

## 叶黄素改善高脂饲料喂养大鼠的胰岛素抵抗

邱 香 高丹红 郝丽萍

(华中科技大学同济医学院公共卫生学院, 中国武汉 430030)

**摘要 目的:** 研究叶黄素对高脂膳食引起大鼠胰岛素抵抗的保护作用, 探索其作用机制。**方法:** 本实验经高脂膳食诱导建立高脂血症大鼠模型。建模成功后, 经灌胃给予高脂血症大鼠 12.5, 25, 50mg/kg·bw·d 的叶黄素进行干预。45 天后测定大鼠的血脂、肝脏脂质、空腹血糖、空腹血胰岛素、氧化应激水平和胰岛素信号传导分子的表达水平, 并对肝脏进行病理学检测。**结果:** ①叶黄素对高脂饲料喂养大鼠的能量摄入和体重有增加的作用趋势, 但剂量依赖性降低肾周脂肪、腹壁脂肪占体重的比值; ②叶黄素对血脂水平影响不显著, 但中剂量组肝脏 TG 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); ③肝脏组织 H&E 及油红 O 染色显示, 叶黄素补充可明显改善肝细胞脂肪沉积; ④叶黄素可显著改善高脂饲料喂养大鼠的空腹血糖、空腹血胰岛素、HOMA-IR 水平和血清总 SOD 水平; ⑤叶黄素可改善高脂喂养诱导的胰岛素信号传导分子 IRS2、PI3K 和 GLUT2 的表达水平的降低。**结论:** 膳食补充叶黄素可通过改善体内脂肪沉积、血脂异常、抗氧化能力和胰岛素信号传导关键分子的表达来改善胰岛素抵抗。

**关键词** 高脂膳食、叶黄素、胰岛素抵抗

### 1 前言

进入 21 世纪以来, 糖尿病以其惊人的速度迅速增长为人类健康的主要威胁之一<sup>[1]</sup>。据报道, 2012 年全球有 3.71 亿的成年糖尿病患者, 其中大部分的患者分布在低等和中等收入的国家。作为人口大国, 中国以 9700 万的庞大数字成为世界上糖尿病患者最多的国家, 印度和美国紧随其后<sup>[2]</sup>。

糖尿病是空腹或餐后血糖异常的一种疾病, 能导致眼睛、肾、神经和循环系统的紊乱, 最终导致冠心病、中风、动脉末梢疾病、心肌病和充血性心力衰竭<sup>[3]</sup>。糖尿病分为 1 型糖尿病和 2 型糖尿病, 目前的糖尿病患者中 90% 患的是 2 型糖尿病, 2 型糖尿病的危险因素除了部分人群的基因易感性之外, 还包括环境和行为生活方式等方面的变化, 例如肥胖、体力活动减少、膳食不合理、压力过大等<sup>[4]</sup>。

除了胰岛  $\beta$  细胞损伤之外, 2 型糖尿病产生和发展的主要病理学基础是胰岛素抵抗 (Insulin Resistance, IR)。IR 通常是 2 型糖尿病发生、发展过程的首要状态<sup>[5]</sup>, 表现为靶器官, 如肝脏、肌肉、脂肪组织等对胰岛素介导的葡萄糖代谢作用敏感性降低。研究显示, IR 是糖尿病、心血管疾病、高脂血症及高血压发病的独立危险因素和共同的病理学基础<sup>[6]</sup>。

植物化学物对疾病的防治作用及其机制研究已日益成为营养研究领域的热点。叶黄素是广泛存在于蔬菜、花卉、水果等植物中的天然物质, 是类胡萝卜素中含氧型的一种。叶黄素分子中有一条含 40 个碳原子的长链, 其中含有多个共轭双键, 这样独特的化学结构使叶黄素具有了较强的抗氧化性, 并且也有动物实验证实了叶黄素的确有显著的抗氧化活性<sup>[7-9]</sup>。流行病学的研究显示, 叶黄素等类胡萝卜素因其抗氧化性, 对动脉

粥样硬化、癌症和糖尿病等慢性疾病的发展具有潜在的保护作用<sup>[10]</sup>。但是目前关于叶黄素能否改善胰岛素抵抗以及如何改善的研究还很少。

很多研究显示，高脂膳食能够引起胰岛素抵抗<sup>[11]</sup>，因此本实验通过给予高脂膳食进行诱导。随后，经灌胃给予大鼠不同剂量的叶黄素进行干预，检测大鼠的各项指标，观察叶黄素对大鼠胰岛素抵抗状态的改善作用并初步探讨机制，为叶黄素的营养开发利用提供科学依据。

