

tion of the methionine metabolic pathway in human lung epithelial-like (A549) cells. *Mutat Res*, 2009, 674 (1-2): 23-30.

[23] Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess. *J Biol Chem*, 1986, 261 (4): 1582-1587.

[24] Mudd SH, Ebert MH, Scriver CR. Labile methyl group balances in the human: the role of sarcosine. *Metabolism*, 1980, 29 (8): 707-720.

[25] Rao AM, Drake MR, Stipanuk MH. Role of the transsulfuration pathway and of gamma-cystathionase activity in the formation of cysteine and sulfate from methionine in rat hepatocytes. *J Nutr*, 1990, 120 (8): 837-845.

[26] Korendyaseva TK, Kuvatov DN, Volkov VA, Martinov MV, Vitvitsky VM, Banerjee R, Ataullakhanov FI. An allosteric mechanism for switching between parallel tracks in mammalian sulfur metabolism. *PLoS Comput Biol*, 2008, 4 (5): e1000076.

[27] Beatty PW, Reed DJ. Involvement of the cystathionine pathway in the biosynthesis of glutathione by isolated rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys*, 1980, 204: 80-87.

[28] Mosharov E, Cranford MR, Banerjee R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry*, 2000, 39: 13005-13011.

[29] Calabrese V, Mancuso C, Sapienza M, Pu-
leo E, Calafato S, Cornelius C, Finocchiaro M, Mangiameli A, Di Mauro M, Stella AM, Castellino P. Oxidative stress and cellular stress response in diabetic nephropathy. *Cell Stress Chaperones*, 2007, 12 (4): 299-306.

[30] Rosenblat M, Hayek T, Aviram M. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*, 2006, 187 (2): 363-371.

[31] Sultana R, Mecocci P, Mangialasche F, Cecchetti R, Baglioni M, Butterfield DA. Increased protein and lipid oxidative damage in mitochondria isolated from lymphocytes from patients with Alzheimer's disease: insights into the role of oxidative stress in Alzheimer's disease and initial investigations into a potential biomarker for this dementing disorder. *J Alzheimers Dis*, 2011, 24 (1): 77-84.

褐藻糖胶抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖的机制

李小婷 殷辰俞 孟徐莲 段 颀 孔秋月 冯 晴

(南京医科大学公共卫生学院营养与食品卫生系, 江苏南京 210029)

摘 要: 目的 探讨调节褐藻糖胶对人肝癌细胞株 HepG2 体外增殖的相关机制。方法 采用 MTT 法测定不同浓度褐藻糖胶对人肝癌细胞株 HepG2 增殖的抑制作用, 计算细胞生长抑制率; 将 0 μ g/ml、10 μ g/ml、100 μ g/ml 和 500 μ g/ml 的褐藻糖胶作用于 HepG2 细胞, 48h 后光镜观察细胞形态改变, 用 Hoechst 染色法和琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡; Western blot 检测 cyclinD1 和 TopoII α 表达的改变。结果 褐藻糖胶具有抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖的作用, 呈剂量依赖性。不同浓度褐藻糖胶作用 HepG2 细胞后, 500 μ g/ml 组较其他浓度组光镜下和 Hoechst 33258 染色均呈现较明显细胞形态改变, 100 μ g/ml 和 500 μ g/ml 组均检测出 DNA 梯形条带。褐藻糖胶也能降低细胞增殖生物标志蛋白 cyclinD1 和 TopoII α 的蛋白表达。结论 褐藻糖胶抑制人肝癌细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 其机制可能与褐藻糖胶抑制细胞增殖的生物标志蛋白 cyclinD1 和 TopoII α 表达有关。

关键词: 褐藻糖胶; 人肝癌细胞 HepG2; 凋亡; cyclinD1; TopoII α

Mechanism of Inhibition of the Proliferation of Fucoidan the Human Hepatoma HepG2 Cells by Fucoidan

Li Xiao-ting Yin Chen-yu Meng Xu-lian Duan Jie Kong Qiu-yue Feng Qing

(Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, NJMU, Nanjing 210029, China)

