

·论著·

无花果叶提取物改善慢性宫内缺氧子代大鼠骨骼肌脂质代谢

丁小明, 程晶¹, 黄丹丹², 游剑虹³

(泉州医学高等专科学校基础医学部人体解剖教研室, 福建泉州 362010)

【摘要】 目的 探讨无花果叶提取物(FCLE)对慢性宫内缺氧成年子鼠骨骼肌脂质代谢的影响,及其潜在分子机制。方法 随机将 24 只 SD 孕鼠分为常氧组、缺氧组及给药组,分别进行慢性宫内缺氧干预及子鼠出生后 8 周 FCLE 灌胃治疗。比色法检测血液学指标、骨骼肌脂肪含量、氧化状态以及 RT-PCR 法检测骨骼肌脂质代谢相关蛋白表达。结果 与常氧组相比,缺氧组子鼠血脂水平升高,出现胰岛素抵抗且骨骼肌脂质含量明显增多[分别为 $(42.3 \pm 5.5) \mu\text{mol/g}$ 、 $(59.9 \pm 6.4) \mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$];脂联素、脂联素受体 1(AdipoR1)及过氧化物酶体增殖激活受体 γ (PPAR γ)表达降低,乙酰辅酶 A 羧化酶 2(ACC2)表达明显上调($P < 0.05$);FCLE 干预后,血脂异常、胰岛素敏感性及骨骼肌脂质异位沉积均得到改善,脂联素、AdipoR1(给药组和缺氧组分别为 0.61 ± 0.10 和 0.22 ± 0.07 , $P < 0.05$)及 PPAR γ 表达上调,而 ACC2 表达降低(给药组和缺氧组分别为 0.49 ± 0.09 和 0.95 ± 0.14 , $P < 0.05$)。结论 FCLE 改善慢性宫内缺氧子鼠高脂血症、胰岛素抵抗及骨骼肌脂质沉淀;脂联素-AdipoR1-PPAR γ -ACC 信号通路可能是潜在的分子机制。

【关键词】 无花果; 慢性宫内缺氧; 大鼠; 胎儿编程; 脂质代谢; 腺苷酸活化蛋白激酶

Ficus carica leaves extract improve lipid metabolism in skeletal muscle of offspring rat with chronic intrauterine hypoxia

DING Xiao-ming, CHENG Jing, HUANG Dan-dan, YOU Jian-hong. Department of Anatomy, School of Basic Medicine, Quanzhou Medical college, Quanzhou, Fujian 362011, China

Corresponding author: YOU Jian-hong, E-mail: 30391244@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of *ficus carica* leaves extract(FCLE) on fat metabolism in skeletal muscle of adult offspring rats with chronic intrauterine hypoxia, and its underlying molecular mechanisms. **Methods** 24 pregnant SD rats were randomly divided into normal oxygen group, hypoxia group and treatment group with intervention of chronic intrauterine hypoxia and 8-week FCLE ig treatment respectively. Colorimetric assay for hematology, muscular content, oxidation state, and real-time PCR method for detecting lipid metabolism related protein expression in skeletal muscle. **Results** Compared with normoxic group, hypoxia group rats increased lipid level, insulin resistance and skeletal muscle fat ectopic deposition [$(59.9 \pm 6.4) \mu\text{mol/g}$ vs $(42.3 \pm 5.5) \mu\text{mol/g}$, $P < (0.05)$ obviously. Adiponectin, adiponectin receptor 1 (AdipoR1) and the PPAR gamma (PPAR γ) expression reduced, acetyl-coa carboxylase2(ACC2) expression obviously raised($P < 0.05$); the disturbance of lipid metabolism was reversed after FCLE intervention by upregulating adiponectin, AdipoR1 (0.61 ± 0.10 and 0.22 ± 0.07 in treatment group and hypoxia group, respectively, $P < 0.05$) and PPAR γ expression and inhibiting ACC2 expression (0.49 ± 0.09 and 0.95 ± 0.14 in treatment group and hypoxia group, respectively, $P < 0.05$). **Conclusion** FCLE attenuated hyperlipemia, insulin resistance and skeletal muscle lipid deposition in chronic intrauterine hypoxia offspring rats. Adiponectin - AdipoR1-PPAR γ -ACC signaling pathway may be the potential molecular mechanism.

