用^{1}H－MRS评价利拉鲁肽对肥胖小鼠脂质代谢影响的研究

辛　颖　闫　爽

摘　要　目的　运用氢质子磁共振波谱(proton magnetic resonance spectroscopy, ^{1}H－MRS)评价利拉鲁肽(liraglutide)对肥胖小鼠模型体内不同部位、不同性质脂肪代谢的影响。**方法**　将32只6周龄清洁级C57BL6雄性小鼠随机分为4组,每组8只,其中一组给予正常饮食,另外3组给予高脂饮食以建立肥胖小鼠模型。8周后,与正常饮食组比较,高脂饮食组体质量平均增长超过30%,表明肥胖小鼠造模成功。将成功造模后的高脂饮食组随机分为利拉鲁肽(glucagon－like peptide －1, GLP－1)组、隔日禁食(altenative day fasting, ADF)组和高脂对照(high－fat diet, HFD)组, GLP－1组和HFD组分别继续给予高脂饮食, ADF组与正常对照(control)组给予普通饲料喂养。GLP－1组每日皮下注射利拉鲁肽0.4mg/(kg·d), ADF组为每隔24h给予正常饲料,期间自由饮水。干预16周末,取活体小鼠,在9.4T MicroMR成像设备上通过氢质子磁共振波谱(proton magnetic resonance spectroscopy, ^{1}H－MRS)技术检测各组小鼠肩胛间区棕色脂肪、肝脏及腹股沟区白色脂肪的甘油三酯(triglyceride, TG)含量。**结果**　干预前各组小鼠体质量比较差异无统计学意义,随喂养时间的延长,各组小鼠平均体质量均呈明显升高的趋势($P<0.05$)。干预16周末,GLP－1组小鼠平均体质量明显低于HFD($P=0.009$),而高于正常对照组($P=0.011$),差异均有统计学意义($P<0.05$)。4组小鼠肩胛部棕色脂肪TG平均含量比较未发现各组之间差异有统计学意义。肝脏TG平均含量比较发现,仅GLP－1和HFD之间差异有统计学意义($P=0.045$)。腹股沟白脂肪TG平均含量比较发现,与GLP－1小鼠比较,正常对照组小鼠腹股沟白脂肪TG平均含量明显降低($P=0.002$),HFD组小鼠腹股沟白脂肪TG平均含量明显升高($P=0.015$)。**结论**　利拉鲁肽可显著降低肥胖小鼠体质量,改善肥胖小鼠脂质代谢,尤其在改善肝脏脂质代谢方面表现出格外优势,表明利拉鲁肽在通过减轻体质量所致整体代谢参数的改善的同时,还有不依赖于体改善影响脂质代谢的其他途径。

关键词　利拉鲁肽　肝脏　棕色脂肪　白色脂肪　脂质代谢　氢质子磁共振波谱

中图分类号　R575　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2019.10.027

Effects of Liraglutide on Lipid Metabolism in Obese Mice Using ^{1}H－MRS. *Xin Ying, Yan Shuang. Department of Endocrinology, The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Heilongjiang 150001, China*

Abstract　Objective　To observe the effect of lipid metabolism of liralgutide in different parts of obese mice which evaluated by proton magnetic resonance spectroscopy (^{1}H－MRS). **Methods**　32 clean grade C57BL6 male mice aged 6 weeks were randomly divided into high－fat diet group ($n=24$) and normal controlgroup ($n=8$). After 8 weeks, the average body weight of the high－fat diet group increased more than 30% than that of the control group, which indicated that the model of high fat was successful. The high－fat diet group was randomly divided into three groups: the GLP－1 group, the ADF group and the HFD group. GLP－1 group and HFD group were fed with high－fat diet respectively, the ADF and the normal control group were fed with normal diet. The GLP－1 group was given daily subcutaneous injection of liraglutide 0.4mg/(kg·d). The ADF group was given normal diet every 24 hours, during which free drinking water was given. At the end of 16 weeks of intervention, the relative fat content in the interscapular area, the white fat in liver and inguinal area of mice was measured by ^{1}H－MRS. **Results**　Before intervention, there was no significant difference in the weight of each group. With the prolongation of feeding time, the average body weight of each group was obviously increased ($P<0.05$). At the end of 16 weeks, the average body weight of GLP－1 group was significantly lower than that of HFD ($P=0.009$), but higher than that of Control ($P=0.011$), and the difference was statistically significant ($P<0.05$). As for comparison of TG content in different parts of four groups after intervention under ^{1}H－MRS, there was no significant difference in the average TG content of brown fat in scapula between the four groups. Only the difference between GLP－1 and HFD was statistically significant ($P=0.045$). Compared with GLP－1 mice, the aver-

