

复配式粗杂粮对胰岛素抵抗大鼠 LCN-2 表达影响*

韩淑芬 张红 迟静 刘亚琪 周思宇 翟成凯

摘要:目的 探讨全谷豆复配式粗杂粮对高脂膳食诱导胰岛素抵抗大鼠肝脏和脂肪组织中载脂蛋白 2(LCN-2) 影响。方法 40 只雄性 SD 大鼠随机分为阴性对照组、高脂模型组、米面组和粗杂粮组,以相应饲料连续喂养 8 周,测定各组大鼠血清空腹血糖(FBG)和胰岛素(FINS)水平,并计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR);Western blotting 检测各组大鼠肝脏和脂肪组织中 LCN-2 和过氧化物酶体增殖体激活受体- γ (PPAR- γ) 蛋白表达。结果 与阴性对照组比较,高脂模型组和米面组血清 FBG 和 FINS 水平明显升高($P < 0.05$)。高脂模型组和米面组 HOMA-IR 分别为(10.39 ± 1.63)和(10.34 ± 1.36),明显高于阴性对照组(6.85 ± 1.33);与高脂模型组和米面组比较,粗杂粮组 HOMA-IR(6.81 ± 1.37)明显下降,粗杂粮组 LCN-2 在肝脏和脂肪组织中表达明显低于高脂模型组和米面组,PPAR- γ 则相反。结论 全谷豆复配式粗杂粮可以激活胰岛素抵抗大鼠 PPAR- γ 蛋白,进而降低脂肪因子 LCN-2 表达,改善胰岛素敏感性。

关键词: 全谷豆复配式粗杂粮;胰岛素抵抗;载脂蛋白 2;过氧化物酶体增殖体激活受体- γ

中图分类号: R 151.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)05-0638-03

Impact of whole grain compound on insulin resistance and level of lipocalin-2 in rats fed with high fat/cholesterol diets HAN Shu-fen, ZHANG Hong, CHI Jing, et al. Department of Food Hygiene and Nutrition, School of Public Health, Southeast University(Nanjing 210009, China)

Abstract: Objective To explore the effect of whole grain compound on insulin resistance and level of lipocalin-2 (LCN-2) in liver and epididymal adipose tissues of rats fed with high fat/cholesterol diets. **Methods** Forty Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group, model group, white rice/processed wheat starch group, and whole grain compound group. All groups were given different experimental diets for 8 weeks. The serum fasting blood glucose (FBG) and fasting insulin (FINS) were measured and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated. Protein expression of LCN-2 and peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) in liver and epididymal adipose tissues were analyzed by western blotting. **Results** The insulin resistance model of SD rats was successfully established. Compared with the control group, serum FBG and FINS levels were significantly increased in white rice/processed wheat starch group and model group ($P < 0.05$). HOMA-IR values of white rice/processed wheat starch group and model group were 10.39 ± 1.63 and 10.34 ± 1.36. The rats fed with whole grain compound diet showed a decreased HOMA-IR level (6.81 ± 1.37) compared with white rice/processed wheat starch group and model group. Protein expression of LCN-2 in whole grain compound group was significantly lower than those of other two groups, too. However, the level of PPAR- γ in whole grain compound group was higher than that of other two groups. **Conclusion** Whole grain compound could improve glucose metabolism and insulin sensitivity through activating protein expression of PPAR- γ and reducing relative level of LCN-2 in the liver of rats.

Key words: compound whole grain; insulin resistance; lipocalin-2; PPAR- γ

胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是肥胖、糖尿病、血脂异常等代谢综合征 (metabolic syndrome, MS) 发病的基础,在 MS 病因机制中处于中心地位。环境因素是引起胰岛素抵抗发生的原因之一,包括高脂和高糖膳食、吸烟、肥胖、缺乏运动等。全谷豆复配式粗杂粮富含优质蛋白质、维生素、矿物质、膳食纤维和植物化学物等生物活性物质,血糖生成指数 (glycemic index, GI) 为 52.6^[1],归为低 GI 食物,研究显示全谷豆复配式粗杂粮膳食干预能够改善三高人群的血压、血脂和血糖^[2-3],但其产生生物学作用的机制有待进一步研究。本研究通过全谷豆复配式粗杂粮膳食干预,观察其对胰岛素抵抗大鼠糖代谢指标的影响,以及载脂蛋白 2 (lipocalin-2, LCN-2) 和过氧化物酶体增殖体激活受体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR- γ) 在胰岛素抵抗和膳食干预中作用,旨在进一步探讨 IR 发生发展病理生理机制,为预防

