

·基础研究·

高脂饮食诱导的肥胖倾向和肥胖抵抗大鼠胃组织和血浆 ghrelin 水平的研究*

裴晓萌¹ 肖海涛¹ 李 显¹ 祝世功² 艾 华^{1,3}

摘要 目的:探讨高脂饮食诱导的肥胖倾向(OP)与肥胖抵抗倾向(ORP)大鼠体内 ghrelin 水平的差异。方法:将 20 只健康雄性 Wistar 大鼠以高脂饲料喂养 10 周后,根据体重增量的不同划入 OP 组与 ORP 组,每组 6 只。记录体重和摄食量,测定内脏脂肪含量、血糖、血脂、血浆胰岛素和血浆 ghrelin 水平,检测大鼠胃组织 ghrelin 蛋白表达水平。结果:OP 大鼠体重增量、能量利用率、内脏脂肪含量明显高于 ORP 大鼠($P<0.01$);与 ORP 大鼠相比,OP 大鼠血浆 ghrelin 水平有降低趋势($P=0.07$),而胃组织 ghrelin 表达极显著增高($P<0.01$);大鼠胃组织 ghrelin 表达水平与体重增量($P<0.05$)、肾周脂肪重量($P<0.05$)呈正相关关系。结论:胃组织 ghrelin 表达水平可能是高脂饮食条件下大鼠发展为肥胖倾向或肥胖抵抗倾向的重要影响因素。

关键词 ghrelin;肥胖倾向;肥胖抵抗倾向;大鼠;高脂饮食

中图分类号:R493,R589.2 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-0-0-0

A study on stomach and plasma ghrelin levels in high fat diet-induced obesity-prone and obesity-resistant rats/PEI Xiaomeng, XIAO Haitao, LI Xian, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2009

Abstract Objective: To explore the difference of plasma ghrelin and ghrelin expression in stomach between high fat diet induced obesity-prone(OP) and obesity-resistance-prone(ORP) rats. **Method:** Twenty male Wistar rats were fed with high fat diet for 10 weeks and then were divided into obesity-prone group and obesity-resistant group according to weight gain. There were six rats in each group. Body weight, food intake, and visceral fat were measured. Glucose, triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), insulin and ghrelin were assayed in fasting plasma. Ghrelin expression in stomach were investigated by Western Blot. **Result:** Body weight gain, energy efficiency, and visceral fat depots in OP rats were significantly higher than ORP rats ($P<0.01$); Compared with ORP rats, OP rats had an increased tend in plasma ghrelin ($P=0.07$) and a significantly elevated expression in stomach ghrelin ($P<0.01$); Stomach ghrelin expression was positively correlated to body weight gain, weights of perirenal fat pads in the high fat diet-fed rats. **Conclusion:** Ghrelin expression in stomach may affect obesity-prone or obesity-resistance-prone development in the rats fed with high fat diet.

Author's address Institute of Sports Medicine, 3rd Hospital, Peking University, Beijing,100191

Key words ghrelin; obesity-prone; obesity-resistant-prone; rat; high fat diet

Levin 等^[1]发现,喂高脂饲料的同一品系的同批大鼠,部分发生肥胖,部分不发生肥胖,前者被称为肥胖倾向(obesity-prone, OP),后者被称为肥胖抵抗倾向(obesity-resistant-prone, ORP)。此现象与人类相似,在相同的饮食环境(高脂饮食)下,有些个体易发生肥胖,而有些个体则可维持正常体重及糖、脂代谢。目前对 OP/ORP 的对比研究,成为肥胖机制研究的重点。

肥胖与肥胖抵抗的发生与能量代谢、摄食行为密切相关。ghrelin 是新近发现的一种主要由胃组织产生的肽类激素^[2],可促进摄食,对短期及长期能量平衡起调节作用^[3]。动物和人体研究显示^[4-5],肥胖机体血浆 ghrelin 水平下降。在 ghrelin 与 OP/ORP 的关系方面,国内外文献报道很少。我们利用高脂饲料诱