基金项目:中国健康促进基金会资助研究项目(CDPF－2017－LXS);哈尔滨医科大学附属第四医院院内基金资助项目(HYDSYYZ201601)
作者单位:150001　哈尔滨医科大学附属第四医院内分泌科
通讯作者:闫爽,主任医师,硕士生导师,电子信箱:Melissaxy999@qq.com

age content of TG in inguinal white fat in Control group was significantly lower than that in GLP－1 mice ($P=0.002$). The average TG content of inguinal white fat in HFD group was significantly higher than that in Control group ($P=0.015$). **Conclusion** Liraglutide can significantly reduce the body weight of obese mice and improve lipid metabolism in obese mice, especially in improving liver lipid metabolism. While improving the overall metabolic parameters, there are other ways of affecting lipid metabolism independent of body improvement.

Key words Liraglutide; Liver; Brown adipose tissue; White adipose tissue; Lipid metabolism; ^{1}H－MRS

肥胖作为一种由遗传、环境、肠道菌群等多种因素作用的慢性代谢性疾病,目前已呈全球流行趋势。最新研究资料显示,截至 2015 年,全球约有 22 亿超重/肥胖患者,中国达 5700 万,仅次于美国,位居世界第 2 位[1]。大量研究证实,肥胖与糖尿病、心血管疾病、肿瘤等慢性疾病的发生和死亡密切相关。因此,治疗肥胖症及其相关的健康问题对卫生保健系统具有重大的影响[2~4]。

哺乳动物体内有棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)、白色脂肪组织(white adipose tissue, WAT)和米色脂肪组织(beige adipose tissue, BAT) 3 种。肥胖主要表现为白色脂肪数量的增多和体积的增大,并聚集于腹腔和皮下,以甘油三酯(triglyceride, TG)的形式储存过剩的能量[5]。甘油三酯在脂肪组织与非脂肪组织等部位的过度蓄积,可导致脂肪组织缺氧、慢性炎性反应以及脂肪因子分泌破坏,继发全身胰岛素抵抗与脂质代谢紊乱,因此而诱发糖尿病、非酒精性脂肪肝病(NFALD)等[6,7]。

利拉鲁肽作为一种人工合成的胰高血糖素样肽－1(glucagon－like peptide －1, GLP－1)的类似物,因其独有的促胰岛素分泌(葡萄糖浓度依赖性)、改善胰岛 β 细胞功能等特性,目前广泛应用于 2 型糖尿病的治疗[8]。近年来,利拉鲁肽作为一种减重药物为人们所熟知。因 GLP－1 受体广泛分布在人体的各个部位,包括胰腺、胃、十二指肠、肺、心脏、肝脏、肾脏、脑及内皮细胞等[9]。而利拉鲁肽可通过与分布于脑干、下丘脑和杏仁体的 GLP－1 受体结合,发挥中枢性抑制食欲作用,同时抑制胃肠蠕动及分泌功能,延缓胃内容物排空,从而达到减重的效果[10]。2014 年美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration of the United States, FDA)批准利拉鲁肽用于慢性体重管理,利拉鲁肽 3.0mg/d 成为肥胖人群尤其伴有高血压、糖尿病、血脂代谢异常人群减重的辅助治疗手段[11]。最近的大量临床研究和动物实验还证实了 GLP－1 可通过减轻体重,改善胰岛素抵抗和糖代谢,进而改善肝脏脂质沉积[12]。间断性禁食(intermittent fasting, IF)是一种新型的通过饮食干预减重的方法,主要包括 5∶2饮食及隔日禁食,本研究采用隔日禁食(alternate day fasting, ADF)的方式,即正常饮食 1 日,然后禁食 1 日,如此循环[13]。

