

海带多糖对高脂血症小鼠血清瘦素水平及瘦素受体表达的影响

张进松¹, 辛 辉^{1*}, 李晓丹², 段德麟³

¹青岛大学医学院附属医院心内科, 青岛 266003; ²青岛大学医学院中西
医结合中心, 青岛 266021; ³中国科学院海洋研究所, 青岛 266071

摘要: 本实验目的在于探讨海带多糖对实验性高脂血症小鼠瘦素及其受体水平的影响及其可能的机制。将健康雄性昆明小鼠 80 只, 随机分为正常饲料组和高脂饲料组, 后组以高脂饲料喂养建立高脂血症动物模型。将建模成功的小鼠随机均衡分为高脂模型组和海带多糖治疗组, 后组以海带多糖灌胃干预。自动生化分析仪检测小鼠空腹血脂水平, ELISA 测定血清瘦素 (Leptin) 含量, 免疫组织化学法和 Western blot 检测下丘脑组织中瘦素受体 (Lep-R, OBR) 蛋白表达, RT-PCR 检测 OBR mRNA 表达。结果显示海带多糖治疗组小鼠血脂及血清 Leptin 水平较模型组显著降低 ($P < 0.05$), 下丘脑 OBR mRNA 及其蛋白表达水平较模型组显著升高 ($P < 0.05$)。说明海带多糖可以通过提高下丘脑 OBR 的水平, 改善瘦素抵抗, 从而发挥降脂作用。

关键词: 海带多糖; 高脂血症; 瘦素; 瘦素受体; 瘦素抵抗; 小鼠

中图分类号: R917; R965

文献标识码: A

Effect of *Laminaria japonica* Polysaccharide on Leptin Level in Serum and Leptin Receptor Expression in Hypothalamus of Hyperlipemia Mice

ZHANG Jin-song¹, XIN Hui^{1*}, LI Xiao-dan², DUAN De-lin³

¹Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, China;

²Institute of Integrative Medicine, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, China;

³Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: This experiment was designed to study the effects and possible mechanism of *Laminaria japonica* polysaccharide (LJPS) on leptin level in serum and leptin receptor expression in hypothalamus of hyperlipemia mice. 80 male mice were randomly divided into control group, model group, and LJPS treatment groups. The hyperlipemia model of mice were established by feeding fat-rich forage for 4 weeks and treated by LJPS orally. Lipids levels in serum were determined by automatic biochemical analyzer and leptin levels in serum were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The immunohistochemistry and western blot were used to detect the expressions of leptin receptors (OBR) proteins and RT-PCR was used to detect the expression of OBR mRNA in hypothalamus tissue. After treated with LJPS, the serum levels of lipids and leptin decreased significantly compared with those in model group ($P < 0.05$). In hypothalamus tissue, the expression levels of OBR mRNA and its protein were significantly higher than those in model group ($P < 0.05$). Hence, it was concluded that LJPS might reduce blood lipid level in hyperlipemia mice by promoting the expressions of OBR and reducing leptin resistance.

Key words: *Laminaria japonica* polysaccharide; hyperlipemia; leptin; leptin receptor; leptin resistance; mice

瘦素 (Leptin) 主要由白色脂肪组织合成和分泌, 是一种多肽类激素, 与其受体结合后可发挥调节食欲、脂质代谢的作用^[1]。研究表明^[2], 许多肥胖患者, 尤其是伴随高脂血症的肥胖患者血清瘦素水平增高, 提示存在瘦素抵抗。海带多糖主要由褐藻

胶 (algin)、褐藻糖胶 (fucoïdan)、褐藻淀粉 (1aminaran) 组成, 具有提高机体免疫力、抗衰老、抗氧化应激、抗肿瘤等多种生物学活性^[3]。研究证实^[4], 海带多糖可以降低血脂及瘦素水平, 但其作用机制尚不明确。本研究通过建立高脂血症小鼠动物模型, 应用海带多糖药物干预, 检测小鼠血清瘦素及下丘脑瘦素受体的表达水平, 探讨海带多糖对血脂水平的调节作用和可能机制。

