

运动与饮食干预对肥胖大鼠脂肪组织视黄醇结合蛋白4基因表达及蛋白水平的影响*

封飞虎¹ 李春艳¹ 韩立伟¹ 杨月琴¹

摘要

目的:探讨运动与饮食干预对肥胖大鼠脂肪组织视黄醇结合蛋白4(RBP4)基因表达及蛋白表达水平的影响。

方法:健康雄性SD大鼠60只(60—95g),随机抽取10只作为普通膳食对照组(C),喂养标准普通饲料。其余50只喂养高脂膳食,7周后建立肥胖大鼠模型24只,再随机分为3组:高脂膳食组(HS,n=8)、普通膳食组(HS-D,n=8)和普通膳食运动组(HS-E,n=8)。8周后测试大鼠腹内脂肪组织RBP4 mRNA水平和蛋白水平。

结果:大鼠腹内脂肪组织RBP4 mRNA表达水平,HS组显著高于C组($P < 0.01$),HS-D和HS-E组显著低于HS组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),HS-E组显著低于HS-D组($P < 0.05$);4组大鼠腹内脂肪组织RBP4蛋白水平没有显著性差异($P > 0.05$)。

结论:肥胖大鼠腹内脂肪组织RBP4 mRNA表达水平显著上升;运动结合饮食干预非常显著性降低腹内脂肪组织RBP4 mRNA表达水平;运动与饮食干预对腹内脂肪组织的RBP4蛋白水平无显著影响。

关键词 运动;饮食干预;脂肪组织;视黄醇结合蛋白4

中图分类号:R723.14, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2013)-07-0611-04

The effects of exercise and diet intervention on gene expression and protein level of retinol-binding protein 4 in adipose tissue of obesity rats/FENG Feihu, LI Chunyan, HAN Liwei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(7): 611—614

Abstract

Objective: To investigate the effects of exercise and diet intervention on gene expression and protein level of retinol-binding protein 4(RBP4) in adipose tissue of obesity rats.

Method: Sixty healthy male Sprague-Dawley rats (60—95g) were assigned in this study, of which rats were randomly selected as normal dietary control group(C, n=10) and fed with normal standard diet. The remaining 50 rats were fed with high-fat diet. Seven weeks later, 24 diet-induced-obesity rats models were established. They were randomly divided into three groups: high fat dietary group (HS, n=8), normal dietary group (HS-D, n=8) and normal dietary exercise group (HS-E, n=8). Eight weeks later, the RBP4 mRNA level and RBP4 protein level in visceral adipose tissue of every group's rats were examined.

Result: The RBP4 mRNA level in visceral adipose tissue of rats was as follow: that in HS group that was significantly higher than that in C group ($P < 0.05$), that in HS-D and HS-E groups were significantly lower than that in HS group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), that in HS-E group was significantly lower than that in HS-D group ($P < 0.05$); RBP4 protein level in visceral adipose tissue had no difference among four groups ($P > 0.05$).

Conclusion: RBP4 mRNA expression in visceral adipose tissue were significantly higher in obesity rats. Exercise and diet intervention could significantly decrease RBP4 mRNA expressions; RBP4 protein level in visceral adipose tissue was not significantly influenced by exercise and diet intervention.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.07.004

*基金项目:湖北省教育厅科学技术研究项目(D20114103)

