

# 激活 $\alpha 7$ nAChR 促进肥胖小鼠的脂肪稳态和米色脂肪生成及产热作用

包汉生<sup>1</sup>, 王苏童<sup>1</sup>, 吕穆杰<sup>1</sup>, 王永成<sup>2</sup>, 姜萍<sup>1</sup>, 李晓<sup>2</sup>

<sup>1</sup>山东中医药大学, 山东 济南 250355; <sup>2</sup>山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250014

**摘要:**目的 观察肥胖小鼠脂肪组织形态学改变以及脂代谢、炎症等相关指标的异常表现,探索激活 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体( $\alpha 7$ nAChR)促进肥胖机体白色脂肪米色化产热的作用机制。方法 取诱导成肥胖小鼠40只和10只低脂进食小鼠,分为空白组、高脂组、模型组、激动剂组、抑制剂组(10只/组)。苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠附睾白色脂肪组织,评估细胞数量、大小及形态。ELISA检测白色脂肪组织肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1(IL1 $\beta$ )、白细胞介素10(IL10)、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )表达水平。qRT-PCR检测白色脂肪一氧化氮合酶(iNOS)、精氨酸酶1(Arg1)mRNA。PCR检测解偶联蛋白(UCP-1)、PR结构域蛋白16(PRDM-16)、线粒体生成的关键调节因子(PGC-1 $\alpha$ )mRNA水平。Western blot检测白色脂肪核转录因子P65(NF- $\kappa$ B P65)、磷酸化蛋白酪氨酸激酶2(p-JAK2)、磷酸化传导及转录激活因子3(p-STAT3)表达水平。结果 与空白组比较,高脂组体质量明显增加( $P < 0.01$ ),白色脂肪组织中出现较多脂肪空泡,脂滴明显增大,iNOS mRNA及TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平升高( $P < 0.01$ ),而Arg-1 mRNA及IL-10、TGF- $\beta$ 水平降低( $P < 0.01$ );而与模型组相比,药物干预的3组体质量均有所减轻( $P < 0.05$ ),白色脂肪中脂滴缩小。激动剂组白色脂肪中PRDM-16、PGC-1 $\alpha$ 、UCP-1 mRNA下降最为明显。而激动剂组TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),IL-10、TGF- $\beta$ 水平升高( $P < 0.01$ ),M1/M2巨噬细胞比值降低。结论 激活 $\alpha 7$ nAChR后可以改善应用 $\beta 3$ 受体激动剂产生的白色脂肪组织稳态受损,促进白色脂肪中M1型巨噬细胞向M2型巨噬细胞转化减轻白色脂肪炎症反应,促进白色脂肪组织米色化,提高米色化产热效能。

**关键词:**肥胖;白色脂肪组织; $\alpha 7$ nAChR;产热;炎症反应

## Activation of $\alpha 7$ nAChR improves white fat homeostasis and promotes beige adipogenesis and thermogenesis in obese mice

BAO Hansheng<sup>1</sup>, WANG Sutong<sup>1</sup>, Lü Mujie<sup>1</sup>, WANG Yongcheng<sup>2</sup>, JIANG Ping<sup>1</sup>, LI Xiao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; <sup>2</sup>Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonist on  $\beta 3$ -adrenoceptor agonist-induced impairment of white fat homeostasis and beige adipose formation and heat production in obese mice. **Methods** Forty obese C57BL/6J mice were randomized into high-fat feeding group,  $\beta 3$ -adrenoceptor agonist-treated model group,  $\alpha 7$  nAChR agonist group, and  $\alpha 7$  nAChR inhibitor group ( $n=10$ ), with another 10 mice with normal feeding as the blank control group. White adipose tissue from the epididymis of the mice were sampled for HE staining of the adipocytes. The expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 and TGF- $\beta$  in the white adipose tissue were determined by ELISA, and the mRNA levels of iNOS, Arg1, UCP-1, PRDM-16 and PGC-1 $\alpha$  were detected using RT-qPCR. Western blotting was performed to detect the expression levels of NF- $\kappa$ B P65, p-JAK2, p-STAT3 in the white adipose tissue. **Results** Compared with those in the blank control group, the mice with high-fat feeding showed significantly increased body weight, more fat vacuoles in the white adipose tissue, increased volume of lipid droplets in the adipocytes, upregulated iNOS mRNA expression and protein expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and lowered expression of Arg-1 mRNA and IL-10 and TGF- $\beta$  proteins ( $P < 0.01$ ). Treatment with  $\alpha 7$  nAChR significantly reduced mRNA levels of PRDM-16, PGC-1 $\alpha$  and UCP-1, lowered TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  expressions, increased IL-10 and TGF- $\beta$  expressions, and reduced M1/M2 macrophage ratio in the white adipose tissues ( $P < 0.05$  or 0.01). **Conclusion** Activation of  $\alpha 7$  nAChR improves white adipose tissue homeostasis impairment induced by  $\beta 3$  agonist, promotes transformation of M1 to M2 macrophages, reduces inflammatory response in white adipose tissue, and promote beige adipogenesis and thermogenesis in obese mice.

**Keywords:** obesity; white adipose tissue;  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor; thermogenesis; inflammatory response

肥胖是脂肪组织过度堆积所导致的病理状态,对人体健康构成了严重的危害。研究发现,哺乳动物体内的脂肪可分为白色脂肪、棕色脂肪和米色脂肪<sup>[1]</sup>,其中白色

脂肪不直接参与机体产热<sup>[2]</sup>,但在一定刺激条件下可转化为米色脂肪,后者含有丰富的线粒体,具有产热和促进能量消耗的作用<sup>[3]</sup>。近些年来,防治肥胖的治疗主要集中在通过激活交感神经促进白色脂肪米色化以增加产热也越来越成为肥胖防治领域的焦点,但这一方法存在弊端<sup>[4,5]</sup>。肥胖机体由于过多营养物质,如葡萄糖、游离脂肪酸和氨基酸等的堆积,能够触发炎症因子造成体内

收稿日期:2023-11-29

基金项目:国家自然科学基金(81874449)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81874449).

