

文章编号 1006-8147(2020)06-0510-04

论著

高脂饮食抑制胰岛素受体和胆囊收缩素受体在小鼠肝脏中的表达

李秋菊¹, 胡立娟², 陈喜娟¹, 邱帅¹, 王丰²

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津南开医院, 天津市急腹症器官损伤与中西医结合修复重点实验室, 天津 300100)

摘要 目的:在高脂饮食(HFD)小鼠中研究肝脏中胰岛素受体(IR)、胆囊收缩素(CCK)受体(CCKR)的表达和胰腺中胰岛素的储量。方法:用含15%和30%脂肪的两种HFD和对照餐(5%脂肪)喂养3组小鼠(15~16只/组)12周,用蛋白印迹法检测IR和CCKR在肝脏中的表达;用免疫组化和ELISA测定胰腺中 β 细胞群落和胰岛素含量;测定门静脉和外周血CCK和胰岛素水平。结果:15%和30% HFD使肝IR、CCKR的表达水平均下降(均 $P<0.05$)。HFD还使胰岛 β 细胞面积增加(对照组:54.57 \pm 2.72;15% HFD:68.74 \pm 1.72;30% HFD:71.61 \pm 2.32;均 $P<0.05$)。此外,30% HFD还增加胰腺胰岛素的储量并提升门静脉血浆中胰岛素的水平。结论:HFD降低小鼠肝脏IR和CCKR的表达,增加胰腺胰岛素储量。

关键词 高脂饮食;肥胖;胰岛素抵抗;胰岛素受体;胆囊收缩素受体

中图分类号 R363.2+1

文献标志码 A

High fat diet inhibits the expression of insulin receptor and cholecystokinin receptor in mouse liver

LI Qiu-ju¹, HU Li-juan², CHEN Xi-juan¹, QIU Shuai¹, WANG Feng²

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. The Laboratory of Acute Abdomen Disease Associated Organ Injury and Repair, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

Abstract Objective: To study the hepatic expression of insulin receptor (IR) and cholecystokinin (CCK) receptor (CCKR) and pancreatic storage of insulin in high fat diet (HFD) mice. **Methods:** Mice in three groups (15–16 per group) were fed with two HFDs with 15% and 30% fat and a control diet (5% fat). After 12 weeks, the expression of IR and CCKR in liver were detected by Western blotting. In the pancreas, β -cell area and insulin content were determined by immunohistochemistry and ELISA. CCK and insulin levels were measured in portal vein and peripheral blood. **Results:** Hepatic IR and CCKR expression was decreased by 15% and 30% HFDs (both $P<0.05$). The β -cell area of the pancreas was increased by both HFDs (control diet: 54.57 \pm 2.72; 15% HFD: 68.74 \pm 1.72; 30% HFD: 71.61 \pm 2.32; all $P<0.05$). Further, 30% HFD increased both pancreatic insulin storage ($P<0.05$) and portal vein insulin. **Conclusion:** HFD decreases the expression of hepatic IR and CCKR and increases pancreatic insulin storage in mice.

Key words HFD; obesity; insulin resistance; IR; CCKR

胰岛素是胰岛 β 细胞分泌的肽类激素^[1],分泌后经门静脉进入肝脏,与肝细胞表面的胰岛素受体(insulin receptor, IR)结合,促进肝细胞葡萄糖和脂类的利用^[2]。持续高脂饮食(high fat diet, HFD)的摄入能导致肝脏发生胰岛素抵抗,继发肝细胞内脂肪堆积,引发非酒精性脂肪肝炎、肝硬化等^[3]。食物中的脂肪和蛋白分解物经上段小肠时会刺激黏膜内的I细胞向血中分泌胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)^[4]继而引发胆囊收缩和胆汁与胰液的外分泌,有助于蛋白和脂肪的消化与吸收^[5]。作为胆汁生成的器官,肝脏的细胞能表达CCK受体(cholecystokinin recep-

