

·论著·

Leptin 对营养性肥胖大鼠摄食量 体重和血脂的影响

刘倩琦,陈荣华,郭锡溶,费莉,龚海霞

(南京医科大学第二临床医学院儿科研究所,江苏*南京 210029)

[摘要] 目的 探讨 leptin 对营养性肥胖模型的减肥、降脂作用。方法 建立高营养饮食诱导的肥胖大鼠模型,行右侧脑室内插管,每只注射重组 leptin 5 μ g,连续 5 d,测量体重、记录摄食量并测定血脂[总胆固醇(TC),三酰甘油(TG),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)]。结果 ①模型制作过程中,肥胖组大鼠体重增长较正常组明显[7周后(347 $\pm$ 44) g vs (288 $\pm$ 32) g,增重(269 $\pm$ 46) g vs (213 $\pm$ 32) g],差异有显著性($P < 0.01$)。注射 leptin 1 d后,肥胖大鼠即出现体重明显下降、摄食量减少,与注射前比较差异有显著性,5 d后尤为明显。体重(336.3 $\pm$ 52.1) g 降至(287.9 $\pm$ 53.4) g ($P < 0.01$),减少(48.4 $\pm$ 17.9) g;进食量(35.6 $\pm$ 13.7) g 降至(21.1 $\pm$ 11.8) g ($P < 0.01$),共减少(14.6 $\pm$ 4.8) g。正常对照组体重和摄食量在给药 3 d后才有所下降:体重(294.5 $\pm$ 29.9) g 降至(269.5 $\pm$ 30.9) g ($P < 0.05$),减少(25.0 $\pm$ 17.8) g;进食量(31.0 $\pm$ 3.5) g 降至(25.6 $\pm$ 3.6) g ($P < 0.05$),共减少(5.3 $\pm$ 3.3) g,但效应较迟且无肥胖组明显。两者减重量和减食量相比, $P < 0.01$ 。②肥胖 leptin 治疗组 TC,LDL-C 均明显低于肥胖对照组[(1.51 $\pm$ 0.27) mmol/L vs (2.22 $\pm$ 0.36) mmol/L,(0.47 $\pm$ 0.12) mmol/L vs (0.86 $\pm$ 0.20) mmol/L],差异有显著性($P < 0.01$);与正常对照组、正常治疗组之间差异无显著性($P > 0.05$);TG 为(0.21 $\pm$ 0.03) mmol/L,明显低于其余三组[(0.76 $\pm$ 0.17) mmol/L,(0.31 $\pm$ 0.06) mmol/L 和(0.37 $\pm$ 0.09) mmol/L],差异有显著性($P < 0.01$)。HDL-C 各组间差异无显著性。正常治疗组各血脂指标与正常对照组间无明显差异($P > 0.05$)。结论 侧脑室注射重组 leptin 对营养性肥胖大鼠有明显的抑制摄食、减轻体重、降低血脂的效应,并对正常大鼠亦能发挥一定的减重作用。

[关键词] Leptin;肥胖;大鼠;脑室内注射

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)-04-0373-04

随着人民生活水平的提高,儿童单纯性肥胖的发生率逐年升高。大多数肥胖儿童在成人后都将发展成为肥胖个体,且伴有严重的内分泌与心血管疾病^[1]。因此,实施成人期疾病在儿童早期的防治已成为世界范围的一种趋势,迫切要求研究肥胖的发病机理并期望获得有效的防治措施。1994年 Zhang 等首次分离出小鼠的肥胖基因(obese gene),leptin 是肥胖基因编码的、主要由脂肪组织分泌的一种蛋白质激素^[2]。现已知,ob/ob⁻ (obese 基因缺陷小鼠)遗传性肥胖小鼠由于存在 obese 基因某一位点的突变,使体内 leptin 缺乏而导致了肥胖的发生。