作者简介:包汉生,在读硕士研究生,E-mail: 1448402879@qq.com

通信作者:姜萍,主任医师,教授,E-mail: lmdlmd6617@163.com

代谢异常,脂肪组织中常伴随着以巨噬细胞浸润为主的炎症反应,表现为有促炎作用的M1型巨噬细胞增多,抗炎作用的M2型巨噬细胞减少<sup>[6-8]</sup>。虽然刺激交感神经可以促进白色脂肪米色化,但会进一步加重炎症,不利于肥胖的长期治疗。因此,激活交感神经刺激的同时,减轻炎症反应,对肥胖的治疗具有重要意义。

$\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体( $\alpha 7$  nAChR)是胆碱能抗炎通路的主要受体之一,在抵抗机体炎症反应中起着重要作用<sup>[9]</sup>。既往研究已证实,机体外周脂肪组织中存在大量 $\alpha 7$  nAChR,肥胖时可导致脂肪组织中 $\alpha 7$  nAChR表达降低<sup>[10,11]</sup>。激活 $\alpha 7$  nAChR可以提升缺血脑组织中M2型巨噬细胞并降低M1型巨噬细胞,并可通过活化JAK2/STAT3选择性的阻止内质网应激导致的M2型巨噬细胞凋亡<sup>[12,13]</sup>。提示激活 $\alpha 7$  nAChR是改善肥胖机体脂肪组织炎症的潜在作用靶点。且近年来通过激活 $\alpha 7$  nAChR改善交感神经兴奋导致的白色脂肪炎症反应,激活交感神经促进白色脂肪米色化产热在文献记录上尚属空白,因此本研究旨在观察激活 $\alpha 7$  nAChR对白色脂肪组织中巨噬细胞表型转化及米色化效能的影响,并探讨其可能的作用机制,尝试解决激活交感神经促进白色脂肪米色化这一方法的实际应用障碍,为防治肥胖提供新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

8周龄雄性C57BL/6J小鼠,SPF级,50只,体质量20~23 g,购于浙江维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号:SCXK(浙)2019-0001,小鼠饲养于SPF级动物房,恒温恒湿,自由进食和饮水,12 h昼夜交替。高脂饲料(蛋白20%、碳水化合物20%、脂肪60%,能量5.24 kcal/g)和普通饲料均购买于济南朋悦实验动物繁育有限公司,许可证号:SCXK(京)2018-0006。所有动物实验部分均符合山东中医药大学动物伦理委员会标准(NO.2020-10)。

### 1.2 实验材料

$\alpha 7$  nAChR选择性激动剂GST-21(MCE); $\alpha 7$  nAChR选择性拮抗剂 $\alpha$ -BGT(ApeXbio); $\beta 3$ 肾上腺素受体激动剂CL316,243(MCE);小鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ );转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ );白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ );白细胞介素10(IL-10)酶联免疫吸附测定试剂盒(江莱生物公司);纤维类组织RNA快速提取试剂盒(离心柱型);SPARKscript II RT Plus Kit(With gDNA Eraser);2 $\times$ SYBR Green qPCR Mix(With ROX)(山东思科捷生物技术有限公司)。Anti-UCP1 Rabbit pAb(Servicebio);Anti-Mannose Receptor/CD206 Rabbit pAb(Servicebio);Anti-CD86 Rabbit pAb(Servicebio)。Western blot中一抗使用UCP-1

(abcam), BetaActin (proteintech), CHRNA7 (ABclonal), NF-KBp65 (ABclonal), STAT3 (abcam), p-STAT3 (abcam), JAK2 (abcam), p-JAK2 (abcam)。

### 1.3 实验仪器

ST8离心机(Thermo Scientific)、Multiskan Go型酶标仪(Thermo Scientific)、Arktik Thermal Cycler 96孔型PCR仪(Thermo Scientific)、Light Cycler 480 II荧光定量PCR仪(Roche)、EG1150H型石蜡包埋机(Leica)、RM2016病理切片机(上海徠卡仪器有限公司)、Nikon Eclipse E100型正置光学显微镜(日本尼康公司)、NIKON DS-U3成像系统(日本尼康公司)、Mini-PROTEAN垂直电泳仪(北京君意垂直电泳仪公司)型Trans-Blot转印槽(Bio-Rad)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 动物造模及干预方法 50只8周龄雄性C57BL/6J小鼠按随机数字表法分为对照组,高脂组,模型组,激动剂组,抑制剂组,10只/组。适应性喂养1周后,空白组继续以普通饲料饲养,其余各组以高脂饲料喂养建立肥胖模型,每周对各组小鼠的体质量进行1次称量并记录数据,高脂饲料饲养14周后,高脂饲料喂养组体质量大于普通饲料喂养组体质量20%即为模型建立成功<sup>[14]</sup>。其中模型组注射 $\beta 3$ 肾上腺素受体激动剂CL316243皮下注射(0.1 mg/kg,1次/d),连续注射2周<sup>[15]</sup>,以诱导白色脂肪米色化,激动剂组和抑制剂组给与注射 $\beta 3$ 肾上腺素受体激动剂CL316243的同时分别给与 $\alpha 7$  nAChR选择性激动剂GST-21(腹腔注射,4 mg/kg,1次/d<sup>[16]</sup>)、 $\alpha 7$  nAChR选择性拮抗剂 $\alpha$ -BGT(腹腔注射,1  $\mu$ g/kg,1次/d<sup>[17]</sup>),干预2周后处死各组小鼠。

1.4.2 标本获取 末次给药后,小鼠禁食10 h称质量,记录小鼠体质量。腹腔注射1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,麻醉后将小鼠置于解剖台上,留取附睾区白色脂肪组织,用于后续指标检测。

1.4.3 苏木素-伊红(HE)染色 将小鼠附睾区白色脂肪组织固定于脂肪固定液24 h以上,梯度脱水,石蜡包埋组织,切成5  $\mu$ m厚片放置蒸馏水中浸泡2 min,HE染色5 min后,流水冲洗10 min,于95%乙醇中脱水处理2 min,二甲苯5 min,透明,重复洗涤2次,滴加中性树脂封片,晾干,于显微镜下进行观察、拍照、分析。

1.4.4 RT-qPCR检测白色脂肪中相关mRNA的表达水平 采用RT-qPCR检测UCP-1、PRDM16、Arg1、iNOS、PGC-1 $\alpha$  mRNA表达水平,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据分析,引物序列见表1。

1.4.5 ELISA法检测白色脂肪中相关指标 取小鼠附睾区白色脂肪,严格按照ELISA试剂盒说明书进行操作,应用酶标仪测定450 nm的吸光度 $A_{490\text{nm}}$ ,以 $A_{490\text{nm}}$ 为横坐标,标准品浓度为纵坐标,根据标准曲线计算出小鼠白色脂肪中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-10和TGF- $\beta$ 水平。