tor, CCKR)。研究表明,该受体的表达异常参与了多个肝脏疾患的发生、发展^[6-7]。

CCK和胰岛素是组成内分泌系统肠-胰轴的重要激素^[8],协调食物的消化吸收^[9],并与肥胖和肝病的发生密切相关^[3,7]。研究表明,肥胖小鼠的胰岛 β 细胞不仅分泌胰岛素,还产生CCK,并刺激胰岛素分泌,促进 β 细胞增殖,保护细胞免于凋亡。胰岛素和CCK的这种异常分泌是对肥胖的适应性改变^[10]。而肝脏作为胰岛素和CCK的靶器官,其IR和CCKR如何对HFD作出应答还未被阐明。此次,笔者在进食HFD的小鼠中研究了其肝脏中IR和CCKR的表达,胰腺中 β 细胞群落和胰岛素储量的变化。

1 材料与方法

1.1 动物和材料

46只雄性Balb/c小鼠和普通小

基金项目 国家自然科学基金(81572318)

作者简介 李秋菊(1993-),女,硕士在读,研究方向:代谢和癌症;通信作者:王丰, E-mail: fengwangpi@163.com。

鼠饲料购自中国北京华阜康生物科技有限公司,该饲料含碳水化合物(56% w/w)、粗蛋白提取物(19% w/w)和粗脂肪提取物(5% w/w),其脂肪含量为5%,并在实验1周前用于全部小鼠,也作为对照饲料(control diet, CD)在实验中用于对照组小鼠。向研磨成粉的CD中加入15%和30%的猪油,制得两个HFD,压缩成形并消毒后储存于4℃备用。

β -tubulin 抗体购自 Santa Cruz 公司(47778), IR 抗体购自 Abcam 公司(ab69508), CCKR 抗体购自 Affinity 公司(DF4914), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体和山羊抗鼠抗体购自上海良森生物科技有限公司, 鼠源胰岛素单克隆抗体购自上海西格玛奥德里奇贸易有限公司。卵白素-生物素-酶复合物(ABC)染色法试剂盒购自美国 Vector 公司, 二氨基联苯胺(DAB)法显色试剂盒购自于美国 Millipore 公司, 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒购于美国 Thermo 公司, 放射免疫(RIA)试剂盒购自上海信帆生物科技有限公司。为准备实验所用的血液容器, 向 EP 管中加入 10 μ L EDTA(15%)溶液, 并随即烘干备用。

1.2 动物管理 小鼠抵达时 4~5 周龄, 体重 14~16 g。饲养于南开医院动物实验中心 SPF 级动物房, 12 h/12 h 循环光照, 所有实验小鼠自由摄食和饮水。小鼠适应性喂养 CD 1 周后, 按随机数字表法分为 3 组: 对照餐组 16 只, 进食含有 15% 脂肪的 HFD 组(15% HFD 组)15 只, 进食含有 30% 脂肪的 HFD 组(30% HFD 组)15 只。每周监测小鼠体重, 而每日进食量在众多文献中已有清楚记载^[11-12], 故不赘述, 共饲养 12 周。

用外周和门静脉两次取血的方法获得了测定胰岛素和 CCK 所需的血浆。为此, 在第 10 周时使用毛细管行内眦采血(250 μ L), 3 000 r/min 离心 15 min, 吸取上层血浆, 置于-80℃冰箱保存备用。第 12 周末, 用三溴乙醇和叔戊醇混合物按 125 mg/kg 腹腔注射麻醉动物, 剖开腹腔, 暴露门静脉, 用采血针(0.55 mm \times 19 mm)取门脉血, 同前法获取血浆置于-80℃冰箱保存备用。快速取胰腺组织平分两份, 一份放入福尔马林中, 另一份于-80℃冰箱保存备用。快速取肝脏、腹股沟棕色脂肪组织(inguinal brown adipose tissue, BAT)和附睾白色脂肪组织(epididymal white adipose tissue, WAT)称重, 并将肝脏放入-80℃冰箱保存备用。

