

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

(AUC) of insulin tolerance, serum insulin levels and HOMA index all decreased significantly. After insulin stimulation, leucine can significantly enhance pSer2448 mTOR expression. **Conclusions** Leucine supplementation could improve the insulin sensitivity in rats fed with high-fat diet.

**Keywords:** Insulin Resistance; Insulin Sensitivity; Leucine

随着经济的发展和水平的提高,2型糖尿病的发病人数不断快速地增长。胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是代谢综合征和2型糖尿病等疾病发病机制中的关键环节。近年来研究中发现,高蛋白饮食可激活胰岛素信号传导途径、增强胰岛素敏感性,有利于改善胰岛素抵抗<sup>[1]</sup>。其中膳食蛋白中的氨基酸发挥着关键作用。亮氨酸(Leucine)是支链氨基酸的一员,不仅仅是人体必需氨基酸,作为一种重要的营养信号分子,在改善胰岛素抵抗方面发挥的作用受到了越来越多的重视。已有研究表明<sup>[2]</sup>,亮氨酸参与了蛋白质合成、胰岛素信号传导、骨骼肌的能量调节等多种重要的生物学过程。本文通过检测胰岛素敏感性相关指标,探讨亮氨酸对胰岛素抵抗大鼠模型胰岛素敏感性的影响,以研究亮氨酸对胰岛素抵抗的干预作用以及合适的干预剂量。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

雄性成年SD大鼠100只,体重200~220g,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,饲养于SPF级动物房。分为基础饲料喂养组和高脂饲料喂养组,分别给予基础饲料(华中科技大学同济医学院实验动物学部提供)和高脂饲料。100g基础饲料含20.52g蛋白质,3.51g脂肪,3.14g粗纤维,6.95g灰分,65.88g碳水化合物,供能377.19kcal。高脂饲料由60%基础饲料、24.5%猪板油、10%鸡蛋黄粉、5%酪蛋白、0.5%牛胆盐配制而成,100g高脂饲料供能520.79kcal,其中各营养物质供能比为:脂肪53.8%,蛋白质14.9%,碳水化合物31.2%。基础饲料喂养组(Normal control, NC)和高脂饲料喂养组(High-fat diet, HFD)又分别分为四个组,分别饲以添加了含不同浓度(0、1.5%、3%、4.5%,相当于正常摄入量的0、1、2、3倍剂量)L-亮氨酸的饲料。各组均自由摄食进水,每日测定进食量,每周测一次体重,实验时间为25周。

### 1.2 指标检测

实验结束前一周,大鼠禁食10小时,经100U/L胰岛素溶液0.8U/kg/bw腹腔注射(胰岛素耐量试验,ITT)或经口灌服100%葡萄糖溶液2g/kg/bw(口服葡萄糖耐量试验,OGTT),于0min、15min、

30min、60min、120min分别经尾静脉穿刺取血,取第二滴血,血糖仪测定大鼠全血血糖值,并计算血糖曲线下面积值(AUC)。

25周末,大鼠禁食10h后断头处死。取左侧肾周围脂肪称重,分离血清,取肝脏,骨骼肌,肌肉,脂肪组织等,置于-80℃冰箱冻存。葡萄糖酶氧化法测定血清葡萄糖(GLU),酶法试剂盒检测甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL)水平,竞争性放射免疫分析法检测血胰岛素水平。胰岛素敏感性指数HOMA-IR = FIN × FPG/22.5。高效液相法测定血清亮氨酸含量。Western blot法检测肝脏mTOR及磷酸化mTOR表达水平。

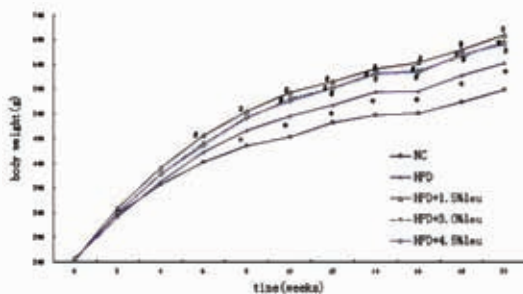
### 1.3 统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,经SPSS16.0统计软件进行多组间的(ANOVA)方差分析。

