

重复性饥饿再投喂对大鼠 UCP-2、3 表达影响*

冯彦红 杜友爱 王瑞 刘重斌

摘要:目的 探讨幼鼠和成年大鼠重复性饥饿再投喂饲喂方式处理后,解偶联蛋白(UCPs) mRNA 表达变化。方法 设计重复性饥饿 1 d/再投喂 1 d 持续 6 周的饲喂方式处理幼鼠和成鼠,比较体重、Lee's 指数,检测血糖、游离脂肪酸(FFA)和胆碱酯酶(CHE)含量,白色脂肪组织 UCP 2 mRNA 和肌肉组织 UCP 3 mRNA 表达水平。结果 饥饿再投喂组幼鼠和成年大鼠体重分别为(243.73 ± 17.66)、(261.12 ± 19.51) g,明显低于对照组幼鼠(375.36 ± 21.12) g 和成年大鼠(396 ± 18.14) g ($P < 0.01$);与对照组比较,饥饿再投喂大鼠血清 FFA 升高($P < 0.05$),成年大鼠血糖含量降低($P < 0.05$);分别与幼鼠对照组与饥饿再投喂组大鼠比较,成鼠血清 CHE 含量明显升高($P < 0.01$)。与对照组比较,饥饿再投喂组大鼠白色脂肪组织 UCP 2 mRNA 表达升高($P < 0.05$);与幼鼠对照组比较,成年对照组大鼠白色脂肪组织 UCP 2 mRNA 表达降低($P < 0.05$);与饥饿再投喂幼鼠比较,饥饿再投喂组成年大鼠白色脂肪组织 UCP 2 mRNA 表达升高($P < 0.05$)。结论 重复性饥饿再投喂处理能使大鼠白色脂肪组织 UCP 2 mRNA 的表达水平升高,提高大鼠基础能量代谢率。

关键词: 饥饿再投喂;解耦联蛋白;脂肪酸;能量代谢

中图分类号: R 332; R 151

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)06-0789-02

Effect of repeated fasting/refeeding on expression of UCP-2, 3 genes in rats FENG Yan-hong, DU You-ai, WANG Rui et al. Department of Physiology, Wenzhou Medical College (Wenzhou 325035, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of expression of uncoupling protein 2 (UCP-2) mRNA and uncoupling protein 3 (UCP-3) mRNA in infant and adult rats treated with repeated fasting/refeeding. **Methods** A repeated fasting/refeeding of infant and adult rats model was designed and the rats were fed with a repeated cycle of 1 day fasting and 1 day refeeding for 6 weeks. The body weight and Lee's index were measured. Glucose, free fatty acid (FFA) and cholinesterase (CHE) levels and the expressions of UCP-2 mRNA and UCP-3 mRNA were detected. **Results** Compared to the control (375.36 ± 21.12 g, 396 ± 18.14 g), the body weight of infant and adult rats in repeated fasting/refeeding group (243.73 ± 17.66 g, 261.12 ± 19.51 g) decreased significantly and the serum glucose levels of adult rats decreased significantly ($P < 0.05$). Compared to the control, serum FFA level of fasting/refeeding rats increased significantly ($P < 0.05$). Compared to the infant rats, serum CHE level of adult rats increased significantly ($P < 0.01$). Compared to the control, the expression of UCP2 mRNA in white fat tissue (WAT) of infant and adult rats increased significantly ($P < 0.05$). Compared to the control infant rats, the expression of UCP-2 mRNA in WAT of adult control rats decreased significantly ($P < 0.05$). Compared to fasting/refeeding infant rats, the expression of UCP-2 mRNA in WAT of adult rats increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** The repeated fasting/refeeding can increase the expression of UCP2 mRNA in WAT and improve energy metabolism in rats.

Key words: fasting/refeeding; UCPs; FFA; energy metabolism

解偶联蛋白(uncoupling proteins, UCPs)是细胞线粒体内膜上转运质子的蛋白质,可使质子经线粒体内膜回漏增加,导致线粒体内膜两侧 H^+ 浓度梯度被消除,ADP 磷酸化合成 ATP 效率下降,氧化与磷酸化脱偶联而产生热量,ATP 生成减少,能量消耗和产热增多^[1]。UCPs 是线粒体内膜阴离子转运蛋白的一个重要家族,UCP 基因编码的 UCP1~5 等解偶联蛋白在结构和功能上相似,通过产热消耗能量来调节机体能量平衡。目前研究较多的 UCP 2 和 UCP 3 有 72% 氨基酸序列相同,与机体肥胖、静息时能量消耗和高胰岛素血症等相关联。因此,UCP 2、UCP 3 成为肥胖、糖尿病易感候选基因。研究表明,经过重复性饥饿/再投喂方式处理,能激活大鼠体内瘦素(leptin)调节能量平衡以控制体重这一调节系统^[2]。本研究通过构建重复性饥饿再投喂动物模型,观察不同年龄组大鼠白色脂肪组织中 UCP 2 mRNA 和肌肉组织中