1.3 指标检测 所用的蛋白印迹法和免疫组化法详见参考文献^[13-14]。在免疫组化中, 每组含至少 5 只小鼠胰腺, 每张切片至少随机获取 3 个视野, 通过

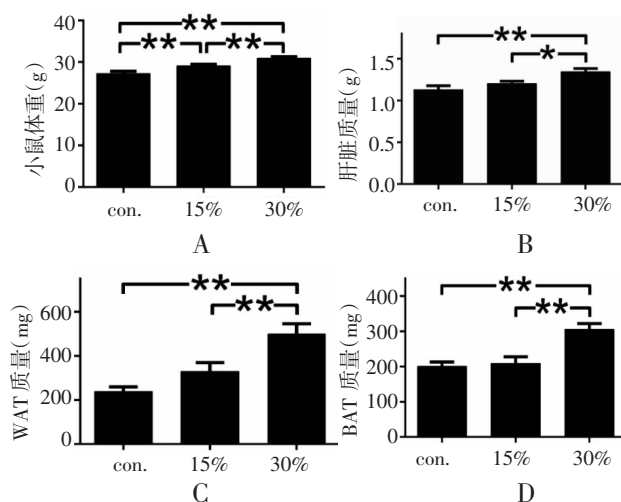
显微镜(400 \times)摄取影像, β 细胞内胰岛素呈棕黄色, 胞核呈蓝色。用镂空方格法计算胰岛素阳性的 β 细胞面积, 及其在胰岛总面积中的占比。

胰腺内胰岛素测定: 用预冷的 PBS(pH7.4)冲洗胰腺组织, 将剪碎的组织与对应体积的 PBS(含蛋白酶抑制剂)在冰上进行超声破碎, 5 000 r/min 离心 10 min 后取上清。按 ELISA 试剂盒说明书的步骤测定胰岛素含量。血浆中胰岛素水平用同一 ELISA 试剂盒测定。按 RIA 试剂盒说明书的步骤操作, 测定血浆 CCK 的浓度。

1.4 统计学处理 应用统计分析软件 SPSS 17.0 进行统计分析, 符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 *LSD-t* 检验。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HFD 对小鼠体重、脂肪组织质量、肝脏质量的影响 与对照餐组相比, 15% HFD 组及 30% HFD 组小鼠体重均增加(*P* < 0.01)(图 1A)。此外, 含 30% HFD 组小鼠的肝脏质量(图 1B)和两处脂肪组织的质量(图 1C 和 1D)增加(*P* < 0.01)。

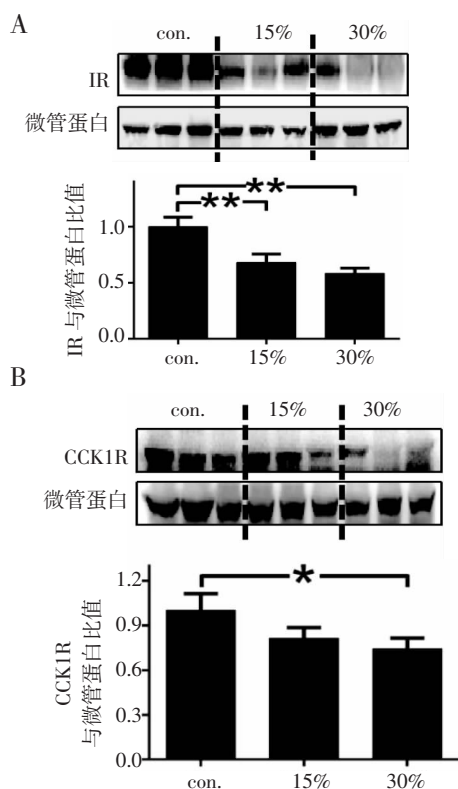


注: 3 组小鼠分别进食含有 5% 脂肪的对照餐(con., *n* = 16)、15% 脂肪的高脂餐(15%, *n* = 14)和 30% 脂肪的高脂餐(30%, *n* = 15), 12 周后处死小鼠; A: 小鼠体重; B: 肝脏质量; C: 附睾白色脂肪组织(WAT); D: 腹股沟棕色脂肪组织(BAT); **P* < 0.05, ***P* < 0.01