收稿日期: 2013-11-18 接受日期: 2013-12-31

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目 (2013BAB01B00/2013BAB01B01)

* 通讯作者 E-mail: xhqy2002@163.com

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

清洁级健康雄性昆明小鼠 80 只(体质量 22 ~ 27 g),由青岛市药物检验所动物中心提供[SCXK(鲁)20110010]。适应性喂养 5 d,随机取 10 只小鼠处死取血测定正常空腹血脂水平。再随机取 20 只作为正常对照组,给予普通饲料喂养,剩余 50 只为高脂饲料组,给予高脂饲料(配比:普通饲料 59%,蔗糖 20%,猪油 10%,蛋黄粉 10%,胆酸钠 1%)喂养。4 周后随机取高脂饲料组小鼠 10 只处死测定血脂水平,以血清甘油三酯、胆固醇水平高于正常水平 2 个标准差作为高脂血症模型建立成功的标志。将造模成功的 40 只小鼠随机分为高脂模型组、海带多糖治疗组,各 20 只。

1.2 干预措施

正常对照组继续予以普通饲料喂养,高脂模型组和海带多糖治疗组改为普通饲料喂养。用生理盐水将海带多糖(中国科学院海洋研究所提供)配制成 300 mg/mL 混合液,根据前期研究^[5]所得的有效剂量(3.00 g/kg)灌胃治疗,每日 1 次,连续 2 周。对照组和模型组同步给予等量生理盐水。

1.3 指标检测

1.3.1 血脂检测

小鼠禁食 12 h 经心脏取血 1 mL 置于红头真空采血管内静置 10 min,4000 rpm 离心 10 min,分离血清,日立 7600 生化分析仪测血脂水平,剩余血清-20 °C 保存。

1.3.2 血瘦素检测

取上述血清标本,室温复溶,按瘦素(Leptin)酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(T-32203,安迪科技公司,美国)说明操作,酶标仪(BioTek 公司 ELx800 型号,美国)在 450 nm 处测定吸光度值,根据样品吸光值在标准曲线坐标上找出对应的血清 Leptin ($\mu\text{g/L}$)水平。

1.3.3 免疫组化法检测下丘脑 OBR 水平

每组随机取小鼠 5 只经心脏取血后用输液器针头刺入左心室内,剪破右心耳,NS 50 mL 冲洗,4% 多聚甲醛溶液 50 mL 灌注,取脑组织,生理盐水洗涤,4% 多聚甲醛溶液固定 2 h,蒸馏水浸泡 4 h,常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,连续 5 μm 切片,贴于多聚赖氨酸处理的载玻片上。石蜡切片脱蜡至水,按试剂盒说明书操作(兔抗小鼠 OBR 一

抗由 abcam 公司提供,免疫组化试剂盒(SP-90001,北京中杉生物公司),DAB 显色,苏木精复染,显微镜下观察细胞浆或细胞膜出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。在 400 倍光镜下随机观察 5 个不重叠的视野,Image-Pro Plus 软件分析组织 OBR 吸光度值(A),以阳性细胞 A 减去背景 A 表示 OBR 表达强度。

1.3.4 Western blot 检测 OBR 蛋白表达

每组随机取小鼠 7 只,生理盐水 50 mL 经心脏灌注后,取下丘脑组织,提取总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳分离蛋白,半干法转膜,加一抗(OBR, Ab5593, 1:2000; GAPDH, TA-08, 1:10000)、二抗(Ab6721, 1:5000)孵育,A、B 液显影,Vilber Fusion FX7 系统成像,Quantity One 软件图像分析。以目的蛋白 OBR(125kD)与内参 GAPDH(36kD)灰度值的比值表示 OBR 的相对含量。