和控制营养相关代谢性疾病提供优良食物资源。

1 材料与方

1.1 仪器和试剂 722 型分光光度计 (上海第三分析仪器厂);GC-911 γ 放射免疫计数器 (合肥科大创新公司中佳分公司);Western 电转仪 (美国 Bio-Rad 公司)。全谷豆复配式粗杂粮 (小麦、玉米、高粱、小米和黄豆为原料,按一定比例混合而成);空腹血糖试剂盒 (南京建成生物工程研究所);空腹胰岛素试剂盒 (北京科美东雅生物技术公司);全蛋白抽提、Bradford 蛋白含量检测、化学发光检测试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司);LCN-2 抗体 (美国 Millipore 公司);PPAR- γ 抗体 (美国 Santa Cruz 公司);聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜 (美国 Millipore 公司);二抗辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG (美国 Cell Signal 公司)。

1.2 实验动物 清洁级近交系雄性 SD 大鼠 (中国科学院上海实验动物中心),40 只,体重 200 ~ 220g,许可证号:SCXK (沪) 2007-0005。实验动物饲养于东南大学公共卫生学院 SPF 实验动物中心,单笼饲养,自由摄水。

1.3 方法

1.3.1 饲料配制及动物分组 阴性对照组饲料参照 AIN-76A 实验动物合成饲料配方。在阴性对照组饲料基础上增加饱和

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81072287, 30872118)

作者单位: 东南大学公共卫生学院营养与食品卫生系,江苏南京 210009

作者简介: 韩淑芬 (1981-),女,山西寿阳人,博士在读,研究方向: 营养相关代谢性疾病。

通讯作者: 翟成凯, E-mail: zck@seu.edu.cn

脂肪酸和胆固醇含量,制成高脂饲料,其中脂肪 12.8 g/100 g 和胆固醇 1.75 g/100 g;同时用粳米粉、面粉或复配式粗杂粮粉代替高脂饲料中蔗糖和淀粉部分,配制成米面和粗杂粮饲料。将实验动物适应性喂养 1 周后,按 HOMA-IR 随机分为阴性对照组、高脂模型组、米面组和粗杂粮组,分别喂饲不同饲料,连续喂养 8 周。

1.3.2 生化指标测定 各组大鼠在禁食 12~14 h 后股动脉采血 3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,测定空腹血糖和胰岛素水平;取大鼠肝脏和脂肪组织并称重,计算肝体比(肝脏湿重/空腹体重)和脂体比(睾周和肾周脂肪/空腹体重);留取部分肝脏和脂肪组织保存于 -80 °C 冰箱,用于检测 LCN-2 和 PPAR-γ 蛋白表达。FBG 测定采用葡萄糖氧化酶法;FINS 测定采用放射免疫沉淀法。胰岛素抵抗评定采用 HOMA 稳态模型计算: $HOMA-IR = (FINS \times FBG) / 22.5$,胰岛 β 细胞功能采用以下公式计算: $HOMA-\beta = (20 \times FINS / FBG) - 3.5$ 。

1.3.3 LCN-2 和 PPAR-γ 蛋白表达 采用 Western blotting 法,按试剂盒步骤提取总蛋白,并用 Bradford 法定量蛋白浓度,等量取各组样本总蛋白 70 μg,进行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,转至 PVDF 膜,在含有脱脂奶粉的封闭液 PBST(磷酸盐缓冲液 + 0.05% Tween-20, pH 7.6)中室温封闭 1 h,加 LCN-2 抗体(稀释 1:100)或 PPAR-γ 抗体(稀释 1:500)于一抗稀释液中 4 °C 摇床孵育过夜, PBST 冲洗 3 次(5 min/次),然后加入 HRP 标记羊抗兔 IgG(稀释 1:5 000)室温下孵育 2 h, PBST 冲洗 3 次,加化学发光剂曝光显影。杂交信号用图像分析系统进行目的蛋白及内参(β-actin)灰度值分析,以目的蛋白灰度值/内参照蛋白灰度值作为所测目的蛋白相对含量。

