

中链脂肪酸对肥胖 C57BL/6J 小鼠小肠 TLR4 传导通路分子表达的影响

赵晓, 张永, 张新胜, 徐庆, 于晓明, 刘鹿, 刘英华, 薛长勇

中国人民解放军总医院营养科, 北京 100853

摘要: **目的** 观察和分析中链脂肪酸(辛酸/癸酸)对高脂膳食诱导的肥胖 C57BL/6J 小鼠小肠中 TLR4 传导通路相关分子表达的影响,探讨中链脂肪酸(MCFA)降体重的机制。**方法** 36 只高脂饲料诱导的 C57BL/6J 肥胖小鼠按空腹体重随机分为 3 组,每组 12 只,分别给予含 2%辛酸(C8:0)、癸酸(C10:0)和油酸(C18:1)的高脂饲料喂养 16 周,测定小鼠体重、肝脏重、肠系膜、附睾及肾周脂肪垫重,测定血清脂代谢指标,采用 ELISA 法测定小肠中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)、白介素-1 β (IL-1 β)水平,采用 Real-time PCR 法检测小肠组织中 Toll 样受体-4(TLR4)、髓样细胞分化因子 88(MyD88)和 TNF- α 的 mRNA 表达。**结果** 辛酸和癸酸组肥胖小鼠体重、肝脏重、附睾周脂肪重、小肠组织中 TNF- α 水平以及 TLR4 mRNA 表达均显著低于油酸组($P<0.05$)。辛酸组小鼠血清胆固醇(TC)和游离脂肪酸(FFA)、小肠组织中 IL-6、IL-1 β 水平以及 MyD88、TNF- α mRNA 表达显著低于油酸组($P<0.05$),而高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)以及 HDL-C/LDL-C 显著高于油酸组($P<0.05$)。癸酸组血清甘油三酯(TG)和 FFA 水平显著低于油酸组。**结论** MCFA 可能通过下调小肠中 TLR4 传导通路相关分子水平抑制肥胖个体炎症反应,降低肥胖个体体重。

关键词: 中链脂肪酸;肥胖;炎症;TLR4

中图分类号: R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2017)08-0916-04 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2017.08.006

Effect of medium-chain fatty acid on the expression of TLR4 pathway related molecules in small intestine of C57BL/6J mice with obesity

ZHAO Xiao, ZHANG Yong, ZHANG Xin-sheng, XU Qing, YU Xiao-ming, LIU Lu, LIU Ying-hua, XUE Chang-yong

Department of Nutrition, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: LIU Ying-hua, E-mail:liuyinghua77@163.com; XUE Chang-yong, E-mail:cyxey@163.com

Abstract: **Objective** To study the possible mechanism of medium-chain fatty acid (MCFA) in reducing body weight by observing the effect of MCFA on the expression of TLR4 signaling pathway related molecules in small intestine tissues of mice with obesity induced by high-fat diet. **Methods** Thirty-six C57BL/6J high-fat diet-induced obese mice were randomly divided into octanoic acid group, capric acid group and oleic acid group (each $n=12$) according to their fasting body weight. After exposure to the high-fat diets (containing 2% octanoic acid (C8:0), capric acid (C10:0) and oleic acid (C18:1) respectively) for 16 weeks, their body, liver and mesenteric, epididymal and perirenal fat pads were weighed. Meanwhile, lipid metabolism related indexes in serum were measured. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 (IL-1) levels in small intestine were measured by ELISA. The expression of toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and TNF- α mRNA in small intestine tissues were measured by real-time RT-PCR. **Results** The weight of body, liver and epididymal fat pads, the level of TNF- α and the expression of TLR4 mRNA in small intestine tissues were significantly lower in octanoic acid group and capric acid group than in oleic acid group (all $P<0.05$). The concentrations of total cholesterol (TC) and free fatty acid (FFA) in serum, the levels of IL-6 and IL-1 and the expression of MyD88 and TNF- α mRNA in small intestine tissues were significantly lower in octanoic acid group than in oleic acid group (all $P<0.05$), whereas the serum concentration of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and the ratio of serum HDL-C to LDL-C (low-density lipoprotein cholesterol) were significantly higher in octanoic acid group than in oleic acid group (both $P<0.05$). The levels of triglyceride (TG) and free fatty acid (FFA) in serum were significantly lower in capric acid group than in oleic acid group (both $P<0.05$). **Conclusions** MCFA may effectively reduce the body weight of obese individuals via reducing inflammatory factors by down-regulating TLR4 signaling pathway related molecules in small intestine tissues.