1 武汉体育学院,武汉,430079

作者简介:封飞虎,男,硕士,教授;收稿日期:2012-07-16

Author's address Wuhan Institute of Physical Education, Wuhan, 430079

Key word exercise; diet intervention; adipose tissue; retinol-binding protein 4

国内外有关肥胖的进一步研究认为,脂肪组织已不仅是传统意义上的储能器官,更是一个可以分泌产生多种激素和细胞因子的内分泌器官^[1-2]。由脂肪组织分泌产生的生物活性分子,如瘦素、脂联素、抵抗素、内脂素、肿瘤坏死因子- α 及视黄醇结合蛋白4(retinol-binding protein 4, RBP4)等,统称为脂肪因子。RBP4是2005年Qin Yang等^[3]在研究肥胖和2型糖尿病的脂肪组织GLUT4葡萄糖载体表达时偶然发现的由脂肪细胞分泌的一种参与胰岛素抵抗的蛋白因子,并发现单纯肥胖和肥胖糖尿病患者的血清RBP4水平较正常对照组高19倍,提示RBP4升高与肥胖有关。进一步研究发现,人体内RBP4主要由肝脏和脂肪组织分泌,肥胖者血清RBP4水平升高,与体脂异常分布、胰岛素水平及代谢综合征组分相关^[4]。然而当前围绕运动与饮食干预对RBP4的影响研究不多,本研究拟通过高脂膳食诱导建立肥胖大鼠模型,探讨运动与饮食干预对脂肪组织RBP4基因表达及蛋白表达水平的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲料

健康清洁级3—4周龄离乳SD雄性大鼠60只,由华中科技大学同济医学院动物中心提供,体重60—95g。普通饲料由湖北省预防医学研究院提供。高脂饲料配方如下:50%标准饲料、15%猪油、10%白糖、5%奶粉、10%蛋黄、5%花生仁、5%芝麻油。

1.2 方法

1.2.1 肥胖大鼠模型建立:SD大鼠适应性喂养3d后,随机分为两组,普通饲料喂养对照组(C)10只,高脂饲料诱导组(HS)50只,给予高脂饲料。分别将所有大鼠编号,每周定期称量大鼠体重,测量体长。所有大鼠均自由进食、进水。大鼠肥胖判断标准:经高脂饲料喂养大鼠7周后,大鼠的体重超过普通饲料喂养大鼠平均体重的1.96倍标准差即作为实验肥胖大鼠^[5]。

1.2.2 肥胖大鼠分组及干预:经过体重筛选出肥胖大鼠24只,再随机分为三组(每组8只):肥胖+高脂膳食不运动组(HS)、肥胖+普通膳食+不运动组

(HS-D,第8周开始喂养普通饲料)和肥胖+普通膳食+运动组(HS-E,第8周开始进行运动干预与喂养普通饲料),所有大鼠自由进食、进水。

运动结合饮食干预组运动方案:大鼠专用电动跑台,坡度5°,速度15.2m/min,相当 $(64 \pm 4.5)\%$ VO_{2max} 强度^[6],并电击驱赶。运动时间60min,每周6次,周日休息,持续8周。

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,心脏取血后,分离血清,迅速取出肾周脂肪组织和睾周脂肪组织并称重,用铝箔纸包好,投入液氮中速冻,之后转入-80℃冰箱保存。

1.4 测定方法

1.4.1 血清生化指标的测定:总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂肪蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)由全自动生化分析仪测定,按试剂盒说明进行。

1.4.2 大鼠腹内脂肪组织RBP4蛋白表达水平测定:准确称取脂肪组织重量,按照重量体积比1:9比例加入9倍体积匀浆介质,研磨制成10%组织匀浆液,低温低速离心机3000r/min离心10min,取上清液待测。采用美国Rapidbio(RB)公司RBP4 ELISA试剂盒测定,所得结果换算成每克脂肪组织含量。

Trizol Reagent购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒均购自日本TOYOBO公司。PCR仪(Life express Thermal Cycle)为杭州博日科技有限公司生产,荧光定量PCR仪(SLAN荧光定量PCR检测系统)为上海宏石医疗科技有限公司生产。

引物由Invitrogen Biotechnology Co., LTD中国公司合成, RBP4上游引物:5'-GTG-TAGCCTCCTTTCTCCAG-3',下游引物:5'-GACAG-TAACCATTGTGCTCG-3'(NM013162),产物245bp; β -actin上游引物:5'-CGTTGACATCCGTA-AAGACCTC-3',下游引物:5'-TAGGAGC-CAGGGCAGTAATCT-3'(NM031144),产物110bp。