本研究采用氢质子磁共振波谱成像(proton magnetic resonance spectroscopy, ^{1}H－MRS)技术,经病理对照研究证实,^{1}H－MRS 不仅是活体下测量体内 TG 含量最准确、最可靠的影像学手段,还是对非酒精性脂肪肝定性和定量有效的方法[14,15]。本研究主要对 C57BL6 小鼠进行高脂肥胖小鼠造模,探讨利拉鲁肽的减重效果,及对小鼠体内不同部位、不同性质脂肪内甘油三酯含量的变化情况,以及与严格饮食控制即隔日禁食法干预比较,利拉鲁肽对脂肪组织代谢的影响是否完全依赖于体质量减轻。

材料与方法

1. 材料:SPF 级 C57BL6 雄性小鼠 32 只, 6 周龄,体质量约 23 ± 10g,购自北京维通利华实验动物中心。利拉鲁肽(诺和力)购自丹麦诺和诺德公司;小动物 9.4T MR 购自德国 Bruker PharmaScan 公司;小鼠正常饲料 D12492、高脂饲料 D12450B 购自博泰宏达生物有限公司。

2. 实验方法:(1)肥胖小鼠模型建立及干预:将 6 周龄清洁级 C57BL6 雄性小鼠 32 只,随机分为 4 组,每组 8 只,其中一组给予正常饲料(D12450B, 10kcal% 脂肪)喂养,其余 3 组给予高脂饲料(D12492, 60kcal% 脂肪)喂养,进行肥胖小鼠造模。8 周后,与正常饲料喂养组比较,高脂饲料喂养组平均体质量增长超过 30%,提示肥胖小鼠造模成功。将成功造模后的高脂饲料喂养组随机分为利拉鲁肽(GLP－1)组、隔日禁食(ADF)组和高脂对照(HFD)组, GLP－1 组和 HFD 组分别继续给予高脂饮食, ADF 组与正常对照(Control)组给予普通饲料喂养。GLP－1 组每日皮下注射利拉鲁肽 0.4mg/(kg·d), ADF 组为每隔 24h 给予正常饲料,期间自由饮水。所有小鼠饲养于 SPF 级动物实验室,标准鼠笼饲养,每笼 4～5 只,温度 20～25℃,湿度 50%～60%,动物

室内明暗各 12h 左右。(2) ^{1}H－MRS 测定肩胛间区棕色脂肪、腹股沟区白色脂肪及肝脏内甘油三酯(triglyceride, TG)含量:每组小鼠 8 只,4 组共 32 只,扫描晨起禁食,所有^{1}H－MRS 采集均在 9.4 T MicroMR 成像设备(Bruker PharmaScan,德国)上完成。扫描期间采用吸入麻醉剂异氟烷,与氧气混合后诱导剂量为 5%,维持剂量为 1% ~2%,同时连接呼吸门控监视呼吸节律及幅度,呼吸频率保持 25 ~35 次/分,并予以保温。采集^{1}H－MRS 运用点分辨自旋回波波谱技术(point－resolved echo spin spectroscopy, PRESS),体素为 1.5mm×1.5mm×1.5mm ~3.0mm×3.0mm×3.0mm,先取俯卧位,体将表面线圈至于肩胛间区,再取仰卧位,将表面线圈置于下腹部生殖腺周围及肝脏左叶,避开大血管部位。波谱数据分析时,设定 4.7ppm 位置水峰下面积为 1,所有其他峰的积分值都随之标准化,甘油三酯(triglyceride, TG)峰位于 1.2ppm 处。按下列公式计算脂肪含量: TG 含量 = TG 峰下面积/(水峰下面积 + TG 峰下面积)×100%。