1.3.5 RT-PCR 检测 OBR mRNA 量

剩余小鼠取下丘脑方法同上,应用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司)提取总 RNA,紫外分光光度计(K5500,北京凯奥科技公司)测 RNA 丰度。逆转录:OBR 上游引物 5'-AAC TCA ACT ACG CTC TTC TG-3',下游引物 5'-CCA TCA TCT GTG ACT TCC AT-3',产物长度 142 bps;内参 GAPDH 上游引物 5'-AAC CTG CCA AGT ATG ATG A-3',下游引物 5'-GGA GTT GCT GTT GAA GTC-3',产物长度 119 bps^[6]。扩增基因:95 °C 预变性 10 min,98 °C 变性 10 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环,72 °C 延伸 10 min(Takara DRR014A PrimeScript[®] RT-PCR Kit)。取适量扩增产物,2% 琼脂糖凝胶电泳(110V/40A)30 min,溴化乙锭染色,Vilber Lourmat 系统成像,Quantity One 软件分析 PCR 产物条带灰度值。以目的基因与内参 GAPDH 灰度值的比值表示 OBR 基因的相对丰度。

1.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD-*t* 检验。

2 实验结果

2.1 血脂(TG、TC、LDL)、血清 Leptin 水平

血脂及血清 Leptin 水平组间有显著性差异($F_{\text{TC}} = 96.80$, $F_{\text{TC}} = 115.30$, $F_{\text{LDL}} = 41.83$, $F_{\text{Leptin}} = 13.51$, $P < 0.01$),其中模型组较对照组显著升高($t_{\text{TC}} = 11.82$, $t_{\text{TC}} = 12.38$, $t_{\text{LDL}} = 7.74$, $t_{\text{Leptin}} = 5.24$, $P <$

0.01), 治疗组较模型组均显著降低($t_{TC} = 9.90, t_{TC}$ 与对照组无显著性差异($t_{TC} = 2.00, t_{TC} = 1.37, t_{LDL}$
 $= 11.80, t_{LDL} = 6.50, t_{Leptin} = 3.98, P < 0.01$), 治疗组 $= 1.11, t_{Leptin} = 1.09, P > 0.05$)。见表1。

表1 各组小鼠血脂、血清 Leptin 水平($\bar{x} \pm s, n = 15$)
 Table 1 Blood lipid and serum leptin level of different groups

分组 Group	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	LDL (mmol/L)	Leptin ($\mu\text{g/L}$)
对照组 Control group	1.33 \pm 0.15	3.30 \pm 0.21	0.22 \pm 0.05	7.06 \pm 1.41
模型组 Model group	2.44 \pm 0.33 ^a	4.51 \pm 0.32 ^a	0.46 \pm 0.11 ^a	9.41 \pm 1.01 ^a
治疗组 Treatment group	1.46 \pm 0.20 ^{bc}	3.40 \pm 0.18 ^{bc}	0.24 \pm 0.07 ^{bc}	7.62 \pm 1.41 ^{bc}

^a与对照组比较, $P < 0.01$; ^b与模型组比较, $P < 0.01$; ^c与对照组比较 $P > 0.05$ 。

^a Compared with the control group, $P < 0.01$; ^b Compared with the model group, $P < 0.01$; ^c Compared with the control group, $P > 0.05$.

2.2 免疫组织化学测得下丘脑 OBR 的表达

各组小鼠下丘脑 OBR 表达水平比较有差异($F = 170.51, P < 0.01$), 模型组表达水平较对照组显

著降低($t = 5.55, P < 0.01$), 治疗组较模型组显著升高($t = 18.03, P < 0.01$), 治疗组较对照组亦有显著性升高($t = 12.48, P < 0.01$)。见图1, 表2。

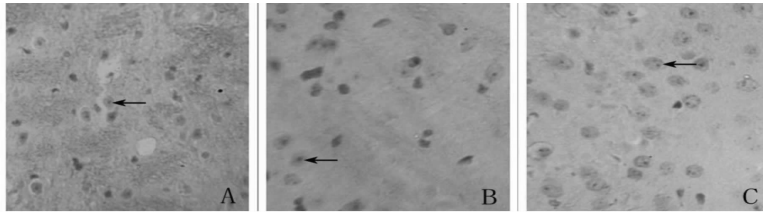


图1 对照组(A)、模型组(B)及治疗组(C)下丘脑 OBR 免疫组化染色 IH $\times 400$

Fig. 1 OBR expression in hypothalamus of control group (A), model group (B) and treatment group (C), immunohistochemical study IH $\times 400$