Abstract: Objective To explore the effect of fucoidan on hepatoma cell proliferation and the related mechanisms. **Methods** Proliferation inhibition rate of hepatoma HepG2 cells was measured by MTT. A variety of dosage of fucoidan (0 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ and 500 $\mu\text{g/ml}$) was treated to HepG2 cells. The morphology change of the cells was observed under microscopy. Apoptosis was detected by Hoechst 33258 staining and DNA Ladder analysis. CyclinD1 and TopoII α are as the proliferation biomarker. Their protein levels were examined by western blot. **Results** Fucoidan inhibited HepG2 cells proliferation in a dose-dependent manner. There was a remarkable morphological change when cells were treated of 500 $\mu\text{g/ml}$ of fucoidan. Apoptosis was occurred when the cells were incubated with 100 $\mu\text{g/ml}$ and 500 $\mu\text{g/ml}$ of fucoidan. In addition, fucoidan also suppressed the expression of cyclinD1 and TopoII α in HepG2 cells. **Conclusion** Fucoidan can inhibit the proliferation of HepG2 cells and induce apoptosis. Meanwhile, fucoidan also has the ability to suppress the protein expression of cyclin D1 and topoII α , which may be one of the mechanisms of inhibition of hepatoma cells proliferation.

Keywords: Fucoidan; Human Hepatoma cell line; Apoptosis; CyclinD1; TopoII α

自古以来, 海带(昆布)在中医药中被认为具有抗肿瘤作用。海藻多糖是一类海藻提取物, 其主要成分为褐藻糖胶(Fucoidan)。褐藻糖胶是一种水溶性膳食纤维, 主要来自于海带、海蕴和裙带菜的孢子叶等的黏滑成分, 其化学成分为以硫酸岩藻糖为主的多糖体, 是由叫做岩藻糖的糖类聚合而成的。褐藻糖胶具有多种生物活性, 在生物体内起着重要作用, 是海洋药物研究和开发的热点之一。有研究表明, 海藻多糖通过改变肿瘤细胞膜特性、抗氧化、抗自由基, 诱导肿瘤细胞的分化与凋亡等来发挥抑制肿瘤的作用^[1,2]。本实验观察褐藻糖胶对肝肿瘤细胞增殖和细胞增殖相关蛋白的影响, 探讨褐藻糖胶抗肿瘤的分子机制, 为其化学预防与临床应用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌 HepG2 细胞株, 由南京医科大学分子毒理实验室馈赠; 褐藻糖胶由南京师范大学江苏省医药超分子材料及应用重点实验室馈赠。褐藻糖胶母液溶解于灭菌水中, 临用时以 PBS 稀释至终浓度; 胰蛋白酶 (Trypsin, 1 : 250)、四甲基偶氮唑盐 (MTT)、DMSO 为美国 Amresco 公司进口分装; DMEM 培养基为美国 Gibco 公司产品; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司); 倒置光学显微镜、IX-70 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 细胞凋亡 -

DNA Ladder 抽取试剂盒 (离心柱式)、预染蛋白标准品, Hoechst 33258 荧光染色试剂盒购自上海碧云天; 电转移装置购自美国 Bio-rad 公司; anti-cyclinD1 兔抗人多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司; anti-TopoisomeraseII α 兔抗人多克隆抗体为英国 Ab-com 公司; 兔抗 β -actin 多抗为武汉博士德公司; 细胞质和细胞核蛋白提取试剂盒为南京凯基生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HepG2 细胞培养在含体积分数为 10% 胎牛血清, 青霉素为 100U/ml, 链霉素为 100 $\mu\text{g/ml}$ 的 DMEM 培养基中, 在 37℃ 和 5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2 天换液 1 次, 待细胞长满至 80% 左右单层时, 用 0.25% 胰蛋白酶溶液进行消化、传代。取生长良好的细胞进行实验。

1.2.2 MTT 方法

取对数生长期的细胞, 制成 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 单细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每孔 180 μL , 随即加入不同浓度的褐藻糖胶溶液每孔 20 μL (药物终浓度为 10、50、100、500、1000、5000 $\mu\text{g/ml}$), 每组设 4 个平行孔, 对照组加入等量 PBS, 培养 48h 后, 每孔加入浓度为 5g/L 的 MTT 20 μL , 继续孵育 4 h 后, 弃去上清加入 DMSO 150 μL , 震荡 10 min 待结晶溶解后用酶标仪 570 nm 波长测定吸光度 (A570)。