3. 统计学方法:利用 SPSS 24.0 统计学软件对数据进行统计分析处理,小鼠体质量和^{1}H－MRS 等计数资料应用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。小鼠体质量进行正态性检验后应用重复测量资料进行检验比较;^{1}H－MRS 资料进行正态性检验后,经正态性转换应用单因素方差分析进行检验比较,采用 *LDS－t* 检验进行组间两两比较,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. 4 组小鼠体质量随时间变化趋势比较:干预前各组小鼠体质量差异无统计学意义,随喂养时间的延长,各组小鼠平均体质量均呈明显升高的趋势($P<0.05$),详见图 1。干预 16 周末,GLP－1 组小鼠平均体质量明显低于 HFD 组($P=0.009$),而高于对照组($P=0.011$),差异有统计学意义($P<0.05$)。4 组小鼠干预 16 周后,ADF 组小鼠平均体质量最低,详见图 2、表 1。

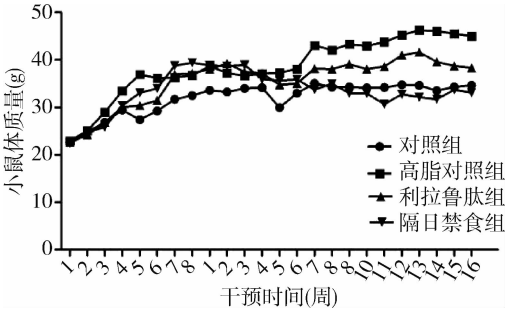

图 1　4 组小鼠造模及干预期间体质量变化

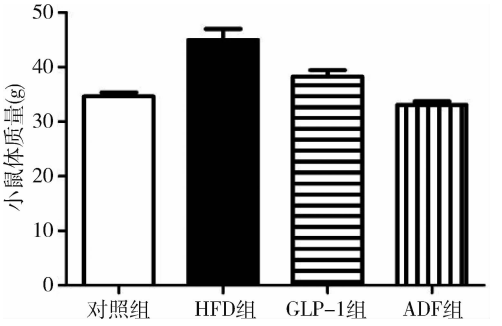

图 2　干预 16 周末 4 组小鼠体质量比较

表 1　干预 16 周末 4 组小鼠体质量及^{1}H－MRS 下各部位 TG 含量比较

组别	体质量(g)	^{1}H－MRS 检测 TG 含量		
		腹股沟区白色脂肪(%)	肝脏(%)	肩胛棕色脂肪(%)
对照组	34.628±2.370	40.47±33.38	10.21±7.68	32.78±9.51
HFD 组	44.987±4.868	91.73±1.27	36.69±10.80	90.37±0.87
GLP－1 组	38.286±1.827$^{*\Delta}$	78.41±10.31*	14.29±4.09*	66.79±17.94
ADF 组	33.103±5.131*	64.52±16.33*	14.12±9.23	54.90±34.90

与 HFD 组比较,$^*P<0.05$;与 ADF 组比较,$^\Delta P<0.05$

2. 4 组小鼠肩胛部棕色脂肪 TG 平均含量:由低到高分别是对照组,ADF 组,GLP－1 组和 HFD 组;各组间比较差异有统计学意义,详见表 1、图 3。

3. 肝脏 TG 含量:4 组小鼠肝脏 TG 平均含量由低到高分别是对照组, GLP－1 组,ADF 组和 HFD 组,GLP－1 组和 HFD 组间比较差异有统计学意义($P=0.045$),详见表 1、图 4。