## 2 材料和方法

### 2.1 材料

50 只健康成年 SD 雄性大鼠（ $199 \pm 7\text{g}$ ），购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司。叶黄素由大连医诺生物有限公司提供。普通饲料由华中科技大学同济医学院提供。总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇试剂盒购于中生北控生物科技有限公司，总超氧化物（T-SOD）测试盒购于南京建成，胰岛素注射液购于万邦医药，胰岛素酶联免疫检测试剂盒购于美国 RD 公司。

### 2.2 方法

大鼠适应性喂养 9 天后，按体重将大鼠分为普通饲料组（10 只），高脂饲料组（40 只），分别给予普通饲料和高脂饲料喂养。高脂饲料配方为：蔗糖 20%、猪油 15%、胆固醇 1.2%、磷酸氢钙 1.72%、胆酸钠 0.2%、酪蛋白 9.4%、基础饲料 52.48%。10 天后，将高脂饲料组喂养大鼠按 TC 水平再分为 4 组：高脂组、高脂+12.5mg/kg·bw·d 叶黄

素组、高脂+25mg/kg·bw·d 叶黄素组和高脂+50mg/kg·bw·d 叶黄素组，喂养 45 天。

大鼠处死前一周，禁食 10 小时后，经 100U/L 胰岛素溶液（0.8U/kg·bw.）腹腔注射，0min、15min、30min、60min、120min 测定大鼠血糖，计算血糖曲线下面积值（AUC）。实验结束，断头处死动物，留取血清及肝脏标本，称量并记录腹壁脂肪和肾周脂肪重量。每组随机取 3 只大鼠肝脏进行 H&E 和油红 O 染色。其余脏器取出后用液氮速冻并保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 。

测定大鼠空腹血糖和血胰岛素水平，计算胰岛素敏感性指数（ $\text{HOMA-IR} = \text{FIN} \times \text{FPG} / 22.5^{[13]}$ ）和胰岛  $\beta$  细胞功能指数（ $\text{HOMA-}\beta = 20 \times \text{FIN} / (\text{FPG} - 3.5^{[14]})$ ），其中 FIN 为空腹血胰岛素，FPG 为空腹血糖。

血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 和 T-SOD 的测定，严格按照试剂盒说明书进行。肝匀浆制备后<sup>[12]</sup>，肝脏的 TC 和 TG 的测定和血清相同。

肝脏 IRS2、PI3K 和 GLUT2 的蛋白表达的测定采用 RIPA 法提取蛋白，改良 Lowry's 法测定且调整蛋白浓度，10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白。以  $\beta$ -actin 为内参，用 Gel Pro 3.0 图形分析软件对 Western Blot 蛋白条带定量分析积分光密度值。

### 2.3 统计分析

数据统计采用 SPSS 18.0 软件分析，实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，统计学分析方法采用独立样本 T 检验和单因素方差分析（ANOVA）。

## 3 实验结果

### 3.1 建模期大鼠体重增加和能量利用情况

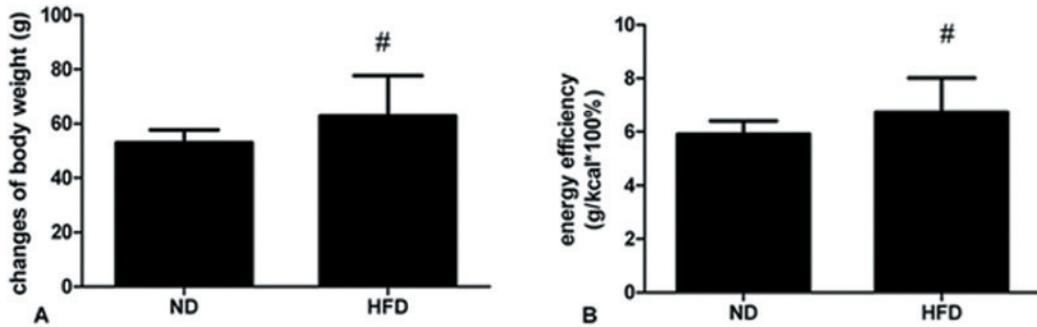


Fig. 1 The changes of body weight and energy efficiency in SD rats. <sup>#</sup>  $P < 0.05$ , compared to ND group;  $n$  (HD) = 10,  $n$  (HFD) = 40.

