

# 限制性摄食对小鼠血中 $\beta$ 羟丁酸水平及 大脑皮质脂蛋白脂酶表达的影响

李心蕙<sup>1</sup>, 詹志鹏<sup>1,2</sup>, 张静竹<sup>1</sup>, 任亚浩<sup>1</sup>, 赵越<sup>1</sup>, 安丽<sup>1</sup>

1. 中国医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室, 辽宁 沈阳 110122;

2. 锦州医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室

**摘要:** **目的** 探讨限制性摄食对小鼠血中  $\beta$  羟丁酸 ( $\beta$ -hydroxybutyrate,  $\beta$ OHB) 水平及大脑皮质脂蛋白脂酶 (lipoprotein lipase, LPL) 表达的影响。 **方法** 50 只健康成年 C57BL/6J 小鼠按体重随机分为 5 组, 每组 10 只, 分别于禁食 0、8、12、16 h 和 24 h 后采血, 采用 ELISA 法测定  $\beta$ OHB 的水平。另取 20 只小鼠按体重随机分为禁食组 and 对照组, 每组 10 只, 禁食组小鼠采用隔日禁食的方式连续处理 4 周, 对照组小鼠自由摄食, 实验末期称重并分析体脂比 (体脂肪含量占体重的百分比), 再分别采用 Real-time RT-PCR 法和 Western blot 法检测大脑皮质 LPL mRNA 及其蛋白表达水平。 **结果** 小鼠血中  $\beta$ OHB 水平随着禁食时间的延长而逐渐升高, 禁食 0、8、12、16 和 24 h 后的小鼠血中  $\beta$ OHB 水平 (mmol/L) 分别为  $(0.93 \pm 0.13)$ 、 $(0.95 \pm 0.37)$ 、 $(1.33 \pm 0.26)$ 、 $(1.68 \pm 0.13)$ 、 $(1.74 \pm 0.27)$ ; 与禁食 0 h 比较, 禁食 12、16 及 24 h 的小鼠血中  $\beta$ OHB 水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ); 禁食 16 h 和 24 h 的小鼠血中  $\beta$ OHB 水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但二者均明显高于禁食 12 h 的小鼠血中  $\beta$ OHB 水平 ( $P < 0.05$ )。在整个实验期间隔日禁食组及对照组小鼠均未见异常表现, 两组小鼠体重及体脂肪含量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。隔日禁食组小鼠大脑皮质 LPL mRNA 水平及蛋白表达均高于对照组 ( $P < 0.01$ ;  $P < 0.05$ )。 **结论** 禁食 12~24 h 的小鼠血中  $\beta$ OHB 水平明显升高; 隔日禁食处理 4 周可上调小鼠大脑皮质 LPL mRNA 及其蛋白表达水平。

**关键词:** 限制性摄食;  $\beta$  羟丁酸; 脂蛋白脂酶

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2017)04-0411-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.04.009

## Effect of restricted feeding on serum beta-hydroxybutyrate level and lipoprotein lipase expression in cerebral cortex in mice

