· 实验研究 ·

亮氨酸对高脂高胆固醇喂养小鼠瘦素抵抗影响*

焦俊[1], 韩淑芬[1], 张薇[1], 徐加英[2], 秦立强[1]

摘 要: 目的 探讨亮氨酸对高脂高胆固醇喂养小鼠体脂和瘦素抵抗的影响。**方法** 60 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、高脂高胆固醇组、低、高剂量亮氨酸组(1.5%、3.0% 亮氨酸), 干预 24 周; 测定小鼠体重、脂肪重量、血清胆固醇和瘦素水平, Western blot 法检测小鼠睾周脂肪组织中瘦素受体(Ob - R)、Janus 蛋白酪氨酸激酶 2(JAK2)、信号转导和转录激活子 3 (STAT3) 及细胞因子信号转导抑制因子 3(SOCS3) 的蛋白表达。**结果** 高脂高胆固醇喂养明显升高小鼠体重、脂重和血清胆固醇水平; 与高脂高胆固醇组比较, 亮氨酸组小鼠体重、脂重和血清胆固醇水平明显下降; 与对照组比较, 高脂高胆固醇组小鼠血清瘦素水平明显升高[(7.14 ± 2.44) ng/mL,] ($P < 0.01$); 与高脂高胆固醇组比较, 1.5%、3.0% 亮氨酸组小鼠瘦素水平[分别为(4.21 ± 2.37)、(4.24 ± 2.22) ng/mL] 明显降低($P < 0.01$); 与对照组比较, 高脂高胆固醇组小鼠睾周脂肪组织中 Ob - R 蛋白表达下调; 与高脂高胆固醇组比较, 亮氨酸组小鼠睾周脂肪组织中 Ob - R、JAK2 蛋白表达上调、SOCS3 蛋白表达下调。**结论** 亮氨酸干预可抑制高脂高胆固醇喂养引起的小鼠体重和体脂增加, 其机制可能与调节瘦素受体及其下游蛋白 JAK2 和 SOCS3 表达、改善瘦素抵抗有关。

关键词: 亮氨酸; 瘦素抵抗; 瘦素受体; 高脂高胆固醇

中图分类号: R 151.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-0580(2017)05-0740-03 DOI: 10.11847/zgggws2017-33-05-14

Effect of leucine on leptin resistance in mice fed with high fat/cholesterol diet

JIAO Jun*, HAN Shu-fen, ZHANG Wei, et al (* *Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Soochow University, Suzhou, Jiangsu Province* 215123, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of leucine on fat mass and leptin resistance in mice fed with a high-fat/cholesterol (HFC) diet. **Methods** Sixty male C57BL/6J mice were randomly divided into four groups: control group, high fat/cholesterol diet group, low and high leucine (1.5% and 3.0%) groups and treated for 24 weeks. Body weight, fat mass, serum levels of cholesterol and leptin were measured. Protein expression of leptin receptor (Ob-R), Janus protein tyrosine kinase 2 (JAK2), signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3), and suppressors of cytokine signaling 3 (SOCS3) in epididymal adipose tissue were analyzed with Western blot. **Results** The body weight, fat weight, and serum cholesterol level in the mice of high fat/cholesterol diet group increased, while those in the mice of leucine group decreased significantly. Serum leptin level was significant higher in the mice of high fat/cholesterol diet group than in those of the control group (7.14 ± 2.44 vs. 0.73 ± 0.42 ng/ml, $P < 0.01$). For the mice of leucine groups, the serum leptin level was deceased (4.21 ± 2.37 and 4.24 ± 2.22 ng/ml) and Ob-R, JAK2 expressions were upregulated, whereas the STAT3 expression was downregulated compared with the mice of high fat/cholestrol diet group. **Conclusion** Leucine supplementation can suppress weight gain and fat mass in the mice fed with high fat/cholesterol diet probably by regulating the expressions of JAK2 and SOCS3 and improving leptin resistance.