2.3 Western blotting 和 RT-PCR 测得下丘脑 OBR 相

对照组、模型组和治疗组小鼠下丘脑 OBR 表达水平比较有显著性差异($F_{WB} = 10.36, F_{PCR} = 15.46, P < 0.01$), 模型组表达水平较对照组显著降低(t_{WB}

$= 2.14, t_{PCR} = 2.74, P < 0.05$), 治疗组较模型组显著升高($t_{WB} = 4.59, t_{PCR} = 5.42, P < 0.01$), 治疗组较对照组亦有显著性升高($t_{WB} = 2.56, t_{PCR} = 2.90, P < 0.05$)。见图2, 表2。

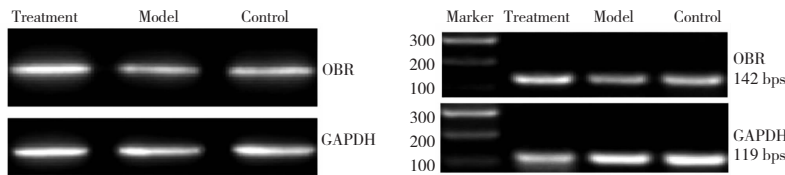


图2 各组下丘脑 OBR 相对丰度的比较(左为 WB, 右为 PCR)

Fig. 2 OBR relative expression of different groups (left for WB, right for PCR)

表2 各组小鼠免疫组化、PCR 及 WB 测得 OBR 相对丰度($\bar{x} \pm s, n_{IHC} = 5, n_{WB} = 7, n_{PCR} = 8$)

Table 2 Immunohistochemistry, PCR and WB measured OBR relative expression of different groups

分组 Group	IHC	WB	PCR
对照组 Control group	0.13 \pm 0.04	0.45 \pm 0.05	0.67 \pm 0.05
模型组 Model group	0.09 \pm 0.05 ^a	0.40 \pm 0.05 ^a	0.61 \pm 0.04 ^a
治疗组 Treatment group	0.22 \pm 0.05 ^{bc}	0.51 \pm 0.04 ^{bc}	0.75 \pm 0.06 ^{bc}

^a与对照组比较, $P < 0.05$; ^b与模型组比较, $P < 0.01$; ^c与对照组比较 $P < 0.05$ 。

^a Compared with the control group, $P < 0.05$; ^b Compared with the model group, $P < 0.01$; ^c Compared with the control group, $P < 0.05$.

3 讨论

高脂血症是指人体脂质代谢障碍导致的血浆胆固醇、甘油三酯水平的升高, 与动脉粥样硬化关系密切。高脂血症可引起机体氧化与抗氧化状态的失衡, 氧自由基产生增加, 增强脂质过氧化并破坏内皮细胞结构, 促进粥样斑块的形成^[7,8]。临床资料显示, 高脂血症患者往往伴有血清瘦素水平的升高^[2,9], 提示高脂血症患者可能存在瘦素抵抗。瘦素受体主要包含短型 OBRa 和长型 OBRb, 存在于大脑脉络丛

和血脑屏障微血管丛的 OBRa 可以调节瘦素通过血脑屏障, OBRb 主要存在于下丘脑表达神经肽 Y (NPY) 的细胞表面, 具有信号转导作用, 是执行瘦素功能的主要受体^[10]。瘦素抵抗主要涉及两种机制: 中枢性瘦素抵抗 (central leptin resistance) 和外周性瘦素抵抗 (peripheral leptin resistance), 主要发生在 3 个环节: 瘦素通过血脑屏障向脑内转运障碍 (外周性抵抗), 瘦素受体突变 (OB-Rb 突变引起中枢性抵抗, OB-Ra 等短型受体突变引起外周性抵抗), 受体后信号转导异常 (中枢性抵抗)^[11]。有实验也表明增加外周瘦素或 OB-Ra 短型受体含量有助于改善瘦素抵抗^[12,13]。

