

早期高脂膳食对幼鼠胰岛细胞结构和胰岛素敏感性的影响

谢坤霞 肖延凤 徐尔迪 尹春燕 易小青 常明

(西安交通大学医学院第二附属医院儿科, 陕西 西安 710004)

[摘要] 目的 研究幼年期高脂饮食对糖代谢、胰岛素敏感性和胰岛β细胞结构的影响。方法 60只雄性幼年SD大鼠随机分为高脂组 and 对照组, 分别采用高脂和普通饲料喂养。在喂养3、6、9周末, 测体重、身高, 取内脏脂肪称重; 测定空腹血糖和空腹血清胰岛素; 电镜观察胰腺超微结构变化。结果 自4周末高脂组体重显著高于对照组($P < 0.05$), 其内脏脂肪重量自3周末显著高于对照组($P < 0.05$), 均随时间延长其差异更显著($P < 0.01$); 两组空腹血糖于第3、6、9周末比较差异均无统计学意义; 高脂组空腹胰岛素水平和HOMA-IR指数均显著高于对照组($P < 0.01$); 高脂饲养6周时, 幼鼠胰岛β细胞粗面内质网扩张, 线粒体轻度肿胀。结论 生命早期高脂膳食可诱导幼鼠胰岛素敏感性下降、胰岛素抵抗; β细胞内质网扩张, 可能是肥胖损伤β细胞的早期信号。

[中国当代儿科杂志, 2010, 12(9): 740-743]

[关键词] 高脂膳食; 胰岛素敏感性; β细胞; 幼年大鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)09-0740-04

Effect of early high fat diet on pancreatic β cellularity and insulin sensibility in young rats

XIE Kun-Xia, XIAO Yan-Feng, XU Er-Di, YIN Chun-Yan, YI Xiao-Qing, CHANG Ming. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital of Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China (Xiao Y-F, Email: xiaoyan-feng0639@sina.com)

Abstract: Objective To study the effects of early high fat diet on sugar metabolism, insulin sensibility and pancreatic β cellularity in young rats. **Methods** Sixty male weaned young rats were randomly fed with high fat diet (high fat group) and normal diet (control group). The body weight, viscus fattiness and fasting plasma glucose (FPG) were measured after 3, 6 and 9 weeks. Serum insulin level was measured with radioimmunoassay. The ultrastructure of pancreas was observed under an electric microscope. **Results** The high fat group had significantly higher body weight and visceral fat weight than the control group after 3 weeks. There were no significant differences in the FPG level between the two groups at all time points. The levels of fasting insulin and HOMA-IR in the high fat group were significantly higher than those in the control group after 3, 6 and 9 weeks ($P < 0.01$). Dilation of rough endoplasmic reticulum and mild swelling of mitochondria of islet β-cells were observed in the high fat group after 6 weeks. **Conclusions** Early high fat diet may induce a reduction in insulin sensitivity and produce insulin resistance in young rats. Endoplasmic reticulum expansion in β-cells may be an early sign of β-cell damage due to obesity. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(9): 740-743]

Key words: High fat diet; Insulin sensitivity; β-cell; Young rats

流行病学资料显示,全球目前已有超过1.5亿糖尿病患者,预测到2025年患病人数将增加一倍。由现代社会生活方式导致的肥胖是2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的一个重要诱发因素。随着儿童肥胖发病率的逐年增加,这种过去一直认为仅在成年人发生的疾病也出现在青少年人群。有研究显示,25%的肥胖儿童检出糖耐量异常(impaired glucose tolerance, IGT),4%检出轻度糖尿病症状^[1]。另有资料显示6~18岁肥胖儿童、青少年中有39.4%的肥胖儿存在胰岛素抵抗^[2]。因此,肥胖发病的高危因素-高能、高脂饮食方式在T2DM发生、发展中作用成为倍受关注的热点。T2DM的发病是一个渐进过程,其中最初的变化是胰岛素抵抗与胰岛β细胞功能下降。本研究以幼年期高脂饮食的大鼠为对象,动态观察大鼠体重、体脂增加的过程中,胰岛β细胞结构和胰岛素敏感性的变化,旨在阐明幼年期高能、高脂饮食对儿童糖代谢、β细胞结构和功能的影响,揭示儿童期T2DM的发病机

[收稿日期] 2010-01-07; [修回日期] 2010-03-17
[基金项目] 国家自然科学基金(No. 30771815); 陕西省科技攻关基金(No. 2007K14-05)。
[作者简介] 谢坤霞,女,硕士,住院医师,现工作单位为延安大学附属医院儿科。
[通信作者] 肖延凤,教授。