表1 RT-qPCR引物序列

Tab.1 Sequence of primers for RT-qPCR

Name	Primary sequence (5'→3')	Product (bp)
UCP-1	Forward: GAAACACCTGCCTCTCTCGGAAAC	103
	Reverse: GCATTCTGACCTTCACGACCTCTG	
iNOS	Forward: ATCTTGAGCGAGTTGTGGATTGTC	131
	Reverse: TAGGTGAGGGCTTGGCTGAGTG	
Arg1	Forward: AGACAGCAGAGGAGGTGAAGAGTAC	107
	Reverse: AAGGTAGTCAGTCCCTGGCTTATGG	
PGC-1 $\alpha$	Forward: CGATGACCCTCCTCACACCAAAC	97
	Reverse: TTGCGACTGCGGTTGTGTATGG	
PRDM16	Forward: CAGCAACCTCCAGCGTCACATC	81
	Reverse: GCGAAGGTCTTGCCACAGTCAG	
GAPDH	Forward: CCT TCC GTG TTC CTA CCC C	131
	Reverse: GCC CAA GAT GCC CTT CAG T	

1.4.6 Western blot法检测白色脂肪 裂解液裂解白色脂肪,4 °C、15000×g离心10 min,取上清,提取总蛋白,用蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,制备SDS-PAGE凝胶,半干转膜至PVDF膜,用5%脱脂奶粉摇床上封闭1 h,三羟甲基氨基甲烷缓冲液与补间(TBST)洗净加入一抗过夜,回收一抗用TBST洗净后,PVDF膜加入二抗摇床1 h。TBST洗净,滴加ECL化学发光液显影、成像。采用Image软件分析量化。

1.4.7 免疫组化 石蜡切片脱蜡至水,组织切片置于盛有抗原修复缓冲液(pH=6.0)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复。自然冷却后洗涤3次。切片置于磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,5 min/次。在组化圈内滴加3%BSA均匀覆盖组织,加一抗过夜后用PBS在摇床上洗涤3次,之后加二抗室温孵育50 min,用PBS在摇床上洗涤3次。切片稍甩干后加钻石荧光显色液(DAB显色液),苏木素复染3 min,脱水封片,显微镜镜检,图像采集分析。

#### 1.5 统计学分析

采用SPSS 21.0软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差表示,两组均数之间比较采用独立样本t检

验;多组间比较采用单因素方差分析,事后检验采用LSD-t检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠体质量的变化

正式造模前,各组小鼠体质量无统计学差异( $P>0.05$ ),饲养14周后,高脂饲料喂养的各组小鼠体质量超过空白组体质量的20%以上,表明肥胖模型建立成功,高脂各组体质量明显高于空白组( $P<0.01$ )。经药物干预2周后,模型组体质量低于高脂组( $P<0.05$ ),模型组低于抑制剂组( $P<0.05$ ),激动剂组体质量低于模型组( $P<0.01$ ,表2)。

### 2.2 激活 $\alpha 7$ nAChR对白色脂肪脂滴的影响

在光镜下,与空白组相比,高脂组白色脂肪平均脂滴面积明显增大( $P<0.01$ ),与高脂组相比,模型组脂滴面积缩小( $P<0.01$ ),与模型组相比,激动剂组脂滴面积进一步缩小( $P<0.05$ )。与高脂组、激动剂组相比,抑制剂组脂滴面积却较激动剂组和模型组增加( $P<0.01$ , $P<0.05$ ,图1)。

表2 各组小鼠体质量比较

Tab.2 Comparison of body weight of the mice among the groups (g, Mean±SD, n=10)

Group	Weeks		
	0	12	14
Blank	21.40±0.78	29.60±0.83	30.59±1.00
High fat	20.81±1.01	40.22±0.65**	43.79±0.81**
Model	21.31±0.98	40.19±0.75	36.89±0.67 $\Delta\Delta$ **
Agonist	21.45±0.81	40.59±0.59	34.14±0.65 $\Delta\Delta$ **
Inhibitor	21.04±0.96	40.07±0.56	43.2±0.81

\*\* $P<0.01$  vs Blank group;  $\Delta\Delta$  $P<0.01$  vs High fat group;  $\Delta\Delta$  $P<0.01$  vs Model group;  $\Delta\Delta$  $P<0.01$  vs Inhibitor group.

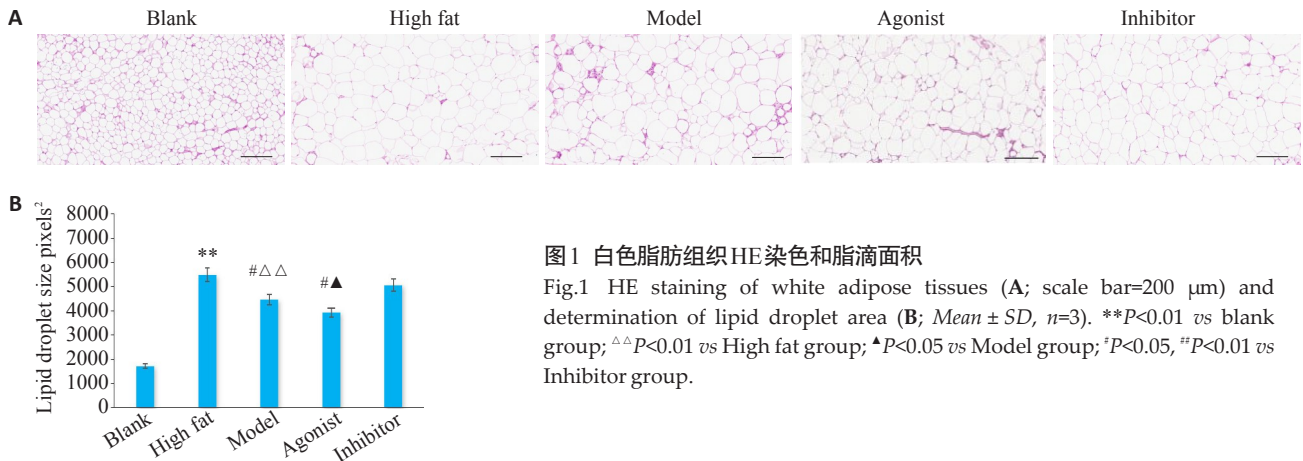


图1 白色脂肪组织HE染色和脂滴面积

Fig.1 HE staining of white adipose tissues (A; scale bar=200 μm) and determination of lipid droplet area (B; Mean ± SD, n=3). \*\*P<0.01 vs blank group; △△P<0.01 vs High fat group; ▲P<0.05 vs Model group; †P<0.05, ††P<0.01 vs Inhibitor group.