【Key words】 Ficus carica; Chronic intrauterine hypoxia; Rat; Fetal programming; Lipid metabolism; AMP-activated protein kinase(AMPK)

基金项目:国家自然科学基金(81271587)

1. 泉州医学高等专科学校实验室, 福建 泉州 362010
2. 福建医科大学附属第二医院药剂科, 福建 泉州 362000
3. 厦门大学附属中山医院超声医学科, 福建 厦门 361000

通信作者: 游剑虹, E-mail: 30391244@qq.com

胎儿宫内窘迫是成年期罹患多种慢性代谢性疾病的主要风险因素^[1-2]。研究表明,出生后环境因素对慢性宫内缺氧引起的宫内代谢适应具有再编程作用^[3]。鉴于无花果叶提取物(*Ficus carica* leaves extract, FCLE)显著的抗氧化、调血脂作

用^[4-5],本研究拟采用慢性宫内缺氧大鼠模型,探讨 FCLE 对子代大鼠骨骼肌脂肪代谢的影响及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

FCLE(西安天瑞生物技术有限公司)、S-450 型氧气检测仪(美国 IST-AIM 公司)、全自动生化分析仪(德国 Beckman 公司)、GC-1200 放射免疫计数器(中国科大中佳公司)、QiagenOneStep RT-PCR Kit(德国 Qiagen 公司)、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(日本 Toyobo 公司)等。引物由上海英潍捷基公司合成并 HAP 纯化。

1.2 动物模型建立及分组

8 周龄清洁级 SD 孕鼠 24 只,于泉州医学高等专科学校实验动物中心饲养。完全随机分为常氧组、缺氧组以及给药组,每组各 8 只。参照本课题组前期实验^[6],于孕 7~21 d 将实验组投入氧体积分数维持在(100±10)mL/L 的密闭缺氧箱,行慢性宫内缺氧处理,每天 3 h,直至分娩。对照组孕鼠置于持续通入空气的有机玻璃箱,余条件同前。分娩后,为保证奶水充足,每窝随机留取 2 只雄鼠继续饲养。母乳喂养 28 d 后即断奶,给药组给予连续 8 周无花果叶提取物 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,常氧组、缺氧组均灌胃等量蒸馏水,自由摄食饮水,保持昼夜节律。

1.3 方法

1.3.1 空腹血糖、胰岛素和血脂检测 干预完成后,随机抽取 3 月龄子鼠每组 8 只,禁食 12 h。2% 戊巴比妥钠(3 mL/100 g)腹腔内注射麻醉。心脏采血 6 mL,常规制备血清标本,检测血糖、血脂等;放射免疫法检测空腹血清胰岛素。稳态模型计算胰岛素抵抗指数 IRI,IRI=(空腹血糖×血清胰岛素)/22.5,取其自然对数。

1.3.2 组织氧化/抗氧化水平及甘油三酯浓度检

测 留取大鼠股外侧肌组织标本,生理盐水漂洗擦干后液氮转-80℃冻存。50~100 mg 肌组织,1:9 加入提取液,钢珠研磨制备 10%匀浆待测液,4℃ 12 000×g 离心 10 min,取上清进行样品前处理;按照试剂盒操作说明制备工作液,混匀于 96 孔板上样混匀,置入酶标仪测定吸光度,计算组织柠檬酸合酶(citrate synthase, CS)、过氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量以及组织甘油三酯浓度等。

