

外源性补充酮体对肥胖小鼠心肌线粒体功能及氧化应激的影响

齐宝文 吕 娟 王凤霞 余小林

摘 要 **目的** 探讨外源性补充酮体对肥胖小鼠线粒体功能及氧化应激的影响。**方法** 采用随机分组对照研究的方法,将 C57BL/6J 雄性小鼠给予普通饲料或高脂饲料喂养。12 周后,除普通饲料喂养的对照组,高脂饲料喂养的小鼠随机分为模型组和酮脂灌胃组。酮脂灌胃组使用酮脂灌胃 4 周,对照组和模型组用相同体积 0.9% NaCl 溶液灌胃。统计固定时间点小鼠体质量及血糖变化,采用经皮心脏超声检测小鼠心功能,检测氧化应激相关指标,脂质过氧化终产物丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性及蛋白过氧化水平;使用 Seahorse 能量分析仪测定线粒体呼吸能力。**结果** 与对照组比较,模型组小鼠体质量增长显著;葡萄糖耐受能力明显降低;左心室射血分数和左心室短轴缩短率均下降;心肌线粒体功能受损,体现在基础呼吸和最大呼吸均显著下降。心肌组织 MDA 含量明显增加,SOD 活性大幅降低以及蛋白过氧化水平加深。与模型组比较,酮脂灌胃后的肥胖小鼠心肌线粒体基础呼吸和最大呼吸均增高,MDA 含量有所下降,SOD 活性提高,同时蛋白过氧化水平下降。**结论** 高脂饮食喂养诱导小鼠肥胖表型,伴随心脏线粒体功能损害及氧化应激增强,外源性补充酮体可以减轻肥胖小鼠心肌线粒体损伤,改善心脏氧化应激。

关键词 酮体 肥胖 线粒体 氧化应激

中图分类号 R541

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.02.010

Effects of Exogenous Ketone Body Supplementation on Myocardial Mitochondrial Function and Oxidative Stress in Obese Mice. QI Bao-wen, LV Juan, WANG Fengxia, et al. Ultrasound Department, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Xinjiang 830001, China

Abstract **Objective** To investigate the effects of exogenous ketone body supplementation on mitochondrial function and oxidative stress in obese mice. **Methods** C57BL/6J male mice were fed chow diet or high fat diet in a randomized controlled study. After 12 weeks, except for the control group fed with chow diet, the mice fed with high fat diet were randomly divided into model group and ketone ester intragastric group. Ketone ester was administered in gavage for 4 weeks, and the control group and model group were given the same volume of normal saline in gavage. The changes of body weight and blood glucose in mice at fixed time points were analyzed. Percutaneous cardiac ultrasound was used to detect the cardiac function of mice. The content of malondialdehyde (MDA), the activity of superoxide dismutase (SOD) and the level of protein peroxidation were detected as markers of oxidative stress. Mitochondrial respiratory capacity was measured by a seahorse energy analyzer. **Results** Compared with the control group, the weight of mice in model group increased significantly. Glucose tolerance was significantly reduced. The left ventricular ejection fraction and left ventricular short-axis shortening rate decreased. The function of myocardial mitochondria was impaired, which was reflected in the significant decrease of basal respiration and maximal respiration. MDA content increased significantly, SOD activity decreased significantly and protein peroxidation level deepened. Compared with the model group, the basic and maximum respiration of myocardial mitochondria of obese mice were increased, MDA content was decreased, SOD activity was increased, and protein peroxidation level was decreased. **Conclusion** High-fat diet induced the obesity phenotype of mice, accompanied by the impairment of cardiac mitochondrial function and the enhancement of oxidative stress. Exogenous ketone body supplementation could reduce the myocardial mitochondrial damage and improve cardiac oxidative stress in obese mice.

Key words Ketone bodies; Obesity; Mitochondria; Oxidative stress

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2018D01C111)

作者单位:830001 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院超声科(齐宝文、吕娟),心内科(王凤霞、余小林)

通信作者:余小林,电子信箱:272458511@qq.com

近年来肥胖的患病率在全球范围内显著增加,肥胖患者常常伴随糖/脂代谢异常、内皮功能障碍、缺氧和线粒体功能受损等一系列病理生理改变,上述病理生理改变均会加重心功能障碍^[1]。心脏能量多来自线粒体氧化磷酸化,而损伤的线粒体却是活性氧产生