如果给 ob/ob⁻ 小鼠腹腔内连续注射 leptin 10 d,则可显著抑制其摄食量、降低体重^[3]。但是人类肥胖的基础并非 leptin 的缺乏,而是对内源性 leptin 产生了抵抗,以致不能发挥其生物学效应^[4]。因此给予外源性 leptin 对人类单纯性肥胖患者能否发挥减重、降脂作用是当前肥胖治疗的研究重点之一。本研究旨在通过建立高营养饮食诱导的肥胖模型以模拟人类肥胖,观察侧脑室注射 leptin 后,肥胖组及正常组大鼠摄食量、体重和血脂的变化,以探讨 leptin 对营养性肥胖的减肥、降脂作用,为进一步开发 leptin 的临床应用提供理论依据。

[收稿日期] 2001-01-08; [修回日期] 2001-06-30
[基金项目] 本课题为江苏省科委自然科学基金资助项目(基金号: BK99136)
[作者简介] 刘倩琦(1972-),女,博士,主治医师。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 SD 大鼠购自江苏省实验动物中心。重组 Leptin (Murine) :英国 Pepro Tech EC 有限公司产品 (批号 01976)。高营养饲料根据钱伯初的方法^[5]加以改进,即每 1 kg 含 80 %普通饲料,再加入 12 %鸡蛋(约 2 个),5 %奶粉,3 %猪油,1 ml 浓鱼肝油。普通饲料和营养饲料所供热能分别为 12.076 kJ/g 和 12.616 kJ/g,营养成分(蛋白质、脂肪、碳水化合物)构成比分别为 19.4 %,6.4 %,38.5 %和 18.1 %,10.5 %,33.7 %。不锈钢导管(外径 0.8 mm,内径 0.5 mm)由我校药理学教研室胡刚教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 肥胖模型的制备 35 只雄性 SD 大鼠,鼠龄 4~5 周,按体重随机分成两组:正常组 15 只,平均体重(75.40 ±11.38) g 和肥胖组 20 只,平均体重(72.05 ±12.53) g,分笼饲养,分别喂以普通饲料和高营养饲料,共 7 周。温度、湿度适当,自由饮水,昼夜比 12 ∶12。每周称量体重 1 次,每日饲料分 3 次供给,吃完后不再添加。7 周后,正常组和肥胖组分别再按体重随机分成正常对照组(n = 5)、正常治疗组(n = 10)和肥胖对照组(n = 5)、肥胖治疗组(n = 15)。

1.2.2 侧脑室插管和给药方法 饲养 7 周后,参照 Noble 法^[6]及大鼠脑冠状面定位图谱,正常和肥胖治疗组分别在 1 %戊巴比妥钠(50 mg/kg 鼠重)腹腔麻醉后进行右侧脑室插管。恢复 7 d 后,每日上午 10 :00 在大鼠清醒状态下从导管注入重组 Leptin 5 μl (1 μg/μl),连续 5 d,每次打药前称鼠重和剩余饲料量^[7],5 d 后处死大鼠,处死前心脏穿刺采血,分离血清。正常组与肥胖组均有大鼠由于插管和注药不当死亡,实验结束时正常组大鼠有 11 只(正常对照组 5 只,正常治疗组 6 只),肥胖组有 16 只(肥胖对照组 5 只,肥胖治疗组 11 只)。

2.2 侧脑室注射 leptin 对两组大鼠摄食量的影响
注射 leptin 后第 1 天,肥胖组大鼠摄食量即明显减少,5 d 后下降更显著(*P* <0.01);正常组大鼠摄食

1.2.3 血脂测定 酶学法测定血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL - C);根据 Friedewald 公式计算低密度脂蛋白胆固醇(LDL - C), $LDL - C = TC - (TG/5 + HDL - C)$ 。

1.3 统计学处理

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较用两样本等方差 *t* 检验和配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 模型制备中两组大鼠体重的变化