4. 腹股沟部位白色脂肪 TG 含量:4 组小鼠腹股沟白脂肪 TG 平均含量由低到高分别是对照组,ADF 组, GLP－1 组和 HFD 组,与 GLP－1 组小鼠比较,对照组小鼠腹股沟白脂肪 TG 平均含量明显降低($P=0.002$),HFD 组小鼠腹股沟白脂肪 TG 平均含量明显升高($P=0.015$),详见表 1、图 5。

讨　　论

目前随着全球肥胖人群的不断增长,肥胖的预防和控制越来越受到人们的关注。肥胖所引发的胰岛

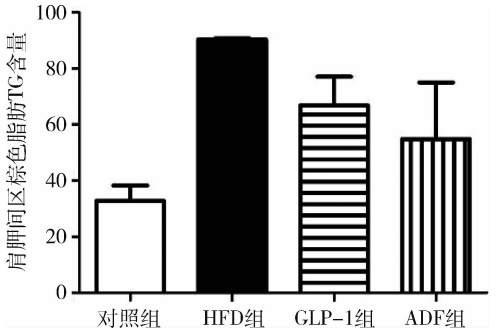

图 3　干预 16 周末 4 组小鼠肩胛间区棕色脂肪 TG 含量比较

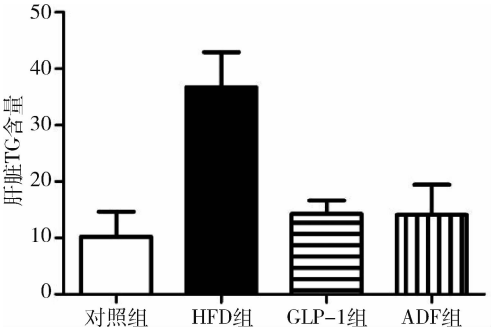

图 4　干预 16 周末 4 组小鼠肝脏 TG 含量比较

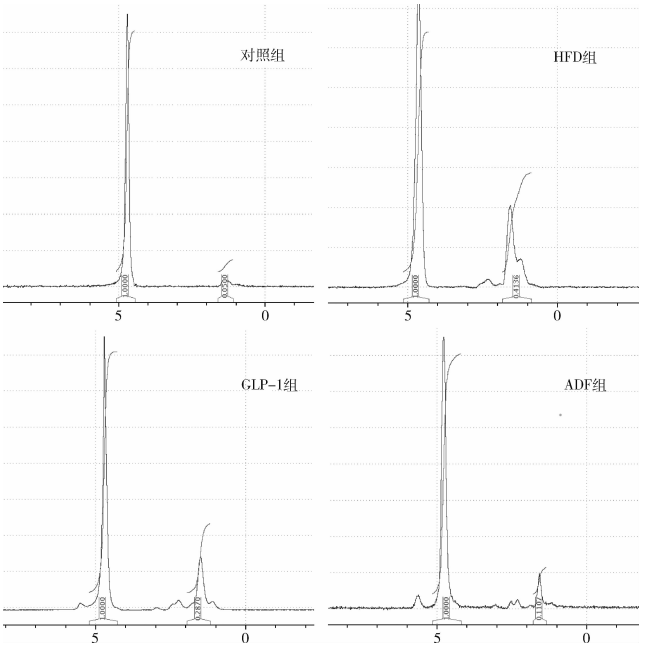

图 5　4 组小鼠肝脏部位 ^{1}H－MRS 图像

素抵抗、血脂代谢异常、慢性炎性反应是其引起的相关慢性疾病发生及发展的重要原因。甘油三酯(TG)在体内沉积部位包括脂肪组织与非脂肪组织(如肝脏)两部分,因此脂肪组织可与肝脏相互联系,通过