Fig. 1 表明，在建模期间，HFD 组大鼠体重增长和能量利用显著高于 ND 组 ( $P < 0.05$ )。

Table 1 The effects of HFD on TC and TG in SD rats.

Group	Serum (mmol/L)	
	TC	TG
ND	1.240±0.164	0.790±0.320
HFD	2.883±0.367 <sup>#</sup>	3.014±0.942 <sup>#</sup>

<sup>#</sup>  $P < 0.05$ , compared to ND group,  $n$  (HD) = 10,  $n$  (HFD) = 40.

如 Table 1 所示：HFD 组 TC、TG 水平明显高于 ND 组，且具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )，说明高脂饲料能诱导大鼠的脂质代谢紊乱。

### 3.2 叶黄素对高脂喂养大鼠的影响

#### 3.2.1 叶黄素对高脂喂养大鼠体重、能量利用和体脂比的影响

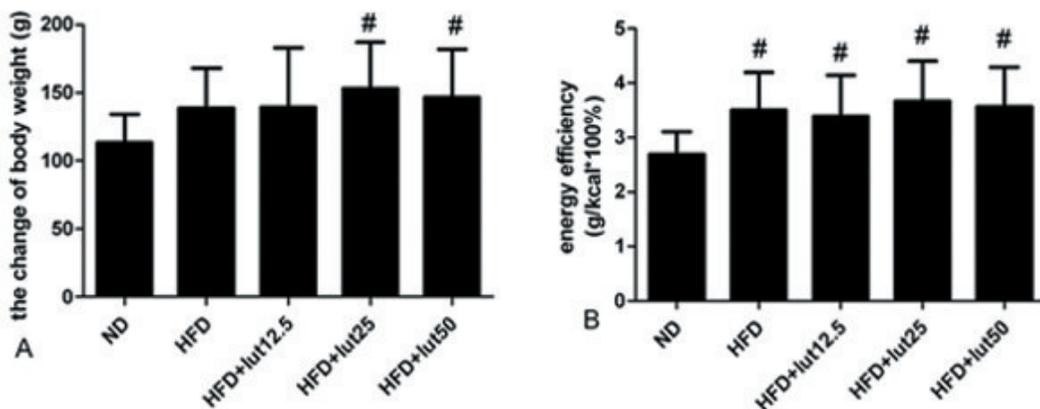


Fig. 2 Effects of lutein on body weight and energy efficiency in rats fed with HFD.

<sup>#</sup>  $P < 0.05$ , compared to ND group;  $n = 10$ .

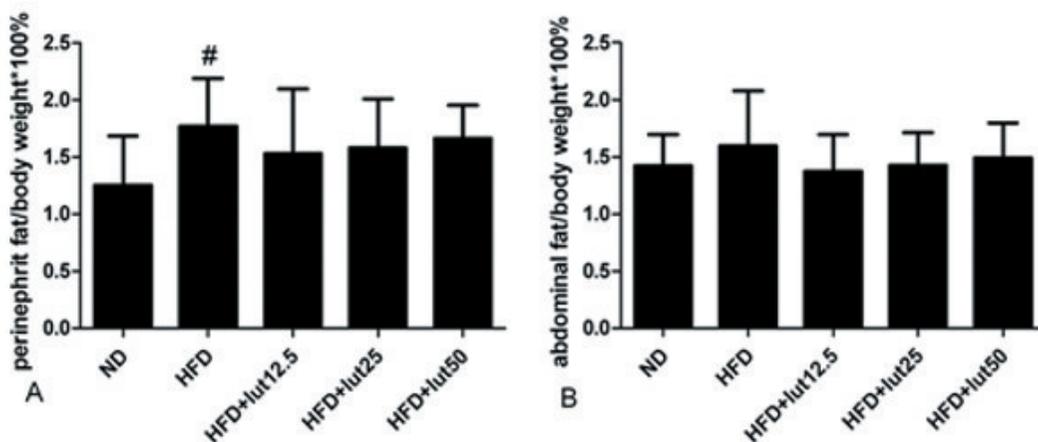


Fig. 3 Effects of lutein on perinephrit/abdominal fat index in rats fed with HFD.

<sup>#</sup>  $P < 0.05$ , compared to ND group;  $n = 10$ .