LI Xin-hui\*, ZHAN Zhi-peng, ZHANG Jing-zhu, REN Ya-hao, ZHAO Yue, AN Li

\* Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110122, China

Corresponding author: AN Li, E-mail: anli@cmu.edu.cn

**Abstract:** **Objective** To explore the effect of restricted feeding on the serum beta-hydroxybutyrate ( $\beta$ OHB) level and lipoprotein lipase (LPL) expression in cerebral cortex in mice. **Methods** Based on their body weight, 50 healthy adult C57BL/6J mice were randomly divided into 5 groups (each  $n = 10$ ), and blood was respectively collected at 0, 8, 12, 16 and 24 h after fasting for detection of serum  $\beta$ OHB by ELISA. Additionally, the other 20 mice were randomly divided into 2 groups (each  $n = 10$ ), the fasting group and control group. The mice in the fasting group received alternate-day fasting diet for 4 consecutive weeks, while those in the control group were fed ad libitum. The body weight and the percentage of body fat were measured at the end of the experiment. Moreover, the expression of LPL mRNA and protein in the cerebral cortex of mice were detected by real-time RT-PCR and Western blot respectively. **Results** The serum  $\beta$ OHB level in mice was gradually increased with the extension of fasting time, with  $(0.93 \pm 0.13)$  nmol/L,  $(0.95 \pm 0.37)$  nmol/L,  $(1.33 \pm 0.26)$  nmol/L,  $(1.68 \pm 0.13)$  nmol/L and  $(1.74 \pm 0.27)$  nmol/L at 0, 8, 12, 16 and 24 h after fasting respectively. Compared with the serum  $\beta$ OHB level at 0 h, the  $\beta$ OHB levels at 12, 16 and 24 h after fasting were significantly increased (all  $P < 0.05$ ). No significant difference was found between the serum  $\beta$ OHB levels at 16 and 24 h after fasting ( $P > 0.05$ ), but both were remarkably higher than that at 12 h ( $P < 0.05$ ). During the experiment, no abnormal manifestations were found in the mice of the alternate-day fasting group and the control group; moreover, their body weight and percentage of body fat showed no statistically significant difference ( $P > 0.05$ ). Compared with the control group,

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究一般项目 (No.L2014289)

作者简介: 李心蕙 (1990-), 女, 辽宁抚顺人, 硕士在读, 研究方向: 营养与慢性病。

通信作者: 安丽, 女, 博士生导师, 教授, E-mail: anli@cmu.edu.cn。

the expression of LPL mRNA and protein in the cerebral cortex of the mice in the alternate-day fasting group was remarkably up-regulated ( $P<0.01$ ;  $P<0.05$ ). **Conclusions** The serum  $\beta$ OHB level in mice is significantly increased during 12–24 h after fasting, and alternate-day fasting for 4 weeks can up-regulate the expression of LPL mRNA and protein in the cerebral cortex of mice.

**Key words:** restricted feeding;  $\beta$ -hydroxybutyrate; lipoprotein lipase

酮体是脂肪酸在肝脏进行正常分解代谢所生成的中间产物,由于血脑屏障的存在,除葡萄糖和酮体外的物质无法进入脑内为脑组织提供能量。酮体是低血糖时大脑能量物质的重要来源(饥饿时酮体可占脑能量来源的 25%~75%)。 $\beta$ 羟丁酸( $\beta$ -hydroxybutyrate,  $\beta$ OHB)是酮体的重要组成成分,其不仅是脂肪代谢的中间产物,还具有抑制组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDACs)作用<sup>[1]</sup>,因此, $\beta$ OHB 可能通过影响组蛋白乙酰化水平而调控脑组织某些基因的表达。脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)是脂代谢的关键酶,主要由脂肪细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞等实质细胞合成和分泌<sup>[2]</sup>。LPL 还在脑组织中高度表达,与精神分裂症、阿尔茨海默病等神经性疾病有关<sup>[3-4]</sup>。本研究在体外研究中发现, $\beta$ OHB 可上调 SH-SY5Y 神经细胞的 LPL mRNA 水平;另有文献报道,禁食和摄食对 LPL 的影响在脂肪组织、心肌、骨骼肌具有组织特异性<sup>[5]</sup>,而对脑组织 LPL 表达的影响尚未见报道。

综上所述,限制性摄食可能通过升高  $\beta$ OHB 水平而调节脑组织 LPL 表达,因此,本研究分析了不同禁食时间小鼠血中  $\beta$ OHB 水平的变化,以及隔日禁食对小鼠大脑皮质 LPL 表达的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 健康成年 C57BL/6J 小鼠 70 只,雌雄各半,体重 18~24 g,由中国医科大学实验动物中心提供(生产许可证号:SCXK(辽)2008-0005,使用许可证号:SYXK(辽)2008-0005)。动物饲养条件:温度 20℃~24℃,相对湿度为 40%~70%,明暗各 12 h,饲料由中国医科大学实验动物中心提供。