模型制备前,肥胖组及正常组大鼠体重无明显差异[(72.05 ±12.53) g vs (75.40 ±11.38) g](*P* >0.05)。喂以高营养饮食后,肥胖组大鼠体重增长明显大于正常组,2 周后两组大鼠体重之间即有显著性差异,7 周后体重分别为(342.05 ±39.27) g 和(302.87 ±31.93) g,增重(270.00 ±39.99) g 和(226.13 ±30.04) g,肥胖组体重增长较对照组明显(*P* <0.01)。见图 1。制备过程中,两组大鼠的一般状况良好,摄食、饮水无异常。

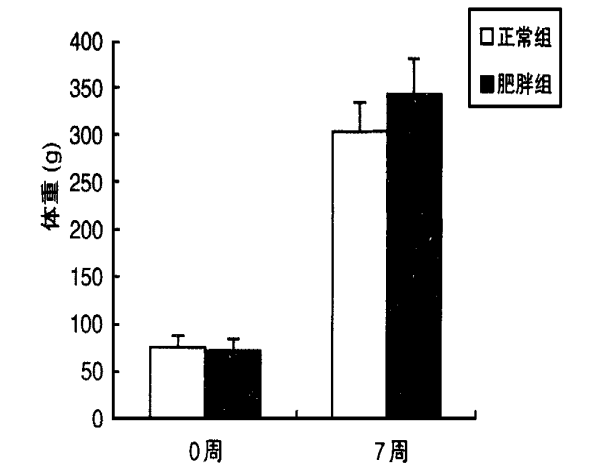


图 1 模型制备中两组大鼠体重的变化

量也随着给药次数的增多逐渐减少,第 3 天后才明显低于给药前摄食量(*P* <0.05)。正常组与肥胖组减食量相比差异有显著性(*P* <0.05)。见表 1。

表 1 两组大鼠侧脑室注射 Leptin 后摄食量的变化								($\bar{x} \pm s$, g)
组别	例数	用药前	用药后 1 d	用药后 2 d	用药后 3 d	用药后 4 d	用药后 5 d	减食量
正常组	6	31.0 ±3.5	27.3 ±5.6	28.5 ±3.5	25.2 ±4.3 ^a	25.3 ±3.4 ^a	25.6 ±3.6 ^a	25 ±17.8
肥胖组	11	35.6 ±13.7	32.8 ±13.6 ^b	30.9 ±13.5 ^b	27.3 ±13.3 ^b	23.8 ±12.3 ^b	21.1 ±11.8 ^b	48.4 ±17.9 ^c

注: a * 与用药前比较 *P* <0.05; b * 与用药前比较 *P* <0.01; c * 与正常组比较 *P* <0.05

2.3 给药后两组大鼠体重的变化

肥胖组大鼠经侧脑室注射 leptin 后 , 体重逐渐下降 , 5 d 后尤其明显 ($P < 0.01$) , 共减重 (48.4 ± 17.9) g ; 正常组大鼠体重也由于给药有

所下降 , 直至第 5 天才出现差异显著性 ($P < 0.05$) , 5 d 共减重 (25.0 ± 17.8) g 。 正常组与肥胖组减重量相比差异有显著性 ($P < 0.05$) 。 见表 2。

表 2 两组大鼠侧脑室注射 Leptin 后体重的变化 ($\bar{x} \pm s$, g)

组别	例数	用药前体重	用药后 1 d	用药后 2 d	用药后 3 d	用药后 4 d	用药后 5 d	减重量
正常组	6	294.5 ±29.9	303.0 ±31.3	300.3 ±35.4	290.3 ±39.3	289.8 ±46.2	269.5 ±30.9 ^a	25.0 ±17.8
肥胖组	11	336.3 ±52.1	329.9 ±59.8 ^a	321.8 ±57.3 ^b	309.5 ±55.2 ^b	297.9 ±56.2 ^b	287.9 ±53.4 ^b	48.4 ±17.9 ^c

注: a * "与给药前比较 $P < 0.05$; b * "与给药前比较 $P < 0.01$; c * "与正常组比较 $P < 0.05$

2.4 给药前后两组大鼠血脂的变化

肥胖 leptin 治疗组 TC , LDL - C 均明显低于肥胖对照组 ($P < 0.01$) , 与正常对照组、正常治疗组之间差异无显著性 ($P > 0.05$) ; TG 则明