图1 HFD 对小鼠体重、脂肪组织质量、肝脏质量的影响

Fig 1 Effects of HFD on body weight, fat tissue weight and liver weight in mice

2.2 HFD 对小鼠肝脏 IR 和 CCK1R 的影响 与对照餐组相比, 15% HFD 组及 30% HFD 组小鼠肝脏 IR 的表达水平均下降(*P* < 0.01)(图 2A)。30% HFD 组肝脏中 CCK1R 表达水平也较对照餐组下降(*P* < 0.05)(图 2B)。

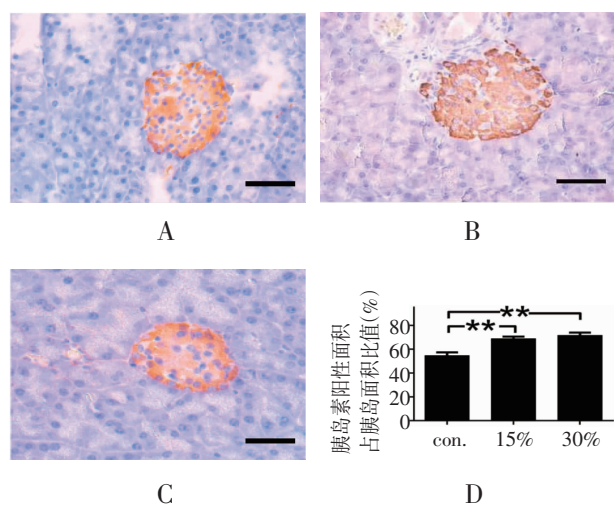


注:3组小鼠分别进食含有5%脂肪的对照餐(con., $n=16$)、15%脂肪的高脂餐(15%, $n=14$)和30%脂肪的高脂餐(30%, $n=15$),12周后处死小鼠;A:肝脏中胰岛素受体(IR)的表达;B:肝脏中胆囊收缩素1型受体(CCK1R)的表达; * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图2 HFD对小鼠肝脏IR和CCK1R表达的影响

Fig 2 Effects of HFD on the expression of IR and CCK1R in mouse liver

2.3 HFD对小鼠胰腺内胰岛素的影响 15%HFD组和30%HFD组小鼠胰腺内 β 细胞面积与对照餐组相比逐渐上升,差异有统计学意义($P<0.01$)(图3)。

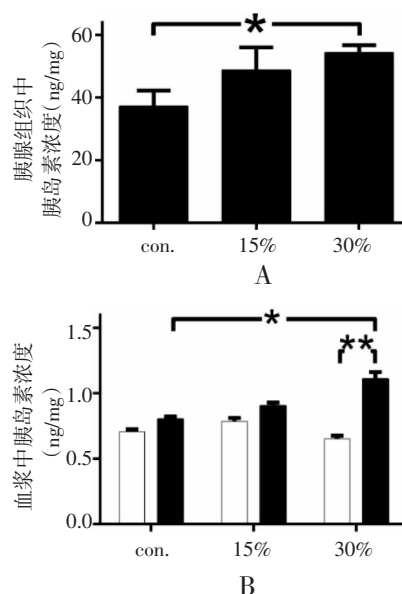


注:3组小鼠分别进食含有5%脂肪的对照餐(con., $n=16$)、15%脂肪的高脂餐(15%, $n=14$)和30%脂肪的高脂餐(30%, $n=15$),12周后处死小鼠;A.con.,比例尺:50 μm ;B.15%,比例尺:50 μm ;C.30%,比例尺:50 μm ;D.胰岛素阳性面积占胰岛面积比值; * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图3 HFD对小鼠胰腺内胰岛素的影响

Fig 3 Effects of HFD on insulin in pancreas

此外,当用ELISA直接检测胰腺组织中胰岛素的含量时,也发现了和免疫组化实验相似的趋势,即15%HFD组和30%HFD组小鼠胰腺内胰岛素含量与对照餐组相比呈上升趋势,并在30%HFD组呈现显著差异($P<0.01$)(图4A)。