**1.2 动物分组、处理及样品采集** 选取 50 只小鼠,按体重分为 5 组,每组 10 只,雌雄各半,分别于禁食 0、8、12、16 和 24 h 后进行乙醚麻醉,采血,离心后取上清,用于  $\beta$ OHB 水平的测定。另 20 只小鼠按体重随机分为禁食组和对照组,每组 10 只,雌雄各半。禁食组小鼠采用隔日禁食(每日 20:00 开始,正常摄食和禁食各 24 h,交替进行)的方式连续处理 4 周,对照组小鼠自由摄食。实验期间小鼠自由饮水,末期将小鼠乙醚麻醉后处死,冰上剥离脑组织供试。

## 1.3 检测指标及方法

**1.3.1 血  $\beta$ OHB 水平的测定** 采用 ELISA 法测定血中  $\beta$ OHB 水平,实验操作严格按照试剂盒说明书进行。

**1.3.2 一般状况及体重、体脂成份分析** 实验期间每日 1 次观察小鼠有无异常表现,末期称重并进行体成份分析,计算体脂比(体脂肪含量占体重的百分比)。

**1.3.3 大脑皮质 LPL mRNA 水平检测** 称取 50 mg 左侧大脑皮质,以 Trizol 试剂提取总 RNA,采用 Real-time 逆转录试剂盒将 mRNA 逆转录为 cDNA,再进行 PCR 扩增。 $\beta$ -actin 引物为:5'-CATCCGTAAAGAC-CTCTATGCCAAC-3' 和 5'-ATGGAGCCACCGATC CACA-3',产物大小 171 bp;LPL 引物为:5'-CCAA-GAGAAGCAGCAAGATGTA-3' 和 5'-ATCCTCAGTC-CCAGAAAAGTGA-3',产物大小 123 bp。反应体系 20  $\mu$ l;上下游特异性引物各 0.8  $\mu$ l,SYBR® Premix Ex Taq™ II 10  $\mu$ l、灭菌蒸馏水 6  $\mu$ l、Rox Reference Dye II (50 $\times$ ) 0.4  $\mu$ l。反应条件为:95℃ 30 s 预变性;扩增 40 个循环:95℃ 5 s、60℃ 34 s;溶解曲线分析:95℃ 15 s、60℃ 1 min、95℃ 15 s。以  $\beta$ -actin 为内参,分析目的基因的相对表达量。

**1.3.4 大脑皮质 LPL 蛋白表达检测** 称取 50 mg 右侧大脑皮质,剪碎后加入 500  $\mu$ l RIPA 裂解缓冲液,匀浆,每隔 5 min 涡旋 30 s。裂解 30 min 后,4℃ 12 000 r 离心 20 min,采用 BCA 试剂盒测定上清液中蛋白浓度,并调整蛋白浓度为 5  $\mu$ g/ $\mu$ l。加入缓冲液,于 95℃ 变性 5 min,取 10  $\mu$ l 样品加入 10%聚丙烯酰胺凝胶,100 V 电泳 1.5 h。85 V 转膜 1.5 h,再以 5%脱脂奶粉封闭 2 h,TBS-T 洗膜 2 次,每次 5 min,一抗(1:1 000) 4℃ 孵育过夜,TBS-T 洗膜 6 次,每次 5 min,二抗(1:3 000)孵育 2 h,TBS-T 洗膜 6 次,每次 5 min,ECL 发光显色,应用化学发光凝胶成像分析仪拍照。Gel-pro analyzer 4.0 软件进行灰度分析,以  $\beta$ -actin 作为内参,分析目的蛋白的相对表达量。