最主要的场所,活性氧的爆发会极大破坏细胞组分如蛋白质、脂质和 DNA^[2,3]。因此,针对肥胖患者的心肌线粒体保护受到了广泛的重视。

心脏线粒体主要的能量底物包括脂肪酸、葡萄糖、酮体和氨基酸等^[4]。目前对肥胖状态下心肌葡萄糖和脂肪酸的代谢紊乱已解析的较为清楚,但包括酮体在内的小众代谢底物的作用却知之甚少^[5,6]。研究发现某些病理状态下心脏对酮体的依赖增加^[7]。酮脂灌胃可以外源性的补充酮体,一定范围内的高浓度酮体水平在细胞层面被证实可以抑制炎症小体的形成,减少炎症细胞因子的释放,也可以抑制心力衰竭患者的氧化应激,减轻心脏重构^[7-9]。但其对肥胖人群心肌线粒体功能及氧化应激的作用尚不清楚。本研究通过构建肥胖小鼠模型,进而论证外源性补充酮体对心肌线粒体呼吸能力和心肌氧化应激的影响。

材料与方法

1. 主要试剂与仪器:普通饲料:总能量 352kcal/100g,其中蛋白质 25.7%,脂肪 13.8%,碳水化合物 5%,购自斯莱克实验动物有限公司。高脂饲料:总能量 473kcal/100g,其中蛋白质 20.0%,脂肪 45%,碳水化合物 35%,购自江苏美迪森生物医药有限公司。酮脂购自美国 MCE 公司。BCA 蛋白浓度测定试剂盒、组织线粒体分离试剂盒购自上海碧云天生物科技公司。线粒体呼吸测定相关试剂:寡霉素 A (oligomycinA)、抗霉素 A (antimycinA)、腺苷-5'-二磷酸 (ADP) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。OxyblotTM protein oxidation 试剂盒购自美国 Sigma-Aldrich 公司。PVDF 转印膜、ECL 发光液购自美国 Millipore 公司。Seahorse XFe24 能量代谢仪购自美国 Agilent 公司。

2. 动物分组和模型建立:本研究符合《美国 NIH 实验室动物使用指南》的规定,选用 30 只 4 周大雄性 C57BL/6J 小鼠(北京华阜康生物科技股份有限公司)饲养于标准清洁级环境。对照组($n=10$)小鼠给予普通饲料;其他小鼠给予高脂饲料喂养 12 周,每周监测小鼠体质量及进食量。之后将高脂饲料喂养的小鼠随机分为模型组($n=10$)及酮脂灌胃组($n=10$)。酮脂灌胃组使用酮脂(1mg/g)灌胃 4 周,对照组和模型组灌胃等体积 0.9% NaCl 溶液 4 周。

3. 葡萄糖耐量测试:对照组和模型组小鼠禁食 6h,通过尾静脉测量空腹血糖之后,腹腔注射 2g/kg D-葡萄糖,分别在注射后 15、30、60 和 90min,用血糖仪测量尾静脉血糖变化,并计算葡萄糖耐量曲线下面积。

4. 经皮超声检测:彩色多普勒超声观察对照组和模型组小鼠心脏运动。小鼠麻醉诱导后,仰卧位固定于恒温板上,胸前区备皮。设置超声探头的探测深度为 15mm,取胸骨旁左心室短轴切面,稳定小鼠心率在 500 次/分左右,记录并分析 M 模式下小鼠左心室射血分数、左心室短轴缩短率。

5. 心肌线粒体功能检测:使用组织线粒体分离试剂盒分别提取 3 组小鼠心肌组织线粒体,通过 BCA 蛋白检测试剂盒进行线粒体蛋白浓度测定。参照文献[10],使用 Seahorse XFe24 能量代谢仪对心肌线粒体功能进行检测。实验前 1 天水化激活探针板,实验当天配置线粒体测试溶液 (mitochondrial assay solution, MAS) 溶液, MAS 液内加入底物丙酮酸 (10mmol/L)/苹果酸 (5mmol/L),细胞板每孔添加 5 μ g 线粒体及 50 μ l MAS 混合液,离心使线粒体贴壁,之后每孔添加 450 μ l MAS 混合液,于无 CO₂ 37 $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 10min。探针板内依次加入 56 μ l (4mmol/L) ADP, 62 μ l (2.5 μ g/ml) oligomycinA, 69 μ l (4 μ mol/L) FCCP、76 μ l (4 μ mol/L) antimycinA,放入 Seahorse XFe24 分析仪,探针校准后将载有线粒体的细胞板置入进行检测。对得到的线粒体耗氧率 (pmol/min) 进行统计,添加 oligomycinA 之前测得的数值减去添加 antimycinA 之后测得的非线粒体呼吸即线粒体基础呼吸,添加 FCCP 之后测得的数值减去非线粒体呼吸即线粒体最大呼吸。