注:3组小鼠分别进食含有5%脂肪的对照餐(con., $n=16$)、15%脂肪的高脂餐(15%, $n=14$)和30%脂肪的高脂餐(30%, $n=15$),12周后处死小鼠;A:胰腺组织中胰岛素浓度,con.($n=8$),15%($n=8$),30%($n=7$);B:外周血(表示为白色)和门脉血(表示为黑色)血浆中胰岛素浓度, $n=12$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图4 HFD对小鼠胰腺组织中胰岛素和血浆胰岛素的影响

Fig 4 Effects of HFD on insulin contents in pancreatic tissue and in plasma

2.4 HFD对小鼠血浆胰岛素和CCK的影响 30%HFD组门脉胰岛素浓度较对照餐组升高,较同组小鼠外周血的胰岛素浓度也升高($P<0.01$)(图4B)。

高脂饮食不影响小鼠门脉血和外周血CCK浓度,两组间比较差异无统计学意义($P>0.05$,结果未展示)。

3 讨论

肥胖在起源上是多因素的,但在许多情况下,肥胖是由于进食过多的高脂饮食而引起的,不同的脂肪含量和脂肪类型对胰岛素的敏感性有不同的影响^[15]。含有大量饱和脂肪如猪油、牛脂、椰子油的饮食更易诱发肥胖和胰岛素抵抗,而含有不饱和脂肪酸的饮食如鱼油和来自各种种子的油却可能对胰岛素敏感性产生有益的作用^[16]。本研究结果也再次证明了摄入过量猪油会诱发肥胖这一事实。高脂饮食时, β 细胞通过多种方式增强胰岛素的分泌能力,包括加快细胞增殖和抑制细胞凋亡^[17]。IR介导肝脏对胰岛素的利用^[3]。胰岛素抵抗时,一个重要特

征就是肝脏胰岛素清除率随 IR 表达水平的降低而降低^[18]。本研究结果显示,随脂肪浓度的增加,小鼠胰腺内胰岛素浓度逐渐增加而肝脏内的 IR 表达水平降低,表明高胰岛素血症可能是胰腺高分泌和肝脏胰岛素清除率降低共同作用的结果,胰岛素代谢的这种适应性变化可能参与了 HFD 导致的肥胖和胰岛素拮抗时的代谢再平衡^[3]。

脂质饮食可以提高 CCK 基因在 CCK 生成细胞(I 细胞)中的表达^[19],这与脂质刺激人类 CCK 分泌增加的结果一致^[20]。CCK 与 CCK1R 相互作用介导摄食调节,具有 CCK1R 亚型特异性的拮抗剂被证明可增加食物的摄入量^[21]。本研究结果显示肝脏中 CCK1R 表达随着膳食脂肪浓度的增加而逐渐降低,这与 IR 结果具有一致性,可能提示肝脏 CCK1R 和 IR 表达水平均与脂肪浓度密切相关,但相关机制仍需进一步研究。胰岛素和 CCK 在生理情况下对肝脂肪代谢有协同作用,而病理情况下则相互影响以适应肥胖导致的变化^[3,10]。本研究同时检测肝 IR 和 CCKR,发现二者均随脂肪浓度的增加逐渐降低,这为临床上通过肝 IR 和 CCK1R 制定新的药物靶点来预防肥胖症和相关肝病提供了数据支持。

综上所述,肥胖症作为全身性疾病,能同步降低肝脏 IR 和 CCK1R 以及增加胰腺胰岛素储量。但在肥胖条件下,肠-胰轴中胰岛素和 CCK 间的相关作用机制仍有待深入研究。本研究的新颖性在于:(1)同时检测肝 IR 和 CCKR 表达水平。(2)用外周血和门静脉血胰岛素水平反映胰岛素敏感性。从这一模型中得到的结果,如 HFD 可同时下调肝 IR 和 CCKR 表达等,也将会对肥胖症和肝病的相关研究产生影响。