## 2 实验结果

### 2.1 体重和进食量

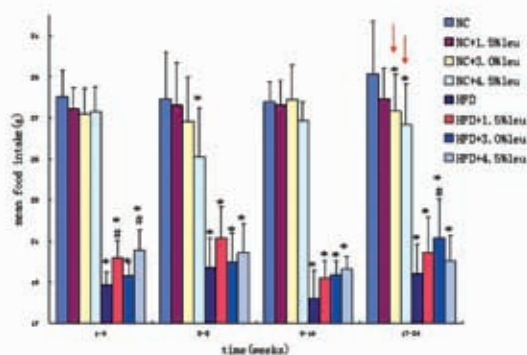
从图1可以看出,从第6周开始,HFD组和HFD+1.5% leu组的体重开始升高;第7周时,HFD组大鼠体重已显著高于NC组大鼠体重( $P < 0.05$ );11周以后,HFD+1.5% leu、HFD+3.0% leu、HFD+4.5% leu组大鼠体重显著高于HFD组大鼠( $P < 0.05$ )。



注: \*  $P < 0.05$  vs NC; #  $P < 0.05$  vs HFD

图1 各组大鼠体重增长情况

从图2可以看出,高脂饲料喂养组老鼠的进食量明显低于基础饲料喂养组( $P < 0.05$ )。在普通饲料喂养组中,亮氨酸干预的大鼠进食量较未摄入亮氨酸组有降低的趋势。到第20w时,NC+3.0% leu、

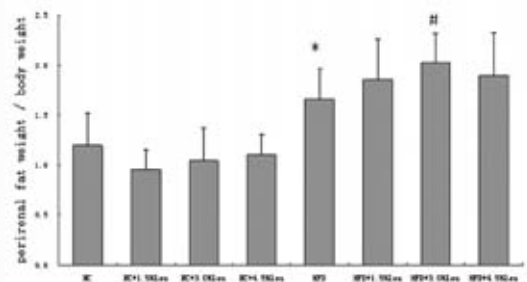


注: \*  $P < 0.05$  vs NC; #  $P < 0.05$  vs HFD

图2 各组大鼠进食量情况

NC + 4.5% leu 组进食量明显较 NC 组低 ( $P < 0.05$ )。在高脂饲料喂养组中, 亮氨酸干预的大鼠进食量较未摄入亮氨酸组有增多的趋势。到第 20w 时, HFD + 3.0% leu 组进食量比 HFD 组高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

## 2.2 肾周脂肪占体重的比值



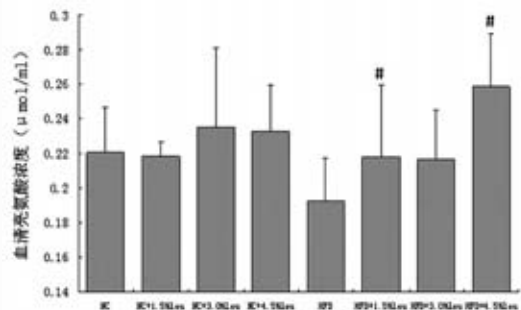
注: \*  $P < 0.05$  vs NC; #  $P < 0.05$  vs HFD

图3 各组大鼠肾周脂肪占体重的比值

由图 3 可得, HFD 组肾周脂肪占体重的比值显著性升高, 差异有统计学意义,  $P < 0.05$ 。HFD + 3.0% leu 组的肾周脂肪占体重的比值较 HFD 组偏高 ( $P < 0.05$ )。

## 2.3 高效液相色谱法 (HPLC) 测定血清亮氨酸含量<sup>[3]</sup>

高效液相色谱法所得到的亮氨酸的标准曲线为  $Y = 434391x - 54820$  ( $R^2 = 0.9972$ )。亮氨酸的保留时间为 34.15min。



注: #  $P < 0.05$  vs HFD

图4 HPLC 检测血清中亮氨酸含量结果

由图 4 可以看出亮氨酸干预组的血清亮氨酸含量均较未干预组高, HFD 组血清中亮氨酸含量较 NC 组有降低的趋势, 但无统计学差异。HFD + 1.5% leu 及 HFD + 4.5% leu 血清中亮氨酸较 HFD 组有明显增高 ( $P < 0.05$ )。

## 2.4 血清生化指标

试验结束时, 各组血清的血糖 (GLU)、甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白 (HDL) 水平结果见表 1。