1.2.3 药物处理后细胞形态学观察

以 $1 \times 10^5/\text{孔}$ 将 HepG2 细胞接种于 6 孔板, 将褐藻糖胶加入肝癌细胞中, 使其终浓度为 0 $\mu\text{g/ml}$ 、

10 μ g/ml、100 μ g/ml 和 500 μ g/ml, 以 0 μ g/ml 为阴性对照组。48h 后光镜下观察细胞形态变化。

1.2.4 Hoechst 33258 荧光染色检测凋亡

将 HepG2 肝癌细胞以 104/ml 密度接种于 6 孔培养板内, 第二天加入褐藻糖胶, 终浓度分别为 10 μ g/ml、100 μ g/ml 和 500 μ g/ml。48h 后将培养液吸出, 加入固定液, 约 10min 后吸出固定液, 预冷的 PBS 漂洗 2 次。滴加适量的 Hoechst 染液避光染色 10min, 用 PBS 漂洗 2 次, 晾干后封片, 于荧光显微镜 450nm 波长处观察并拍照。

1.2.5 DNA 梯形带的检测

常规收集细胞, 再用 PBS 洗两遍, 按照细胞凋亡 - DNA Ladder 抽提试剂盒 (离心柱式) 说明书提取细胞 DNA。1% 琼脂糖凝胶电泳分析结果。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达

常规收集细胞, 再用 PBS 洗 3 次, 按照细胞浆和细胞核蛋白提取试剂盒的说明书提取细胞浆和细胞核的总蛋白质, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。用 BCA 法进行蛋白定量, 取 60 μ g 蛋白质样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳转膜, 对膜依次进行封闭, 一抗 (1:1000) 4 $^{\circ}$ C 过夜, 二抗 (1:2000) 室温孵育 1 h。ECL 显色, 显影, 定影。

1.2.7 统计学方法

数据以 SPSS 11.0 统计软件处理分析, 各组之间的数据比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 ImageJ 软件对免疫印迹条带扫描后进行分析, 各实验组重复三次以上。

2 结果

2.1 褐藻糖胶抑制 HepG2 肝癌细胞增殖

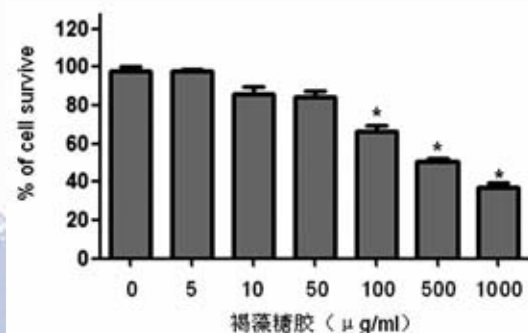


图1 褐藻糖胶对 HepG2 细胞增殖的抑制作用 (与对照组相比, * $P < 0.05$)。

Figure1 Effect of fucoidan on inhibition of HepG2 proliferation (* $P < 0.05$ compared to control)

图1表明, 不同浓度的褐藻糖胶对 HepG2 细胞的生长均有一定程度的抑制作用。且随着浓度的增加, 细胞增殖的抑制作用逐渐增强, 当 100 μ g/ml 的褐藻糖胶作用 48h 后, 细胞存活率显著下降, 呈明显的量效关系。

2.2 光镜观察褐藻糖胶对 HepG2 细胞形态的影响

人肝癌细胞系 HepG2 细胞内加入 10 μ g/ml、100 μ g/ml 和 500 μ g/ml 褐藻糖胶作用 48h 后, 0 μ g/ml 作为对照, 光镜下观察: 对照组细胞生长良好, 细胞膜完整, 形态规则, 密度均一; 实验组细胞边缘模糊, 贴壁细胞减少, 部分细胞死亡、漂浮; 随着浓度的增加, 500 μ g/ml 组死亡细胞数明显增加, 如图 2。

