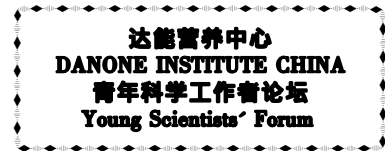


高脂膳食诱导的大鼠肥胖对小肠 黏膜糖吸收功能的影响



黄微 刘瑞¹ 郭韡 魏娜 强鸥 李献 欧艳 唐承薇
四川大学华西医院 生物治疗国家重点实验室 人类疾病相关多肽研究室,
华西医院消化内科, 成都 610041

摘要:目的 探讨高脂膳食诱导肥胖的发生是否与小肠黏膜糖类消化及吸收功能的改变相关联。方法 46只雄性SD大鼠随机分为高脂组($n=31$)与正常对照组($n=15$),分别用高脂饲料和基础饲料饲养24周。24周后高脂饲料组大鼠根据体重分为肥胖组($n=16$)及肥胖抵抗组($n=10$)。测定大鼠的体重及腹腔脂肪湿重、空腹血糖水平、小肠黏膜麦芽糖酶及蔗糖酶活性。免疫组织化学法、RT-PCR法及蛋白质免疫印迹法检测大鼠小肠黏膜中 Na^+ -依赖型葡萄糖转运蛋白(SGLT-1)的表达水平。结果 肥胖组大鼠的体重、腹腔脂肪湿重、空腹血糖水平、小肠黏膜麦芽糖酶活性及SGLT-1蛋白表达量显著高于正常对照组及肥胖抵抗组($P<0.05$)。3组大鼠小肠黏膜蔗糖酶活性无明显差异($P>0.05$)。肥胖组大鼠小肠黏膜SGLT-1 mRNA的表达水平与正常对照组及肥胖抵抗组比较分别增加了12.5%和23%,但差异无显著性($P>0.05$)。结论 高脂膳食诱导的大鼠肥胖与小肠黏膜中麦芽糖酶活性增强及糖吸收的关键分子SGLT-1的表达增加相关联。

关键词: 肥胖 小肠吸收 Na^+ -依赖型葡萄糖转运蛋白 麦芽糖酶 大鼠
中图分类号: R151.2 Q591.4 文献标识码: A

Impact of high-fat diet induced obesity on glucose absorption in small intestinal mucosa in rats

HUANG Wei, LIU Rui, GUO Wei, WEI Na, QIANG Ou,
LI Xian, OU Yan, TANG Chengwei

Division of Peptides Related with Human Disease, West China Hospital, Sichuan University,
Department of Gastroenterology, West China Hospital,
Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To investigate whether high-fat diet induced obesity was associated with variation of glucose absorption in small intestinal mucosa of rats. **Methods** 46 male SD rats were randomly divided into high-fat diet group ($n=31$) and control group ($n=15$), fed with high-fat diet and normal diet for 24 weeks, respectively. After 24 weeks, the rats were divided into obese ($n=16$) and obesity-resistant group ($n=10$) according to their body weight. Rats' body weight, abdominal fat weight, plasma glucose level, maltase, sucrase activity in small intestinal mucosa were measured. SGLT-1

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30870919); 四川省科技厅科技支撑计划(No. 2010SZ0176)

作者简介: 黄微,女,硕士研究生,E-mail: cdqww@yahoo.cn

¹ 通讯作者: 刘瑞,女,副研究员,硕士生导师,研究方向: 脂代谢与动脉粥样硬化发病机理研究,胃肠多肽与疾病,
E-mail: lrui60@yahoo.com.cn

expression in intestinal mucosa was detected by immunohistochemistry, RT-PCR and Western blot. **Results** Mean body weight, abdominal fat weight, fast plasma glucose levels, maltase activities and SGLT-1 protein expression in intestinal mucosa of obese rats were significantly higher than those in the control and obesity-resistant rats ($P < 0.05$). Sucrase activities in intestinal mucosa showed no statistical difference among the three groups ($P > 0.05$). The SGLT-1 mRNA expression in obese group was increased by 12.5% and 23% when compare with the control and obesity-resistant group, respectively. But the difference was not statistical significant ($P > 0.05$). **Conclusion** High-fat diet induced obesity was associated with the increased intestinal maltase activity and expression of SGLT-1 in rats, the key molecule in glucose absorption.