制,为儿童肥胖、T2DM 的治疗和预防提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物饲养和模型建立

选用雄性、刚断乳的 Sprague-Dawley (SD) 清洁级大鼠 60 只,体重 60 ~ 70 g。动物适应性喂养 3 d 后,随机分成两组,各 30 只。对照组采用普通饲料喂养;高脂组采用高脂饲料喂养。各组又分为 3、6 和 9 周等亚组,每组 10 只。全部大鼠均以单笼饲养,温度 22℃,在相对湿度约 50%,和光照(8:00 ~ 21:00)的控制环境下自由饮食。高脂饲料每周加工 1 次。每周记录测量体重、体长 1 次。

普通饲料为第四军医大学实验动物中心普通清洁级动物基础饲料。高脂饲料中普通饲料占 60%,另加入猪油、花生、蔗糖、奶粉和鸡蛋占 40%。普通饲料中脂肪含量占 20.8%,高脂饲料中脂肪含量占 51.9%。

1.2 标本采集和处理

实验第 3、6、9 周末,分别将相应组的 10 只大鼠禁食 12 h,用 10% 水合氯醛(3 ~ 5 mL/kg)腹腔内注射,麻醉成功后腹主动脉抽血 3 mL,取 1mL 立即离心后测血糖;余血室温下静置 1 h,以 3 000 rpm 离心 20 min,分离血清,-20℃冰箱保存,待测胰岛素。

将胰尾部组织切成 1 mm³ 的小块,立即置于 2.5% 的戊二醛固定液中 4℃ 固定,用于电镜观察。最后剖开腹部,取出腹腔内、附睾全部脂肪垫,生理盐水冲洗干净后用滤纸吸干,电子天平上称重记录,结果精确到 0.01 g。

1.3 实验检测方法

1.3.1 血糖水平测定 运用全自动生化仪采用葡萄糖氧化法测定。

1.3.2 血清胰岛素(INS) 采用放射免疫液相竞争法,按放射免疫分析试剂盒中的使用说明,进行血清胰岛素检测。胰岛素抵抗指数(HOMA-IR) = (空腹血糖 × 空腹胰岛素)/22.5。

1.4 统计学分析

将实验数据输入计算机,采用 SPSS 10.0 统计软件处理。计量资料结果均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。计量资料经正态性检验或方差齐性检验后,两组间差异比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 两组大鼠体重和体长的比较

两组大鼠的体重随着时间的增加均逐渐增加,从 4 周末开始高脂组大鼠体重显著大于对照组;9 周末高脂组平均体重大于对照组的 19%,其中 7 只大鼠体重大于对照组 20%。两组大鼠身长差异无统计学意义(表 1)。

2.2 两组大鼠内脏脂肪重量比较

由表 2 可见,对照组大鼠的内脏脂肪重量随着时间的增长呈缓慢增加。高脂组大鼠的内脏脂肪重量增长迅速,3 周末其重量显著高于对照组(*P* < 0.05),随时间延长其差异更显著(*P* < 0.01)。

2.3 两组空腹血糖水平的比较

高脂组 3、6、9 周末空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)与对照组比较,不同时段两组比较差异均无统计学意义(表 2)。

表 1 不同时期两组大鼠体重和体长的比较 (*n* = 10, $\bar{x} \pm s$)

时间(周)	体重(g)		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	身长(cm)		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	对照组	高脂组			对照组	高脂组		
3	214 ± 19	221 ± 17	0.964	>0.05	20.51 ± 1.05	21.16 ± 0.85	0.456	>0.05
4	259 ± 19	276 ± 28	2.871	<0.05	22.50 ± 0.50	23.45 ± 0.93	1.095	>0.05
5	292 ± 23	324 ± 30	3.663	<0.01	24.54 ± 0.46	24.89 ± 0.33	1.906	>0.05
7	382 ± 21	428 ± 38	3.985	<0.01	26.12 ± 0.18	26.58 ± 0.23	1.945	>0.05
9	447 ± 28	532 ± 36	5.976	<0.01	26.95 ± 0.44	27.00 ± 0.25	0.317	>0.05

表 2 高脂组和对照组大鼠内脏脂肪重量和空腹血糖含量 (*n* = 10, $\bar{x} \pm s$)

