

- [6] 高伦江. 余甘子抑菌活性及防腐应用活性研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2008.
- [7] 刘延麟. 没食子单体化合物分离鉴定及其药理活性研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2008.
- [8] 黄秀梨. 微生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997: 23-30.
- [9] 毛淑炯, 花春珍, 李珊. 纸片法和 E-test 法检测金黄色葡萄球菌药敏结果比较[J]. 浙江预防医学, 2006, 18(1): 75-79.
- [10] 汪长中, 程惠娟, 官妍, 等. 没食子酸抑制白念珠菌生物膜作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(9): 1137-1140.

收稿日期: 2011-01-07

(王奕编校)

## • 实验研究 •

SH2-B  $\beta$  在肥胖小鼠下丘脑和肺内表达及作用

齐金萍, 王效杰, 金韵, 关宝丽

**摘要:** 目的 探讨高脂饮食诱导肥胖小鼠下丘脑及肺内 SH2-B  $\beta$  表达与肥胖和炎症之间关系。方法 c57BL/6 小鼠 45 只, 随机分为对照组和肥胖组, 对照组 20 只, 肥胖组 25 只; 高脂饮食制备肥胖模型。利用免疫组织化学法, 测定各组小鼠肺内 SH2-B  $\beta$  表达变化; western blot 检测下丘脑 SH2-B  $\beta$  蛋白变化; 应用小鼠肺功能仪检测气道阻力变化。结果 肥胖小鼠肺内可见大量炎性细胞浸入, 气道上皮及炎性细胞均高表达 SH2-B  $\beta$ , 肥胖组小鼠肺内 SH2-B  $\beta$  平均光密度值为  $(0.685 \pm 0.025)$ , 明显高于对照组的  $(0.127 \pm 0.019)$  ( $t = 56.19, P < 0.01$ ), 下丘脑 SH2-B  $\beta$  免疫阳性产物平均光密度值为  $(0.686 \pm 0.016)$ , 明显低于对照组的  $(2.487 \pm 0.014)$  ( $t = 267.88, P < 0.01$ ); 肥胖组小鼠气道阻力较对照组明显增高 ( $P < 0.01$ )。结论 高脂饮食可使小鼠下丘脑内 SH2-B  $\beta$  表达下调而导致肥胖; 肺内气道上皮和炎性细胞 SH2-B  $\beta$  过表达使气道阻力增加。

关键词: SH2-B; 肥胖; 气道阻力; 小鼠

中图分类号: R 392.6

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)10-1331-03

Expression of SH2-B  $\beta$  in hypothalamus and lung of obese mice

QI Jin-ping, WANG Xiao-jie, JIN Yun, et al (Department of Anatomy, Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning Province 110034, China)

**Abstract: Objective** To compare the difference in sre homology 2 domain (SH2-B)  $\beta$  expression in hypothalamus and lung between diet-induced obese mice and normal mice (NC), and to explore the association of SH2-B  $\beta$  and obesity and inflammation. **Methods** Forty-five C57BL/6 mice (male) aged 6 weeks were randomized to a standard rodent chow (NC,  $n = 20$ ) or to a high fat diet chow (HFD,  $n = 25$ ). Western blot was used to detect SH2-B  $\beta$  expression in hypothalamus and immunohistochemistry was adopted to detect SH2-B  $\beta$  expression in lung. By means of animal lung function analysis system, the changes of the airway resistance was investigated. **Results** Immunohistochemistry detection demonstrated that more inflammatory cells were in the lung in obese mice than NC group, and the mean optic density (MOD)  $(0.685 \pm 0.025)$  of SH2-B  $\beta$  positive substance in the airway epithelium and inflammatory cells of the obese mice was much higher than those of NC group  $(0.127 \pm 0.019)$  ( $P < 0.01$ ). Western blot results demonstrated that the mean ratio of SH2-B  $\beta$  MOD to  $\beta$ -actin MOD in hypothalamus was  $0.686 \pm 0.056$  in obese mice, much lower than that of in NC group  $(2.487 \pm 0.204)$  ( $P < 0.01$ ). Airway resistance was increased significantly in obese mice compared to that of NC group. **Conclusion** High fat diet may decrease SH2-B  $\beta$  expression in hypothalamus and induced obesity. SH2-B  $\beta$  expression in airway epithelium and inflammatory cells increases and results in higher airway resistance.