Key words: obesity, small intestinal absorption, Na^+ -dependent glucose transporter protein, maltase, rat

机体的主要能量来源于小肠内营养物质的消化及吸收。碳水化合物是食物的主要成分,碳水化合物的消化及吸收主要是肠腔内淀粉的水解、小肠黏膜上皮细胞刷状缘双糖酶对双糖的水解和 Na^+ -依赖型葡萄糖转运蛋白 (Na^+ -dependent glucose transporter protein, SGLT-1) 介导的葡萄糖进入细胞的过程^[1]。SGLT-1 是葡萄糖跨膜转运的载体,当载体与 Na^+ 结合时,其与葡萄糖的结合力增高, Na^+ -载体-葡萄糖复合物顺 Na^+ 的浓度梯度进入细胞后,SGLT-1 的构象还原到原始状态,重新暴露其表面的结合位点,以便再次与葡萄糖结合。SGLT-1 是小肠葡萄糖吸收的决定因素,直接关系到体内能量的摄入与代谢。其含量和功能上的异常可导致一系列病理改变和临床症状^[2-3]。本研究拟探讨高脂膳食诱导的大鼠肥胖是否与小肠黏膜内糖类消化及吸收功能的变化相关联。

1 材料与方法

1.1 实验动物

出生 21d、断乳 3d 的健康雄性 SD 大鼠 46 只,购于四川大学华西医学中心实验动物中心。适应性饲养 3d 后,将大鼠随机分为 2 组:一组喂食基础饲料(面粉 20g,小麦 7.2g,玉米 25.6g,麦麸 4g,草粉 8g,骨粉 2g,鱼粉 6g,盐 1g,豆粕 22g,酵母 2g,蛋氨酸 0.2g,赖氨酸 0.2g,维生素 0.02g,玉米油 2g,290kcal/100g),作为正常对照组,共 15 只;另一组喂食高脂饲料(基础饲料中添加 10% 蛋白质、15% 猪油及 10% 蔗糖,430kcal/100g),共 31 只。大鼠自由摄食和饮水,饲养于动物独立通气笼具中,每周记录体重,测量身长,共饲养 24 周。实验结束时在喂食高脂饲料组大鼠中选取体重大于等于正常对照组体重均值

加 1.4 倍标准差者作为肥胖组大鼠,共 16 只,体重小于正常对照组体重均值加 1 倍标准差者作为肥胖抵抗组大鼠,共 10 只^[4]。

1.2 体重、身长测量及计算 Lee's 指数

每周定时测量各组大鼠的体重及身长(鼻至肛门长度),计算 Lee's 指数 [计算公式: 体重 (g)^{1/3} × 1000 / 身长 (cm)]。

1.3 标本收集

实验结束时,大鼠禁食 12h,用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,取股静脉血,肝素抗凝,离心分离血浆,-80℃ 保存,用于测定空腹血糖水平。快速取出小肠,每只大鼠取小肠上段相同部位处肠段 2cm,置于卡纸上用 4% 多聚甲醛固定,经过脱水、透明后常规石蜡包埋,5μm 切片,用于免疫组织化学测定。留取肾周脂肪组织、睾周脂肪组织和网膜脂肪组织。腹腔脂肪湿重 = 肾周脂肪 + 睾周脂肪 + 网膜脂肪。另取 10cm 上段小肠纵行剖开肠管,冷生理盐水冲洗数次,玻片轻轻刮取黏膜收集,-80℃ 保存,用于麦芽糖酶及蔗糖酶活性测定及蛋白免疫印迹实验。取 1cm 小肠 -140℃ 保存用于总 RNA 提取。

1.4 空腹血糖水平测定

血糖测定试剂盒购自四川迈克科技有限责任公司。按照说明书操作,采用 GOD-PAP 法,用分光光度计,测定各管吸光度。计算公式如下:

大鼠空腹血糖 = (测定 A / 标准 A) × 标准浓度 (5.55mmol/L)

1.5 小肠黏膜麦芽糖酶及蔗糖酶活性测定

麦芽糖酶及蔗糖酶活性测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所,蛋白定量试剂盒购自 PIERCE 公司。制备 10% 小肠黏膜匀浆液,按说明书操作,用分光光度计测定其吸光度值,测出麦芽糖酶及蔗糖酶的活性。酶活力单位的定义:在