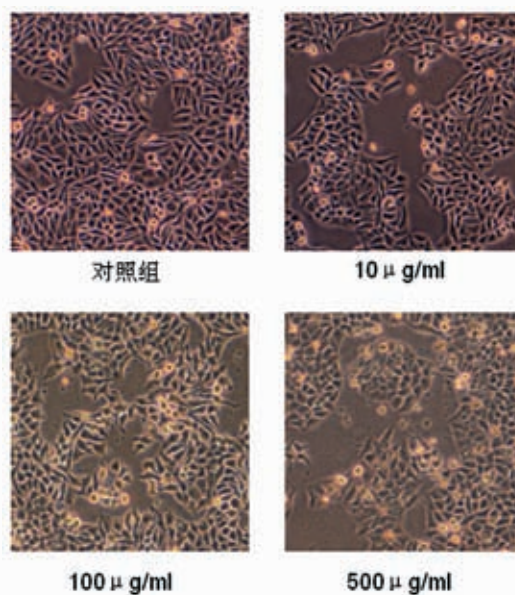


图2 光镜观察褐藻糖胶对 HepG2 细胞的形态变化 ($\times 100$)

Figure 2 The morphological change of HepG2 cells with fucoidan treatment under microscopy ($\times 200$)

2.3 褐藻糖胶诱导 HepG2 细胞凋亡的检测

细胞发生凋亡时, 染色质固缩, 细胞核会呈致密浓染, 或呈碎块状致密浓染。利用这一特殊形态学特征可检测细胞凋亡。我们分别用不同浓度的褐藻糖胶处理人 HepG2 细胞 48h 后, 以 Hoechst 33258 染色, 荧光显微镜下观察细胞形态学的变化。结果 (图 3A) 显示褐藻糖胶诱导 HepG2 细胞凋亡的程度随褐藻糖胶浓度的增加而加重, 呈剂量 - 效应关系。

细胞凋亡时 DNA 在核小体间断裂 (DNA fragmentation) 形成一些 DNA 片断, 提取后由一些特殊质粒被特定内切酶消化, 在凝胶电泳上产生多条带的核酸片段组成, 由于成梯状 故称之为 DNA Ladder。DNA Ladder 的形成与细胞凋亡密不可分, 也是判断细胞凋亡的重要标准。通常观察到 DNA Ladder, 就可以判定细胞发生了凋亡, 作为检测细胞凋亡的一个定性指标。因此, 我们用不同浓度的褐藻糖胶作用 HepG2 细胞 48h 后, 用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA Ladder。图 3B 显示, 当用 100 μ g/ml 的褐藻糖胶处理细胞时就呈现出明显的 DNA 梯形带。这些结果均提示了褐藻糖胶能诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡, 且随着剂量的增加, 褐藻糖胶诱导细胞凋亡的能力增加。

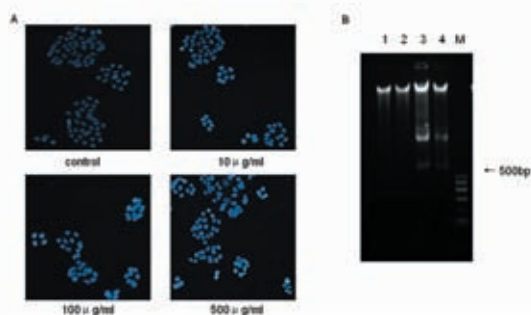


图 3 褐藻糖胶诱导 HepG2 细胞凋亡

A. HepG2 肝癌细胞凋亡的形态学改变 (Hoechst, $\times 100$); B. DNA Ladder 检测。M: Marker; 1: control; 2: 10 μ g/ml 褐藻糖胶; 3: 100 μ g/ml 褐藻糖胶; 4: 500 μ g/ml 褐藻糖胶。

Figure 3 Fucoidan induced apoptosis in HepG2 cells

A. Morphological changes detected by microscopy (Hoechst, $\times 100$); B. DNA Ladder detection M: Marker; 1: Fucoidan treatment for 0 μ g/ml; 2: Fucoidan treatment for 10 μ g/ml; 3: Fucoidan treatment for 100 μ g/ml; 4: Fucoidan treatment for 500 μ g/ml.