UCP 3 mRNA 表达,探讨 UCP 2、UCP 3 在机体能量平衡调节中作用。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂 7600 型全自动生化分析仪(日本日立公司)、葡萄糖、游离脂肪酸、胆碱酯酶试剂盒(南京建成生物工程研究所)、Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)、BcaBE-STTM RNA PCR Kit Ver. 1.1(大连宝生物工程有限公司)、PCR 引物合成(上海英骏生物技术有限公司)。其余试剂均为市售分析纯。

1.2 动物分组与处理 清洁级健康雄性 3 周龄(约 160 g)和 6 周龄(约 200 g)SD 大鼠(温州医学院实验动物中心)各 12 只,许可证号:SYXK(浙)2010-0150。大鼠适应性饲养 1 周后,按体重随机分为 4 组,每组 6 只:幼、成鼠饥饿再投喂组、幼、成鼠对照组。饥饿再投喂组进行重复性饥饿 1 d 再投喂 1 d 持续 6 周的饲喂处理,隔天喂以基础饲料;对照组每天喂以基础饲料。实验期间所有大鼠自由饮食和饮水,温度 22~25 °C,相对湿度 60~70%,每周定时称量体重。实验结束后,动物禁食 12 h,腹主动脉采血,3 000 r/min 离心 15 min, -20 °C 保存待测。迅速取肌肉组织和脂肪组织,置液氮冻存,备用。

* 基金项目:浙江省自然科学基金(Y2080613; Y2110388)

作者单位:温州医学院生理学教研室,浙江温州 325035

作者简介:冯彦红(1982-),女,河北石家庄人,硕士在读,研究方向:消化与代谢生理。

通讯作者:杜友爱, E-mail: duyouai@163.com.; 刘重斌, E-mail: liuchongbin1972@126.com

1.3 体重、Lee's 指数测定 实验结束时,称量大鼠体重,测量体长(从鼻尖至肛门长度)按照公式计算 Lee's 指数即动物肥胖评价指数: Lee's 指数 = (体重(g))^{1/3} × 1 000 / 体长(cm)。

1.4 血液相关指标测定 生化分析仪检测血清葡萄糖、游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)、胆碱酯酶(cholinesterase, CHE)含量。所有操作均严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 组织中 UCP 2、UCP 3 mRNA 表达测定 采用 Trizol 一步法提取白色脂肪和肌肉组织总 RNA,测定 RNA 浓度与纯度后逆转录成 cDNA。UCP 2 引物: FP5'-GAGAGT-CAAGGGCTAGCGC-3', RP5'-GCTTCGACAGTGCTCTGG-TA-3', 扩增片段 350 bp; UCP 3 引物: FP5'-GTTGGACT-TCAGCCATCAGAA-3', RP5'-GTGGTTGAGCACAGGTC-3', 扩增片段 418 bp; GAPDH 引物: FP5'-AACTCCCTCAA-GATTGTCAGCAA-3', RP5'-ATGTCAGATCCACAACGGAT-ACA-3', 扩增片段 316 bp⁽³⁾。反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 循环 33 次, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶

成像,用 Gel-Pro Analyzer 分析软件进行图像分析。

1.6 统计分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,对实验数据进行方差齐性检测,根据方差齐性情况采用两独立样本 *t* 检验,或 Wilcoxon 非参数检验进行 2 组比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学。

2 结果

2.1 饥饿再投喂对大鼠体重、Lee's 指数影响 饥饿再投喂组幼鼠体重(243.73 ± 17.66)g 与成鼠体重(261.12 ± 19.51)g 都分别明显低于对照组幼鼠(375.36 ± 21.12)g 和成鼠(396 ± 18.14)g ($t = 15.86, 14.32, P < 0.05$)。成鼠体重与幼鼠相比无明显差异($P > 0.05$)。饥饿再投喂幼鼠与成鼠 Lee's 指数与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 饥饿再投喂对血清葡萄糖、FFA、CHE 影响(表 1) 与对照组比较,饥饿再投喂组幼鼠和成鼠血清 FFA 含量明显升高,差异有统计学意义($t = -4.34, -3.62, P < 0.01$)。饥饿再投喂幼鼠和成鼠血清 CHE 含量无明显变化($P > 0.05$);饥饿再投喂成鼠血糖水平明显低于对照组($t = 4.21, P < 0.01$)。