### 2.3 激活α7 nAChR对白色脂肪米色化产热的影响

PCR结果显示,与空白组相比,高脂组小鼠白色脂肪组织UCP-1、PRDM-16、PGC-1α mRNA水平分别下降(P<0.01),与高脂组小鼠相比,模型组UCP-1、PRDM-16、PGC-1α mRNA较空白组分别升高(P<0.01)。与模型组相比,激动剂组UCP-1、PRDM-16 mRNA水平较模型组升高(P<0.01),PGC-1α mRNA水平升高,但差

异无统计学意义。与模型组、激动剂组相比,抑制剂组UCP-1、PRDM-16、PGC-1α mRNA水平分别降低(P<0.01)。免疫组化结果显示,与空白组相比,高脂组小鼠白色脂肪组织UCP-1表达水平下降(P<0.01)。与高脂组相比,模型组UCP-1表达水平升高(P<0.01)。与高脂组、模型组、抑制剂组相比,激动剂组UCP-1表达水平升高(P<0.01,图2、3)。

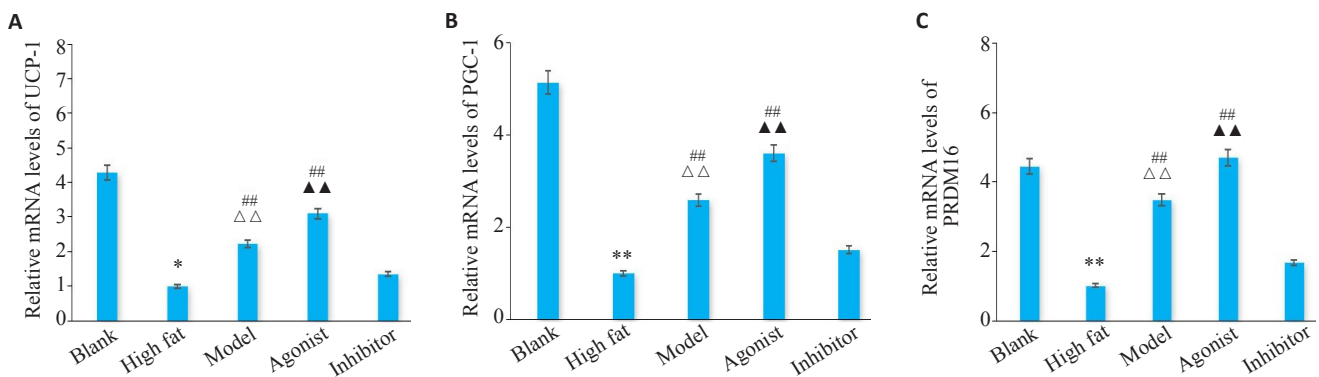


图2 各组小鼠白色脂肪组织UCP-1、PRDM16及PGC-1α的mRNA表达水平

Fig.2 Expression levels of UCP-1 (A), PRDM16 (B) and PGC-1α (C) mRNAs in the white adipose tissue of the mice in each group. Data are presented as Mean±SD (n=3). \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs Blank group; △△P<0.01 vs High fat group; ▲▲P<0.01 vs model group; ††P<0.01 vs Inhibitor group.

### 2.4 激活α7 nAChR对白色脂肪炎症标志物及炎症因子的影响

与空白组相比,高脂组iNOS mRNA、TNF-α、IL-1β水平升高(P<0.01),Arg1 mRNA、TGF-β、IL-10水平降低(P<0.01)。与高脂组相比,模型组iNOS mRNA、TNF-α、IL-1β水平升高(P<0.01),Arg1 mRNA、TGF-β、IL-10水平降低(P<0.01)。与模型组相比,激动剂组iNOS mRNA、TNF-α、IL-1β水平降低(P<0.05),Arg1 mRNA、TGF-β、IL-10水平升高(P<0.01)。与模型组、激

动剂组相比,抑制剂组iNOS mRNA水平、TNF-α、IL-1β水平升高,但差异没有统计学意义(P>0.05)。Arg1 mRNA水平、TGF-β、IL-10水平降低(P<0.05, P<0.01, 图4)。

### 2.5 激活α7 nAChR对白色脂肪CD206、CD86的影响

与空白组相比,高脂组CD86表达水平上升(P<0.05),CD206降低(P<0.01)。与高脂组相比,模型组CD86水平升高(P<0.01),CD206水平降低(P<0.01)。与模型组、高脂组相比,激动剂组CD86水平明显降低

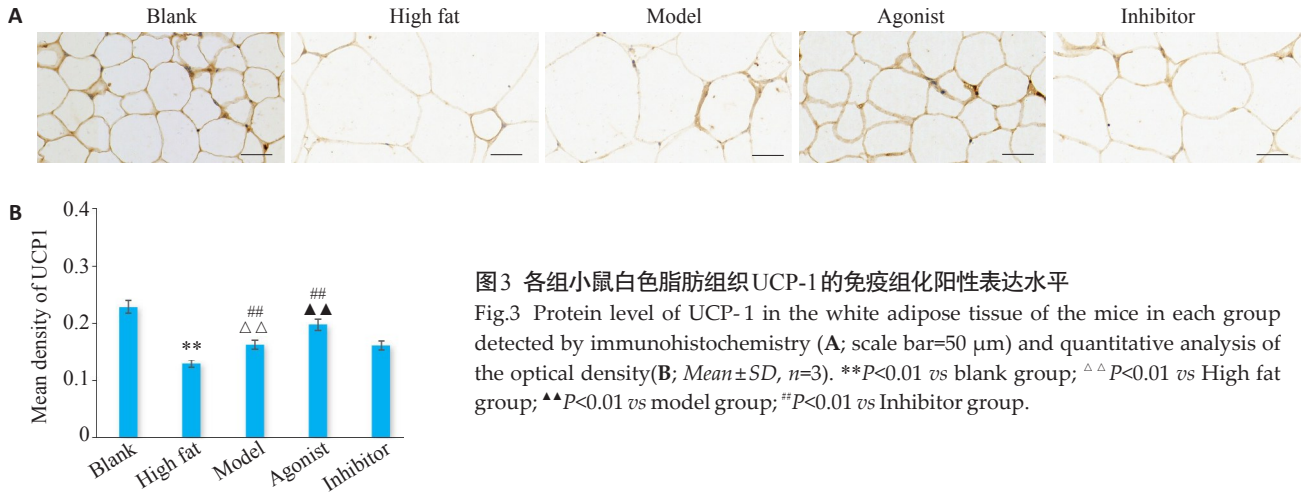


图3 各组小鼠白色脂肪组织UCP-1的免疫组化阳性表达水平

Fig.3 Protein level of UCP-1 in the white adipose tissue of the mice in each group detected by immunohistochemistry (A; scale bar=50 μm) and quantitative analysis of the optical density(B; Mean±SD, n=3). \*\*P<0.01 vs blank group; <sup>△△</sup>P<0.01 vs High fat group; <sup>▲▲</sup>P<0.01 vs model group; <sup>#</sup>P<0.01 vs Inhibitor group.