如图所示，在叶黄素干预期内，高脂膳食喂养大鼠的体重均高于ND组，且HFD+lut25组及HFD+lut50组与HFD组相比体重有增加趋势，但对能量利用率无明显影响；与ND组相比，HFD组大鼠的肾周脂肪占体

重的比值显著性升高 ( $P < 0.05$ )。HFD+lutein组与HFD组大鼠相比，肾周脂肪、腹壁脂肪占体重的比值有降低的趋势。

### 3.2.2 叶黄素对高脂喂养大鼠脂质代谢的影响

Table 2 Effects of lutein on lipids metabolism in rats fed with HFD

Group	Serum (mmol/L)				Liver ( $\mu\text{mol/g}$ )	
	TC	TG	LDL-C	HDL-C	TC	TG
ND	1.103±0.241	0.580±0.176	0.184±0.134	0.814±0.124	1.01±0.33	2.28±0.87
HFD	1.905±0.367 <sup>#</sup>	0.585±0.251	0.566±0.350 <sup>#</sup>	0.722±0.304	1.61±0.15 <sup>#</sup>	8.31±1.92 <sup>#</sup>
HFD+Lut12.5	2.043±0.544 <sup>#</sup>	0.527±0.192	0.515±0.487 <sup>#</sup>	0.882±0.171	1.80±0.15 <sup>#</sup>	7.61±1.41 <sup>#</sup>
HFD+Lut25	1.679±0.397 <sup>#</sup>	0.496±0.156	0.305±0.224	0.747±0.189	1.72±0.22 <sup>#</sup>	6.77±1.15 <sup>#*</sup>
HFD+Lut50	2.064±0.583 <sup>#</sup>	0.488±0.150	0.712±0.342 <sup>#</sup>	0.773±0.182	1.57±0.11 <sup>#</sup>	7.66±1.31 <sup>#</sup>

<sup>#</sup>  $P < 0.05$ , compared to ND group, \*  $P < 0.05$ , compared to HFD group,  $n = 10$ .

由上表可知，HFD组的TC、LDL-C水平明显高于ND组 ( $P < 0.05$ )，除HFD+lut25组TC、TG、LDL-C较HFD组有降低趋势外，叶黄素对高脂喂养大鼠血脂水平无

明显影响。但肝脏HFD+lut25组TG水平显著低于HFD组 ( $P < 0.05$ )。

### 3.2.3 叶黄素对高脂喂养大鼠肝脏病理学的影响

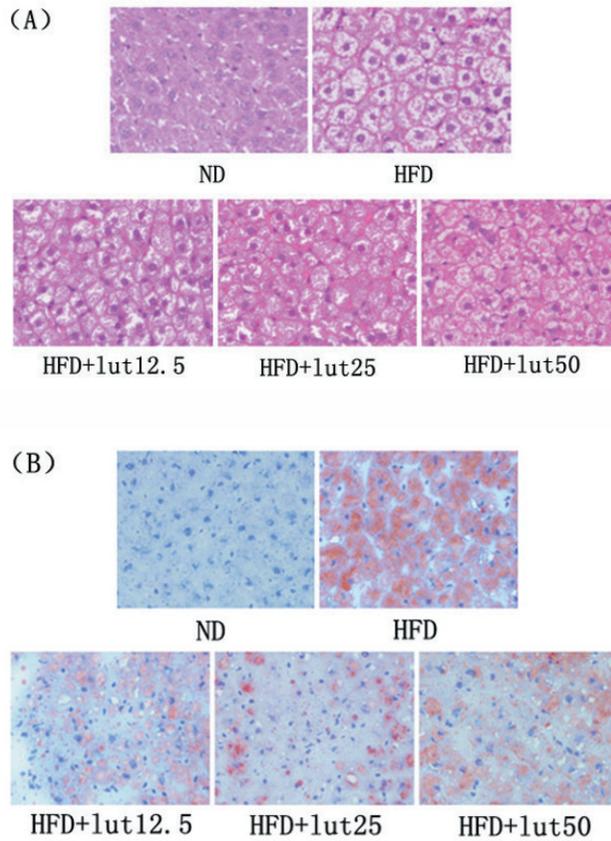


Fig. 4 Effect of lutein on nonalcoholic fatty degeneration in rats fed with HFD.