Key words: leucine; leptin resistance; leptin receptor; high fat/cholesterol

脂肪组织是体内最大的胆固醇池, 胆固醇储存量可达总脂质的 0.5%[1]。在肥胖状态下, 过多的胆固醇在脂肪细胞累积导致细胞膨胀, 胞膜流动性增高, 引起脂肪细胞功能障碍[2]。另一方面, 脂肪又是重要的内分泌器官, 分泌包括瘦素在内的脂肪因子, 与下丘脑瘦素受体(leptin receptor, Ob-R)结合, 经 Janus 激酶 2(Janus protein tyrosine kinase 2, JAK2)/细胞因子信号转导抑制因子 - 3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3) 等通路进行信号转导, 调节饮食、能量平衡及糖脂代谢[3]。除中枢神经系统之外, Ob-R 在脂肪等外周组织亦有分布[4]。但是, 血清瘦素水平往往与体内脂肪量成正比, 肥胖者过高的血清瘦素水平导致瘦素抵抗[5]。亮氨酸不仅是必需氨基酸, 同时作为信号分子影响细胞代谢过程, 亮氨酸主要通过能量敏感的 mechanistic target of rapamycin(mTOR)信号通路调节摄食和体重[6], 近年来, 亮氨酸及其瘦素信号通路的调节作用也引起关注[4]。本研究在高脂高

* **基金项目:** 国家自然科学基金(81472974; 81302425; 81273067); 江苏省高校"青蓝工程"中青年学术带头人培养对象
作者单位: 1. 苏州大学公共卫生学院营养与食品卫生教研室, 江苏 苏州 215123; 2. 苏州大学放射医学与防护学院
作者简介: 焦俊(1990 -), 女, 山东济宁人, 硕士在读, 研究方向: 营养与疾病。
通讯作者: 秦立强, E-mail: qinliqiang@suda.edu.cn
数字出版日期: 2016 - 6 - 21 14:02
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160621.1402.016.html

胆固醇饲料喂养小鼠的同时进行亮氨酸干预,探讨亮氨酸对脂肪以及瘦素抵抗的作用。结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器　亮氨酸(山东鲁洲氨基酸有限责任公司),纯度 95%;高脂饲料(美国 Research diets 公司,D12451),该饲料脂肪、碳水化合物和蛋白质能量比为 46.0%:34.4%:19.6%;胆固醇和瘦素试剂盒(南京建成生物工程研究所);Ob-R 抗体(美国 ImmunoWay 公司)、JAK2 抗体(美国 ImmunoWay 公司)、STAT3 抗体和细胞因子信号转导抑制因子 -3(suppressors of cytokine signaling 3, SOCS3)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司)、β-actin 抗体(杭州华安生物技术有限公司);Western blot 及 immunol precipitation(IP)细胞裂解液和 bicinchoninic acid(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究所);聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)和电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)检测试剂盒(美国 Millipore 公司)。BioTek/ Synergy 2 多功能酶标仪;低温冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);Western 电转仪(美国 Bio-Rad 公司);G:Box XL1.4 化学发光成像仪(英国 Syngene 公司)。

1.2　实验动物分组与处理　60 只 7 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠购自中国科学院上海动物实验中心,许可证号:SCXK(沪)2012 -0002,饲养于苏州大学动物实验中心;适应 1 周后,随机分为 4 组,分别为对照组(普通饲料)、高脂高胆固醇组(1% 胆固醇 + 高脂饲料)、低、高剂量亮氨酸组(高脂高胆固醇饲料 + 1.5%、3.0% 亮氨酸)。胆固醇、亮氨酸按质量比与高脂饲料混匀,制成相应的固体饲料使用;连续 24 周,小鼠自由摄食饮水,每周称体重和摄食量,根据摄食量和饲料配方计算能量摄入量。

1.3　血清胆固醇和瘦素测定　实验结束时,小鼠禁食 12 ~ 14 h,次日上午取血分离血清(3 000 r/min, 10 min),按照试剂盒说明测定血清胆固醇和瘦素水平。

1.4　脂肪组织中相关蛋白表达水平测定　取小鼠部分睾周脂肪组织保存于 -80 ℃冰箱,按照试剂盒说明提取总蛋白,并用二喹啉甲酸蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度定量,等量取各组样本总蛋白 30 ~ 50 μg,上样,电泳,转膜,封闭 1 ~ 1.5 h,分别加 Ob-R、JAK2、STAT3、SOCS3 和 β - actin 抗体于一抗稀释液中(稀释比例分别为 1∶1 000, 1∶1 000, 1∶2 000, ,1∶1 000, 1∶1 000),4 ℃摇床孵育过夜,磷酸盐吐温缓冲液(phosphate tween buffer saline, PBST)冲洗 3 次(每次 15 min),加辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗兔或抗鼠 IgG 抗体室温下孵育 1 ~ 2 h, ECL 发光剂于凝胶成像系统进行曝光显影。条带结果用 Quantity One 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目的蛋白相对含量。