导产生 OP/ORP 大鼠,观察其胃组织和血浆 ghrelin 蛋白水平,探讨 OP/ORP 的发生机制。

1 材料与方法

1.1 OP/ORP 大鼠的喂养和选择

4 周龄健康雄性 Wistar 大鼠 20 只,体重 95—105g,由中国医学科学院实验动物研究所提供。饲养条件为 SPF 级,饲养温度:22±1℃,湿度:40%—

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270636 和 30671015)

1 北京大学第三医院运动医学研究所,北京,100191

2 北京大学医学部生理学与病理生理学系

3 通讯作者

作者简介:裴晓萌,女,医学硕士,博士研究生在读

收稿日期:2008-01-07

60%, 光-暗周期 12h。适应性喂养 3 天后以高脂饲料喂养 10 周。实验期间, 动物自由摄食和饮水。第 10 周末喂养结束后, 将大鼠根据体重增量由高至低排序, 较高的 6 只作为 OP 大鼠, 较低的 6 只作为 ORP 大鼠, 两组腹脂/体重比值均值相比差异有显著性意义 ($P<0.05$)。

普通基础饲料, 所含的营养素和能量可保证大鼠生长发育的要求, 由中国医学科学院实验动物研究所提供, 高脂饲料由 80% 基础饲料加 10% 猪油和 10% 蛋黄粉混合组成, 其营养素含量和能量百分比见表 1。

表 1 饲料中碳水化合物、脂肪、蛋白质能量百分比

	碳水化合物	脂肪	蛋白质	热能密度(kCal/g)
基础饲料	61.6%	14.8%	23.6%	3.05
高脂饲料	38.26%	44.07%	17.63%	3.98

每克蛋白质、脂肪、碳水化合物的能量系数分别按 4、9、4 kCal 计算

1.2 主要试剂和材料

山羊来源多抗 ghrelin 一抗购自 Santa Cruz 公司, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗羊二抗购自北京中山金桥生物公司, 预染标准分子量蛋白购自 Genview 公司, 增强化学发光 (ECL) 液购自美国 Amersham 公司。ghrelin 标准蛋白购自美国 Phoenix Pharmaceuticals 公司。其余试剂均为市购分析纯级。

1.3 标本采集和保存

禁食 12h 后, 将大鼠用戊巴比妥钠腹腔麻醉, 腹主静脉取血后, 打开胸腔, 从左心室心尖搏动处插入灌流针, 至升主动脉用磷酸盐缓冲盐水(PBS)经心脏进行全身灌流, 直到组织器官灌洗干净, 待右心房剪破处流出的灌流液变为清凉液体后, 迅速取出肾周脂肪和睾周脂肪并称重, 用铝箔纸包好, 投入液氮中速冻, 之后转入 -80°C 冰箱保存。腹主静脉取血后, 迅速将血分别转入肝素钠抗凝(待测血糖、血脂、血胰岛素)和乙二胺四乙酸(EDTA)-K 抗凝并添加抑肽酶(aprotinin, 25kU/ μl , 待测血浆 ghrelin)的离心管, 混匀后室温离心分离血浆(3000 转/min, 20min), 分装后 -80°C 冻存。

1.4 指标测定

1.4.1 生理学指标观察: 喂养期间每日同一时间称重, 记录给食量、剩食量, 计算摄食量、能量利用率。

摄食量=给食量-剩食量

能量利用率=[体重增量(g)/热能摄入量(kCal)] $\times 1000$

腹脂/体重比值=[睾周脂肪量(g)+肾周脂肪量(g)]/体重(g) $\times 100$

1.4.2 血浆指标检测: 血浆甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和空腹血糖由日立 7170A 自

动分析仪测定; 血浆胰岛素由放射免疫法测定(试剂盒购于北京尚柏生物技术公司); 胰岛素敏感指数 (ISI) 以空腹胰岛素 (FINS) 与空腹血糖 (FPG) 乘积倒数的自然对数来表示, 即 $\text{ISI} = \ln [1/(\text{FINS} \times \text{FPG})]$, FINS 单位为 mU/L, FPG 为 mmol/L^[6]; 血浆 ghrelin 蛋白水平由酶联免疫法 (EIA) 检测 (试剂盒购于美国 Phoenix Pharmaceuticals 公司)。