37℃、pH6.0 的条件下,每毫克蛋白组织每分钟水解 1nmol 双糖定义为一个酶活力单位 (U/mg protein)。计算公式如下:

$$\text{双糖酶的活性 (U/mg pro)} = [(\text{测定 A} - \text{对照 A}) / (\text{标准 A} - \text{空白 A})] \times \text{标准浓度} (5.55\text{mmol/L}) / [\text{反应时间} (20\text{min}) \times \text{样本蛋白浓度} (\text{mg pro/ml})] \times 1000$$

1.6 SGLT-1 在小肠黏膜中的表达

1.6.1 SGLT-1 的免疫组织化学测定

小肠石蜡组织切片经脱蜡 3% H₂O₂ 处理,高压修复抗原,正常山羊血清封闭,滴加 SGLT-1 羊抗大鼠多克隆抗体 (Santa Cruz 公司,美国),稀释比例为 1:200,4℃ 孵育过夜,37℃ 复温后滴加生物素标记兔抗羊二抗,37℃ 孵育,滴加辣根过氧化物酶,37℃ 30min, DAB 显色,苏木素复染,盐酸酒精分化,返蓝,最后脱水、透明、封片。光镜下观察结果。使用 Image-Pro Plus 软件对阳性反应区域计算积分吸光度值 (IA 值)。

1.6.2 SGLT-1 mRNA 的表达

总 RNA 提取试剂盒购自大连宝生物工程有限公司。每 100mg 小肠组织样本中加入 1ml Trizol 提取液提取总 RNA,测定 RNA 提取液浓度。使用逆转录试剂盒 (MBI, Fermentas Life Sciences 公司) 完成逆转录, -80℃ 保存 cDNA 液。SGLT-1 基因的 PCR 扩增: PCR 扩增引物参照文献 [5],由上海 Invitrogen 公司合成。SGLT-1 上游引物: 5'-CTTCTGGG GACTGATTCTCG-3', 下游引物: 5'-CGCTCTTCT GTGCTGTTACG-3'; GAPDH 上游引物: 5'-CATGACCACAGTCCATGCCATC-3', 下游引物: 5'-CACCTGTTGCTGTAGCCATATTC-3'。PCR 反应总体系 25μl,加入 cDNA 模板 2μl,反应条件: 94℃ 5min, 94℃ 1min, 63℃ 1min, 72℃ 1min, 共 23 个循环。用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,检测特异性 PCR 扩增产物,在凝胶成像系统上拍照并记录。以目的基因的 PCR 扩增片段吸光度与同

一标本相应的 GAPDH 扩增片段光密度的比值作为其 mRNA 表达水平的相对参数。

1.6.3 SGLT-1 蛋白质免疫印迹实验

刮取 0.1g 小肠黏膜,加入 1ml 含有蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液 (凯基生物公司),超声匀浆,匀浆液 4℃ 低温离心,收集上清液,BCA 法测定蛋白浓度 (PIERCE 公司)。样品液中加入 5 × Loading buffer 混匀,100℃ 变性 5 min,用于实验上样。制备 10% 的分离胶及 5% 的浓缩胶,每孔上样 60μg 蛋白。常规电泳、转膜,将蛋白从 PAGE 胶转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜,加入 SGLT-1 一抗 (Millipore 公司, 1:1000) 37℃ 孵育 1h,二抗 (Santa Cruz 公司, 1:50 000) 37℃ 孵育 1h,洗膜后 ECL 化学发光试剂 (PIERCE 公司) 曝光显影。使用 Quantity One 分析软件,计算每一样本的 SGLT-1 表达的相对量,即 SGLT-1 蛋白条带的 A 值与 GAPDH 条带的 A 值之比。

1.7 统计学方法

所有数据均用 SPSS 13.0 统计软件分析。结果用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。差异检验用方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体重、腹腔脂肪湿重、Lee's 指数及空腹血糖水平

由表 1 可见,3 组大鼠初始体重无显著差异 (P > 0.05),从第 3 周开始肥胖组大鼠的体重增长速度较正常对照组及肥胖抵抗组大鼠明显加快。实验结束时肥胖组大鼠的体重较正常对照组及肥胖抵抗组分别增加了 65% 及 68%,腹腔脂肪湿重较正常对照组及肥胖抵抗组分别增加了 3.2 倍和 2.45 倍,且差异具有统计学意义 (P < 0.05)。肥胖组大鼠的 Lee's 指数显著高于正常对照组大鼠 (P < 0.01),空腹血糖水平与正常对照组及肥胖抵抗组比较显著增加 (P < 0.05)。