1.3.3 骨骼肌脂质代谢相关蛋白表达检测 将 50~100 mg 骨骼肌组织加入 Trizol 试剂,钢珠研磨充分,用 Trizol-氯仿提取组织总 RNA,紫外分光光度计测量 A₂₆₀/A₂₈₀,计算样品 RNA 浓度,按以下参数进行逆转录反应:37℃ 30 min 逆转录,98℃ 5 min 酶失活,4℃ 冷却;取逆转录产物 cDNA 2 μL 于 96 孔板混样后上机,行实时定量 PCR 反应(SYBR Green 法),参数设置如下:预变性 95℃ 30 s,变性 95℃ 5 s,退火 58℃ 10 s,延伸 72℃ 15 s,共 40 个循环,然后收集荧光,以 β-actin 为内参,通过 2^{-ΔΔCt} 法计算 mRNA 的相对表达量。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多个样本均数比较用单因素方差分析(One-way ANOVA),多个样本均数间的两两比较用最小显著差法(LSD), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FLLE 对慢性宫内缺氧子鼠血糖、血脂和胰岛素抵抗水平的影响

慢性宫内缺氧干预后,子代雄鼠成年期空腹血糖及胰岛素水平未见明显差异,血脂水平明显升高(TG、FFA)且出现胰岛素抵抗。而持续 8 周 FCLE 给药能够明显改善缺氧组血脂异常及胰岛素抵抗状态($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 各组大鼠一般血源性指标 ($\bar{x}\pm s$)

	<i>n</i>	常氧组	缺氧组	给药组
血糖(mmol/L)	8	3.89±0.65	4.02±0.43	4.04±0.34
游离脂肪酸(mmol/L)	8	216±135.4	358±94.7*	197±80.1*
甘油三酯(mmol/L)	8	0.42±0.20	0.74±0.38*	0.38±0.17*
胰岛素抵抗指数	8	1.23±0.11	1.76±0.21*	1.35±0.19*

注:*与常氧组比, $P < 0.05$; *与缺氧组比, $P < 0.05$

2.2 FCLE 对慢性宫内缺氧子鼠组织氧化/抗氧化水平及甘油三酯浓度的影响

慢性宫内缺氧干预后,子代雄鼠成年期股外侧肌组织氧化/抗氧化水平未见明显差异,甘油三

酯水平明显增高。持续 8 周 FCLE 给药能够上调超氧化物歧化酶活性并降低丙二醛含量。肌组织甘油三酯水平,持续 FCLE 给药后明显下降($P < 0.05$)(表 2)。

表 2 各组大鼠肌组织氧化/抗氧化水平及甘油三酯浓度 ($\bar{x} \pm s$)

	<i>n</i>	常氧组	缺氧组	给药组
柠檬酸合酶 (U/mg)	8	162.3±24.5	155.0±38.1	171.1±37.5
丙二醛 (nmol/mg)	8	1.6±0.4	1.5±0.6	1.5±0.6
超氧化物歧化酶 (U/mg)	8	28.1±9.7	27.8±7.3	35.7±6.9*
甘油三酯 ($\mu\text{mol/g}$)	8	42.3±5.5	59.9±6.4*	37.6±4.7*

注: *与常氧组比, $P < 0.05$; #与缺氧组比, $P < 0.05$

2.3 FCLE 对慢性宫内缺氧子鼠骨骼肌脂质代谢相关蛋白表达的影响

与常氧组相比,缺氧组成年大鼠股外侧肌组织脂联素、脂联素受体 1 (adiponectin receptor 1, AdipoR1) 及过氧化物酶体增殖激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ) mRNA 表达水平明显下调,乙酰辅酶 A 羧化酶 2 (acetyl-coa carboxylase 2, ACC2) 表达上调。FCLE 干预后可以有效逆转脂联素、AdipoR1 (给药组缺氧组分别为 0.61 ± 0.10 和 0.22 ± 0.07) 以及 ACC2 (给药组缺氧组分别为 0.49 ± 0.09 和 0.95 ± 0.14) 表达改变 ($P < 0.05$)(图 1)。