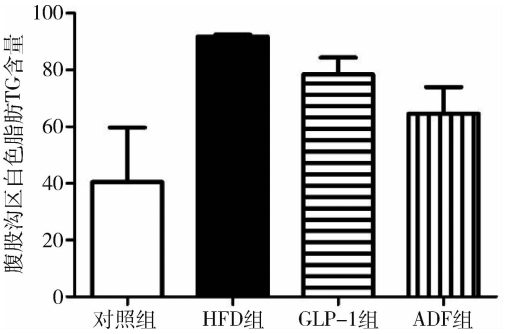

图 6　干预 16 周末 4 组小鼠腹股沟区白色脂肪 TG 含量比较

调节游离脂肪酸水平,合成与释放多种脂肪细胞因子来控制全身的脂质代谢[16]。

利拉鲁肽作为一种人工合成的 GLP－1 受体激动剂,与人体内 GLP－1 的同源性达 97%,目前研究表明人体内 GLP－1 可抑制摄食中枢,延缓胃排空,从而达到抑制甘油三酯吸收的效果,因此人体内 GLP－1 在减低体重的同时可改善脂质代谢[17]。关于人工合成 GLP－1 受体激动剂的研究亦表明,GLP－1 受体激动剂可能通过抑制脂肪的合成及刺激脂肪酸氧化两个方面来改善肝脏的脂质代谢[18]。虽然目前大量研究结果表明 GLP－1 可影响体内脂肪酸代谢,然而机制仍未完全明确。

自 2010 年 Gupta 等首次发现人类原代肝细胞上存在 GLP－1 受体,之后陆续有临床、动物及细胞研究证明了 GLP－1 能改善脂质在肝脏内的沉积,但具体机制尚不明确。研究发现,作为介导细胞间黏附和参与基因表达的 β－catenin 分子对 GLP－1 的生成和功能发挥起着重要作用,其重要机制除了包括 wnt 信号途径外,还可能与迁移相关信号通路 PI_3K/Akt、MAPKs 之间存在密切关系。β－catenin 作为 wnt 信号途径的核心分子,越来越多的研究表明,其与肥胖、糖尿病、非酒精性脂肪性肝病以及代谢综合征的发生、发展也密切相关。虽然 GLP－1 降脂机制仍不十分清楚,但其降脂效果得到了公认,本研究意在通过小鼠高脂模型研究 GLP－1 对小鼠机体不同部位脂肪含量的影响,验证其通过多途径影响脂代谢的假说。

本研究通过对 C57BL6 小鼠建立肥胖模型,以 FDA 建议的 3.0mg/d 的减重剂量换算成小鼠给药剂量 0.4mg/(kg·d),并分别设置普通对照组,高脂对照组及隔日禁食组,隔日禁食组被动性减少小鼠摄食量,导致小鼠摄入的能量显著降低,从而达到强制性

减重的目的。干预 16 周末,通过^{1}H－MRS 技术分别对 4 组小鼠进行扫描,测量定量肩胛部位棕色脂肪,腹股沟区白色脂肪及肝脏等 3 个部位的甘油三酯含量。

本研究结果显示,利拉鲁肽有显著降低体质量及改善白色脂肪脂质代谢的作用,但通过与隔日禁食组比较后发现,额外的体质量减低并没有给隔日禁食组带来白色脂肪脂质代谢方面的获益,这说明利拉鲁肽在通过降低体质量改善脂质代谢的同时,还有其他不依赖于体质量减轻而影响脂质代谢的途径。有研究显示,GLP－1 受体激动剂可能通过 MAPK 通路,促进脂肪酸氧化,逆转肝脏脂肪变性,还可能通过增强肝细胞自噬作用,减少肝脏脂肪沉积,并通过增加沉默调节蛋白(SIRT1)的表达,抑制肝细胞内质网应激,减少肝脏脂质沉积[19,20]。近年来研究发现,哺乳类动物和啮齿类动物的肝脏上均存在 GLP－1 受体[21]。因此,笔者认为利拉鲁肽改善肝脏脂质代谢是一个多途径、多通路的复杂的过程,不单纯依赖于体重的减轻,但这一过程还需要更多的基础性研究加以佐证。

参考文献

1 Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, *et al*. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years[J]. N Engl J Med, 2017,377(1):13－27