表 1 各组大鼠体重、腹腔脂肪湿重、Lee's 指数及空腹血糖水平

Table 1 The body weight, abdominal fat weight, Lee's index and plasma glucose level in each groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	初始体重 (g)	最终体重 (g)	腹腔脂肪湿重 (g)	Lee's 指数	血糖 (mmol/L)
正常对照组	15	79.45 ± 7.53	402.13 ± 117.21	20.07 ± 15.00	303.44 ± 22.87	7.13 ± 0.58
肥胖组	16	79.60 ± 9.12	664.41 ± 168.09 ⁽¹⁾	64.69 ± 27.72 ⁽¹⁾	336.47 ± 27.77 ⁽²⁾	8.64 ± 0.93 ⁽²⁾
肥胖抵抗组	10	78.34 ± 8.51	396.22 ± 52.46 ⁽⁴⁾	26.32 ± 11.87 ⁽³⁾	313.97 ± 13.94	6.91 ± 1.03 ⁽⁴⁾

注:与正常对照组比较 (1) P < 0.05, (2) P < 0.01; 与肥胖组比较 (3) P < 0.05, (4) P < 0.01

2.2 小肠黏膜麦芽糖酶及蔗糖酶活性

由表 2 可见,肥胖组大鼠小肠黏膜麦芽糖酶

活性较正常对照组 (P < 0.01) 和肥胖抵抗组 (P < 0.05) 显著增加。蔗糖酶活性 3 组大鼠间差异无

表 2 各组大鼠麦芽糖酶及蔗糖酶活性

Table 2 Maltase and sucrase activities in intestinal mucosa of each groups($\bar{x} \pm s$)

组别	n	蔗糖酶活性 (U/mg pro)	麦芽糖酶活性 (U/mg pro)
正常对照组	15	52.05 ± 16.93	54.03 ± 45.65
肥胖组	16	48.90 ± 13.95	156.01 ± 58.81 ⁽¹⁾
肥胖抵抗组	10	44.96 ± 12.99	78.35 ± 36.84 ⁽²⁾

注:与正常对照组比较(1) $P < 0.01$; 与肥胖组比较(2) $P < 0.01$

显著性($P > 0.05$)。

2.3 小肠黏膜中 SGLT-1 的表达

2.3.1 SGLT-1 在小肠黏膜中的分布与表达 大鼠小肠内 SGLT-1 主要表达于小肠绒毛上皮细胞刷状缘(图 1)。肥胖组大鼠小肠上皮细胞 SGLT-1 的表达较正常对照组及肥胖抵抗组显著增加(表 3)。

2.3.2 SGLT-1 mRNA 在小肠黏膜中的表达 RT-PCR 结果显示,肥胖组大鼠小肠黏膜中 SGLT-1 mRNA 的表达水平与正常对照组及肥胖抵抗组大鼠比较分别增加了 12.5% 及 23%,但差异均无显著性($P > 0.05$)(图 2 及表 3)。

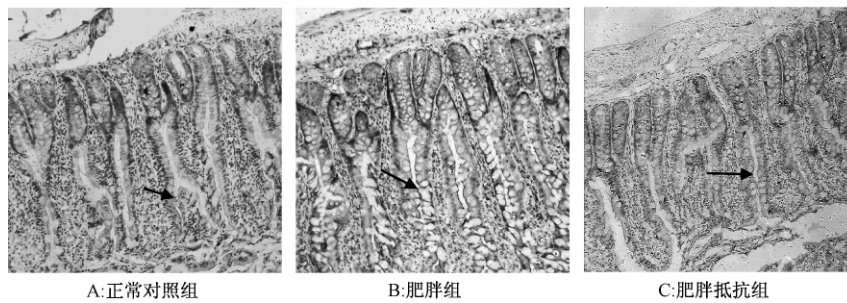
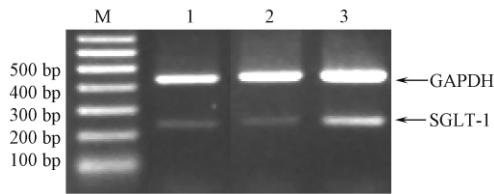