Key words: medium-chain fatty acid; obesity; inflammation; toll-like receptor 4

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81541067, 81202203); 解放军总医院科技创新苗圃基金(No. 15KMM45, 16KMM45)

作者简介: 赵晓(1991-), 女, 在读硕士, 研究方向: 临床营养与脂代谢。

通信作者: 刘英华, E-mail: liuyinghua77@163.com; 薛长勇, E-mail: cyxey@163.com。

随着我国居民生活水平的提高和生活方式的变化,超重和肥胖率正极速增长,《中国居民营养与慢性病状况报告(2015 年)》显示,全国 18 岁及以上成人超重率为 11.9%,肥胖率为 9.6%,超重肥胖问题凸显,通过减轻体重改善机体脂代谢,进而预防一系列并发症尤其是心血管并发症发生,将对提高人们生活质量,促进人类健康具有重大意义。本课题组前期研究结果表明适量食用中链脂肪酸油脂(medium-chain triglyceride, MCT)可降低高甘油三酯血症人群体重,改善脂代谢水平^[1],同时证实这种作用与中链脂肪酸(medium-chain fatty acid, MCFA)增加肥胖小鼠血中甘油三酯水解酶以及激素敏感酯酶活性、增加肥胖小鼠棕色脂肪重量有关^[2],但相关机制还有待进一步研究。肥胖被称为一种慢性低度炎症状态,关于炎症反应涉及多条通路,其中 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)信号通路在高脂饮食致全身性炎症反应及肥胖所致炎症疾病发展中起着重要作用。为此,本研究通过观察和分析 MCFA(辛酸/癸酸)对高脂膳食诱导的肥胖 C57BL/6J 小鼠小肠中 TLR4 传导通路中相关分子及炎症因子表达的影响,进一步探讨 MCFA 降体重的机制,为研究 MCFA 具有抑制炎症因子释放的新作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 肥胖动物模型的建立、动物分组及处理 实验动物 C57BL/6J 小鼠由中国医学科学院实验动物研究所提供,实验动物生产许可证号为 SCXK(京)2014-0004,实验动物使用许可证号为 SYXK(军)2012-0010。按参考文献^[3]方法建立实验用肥胖动物模型,设置 10 只小鼠喂饲普通饲料,60 只小鼠喂饲高脂饲料,4 周后体重高于普通小鼠饲料组小鼠体重 10%以上的高脂饲料小鼠即为造模成功。选取 36 只造模成功的肥胖小鼠,按空腹体重随机分为 3 组,每组 12 只,分别给予含有 2%辛酸、癸酸和油酸的高脂饲料,喂养 16 周。高脂饲料配方参考文献^[3]。实验期间小鼠饲养于温度恒定(22℃~24℃)、湿度恒定(52%~58%)、12 h 照明/非照明循环房间。

1.2 仪器与试剂 仪器:电子天平,解剖器械,全自动生化仪 7600(日本 Hitachi),Fresco 低温冷冻离心机(美国 Thermo),酶标仪(美国 Molecular Devices),Real-Time PCR 检测系统(美国 Bio-Rad)。ELISA 检测试剂盒购自中国上海 BlueGene 公司,核糖核酸(RNA)提取试剂盒,逆转录-PCR(RT-PCR)试剂盒购自美国 Promega 公司;Trizol、M-MLV 逆转录酶购自美国 In-

vitrogen 公司;其他试剂为进口分析纯试剂。引物合成由北京奥科鼎盛生物科技有限公司提供。

1.3 检测指标

1.3.1 动物体重、肝脏重及体脂肪重 实验小鼠于研究结束前一夜禁食不禁水,第 2 d 清晨进行小鼠空腹体重称量并记录。小鼠处死后立即分离肝脏,肠系膜周围脂肪组织、左右双侧附睾周围和左右双侧肾周脂肪组织,滤纸吸干组织液后,用万分之一电子天平分别称重,并记录。

1.3.2 血脂水平 实验小鼠处死后取腹主动脉血,离心取血清。血清甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)测定采用 GPO-PAP 酶法,高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)测定采用 PEG-6000 沉淀法,游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)测定采用 ELISA 方法,上述指标检测结果由解放军总医院生化科技人员提供。