如 Fig. 4A 所示：叶黄素补充后，各剂量组肝细胞的脂肪变性均得到了明显的改善，较 HFD 组脂肪沉积明显减少。

### 3.2.4 叶黄素对高脂喂养大鼠胰岛素

敏感性的影响

#### 3.2.4.1 叶黄素对高脂喂养大鼠胰岛素耐量的影响

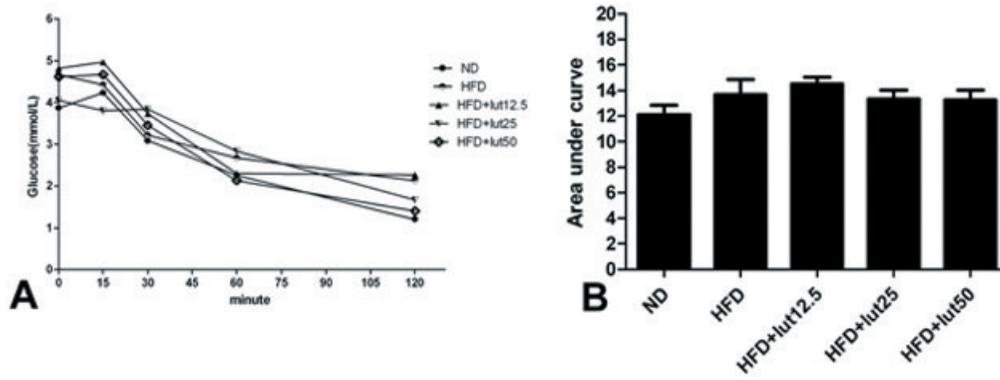


Fig. 5 Effect of lutein on insulin sensitivity in rats fed with HFD,  $n=6$ .

如 Fig. 5A、B 所示胰岛素耐量试验 (insulintolerancetest, ITT) 血糖曲线下面积 (areas under the curves, AUC) 结果表明, HFD+lut25 组和 HFD+lut50 组的曲线下面积

与 HFD 组比有降低趋势。

### 3.2.4.2 叶黄素对高脂喂养大鼠 HOMA 水平的影响

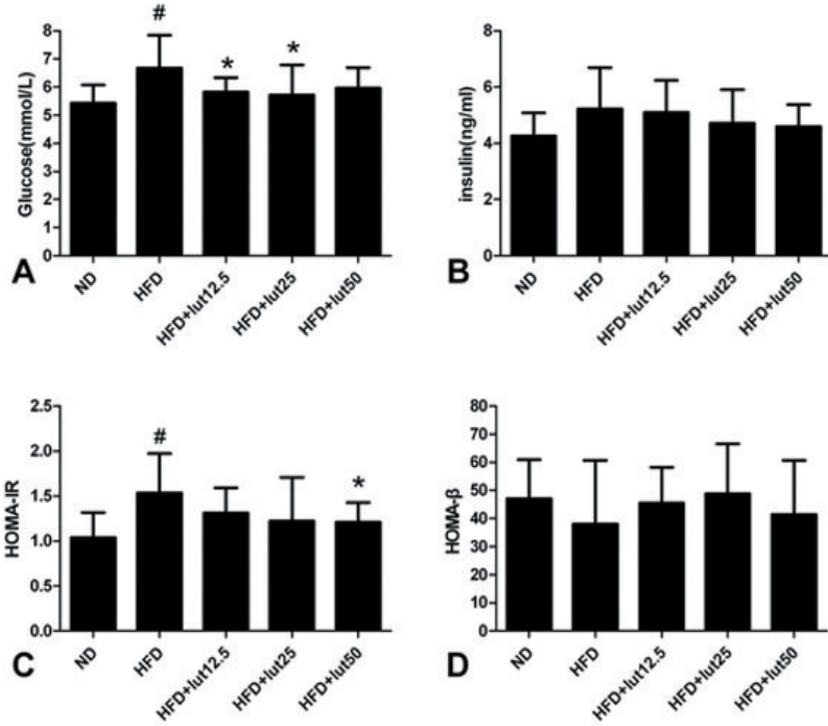


Fig. 6 Effects of lutein on HOMA-IR and HOMA-beta in HFD rats.

<sup>#</sup>  $P < 0.05$ , compared to ND group, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , compared to HFD group;  $n = 10$ .