PCR扩增:95℃预变性1min,95℃变性15s→58℃退火20s→72℃延伸20s,40次循环;72℃末端延伸5min;溶解曲线:72℃→95℃,每20s升温1℃。

采用比较阈值法表示目的基因的相对表达,即 $\Delta \Delta Ct$ 法:目的基因的相对表达量= $2^{-\Delta \Delta Ct}$

$$\Delta CT = CT_{\text{目的基因}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta t_{\text{实验}} - \Delta t_{\text{对照组平均值}}$$

$2^{-\Delta \Delta Ct}$ 表示的是实验组目的基因的表达相对于对照组的倍数。

1.5 统计学分析

统计分析使用 13.0 版 SPSS 统计软件完成。结果以均数 ± 标准差表示。统计分析采用单因素方差分析和独立样本 *t* 检验。

2 结果

实验结果显示 HS 组血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)明显高于其他 3 组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);HS-E 组血清 TC、TG、LDL-C 与 C 组没有显著性差异,但高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)明显升高($P < 0.05$)。实验结果还显示,大鼠腹内脂肪组织 RBP4 mRNA 表达水平,HS 组显著高于 C 组($P < 0.01$),而 HS-D 和 HS-E 组均显著低于 HS 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),HS-E 组显著低于 HS-D 组($P < 0.05$);4 组大鼠腹内脂肪组织 RBP4 蛋白水平没有显著性差异($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠检测指标比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	血脂水平(mmol/l)				RBP4 mRNA 相对量	RBP4 蛋白 (ng/g 脂肪)
		TC	TG	HDL-C	LDL-C		
C	10	1.37 ± 0.29	0.38 ± 0.09	0.88 ± 0.13	0.44 ± 0.08	1	0.435 ± 0.134
HS	8	1.93 ± 0.11 ^②	0.77 ± 0.11 ^②	0.77 ± 0.21	0.61 ± 0.07 ^②	2.28 ± 0.43 ^②	0.444 ± 0.143
HS-D	8	1.44 ± 0.27 ^③	0.49 ± 0.10 ^{③④}	0.91 ± 0.19	0.46 ± 0.09 ^③	1.62 ± 0.76 ^{③⑤}	0.440 ± 0.126
HS-E	8	1.39 ± 0.20 ^③	0.41 ± 0.05 ^{④⑤}	1.03 ± 0.17 ^{④⑤}	0.49 ± 0.13 ^⑤	0.92 ± 0.67 ^{④⑤}	0.429 ± 0.132

与普食对照组(C组)比较:① $P < 0.05$,② $P < 0.01$;与高脂膳食肥胖非运动组(HS组)比较:③ $P < 0.05$,④ $P < 0.01$;HS-E与HS-D组比较:⑤ $P < 0.05$

3 讨论

本实验结果显示,高脂饲养诱导的肥胖大鼠腹内脂肪组织 RBP4 mRNA 水平明显升高,与大多数学者的研究结果一致。Graham 等^[7]在对正常糖调节正常体重质量(NW-NGT)、正常糖耐量超重肥胖(OW/OB-NGT)以及 T2DM 伴超重肥胖(OW/OB-T2DM)3 组人群的分析中发现,与正常对照组相比,血清 RBP4 水平在肥胖糖尿病和超重肥胖人群中均显著升高,以 OW/OB-T2DM 组升高最为明显。吴海娅等^[8]研究结果显示肥胖者的血清 RBP4 显著升高,以 OW/OB-T2DM 患者最高。相关分析提示,血清 RBP4 与腰臀围比值、TG、年龄呈正相关。Kloting 等^[9]研究发现,内脏脂肪分泌的 RBP4 可能是肥胖患者 RBP4 的主要来源。他们观察到,与正常体重指数者相比,肥胖患者内脏 RBP4 mRNA 升高 60 倍左右,睾周脂肪 RBP4 mRNA 升高约 12 倍。肥胖患者血清 RBP4 升高 2—3 倍,且与脂肪组织中 RBP4 的 mRNA 水平及内脏脂肪含量成正比,而与胰岛素敏感性成反比。贾伟平等^[10]在 1033 例不同肥胖程度的中国人群中,利用核磁共振技术研究内脏脂肪和血清 RBP4 的关系,发现 RBP4 血清水平与内脏脂肪呈正相关,而与反映总体脂含量的体质指数无关。刘晓华^[11]研