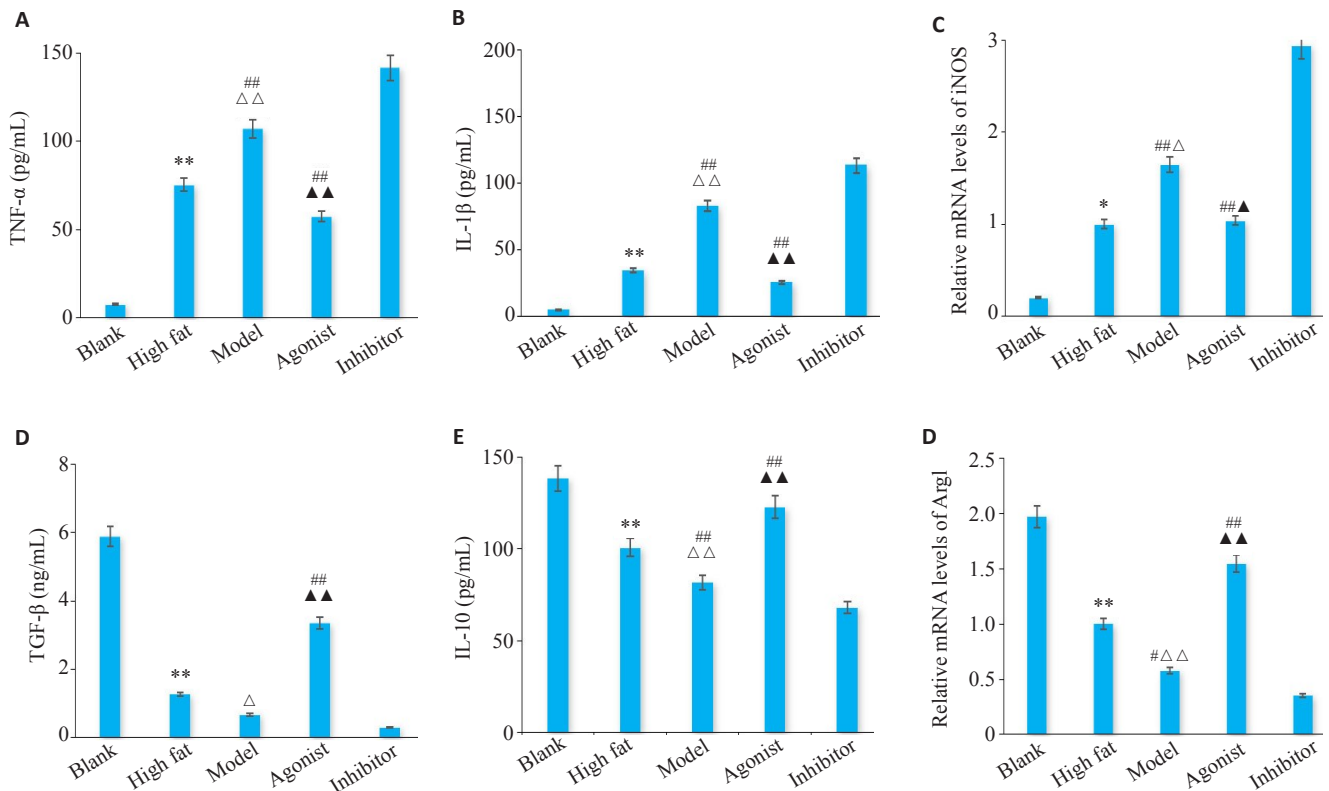


图4 各组小鼠白色脂肪组织中iNOS、Arg1 mRNA表达水平及炎症因子TNF-α、IL-1β、TGF-β、IL-10含量

Fig.4 Expression levels of iNOS and Arg1 mRNA and the contents of TNF-α, IL-1β, TGF-β and IL-10 in the white adipose tissue of the mice in each group. A-C: Levels of proinflammatory factors released (A, B) and M1-type macrophage markers (C). D-F: Anti-inflammatory factors released (D, E) and M2-type macrophage markers (F). Data are presented as Mean±SD (n=3). \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs Blank group; <sup>△</sup>P<0.05, <sup>△△</sup>P<0.01 vs High fat group; <sup>▲</sup>P<0.01 vs Model group; <sup>#</sup>P<0.05, <sup>##</sup>P<0.01 vs Inhibitor group.

( $P<0.05$ ), CD206水平升高( $P<0.01$ )。与模型组、高脂组相比,抑制剂组CD86水平升高,但差异没有统计学意义( $P>0.05$ )、CD206水平降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ , 图5A、C示CD206;B、D示CD86)。  
2.6 激活 $\alpha 7$  nAChR对白色脂肪促炎通路及抑炎通路的影响

与空白组相比,高脂组小鼠白色脂肪组织 $\alpha 7$  nAChR、p-STAT3、p-JAK2表达水平下降( $P<0.05$ ),NF- $\kappa$ B p65表达水平上升( $P<0.01$ )。与高脂组相比,模型组小鼠脂肪组织 $\alpha 7$  nAChR、p-STAT3、p-JAK2表达水平下降( $P<0.05$ ),NF- $\kappa$ B p65表达水平上升( $P<0.01$ )。与模型组相比,激动剂组 $\alpha 7$  nAChR、p-STAT3、p-JAK2表达