1.4.3 胃组织 ghrelin 蛋白水平检测: Western 印迹法检测胃组织 ghrelin 的表达。实验步骤: ①胃组织总蛋白的提取: 200mg 胃组织加入 1ml 裂解液、10 μl 蛋白酶抑制剂破碎裂解组织, 转至 EP 管, 冰上静置 10min; 2°C , 13000 转/min, 离心 10min, 取上清 (胞浆蛋白), -80°C 分装冻存。②利用 BCA (bicinchoninic acid) 法测定胃组织蛋白浓度。③电泳和转膜: 根据蛋白定量结果, 加入相应体积的总蛋白样品与 5 $\times$ 蛋白质凝胶电泳上样缓冲液 (上样浓度为 35 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$), 轻轻混合, 95°C 变性 10min, 立即插入冰中待用; 将样品加入凝胶孔中进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结束后将蛋白条带转移至 PVDF 膜。④免疫反应和显色: 用封闭液 (含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液) 封闭 1h; 将 ghrelin 一抗用封闭液稀释 500 倍, 封闭后的 PVDF 膜直接放入一抗工作液中, 4°C 孵育过夜; TBST 洗膜后 (3 次, 每次 10min) 放入辣根过氧化物酶标记的二抗工作液 (用 TBST 稀释 2000 倍) 中孵育 1h; TBST 洗膜后 (3 次, 每次 10min) ECL 显色。⑤灰度分析: 用图像分析软件对条带扫描结果进行灰度分析, 结果以 ghrelin 条带与 β -actin 条带灰度值之比表示。样本经实验步骤③后, 按照实验步骤④和⑤分别测定 PVDF 膜上的 ghrelin 和 β -actin。

1.5 统计学分析

统计学分析采用 SPSS10.0 统计软件包进行。计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 两组间的比较采用独立样本 t 检验分析, 显著性水平为 $P<0.05$ 。简单直线相关分析采用 Pearson 法, 显著性水平为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 一般状态

在喂养期间, Wistar 大鼠的精神状态、摄食、饮水及活动情况均未见明显异常。

2.2 OP/ORP 两组大鼠体重变化

见图 1。OP/ORP 组大鼠初始体重并无显著性, 喂养 1 周后, OP 大鼠的体重即显著高于 ORP 大鼠 ($P<0.01$), 随着喂养时间的推移, 体重之间的差异逐渐增大, 至第 10 周喂养结束时, OP 组大鼠体重较 ORP 组多 78.17g ($P<0.01$)。

2.3 OP/ORP 大鼠能量摄入量、能量利用率和脂肪蓄积能力的比较

见表 2。整个喂养期间,OP/ORP 组大鼠能量摄入量无显著性差异($P>0.05$),但 OP 大鼠能量利用率显著高于 ORP 大鼠($P<0.05$)。OP 大鼠肾周、睾周脂肪湿重、两个部位总的脂肪湿重即腹脂重量以及腹脂/体重比值均显著高于 ORP 大鼠($P<0.01$)。

2.4 血浆生化指标检测结果

见表 3。OP/ORP 大鼠之间血糖、TG、HDL-C、LDL-C 水平差异无显著性($P>0.05$),与 ORP 大鼠相比,OP 大鼠血浆胰岛素水平有升高的趋势,但血浆胰岛素水平个体之间波动较大,因此差异无显著性($P=0.54$),血浆 ghrelin 水平有降低的趋势,但差异无显著性意义($P=0.07$)。

2.5 OP/ORP 大鼠胃组织 ghrelin 表达

OPR 和 OP 大鼠胃组织 ghrelin/ β -actin 灰度比值(Western Blot 法)分别为 0.72 ± 0.18 和 0.98 ± 0.10 ,两者差异有非常显著性($P<0.01$)。这表明 OP 大鼠的胃组织 ghrelin 蛋白表达明显高于 ORP 大鼠。