1.4 统计分析 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 统计软件中单因素方差分析进行数据处理,组间比较采用最小显著差值 *t* 检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 全谷豆复配式粗杂粮对大鼠体重及脏体比影响 实验前各组大鼠体重无明显差异,实验末期高脂模型组(506.27 ± 16.14) g 和米面组(496.87 ± 20.55) g 体重大于粗杂粮组(462.19 ± 23.20) g ($F = 11.284, P < 0.05$);粗杂粮组与阴性对照组(471.29 ± 17.70) g 比较,差异无统计学意义。模型组和米面组肝体比及脂体比均高于粗杂粮组和阴性对照组($F = 53.121, 6.401, P < 0.05$)。

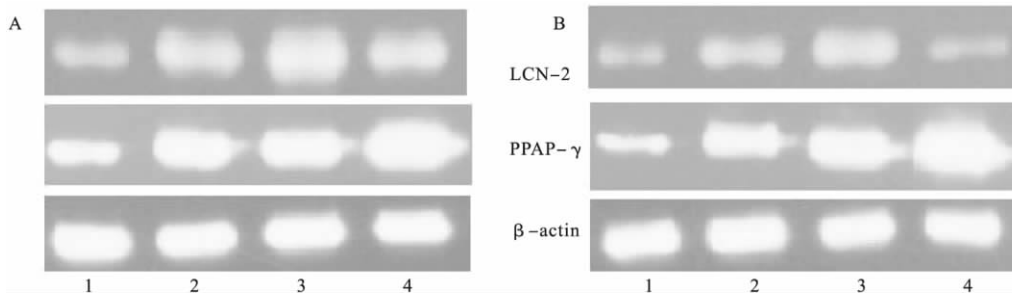
2.2 全谷豆复配式粗杂粮对胰岛素抵抗大鼠糖代谢指标影响(表 1) 高脂模型组血清 FBG、FINS、HOMA-IR 和 HOMA-β 明显高于阴性对照组($t = 3.297, 4.301, 5.539, 2.699, P < 0.05$);与高脂模型组和米面组比较,粗杂粮组血清 FBG、FINS、HOMA-IR 和 HOMA-β 明显降低($F = 6.038, 14.816, 20.390, 3.473, P < 0.05$);粗杂粮组血糖和胰岛素水平与阴性对照组比较,差异无统计学意义。

表 1 全谷豆复配式粗杂粮对胰岛素抵抗大鼠糖代谢指标影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | FBG(mmol/L) | FINS(mIU/mL) | HOMA-IR | HOMA-β |
|-------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 阴性对照组 | 6.05 ± 0.58 | 25.57 ± 4.51 | 6.85 ± 1.33 | 82.08 ± 18.18 |
| 高脂模型组 | 6.98 ± 0.72 ^a | 33.75 ± 5.81 ^a | 10.39 ± 1.63 ^a | 94.84 ± 23.10 ^a |
| 米面组 | 6.66 ± 0.74 ^a | 34.98 ± 3.54 ^a | 10.34 ± 1.36 ^a | 102.80 ± 15.80 ^a |
| 粗杂粮组 | 5.95 ± 0.45 ^{bc} | 25.59 ± 3.40 ^{bc} | 6.81 ± 1.37 ^{bc} | 82.37 ± 8.07 ^{bc} |

注:与阴性对照组比较,^a $P < 0.05$;与高脂模型组比较,^b $P < 0.05$;与米面组比较,^c $P < 0.05$ 。

2.3 肝脏和脂肪组织 LCN-2 和 PPAR-γ 蛋白表达(图 1) 与阴性对照组比较,高脂模型组大鼠肝脏和脂肪组织中 LCN-2 蛋白表达升高;与高脂模型组和米面组比较,粗杂粮组组织 LCN-2 蛋白表达明显降低($F = 75.305, 62.245, P < 0.05$)。与阴性对照组比较,高脂模型、米面、粗杂粮组大鼠肝脏和脂肪组织中 PPAR-γ 蛋白表达明显升高($F = 689.622, 501.667, P < 0.05$),其中粗杂粮组表达量最高。