显低于其余 3 组 ($P < 0.01$) 。 HDL - C 各组间差异无显著性。正常 leptin 治疗组各血脂指标与正常对照组间差异无显著性意义 ($P > 0.05$) 。 见表 3。

表 3 各组大鼠血脂的比较 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	n	TC	TG	HDL - C	LDL - C
正常对照组	5	1.54 ±0.19	0.37 ±0.09	0.97 ±0.19	0.49 ±0.21
正常治疗组	6	1.57 ±0.42	0.31 ±0.06	0.93 ±0.30	0.58 ±0.21
肥胖对照组	5	2.22 ±0.36	0.76 ±0.17	1.21 ±0.23	0.86 ±0.20
肥胖治疗组	9	1.51 ±0.27 ^a	0.21 ±0.03 ^{a,b,c}	1.00 ±0.24	0.47 ±0.08 ^a

注: a * "与肥胖对照组相比 $P < 0.01$; b 与正常对照组相比 $P < 0.01$; c * "与正常治疗组相比 $P < 0.01$

3 讨论

目前的研究已表明 leptin 具有广泛的生物学效应 , 其中较为重要的是其作为摄食反馈通路中的传入饱食信号 , 作用于下丘脑的体重调节中枢 , 引起食欲下降、能量消耗增加及促进脂肪细胞代谢 , 从而维持正常的体脂含量^[1]。 Van Heek 曾报道高脂饮食诱导的肥胖小鼠血浆 leptin 水平升高 , 脂肪组织 obese 基因 mRNA 表达增加^[9] , 与单纯性肥胖人群的报道相似^[9]。提示如此高的内源性 leptin 水平并没有发挥其降低体重和抑制摄食的作用 , 表明 leptin 抵抗可能是导致肥胖的主要原因。因此给予外源性 leptin 对人类单纯性肥胖患者能否发挥减重、降脂作用是目前肥胖治疗的研究重点之一。高营养饮食诱导的肥胖模型比遗传性肥胖模型更接近于人类肥胖模式 , 本研究即旨在通过建立高营养饮食诱导的肥胖模型以模拟人类肥胖 , 观察侧脑室注射 leptin 后 , 对肥胖大鼠及正常组摄食量、体重和血脂的影响 , 以探讨外源性 leptin 对营养性肥胖的抗肥胖作用。本实验显示 , 高营养饮食诱导的肥胖大鼠侧脑室注射外源性

重组 leptin 后 , 其体重和摄食量明显下降 , 注射第 1 天后体重及摄食量与注射前相比差异即有显著性。正常治疗组给药后 , 体重和摄食量也逐渐降低 , 但 3~5 d 后才有显著性 , 明显迟于肥胖组。

研究发现 , leptin 必须与其下丘脑内的特异性受体 (leptin receptor , OBR) 相结合 , 通过信号转导 , 调控其它基因 (如神经肽 Y , 促皮质激素释放激素等) 的表达 , 才能发挥减重作用^[10]。由此提示本实验中 , 给肥胖和正常大鼠侧脑室注射重组 leptin 后 , leptin 可能迅速进入下丘脑的内侧基底部、弓状核及附近脑区 , 与这些部位的 leptin 受体结合 , 通过信号转导 , 对该区域的神经肽 Y、促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 等相关靶基因的表达直接进行调控。 ob / ob⁻ 小鼠由于 leptin 的缺乏 , 而表现为多食、血糖增高、肥胖及弓状核神经肽 Y 水平增高 , 腹腔或脑室内给予 leptin 后 , 可使以上症状逆转 , 神经肽 Y 水平接近正常 ; 但中枢注射只需用很小的剂量即可发挥相同的抑制摄食的作用^[11]。本实验结果亦证实侧脑室内注射 leptin 可以有效地抑制高营养肥胖大鼠的摄食 , 减轻体重 , 消除 leptin 抵抗 ; 而且对正常大鼠也有一定作用 , 减重效果较肥胖组出现延迟。