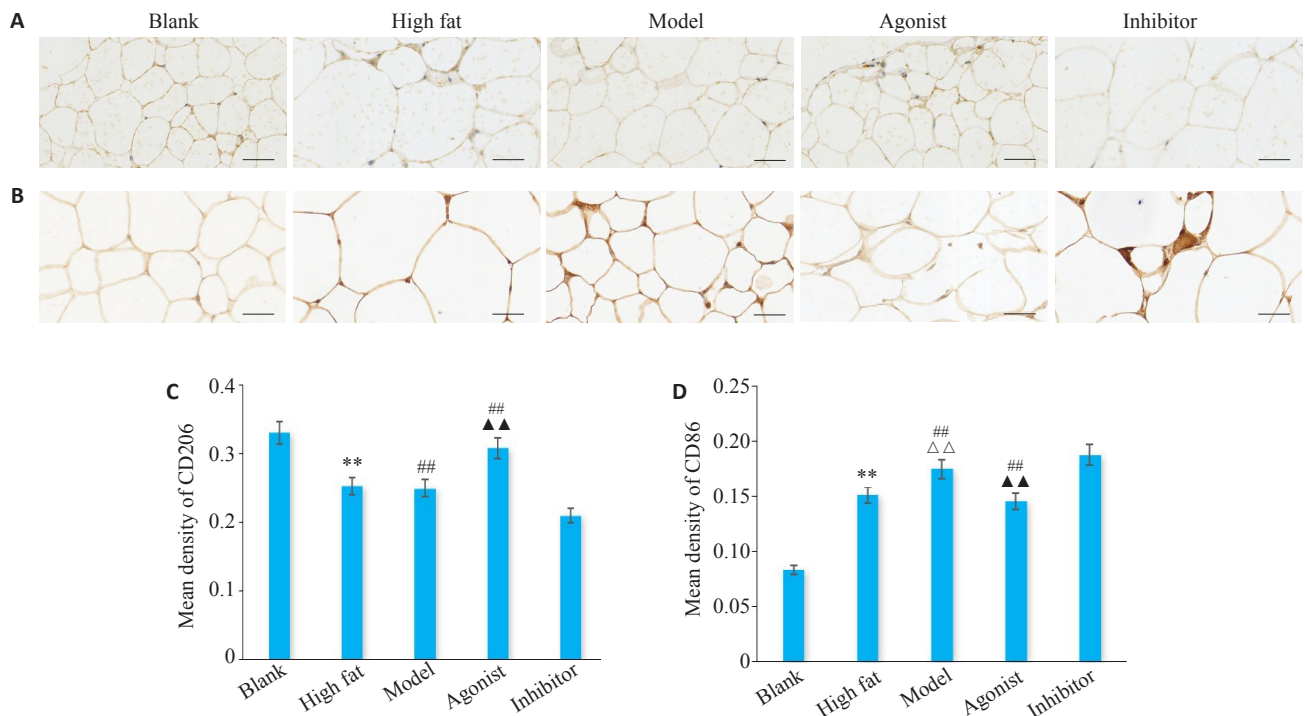


图5 各组小鼠白色脂肪组织CD206、CD86的免疫组化阳性表达水平

Fig.5 Protein levels of CD206 and CD86 in white adipose tissue of the mice in each group detected by immunohistochemistry (scale bar=50 μm). A, C: Immunohistochemistry for CD206 in the white adipose tissue in each group. B, D: Immunohistochemistry for CD86 in each group. Data are presented as Mean±SD (n=3). \*\*P<0.01 vs Blank group; ▲▲ P<0.01 vs High fat group; ▲▲ P<0.01 vs Model group; #P<0.01 vs Inhibitor group.

水平上升( $P<0.01$ ),NF-κB p65 表达水平下降( $P<0.01$ )。抑制剂组α7 nAChR、p-STAT3、p-JAK2 表达水平较模型组、激动剂组下降( $P<0.01$ ),NF-κB p65 表达水平较高脂组,激动剂组上升( $P<0.01$ ,图6)。

### 3 讨论

肥胖是一种慢性、复发和多因素疾病,其特征是体内多余的脂肪组织堆积而成的,主要与白色脂肪组织中的炎症以及促炎M1巨噬细胞和其它免疫细胞增加有关。研究发现白色脂肪在交感神经刺激下可转化为米色脂肪,通过米色脂肪产热可起到减脂的作用<sup>[18]</sup>。既往研究证明,刺激白色脂肪交感神经可激活环磷酸腺苷/蛋白激酶A(cAMP/PKA)通路,促进脂肪甘油三酯脂肪酶(ATGL)、激素敏感性脂肪酶(HSL)和围脂滴蛋白(Perilipin)磷酸化,从而导致脂肪分解产生游离脂肪酸<sup>[19]</sup>。但是激活交感神经会强化IKKβ/NF-κB促炎通路活性<sup>[20]</sup>,促进M1巨噬细胞分泌TNF-α、IL-1β因子,从而加重其炎症反应。Okla等<sup>[21]</sup>还发现激活M1型巨噬细胞表面 toll 样受体 4 (TLR4) 和 Nod 样受体 3 (NLRP3)可致脂肪细胞氧化应激和线粒体功能障碍,同样导致激活β3受体介导的白色脂肪“米色化”受到抑

制,因此长时间激活交感神经会破坏白色脂肪组织微环境稳态,影响其产热效能。本研究结果显示高脂饮食后各组小鼠体质量均增加,而激动剂组较其它高脂饮食各组体质量减轻最为明显,产热因子UCP-1、PRDM-16、PGC-1α mRNA水平较模型组明显升高,说明了增加产热反应可促进白色脂肪的消耗,推动减脂。模型组的炎症反应加剧,提示激活β3受体促进产热的同时会破坏白色脂肪组织稳态,而使用α7 nAChR后,激动剂组不仅白色脂肪组织脂滴面积减少,且炎症水平降低。加用α7 nAChR受体抑制剂后可减弱上述作用,进一步提示激活α7 nAChR后能减轻机体炎症反应,促进白色脂肪米色化,增强产热效能。

既往研究证明,激活α7 nAChR后可通过增加环加氧酶2表达和前列素E2的合成来减少炎症反应治疗阿尔茨海默症<sup>[22]</sup>。Liu等<sup>[23]</sup>发现激活α7 nAChR可减轻碘乙酸单钠(MIA)诱导的关节疼痛退化和骨关节疼痛,通过比较正常人和膝骨关节炎患者发现,膝关节炎患者α7 nAChR降低,自噬和细胞凋亡失衡。刘慧阳等<sup>[24]</sup>通过总结发现在抗抑郁作用的关键受体是α7 nAChR,它可以介导胆碱能抗炎途径(CAP)的激活表现良好的治疗抑郁效果。吴淑杰等<sup>[25]</sup>发现使用α7 nAChR激动剂