参考文献:

- [1] Lancet Gastroenterol Hepatol. Obesity management: gastroenterologists take centre stage[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2017, 2(7): 463
- [2] Farmer T D, Jenkins E C, O'Brien T P, et al. Comparison of the physiological relevance of systemic vs. portal insulin delivery to evaluate whole body glucose flux during an insulin clamp[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2015, 308(3): E206
- [3] Haeusler R A, McGraw T E, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(1): 31
- [4] Irwin N, Montgomery I A, Moffett R C, et al. Chemical cholecystokinin receptor activation protects against obesity-diabetes in high fat fed mice and has sustainable beneficial effects in genetic ob/ob mice[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(1): 81
- [5] Rehfeld J F. Cholecystokinin—from local gut hormone to ubiquitous messenger[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2017, 8(8): 47
- [6] Rehfeld J F. Cholecystokinin expression in tumors: biogenetic and diagnostic implications[J]. Future Oncol, 2016, 12(18): 2135
- [7] Tucker R D, Ciofoaia V, Nadella S, et al. A cholecystokinin receptor antagonist halts nonalcoholic steatohepatitis and prevents hepatocellular carcinoma[J]. Dig Dis Sci, 2020, 65(1): 189
- [8] Okabayashi Y, Otsuki M, Baba S. Cholecystokinin in the entero-insular axis[J]. Diabetes Res Clin Pract, 1989, 7: S79
- [9] Calanna S, Piro S, Pino A D, et al. Beta and alpha cell function in metabolically healthy but obese subjects: relationship with entero-insular axis[J]. Obesity, 2013, 21(2): 320
- [10] Linnemann A K, Davis D B. Glucagon-like peptide-1 and cholecystokinin production and signaling in the pancreatic islet as an adaptive response to obesity[J]. J Diabetes Investig, 2016, 7(Suppl 1): 44
- [11] Nishikawa S, Yasoshima A, Doi K, et al. Involvement of sex, strain and age factors in high fat diet-induced obesity in C57BL/6J and BALB/cA mice[J]. Exp Anim, 2007, 56(4): 263
- [12] Li J L, Wu H S, Liu Y T, et al. High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR[J]. Exp Anim, 2020, 69(3): 326
- [13] 黄金灿, 张磊, 常永生. KLF9 基因腺病毒载体的构建及其脂肪酶氧化功能[J]. 天津医科大学学报, 2020, 26(3): 193
- [14] Kaptaner B. Immunohistochemical distribution of insulin-, glucagon- and somatostatin-containing cells in the pancreas of Lake Van fish (Alburnus tarichi Guldenstädt, 1814) (Cyprinidae) [J]. Eur J Histochem, 2019, 63(1): 2999
- [15] Tierney A C, Roche H M. The potential role of olive oil-derived MUFA in insulin sensitivity[J]. Mol Nutr Food Res, 2007, 51(10): 1235
- [16] Storlien L H, Baur L A, Kriketos A D, et al. Dietary fats and insulin action[J]. Diabetologia, 1996, 39(6): 621
- [17] Boland B B, Rhodes C J, Grimsby J S. The dynamic plasticity of insulin production in β -cells[J]. Mol Metab, 2017, 6(9): 958
- [18] Soli A H, Kahn C R, Neville D M, et al. Insulin receptor deficiency in genetic and acquired obesity[J]. J Clin Invest, 1975, 56(4): 769
- [19] Zhan J, Weng J, Hunt B G, et al. Apolipoprotein A-IV enhances cholecystokinin secretion[J]. Physiol Behav, 2018, 188: 11
- [20] Kohan A B, Wang F, Lo C M, et al. ApoA-IV: current and emerging roles in intestinal lipid metabolism, glucose homeostasis, and satiety[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015, 308(6): G472
- [21] Moran T H, Bi S. Hyperphagia and obesity in OLETF rats lacking CCK-1 receptors[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006, 361(1471): 1211

(2020-05-28 收稿)