图 1 小肠黏膜 SGLT-1 的表达(×200)

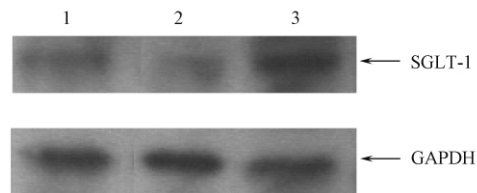
Figure 1 Expression of SGLT-1 in the rat small intestinal mucosa (×200)



M: 标记; 1: 正常对照组; 2: 肥胖抵抗组; 3: 肥胖组

图 2 小肠黏膜 SGLT-1 mRNA 表达

Figure 2 Expression of SGLT-1 mRNA in the rat small intestinal mucosa



1: 正常对照组; 2: 肥胖抵抗组; 3: 肥胖组

图 3 小肠黏膜 SGLT-1 蛋白表达

Figure 3 Expression of SGLT-1 protein in the rat small intestinal mucosa

2.3.3 SGLT-1 蛋白在小肠黏膜中的表达

Western blot 结果显示,肥胖组大鼠小肠黏膜中 SGLT-1 蛋白的表达水平较正常对照组及肥胖抵抗组大鼠显著增加($P < 0.01$)(表 3 及图 3)。

3 讨论

本研究观察到肥胖组大鼠小肠黏膜麦芽糖酶活性显著升高,分别是正常对照组大鼠的 2.9 倍,

肥胖抵抗组大鼠的 2 倍。而蔗糖酶活性与正常对照组及肥胖抵抗组比较没有明显差异。双糖酶的活性受饮食调节,蔗糖酶和麦芽糖酶随着其底物浓度的增加活性增强^[6]。肥胖组大鼠小肠黏膜麦芽糖酶活性较正常对照组及肥胖抵抗组大鼠显著升高,这说明肥胖组大鼠小肠对淀粉的消化能力显著增强。FERRARIS 等^[7]报道,饲料中添加

表 3 各组大鼠小肠黏膜 SGLT-1 mRNA 及蛋白表达量

Table 3 The mRNA and the protein levels of SGLT-1 in each groups($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IHC (IA)	Western blot(SGLT-1/GAPDH)	RT-PCR (SGLT-1/GAPDH)
正常对照组	15	12347.27 ± 592.08	0.96 ± 0.21	0.20 ± 0.13
肥胖组	16	17216.00 ± 1294.85 ⁽¹⁾	1.43 ± 0.59 ⁽²⁾	0.23 ± 0.15
肥胖抵抗组	10	12053.00 ± 4510.67 ⁽³⁾	0.86 ± 0.61 ⁽⁴⁾	0.19 ± 0.14

注:与正常对照组比较(1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.01$; 与肥胖组比较(3) $P < 0.05$, (4) $P < 0.01$

蔗糖时小鼠体内的蔗糖酶活性比对照组小鼠体内蔗糖酶活性高 68%。而本实验为了肥胖模型的成功建立,高脂饲料中添加了一定比例的蔗糖,但蔗糖酶活性在肥胖组、肥胖抵抗组及正常对照组大鼠之间没有差异。BLACK 等^[8]报道,高脂饮食刺激胰蛋白酶的分泌可使蔗糖酶降解,从而下调了蔗糖酶的活性。本实验肥胖组及肥胖抵抗组大鼠饲料中脂肪含量高于正常对照组,这可能是肥胖组及肥胖抵抗组大鼠蔗糖酶活性与正常对照组比较无显著差异的原因。