2.6 胃组织 ghrelin 表达与各测量指标的相关性

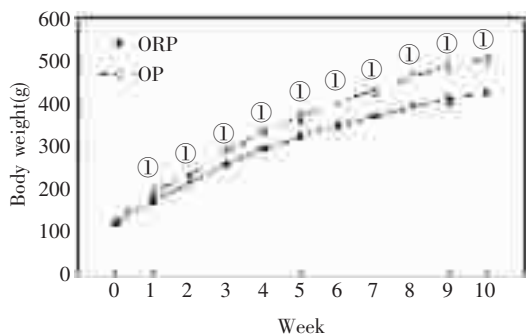


图1 OP/ORP 大鼠体重变化

①与 ORP 大鼠相比 $P<0.01$

表 2 OP/ORP 大鼠的能量摄入量、能量利用率和脂肪蓄积能力 ($\bar{x}\pm s$)

	OP(n=6)	ORP(n=6)
热能摄入量(kCal)	5668.94 $\pm$ 187.69	5380.08 $\pm$ 201.33
能量利用率	66.67 $\pm$ 4.54 ^①	56.77 $\pm$ 4.17
肾周脂肪(g)	8.08 $\pm$ 0.66 ^①	4.84 $\pm$ 0.90
睾周脂肪(g)	6.02 $\pm$ 0.59 ^①	3.86 $\pm$ 0.63
腹脂重量(g)	14.1 $\pm$ 0.86 ^①	8.7 $\pm$ 1.19
腹脂重量/体重	2.81 $\pm$ 0.18 ^①	2.04 $\pm$ 0.27
体重增量(g)	377.97 $\pm$ 16.79 ^①	304.83 $\pm$ 13.61

①与 ORP 大鼠相比 $P<0.01$

表 3 OP/ORP 大鼠血浆生化指标的变化 ($\bar{x}\pm s$)

	OP(n=6)	ORP(n=6)
TG(mmol/L)	0.89 $\pm$ 0.20	1.25 $\pm$ 0.79
TC(mmol/L)	1.60 $\pm$ 0.21	1.78 $\pm$ 0.35
HDL-C(mmol/L)	1.07 $\pm$ 0.30	1.01 $\pm$ 0.12
LDL-C(mmol/L)	0.57 $\pm$ 0.17	0.65 $\pm$ 0.33
Glucose(mmol/L)	9.80 $\pm$ 0.72	9.77 $\pm$ 1.07
Insulin(mU/L)	113.49 $\pm$ 53.25	96.08 $\pm$ 42.52
ISI	-6.90 $\pm$ 0.57	-6.74 $\pm$ 0.58
Ghrelin(μ g/L)	1.14 $\pm$ 0.20	1.44 $\pm$ 0.31

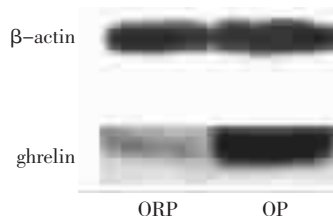


图2 OP/ORP 大鼠胃组织 ghrelin 的表达

将本实验所用每只大鼠胃组织 ghrelin 表达水平与各测量指标进行简单线性相关分析,结果显示,胃组织 ghrelin 表达水平与体重增量($P<0.05$)、肾周脂肪重量($P<0.05$)呈显著正相关关系,即大鼠胃组织 ghrelin 表达越高,其体重增量、肾周脂肪重量越高。而胃组织 ghrelin 表达水平与体重、摄食量、能量利用率、睾周脂肪重量、血糖、TG、TC、HDL-C、LDL-C、胰岛素、ghrelin 水平无显著性相关关系($P>0.05$)。