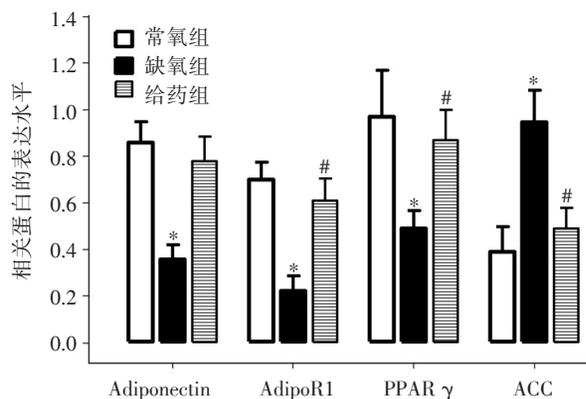


图 1 FCLE 改善慢性宫内缺氧子代大鼠骨骼肌脂质代谢相关蛋白表达 *与常氧组比, $P < 0.05$; #与缺氧组比, $P < 0.05$

3 讨论

自从 1995 年“成人疾病胎儿起源”学说提出以来,实验室研究已经证实非酒精性脂肪肝、糖脂代谢异常、动脉粥样硬化等都可能存在慢性缺

氧相关的宫内编程^[2,6-7]。脂质代谢异常可能是编程最直接的结果之一,已有研究报道了慢性宫内缺氧可以引起子代大鼠成年期出现高血脂、胰岛素抵抗的病理改变^[3]。本研究再次验证了慢性宫内缺氧引起子鼠成年期高血脂以及胰岛素抵抗效应,与此同时,还发现慢性宫内缺氧干预后骨骼肌甘油三酯水平呈明显上调。骨骼肌作为外周胰岛素作用最重要的靶器官之一,大量的脂质异位沉积可以引起局部和系统的脂毒性损伤,出现胰岛素作用受损^[8]。Dunlop 等^[9]综述了缺氧等宫内环境能够影响骨骼肌正常的营养代谢,引起骨骼肌内脂肪沉积和线粒体功能缺陷,脂肪酸 β -氧化障碍,PKC- θ 激活,介导丝氨酸/苏氨酸磷酸化异常,最终发展为成年后的胰岛素抵抗等慢性代谢性疾病。

本研究首次在慢性宫内缺氧子代大鼠模型中研究发现,连续 8 周 FCLE 干预能显著改善血脂异常、胰岛素抵抗状态,降低股四头肌甘油三酯含量。无花果叶富含黄酮类化合物,后者是一类具有广泛药理活性的天然多酚类化合物,抗炎、抗氧化活性显著,在缺血再灌注损伤及炎症等领域均有应用^[10]。Stalin 等^[11]在四氧嘧啶诱导的胰岛素缺陷型糖尿病大鼠模型上证实无花果具有抗糖尿病属性。在高脂饮食诱导的高脂血症大鼠模型上,Joerin 等^[5]研究发现 6 周的 FCLE 干预可以明显下调血清甘油三酯以及 IL6 水平,上调高密度脂蛋白表达,因此认为 FCLE 是有效的血脂调节剂。一项利用黄酮类化合物前体分子查耳酮的干预实验发现,6 周的查耳酮补充治疗可以明显下调高胆固醇饮食小鼠脂联素的表达,同时改善肝脏脂质异位沉积效应^[12]。

尽管不少研究证明 FCLE 具有降糖调脂活性,但少有研究分析其潜在分子机制,本研究检测了脂质代谢相关信号分子,发现 FCLE 给药可以逆转慢性宫内缺氧引起脂联素/AdipoR1 蛋白表达下调的效应,同时下调 ACC 蛋白表达。与本研究类似,在肥胖模型中,研究人员发现脂联素及 AdipoR1 蛋白表达减少,脂联素敏感性下降,出现胰岛素抵抗^[13]。Yamauchi 等^[14]在骨骼肌以及肝脏研究中均证实 AdipoR1 可以提高腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)酶活性,促进骨骼肌葡萄糖摄入及脂肪酸 β 氧化,具有胰岛素增敏作用。ACC 是脂肪酸合成重要的限速酶,Gao 等^[15]同样高脂饮食肥胖症肌细胞体外培养中发现,酸藤子(富含多酚类化合物)治疗可以下调 PPAR γ 以及脂肪合成酶、ACC、硬脂酰辅酶 A 脱氢酶 1(stearoyl-CoA desaturase1, SCD1)表达,从而改善脂肪沉积及胰岛素抵抗。