表 1 各组大鼠 GLU、TG、TC、HDL 水平 (mmol/L,  $\bar{x} \pm s$ )

| 分组            | 血糖 (GLU)    | 甘油三酯 (TG)     | 总胆固醇 (TC)     | 高密度脂蛋白 (HDL)  |
|---------------|-------------|---------------|---------------|---------------|
| NC            | 5.79 ± 1.58 | 1.06 ± 0.52   | 1.94 ± 0.34   | 1.96 ± 0.60   |
| NC + 1.5%leu  | 6.96 ± 1.68 | 1.08 ± 0.29   | 2.01 ± 0.31   | 1.73 ± 0.76   |
| NC + 3.0%leu  | 7.27 ± 2.11 | 1.28 ± 0.37   | 2.29 ± 0.31   | 2.88 ± 0.72 * |
| NC + 4.5%leu  | 6.78 ± 1.69 | 0.82 ± 0.26   | 2.35 ± 0.40   | 1.79 ± 0.67   |
| HFD           | 6.14 ± 0.98 | 0.96 ± 0.19   | 2.39 ± 0.37 * | 2.23 ± 0.59   |
| HFD + 1.5%leu | 7.46 ± 0.98 | 1.28 ± 0.24 # | 2.66 ± 0.31   | 2.98 ± 0.75 # |
| HFD + 3.0%leu | 4.76 ± 2.04 | 0.93 ± 0.20   | 2.41 ± 0.34   | 1.61 ± 0.16 # |
| HFD + 4.5%leu | 4.78 ± 1.29 | 1.08 ± 0.15   | 2.29 ± 0.87   | 1.95 ± 0.24   |

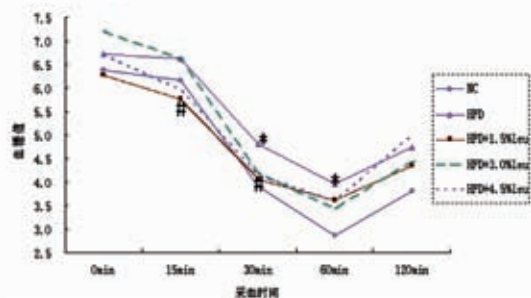
注: \*  $P < 0.05$  vs NC; #  $P < 0.05$  vs HFD

表 1 的结果表明, 实验结束时, 各组血糖水平无显著性差异。HFD 组总胆固醇水平显著高于 NC

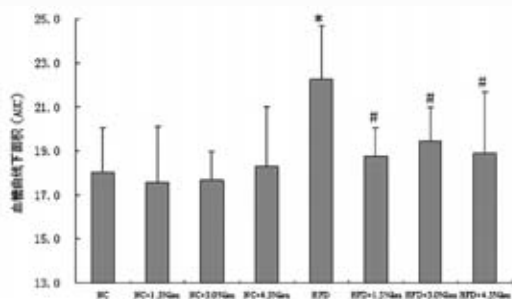
组,  $P < 0.05$ , 补充亮氨酸组未表现出明显差异。而 NC + 3.0% leu 组 HDL-C 水平显著高于 NC 组 ( $P <$

0.05), HFD + 1.5% leu 组 TG、HDL-C 水平显著高于 HFD 组 ( $P < 0.05$ )。

## 2.5 胰岛素耐量试验 (Insulin Tolerance Testing, ITT)



(1) 各时间点血糖值



(2) 血糖曲线下面积 (AUC)

注: \*  $P < 0.05$  vs NC; #  $P < 0.05$  vs HFD

图5 胰岛素耐量试验

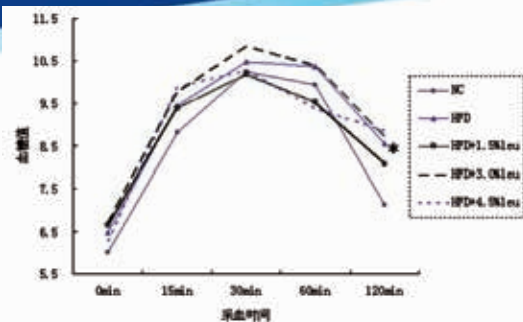
由图5可见,胰岛素注射30min及60min后,HFD组的血糖值显著高于NC组 ( $P < 0.05$ )。HFD + 1.5% leu 组在胰岛素注射15min及30min时间段内,血糖明显低于HFD组 ( $P < 0.05$ )。HFD组胰岛素耐量实验曲线下面积(AUC)明显高于NC组 ( $P < 0.05$ )。HFD加亮氨酸干预组的曲线下面积均比HFD组低,有显著性差异,  $P < 0.05$ 。