如 Fig. 6 所示, HFD 组 HOMA-IR 水平明显高于 ND 组 ( $P < 0.05$ ), 叶黄素补充后高脂饲料喂养大鼠 HOMA-IR 水平随叶黄素浓度的升高而呈现降低趋势, 且 HFD+lut50 组有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。叶黄素补充后高脂血症大鼠 HOMA-beta 水平有升高趋势, 叶黄素可能有改善胰岛 beta 细胞功能的作用。

### 3.3.3 叶黄素对高脂喂养大鼠抗氧化水平的影响

大鼠血清 T-SOD 结果表明, HFD 组明显低于 ND 组 ( $P < 0.05$ ), HFD+lutein 组与 HFD 组相比水平升高且有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 叶黄素补充可改善因高脂膳食引起的血清 T-SOD 降低。

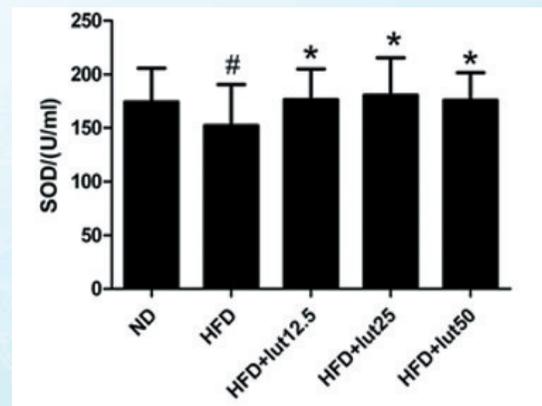


Fig. 7 Effect of lutein on SOD in rats fed with HFD.

<sup>#</sup>  $P < 0.05$ , compared to ND group;

<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , compared to HFD group;  $n = 10$ .

### 3.3.4 叶黄素对高脂喂养大鼠肝脏胰岛素信号传导相关分子的影响

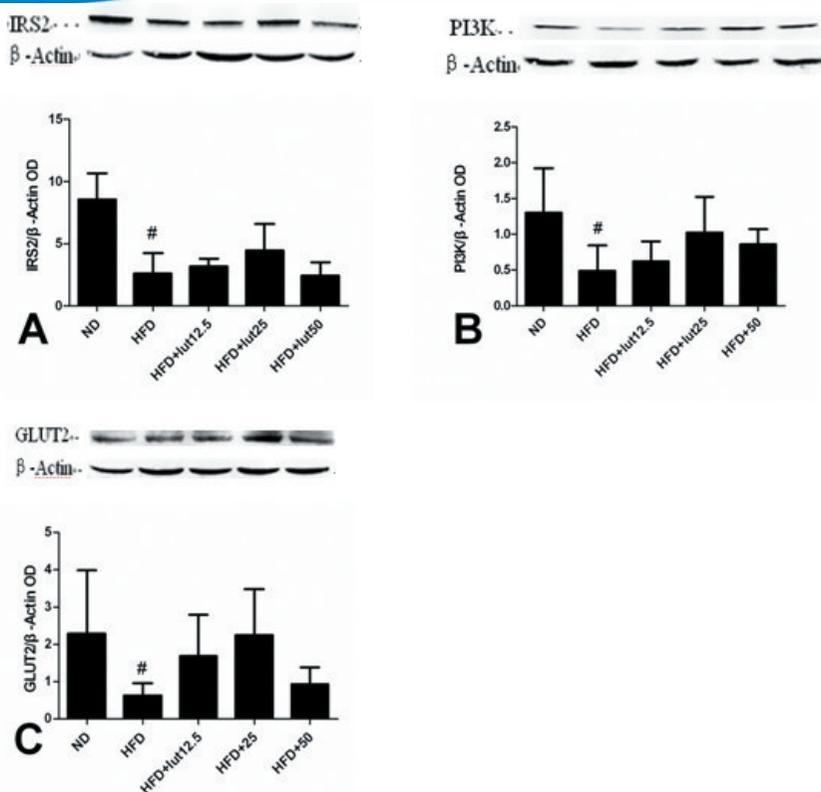


Fig. 8 Effect of lutein on insulin signaling in liver of rats.

<sup>#</sup>  $P < 0.05$ , compared to ND group.