**1.4 主要仪器及试剂** FL50 小动物体脂成份分析仪(德国 Bruker 公司)、低温高速离心机(美国, SIGMA 3K30)、DNA 扩增仪(PC812,日本)、酶标仪(Multiskan MK3,美国 Thermo)、实时定量 PCR 仪(7500,美国 Ap-

plied Biosystem)、电泳凝胶成像分析仪(2500R, 上海)、微型垂直电泳仪(VE-180, 上海)、转移电泳槽(VE-186, 上海)、水平摇床(TS-1000, 江苏海门)、QL-901 漩涡混合器(江苏海门市麒麟医用仪器厂)。 $\beta$ -OHB 试剂盒(南京建成生物工程研究所)、Trizol(美国 Invitrogen 公司)、逆转录试剂盒(TaKaRa, 大连大连宝生物公司)、RT-PCR SYBR 试剂盒(TaKaRa, 大连大连宝生物公司)、RIPA 裂解缓冲液(Beyotime, 上海碧云天生物技术有限公司)、BCA 试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司)、兔抗小鼠 LPL 多克隆抗体(美国 Abcam 公司)、羊抗兔 IgG-HRP(美国 Abcam 公司)、ECL 显色试剂盒(Tanon, 上海天能科技有限公司)。

1.5 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析, 结果表示为均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )。多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用最小显著差值法检测; 两组间比较采用独立样本  $t$  检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

2.1 不同禁食时间小鼠血中  $\beta$ OHB 水平的变化 见图 1。小鼠血中  $\beta$ OHB 水平随着禁食时间的延长

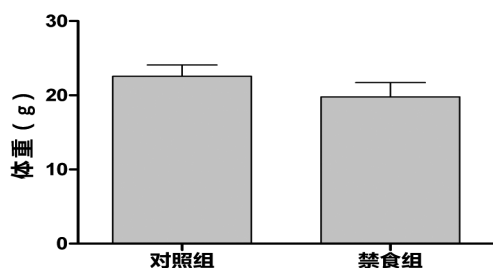
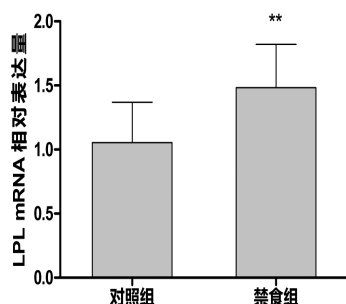


图 2 隔日禁食组小鼠体重及体脂比检测结果

2.3 大脑皮质 LPL mRNA 水平 见图 3。禁食组小鼠大脑皮质 LPL mRNA 水平高于对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

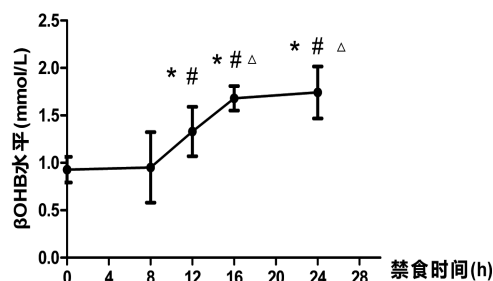


注: 与对照组比较,  $** P < 0.01$ 。

图 3 隔日禁食对小鼠大脑皮质 LPL mRNA 表达影响

2.4 大脑皮质 LPL 蛋白表达 见图 4。禁食组小鼠大脑皮质 LPL 蛋白表达水平高于对照组, 差异有统计

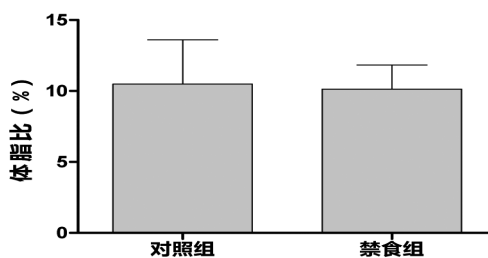
而逐渐升高; 与禁食 0 h 比较, 禁食 12 h 后的小鼠血中  $\beta$ OHB 水平明显升高( $P < 0.05$ ); 禁食 16 h 和禁食 24 h 的小鼠血中  $\beta$ OHB 水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 但二者均明显高于禁食 12 h 的小鼠血中  $\beta$ OHB 水平( $P < 0.05$ )。