注:A:肝脏组织;B:脂肪组织;1:阴性对照组;2:高脂模型组;3:米面组;4:粗杂粮组。

图 1 大鼠肝脏和脂肪组织中 LCN-2 和 PPAR-γ 蛋白表达

3 讨论

本研究结果表明,SD 大鼠经高脂饲料喂养 8 周后,HOMA-IR 和 HOMA-β 水平均明显高于阴性对照组,提示大鼠整体胰岛素敏感性下降,高脂膳食诱导的大鼠 IR 模型建立成功;米面组 FBG 和 FINS 水平与高脂模型组无明显差异,提示精米面对 IR 大鼠无明显改善作用;粗杂粮组降低了大鼠血清 FBG 和 FINS 浓度,抑制了肝体比和脂体比的增加,提示全谷豆复配式粗杂粮能够改善高脂膳食诱导的大鼠 IR。研究显示,全谷类食物富含植物化学物和膳食抗氧化剂,在营养相关慢性病的预防和控制中具有重要作用⁽⁴⁾。全谷豆复配式粗杂粮是由小麦、玉米、高粱、小米和黄豆混合制成的全谷类食物,具有营养互补性,并富含膳食纤维和植物化学物,这些物

质参与机体糖脂代谢过程,可抑制高脂膳食引起的氧化应激,提高胰岛素敏感性,改善 IR。

脂肪组织分泌的具有生物活性的脂肪细胞因子在与低度炎症相关的肥胖和 IR 中发挥了重要作用⁽⁵⁾。LCN-2 是一种新发现的脂肪细胞因子,与肥胖、IR 和其他心血管疾病密切相关⁽⁶⁻⁷⁾。研究表明⁽⁸⁾,db/db 小鼠肝脏和脂肪组织高度表达 LCN-2,用 PPAR-γ 激动剂罗格列酮干预后,LCN-2 表达下降,提示 PPAR-γ 下调了 LCN-2 表达,抑制肥胖所伴随的慢性炎症和改善 IR。本研究结果表明,高脂模型组 LCN-2 在肝脏和脂肪组织表达均高于阴性对照组,提示 LCN-2 高表达可能是导致 IR 发生的因素之一。全谷豆复配式粗杂粮富含大量生物活性物质,是 PPAR-γ 的内源性激动剂⁽⁹⁾,可以通过上调

和激活 IR 大鼠 PPAR- γ 蛋白表达,进而降低脂肪因子 LCN-2 表达,改善胰岛素敏感性;同时可增强脂肪组织蓄积 TG 能力,促进脂肪酸向 TG 酯化,降低外周循环系统的 TG 和游离脂肪酸的水平,从而缓解脂质毒性,改善胰岛素抵抗^[10]。

参考文献

- (1) 郭宝福,翟成凯,姜明霞,等. 复配式粗杂粮的营养成分特征及其对人体血糖生成的影响[J]. 卫生研究, 2006, 35(4): 450-452.
- (2) 刘昊,翟成凯,姜玲,等. 空腹血糖受损人群复合式营养干预效果评价[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(4): 427-428.
- (3) 张群,翟成凯,王艳丽,等. 过氧化物增值激活受体 γ 2 基因多态性对高血脂人群膳食干预效果的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2010, 44(1): 39-43.
- (4) Liu RH. Whole grain phytochemicals and health[J]. J Cereal Sci, 2007, 46(3): 207-219.
- (5) Zou CH, Shao JH. Role of adipocytokines in obesity-associated insulin resistance[J]. J Nutr Biochem, 2008, 19(5): 277-286.
- (6) Yan QW, Yang Q, Mody N, et al. The adipokine lipocalin-2 is regulated by obesity and promotes insulin resistance [J]. Diabetes, 2007, 56: 2533-2540.
- (7) Moreno-Nararrete JM, Manco M, Ibanez J, et al. Metabolic endotoxemia and saturated fat contribute to circulating NGAL concentrations in subjects with insulin resistance [J]. Int J Obesity, 2009, 242: 1-10.
- (8) Wang Y, Lam KS, Kraegen EW, et al. Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance and hyperglycemia in humans [J]. Clinical Chemistry, 2007, 53(1): 34-41.
- (9) Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPAR γ [J]. Cell, 2005, 123: 993-999.
- (10) Gelman L, Feige JN, Desvergne B. Molecular basis of selective PPAR γ modulation for the treatment of type 2 diabetes [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2007, 1771: 1094-1107.