1.5　统计分析　结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著差法检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　亮氨酸对小鼠体重、体脂和能量摄取影响(表 1)　与对照组比较,高脂高胆固醇组小鼠体重、脂肪重量明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与高脂高胆固醇组比较,低、高剂量亮氨酸组小鼠体重、脂肪重量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);各组小鼠能量摄入量无明显差异。

表 1　亮氨酸对小鼠能量摄取、体重和体脂影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别(%)	体重(g)	脂肪重量(g)	能量(kcal/day)
对照组	29.81 ± 1.82	0.57 ± 0.22	12.26 ± 0.89
高脂高胆固醇组	37.69 ± 2.73[a]	2.29 ± 0.62[a]	12.25 ± 1.08
亮氨酸组 1.5	32.55 ± 1.91[a,c]	1.70 ± 0.84[a,b]	11.98 ± 1.41
3.0	34.88 ± 4.57[a,b]	1.71 ± 0.85[a,b]	12.31 ± 1.44

注:与对照组比较,a $P < 0.01$;与高脂高胆固醇组比较,b $P < 0.05$, c $P < 0.01$。

2.2　亮氨酸对小鼠血清胆固醇和瘦素水平影响(表 2)　与对照组比较,高脂高胆固醇组小鼠血清胆固醇和瘦素明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与高脂高胆固醇组比较,低、高剂量亮氨酸组小鼠血清胆固醇和瘦素水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

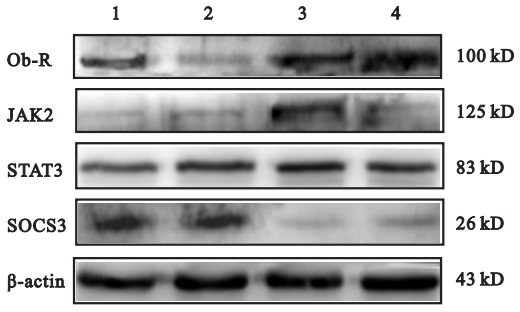
表 2　亮氨酸对小鼠血清胆固醇和瘦素水平影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别(%)	胆固醇(mmol/L)	瘦素(ng/mL)
对照组	1.81 ± 0.20	0.73 ± 0.42
高脂高胆固醇组	2.69 ± 0.45[a]	7.14 ± 2.44[b]
亮氨酸组 1.5	2.15 ± 0.54[c]	4.21 ± 2.37[d]
3.0	2.12 ± 0.60[c]	4.24 ± 2.22[d]

注:与对照组比较,a $P < 0.05$, b $P < 0.01$;与高脂高胆固醇组比较,c $P < 0.05$, d $P < 0.01$。

2.3　亮氨酸对小鼠睾周脂肪组织相关蛋白表达影响(图 1、表 3)　与对照组比较,高脂高胆固醇组小鼠睾周脂肪组织中 Ob-R 蛋白表达明显下调($P < 0.05$),JAK2、STAT3 和 SOCS3 蛋白表达水平无明显变化;与高脂高胆固醇组比较,低、高剂量亮氨酸组小鼠睾周脂肪组织中 Ob-R、JAK2 蛋白表达水平上调($P < 0.05$),SOCS3 蛋白表达水平下调($P < 0.01$)。

中国公共卫生 CPH



注:1:对照组;2:高脂高胆固醇组;3,4:亮氨酸 1.5%、3.0%组。

图 1　亮氨酸对小鼠睾周脂肪组织相关蛋白表达影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 3　亮氨酸对小鼠睾周脂肪组织相关蛋白的表达影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别(%)	Ob-R	JAK2	STAT3	SOCS3
对照组	0.54 ± 0.13	0.24 ± 0.08	0.88 ± 0.12	0.76 ± 0.23
高脂高胆固醇组	0.23 ± 0.08[a]	0.34 ± 0.14	0.96 ± 0.15	0.82 ± 0.25
亮氨酸组 1.5	0.57 ± 0.18[b]	0.78 ± 0.25[c]	1.20 ± 0.25	0.28 ± 0.06[c]
3.0	0.48 ± 0.10[b]	0.51 ± 0.13[b]	1.16 ± 0.60	0.29 ± 0.07[c]