**Key words:** SH2-B  $\beta$ ; obesity; airway resistance; mice

肥胖和哮喘是发展中国家迅速增长和普遍的公共健康问题, 但哮喘和肥胖之间是否相关联仍存在争议。细胞内胞浆接头蛋白 (sre homology 2 domain, SH2-B) 通过 SH2 结构域与 Janus 激酶 2 (JAK2) 结合介导并增强生长激素等多种激素或细胞因子信号转导<sup>[1]</sup>。Ren 等<sup>[2]</sup>通过对小鼠实验表明 SH2-B 是瘦素敏感性、能量平衡和体重的重要调节

者。而 SH2-B 敲除鼠则出现瘦素抵抗和肥胖。哮喘小鼠肺内炎性细胞及内脏传入系统 SH2-B  $\beta$  表达增强<sup>[3-4]</sup>, 表明 SH2-B  $\beta$  参与哮喘炎症反应。本研究通过检测高脂饮食所致肥胖小鼠下丘脑及肺内 SH2-B  $\beta$  表达, 探讨其在肥胖和炎症中作用。

## 1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 SH2-B 羊多克隆 IgG 抗体, 链霉素亲霉素酶复合试剂盒、二氨基联苯胺(武汉博士德生物公司)。其余试剂为国产分析纯。BS110S 电

作者单位: 沈阳医学院解剖教研室 辽宁 沈阳 110034

作者简介: 齐金萍(1970-), 女, 辽宁沈阳人, 副教授, 博士, 主要从事神经肽与临床疾病方面研究。

子天平(德国 Startorius 公司) AniREs 2003 动物肺功能分析系统(北京贝兰博科技有限公司)。

1.2 实验动物 选用健康、雄性、出生 5 周左右的 c57BL/6 小鼠(上海莱克实验动物有限责任公司) 45 只,许可证号: SCXK(沪) 2003-0003。普通饲料: 玉米粉 30%, 豆饼 21.0%, 麸皮 10.0%, 次粉 28.0%, 鱼粉 9.0%, 酵母粉 1.0%, 鱼肝油 1% (g/100 g) 等。高脂饲料: 猪油 12.0%, 奶粉 8.0%, 鸡蛋 10.0%, 花生 5.0%, 麻油 3.0%, 以普通饲料补足 100 g 混成含 12% 猪油的高脂饲料<sup>[5]</sup>, 食用前 2 d 配好, 低温保存。适应性喂养 1 周。

1.3 动物模型制备 将小鼠随机分为 2 组: 对照组 20 只 喂普通饲料; 高脂组 25 只 喂高脂饲料。自由饮水, 昼夜比 12:12, 饲养 8 周。每周称体重 1 次。8 周后, 以体重超过对照组平均值 2 倍标准差作为肥胖标准, 筛选出营养性肥胖小鼠 20 只作为肥胖组。

1.4 气道阻力测定 实验结束后禁食 12 h, 各组随机选 10 只小鼠, 以 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg) 腹腔麻醉, 气管插管, 用动物肺功能分析系统测定气道阻力。呼吸频率为 1.67 次/s, 潮气量为 0.2 mL, 正压气压为 0.02~0.04 kPa。经颈静脉浓度梯度增加应用乙酰胆碱(0~0.2 μg/g) 激发气道阻力。待曲线平稳后进行下一次给药。

1.5 Western blot 分析 SH2-B β 表达 动物断头取下丘脑, -70 °C 储存。用组织细胞裂解液抽提可溶性蛋白, 制备十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶, 样品加热变性后每孔加等量蛋白样品, 电泳后湿转至硝酸纤维素膜上。50 g/L 脱脂奶粉, 吐温 Tris 缓冲液室温振荡封闭 3 h 后洗膜, 一抗 SH2-B β(1:300) 或 β-actin(1:300) 室温孵育 2 h, 洗膜, 辣根酶标记羊抗小鼠 IgG(1:5 000) 室温孵育 1 h, 洗膜后加入化学发光试剂反应 1 min, 暗室曝光显影后冲洗胶片。凝胶成像分析系统上摄像分析, 计算相对光密度值。

1.6 肺组织结构观察及 SH2-B β 表达检测 各组另 10 只小鼠用 1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉(40 mg/kg), 用 40 g/L 多聚甲醛灌流固定后取肺, 固定 24 h 后移入 0.87 mol/L 蔗糖缓冲液中至标本沉降。冰冻切片包埋剂包埋, 恒冷箱连续切片(厚 14 μm), 冷风干燥后进行苏木素-伊红(HE) 染色, 观察肺组织结构。SH2-B β 表达采用免疫组织化学染色(SABC), 一抗 SH2-B 工作浓度为 1:150, 二氨基联苯胺显色。每块组织随机取 3~4 张切片, 且各组所选部位相同, 每张切片平均选取 4 个视野, 使用