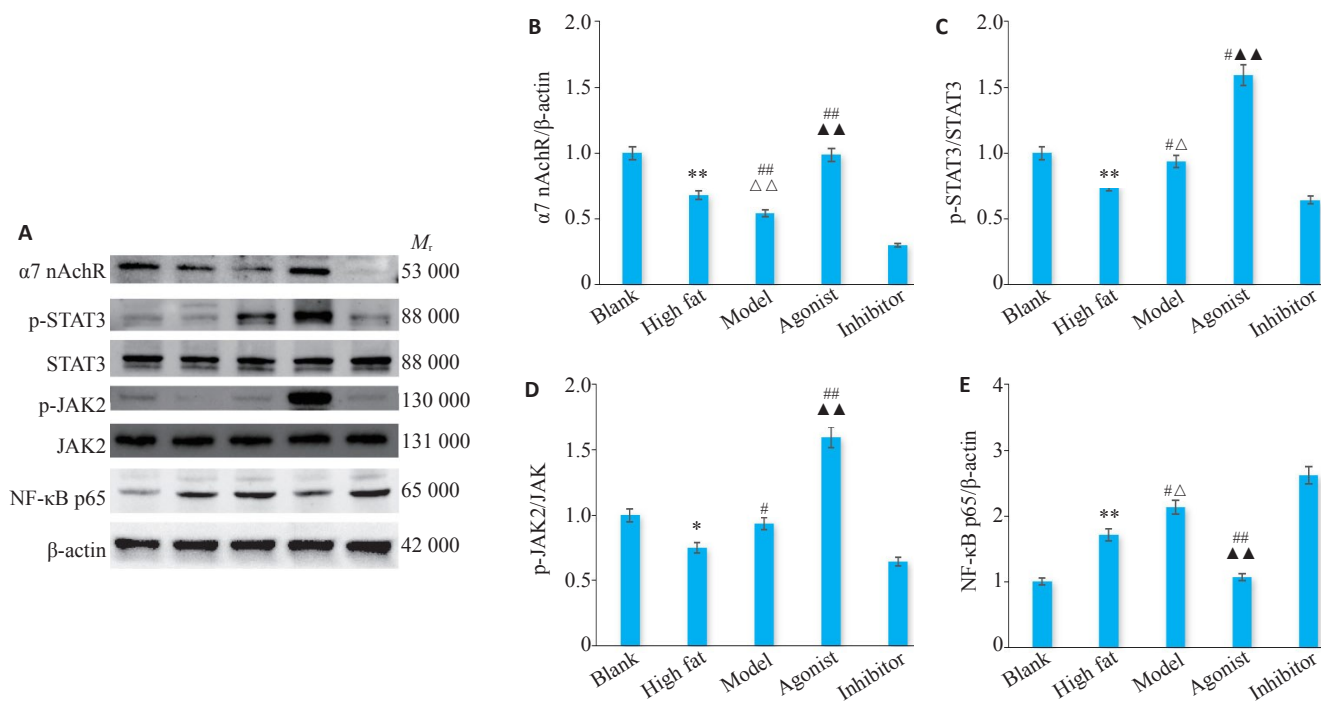


图6 各组小鼠白色脂肪组织中 $\alpha 7$  nAChR、p-STAT3、p-JAK2、NF- $\kappa$ B p65蛋白表达量

Fig.6 Protein expressions of  $\alpha 7$  nAChR, p-STAT3, p-JAK2 and NF- $\kappa$ B p65 in white adipose tissue of the mice. A: Western blots of  $\alpha 7$  nAChR, p-STAT3, p-JAK2 and NF- $\kappa$ B p65 in each group. B-E: Quantitative analysis of the protein expressions (Mean $\pm$ SD, n=3). \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs Blank group;  $\Delta$  $P$ <0.05 vs High fat group; ## $P$ <0.01 vs Model group;  $\Delta$  $P$ <0.05,  $\Delta\Delta$  $P$ <0.01 vs Inhibitor group.

GTS-21可以改善自主神经平衡,抑制NF- $\kappa$ B通路激活以及减少肾纤维化和炎症反应。齐勇等<sup>[26]</sup>综述说明 $\alpha 7$  nAChR信号传导在肥胖诱导的慢性炎症中起关键作用,最终表明在肥胖机体体内限制了 $\alpha 7$  nAChR的表达。Kumi等<sup>[27]</sup>证明抑制 $\alpha 7$  nAChR加剧了小鼠的肝脏炎症和纤维化。以上证据均证明了激活 $\alpha 7$  nAChR可抵抗炎症,降低炎症反应带来的负面影响。

巨噬细胞可能受到多种因素影响,而改变其表型, M1巨噬细胞主要参与促炎反应, M2巨噬细胞主要参与抗炎反应,通过调节巨噬细胞的活化状态来改善炎症环境是治疗炎症类疾病的有效方法<sup>[28]</sup>。在高脂肪饮食小鼠模型中,调节M1、M2巨噬细胞平衡可改善高脂血症,炎症和心肌损伤,在疼痛发生时M2巨噬细胞可以分泌抑炎因子从而达到抑制疼痛的作用, M2巨噬细胞似乎是促进疼痛缓解的多种内源性途径的主要参与者<sup>[29]</sup>。促进M2巨噬细胞的极化增加抗炎因子可以缓解脓毒血症患者的急性肾损伤<sup>[30]</sup>。大量证据表明调节M1、M2巨噬细胞的平衡在改善机体炎症反应方面有重要作用。

激活 $\alpha 7$  nAChR受体可激活JAK2/STAT3通路以阻止NF- $\kappa$ B进入细胞核与DNA结合,抑制促炎因子转录合成<sup>[32]</sup>,减少促炎因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ,增加抑炎因子TGF- $\beta$ 、IL-10的产生。实验中模型组小鼠应用 $\beta 3$ 受体激动剂后促使白色脂肪组织释放NE,作用于脂肪组织

$\beta$ -AR,增加cAMP水平和PKA活性,从而使白色脂肪组织产热基因UCP-1、PRDM16及PGC-1 $\alpha$ 等表达量增高。同时该组小鼠白色脂肪组织中促炎通路NF- $\kappa$ B p65表达水平上升、脂滴面积增大,提示 $\beta 3$ 受体激动剂可促进白色脂肪的产热反应,但加重其炎症反应,增强的炎症反应导致白色脂肪组织微环境稳态受损。实验中使用GTS-21激活激动剂组小鼠 $\alpha 7$  nAChR后,促炎通路NF- $\kappa$ B p65表达降低,抑炎通路p-STAT3、p-JAK2的表达升高,实验结果显示M1巨噬细胞标志物及其分泌的促炎因子降低, M2巨噬细胞标志物及其分泌的抑炎因子升高,提示M1/M2比值降低,机体炎症反应降低。此外研究表明, M1型巨噬细胞数量降低可弱化toll样受体4 (TLR4)和Nod样受体3(NLRP3)对脂肪组织的线粒体功能障碍的影响<sup>[33,34]</sup>,我们的结果也提示 $\alpha 7$  nAChR后白色脂肪组织产热相关基因UCP-1,激活表明激活 $\alpha 7$  nAChR可以进一步降低脂滴面积,改善炎症水平,有利于维持白色脂肪组织的稳态,促进米色化产热效能。

综上所述,激活 $\alpha 7$  nAChR可促进巨噬细胞M1型向M2型转化,降低M1/M2的比值;激活JAK2/STAT3通路;减少促炎因子TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的释放,增加抑炎因子TGF- $\beta$ 、IL-10释放,从而减轻脂肪组织炎症反应,以维持白色脂肪组织微环境稳态,起到促进白色脂肪组织米色化、提高米色化产热效能的作用。