6. 蛋白质免疫印迹法检测:分别提取 3 组小鼠的心肌总蛋白,BCA 法定量后取 50 μ g 样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳蛋白分离,将 PVDF 膜用 5% 白蛋白在室温下封闭 1h。随后加入一抗溶液,在 4 $^{\circ}$ C 下摇床孵育过夜。次日, TBST 洗膜 3 次,加入二抗溶液室温摇床孵育 1h, TBST 洗膜 3 次后 ECL 法显影。另取 20 μ g 蛋白按照 OxyblotTM Protein Oxidation 试剂盒说明制备样品,电泳后对 DNP 残基显影反映蛋白羰基化程度。用 Image J 测得总蛋白羰基化灰度值和内参蛋白 GAPDH 灰度值之比作为总蛋白过氧化的相对表达值。

7. MDA 与 SOD 检测:3 组小鼠分别取 20mg 心肌组织,加入裂解液匀浆后, 10000 $\times$ g 离心 10min 取上清后按照 MDA 含量检测试剂盒和 SOD 活性检测试剂盒说明进行操作。上清液蛋白浓度使用 BCA 法定量校正后得到 MDA 含量 (μ mol/g) 及 SOD 活性 (U/g)。

8. 统计学方法:采用 GraphPad Prism 8.0 统计学软件对数据进行统计分析。所有数据都以均数 $\pm$ 标

准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用非配对双尾 Student *t* 检验对两组之间计量资料进行分析,使用重复测量单因素方差分析结合 *Sidak* 检验对成组数据进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 高脂饮食诱导与葡萄糖耐量检测:给予4周大