免疫组化及 Western blot 实验结果发现,肥胖大鼠小肠黏膜 SGLT-1 蛋白表达水平显著增加,而其 mRNA 的表达水平虽然较正常对照组及肥胖抵抗组有增高趋势,但差异未达到统计学意义,提示 SGLT-1 蛋白的改变可能涉及到转录后的调节^[9]。近期研究发现,蛋白激酶 C (PKC) 的激活显著减少了 SGLT-1 的转运率^[10]。LEE 等^[11]的研究表明,TNF- α 抑制了 PKC 的活性。研究发现肥胖大鼠体内 TNF- α 的含量显著升高^[12]。TNF- α 可引发炎症反应。HARDIN 等^[13]的研究表明,小肠的炎症反应和释放的炎症介质增加了小肠对葡萄糖的吸收。SAKURAI 等^[14]也报道,在狗体内 TNF- α 刺激了葡萄糖的吸收。因此,TNF- α 的升高可能会引起葡萄糖吸收的增加。OSSWALD 等^[15]报道,质膜相关蛋白 RS-1 基因敲除小鼠小肠内 SGLT-1 表达增高可导致肥胖发生。这些研究提示,TNF- α 的升高抑制了 PKC 的活性,PKC 的活性降低诱导 SGLT-1 的表达升高,导致葡萄糖的吸收增加。葡萄糖吸收的增加促使糖在体内转化为脂肪的数量也增加,脂肪在脂肪组织内储存,最终导致肥胖。

综上所述,高脂膳食诱导的大鼠肥胖与小肠黏膜中麦芽糖酶活性增强及糖吸收的关键分子 SGLT-1 的表达增加相关联。

参考文献

- 1 DROZDOWSKI L A , THOMSON A B. Intestinal sugar transport[J]. World J Gastroenterol , 2006 ,12 (11) : 1657-1670.
- 2 WRIGHT E M , LOO D D , HIRAYAMA B A. Biology of human sodium glucose transporters [J]. Physiol Rev , 2011 ,91 (2) : 733-794.
- 3 WRIGHT E M , HIRAYAMA B A , LOO D F. Active sugar transport in health and disease [J]. J Intern Med ,

- 2007 ,261 (1) : 32-43.
- 4 刘荣,孙长颢,王舒然,等. 饮食诱导肥胖抵抗和饮食诱导肥胖大鼠的对比研究 [J]. 中国公共卫生 , 2003 , 19 (5) : 563-564.
- 5 KANG L , ROUTH V H , KUZHIKANDATHIL E V , et al. Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons [J]. Diabetes , 2004 ,53 (3) : 549-559.
- 6 KARASOV W H , MARTINEZ DEL RIO C , CAVIEDES V E. Ecological physiology of diet and digestive systems [J]. Ann Rev Physiol , 2011 ,73 (73) : 69-93.
- 7 FERRARIS R P , VILLENAS S A , DIAMOND J. Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine [J]. Am J Physiol , 1992 ,262 (6 pt 1) : G1047-G1059.
- 8 BLACK B L , CROOM J , EISEN E J , et al. Differential effects of fat and sucrose on body composition in A/J and C57BL/6 mice [J]. Metabolism , 1998 ,47 (11) : 1354-1359.
- 9 WRIGHT E M , HIRSCH J R , LOO D D , et al. Regulation of Na⁺/glucose cotransporters [J]. J Exp Biol , 1997 ,200 (Pt 2) : 287-293.
- 10 CASTANEDA- SCEPPA C , SUBRAMANIAN S , CASTANEDA F. Protein kinase C mediated intracellular signaling pathways are involved in the regulation of sodium-dependent glucose co-transporter SGLT1 activity [J]. J Cell Biochem , 2010 ,109 (6) : 1109-1117.
- 11 LEE J Y , HANNUN Y A , OBEID L M. Functional dichotomy of protein kinase C (PKC) in tumor necrosis factor- α (TNF- α) signal transduction in L929 cells [J]. J Biol Chem , 2000 ,275 (38) : 29290-29298.
- 12 GUO W , LIU R , QIANG O , et al. Study of serum TNF- α , GTH and MDA levels in obesity-prone and obesity-resistant rats induced by high fat diet [J]. Modern Prev Med , 2009 ,36 : 2434-2437.
- 13 HARDIN J , KROEKER K , CHUNG B , et al. Effect of proinflammatory interleukins on jejunal nutrient transport [J]. Gut , 2000 ,47 (2) : 184-191.
- 14 SAKURAI Y , ZHANG X J , WOLFE R R. TNF directly stimulates glucose uptake and leucine oxidation and inhibits FFA flux in conscious dogs [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab , 1996 ,270 (5) : E864-E872.
- 15 OSSWALD C , BAUMGARTEN K , STUMPEL F , et al. Mice without the regulator gene Rse1A1 exhibit increased Na⁺-D-glucose cotransport in small intestine and develop obesity [J]. Mol Cell Biol , 2005 ,25 (1) : 78-87.

收稿日期: 2012-04-24