承工作室. 樟树药帮中药传统炮制法经验集成及饮片图鉴[M]. 上海:上海科学技术出版社,2016:118-120.
- [9] 童恒力,钟凌云. 不同姜制附子对急性心力衰竭大鼠血流动力学的影响[J]. 中华中医药杂志,2019, 34(1):334-337.
- [10] 孙祥瑞,高家荣,汪庆飞,等. 补骨脂-肉豆蔻醇提物对脾虚泄泻小鼠水通道蛋白及结肠中细胞因子的影响[J]. 蚌埠医学院学报,2018,43(2):152-155,159.
- [11] JEŽEK P, JAŮBREK M, PORTER R K. Uncoupling mechanism and redox regulation of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1) [J]. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 2019, 1860(3):259-269.
- [12] HEINE M, FISCHER A W, SCHLEIN C, et al. Lipolysis triggers a systemic insulin response essential for efficient energy replenishment of activated brown adipose tissue in mice [J]. *Cell Metab*, 2018, 28(4): 644-655.
- [13] ZHAO L J, ZHU X Q, CONG R H, et al. The protective effects of Danggui-Baizhu-Tang on high-fat diet-induced obesity in mice by activating thermogenesis [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:1019.
- [14] RIPPE C, BERGER K, BÖIERS C, et al. Effect of high-fat diet, surrounding temperature, and enterostatin on uncoupling protein gene expression [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000, 279(2):E293-E300.
- [15] 唐汉庆,黄岑汉,黄赞松,等. 附子理中汤及拆方干预脾阳虚模型大鼠[J]. 中国组织工程研究,2013, 17(15):2743-2748.

[责任编辑 刘德文]