

内源性 n-3 多不饱和脂肪酸对 fat-1 转基因小鼠血糖血脂的影响

周 飞^{1,2}, 张晓宏², 邹祖全², 张才乔^{1*}

(1. 浙江大学 动物科学学院, 浙江 杭州 310012; 2. 宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 利用 fat-1 转基因小鼠模型, 研究内源性 n-3 多不饱和脂肪酸(n-3 PUFAs)的血糖血脂调节作用。采用 fat-1 转基因小鼠和 C57BL/6 野生型小鼠喂食高 n-6、低 n-3 PUFAs 的标准配方饲料 4 周, 然后 2 组小鼠给予高糖饮液自由饮用 4 周, 每周测体重。第 8 周末, 取血离心测血糖、胰岛素、甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)水平。结果表明: fat-1 转基因小鼠体重增加幅度、空腹血糖值、血清胰岛素、胰岛素抵抗指数、血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平明显低于野生型小鼠($P < 0.05$)。认为 n-3 PUFAs 能抑制体重增长, 降低小鼠血糖、血脂和胰岛素抵抗, 起到调节血糖、血脂的作用。

关键词: fat-1 转基因小鼠; n-3 PUFAs; 血糖; 血脂

中图分类号: R151.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2015) 03-0098-05

n-3 多不饱和脂肪酸(n-3 PUFAs)主要包括 α -亚麻酸(α -linolenic acid, ALA)、二十碳四烯酸(ETA)、二十二碳五烯酸(DPA)、二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)。国内外大量研究表明, 大幅提高膳食中的 n-3 PUFAs 的摄取比例对人类健康具有重要意义。动物实验^[1]以及体外实验研究表明, n-3 PUFAs 具有明显的抗肿瘤作用^[2]。从保护心血管的角度, n-3 PUFAs 能降低心率^[3]及心率变异性, 减少心律失常及心房颤动^[4]发生, 预防心源性猝死。另外, 研究发现不仅 EPA 和 DHA 的摄入可显著降低高脂血症患者血清脂类、脂蛋白和载脂蛋白的水平, 进而降低健康成人的体脂含量, 促进脂肪利用^[5-8], 还发现其在风湿性疾病、代谢性疾病、帕金森等疾病的预防和治疗方面有显著功效, 并且对于新生儿及幼儿的大脑、中枢神经和免疫系统的发育起重要作用^[9-12]。

人体内的 n-6/n-3 PUFAs 最理想比例为 1:1, 但是西方膳食中 n-6/n-3 PUFAs 的比例为(10~30):1。过高的 n-6/n-3 PUFAs 比例可能会导致产生过多的 n-6 PUFAs 衍生的类花生酸, 这可能诱发心脑血管

疾病、糖尿病以及癌症等疾病的发生。因此研究不同比例的 n-6/n-3 PUFAs 与上述疾病的关系, 迫切需要一个好的动物模型。哈佛大学康景轩教授建立的 fat-1 转基因小鼠模型是解决这一难题的最佳动物模型^[13]。fat-1 基因来源于秀丽隐杆线虫, 它能把 n-6 PUFAs 转化为 n-3 PUFAs。和野生型小鼠相比, 同样喂食高 n-6/n-3 PUFAs 比例饲料的 fat-1 转基因小鼠组织中有较低的 n-6/n-3 PUFAs 比例。

笔者以 fat-1 转基因小鼠为模型, 以 C57BL/6 小鼠为对照, 探讨内源性 n-3 PUFAs 对血糖血脂调节作用, 为进一步研究 n-3 PUFAs 在预防糖代谢紊乱与心血管疾病的作用与机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 实验动物

fat-1 转基因小鼠与野生型 C57BL/6 小鼠, 雄性, 各 5 只。野生型 C57BL/6 小鼠购自上海斯莱克公司, 动物合格证号: SCXK(沪)2012-0002。将来源于美国哈佛大学的 fat-1 转基因小鼠雄性种鼠与

野生型的 C57BL/6 雌性小鼠交配, 在子代中通过基因鉴定出 5 只雄性 fat-1 转基因小鼠作为本实验的模型组

1.1.2 实验动物标准饲料

根据美国营养学会推荐配方 AIN93G 标准改进添加 10%的玉米油, 饲料的成分配方: 酪蛋白 218.48‰、胱氨酸 3‰、玉米淀粉 481‰、蔗糖 100‰、玉米油 100‰、粗纤维 50‰、矿物质 35‰、维生素 10‰、胆碱 2.5‰、食品抗氧化剂 0.02‰; 能量占比为: 蛋白质 20%、碳水化合物 58%、脂肪 22%。饲料制备后 4℃低温保存。高糖饮液为可口可乐。