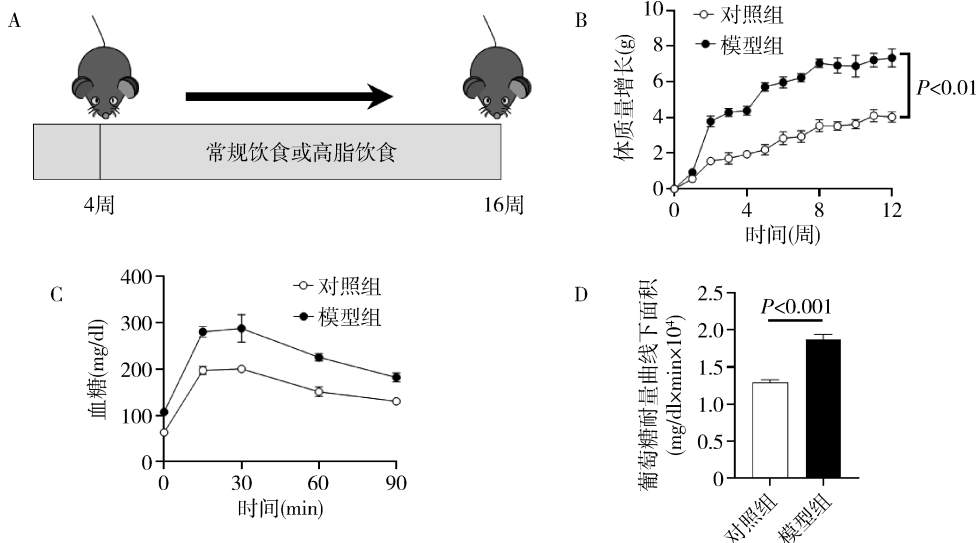


图1 高脂饮食喂养小鼠12周构建肥胖模型

A. 构建肥胖小鼠模型示意图;B. 每周体质量增长情况;C. 葡萄糖耐受能力试验, 血糖浓度的变化情况;D. 血糖随时间的变化计算的曲线下面积

2. 肥胖小鼠心功能评估:于16周行经胸部超声检测小鼠心脏收缩功能(图2A),与对照组比较,模

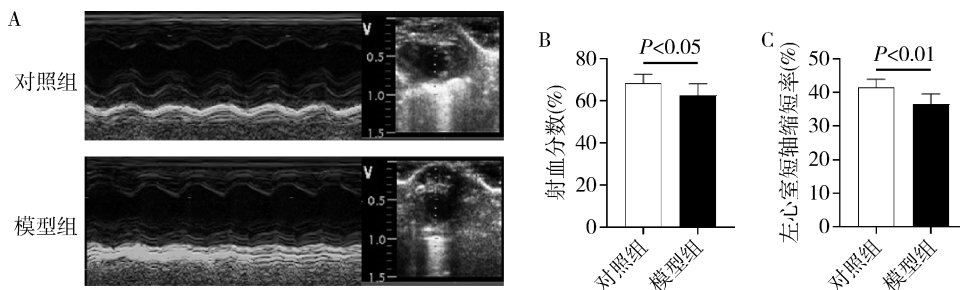


图2 高脂饮食喂养小鼠心功能变化

A. 代表性小鼠心脏超声;B. 左心室射血分数($n = 10$);C. 左心室短轴缩短率($n = 10$)

3. 酮脂灌胃对肥胖小鼠线粒体呼吸功能与氧化应激的作用;Seahorse 能量代谢仪检测结果显示(图3中A~C),与对照组比较,模型组小鼠心脏线粒体有氧呼吸显著降低,包括ADP激发的基础呼吸和FCCP激发的最大呼吸(P 均 < 0.01);与模型组比较,酮脂灌胃的小鼠线粒体呼吸得到改善,ADP激发的基础呼吸和FCCP激发的最大呼吸均明显提高(P 值分别为 < 0.05 、 < 0.01)。氧化应激相关指标检测包括

小鼠高脂饮食喂养12周,构建肥胖小鼠模型(图1A)。在每日食物摄入量相似的情况下,高脂饮食喂养的小鼠体质量增幅比对照组小鼠体质量增幅更大($P < 0.01$,图1B);葡萄糖耐量检测结果显示,与对照组小鼠比较,模型组小鼠葡萄糖耐受能力明显下降($P < 0.001$,图1中C、D)。

型组心脏左心室射血分数有所下降($P < 0.05$,图2B),左心室短轴缩短率明显下降($P < 0.01$,图2C)。

(图3中D~G)心肌组织脂质过氧化终产物MDA含量、SOD活性及蛋白羰基化水平,结果提示,与对照组比较,模型组MDA含量大幅上升($P < 0.001$),SOD活性明显下降($P < 0.001$),蛋白羰基化更显著($P < 0.01$);与模型组比较,酮脂灌胃组心脏MDA含量减少($P < 0.01$),SOD活性有一定提高($P < 0.01$),蛋白羰基化水平降低($P < 0.05$)。

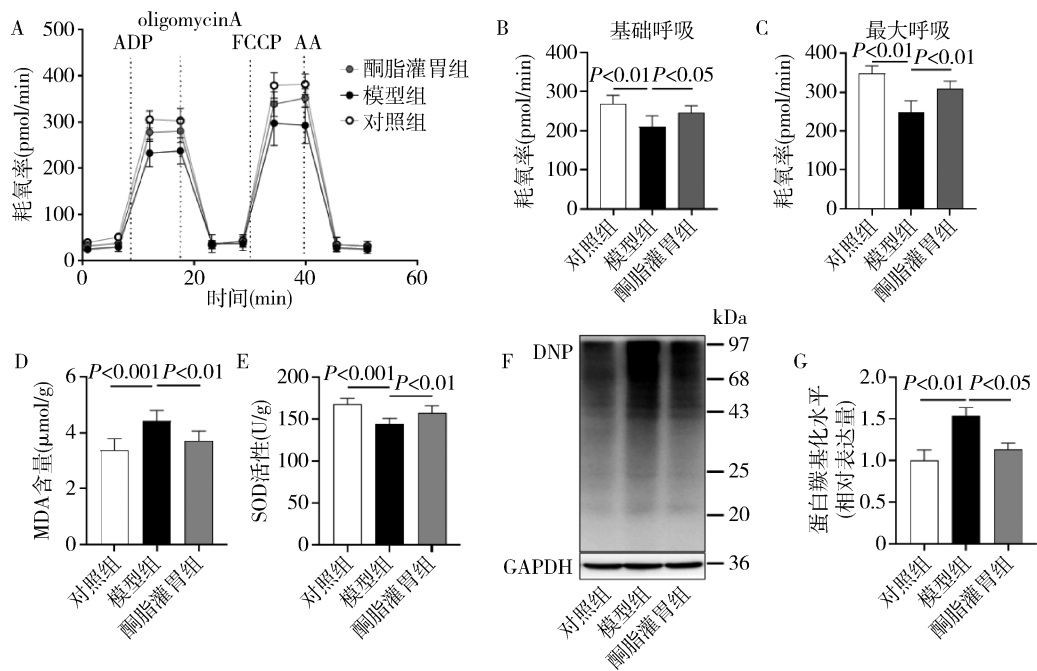


图3 第16周各组小鼠心肌线粒体功能及氧化应激相关指标的比较

A. 丙酮酸和苹果酸为底物的线粒体有氧呼吸曲线 ($n=5$); B. ADP 激发的基础呼吸 ($n=5$); C. FCCP 激发的最大呼吸 ($n=5$); D. 心肌丙二醛含量 ($n=5$); E. 心肌超氧化物歧化酶活性 ($n=5$); F. 代表性心肌羰基化修饰蛋白印迹图; G. 羰基化修饰蛋白水平 ($n=5$)