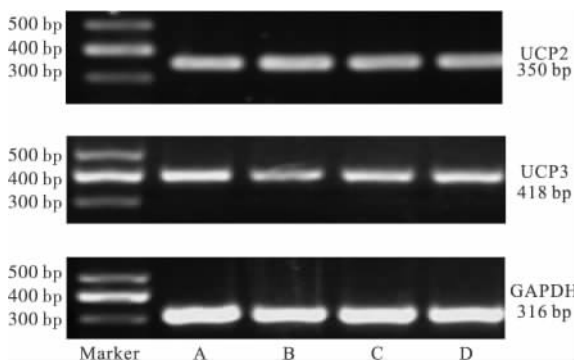
表 1 各组大鼠血清葡萄糖、游离脂肪酸、胆碱酯酶比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	幼鼠			成鼠		
	血糖(mmol/L)	FFA(μmol/L)	CHE(μmol/L)	血糖(mmol/L)	FFA(μmol/L)	CHE(μmol/L)
对照组	30.15 ± 6.26	168.87 ± 65.23	132.27 ± 21.71	34.92 ± 2.56	78.91 ± 47.62	186.98 ± 43.54 ^a
饥饿再投喂组	34.59 ± 5.33	305.67 ± 26.68 ^b	146.24 ± 19.66	29.81 ± 2.53 ^a	228 ± 87.21 ^b	186.65 ± 15.49 ^a

注:与对照组比较 ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$;与幼鼠比较 ^c $P < 0.01$ 。

2.3 UCP 2、UCP 3 mRNA 水平比较(图 1) 与对照组(0.77 ± 0.16)比较,饥饿再投喂组成鼠白色脂肪组织 UCP 2 mRNA(1.11 ± 0.36)表达水平明显升高($t = -2.50, P < 0.05$);与对照组幼鼠与成鼠(0.47 ± 0.30, 0.38 ± 0.12)比较,饥饿再投喂组幼鼠(0.51 ± 0.43)与成鼠(0.57 ± 0.25)骨骼肌中 UCP 3 mRNA 表达无明显差异($P > 0.05$);成鼠与幼鼠之间也无明显差异($P > 0.05$)。

白色脂肪组织 UCP 2 mRNA 表达量均明显高于对照组,可能是经过重复性饥饿再投喂,刺激大鼠利用储存脂肪,促进了以脂肪酸作为能量底物的利用。对照组成鼠白色脂肪组织 UCP 2 mRNA 表达量低于对照组幼鼠,可能与成鼠的能量代谢比幼鼠代谢低有关。饥饿再投喂成鼠白色脂肪组织 UCP 2 mRNA 表达量高于饥饿再投喂幼鼠,可能与经过重复性饥饿再投喂后,组织能量不足,幼鼠相比成鼠合成代谢旺盛,UCP 2 mRNA 表达减少,产热相对减少有关。成鼠与幼鼠骨骼肌 UCP 3 表达量与对照组比较无明显升高,这与已有研究不完全一致⁽⁵⁾,可能与所选实验动物饲养时间、选取骨骼肌类型不同等有关。提示 UCP 表达异常(表达缺如或表达过量)可能对机体能量代谢产生影响。



注: A: 幼鼠对照组, B: 幼鼠饥饿再投喂组, C: 成鼠对照组, D: 成鼠饥饿再投喂组。

图 1 各组大鼠 UCP2 mRNA、UCP3 mRNA 表达

3 讨论

本研究结果显示,通过重复性饥饿再投喂,成鼠和幼鼠体重比对照组减轻,但 Lee's 指数水平却无明显差异,与文献报道一致。本研究结果表明饥饿再投喂成鼠和幼鼠血清游离脂肪酸比对照组增加。摄食状况是影响组织 UCP 2、UCP 3 基因表达重要因素,游离脂肪酸可上调白色脂肪组织和骨骼肌中 UCP 2 和 UCP 3 表达。本研究中饥饿再投喂成鼠和幼鼠

参考文献

- (1) Lowell BB, Flier JS. Brown adipose tissue, beta 3-adrenergic receptors and obesity [J]. Annu Rev Med, 1997, 48: 307-316.
- (2) Kim YW, Scarpace PJ. Repeated fasting/refeeding elevates plasma leptin without increasing fat in rats [J]. Physiol Behav, 2003, 78(3): 459-464.
- (3) Alán L, Smolková K, Kronusova E et al. Absolute levels of transcripts for mitochondrial uncoupling proteins UCP-2, UCP-3, UCP-4 and UCP-5 show different patterns in rat and mice tissues [J]. Bioenerg Biomembr, 2009, 41: 71-78.
- (4) 吴博, 刘重斌, 董缪武, 等. 重复性饥饿/再投喂大鼠下丘脑 NUCB2 表达影响 [J]. 中国公共卫生, 2010, 26(3): 313-314.
- (5) Fabris R, Nisoli E, Lombardi AM et al. Preferential channeling of energy fuels toward fat rather than muscle during high free fatty acid availability in rats [J]. Diabetes, 2001, 50(3): 601-608.

收稿日期: 2011-08-22

(解学魁编辑 范会清校对)