1.1.3 实验试剂与仪器

奥林巴斯 2700 生化分析仪测定血糖、血脂水平, 试剂盒购自宁波美康生物公司; 美国强生公司 One Touch Ultra 血糖仪、血糖试纸, 血糖试纸批号 3880673; KA-1000 低速台式离心机; 德国 Reference 移液器, 型号 A4001387; 5334 PCR 仪; 通用型电泳仪-JY1600C; PBNB 裂解液、TAE、琼脂糖、TAQ 酶、罗氏 E601 原装试剂。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与实验设计

5 只 fat-1 转基因小鼠为模型组, 另外 5 只 C57BL/6 小鼠为野生型组。分组后先自由摄食标准饲料与自由饮水 4 周, 实验动物饲养于 SPF 环境中, 温度(23±3)℃, 湿度 40%~70%。第 4 周末禁食 12 h 后进行葡萄糖耐量实验, 然后给予可口可乐自由饮用, 按照每周连续 5 d 饮用可乐、2 d 饮水为一个循环, 饮用 4 周, 每周称量体重, 测血糖值。第 8 周末去眼球采血 0.5~2.0 mL, 室温下静置 2 h, 3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清液 50~150 μL, -70℃低温保存。

1.2.2 葡萄糖耐量实验

第 4 周末进行葡萄糖耐量试验, 实验前禁食 12 h, 按照 1.5 g·kg⁻¹ 剂量对小鼠腹腔注射葡萄糖, 采

用剪尾法取血后, 通过血糖试纸和血糖仪检测 0、30、60、90、120 min 的血糖水平, 绘制葡萄糖耐量实验血糖曲线。

1.2.3 血糖水平

血清葡萄糖水平采用全自动生化分析仪测定。

1.2.4 血脂水平

TG、TC、HDL-C、LDL-C 水平采用全自动生化分析仪测定, 并计算 HDL-C 与 LDL-C 比值。

1.2.5 血清胰岛素水平

采用 ELISA 法测定血清胰岛素, 胰岛素抵抗指数(AI)为空腹胰岛素浓度(mμ·L⁻¹)×空腹血糖浓度(mmol·L⁻¹)/22.5。

1.2.6 统计学分析

经 Excel 录入数据, 采用 SPSS 20.0 软件处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 对数据进行单因素方差分析进行比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。绘图采用 Graphpad prism 5.0 软件。

2 结果

2.1 各组小鼠试验期间体重的变化

实验期间 2 组小鼠体重变化见表 1, 从表 1 可知, 第 2 周末开始, 2 组小鼠的体重变化有显著性差异($P < 0.05$), 从第 2 周末以后 fat-1 转基因小鼠组每周体重增加的幅度和速度明显低于野生型小鼠组。表明 n-3 PUFAs 对小鼠体重增长具有抑制作用。

2.2 第 4 周末 2 组小鼠葡萄糖耐量

糖耐量实验是用于检测胰岛功能的常用手段。第 4 周末 2 组小鼠葡萄糖耐量测定结果如图 1 所示。从图 1 可看出, 实验前 fat-1 转基因小鼠的血糖值低于野生型组小鼠, 0~0.5 h 内转 fat-1 基因小鼠血糖值上升很快, 且在 0.5 h 时达到峰值, 这时 fat-1 转基因小鼠的血糖值远高于野生型组小鼠。同时, 图 1 显示, 在 0.5~2.0 h 内, 和野生型小鼠相比, fat-1 小鼠的血糖值下降相对较快, 这表明 fat-1 转基因

表 1 实验期间 2 组小鼠体质量变化(n=5, $\bar{x} \pm s$) g

组别	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周
模型组	14.50±0.57	16.28±1.54	17.48±1.23*	18.64±0.71**	19.78±0.95*	20.14±1.52*	20.78±1.69*	21.10±1.59**	21.64±1.48**
野生型组	16.18±1.25	17.70±0.70	18.98±0.33	20.1±0.68	21.16±0.50	22.18±0.79	22.86±1.44	23.66±0.34	24.30±0.67
t 值	2.234	2.142	2.640	3.404	2.877	2.667	2.668	3.524	3.662
P 值	0.056	0.650	0.030	0.009	0.021	0.028	0.028	0.008	0.006