注:与对照组比较,a $P < 0.05$,;与高脂高胆固醇组比较,b $P < 0.05$,c $P < 0.01$。

3　讨　论

随着生活水平提高,居民饮食高脂高胆固醇趋势明显[7]。本研究结果显示,高脂高胆固醇喂养小鼠体重、体脂含量、血胆固醇水平明显升高,小鼠血清血瘦素水平升高,但脂肪组织中瘦素受体表达水平明显下降。提示,高脂高胆固醇喂养导致小鼠肥胖、且肥胖小鼠发生了瘦素抵抗。近年来研究已证实亮氨酸可调节哺乳动物的脂肪代谢,表现为降低脂肪合成和促进脂肪分解[4,6]。本研究结果显示,亮氨酸干预组小鼠在未改变能量摄取水平同时,明显抑制了高脂高胆固醇喂养小鼠的体重增重、体脂量和血胆固醇水平。提示,亮氨酸可增加能量消耗和改善脂代谢[6,8]。

研究发现含 1.5% 亮氨酸的饮水喂养小鼠 14 周后,血浆瘦素水平仅为对照组的一半[6],亮氨酸干预高脂喂养大鼠 16 周不仅降低血浆瘦素水平,而且上调下丘脑瘦素受体的表达[4]。Binder 等[9]用亮氨酸干预肥胖小鼠 15 周后腹腔注射瘦素,发现亮氨酸组小鼠摄食量明显低于对照组,表明亮氨酸干预抑制了肥胖小鼠的进食能力。本研究结果表明,与高脂高胆固醇组比较,亮氨酸组小鼠血清瘦素水平降低、脂肪组织瘦素受体的表达水平上调,从而改善了肥胖所引起的瘦素抵抗。JAK2/STAT3 通路是瘦素受体信号转导的主要途径,SOCS3 通过与 JAK2 结合,反馈抑制瘦素诱导的 JAK2 和 Ob-R 的酪氨酸磷酸化,导致瘦素抵抗[10]。当 SOCS3 受到抑制时,可改善高脂喂养小鼠的瘦素敏感性[11]。本研究结果表明亮氨酸干预后小鼠脂肪组织中瘦素受体和 JAK2 蛋白表达上调、SOCS3 蛋白下调。这与已有结果一致[4]。

综上所述,亮氨酸对高脂高胆固醇诱导的小鼠肥胖等脂代谢异常具有干预作用,其机制可能与调节瘦素受体及其下游蛋白 JAK2 和 SOCS3 表达、改善小鼠的瘦素抵抗有关。

参考文献

[1] Schreibman PH, Dell RB. Human adipocyte cholesterol. Concentration, localization, synthesis, and turnover[J]. J Clin Invest, 1975, 55(5): 986 – 993.
[2] Bluher M. Adipose tissue dysfunction in obesity[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2009, 117(6): 241 – 250.
[3] Münzberg H, Morrison CD. Structure, production and signaling of leptin[J]. Metabolism, 2015, 64(1): 13 – 23.
[4] Yuan XW, Han SF, Zhang JW, et al. Leucine supplementation improves leptin sensitivity in high-fat diet fed rats[J]. Food Nutr Res, 2015, 59: 27373.
[5] Sáinz N, Barrenetxe J, Moreno-Aliaga MJ, et al. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin[J]. Metabolism, 2015, 64(1): 35 – 46.
[6] Zhang Y, Guo K, LeBlanc RE, et al. Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms[J]. Diabetes, 2007, 56(6): 1647 – 1654.
[7] 杜文雯,欧阳一非,王惠君,等. 中国 9 省/自治区成年居民膳食胆固醇摄入与高胆固醇血症关系的前瞻性研究[J]. 中华流行病学杂志, 2015, 36(6): 594 – 597.
[8] 袁雪薇,韩淑芬,张建伟,等. 亮氨酸对高脂膳食诱导的大鼠非酒精性脂肪性肝病的影响[J]. 中国公共卫生, 2014, 30(9): 1160 – 1162.
[9] Binder E, Bermúdez-Silva FJ, Elie M, et al. Leucine supplementation modulates fuel substrates utilization and glucose metabolism in previously obese mice[J]. Obesity, 2014, 22(3): 713 – 720.
[10] Croker BA, Kiu H, Nicholson SE. SOCS regulation of the JAK/STAT signaling pathway[J]. Semin Cell Dev Biol, 2008, 19(4): 414 – 422.
[11] Pedroso JA, Buonfiglio DC, Cardinali LI, et al. Inactivation of SOCS3 in leptin receptor-expressing cells protects mice from diet-induced insulin resistance but does not prevent obesity[J]. Mol Metab, 2014, 3(6): 608 – 618.

收稿日期: 2016-02-17　　(解学魁编辑　韩仰欢校对)

中国公共卫生 CPH