1.3.3 小肠组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平测定

取实验小鼠小肠组织,一部分立即放于液氮中备检 mRNA 表达,另一部分用 0.9% 氯化钠注射液按 10% 浓度制成匀浆,700 g/min 离心 15 min,取上清液,BCA 法测定小肠组织蛋白浓度,再根据 ELISA 检测试剂盒说明检测小肠组织中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)水平。

1.3.4 小肠组织中 TLR4、MyD88 和 TNF- α 的 mRNA 表达测定

每组随机选取 6 个小肠组织样本,每个样本约 100 mg,首先按 Trizol 试剂的操作说明进行 RNA 提取,以总 RNA 3 μ g 为逆转录反应模板,采用随机引物,按照反转录试剂盒的操作步骤说明在普通 PCR 仪上进行逆转录,再以 2 μ l 逆转录反应产物为模板,按照荧光实时定量 PCR(real-time RT-PCR)试剂盒说明书,冰上配置 50 μ l 的 PCR 反应体系,进行小肠组织中 mRNA 表达测定。其中 TLR4 引物序列为:上游 5'-TGG CTG GTT TAC ACG TCC AT-3',下游 5'-TGC AGA AAC ATT CGC CAA GC-3';MyD88 引物序列为:上游 5'-CTG GCC TTG TTA GAC CGT GA-3',下游 5'-GTG GGA CAC TGC TTT CCA CT-3';TNF α 引物序列为:上游 5'-ACT GAA CTT CGG GGT GAT CG-3',下游 5'-CCT CCA CTT GGT GGT TTG TG-3'。实时定量 PCR 扩增条件为:95℃预变性 120 s,95℃变性 20 s,59℃退火 25 s,72℃延伸 30 s,45 个循环。目的基因表达采用 Ct(threshold cycle, Ct)值法,表示方

法为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 即为 $2^{\Delta Ct(\text{actin}) - \Delta Ct(\text{target gene})}$ 。

1.4 统计分析 所有数据均采用($\bar{x}\pm s$)表示。采用 SPSS17.0 统计软件包进行数据处理,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肥胖小鼠动物模型的建立和分组 造模 4 周后,普通饲料组小鼠体重为(19.44 ± 0.87)g,高脂饲料组有 52 只小鼠体重高于普通饲料组 10% 以上,平均为(21.29 ± 0.47)g,随机选取 36 只,按空腹体重分 3 组,各组间体重差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 MCFA 对肥胖小鼠体重、肝脏重、体脂肪重的影响 16 周后,辛酸和癸酸组肥胖小鼠体重、肝脏重、附睾周脂肪重均显著低于油酸组($P<0.05$),双侧肾周和肠系膜周围脂肪重三组之间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 MCFA 对肥胖 C57BL/6J 小鼠体重、肝脏重、体脂肪重的影响($g, n=12, \bar{x}\pm s$)

组别	体重	肝脏重	双侧肾周脂肪重	肠系膜周脂肪重	双侧附睾脂肪重
辛酸($C_{8:0}$)	36.18 \pm 1.98 *	1.48 \pm 0.12 *	0.66 \pm 0.09	0.57 \pm 0.19	1.98 \pm 0.41 *
癸酸($C_{10:0}$)	35.66 \pm 2.15 *	1.37 \pm 0.14 *	0.61 \pm 0.10	0.54 \pm 0.10	1.83 \pm 0.46 *
油酸($C_{18:1}$)	38.05 \pm 2.21	2.02 \pm 0.13	0.71 \pm 0.18	0.62 \pm 0.15	2.72 \pm 0.53
F 值	4.236	85.603	1.782	0.857	12.372
P 值	0.023	<0.001	0.184	0.434	<0.001

注: * 与油酸组比较, $P<0.05$ 。下同。

2.3 MCFA 对肥胖小鼠血清脂代谢指标的影响 16 周后,辛酸组小鼠血清胆固醇(TC)和游离脂肪酸(FFA)水平显著低于油酸组($P<0.05$),而 HDL-C 以及 HDL-C/LDL-C 显著高于油酸组($P<0.05$)。癸酸组血清甘油三酯(TG)和 FFA 水平显著低于油酸组($P<0.05$)。见表 2。

表 2 MCFA 对肥胖 C57BL/6J 小鼠血清指标的影响($n=12, \bar{x}\pm s$)