注: 与野生型组小鼠比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。下表同。

小鼠对葡萄糖的耐受低于野生型小鼠。

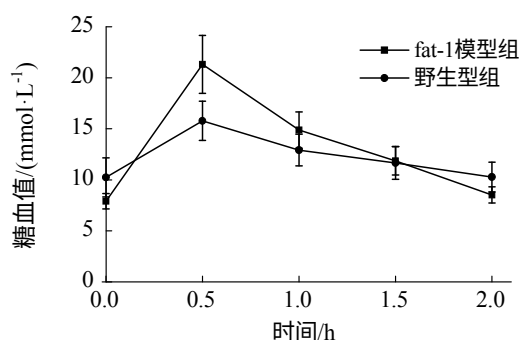


图1 第4周末2组小鼠葡萄糖耐受量

2.3 2组小鼠血糖、胰岛素变化

2组小鼠血糖、胰岛素变化结果见表2。从表2可看出,与野生型组小鼠相比, fat-1 转基因小鼠的血糖值相对较低($P<0.05$),血清胰岛素测定也表明, fat-1 转基因小鼠的血清胰岛素低于野生型组小鼠含量($P<0.05$)。另外, fat-1 转基因小鼠组的胰岛素抵抗指数显著降低($P<0.01$),说明 n-3 PUFAs 能够提高胰岛素的敏感性,改善胰岛素抵抗,从而达到降低血糖的目的。

表2 第8周末2组小鼠血清血糖和胰岛素水平

组别	血糖/ (mmol·L ⁻¹)	血清胰岛素/ (ng·mL ⁻¹)	胰岛素抵抗指数
模型组	6.37±0.79*	1.41±0.22*	5.92±1.61**
野生型组	9.86±2.27	3.46±0.34	14.43±4.52
t 值	3.254	6.359	10.217
P 值	0.012	0.026	0.004

2.4 2组小鼠血脂变化

第8周末2组小鼠的血脂变化见表3。从表3可以看出,与野生型组小鼠相比, fat-1 转基因小鼠 TC、TG、HDL-C、LDL-C 值均明显偏低($P<0.05$),表明 n-3 PUFAs 具有调节血脂的功能。

3 分析讨论

高血糖、高血脂是心脑血管疾病发生发展的危

险因素,合理的饮食习惯是预防心血管疾病的有效手段之一。因此,寻找有效降低血糖和血脂的食品以预防代谢综合征已成为共识。在人类饮食中, n-6 PUFAs 含量比较高,而 n-3 PUFAs 的含量非常低,造成了 n-6/n-3 PUFAs 比例的严重失调,研究发现 n-6/n-3 PUFAs 比例失调成为心血管疾病高发的主要诱因。因此,如何增加膳食中 n-3 PUFAs 含量成为人们研究的热点。

哈佛大学康景轩博士建立的 fat-1 转基因小鼠为我们研究内源性 n-3 PUFAs 在调节血糖、血脂方面提供了良好的动物模型。fat-1 转基因小鼠可以将体内 n-6 PUFAs 转化为相应的 n-3 PUFAs,与野生型小鼠相比, fat-1 转基因小鼠体内的肌肉、乳汁、心脏、脑、肝脏、肾脏等组织和器官中 n-3 PUFAs 含量增加^[13],而 n-6 PUFAs 含量相应减少。研究发现,多不饱和脂肪酸(PUFAs)不仅能够阻止糖尿病的发生,改善慢性、进展性肾损伤,还可以在某种程度上对抗肥胖^[14-15]。本实验首先研究 n-3 PUFAs 对体重的影响,结果发现在相同的时间内野生型组小鼠体重增加的幅度显著高于 fat-1 转基因小鼠组,说明 n-3 PUFAs 有抑制体重快速增加的作用,实验结果与 Buckley 等^[16]和 Wang 等^[17]发现的 n-3 PUFAs 能改善啮齿类动物的体脂分布,限制脂肪堆积的作用^[18]相吻合。也与 Hill 等^[19]和 Newman 等^[20]在对不同的动物模型进行研究时发现的富含 n-3 PUFAs 的膳食可以显著降低动物的体重和体脂含量的研究结果相一致。