2 Tobias DK, Pan A, Jackson CL, *et al*. Body－mass index and mortality among adults with incident type 2 diabetes[J]. N Engl J Med, 2014,370(3):233－244

3 Twig G, Yaniv G, Levine H, *et al*. Body－mass index in 2.3 million adolescents and cardiovascular death in adulthood[J]. N Engl J Med, 2016,374(25):2430－2440

4 Lauby－Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, *et al*. Body fatness and cancer－viewpoint of the IARC working group[J]. N Engl J Med, 2016,375(8):794－798

5 Peirce V, Carobbio S, Vidal－Puig A. The different shades of fat[J]. Nature, 2014,510(7503):76－83

6 Lee SJ, Shin SW. Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity[J]. N Engl J Med, 2017,376(15):1491－1492

7 Lim JS, Choi YJ, Kim SK, *et al*. Optimal waist circumference cutoff value based on insulin resistance and visceral obesity in Koreans with type 2 diabetes[J]. Diabetes Metab J, 2015,39(3):253－263

8 de Boer IH. Liraglutide and renal outcomes in type 2 diabetes[J]. N Engl J Med, 2017,377(22):2198

9 Waser B, Reubi JC. Radiolabelled GLP－1 receptor antagonist binds to GLP－1 receptor－expressing human tissues[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2014,41(6):1166－1171

10 Nakade Y, Tsukamoto K, Pappas TN, *et al*. Central glucagon like peptide－1 delays solid gastric emptying via central CRF and peripheral sympathetic pathway in rats[J]. Brain Res, 2006,1111(1):117－121

11 Freemark M. Liraglutide in weight management[J]. N Engl J Med, 2015,373(18):1780－1781

12 Liu J, Wang G, Jia Y, *et al*. GLP－1 receptor agonists: effects on the progression of non－alcoholic fatty liver disease[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2015,31(4):329－335

13 Varady KA, Hellerstein MK. Alternate－day fasting and chronic disease prevention: a review of human and animal trials[J]. Am J Clin Nutr, 2007,86(1):7－13

14 Traussnigg S, Kienbacher C, Gajdošík M, *et al*. Ultra－high－field magnetic resonance spectroscopy in non－alcoholic fatty liver disease: novel mechanistic and diagnostic insights of energy metabolism in non－alcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis[J]. Liver Int, 2017,37(10):1544－1553

15 Bannas P, Kramer H, Hernando D, *et al*. Quantitative magnetic resonance imaging of hepatic steatosis: validation in ex vivo human livers[J]. Hepatology, 2015,62(5):1444－1455

16 Piya MK, McTernan PG, Kumar S. Adipokine inflammation and insulin resistance: the role of glucose, lipids and endotoxin[J]. J Endocrinol, 2013,216(1):1－15

17 Petersen KF, Dufour S, Morino K, *et al*. Reversal of muscle insulin resistance by weight reduction in young, lean, insulin－resistant offspring of parents with type 2 diabetes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012,109(21):8236－8240

18 Mells JE, Fu PP, Sharma S, *et al*. Glp－1 analog, liraglutide, ameliorates hepatic steatosis and cardiac hypertrophy in C57BL/6J mice fed a Western diet[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012,302(2):225－235

19 Liu Y, Wei R, Hong TP. Potential roles of glucagon－like peptide－1－based therapies in treating non－alcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2014,20(27):9090－9097

20 Zhou SW, Zhang M, Zhu M. Liraglutide reduces lipid accumulation in steatotic L－02 cells by enhancing autophagy[J]. Mol Med Rep, 2014,10(5):2351－2357

21 Xu F, Li Z, Zheng X, *et al*. SIRT1 mediates the effect of GLP－1 receptor agonist exenatide on ameliorating hepatic steatosis[J]. Diabetes, 2014,63(11):3637－3646

(收稿日期:2018－12－29)
(修回日期:2019－01－21)