	3 周		6 周		9 周	
	内脏脂肪(g)	FBG(mmol/L)	内脏脂肪(g)	FBG(mmol/L)	内脏脂肪(g)	FBG(mmol/L)
对照组	2.80 ± 0.11	4.89 ± 0.13	5.10 ± 0.80	4.81 ± 0.12	6.45 ± 0.76	5.03 ± 0.16
高脂组	3.57 ± 0.86	4.91 ± 0.19	9.63 ± 3.47	4.96 ± 0.57	16.17 ± 6.52	5.13 ± 0.31
<i>t</i> 值	2.876	0.277	4.020	0.815	4.683	0.538
<i>P</i> 值	<0.05	>0.05	<0.01	>0.05	<0.01	>0.05

2.4 两组空腹血清胰岛素水平和胰岛素抵抗指数的比较

由表 3 可见,随时间延长对照组空腹 INS 水平无明显波动,而高脂组 INS 水平则逐渐升高;两组比

较,3、6 和 9 周末高脂组 INS 均显著高于对照组。HOMA-IR 也随时间逐渐升高,自第 3 周末开始显著高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

2.5 胰腺组织超微结构变化

电镜下,对照组胰岛 β 细胞核圆形或卵圆形,粗面内质网丰富及核糖体丰富。腺泡细胞形态不规则,细胞核圆形,核膜下异染色质明显,核仁可见,细胞质内粗面内质网丰富,细胞顶部有许多成熟的酶

原颗粒。毛细血管腔完整,内皮细胞质内细胞器较少。高脂组第 6 周末即可见胰岛 β 细胞粗面内质网扩张,线粒体轻度肿胀。

腺泡细胞在 3 周时酶原颗粒分泌增加,6 周末腺泡细胞大量粗面内质网池样扩张,9 周腺泡细胞部分细胞核内染色质呈块状凝集、边集,形成电子密度较高的团块,出现凋亡细胞形态改变。第 9 周毛细血管腔可见较多的内皮突起。见图 1。

表 3 高脂组和对照组血清胰岛素水平和 HOMR-IR 指数 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

	3 周		6 周		9 周	
	INS(mIU/L)	HOMA-IR	INS(mIU/L)	HOMA-IR	INS(mIU/L)	HOMA-IR
对照组	10.28 $\pm$ 1.49	2.19 $\pm$ 0.13	9.76 $\pm$ 1.23	2.12 $\pm$ 0.22	9.87 $\pm$ 1.11	2.20 $\pm$ 0.19
高脂组	16.35 $\pm$ 1.77	3.57 $\pm$ 1.03	22.42 $\pm$ 2.46	4.94 $\pm$ 1.86	34.25 $\pm$ 3.32	7.81 $\pm$ 1.01
<i>t</i> 值	9.067	4.183	14.528	4.183	21.944	17.108
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

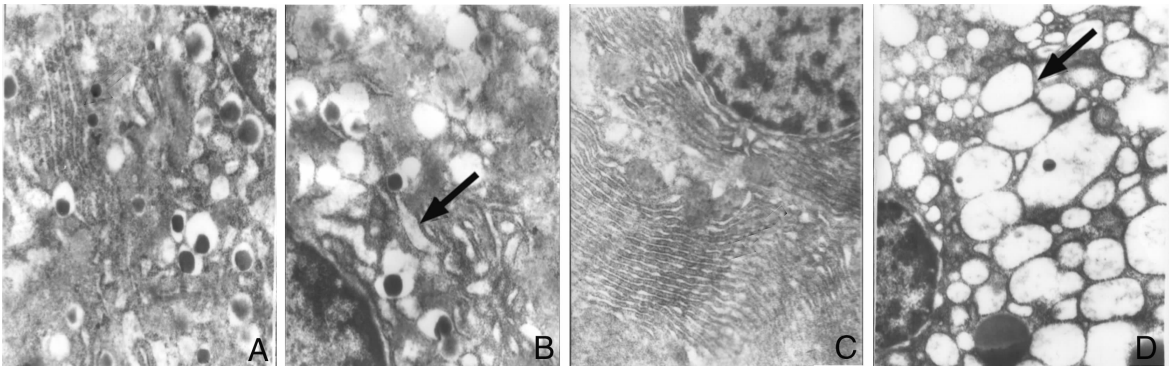


图 1 两组第 6 周胰腺 β 细胞和腺泡细胞内网质结构比较 A、B 分别为对照组及高脂组 β 细胞的内质网结构 ($\times 20\,000$);C、D 分别为对照组及高脂组腺泡细胞的内质网结构($\times 15\,000$)。高脂组可见内质网扩张(箭头所示)。