胰岛素控制着蛋白质、糖类、脂肪三大营养物质的代谢和贮存,能加速葡萄糖的利用和抑制葡萄糖的生成,提高细胞膜对葡萄糖的通透性。胰岛素抵抗(IR)是2型糖尿病的根本病症,研究表明 n-3 PUFAs 能通过抑制脂肪组织的炎症效应来阻止糖尿病的发展^[21]。本实验发现,和野生型小鼠相比, fat-1 转基因小鼠组血糖值、胰岛素含量、胰岛素抵抗指数都明显低于野生型小鼠组($P<0.05$),表明

表3 第8周末2组小鼠的血脂变化

组别	TC	TG	HDL-C	LDL-C	HDL-C/LDL-C
模型组	2.43±0.31	1.29±0.17	1.43±0.23	0.4±0.136	3.94±1.39
野生型组	3.07±0.39	1.69±0.09	1.87±0.28	0.69±0.10	2.78±0.71
t 值	2.928	4.584	2.733	3.879	1.684
P 值	0.019	0.002	0.026	0.005	0.131

n-3 PUFAs 有降血糖, 缓解胰岛素抵抗的作用. 这与 Nettleton 等^[22]通过临床和动物实验证明的 n-3 PUFAs 的摄入能降低血清甘油三酯水平、改善血管内皮功能、降低血压、改善胰岛素抵抗相吻合. n-3 PUFAs 在降血糖和改善胰岛素抵抗的作用方面是否因为其激活了过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPARs), 从而增加了脂肪酸的氧化, 节约了葡萄糖还需要进一步研究.

动脉粥样硬化是指在中等及大动脉血管内膜和中层形成的脂肪块, 主要有胆固醇和胆固醇酯组成. 流行病学、动物实验与临床研究都证明, 高脂血症是动脉粥样硬化形成的重要危险因素之一, 动脉粥样硬化疾病的发生发展, 与血清中的 TC、TG 水平有关. LDL-C 是动脉粥样硬化发生发展的主要脂类危险因子, 高密度脂蛋白(HDL-C)被认为是一种抗动脉粥样硬化的脂蛋白, 在限制动脉胆固醇的沉积和清除胆固醇上起着重要作用. 流行病学调查证明, 血液中 HDL-C 水平与动脉粥样硬化发病率成负相关, 与 LDL-C 水平成正相关^[23-24]. 本研究发现, 和野生型小鼠相比, fat-1 转基因小鼠组的血清 TC 值、TG 值、HDL-C 值、LDL-C 值明显偏低($P < 0.05$), 表明 n-3 PUFAs 在调节血脂方面起重要作用. 这与 Thies 等^[25]研究结果相吻合.

综上所述, n-3 PUFAs 能够抑制小鼠体重的过快增长, 间接起到了减肥作用, 进而达到控制体质量的目的. n-3 PUFAs 同时能够显著降低小鼠的血糖和血脂, 缓解胰岛素的抵抗, 从而缓解动脉硬化等心血管疾病, 具有免疫调节作用. 至于 n-3 PUFAs 调节血糖、血脂的作用机制与机理, 我们将在后续的研究中进一步探讨.

参考文献:

- [1] Manni A, Xu H, Washington S, et al. The impact of fish oil on the chemopreventive efficacy of tamoxifen against development of N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary carcinogenesis[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2010, 3(3):322-330.
- [2] Terry P D, Rohan T E, Wolk A. Intakes of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other hormone-related cancer[J]. *Am J Clin Nutr*, 2003, 77(3):532.
- [3] La Rovere M T, Staszewsky L, Barlera S, et al. n-3 PUFA and Holter-derived autonomic variables in patients with heart failure: Data from the gruppo italiano per lo studio della sopravvivenza nell' insufficienza cardiaca (GISSI-HF) Holter substudy[J]. *Heart Rhythm*, 2013, 10(2):226-232.
- [4] Wu J H, Lemaitre R N, King I B, et al. Association of plasma phospholipid long-chain w-3 fatty acids with incident atrial fibrillation in older adults: the cardiovascular health study[J]. *Circulation*, 2012, 125(9): 1084-1093.
- [5] Phillipson B E, Rothrock D W, Connor W E, et al. Reduction of plasma lipids, lipoproteins, and apoproteins by dietary fish oils in patients with hypertriglyceridemia [J]. *N Engl J Med*, 1985, 312(19):1210-1216.
- [6] Popp-Snijders C, Schouten J A, Heine R J, et al. Dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids improves insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetes[J]. *Diabetes Res*, 1987, 4(3):141-147.
- [7] Malasanos T H, Stacpoole P W. Biological effects of omega-3 fatty acids in diabetes mellitus[J]. *Diabetes Care*, 1991, 14(12):1160-1179.
- [8] Couet C, Delarue J, Ritz P, et al. Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults [J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1997, 21(8):637-643.
- [9] Bucher H C, Hengstler P, Schindler C, et al. n-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: A meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Am J Med*, 2002, 112(4):298-304.
- [10] Deckere E A. Possible beneficial effect of fish and fish n-3 polyunsaturated fatty acids in breast and colorectal cancer[J]. *Eur J Cancer Prev*, 1999, 8(3):213-221.
- [11] Sinn N, Bryan J. Effect of supplementation with polyunsaturated fatty acids and micronutrients on learning and behavior problems associated with child ADHD[J]. *J Dev Behav Pediatr*, 2007, 28(2):82-91.
- [12] Bousquet M, Saint-Pierre M, Julien C, et al. Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid on toxin-induced neuronal degeneration in an animal model of Parkinson's disease[J]. *FASEB J*, 2008, 22(4):1213-1225.
- [13] Kang J X, Wang J, Wu L, et al. Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids[J]. *Nature*, 2004, 427: 504.
- [14] Duplus E, Glorian M, Tordjman J, et al. Evidence for selective induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by unsaturated and nonmetabolized fatty acids in adipocytes[J]. *J Cell Biochem*, 2002, 85(3): 651-661.