组别	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C/ LDL-C	FFA (mmol/L)
辛酸($C_{8:0}$)	1.37 \pm 0.22	3.26 \pm 0.48 *	3.25 \pm 0.22 *	0.62 \pm 0.28	5.24 \pm 1.27 *	76.77 \pm 7.24 *
癸酸($C_{10:0}$)	1.09 \pm 0.16 *	3.72 \pm 0.37	3.07 \pm 0.28	0.72 \pm 0.20	4.26 \pm 0.92	82.79 \pm 8.35 *
油酸($C_{18:1}$)	1.68 \pm 0.27	4.01 \pm 0.52	2.89 \pm 0.15	0.81 \pm 0.20	3.57 \pm 1.02	98.46 \pm 7.98
F 值	21.345	8.075	7.812	2.053	7.244	24.289
P 值	<0.001	0.001	0.002	0.144	0.002	<0.001

2.4 MCFA 对肥胖小鼠小肠组织 TLR4 通路相关因子表达的影响

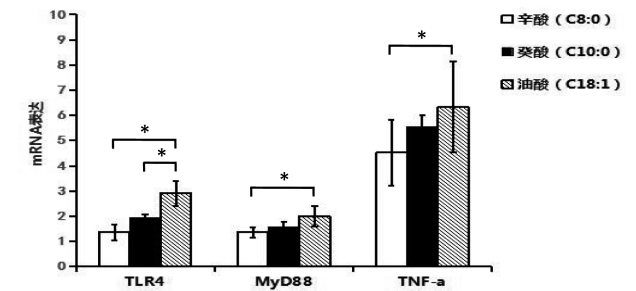
2.4.1 小肠组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平的变化 辛酸和癸酸组小鼠小肠组织中 TNF- α 水平均显著低于油酸组($P<0.05$),IL-6、IL-1 β 水平在辛酸组也显著低于油酸组($P<0.05$),但癸酸组与油酸组比

较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 MCFA 对肥胖 C57BL/6J 小鼠小肠组织 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平的影响($n=12, \bar{x}\pm s$)

组别	蛋白浓度 (mg/ml)	TNF- α (pg/mg protein)	IL-6 (pg/mg protein)	IL-1 β (pg/mg protein)
辛酸($C_{8:0}$)	112.44 \pm 23.67	587.25 \pm 124.56 *	48.72 \pm 7.88 *	412.36 \pm 99.06 *
癸酸($C_{10:0}$)	153.21 \pm 33.72	672.97 \pm 125.11 *	60.17 \pm 21.54	709.13 \pm 278.45
油酸($C_{18:1}$)	132.78 \pm 32.56	892.26 \pm 171.23	78.38 \pm 23.59	758.96 \pm 157.50
F 值		14.727	7.440	11.271
P 值		<0.001	0.002	<0.001

2.4.2 小肠组织中 TLR4、MyD88 和 TNF- α mRNA 表达的变化 辛酸和癸酸组小鼠小肠组织中 TLR4 mRNA 表达显著低于油酸组($P<0.05$)。辛酸组小鼠小肠组织中 MyD88、TNF- α mRNA 表达也显著低于油酸组($P<0.05$),但癸酸组与油酸组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 1。



注:研究期限为 16 周;每组 12 只小鼠;Real-time RT-PCR 法检测相应因子的 mRNA 表达,结果采用 $2^{-\Delta Ct(\text{actin}) - \Delta Ct(\text{target gene})}$ 法表示。

图 1 MCFA 对 C57BL/6J 肥胖小鼠小肠中 TLR4、MyD88 及 TNF- α mRNA 表达的影响

3 讨论

MCFA 是含有 8~12 个碳原子的饱和脂肪酸,常见为辛酸($C_{8:0}$)和癸酸($C_{10:0}$),因其在体内的转运代谢机制不同于长链脂肪酸(long-chain fatty acid, LCFA),本课题组前期已证实 MCFA 能减少体内脂质积蓄,有防治肥胖的作用。越来越多的证据结果显示,患者肥胖度的增加往往伴随着血浆中相关促炎细胞因子的增长^[4-5],而炎症反应会进一步破坏机体代谢功能,恶性循环加重炎症和代谢性疾病。由此可见,慢性低度炎症状态对肥胖以及相关代谢性疾病的发生发展起着至关重要的作用^[6-7]。

TLR4 在先天性免疫反应的炎症信号通路中具有重要作用,其通过识别病原相关分子模式的特有抗原成分而进行信号识别和传导。革兰阴性细菌的细胞壁成分脂多糖 LPS 是 TLR4 最重要的配体^[8],通过结合白细胞分化抗原 14(cluster of differentiation 14, CD14)、脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP)、TLR4 形成受体复合物,与(转 979 页)