由以上结果可知，与对照组相比，高脂饲料能显著降低 IRS2、PI3K 和 GLUT2 的表达，影响胰岛素信号传导；叶黄素补充可改善胰岛素信号传导分子的表达，且中剂量的改善趋势最明显。

## 4 讨论

胰岛素抵抗 (Insulin Resistance, IR), 即正常或高于正常浓度的胰岛素只能起到低于正常的生理效应, 或者需要超常量的胰岛素才能引起正常量反应的一种状态, 是多种疾病, 尤其是糖尿病和心血管疾病共同的危险因素<sup>[15,16]</sup>。大量流行病学调查研究和动物实验显示, 肥胖是胰岛素抵抗和 2 型糖尿病确定的危险因素<sup>[17-20]</sup>。高脂膳食能引起肥胖和胰岛素抵抗, 因此被广泛用于构建肥胖和胰岛素抵抗的动物模型<sup>[21]</sup>。随着植物化学物对疾病的防治作用及其机制的研究逐渐成为

营养研究领域的热点, 叶黄素因其含有多个共轭双键, 具有较强的抗氧化活性, 日益受到营养研究的关注。先前有研究显示, 血清中叶黄素等类胡萝卜素的含量与空腹血糖、HOMA-IR 以及代谢综合征之间存在负相关的关系<sup>[22-24]</sup>, 但是关于叶黄素的改善机制目前还不清楚。因此, 本实验采用对胆固醇饮食高度敏感的正常雄性 SD 大鼠作为模型动物, 给予高脂饲料喂养, 建立高脂血症模型, 从而研究叶黄素对胰岛素抵抗的影响, 探索其影响机制。

在研究肥胖和胰岛素抵抗关系的过程中, 人们发现腹腔脂肪, 特别是内脏脂肪, 和胰岛素抵抗高度相关<sup>[25]</sup>。本实验发现, 叶黄素虽然能使大鼠的体重增加, 但是却能减少大鼠肾周脂肪和腹壁脂肪的沉积, 且呈现剂量效应关系。表明叶黄素可通过抑制高脂大鼠脂肪组织的脂肪聚集来改善胰岛素抵



抗状态。在对血清和肝脏的 TC、TG 的检测中,虽然叶黄素对血脂水平无明显影响,但是 HFD+lutein 组肝脏 TG 水平则显著降低。进一步的肝脏组织 H&E 及油红 O 染色的结果也显示,与 HFD 组相比,叶黄素能显著改善肝细胞中的脂肪沉积。从病理学的角度确证叶黄素对高脂血症大鼠脂质代谢紊乱也具有改善作用。

体内脂质过多时,活性氧反应引起脂质过氧化作用,损伤抗氧化酶活性,并造成恶性循环,是 2 型糖尿病、心血管疾病及糖、脂代谢紊乱的重要机制之一<sup>[26-28]</sup>。大量的研究证实,在防止老年性黄斑变性中,叶黄素起到了抗氧化的作用<sup>[29-31]</sup>。本次实验通过检测大鼠血清 SOD 的水平发现,与 HFD 组相比,HFD+lutein 组的血清 SOD 水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。说明叶黄素可能是通过升高高脂饲料喂养大鼠血清 SOD 途径来改善氧化应激。

另外,胰岛素耐量试验 (insulintolerant test, ITT) 实验、HOMA-IR 和 HOMA- $\beta$  结果也显示,补充叶黄素的摄入量后,高脂血症大鼠胰岛素抵抗及胰岛素敏感性得到了明显的改善,使得空腹血糖水平出现显著的降低,并且叶黄素可能有改善胰岛  $\beta$  细胞功能的作用。由于胰岛素主要是通过与受体结合而发挥其生理学作用的,因此胰岛素受体的分布可直接影响胰岛素生理功能的发挥。在机体中,有 50% 的胰岛素是与肝细胞上的胰岛素受体结合而发挥作用。所以肝细胞在胰岛素分布、降解、代谢中起着很重要的作用<sup>[32]</sup>。大鼠肝脏的 western blot 结果显示,与 HFD 组相比,HFD+lutein 组的胰岛素信号传导分子的表达量增加,且中剂量组的改善趋势最明显。

综上所述,我们发现,叶黄素可通过抑制高脂大鼠脂肪组织的脂肪聚集和活性氧的作用来有效改善脂质代谢紊乱和胰岛素信号传导分子的表达,从而改善大鼠的胰岛素抵抗状态。

## 参考文献

[1] Zimmet, P. Globalization. Coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the doomsday scenario be averted? *J. Intern. Med.* 247, 301-310 (2000).

[2] Leonor Guariguata. By the numbers: New estimates from the IDF Diabetes Atlas Update for 2012. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 98 (2012): 524-525.