2.4 褐藻糖胶对 cyclinD1 蛋白表达的影响

分别用不同浓度的褐藻糖胶作用 HepG2 肝癌细胞 48h 后, 如图 4 示, 随着浓度的增加, cyclinD1 的表达量逐渐减少, 当褐藻糖胶的浓度达到 500 μ g/ml 时, cyclinD1 的含量已减少了 50%, 提示褐藻糖胶诱导 cyclinD1 蛋白含量的下降具有剂量依赖性。

2.5 褐藻糖胶调节 TopoII α 蛋白表达

用不同浓度的褐藻糖胶作用 HepG2 细胞 48h

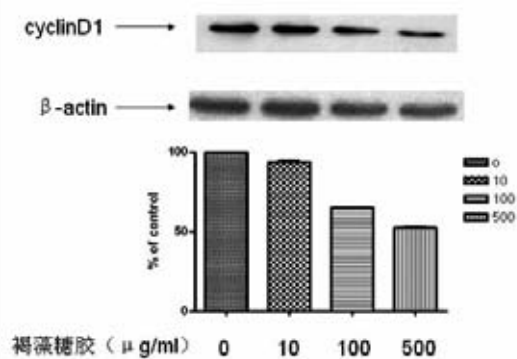


图 4 褐藻糖胶对 cyclinD1 表达水平的影响

Figure 4 Effect of fucoidan on protein expression of cyclin D1

后, western blot 检测 TopoII α 蛋白水平。结果如图 5 显示, 褐藻糖胶能降低 TopoII α 的蛋白表达, 且随着褐藻糖胶剂量的增加, TopoII α 的含量逐渐降低, 当褐藻糖胶的浓度为 100 μ g/ml 时 TopoII α 已出现显著下降。

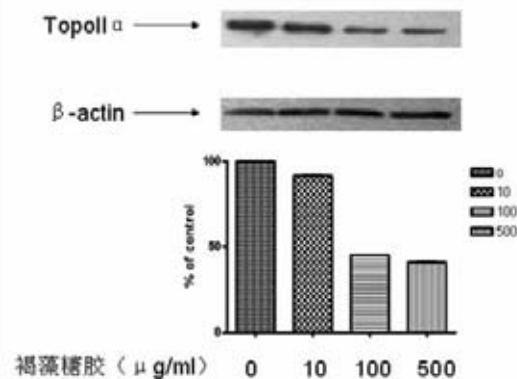


图 5 褐藻糖胶调节 TopoII α 的蛋白表达水平

Figure 5 Effect of fucoidan on protein expression of TopoII α

3 讨论

癌症严重威胁着人们健康和生命。癌症化学预防 (chemoprevention) 作为解决癌症问题的最佳花费/效益比的方法越来越受到人们的重视。它指利用天然的或合成的化学物质来阻止、减缓或者逆转癌症发生发展过程或者复发的策略。目前发现不少来源于天然食物中的成分如姜黄素、茶多酚、白藜芦醇等具有较强的化学预防作用^[3-5]。褐藻糖胶作为一种海洋中的具有多种生物活性的天然生物, 其在肿瘤化学预防的重要性已引起人们的关注。

褐藻糖胶因具有多种生物活性如抗肿瘤、抗病毒等而成为近年海洋生物研究开发的热点^[6]。体内试验显示褐藻糖胶能诱导肺癌细胞、结肠癌细胞等的凋亡^[7,8]。褐藻糖胶通过激活 JNK、ERK 和 caspase-8 途径来诱导白血病细胞和乳腺癌细胞凋亡^[9,10]。在体外实验中发现,褐藻糖胶可以明显抑制 S180 小鼠瘤体的生长,延长 H22 荷瘤小鼠的生存时间,提示褐藻糖胶具有抗肿瘤的作用^[11]。另外,螺旋藻多糖蛋白提取物能显著抑制小鼠体内腹水中肝癌细胞的增殖^[6]。本实验在 HepG2 人肝癌细胞系中也观察到褐藻糖胶对该细胞的体外增殖有抑制作用,进一步证实褐藻糖胶对肿瘤细胞增殖的对抗作用。