Metamorph 图像分析系统, 进行光密度测定。测量值与相应阴性对照切片相减后的平均值为各区域最终平均光密度值。

1.7 统计分析 所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 11.0 软件进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 不同组别小鼠体重比较 对照组和高脂组小鼠初始体重分别为(16 ± 1.65)、(16 ± 1.27) g。饲养 8 周后, 高脂组小鼠体重为(28.75 ± 1.68) g, 明显高于对照组(23.51 ± 1.47) g, 差异有统计学意义(*t* = 10.50, *P* < 0.01)。表示肥胖模型成立。

2.2 肥胖对气道阻力影响(图 1) 在乙酰胆碱激发下, 肥胖小鼠较对照组小鼠气道阻力及气道反应性明显增高(*t* = 7.84、9.42、5.37、5.25, *P* < 0.01)。

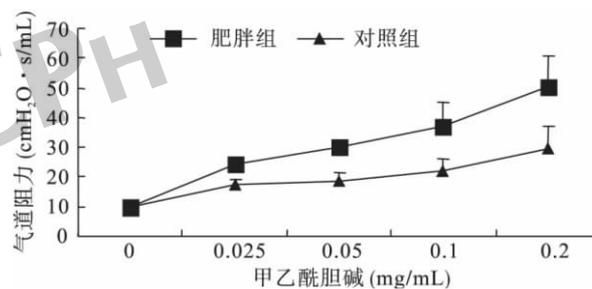


图 1 肥胖对乙酰胆碱激发的气道阻力影响

2.3 肥胖对下丘脑 SH2-B β 表达影响 Western blot 结果显示, 肥胖小鼠下丘脑 SH2-B β 免疫阳性产物平均光密度值为(0.686 ± 0.016), 明显低于对照组小鼠的(2.487 ± 0.014) (*t* = 267.88, *P* < 0.01)。

2.4 肺组织结构变化(图 2) 对照组小鼠肺组织支气管形态规整, 气道上皮正常(图 2a)。肥胖小鼠可以见到支气管上皮有断裂, 基膜增厚, 细支气管平滑肌增生; 肺泡及细支气管腔中有较多炎性分泌物, 细支气管和血管壁周围可见较多炎性细胞浸润(图 2b)。

2.5 肥胖对肺组织 SH2-B β 表达影响(图 3) 对照组小鼠肺组织支气管上皮有少数细胞呈 SH2-B β 阳性, 炎性细胞数量少, 含少量 SH2-B β 阳性物质(图 3a)。肥胖小鼠肺组织细支气管、肺泡上皮细胞和较多炎性细胞呈 SH2-B β 强阳性(图 3b)。肥胖小鼠肺内 SH2-B β 免疫阳性产物平均光密度值为(0.685 ± 0.025), 对照小鼠平均光密度为(0.127 ± 0.019), 差异有统计学意义(*t* = 56.19, *P* < 0.01)。

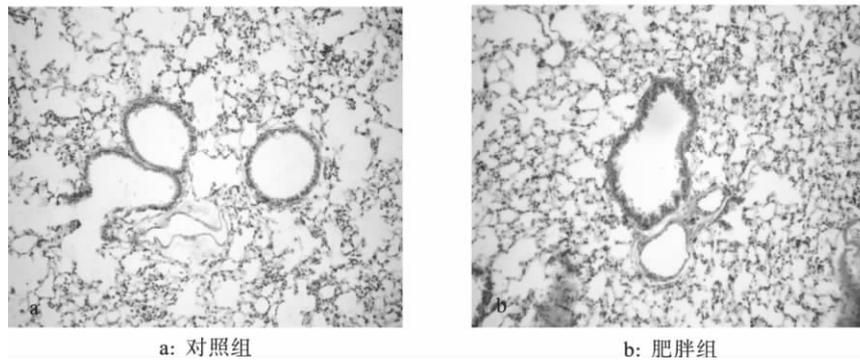
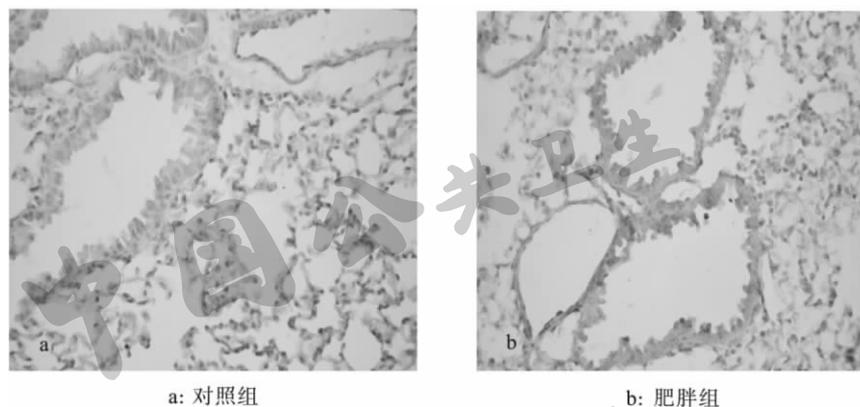