推测可能是 leptin 抵抗时,OBR 各亚型表达异常,对 leptin 不敏感,而足量的 leptin 可以调控 OBR 各亚型在下丘脑的表达以及在各作用部位的分布,以充分发挥各自的功能。

本实验结果显示,高营养饮食诱导的肥胖大鼠 TC,TG,LDL - C 明显高于正常对照组,可能是由于饲料中猪油的添加致大鼠胆固醇、饱和脂肪酸摄入增加,使肝脏胆固醇、TG,VLDL 合成增加,LDL 受体合成减少、活性降低;同时肥胖组大鼠体重增加显著,亦可使全身的胆固醇合成增加,引起肝内胆固醇池扩大,因而抑制 LDL 受体的合成。经 leptin 治疗的肥胖组大鼠上述各血脂指标较肥胖对照组显著下降,与正常治疗组、正常对照组之间无明显差异。推测 leptin 不仅能明显降低高营养饲料组大鼠的体重,改善脂质代谢;另外还可以使体内胰岛素敏感性增强,消除胰岛素抵抗,从而抑制 VLDL 的合成、增加 LDL 的清除、VLDL 的降解;亦有研究表明,leptin 本身具有特异性的消除脂肪的作用。但是本实验结果显示各组大鼠 HDL 无显著性差异,此与其它报道不一致。可能由于本实验是以 HDL 中的胆固醇含量(即 HDL - C)来表示血中 HDL 水平的,不能很好的反映体内 HDL 的实际浓度。

随着对 leptin 作用机制的进一步研究,leptin 有望成为临床治疗肥胖的药物并具有广阔的应用前景。

[参 考 文 献]

[1] 李家宜. 注意在儿童时期预防成人心血管病 [J]. 中华儿科杂志,1994, 32(3): 137 - 138.

[2] Zhang YY, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [J]. Nature, 1994, 372(4): 425 - 432.

[3] Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. Weight - reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene [J]. Science, 1995, 269(28): 543 - 546.

[4] Robert VC, Madhur KS, Mark LH. Serum Immunoreactive - leptin concentration in normal - weight and obese humans [J]. N Engl J Med, 1996, 334(5): 292 - 295.

[5] 钱伯初. 肥胖动物模型的制备原理和方法 [J]. 中国药理学通报,1993, 9(1): 75 - 76.

[6] Noble CP. A single and rapid method for injecting 3H - norepinephrine into the lateral ventricle of the brain [J]. Life Sci, 1967, 6(3): 281 - 291.

[7] Cusin I, Rohner - Jeanrenand F, Stricker - Knongrod A, et al. The weight - reducing effect of an intracerebroventricular bolus injection of leptin in genetically obese fa/fa rats [J]. Diabetes, 1996, 45(10): 1446 - 1450.

[8] Van Heek M, Compton DS, France CF, et al. Diet - induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin [J]. J Clin Invest, 1997, 99(1): 385 - 390.

[9] Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N, et al. Human obese gene expression: Adipocyte - specific expression and regional differences in the adipose tissue [J]. Diabetes, 1995, 44(7): 855 - 858.

[10] White DW, Kuropatwinski KK, Devos R, et al. Leptin Receptor(OB - R) signaling [J]. J Bio Chem, 1997, 272(7): 4065 - 4071.

[11] Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, et al. The Role of Neuropeptide Y in the Antiobesity Action of the Obese Gene Product [J]. Nature, 1995, 377(12): 530 - 532.

[12] 赵水平. 临床血脂学 [M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 1997, 12 - 14.

[13] Masuzaki H, Ogawa Y, Hosoda K, et al. Augmented expression of the obese gene in adipose tissue from rats fed high - fat diet [J]. BBRC, 1995, 216(1): 355 - 358.

(本文编辑:曹励之 英文译文见本期 464 页)