## 2.6 口服葡萄糖耐量试验 (OGTT)

口服葡萄糖耐量试验结果(见图6)表明,HFD组的120min的血糖值明显高于NC组 ( $P < 0.05$ ),各HFD加亮氨酸干预组与HFD组之间血糖值以各组血糖曲线下面积(AUC)均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

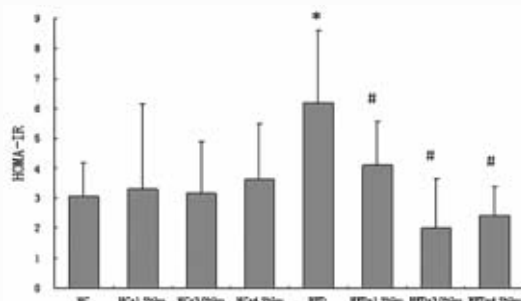
## 2.7 亮氨酸对大鼠空腹胰岛素水平、HOMA-IR指数的影响

图7的结果表明,各组大鼠空腹血糖水平无显著性差异。HFD组的空腹胰岛素水平及HOMA-IR指数均显著高于正常对照组 ( $P < 0.05$ )。各HFD加

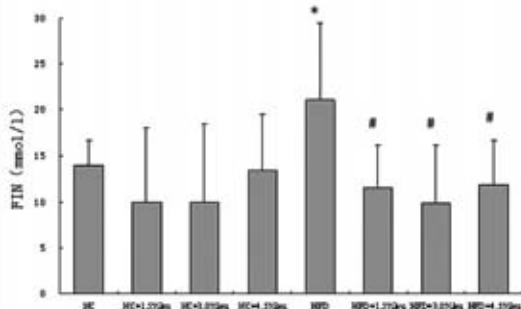


注: \*  $P < 0.05$  vs NC; #  $P < 0.05$  vs HFD

图6 口服葡萄糖耐量各时间点血糖值



(1) HOMA-IR 指数



(2) 大鼠空腹胰岛素水平

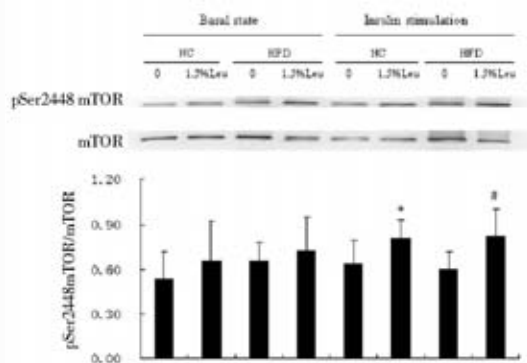
注: \*  $P < 0.05$  vs NC; #  $P < 0.05$  vs HFD

图7 亮氨酸对大鼠空腹胰岛素水平、HOMA-IR指数的影响

亮氨酸干预组的空腹胰岛素水平及HOMA-IR指数均明显低于HFD组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

## 2.8 基础状态和胰岛素刺激状态下,亮氨酸对肝脏mTOR及磷酸化mTOR蛋白表达水平的影响

由图8可知,在非胰岛素刺激状态下,亮氨酸对肝脏pSer2448mTOR的表达有升高的趋势,但是无显著性差异。但在胰岛素刺激状态下,亮氨酸可显著增强pSer2448mTOR的表达,差异有统计学意义。