此外,本研究中成年子鼠骨骼肌氧化/抗氧化平衡未见异常,这一结果与 You 等^[3]研究相符,可能在于骨骼肌具有极强的代偿功能。由于报道指出 FCLE 具有突出的抗氧化调节作用^[4],因此对慢性宫内缺氧子鼠肝脏、血管及颅脑的抗氧化调节作用还需要进一步研究支持。

综上所述,本研究显示慢性宫内缺氧可以引起子代大鼠成年期高血脂、胰岛素抵抗以及骨骼肌脂质沉积,而 FCLE 干预可以改善子代大鼠脂质代谢紊乱;脂联素/AdipoR1-PPAR γ -ACC 信号通路可能是 FCLE 调节骨骼肌脂质代谢的潜在分子机制。FLLE 对慢性宫内缺氧子鼠其他器官的抗氧化调节作用值得进一步研究。

参 考 文 献

- Gatford KL, Simmons RA. Prenatal programming of insulin secretion in intrauterine growth restriction[J]. Clin Obstet Gynecol, 2013, 56(3):520-528.
- Su YM, Lv GR, Xie JX, et al. Maternal hypoxia increases the susceptibility of adult rat male offspring to high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease[J]. Endocrinology, 2013, 154(11):4377-4387.
- You JH, Zhuang YF, Cheng J, et al. Juvenile activity levels affect predisposition to metabolic syndrome induced by maternal hypoxia in male offspring rats[J]. Int J Clin Exp Med, 2016, 9(2):1422-1434.
- Stephen Irudayaraj S, Christudas S, Antony S, et al. Protective effects of Ficus carica leaves on glucose and lipids levels, carbohydrate metabolism enzymes and β -cells in type 2 diabetic rats[J]. Pharm Biol, 2017, 55(1):1074-1081.
- Joerin L, Kauschka M, Bonnländer B, et al. Ficus carica leaf extract modulates the lipid profile of rats fed with a high-fat diet through an increase of HDL-C[J]. Phytother Res, 2014, 28(2):261-267.
- Wang Z, Huang Z, Lu G, et al. Hypoxia during pregnancy in rats leads to early morphological changes of atherosclerosis in adult offspring[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 296(5):H1321-1328.
- You JH, Su YM, Zhuang YF, et al. Metabolic programming from neonate to adulthood in rats with maternal hypoxia[J]. Int J Clin Exp Med, 2016, 9(2):2921-2928.
- Malhi H, Gores GJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Semin Liver Dis, 2008, 28(4):360-369.
- Dunlop K, Cedrone M, Staples JF, et al. Altered fetal skeletal muscle nutrient metabolism following an adverse in utero environment and the modulation of later life insulin sensitivity[J]. Nutrients, 2015, 7(2):1202-1216.
- Allahyari S, Delazar A, Najafi M. Evaluation of general toxicity, anti-oxidant activity and effects of ficus carica leaves extract on ischemia/reperfusion injuries in isolated heart of rat[J]. Adv Pharm Bull, 2014, 4(Suppl 2):577-582.
- Stalin C, Dineshkumar P, Nithiyannathan K. Evaluation of antidiabetic activity of methanolic leaf extract of Ficus carica in alloxan induced diabetic rats[J]. Asian J Pharm Clin Res, 2012, 5:85-87.
- Karkhaneh L, Yaghmaei P, Parivar K, et al. Effect of trans-chalcone on atheroma plaque formation, liver fibrosis and adiponectin gene expression in cholesterol-fed NMRI mice[J]. Pharmacol Rep, 2016, 68(4):720-727.
- Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, et al. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 α and mitochondria by Ca²⁺ and AMPK/SIRT1[J]. Nature, 2010, 464(7293):1313-1319.
- Yamauchi T, Kadowaki T. Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases[J]. Cell Metab, 2013, 17(2):185-196.
- Gao Y, Li J, Xu X, et al. Embelin attenuates adipogenesis and lipogenesis through activating canonical Wnt signaling and inhibits high-fat diet-induced obesity[J]. Int J Obes (Lond), 2017 Feb 6.

(收稿日期:2017-05-18)