3 讨论

近年流行病学和动物实验研究表明,生命早期营养状况对成年期肥胖、冠心病等慢性疾病的发生有重要影响。早期营养对成年肥胖的影响最早、最具学术影响资料来自对暴露于 1944 ~ 1945 年荷兰饥荒人群进行的回顾性流行病学研究。该研究发现一些孕妇在妊娠期间因暴露于饥荒而发生营养不良,使其后代出生时身材矮小,成年时发生肥胖和葡萄糖不耐受的危险增加^[3]。为了研究幼年期摄入高脂膳食对机体脂肪堆积以及糖代谢及调节的影响,以揭示 T2DM 的发病机制,本研究用脂肪高于常规 30% 的饲料喂养 SD 幼鼠。结果显示,从 4 周末开始高脂组大鼠体重显著高于对照组;9 周末高脂组中有 7 只大鼠体重超出对照组者 20%,达到肥胖标准。伴随高脂组体重的显著增加,大鼠内脏脂肪明显堆积。在第 3 周末两组大鼠体重差异尚不显著

时,高脂组内脏脂肪重量已经显著高于对照组,表明高脂饲料喂养幼鼠内脏脂肪蓄积出现更早,表现为腹型肥胖。已有研究资料显示,体内脂肪过多,特别是腹部脂肪蓄积同胰岛素抵抗综合征的发生具有更高的相关性^[4]。Pietilainen 等^[5] 通过对 19 对 24 ~ 27 岁、BMI 在 20.0 ~ 33.9 kg/m² 的单卵双生子的研究发现,独立于遗传因素以外,获得性肥胖症与腹部内脏脂肪含量、肝脏脂肪含量和胰岛素抵抗 (Insulin resistance) 呈正相关。本研究提示,幼年期高脂饮食结构可导致腹部、内脏过早的堆积大量脂肪,这是引起胰岛素抵抗的重要危险因子之一。

当血糖含量升高时,可刺激胰岛 β 细胞增强分泌胰岛素,进而维持血糖水平的稳定。在胰岛素抵抗时,机体对胰岛素的敏感性下降,为了保持血糖正常,胰岛素呈代偿性持续性高分泌状态;当胰岛素分泌最终不能满足需要时,血糖则高于正常,临床表现糖尿病。本研究在高脂喂养导致幼鼠逐渐肥胖、内脏脂肪堆积日趋显著的过程中,检测了空腹血糖和

胰岛素的变化。结果显示,两组大鼠血糖水平保持平稳,随时间延长无明显波动,两组血糖在3、6和9周末比较差异均无统计学意义。但胰岛素水平随时间延续明显持续性上升,高脂组血清胰岛素在3、6和9周末均显著高于对照组。进一步采用稳态模型的HOMA-IR评估胰岛素抵抗状态。结果显示,HOMA-IR随时间延长逐渐升高,自第3周末开始显著高于对照组。随着高脂饮食时间的延长,幼鼠保持空腹血糖正常需要不断增加胰岛素的分泌,表明机体对胰岛素的敏感性下降,出现胰岛素抵抗。

较多研究表明,肥胖与T2DM密切相关,腹型肥胖患者HOMA-IR增高,表现胰岛素抵抗^[6-7]。肥胖特别是腹型肥胖引起胰岛素抵抗的机制是目前备受关注的热点课题。已有研究发现肥胖者脂肪组织分泌TNF- α 、IL-6、瘦素、抵抗素、脂联素等与胰岛素抵抗密切相关^[8]。本研究结果提示,生命早期的饮食结构对机体的代谢有重要的影响,高脂膳食可诱导胰岛素敏感性下降、胰岛素抵抗,成为肥胖儿童T2DM重要病理基础。

胰岛素抵抗与 β 细胞功能障碍是导致T2DM发生的2个关键。在胰岛素抵抗早期,为了补偿外周胰岛素敏感性下降,机体主要通过提高 β 细胞质量来增加胰岛素分泌。由于此时增加的胰岛素可以补偿胰岛素抵抗,当功能性 β 细胞不足时发生糖尿病^[9]。T2DM患者胰岛解剖显示, β 细胞凋亡增加, β 细胞质量约减少50%~65%,并出现胰岛淀粉样变性^[10]。在糖尿病动物观察到高浓度葡萄糖能诱导的 β 细胞凋亡^[11]。 β 细胞体外培养于高浓度游离脂肪酸(FFA)和高浓度葡萄糖,均引起胰岛 β 细胞凋亡增加^[12]。