注: \*  $P < 0.05$  vs NC; #  $P < 0.05$  vs HFD

图8 亮氨酸对大鼠肝脏 mTOR 及磷酸化 mTOR 蛋白表达水平的影响

### 3 讨论

近年来的研究发现,亮氨酸作为一种重要的营养信号分子,通过调控 mTOR (mammalian target of rapamycin, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白) 途径调控蛋白质合成、胰岛素信号传导以及能量代谢等重要的生物学过程,在防治肥胖、糖尿病和代谢综合征等代谢性疾病中发挥了重要作用,其中亮氨酸是 mTORC1 最有效的激活剂。体外实验发现<sup>[4]</sup>,亮氨酸可通过激活 mTOR 影响脂肪细胞的胰岛素信号传导途径,增强胰岛素敏感性。Cota 报道<sup>[5]</sup>,正常大鼠脑室注射亮氨酸可降低动物摄食量和体重,对能量和营养摄入发挥有益的反馈调节作用,从而有利于改善胰岛素抵抗。通过饮水给予小鼠正常摄入量 2 倍的亮氨酸可显著降低体重,增强胰岛素敏感性、促进葡萄糖转运,显著改善高脂膳食导致的肥胖、高血糖、高血脂等代谢紊乱状态<sup>[6]</sup>。也有报道,正常动物补充亮氨酸对胰岛素敏感性无明显影响或导致胰岛素抵抗<sup>[7]</sup>。

由于研究对象的不同,研究设计的差异,亮氨酸与胰岛素敏感性的关系结论并不一致。本研究对于正常大鼠和高脂喂养大鼠分别补充不同剂量的亮氨酸,以观察亮氨酸补充对生理状态和胰岛素抵抗状态下胰岛素敏感性的影响并确定合适的剂量,为 2 型糖尿病的膳食干预提供理论依据。

以往研究报道,亮氨酸可以降低食欲和摄食量,从而降低体重。近期有研究<sup>[8]</sup>报道,通过给老年大鼠长期饲以亮氨酸干预,除饲养第二周时体重有明显降低外,未发现体重有其他改变。我们的研究发现,正常大鼠通过不同剂量亮氨酸的干预表现出摄食量减少的趋势。实验末,3.0%,4.5%亮氨酸干

预组摄食量明显降低。但是对于摄食量已经明显减少的喂食高脂饲料的大鼠,随着亮氨酸干预浓度的增加,摄食量却有升高的趋势,体重均较 HFD 组大鼠明显升高,普通饲料组大鼠体重未见明显差异。同时,高脂亮氨酸干预组的肾周脂肪均较 HFD 组有增加的趋势。因此,本研究结果表明,亮氨酸补充对正常大鼠和高脂大鼠的进食量表现出不同的干预作用。

糖尿病的发生发展从正常血糖正常胰岛素、正常血糖高胰岛素到高血糖高胰岛素以及高血糖低胰岛素,是一个非常漫长的过程。本研究在高脂饮食诱导胰岛素抵抗的同时,加以不同剂量的亮氨酸干预。实验结束时,大鼠 HFD 组血清的 TC 含量较 NC 组明显升高。血糖各个实验组均未表现出明显差异。血糖胰岛素水平 HFD 组显著升高。表明本实验高脂膳食喂养大鼠处于胰岛素抵抗阶段。而亮氨酸的干预对血脂、血糖没有明显的影响。但是,亮氨酸干预组的胰岛素水平显著降低。胰岛素耐量试验 (ITT) 血糖曲线下面积 (AUC) 降低, HOMA-IR 显著降低。1.5% 亮氨酸就表现出了明显的改善胰岛素抵抗的作用,而且此剂量的亮氨酸补充对正常大鼠无明显的影响。

磷酸化是调节 mTOR 活性的方式之一, mTOR 受多个磷酸化位点的调节。其中 Ser2448 位点的磷酸化是调节其活性的位点之一,而且 Ser2448 的磷酸化水平与 mTORC1 的活性高度相关。有研究表明临床上长期使用 mTORC1 的抑制剂雷帕霉素的移植病人反而出现了胰岛素抵抗。而且尽管 OB 小鼠体内 mTORC1 水平升高,但是雷帕霉素却没有改善胰岛素耐量和葡萄糖耐量,增强胰岛素敏感性。mTORC1 抑制剂在生理和病理状态下对胰岛素抵抗敏感性的作用会有所不同, Vodenik 等人研究发现:在正常状态下 mTORC1 抑制剂会导致胰岛素抵抗,而在胰岛素抵抗和肥胖时 mTORC1 抑制剂能够增强胰岛素敏感性,改善胰岛素抵抗状态<sup>[9]</sup>。本实验发现在胰岛素刺激状态下,亮氨酸可显著增强 mTOR 的活性,在基础状态下,有升高的趋势。