CyclinD1 是细胞增殖的生物标志蛋白,已成为肿瘤治疗的靶点之一。CyclinD1 同时也作为细胞周期重要的正调控因子,主要是促进细胞周期通过 G1/S 检查点。岩藻多糖能作用于细胞的 G1/S 节点,使细胞停滞于 G 期,进而抑制 NSCLC-6 细胞(非小细胞肺癌细胞株)的增殖^[12];另外发现海带多糖也可改变癌细胞的细胞周期,使 S 期细胞百分率增加, G0/G1 期细胞百分率降低,细胞被阻滞于 S 期^[13]。褐藻多糖硫酸酯是从海带中提取的一种高活性物质,海带多糖对细胞周期的影响是否主要由褐藻多糖硫酸酯起作用,及该过程是否通过直接作用于细胞周期的调节因子 cyclinD1 所导致的,目前还不是很清楚。本实验首次发现褐藻糖胶能有效抑制 cyclinD1 的表达,提示褐藻糖胶可能直接作用于细胞周期调节的蛋白,影响细胞周期的进程,抑制细胞的增殖。我们推测诱导 cyclinD1 表达降低可能是褐藻糖胶抑制肿瘤细胞增殖的机制之一。

DNA 拓扑异构酶(Topoisomerase, Topo)也是细胞增殖的重要生物标志蛋白。它能调节核酸空间结构动态变化,是控制核酸生理功能的关键酶。在肿瘤细胞中,拓扑异构酶含量及活性远高于正常体细胞,抑制拓扑异构酶的活性可能抑制肿瘤细胞的快速增殖,进而杀死肿瘤细胞^[14]。TopoII α 作为 Topo 酶的一个亚型,可以准确地反映细胞增殖的情况,而且恶性增殖细胞比良性增生细胞 TopoII α 水平更高。目前,DNA 拓扑异构酶已经成为公认的抗癌药物的作用靶点。然而,目前有关褐藻糖胶对 Topo 酶的调节尚未报道。我们发现褐藻糖胶能抑制 TopoII α 的蛋白表达,并具有剂量依赖性。提示褐藻糖胶可能是一种天然的 TopoII 的抑制剂,但褐藻糖胶调节 TopoII α 的蛋白水平的机制还有待于进一步研究。

细胞增殖是通过细胞周期实现的。细胞周期的

运行,是在一系列称为检验点(check point)的严格检控下进行的,当 DNA 发生损伤,复制不完全或纺锤体形成不正常,周期将被阻断。因此,细胞周期设有若干个关卡即调节点,其中以 G1/S 期和 G2/M 期转换最重要。CyclinD1 在促进 G1 期向 S 期转换中发挥着重要的作用。在生理状态下,细胞进入 S 期后 cyclinD1 迅速分解。如 cyclinD1 基因被激活,则 cyclinD1 持续高表达,导致 G1 期缩短,提前进入 S 期,细胞增殖异常,最终形成肿瘤^[15]。TopoII α 表达降低,延长 G2 期向 M 期转换,引起细胞周期阻滞在 G2 期^[16]。褐藻糖胶诱导 cyclinD1 和 TopoII α 表达下降对细胞周期是否也产生相应的影响,导致 G1/S 期和(或) G2/M 期阻滞?这将是我们的下一步研究的重点。

综上所述,褐藻糖胶能抑制人肝癌细胞 HepG2 的生长,而其抑制细胞增殖的机制可能是影响细胞增殖标志蛋白 cyclinD1 和 DNA TopoII α 的表达来实现的。褐藻糖胶是一种具有多种生物活性的天然物质,深入探讨褐藻糖胶的抗肿瘤机理对于开发肿瘤的化学预防药物具有重大的意义。

参考文献

- [1] 王晓宇,邹明明,王蓉,等.海藻多糖抗肿瘤机理研究进展[J].大连医科大学学报,2007,29(3):318-319+322.
- [2] 郭婧,李强.肝癌化学预防新进展[J].中国肿瘤临床,2006,33(10):597-600.
- [3] Roy P, George J, Srivastava S, et al. Inhibitory effects of tea polyphenols by targeting cyclooxygenase-2 through regulation of nuclear factor kappa B, Akt and p53 in rat mammary tumors[J]. Invest New Drugs, 2011, 29(2): 225-231.
- [4] Bartik L, Whitfield G K, Kaczmarek M, et al. Curcumin: a novel nutritionally derived ligand of the vitamin D receptor with implications for colon cancer chemoprevention[J]. J Nutr Biochem, 2010, 21(12): 1153-1161.
- [5] 付招娣,曹玉,王凯风,等.白藜芦醇对癌的化学预防作用[J].癌症,2004,23(8):869-873.
- [6] 刘好,侯放,杨丽丽.海洋藻类多糖的生物活性研究进展[J].安徽农学通报,2009,15(8):47-48.
- [7] Boo H J, Hyun J H, Kim S C, et al. Fu-

coidan from *Undaria pinnatifida* Induces Apoptosis in A549 Human Lung Carcinoma Cells [J]. *Phytother Res*, 2011. [Epub ahead of print]