究表明,肥胖和 2 型糖尿病患者腹内脂肪 RBP4 mRNA 的表达量显著高于正常人;大鼠高脂喂养 8 周后血清 RBP4 水平显著升高,12 周后进一步升高;大鼠附睾周脂肪组织 RBP4 mRNA 和蛋白表达量均明显高于普通组,而肝脏组织 RBP4 mRNA 和蛋白的表达量却没有差异。血清 RBP4 与附睾脂肪 RBP4 mRNA 及蛋白表达量均明显相关,*r* 分别为 0.594 和 0.648,与肝脏组织 RBP4 mRNA 及蛋白均无明显相关性,说明脂肪组织来源的 RBP4 是导致其血清水平升高的主要原因之一。

本研究发现,肥胖大鼠 HS-D 组单独的饮食干预后,腹内脂肪组织 RBP4 mRNA 水平降低,与高脂肥胖组大鼠具有显著性差异($P < 0.05$),且高于普通饲料喂养组($P < 0.05$)。HS-E 组在运动结合饮食干预后,腹内脂肪组织 RBP4 mRNA 水平比 HS 组降低非常显著($P < 0.01$),与单独饮食干预 HS-D 组相比,也明显降低($P < 0.05$)。说明运动结合饮食干预更能降低腹内脂肪组织 RBP4 mRNA 水平。关于运动与饮食干预对 RBP4 的影响,国内外学者也开展了一些研究。Vitkova^[12]等证实:极低热量饮食可以显著降低血清 RBP4 水平,而在随后重新保持体重恒定的饮食后,血清 RBP4 复又升高,但仍然低于基础水

平。极低热量饮食控制后,脂肪组织RBP4基因表达水平下降,在低热量饮食控制和维持体重阶段上升。Soo Lim等^[13]对青年和中年健康妇女进行了10周的有氧运动干预,结果发现:血清RBP4水平和胰岛素抵抗改善的显著变化主要发生在中年妇女,而青年妇女的变化不明显,研究者将可能的原因归结于中年妇女有着更高的脂肪含量。Ji-Won LEE等^[14]进行的16周包括体育运动、生活方式调整的综合减重研究显示:体重降低19%的对象的血清RBP4水平也下降25.5%。张明军^[15]对肥胖青年女性进行12周慢跑锻炼干预,结果显示有氧运动能够降低肥胖者血清RBP4水平。王清生等^[16]对2型糖尿病肥胖大鼠进行8周游泳干预,结果表明大鼠附睾脂肪组织RBP4 mRNA表达下调,胰岛素敏感性提高,并伴有脂肪代谢的改善,但肝脏RBP4 mRNA表达无明显改变。赵芝^[17]研究发现,肥胖者血清RBP4、胰岛素水平显著高于正常人,通过16周有氧运动干预后,肥胖者体重、BMI、腰围、臀围显著下降,血清RBP4、胰岛素水平明显降低。

本研究发现,肥胖大鼠继续高脂饮食或进行运动与饮食干预,腹内脂肪组织RBP4水平虽有下降趋势,但没有显著性差异,说明运动与饮食干预对腹内脂肪组织的RBP4水平无显著影响。与刘晓华^[11]研究结果相反,而与章婷^[18]的研究结果一致。章婷研究发现,利用高脂饮食诱导的肥胖小鼠血清RBP4水平与肥胖、脂肪含量、血清胰岛素水平呈正相关;饮食和运动对脂肪组织及肝脏组织的RBP4表达水平无显著影响。血清中RBP4的增加可能是脂肪组织总量增加导致的;也可能是不同来源的脂肪组织分泌RBP4的能力不同。究其原因,可能是单位脂肪细胞产生的RBP4的量是一定的,脂肪细胞数量的增加是血清中RBP4总量增加的原因之一。此外,我们仅对腹内脂肪组织进行了研究,而没有检测皮下脂肪组织中RBP4的表达变化,可能不同来源的脂肪组织调节和分泌RBP4的能力不同。另外,我们检测的仅是滞留在组织内的RBP4水平,目前尚不能测量RBP4的分泌速率,所以不能排除RBP4在组织中有表达量的变化,但由于分泌过程的影响,在组织中无法准确测出。因此,对RBP4在肝脏及脂肪组织的转录及分泌机制的进一步研究有重要的意义。