3 讨论

肥胖是在遗传因素与环境因素共同作用下,引起能量失衡即能量摄入大于能量消耗的结果。以高脂饲料喂养大鼠是建立饮食诱导肥胖模型最常用的方法,与人类肥胖发生的特点相似。本实验发现高脂饲料喂养 1 周后,OP/ORP 大鼠体重即出现了显著性差异($P<0.01$),这种差异随着喂养时间的推移而逐渐增大(图 1)。

给予大鼠外源性 ghrelin,能引起大鼠摄食量增多^[7]。本实验对 OP 与 ORP 大鼠的比较发现,虽然 OP 大鼠胃组织 ghrelin 表达水平显著高于 ORP 大鼠($P<0.001$),但 OP 大鼠的总热能摄入量与 ORP 大鼠差异并不大($P>0.05$),但能量利用率却较高($P<0.01$,见表 2)。能量利用率受遗传因素、膳食营养成分、体内代谢状态等多种因素影响。Pfluger 等^[8]发现,同时缺失 ghrelin 与其受体的小鼠体力活动水平增加,能量消耗增加。推测可能内源性 ghrelin 表达水平升高,并不直接影响摄食量,而是通过影响体力活动水平、体内代谢状态等影响能量利用率。Pagliassotti 等^[9]认为,OP 大鼠的碳水化合物的转化能力、脂肪的合成能力与储存能力较强,这可能导致其能量利用率较高。Sam 等^[10]的研究指出,高脂饮食诱导下的 ORP 大鼠 24h 呼吸系数显著低于 OP 大鼠,提示 ORP 大鼠氧化脂肪比例较高,说明 ORP 大鼠能随着饮食成分中能量来源的改变而调整能量的利用,从而减少了体脂的堆积。研究表明^[11],ORP 大鼠自发性体力活动水平高于 OP 大鼠,这可能是其维持较低体重的原因之一。

本次实验观察到,OP 大鼠腹脂重量高于 ORP 大鼠($P<0.01$,表 2),证明 OP 大鼠体内能量以脂肪

形式进行储存的能力较高。但 OP 大鼠较之 ORP 大鼠, 空腹血糖、胰岛素、血浆 TG、TC、HDL-C、LDL-C 水平均无显著性差异。有学者发现^[12], 短期外源性高胆固醇、高饱和脂肪酸的摄入并不显著影响大鼠的糖、脂代谢。由此推断, 本实验结果可能与喂养时间较短有关。

既往研究表明^[13-14], 肥胖大鼠血浆 ghrelin 水平下降。本实验 OP 与 ORP 大鼠相比, 血浆 ghrelin 水平有降低的趋势, 但在统计上差异没有显著性 ($P=0.07$, 表 3)。Liu 等^[15]也没有观察到 OP 和 ORP 大鼠血浆 ghrelin 的差异。肥胖倾向还没有达到肥胖的阶段, 血浆 ghrelin 的变化程度不是很明显, 这可能是一些实验结果不一致的原因。OP/ORP 大鼠血浆 ghrelin 水平还需进一步的研究。

本次 Western 印迹实验结果显示, OP 大鼠胃组织 ghrelin 的表达极显著高于 ORP 大鼠 ($P<0.01$, 图 2)。OP 大鼠胃组织 ghrelin 表达与体重增量、肾周脂肪重量呈显著正相关关系。此结果说明胃组织 ghrelin 表达越高, 体重增量、腹内脂肪沉积 (主要是肾周脂肪), 这与 ghrelin 的生理功能是一致的。ghrelin 有促进摄食、脂肪合成的作用^[7]。ghrelin 不仅可以通过促进脂肪合成、抑制脂肪酸的氧化使体脂量增加, 还可以直接作用于脂肪细胞, 造成脂肪细胞数量增多而引起肥胖^[16]。体外实验证明, 3T3-L1 前脂肪细胞和脂肪细胞本身均匀地分布有 ghrelin 受体, ghrelin 可以通过促进分化和抑制凋亡来增加脂肪细胞数量从而引起肥胖^[17]。动物^[4]和人体^[5]研究都证实, 肥胖个体血浆 ghrelin 水平降低。本实验 OP 大鼠血浆 ghrelin 也有下降的趋势。血浆 ghrelin 水平可反映全身组织器官 ghrelin 分泌的水平。血浆 ghrelin 水平下降, 可能与 OP 大鼠机体 ghrelin 全身性下调有关。而此时 OP 大鼠胃组织 ghrelin 表达水平依然较高, 说明胃组织 ghrelin 可能在大鼠的肥胖倾向发生过程中具有重要作用。