本研究表明, 高脂血症小鼠血清 Leptin 水平代偿性升高, 且未能使血脂恢复正常水平, 说明存在瘦素抵抗, 高水平的瘦素刺激下丘脑 OBR, 导致下丘脑 OBR 下调, 进一步加剧瘦素抵抗。应用海带多糖干预后, 高脂血症小鼠的 Leptin 水平下降, 下丘脑 OBR 的水平升高, 明显改善了瘦素抵抗, 并使血脂恢复至正常水平。其可能机制为: 海带多糖通过提高中枢 OBR 的水平, 一方面促进中枢 OBRa 介导的血清 Leptin 向脑脊液转移, 另一方面下丘脑 OBRb 与 Leptin 的结合量升高, 明显改善瘦素抵抗, 极大发挥了 Leptin 的生物学作用: 降低脂肪的摄入, 抑制脂肪的合成, 增加脂质的消耗^[14], 从而使血脂水平恢复正常。另外海带多糖也可能有直接降血脂作用或通过其他途径改善血脂水平, 故而关于海带多糖的降血脂作用机制有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Paz-Filho G, Mastronardi C, Franco CB, *et al.* Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2012, 56: 597-607.
- 2 Schutte AE, Huisman HW, Schutte R, *et al.* Adipokines and cardiometabolic function: How are they interlinked? *Regul Pept*, 2010, 164(2-3): 133-138.
- 3 Li X, Yu Z, Long S, *et al.* Hypoglycemic effect of *Laminaria Japonica* polysaccharide in a type 2 diabetes mellitus mouse

- model. *ISRN Endocrinology*, 2012, 3(10): 1-4.
- 4 Xin H, Tian JW, Yu ZQ, *et al.* Laminaria japonica polysaccharide reduces lipids and leptin levels in hyperlipidemic mice. *Basic Res J Med Clin Sci*, 2013, 2(2): 22-26.
- 5 Tian JW (田嘉伟), Long SH (龙少华), Li XD (李晓丹), *et al.* The Effect of Laminaria Japonica Polysaccharide on Lipids and Leptin Levels of Hyperlipemia Mice. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物杂志), 2012, 31(6): 37-40.
- 6 Lundh SH, Soylu R, Petersén A. Expression of mutant huntingtin in leptin receptor-expressing neurons does not control the metabolic and psychiatric phenotype of the BACHD mouse. *PLoS One*, 2012, 7: e51168.
- 7 Iversen A, Jensen JS, Scharling H, *et al.* Hypercholesterolemia and risk of coronary heart disease in the elderly: impact of age: the Copenhagen City Heart Study. *Eur J Intern Med*, 2009, 20(2): 139-144.
- 8 Patel SB, Reams GP, Spear RM, *et al.* Leptin: linking obesity, the metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep*, 2008, 10(2): 131-137.
- 9 van de Woestijne AP, Monajemi H, Kalkhoven E, *et al.* Adipose tissue dysfunction and hypertriglyceridemia: mechanisms and management. *Obes Rev*, 2011, 12: 829-840.
- 10 Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, *et al.* Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2002, 26: 1407-1433.
- 11 Ding WL (丁文玲), Liu CY (刘长云), Song MY (宋茂媛), *et al.* Effect of Leptin Resistance and Leptin Receptor Gene Mutation on Lipid Metabolism in Simple Obese Children. *J Appl Clin Petiatr* (实用儿科临床杂志), 2012, 27: 492-494.
- 12 Prieur X, Tung YC, Griffin JL, *et al.* Leptin regulates peripheral lipid metabolism primarily through central effects on food intake. *Endocrinology*, 2008, 149: 5432-5439.
- 13 Delgado MG, Gracia-Sancho J, Marrone G, *et al.* Leptin receptor blockade reduces intrahepatic vascular resistance and portal pressure in an experimental model of rat liver cirrhosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013, 305: G496-502.
- 14 Pilka L, Rumpík D, Pilka R. Role of leptin in human reproduction (anorexia, bulimia). *Ceska Gynekol*, 2012, 77: 484-485.