本研究采用高脂喂养幼年大鼠,以电镜观察胰腺组织中腺泡细胞和 β 细胞的形态,研究早期高脂膳食摄入对胰腺 β 细胞和腺泡的影响。在高脂喂养3周时,腺泡细胞外分泌部腺泡细胞可见酶原颗粒代偿性增加,随着时间的延长,外分泌部腺泡细胞可见内质网扩张,腺泡细胞出现核凋亡现象。在高脂喂养6周后, β 细胞表现为线粒体肿胀,内质网扩张。内质网是细胞内修饰、折叠分泌性蛋白质和膜蛋白的一个重要胞器,在细胞面对压力时也扮演了一个关键的反应角色。当过多的内质网应激(ER stress)存在时,就会引发细胞死亡。 β 细胞具有高度发达的内质网,承担合成、分泌大量的胰岛素的功能,因此,易受损于内质网应激^[13]。目前研究认为,内质网压力可能在血糖、血脂、游离脂肪酸和淀粉样多肽^[14]诱导 β 细胞凋亡中起重要介导作用。长期

内质网应激可能导致活性氧产生和积累,通过氧化蛋白质折叠^[15]可以介导 β 细胞凋亡。本研究观察到幼年高脂饮食时, β 细胞首先表现为内质网扩张,这可能是肥胖损伤 β 细胞的早期改变。随着高脂饮食的持续,可能加重 β 细胞的损害和功能障碍,最终引起T2DM发病。

[参 考 文 献]

- [1] Sinha R, Fisch G, Teague B, Tamborlane WV, Banyas B, Allen K, et al. Prevalence of impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity[J]. *N Engl J Med*, 2002, 364 (11): 802-810.
- [2] Caceres M, Teran CG, Rodriguez S, Medina M. Prevalence of insulin resistance and its association with metabolic syndrome criteria among Bolivian children and adolescents with obesity[J]. *BMC Pediatrics*, 2008, 8(12): 31-36.
- [3] 龚清海, 张晓宏. 早期营养对肥胖的程序性影响研究进展[J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 11(2): 155-158.
- [4] Miyazaki Y, Glass L, Triplitt C, Wajsborg E, Mandarino LJ, DeFronzo RA. Abdominal fat distribution and peripheral and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus[J]. *Pediatr Endocrinol Metab*, 2002, 283(6): 1135-1143.
- [5] Pietiläinen KH, Rissanen A, Kaprio J, Mäkimattila S, Häkkinen AM, Westerbacka J, et al. Acquired obesity is associated with increased liver fat, intra-abdominal fat, and insulin resistance in young adult monozygotic twins[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288(4): E768-774.
- [6] 刘军, 查英, 盛励, 陈灶萍, 陈钦达, 廖晓寰, 等. 腹型肥胖患者胰岛 β 细胞功能和胰岛素敏感性的变化[J]. *复旦学报(医学版)*, 2006, 33(3): 393-396.
- [7] Hayashi T, Boyko EJ, Leonetti DL, McNeely MJ, Newell-Morris L, Kahn SE, et al. Visceral adiposity and the risk of impaired glucose tolerance: a prospective study among Japanese Americans[J]. *Diabetes Care*, 2003, 26 (3): 650-655.
- [8] Stepan CM, Lazar MA. Resistin and obesity-associated insulin resistance[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2002, 13(1): 18-23.
- [9] 刘瑞, 李益明, 王庆华. 胰岛 β 细胞质量下降在糖尿病发展中的作用[J]. *国际内科学杂志*, 2008, 35(5): 265-268.
- [10] Matveyenko AV, Butler PC. Beta-cell deficit due to increased apoptosis in the human islet amyloid polypeptide transgenic (HIP) rat recapitulates the metabolic defects present in type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2006, 55(7): 2106-2114.
- [11] Thomas HE, McKenzie MD, Angsted E, Campbell PD, Kay TW. Beta cell apoptosis in diabetes[J]. *Apoptosis*, 2009, 14 (12): 1389-1404.
- [12] Piro S, Anello M, Di Pietro C, Lizzio MN, Patanè G, Rabuazzo AM, et al. Chronic exposure to free fatty acid or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress[J]. *Metabolism*, 2002, 51(10): 1340-1347.
- [13] Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus[J]. *Endocr Rev*, 2008, 29(1): 42-61.
- [14] Scheuner D, Kaufman RJ. The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes[J]. *Endocr Rev*, 2008, 29(3): 317-333.
- [15] Haynes CM, Titus EA, Cooper AA. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death[J]. *Mol Cell*, 2004, 15(5): 767-776.

(本文编辑: 黄 榕)