图 2 肺组织结构改变( HE 染色, ×400)

图 3 肺组织内 SH2-B  $\beta$  表达( SABC 法, ×400)

### 3 讨论

瘦素在神经内分泌调节中起着重要作用。人类肥胖患者大多存在瘦素抵抗现象,即虽然体内有较高的瘦素水平,但由于其信号传导过程存在缺陷,导致无法发挥生物学效应<sup>[6]</sup>。SH2-B 是细胞内一种连接物蛋白,是瘦素敏感性、能量平衡和体重的重要调节者<sup>[6]</sup>。瘦素通过下丘脑内瘦素受体发挥作用,但这种作用发挥需要有足够 SH2-B 存在<sup>[7]</sup>。本研究结果表明,高脂饮食诱导的肥胖小鼠下丘脑内 SH2-B  $\beta$  表达下降。由于下丘脑内 SH2-B  $\beta$  表达下降,致使瘦素发挥作用的受体后信号系统受阻,出现瘦素抵抗。Chinn 等<sup>[8]</sup>研究表明,肥胖可增加哮喘病人病情严重程度。肥胖使小学生心肺功能受到影响<sup>[9]</sup>。肥胖哮喘病人在体重减轻后肺功能改善<sup>[10]</sup>。研究表明,过剩的脂质在脂肪组织和肝脏(肝脂肪变性)中累积常伴随着慢性、亚急性炎症反应,炎症细胞和炎症生化标记物的改变证明了这一过程的存在<sup>[11]</sup>。本研究结果显示,高脂饮食诱导的肥胖小鼠肺内有高表达 SH2-B  $\beta$  的炎性细胞浸润,气道上皮细胞 SH2-B  $\beta$  过表达,在乙酰胆碱刺激下,气道阻力也较正常小鼠明显增加。表明高脂饮食可使肺部 SH2-B  $\beta$  表达上调,增加肺部炎症反应,使气道阻力增加。

### 参考文献

- [1] Duan C, Yang H, White MF, et al. Disruption of the SH2-B identification and gene causes age-dependent insulin resistance and glucose intolerance[J]. *Mol Cell Biol* 2004 24: 7435-7443.
- [2] Ren D, Zhou Y, Morris D, et al. Neuronal SH2B1 is essential for controlling energy and glucose homeostasis[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(2): 397-406.
- [3] 齐金萍, 曹德寿, 刘晓湘, 等. 哮喘小鼠肺内及内脏感觉传入系统 SH2-B  $\beta$  的表达[J]. *解剖学报* 2006 37(2): 195-198.
- [4] Qi JP, Fang XB. Regulatory effects of nerve growth factor on SH2-B  $\beta$  expression in the lung and primary afferent neurons of asthmatic mice[J]. *Neural Regen Res* 2008 3(10): 1133-1136.
- [5] 诸骏仁, 陶寿淇. 高脂血症的分类与防治[J]. *岭南心血管病杂志* 2005(4): 296.
- [6] Duan CJ, Li MH, Rui L. SH2-B promotes insulin receptor substrate 1(IRS1)- and IRS2-mediated activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in response to leptin[J]. *Biol Chem*, 2004 279(42): 43684-43691.
- [7] Li Z, Zhou Y, Carter-Su C, et al. SH2B1 enhances leptin signaling by both Janus kinase 2 Tyr813 phosphorylation-dependent and -independent mechanisms[J]. *Mol Endocrinol* 2007 21(9): 2270-2281.
- [8] Chinn S, Rona RJ. Can the increase in body metabolism index explain the rising trend in children[J]. *Thorax* 2001 56(11): 845-850.
- [9] 王国祥, 刘殿玉, 王文军, 等. 苏州市小学生肥胖现状及其对心肺功能影响[J]. *中国公共卫生* 2011 27(6): 23-25.
- [10] Stenius-Aamiala B, Poussa T, Kvarnstrom J, et al. Immediate and long term effects of weight reduction in obese people with asthma. randomised controlled study[J]. *BMJ* 2000 320(7238): 827-832.
- [11] Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation and insulin resistance[J]. *Gastroenterology* 2007 132: 2169-2180.