本研究发现肥胖大鼠腹内脂肪组织RBP4

mRNA表达水平显著上升($P < 0.01$)。运动与饮食干预均能显著降低腹内脂肪组织RBP4 mRNA表达水平($P < 0.05$),运动结合饮食干预比饮食干预降低更明显($P < 0.01$);运动与饮食干预对腹内脂肪组织的RBP4蛋白表达水平均没有显著影响($P > 0.05$)。

参考文献

- [1] Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(6):2548—2556.
- [2] Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue[J]. *Br J Nutr*, 2004, 92(3):347—355.
- [3] Yang Q, Graham TE, Mody N, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes[J]. *Nature*, 2005, 436(7049):356—362.
- [4] 梁琳琅,张杰,周文平,等.代谢综合征患者血清视黄醇结合蛋白4的变化及其影响因素[J]. *中国实用内科杂志*,2008,(28):267—270.
- [5] 王重建,杨年红,许明佳,等.高脂饮食诱导大鼠肥胖易感性差异的研究[J]. *华中科技大学学报(医学版)*,2005,34(1):65—68.
- [6] Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures[J]. *J Appl Physiol*, 1979, 47(6):1278—1283.
- [7] Graham TE, Yang Q, Blüher M, et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(24):2552—2563.
- [8] 吴海娅,贾伟平.肥胖及2型糖尿病患者血清视黄醇结合蛋白4水平的变化及其临床意义[J]. *中华内分泌代谢杂志*,2006,22(3):290—293.
- [9] Klötting N, Graham TE, Berndt J, et al. Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass[J]. *Cell Metab*, 2007, 6(1):79—87.
- [10] Jia W, Wu H, Bao Y, et al. Association of serum retinol-binding protein 4 and visceral adiposity in Chinese subjects with and without type 2 diabetes[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(8):3224—3229.
- [11] 刘晓华.脂肪组织视黄醇结合蛋白4基因表达调控的研究[D].苏州大学,2010.
- [12] Vitkova M, Klimcakova E, Kovacicova M, et al. Plasma levels and adipose tissue messenger ribonucleic acid expression of retinol-binding protein 4 are reduced during calorie restriction in obese subjects but are not related to diet-induced changes in insulin sensitivity[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(6):2330—2335.
- [13] Lim S, Choi SH, Jeong IK, et al. Insulin-sensitizing effects of exercise on adiponectin and retinol binding protein-4 concentrations in young and middle-aged women[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(6):2263—2268.
- [14] Lee JW, Lee HR, Shim JY, et al. Abdominal visceral fat reduction is association with favorable changes of serum retinol binding protein-4 in nondiabetic subjects[J]. *Endocr J*, 2008, 55(5):811—818.
- [15] 张明军.运动干预后肥胖青年女性RBP4与GLUT4 mRNA表达的相关性研究[J]. *福建体育科技*,2009,28(5):31—33.
- [16] 王清生,张明军.游泳运动对2型糖尿病大鼠脂肪组织、肝脏RBP4 mRNA表达的影响[J]. *北京体育大学学报*,2009,32(3):61—66.
- [17] 赵芝.有氧运动对肥胖者血清RBP4、TNF- α 水平的影响[D].苏州大学,2010.
- [18] 章婷.肥胖小鼠RBP4水平与胰岛素抵抗的关系及运动干预的影响[D].中南大学,2007.