[3] John B, Henry N. Ginsberg, George L. Bakris, et al. primary prevention of cardiovascular diseases in people with diabetes mellitus: A scientific statement from the American heart association and the American diabetes association. *Circulation.* 2007. 115: 114-126.

[4] Paul Zimmet, K. G. M. M. Alberit & Jonathan Shaw. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.* 2012. 414: 782-787.

[5] R. K. Avramoglu, Heather Basciano, Khosrow Adeli. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clinica Chimica Acta.* 2006. 368: 1-19.

[6] Bohm F, Edge R, Truscott G: Interactions of dietary carotenoids with activated (singlet) oxygen and free radicals: potential effects for human health. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56: 205-216.

[7] Kim JH, Na HJ, Kim CK, Kim JY, Ha KS, Lee H, Chung HT, Kwon HJ, Kwon YG, Kim YM: The non-provitamin A carotenoid, lutein, inhibits nf-kappab-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/pten/akt and nf-kappab-inducing kinase pathways: role of h (2) o (2) in nf-kappab activation. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 885-896.

[8] 齐小秋,王宇:中国慢性病报告. 中华人民共和国卫生部疾病预防控制局. 中

国疾病预防控制中心。

[8] McMillan DC, Sattar N, Talwar D, O'Reilly DS, McArdle CS: Changes in micro-nutrient concentrations following anti-inflammatory treatment in patients with gastrointestinal cancer. *Nutrition* 2000; 16: 425-428.

[10] E. S. Ford, J. C. Will, B. A. Bowman, et al. diabetes mellitus and serum carotenoids: findings from the third national health and nutrition examination survey. *Am J Epidemiol.* 1999. 149: 168-176.

[11] Qu DM, Song GY, Gao Y, et al. Expression pattern of PGC-1 $\alpha$  and Mfu2 in insulin resistance state and after recovery in rat. *Jichu Yixue Yu Linchuang.* 2008. 28: 133-137.

[12] Loison C, Mendy F, Serougne C, Lutton C: Dietary myristic acid modifies the hdl-cholesterol concentration and liver scavenger receptor bi expression in the hamster. *Br J Nutr* 2002; 87: 199-210.

[13] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-419.

[14] Reaven GM: Homa-beta in the ukpds and adopt. Is the natural history of type 2 diabetes characterised by a progressive and inexorable loss of insulin secretory function? *Maybe? Maybe not? Diab Vasc Dis Res* 2009; 6: 133-138.

[15] Grundy SM: Pre-diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 2012; 59: 635-643.

[16] Leroith D: Pathophysiology of the metabolic syndrome: implications for the cardiometabolic risks associated with type 2 diabetes. *Am J Med Sci* 2012; 343: 13-16.

[17] Garber AJ (2012) Obesity and type 2 diabetes: which patients are at risk? *Diabetes*

*Obes Metab* 14: 399-408.

[18] Keller U (2006) From obesity to diabetes. *Int J Vitam Nutr Res* 76: 172-177.

[19] Naser KA, Gruber A, Thomson GA (2006) The emerging pandemic of obesity and diabetes: are we doing enough to prevent a disaster? *Int J Clin Pract* 60: 1093-1097.

[20] Seidell JC (2000) Obesity, insulin resistance and diabetes—a worldwide epidemic. *Br J-Nutr* 83 Suppl 1: S5-8.

[21] Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol.* 2006. 36: 485-501.

[22] Earl S. F, Julie C. W, Barbara A. B et al. Diabetes Mellitus and Serum Carotenoids: Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol.* 1999. 149: 168-176.

[23] May A. B, Monal R. S, Xiaoli Chen, et al. Serum Antioxidant Status Is Associated with Metabolic Syndrome among U. S. Adults in Recent National Surveys 1-3. *The Journal of Nutrition.* 2011. 141: 903-913.

[24] May A. B, J. Atilio Canas, Hind A. B, et al. Serum Antioxidant Concentrations and Metabolic Syndrome Are Associated among U. S. Adolescents in Recent National Surveys 1-3. *The Journal of Nutrition.* 2012. 142: 1693-1704.

[25] Despre's JP, Lemieux I, Bergeron J et al. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1039-1049.

[26] Suci I, Negrean V, Sampelean D: The oxidative stress in the development of diabetes chronic complications in the elderly. *Rom J Intern Med* 2004; 42: 395-406.

[27] Bekyarova GY, Ivanova DG, Madjova VH: Molecular mechanisms associating oxi-