4 结论

OP 大鼠血浆 ghrelin 浓度有低于 ORP 大鼠的趋势。OP 大鼠胃组织中 ghrelin 的表达显著高于 ORP 大鼠。胃组织 ghrelin 可能对高脂饮食诱导的 OP 和 ORP 的发生发展具有重要作用。胃组织 ghrelin 表达与体重增量、肾周脂肪重量存在正相关关系。ghrelin 表达水平影响腹内脂肪沉积, 从而影响

OP/ORP 的发生。

参考文献

- [1] Levin BE, Triscari J, Sullivan AC, et al. Relationship between sympathetic activity and diet-induced obesity in two rat strains [J]. *Am J Physiol*, 1983, 245(3): R364—371.
- [2] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature*, 1999, 402: 656—660.
- [3] Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, et al. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein [J]. *Endocrinology*, 2004, 145 (6): 2607—2612.
- [4] Beck B, Max JP, Fernet B, et al. Adaptation of ghrelin levels to limit body weight gain in the obese Zucker rat [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318(4): 846—851.
- [5] Zwirska-Korczala K, Konturek SJ, Sadowski M, et al. Basal and postprandial plasma levels of PPY, ghrelin, cholecystokinin, gastrin and insulin in women with moderate and morbid obesity and metabolic syndrome [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2007, 58 Suppl1: 13—35.
- [6] 李光伟, 潘孝仁, Lillioja S, 等. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数 [J]. *中华内科杂志*, 1993, 32(10): 656—660.
- [7] 裴晓萌, 艾华. Ghrelin 与摄食和肥胖的关系 [J]. *卫生研究*, 2007, 36(1): 124—127.
- [8] Pfluger PT, Kirchner H, Gunnell S, et al. Simultaneous deletion of ghrelin and its receptor increases motor activity and energy expenditure [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 294(3): G610—618.
- [9] Pagliassotti MJ, Pan DA, Prach PA, et al. Tissue oxidative capacity, fuel stores and fatty acid composition in obesity-prone and obesity resistant rats [J]. *Obes Res*, 1995, 3: 459—654.
- [10] Sam C, Brent G, Fatima A Y, et al. Metabolic difference between obesity-prone and obesity-resistant rats [J]. *Am J Physiol*, 1990, 259: R1103—1110.
- [11] Teske JA, Billington CJ, Kotz CM. Neuropeptidergic Mediators of Spontaneous Physical Activity and Non-Exercise Activity Thermogenesis [J]. *Neuroendocrinology*, 2008, 87(2): 71—90.
- [12] 曹廷兵, 闫振成, 沈成义, 等. 代谢综合征大鼠模型的建立及其相关基因表达变化的研究 [J]. *解放军医学杂志*, 2005, 30(8): 702—705.
- [13] Williams DL, Grill HJ, Cummings DE, et al. Overfeeding-induced weight gain suppresses plasma ghrelin levels in rats [J]. *J Endocrinol Invest*, 2006, 29(10): 863—868.
- [14] Ukkola O. Ghrelin and metabolic disorders [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2009, 10(1): 2—7.
- [15] Liu X, York DA, Bray GA, et al. Regulation of ghrelin gene expression in stomach and feeding response to a ghrelin analogue in two strains of rats [J]. *Peptides*, 2004, 25 (12): 2171—2177.
- [16] Wren AM, Bloom SR. Gut hormones and appetite control [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132 (6): 2116—2130.
- [17] Kim MS, Yoon CY, Jang PC, et al. The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18(9): 2291—2301.