[8] Kim E J, Park S Y, Lee J Y, et al. Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells [J]. *BMC Gastroenterol*, 2010, 10: 96.

[9] Jin J O, Song M G, Kim Y N, et al. The mechanism of fucoidan-induced apoptosis in leukemic cells: involvement of ERK1/2, JNK, glutathione, and nitric oxide [J]. *Mol Carcinog*, 2010, 49 (8): 771-782.

[10] Yamasaki-Miyamoto Y, Yamasaki M, Tachibana H, et al. Fucoidan induces apoptosis through activation of caspase-8 on human breast cancer MCF-7 cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57 (18): 8677-8682.

[11] 徐明芳, 高孔荣. 海藻多糖及其生物活性 [J]. *水产科学*, 1996, 15 (6): 8-10.

[12] 王琪琳, 桑青, 曲爱琴. 海带多糖在诱导肿瘤细胞凋亡机制方面的研究 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37 (9): 4128-4130.

[13] 孙冬岩, 林虹, 史玉霞. 海带硫酸多糖对人宫颈癌细胞株增殖和凋亡的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2005, 21 (12): 1241-1243.

[14] Woessner R D, Mattern M R, Mirabelli C K, et al. Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. [J]. *Cell Growth Differ*, 1991, 2 (4): 209-214.

[15] 王前, 邓晶, 蒋永新. cyclinD1 的研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17 (2): 350-353.

[16] Bower J J, Karaca G F, Zhou Y, et al. Topoisomerase IIalpha maintains genomic stability through decatenation G (2) checkpoint signaling. [J]. *Oncogene*, 2010, 29 (34): 4787-4799.

膳食补充亮氨酸对高脂喂养大鼠胰岛素敏感性的影响

李 想 刘 锐 王晓蕾 马 炎 郝丽萍 姚 平 杨雪锋

(华中科技大学同济医学院营养与食品卫生学系, 武汉 430030)

摘要: **目的** 通过观察不同剂量亮氨酸补充对高脂喂养大鼠葡萄糖耐量和胰岛素耐量的影响, 检测胰岛素敏感性相关指标, 探讨亮氨酸对胰岛素抵抗动物模型的胰岛素敏感性的影响。 **方法** 通过高脂膳食喂养建立胰岛素抵抗大鼠模型, 同时饲以 1.5%, 3.0% 和 4.5% 亮氨酸进行干预。饲养 25 周后, 进行葡萄糖耐量实验、胰岛素耐量实验。检测血清亮氨酸水平、血糖, 血胰岛素, 计算 HOMA 指数。Western blot 检测肝脏 mTOR 及磷酸化 mTOR 表达水平。 **结果** 高脂亮氨酸干预组胰岛素耐量曲线下面积值 (AUC) 明显降低, 血胰岛素水平及 HOMA 指数明显降低。胰岛素刺激状态下, 亮氨酸可显著增强肝脏的胰岛素信号传导关键分子 pSer2448 mTOR 的表达。 **结论** 一定剂量的亮氨酸可以增加高脂喂养胰岛素抵抗大鼠的胰岛素敏感性。

关键词: 胰岛素抵抗; 胰岛素敏感性; 亮氨酸

Abstract: Objective To evaluate the effects of leucine on insulin sensitivity in rats fed with high-fat diet. **Methods** Rats were fed with normal chow diet or high-fat diet supplemented with 1.5%, 3.0% and 4.5% leucine for 25 weeks. Glucose tolerance test and insulin tolerance test were performed. Then serum leucine, glucose and insulin levels were detected and HOMA index was calculated. Western blot was used to detect mTOR and phosphor-mTOR (pSer 2448) expression. **Results** In the high-fat supplemented with leucine groups, the areas under the curve