本研究发现,高脂喂养大鼠补充亮氨酸后,摄食量和体重有增加的趋势,肾周脂肪组织也增加,但是总的胰岛素敏感性却显著增加,表明体重的增加和脂肪组织的增加并不是胰岛素抵抗的决定因素。研究<sup>[10]</sup>发现,脂肪在肝脏和骨骼肌的异位沉积以及所导致的代谢改变是胰岛素抵抗发生的重要原因。最近 Zeanandin 报道,老年大鼠补充 4.5% 的亮氨酸 6 个月,外周脂肪增加了 45%,但是骨骼肌的葡萄糖

糖摄取也显著增加<sup>[8]</sup>。本课题组的细胞实验也表明,亮氨酸可显著增强原代培养大鼠骨骼肌细胞的葡萄糖摄取能力<sup>[10,11]</sup>。在亮氨酸干预的高脂小鼠,肝脏葡萄糖-6-磷酸酶(G6P)的表达及胰高血糖素的水平均较低,肝脏糖异生作用显著降低。因此,在本实验条件下,亮氨酸补充是否通过调控肝脏和骨骼肌的葡萄糖代谢从而改善胰岛素抵抗,具体机制如何,尚待进一步深入的研究。

## 参考文献

- [1] Eckel, R. H. , A new look at dietary protein in diabetes. *Am J Clin Nutr*, 2003. 78 (4): p. 671-2.
- [2] Layman, D. K. , Walker, D. A. , Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome. *J Nutr*, 2006. 136 (1 Suppl): p. 319S-23S.
- [3] 赵剑虹, 杨柳桦, 李永新, et al. , 柱前衍生-高效液相色谱法测定大熊猫血清中18种游离氨基酸. *分析实验室*, 2007 (11): p. 15-19.
- [4] Hinault, C. , E. Van Obberghen, and I. Mothe-Satney, Role of amino acids in insulin signaling in adipocytes and their potential to decrease insulin resistance of adipose tissue. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2006. 17 (6): p. 374-378.
- [5] Cota, D. , Proulx, K. , Smith, K. A. , et al. , Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*, 2006. 312 (5775): p. 927-30.
- [6] Zhang, Y. G. , K. LeBlanc, R. E. , et al. , Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. *Diabetes*, 2007. 56 (6): p. 1647-54.
- [7] Balage, M. , Dupont, J. , Mothe-Satney, I. , et al. , Leucine supplementation in rats induced a delay in muscle IR/PI3K signaling pathway associated with overall impaired glucose tolerance. *J Nutr Biochem*, 2011. 22 (3): p. 219-26.
- [8] Zeanandin, G. B. , M. Schneider, S. M. , et al. , Differential effect of long-term leucine supplementation on skeletal muscle and adipose tissue in old rats: an insulin signaling pathway approach. *Age (Dordr)*, 2011.
- [9] Vodenik, B. , J. Rovira, and J. M. Campistol, Mammalian Target of Rapamycin and Diabetes: What Does the Current Evidence Tell Us? *Transplantation Proceedings*, 2009. 41 (6): p. S31-S38.
- [10] Martin Krssak, M. R. , The Role of Lipid Accumulation in Liver and Muscle for Insulin Resistance. *Intracellular Triglycerides and Insulin Action*, 2004. 5: p. 127-134.
- [11] 刘锐, 郝丽萍, 李想, et al. 亮氨酸对原代培养大鼠骨骼肌细胞葡萄糖摄取及胰岛素信号传导关键分子 AKT 表达的影响. 2010. 营养学报.

## 不同脂肪酸对 3T3-L1 脂肪细胞脂联素及 PPAR $\gamma$ 基因表达的影响

林杰义 张奕 罗伟 查龙应 毛丽梅

(南方医科大学公共卫生与热带医学学院营养与食品卫生学系, 广州 510515)

**摘要:**目的 用不同种类、不同浓度的脂肪酸分别处理体外培养的 3T3-L1 成熟脂肪细胞, 观察不同脂肪酸处理前后脂联素及 PPAR $\gamma$  基因 mRNA 的表达水平, 并观察其两者之间是否存在相互关系。方法 运用实时荧光定量 PCR 方法检测体外培养并诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞经一定浓度脂肪酸处理前后脂联素及 PPAR $\gamma$  基因 mRNA 的表达水平。结果 棕榈酸 (PA) 在低浓度 (25 $\mu$ mol/L) 时能明显上调脂联素及