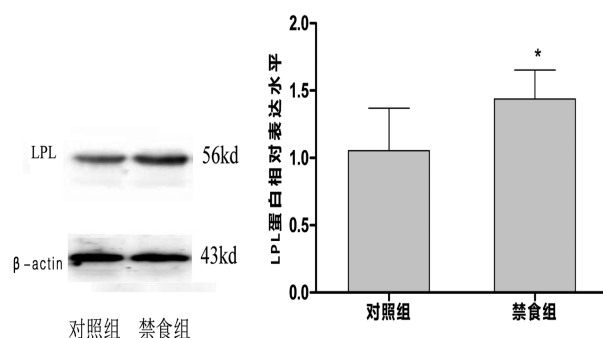
注: 与禁食 0 h 比较,  $* P < 0.05$ ; 与禁食 8 h 比较,  $\# P < 0.05$ ; 与禁食 12 h 比较,  $\Delta P < 0.05$ 。

图 1 不同禁食时间小鼠血中  $\beta$ OHB 水平

2.2 一般状况、体重及体脂比 在整个实验期间, 隔日禁食组小鼠与对照组小鼠活动自如, 状态良好, 未见异常表现。体重及体脂成份结果见图 2, 隔日禁食处理 4 周的小鼠与自由摄食组小鼠相比, 体重及体脂比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。



学意义( $P < 0.05$ )。



注: 与对照组相比,  $* P < 0.05$ 。

图 4 隔日禁食对小鼠大脑皮质 LPL 蛋白表达影响

## 3 讨论

内源性  $\beta$ OHB 主要来源于肝脏脂肪酸氧化,

$\beta$ OHB 通过与脂肪细胞分泌的 G 蛋白偶联受体 109A 结合,反馈性地抑制脂解作用。通过这种负反馈的机制,能够减少血浆中游离脂肪酸浓度的降低,同时在长期饥饿时避免过度消耗脂肪<sup>[6]</sup>。人在长时间禁食条件下,血浆中  $\beta$ OHB 浓度上升<sup>[7]</sup>。研究发现,正常人在用餐后血浆中  $\beta$ OHB 的浓度会降低到 0.05 mmol/L,而在过夜后浓度则增长到 0.4 mmol/L,在禁食 2~3 d 后血浆中  $\beta$ OHB 的浓度则可上升到 1~2 mmol/L,延长饥饿时血浆中  $\beta$ OHB 的浓度可能达到 6~8 mmol/L<sup>[8]</sup>。另有文献报道,禁食 24 h 的小鼠血中  $\beta$ OHB 浓度增加到 1.5 mmol/L<sup>[1]</sup>。本研究发现,小鼠禁食 12 h 即可明显升高血中  $\beta$ OHB 水平,禁食后 16~24 h 血中  $\beta$ OHB 水平进一步升高,与上述文献报道相一致。与自由摄食相比,每日 8 h 限时摄食和隔日摄食对小鼠的能量摄入均无明显影响<sup>[9-10]</sup>,后者在研究过程中更易于操作,因此,本研究采用了隔日摄食方式喂饲小鼠使其内源性  $\beta$ OHB 水平升高。

间断性禁食可有效预防和延缓 2 型糖尿病、心血管疾病及癌症等慢性病的发生<sup>[11]</sup>。Desautels M 等<sup>[12]</sup>研究发现,禁食 24 h 后补饲 2 d,连续处理 42 d,实验末期禁食组与自由摄食组小鼠体重及体脂肪含量无明显差异;进一步的研究表明,小鼠禁食 24 h 后,体脂肪含量明显减少,而补饲 24 h 后恢复正常水平。本研究结果显示,隔日禁食处理 4 周的小鼠与对照组小鼠体重及体脂肪含量也未见明显差异。作为甘油三酯降解的限速酶,LPL 缺乏或活性异常导致的高甘油三酯血症是血脂异常、2 型糖尿病、高血压、冠心病等常见疾病的高危因素之一<sup>[13]</sup>。LPL 还广泛表达在大脑组织中参与学习、记忆和认知等功能的区域,与阿尔茨海默症等神经系统疾病有关<sup>[14]</sup>。