## 参考文献:

- [1] Kaisanlahti A, Glumoff T. Browning of white fat: agents and implications for beige adipose tissue to type 2 diabetes[J]. *J Physiol Biochem*, 2019, 75(1): 1-10.
- [2] Gulyaeva O, Dempersmier J, Sul HS. Genetic and epigenetic control of adipose development[J]. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Biol Lipids*, 2019, 1864(1): 3-12.
- [3] Cohen P, Kajimura S. The cellular and functional complexity of thermogenic fat[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22: 393-409.
- [4] Zeng X, Ye MC, Resch JM, et al. Innervation of thermogenic adipose tissue *via* a calsyntenin3 $\beta$ -S100b axis[J]. *Nature*, 2019, 569: 229-35.
- [5] 马度芳, 姜萍, 王永成, 等. 肾上腺素能系统介导的棕色/米色脂肪产热在治疗肥胖中的应用局限性[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2017, 33(7): 625-8.
- [6] Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(1): 1-4.
- [7] Purdy JC, Shatzel JJ. The hematologic consequences of obesity[J]. *Eur J Haematol*, 2021, 106(3): 306-19.
- [8] Dong M, Yang XY, Lim S, et al. Cold exposure promotes atherosclerotic plaque growth and instability *via* UCP1-dependent lipolysis[J]. *Cell Metab*, 2013, 18(1): 118-29.
- [9] 马度芳, 蔡璐, 姜萍, 等. 激活 $\alpha 7$  nAChR通过抑制慢性炎症反应减轻饮食诱导的大鼠肥胖型高血压[J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(12): 2131-8.
- [10] Huang H, Xu Y, van den Pol AN. Nicotine excites hypothalamic arcuate anorexigenic proopiomelanocortin neurons and orexigenic neuropeptide Y neurons: similarities and differences [J]. *J Neurophysiol*, 2011, 106(3): 1191-202.
- [11] Canello R, Zulian A, Maestrini S, et al. The nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  in subcutaneous mature adipocytes: downregulation in human obesity and modulation by diet-induced weight loss[J]. *Int J Obes: Lond*, 2012, 36(12): 1552-7.
- [12] Han Z, Shen F, He Y, et al. Activation of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor reduces ischemic stroke injury through reduction of pro-inflammatory macrophages and oxidative stress [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105711.
- [13] Lee RH, Vazquez G. Evidence for a prosurvival role of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor in alternatively (M2)-activated macrophages[J]. *Physiol Rep*, 2013, 1(7): e00189.
- [14] Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents [J]. *Obesity: Silver Spring*, 2007, 15(4): 798-808.
- [15] Shin W, Okamatsu-Ogura Y, Machida K, et al. Impaired adrenergic agonist-dependent beige adipocyte induction in aged mice [J]. *Obesity: Silver Spring*, 2017, 25(2): 417-23.
- [16] Al-Sharea A, Lee MKS, Whillas A, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 stimulation dampens splenic myelopoiesis and inhibits atherogenesis in Apoe<sup>-/-</sup> mice[J]. *Atherosclerosis*, 2017, 265: 47-53.
- [17] Liu Z, Wang Y, Wang Y, et al. Dexmedetomidine attenuates inflammatory reaction in the lung tissues of septic mice by activating cholinergic anti-inflammatory pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 35: 210-6.
- [18] Warner A, Mittag J. Breaking BAT: can browning create a better white?[J]. *J Endocrinol*, 2016, 228(1): R19-29.
- [19] Geerling JJ, Boon MR, Kooijman S, et al. Sympathetic nervous system control of triglyceride metabolism: novel concepts derived from recent studies[J]. *J Lipid Res*, 2014, 55(2): 180-9.
- [20] Purkayastha S, Zhang G, Cai DS. Uncoupling the mechanisms of obesity and hypertension by targeting hypothalamic IKK- $\beta$  and NF- $\kappa$ B[J]. *Nat Med*, 2011, 17: 883-7.
- [21] Okla M, Zaher W, Alfayez M, et al. Inhibitory effects of toll-like receptor 4, NLRP3 inflammasome, and interleukin-1 $\beta$  on white adipocyte browning[J]. *Inflammation*, 2018, 41(2): 626-42.
- [22] Hoskin JL, Al-Hasan Y, Sabbagh MN. Nicotinic acetylcholine receptor agonists for the treatment of Alzheimer's dementia: an update[J]. *Nicotine Tob Res*, 2019, 21(3): 370-6.
- [23] Liu Y, Xu S, Zhang HJ, et al. Stimulation of  $\alpha 7$ -nAChRs coordinates autophagy and apoptosis signaling in experimental knee osteoarthritis[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12: 448.
- [24] Liu H, Zhang X, Shi P, et al.  $\alpha 7$  Nicotinic acetylcholine receptor: a key receptor in the cholinergic anti-inflammatory pathway exerting an antidepressant effect[J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 84.
- [25] Wu SJ, Shi ZW, Wang X, et al. Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway attenuated angiotension II-dependent hypertension and renal injury [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 593682.
- [26] Qi Y, Si D, Zhu L, et al. High-fat diet-induced obesity affects alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor expressions in mouse lung myeloid cells[J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 18368.
- [27] Kimura K, Inaba Y, Watanabe H, et al. Nicotinic alpha-7 acetylcholine receptor deficiency exacerbates hepatic inflammation and fibrosis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis [J]. *J Diabetes Investig*, 2019, 10(3): 659-66.
- [28] Yunna C, Mengru H, Lei W, et al. Macrophage M1/M2 polarization [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 877: 173090.
- [29] Zhao W, Ma L, Deng D, et al. M2 macrophage polarization: a potential target in pain relief[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1243149.
- [30] Ma K, Liu JF, Zheng ZR, et al. The polarization of M2 macrophages can be adjusted to alleviate renal injury by methylprednisolone in sepsis-AKI[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2023, 747: 109738.
- [31] 马度芳, 姜萍, 杨金龙, 等. 调节自主神经系统: 心血管疾病抗炎治疗的新领域[J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(2): 374-8, 384.
- [32] Pavlov VA, Tracey KJ. The vagus nerve and the inflammatory reflex-linking immunity and metabolism[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2012, 8: 743-54.
- [33] Zhu X, Dai S, Xia B, et al. Activation of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor mitigates osteoarthritis progression by inhibiting NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome activation and enhancing autophagy[J]. *PLoS One*, 2021, 16(12): e0256507.
- [34] Youssef ME, Abdelrazek HM, Moustafa YM. Cardioprotective role of GTS-21 by attenuating the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats[J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2021, 394(1): 11-31.

(编辑:余诗诗)