- [15] 蒋立勤, 余陈欢, 余勤, 等. 两种海洋副产品的脂肪酸组成及其对高脂小鼠的影响[J]. 食品与机械, 2009(2): 58-61.
- [16] Buckley J D, Howe P R. Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids[J]. *Obese Rev*, 2009, 10(6):648-659.
- [17] Wang H, Storlien L H, Huang X F. Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor NPY, and AgRP mRNA expression[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 282(6):1352-1359.
- [18] Baillie R A, Takada R, Nakamura M, et al. Coordinate induction of peroxisomal-acyl-CoA oxidase and UCP-3 by dietary fish oil: A mechanism for decreased body fat deposition[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1999, 60(5/6):351-356.
- [19] Hill J O, Peters J C, Lin D, et al. Lip accumulation and body fat distribution is influenced by type of dietary fat fed to rats[J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1993, 17(4): 223-236.
- [20] Newman R E, Bryden W L, Fleck E, et al. Dietary n-3 and n-6 fatty acids alter avian metabolism: Metabolism and abdominal fat deposition[J]. *Br J Nutr*, 2002, 88(1): 11-18.
- [21] Todoric J, Loffler M, Huber J, et al. Adipose tissue inflammation induced by high fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids[J]. *Diabetologia*, 2006, 49(9):2109-2119.
- [22] Nettleton J A, Katz R. n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review[J]. *Am Diet Assoc*, 2005, 105(3):428-440.
- [23] 赵冬. 中国人群的血脂流行病学研究[J]. 中华心血管病杂志, 2003, 31:74-78.
- [24] 陆宗良. 血脂异常与心血管病危险因素控制[J]. 中国心血管杂志, 2001, 29:315-317.
- [25] Theis F, Garry J M, Yaqoob P, et al. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: A randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2003, 361:477-485.

Effects of Endogenous n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs) on Blood Glucose and Serum Lipid in fat-1 Transgenic Mouse Model

ZHOU Fei^{1,2}, ZHANG Xiao-hong², ZOU Zu-quan², ZHANG Cai-qiao^{1*}

(1.College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China;

2.Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In this study, we investigate the effects of endogenous n-3 PUFAs on blood glucose and serum lipid in fat-1 transgenic mouse model. The transgenic and wild type mice are maintained on a 10% corn oil diet which has high ratio of n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids for 4 weeks. Then make them drink high sugar pinocytosis freely for another four weeks. On the eighth weekend, serum glucose, insulin, serum triglyceride (TG), serum total cholesterol (TC), serum high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), serum low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels of blood serum are tested after blood collection and centrifugation. The weight gain rate, fasting blood sugar and serum insulin levels, insulin resistance index, serum TC, TG, HDL-C, LDL-C of fat-1 transgenic mice are found to be significantly lower than those of wild type mice ($P<0.05$). The tests indicate that n-3 polyunsaturated fatty acids can reduce the blood glucose and serum lipid, which may play a vital role in regulating blood lipid and decreasing insulin resistance.

key words: fat-1 transgenic mouse; n-3 polyunsaturated fatty acids; blood glucose; serum lipid

(责任编辑 史小丽)