LPL 的表达和活性可受多种因素调控,包括激素、营养、运动、转录因子 PPAR $\gamma$ 、载脂蛋白等。研究发现,禁食和摄食对 LPL 的影响具有组织特异性,摄食后脂肪组织的 LPL 活性增加,禁食期间脂肪细胞的 LPL 活性下降,而心肌、骨骼肌的 LPL 活性在禁食期间增强,其调控很可能与胰岛素有关,通过快速降低血管生成素样蛋白 4 实现增强 LPL 活性的作用<sup>[5,15]</sup>。如前所述, $\beta$ OHB 是一种 HDACs 泛抑制剂,可上调 SH-SY5Y 神经细胞 LPL mRNA 水平;另有报道,HDACs 抑制剂二烯丙基二硫化物可使 3T3-L1 前脂肪细胞 LPL 表达增多<sup>[16]</sup>。上述研究结果提示,LPL 的表达可能受到组蛋白乙酰化水平的调控。本研究发现,隔日

禁食处理 4 周可上调小鼠大脑皮质 LPL mRNA 及其蛋白表达,其原因有待进一步探讨,可能是由于禁食期间小鼠内源性  $\beta$ OHB 水平升高,进而通过影响脑组织组蛋白乙酰化水平而调控 LPL 的表达。

#### 参考文献

- [1] Shimazu T, Hirschey MD, Newman J, et al. Suppression of oxidative stress by  $\beta$ -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor[J]. *Science*, 2013, 339(6116): 211-214.
- [2] Semenkovich CF, Chen SH, Wims M, et al. Lipoprotein lipase and hepatic lipase mRNA tissue specific expression, developmental regulation, and evolution[J]. *J Lipid Res*, 1989, 30(3): 423-431.
- [3] Xie C, Wang ZC, Liu XF, et al. Association between schizophrenia and single nucleotide polymorphisms in lipoprotein lipase gene in a Han Chinese population[J]. *Psychiatr Genet*, 2011, 21(6): 307-314.
- [4] Gong H, Dong W, Rostad SW, et al. Lipoprotein lipase (LPL) is associated with neurite pathology and its levels are markedly reduced in the dentate gyrus of Alzheimer's disease brains[J]. *J Histochem Cytochem*, 2013, 61(12): 857-868.
- [5] Goldberg IJ, Eckel RH, Abumrad NA. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(Supplement): S86-S90.
- [6] Plaisance EP, Lukasova M, Offermanns S, et al. Niacin stimulates adiponectin secretion through the GPR109A receptor[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 296(3): E549-E558.
- [7] Halberg N, Henriksen M, Söderhamn N, et al. Effect of intermittent fasting and refeeding on insulin action in healthy men[J]. *J Appl Physiol*, 2005, 99(6): 2128-2136.
- [8] Taggart AKP, Kero J, Gan X, et al. (D)- $\beta$ -hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G[J]. *J Biol Chem J*, 2005, 280(29): 26649-26652.
- [9] Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet[J]. *Cell Metab*, 2012, 15(6): 848-860.
- [10] Anson RM, Jones B, de Cabod R. The diet restriction paradigm: a brief review of the effects of every-other-day feeding[J]. *Age*, 2005, 27(1): 17-25.
- [11] Varady KA, Hellerstein MK. Alternate-day fasting and chronic disease prevention: a review of human and animal trials[J]. *Am J Clin Nutr*, 2007, 86(1): 7-13.
- [12] Desautels M, Dullos RA. Effects of repeated cycles of fasting-refeeding on brown adipose tissue composition in mice[J]. *Am J Physiol*, 1988, 255(2): E120-E128.
- [13] Xie C, Wang ZC, Liu XF, et al. The common biological basis for common complex diseases: evidence from lipoprotein lipase gene[J]. *Eur J Hum Genet* 2010, 18(1): 3-7.
- [14] Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity[J]. *Am J Physiol*, 2009, 297(2): E271-E288.
- [15] Yoshida K, Shimizugawa T, Ono M, et al. Angiopoietin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase[J]. *J Lipid Res*, 2002, 43(11): 1770-1772.
- [16] Lee J H, Kim KA, Kwon KB, et al. Diallyl disulfide accelerates adipogenesis in 3T3-L1 cells[J]. *Int J Mol Med*, 2007, 20(1): 59-64.

收稿日期:2016-11-08