收稿日期: 2011-08-02

(解学魁编辑 刘铁校对)

【实验研究】

硒对家兔心肌缺血再灌注损伤膜磷脂保护作用

范颖, 黄波, 宋光熠

摘要:目的 观察硒对家兔心肌缺血再灌注损伤(IRI) 膜磷脂的保护作用。方法 24 只家兔, 雌雄各半, 随机分成假手术组、缺血再灌注组、硒组, 分别检测心肌组织中总磷脂(PL)、总胆固醇(Ch)、磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL) 含量。结果 缺血再灌注组与假手术组比较, 缺血再灌注组 PL、PE、CL 含量(41. 21 \pm 9. 71、415. 30 \pm 31. 25、200. 56 \pm 29. 41) 明显降低($P < 0. 05$), Ch 含量(88. 75 \pm 14. 03) 明显升高($P < 0. 05$)。硒组与缺血再灌注组比较, 硒组 PL、PE、CL 含量(58. 73 \pm 11. 12、764. 34 \pm 51. 87、325. 79 \pm 31. 14) 明显升高($P < 0. 05$), 硒组 Ch 含量(62. 41 \pm 12. 11) 明显降低($P < 0. 05$)。结论 硒对家兔心肌缺血再灌注损伤膜磷脂有保护作用。

关键词: 硒; 缺血再灌注损伤; 磷脂

中图分类号: R 151. 3

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)05-0640-03

Protective effect of selenium on membrane phospholipids in myocardial ischemia reperfusion injury in rabbits FAN Ying, HUANG Bo, SONG Guang-yi, et al. Department of Biochemistry, Liaoning Provincial Health Professional Technical College(Shenyang 110101, China)

Abstract: Objective To study the protective effect of selenium on membrane phospholipids in myocardial ischemia reperfusion injury(IRI) in rabbits. **Methods** Twenty-four rabbits were randomly divided into non-operation group, ischemia reperfusion group and selenium group. The cardiac tissue was collected at 60 min reperfusion for determination of phospholipid(PL), cholesterol(Ch), phosphatidyl ethanolamine(PE), and cardiolipin(CL) content. **Results** Compared to non-operation group, the contents of PL, PE and CL in IRI group were significantly lower than in ischemia reperfusion group($P < 0. 05$). The content of Ch in IRI group was significantly higher than in non-operation group($P < 0. 05$). The contents of PL, PE and CL in selenium group were significantly higher than those of IRI group($P < 0. 05$). The content of Ch in selenium group was significantly lower than IRI group($P < 0. 05$). **Conclusion** Selenium can protect membrane phospholipids in myocardial ischemia reperfusion injury in rabbits.

Key words: selenium; ischemia reperfusion injury; phospholipid

硒是一种人体必需的微量元素, 缺乏硒元素是高血压综合征、冠心病、缺血性心肌梗死、动脉粥样硬化等扩张性心脏病的重要发病原因之一。宋光熠、李贤相等^[1-2]对硒的研究实验证明, 硒元素对心肌缺血再灌注损伤的保护作用可以通过抗脂质过氧化作用和清除自由基途径完成。但是, 由于心肌缺血性损伤的发生机制非常复杂, 尚未彻底阐明。本研究

从硒对心肌缺血再灌注损伤时膜磷脂的保护作用, 探讨硒元素的作用机制, 以为以硒为核心的中药复方制剂的开发提供理论依据。

1 材料与方

1.1 试剂与仪器 亚硒酸钠(北京市朝阳区中联化工试剂厂, 批号 960729) 临用时用生理盐水配制, 灭菌后备用。磷脂标准品 66F-8375(美国 Sigma 公司)。cs930 自动色谱扫描仪(日本岛津公司)。

1.2 动物分组 日本大耳白兔 24 只, 2~3kg, 雌雄各半(中国医科大学第二临床医院医学实验动物中心提供)。实验动

作者单位: 辽宁卫生职业技术学院生化教研室, 辽宁 沈阳 110101

作者简介: 范颖(1972-), 河南南阳人, 讲师, 硕士, 研究方向: 缺血性心脏病。

通讯作者: 宋光熠, E-mail: fy_8@163.com