讨 论

在本研究中,通过 12 周高脂饮食喂养,观察到小鼠体重明显上升,伴随葡萄糖耐量能力下降,认为小鼠肥胖模型诱导成功^[11]。通过心脏超声检测发现,与正常小鼠比较,肥胖小鼠左心室射血分数及左心室短轴缩短率下降,提示心功能受损。心脏功能异常与心肌线粒体功能损伤关系密切,正常线粒体发挥主要功能的是复合体 I,利用 Seahorse 能量代谢仪检测到肥胖小鼠由复合体 I 的底物丙酮酸和苹果酸驱动的线粒体呼吸受损^[12]。

细胞内线粒体氧化底物供能的同时也不可避免产生副产物活性氧簇,过量活性氧的产生超过细胞抗氧化系统的代偿能力时会引起心肌结构和功能的改变^[13, 14]。肥胖作为一种代谢性的疾病,病理机制非常复杂,其中由于局部的氧化应激增强引起的线粒体功能障碍对于细胞和组织是非常不利的^[6, 15]。因此本研究试图将肥胖这一以代谢改变为主的综合征,与心肌氧化应激及线粒体功能损伤联系起来,找到有效干预措施来减轻肥胖小鼠的心肌氧化应激,改善线粒体功能。

健康心脏首选的能量底物是乙酰辅酶 A (脂肪酸的主要代谢物),某些病理情况下,心脏对脂肪酸的利用减少,能量供应不足导致心脏代谢重编程,对酮

体利用增加^[16]。研究证实,酮体除了可以在营养缺乏和低碳水化合物饮食的过程中作为大脑、心脏、骨骼肌等肝外组织的替代能源,还可以作为信号转导介质、蛋白质翻译后修饰的驱动因子^[16, 17]。

外源性补充酮脂能有效提高循环酮体水平,包括 β -羟基丁酸、乙酰乙酸酯和丙酮^[17]。有研究发现,在人胚胎肾细胞, β -羟基丁酸可以通过促进组蛋白乙酰化来增加抗氧化基因的表达,从而减轻细胞氧化应激,也有研究发现运动员在服用含酮脂的饮料后身体耐力和运动表现都得到了提高。总之,酮体的作用已经在细胞、动物及在体层面都得到了解释。但尚未有研究针对肥胖人群探讨外源性补充酮体对心脏的影响^[18]。因此本研究通过构建肥胖小鼠模型,发现灌胃酮脂使得肥胖小鼠心肌组织线粒体呼吸功能得到改善,蛋白过氧化即蛋白羰基化水平显著降低,脂质过氧化终产物丙二醛含量也明显降低,伴随超氧化物歧化酶活性的提高,从多角度证明了外源性补充酮体对肥胖小鼠心脏氧化应激及线粒体有氧呼吸的改善作用。

本研究也存在一定的不足,酮体对肥胖小鼠心脏氧化应激的保护作用,可以扩展到其他组织进行全身性的探索。此外酮体减轻心脏氧化应激的具体机制,还需要对照相关通路进行深入研究予以证实。

参考文献

- Schulze MB. Metabolic health in normal – weight and obese individuals[J]. Diabetologia, 2019, 62(4): 558 – 566
- Piché ME, Tchernof A, Després JP. Obesity phenotypes, diabetes, and cardiovascular diseases[J]. Circ Res, 2020, 126(11): 1477 – 1500
- Eckel RH, Bornfeldt KE, Goldberg IJ. Cardiovascular disease in diabetes, beyond glucose[J]. Cell Metab, 2021, 33(8): 1519 – 1545
- 谢玉霞, 姜海兵, 杨洁, 等. 线粒体 ATP 敏感性钾离子通道开放剂对冠心病大鼠心肌细胞影响及机制研究[J]. 医学研究杂志, 2020, 49(3): 65 – 69
- Dorn GW 2nd. Evolving concepts of mitochondrial dynamics[J]. Annu Rev Physiol, 2019, 81: 1 – 17
- Murashige D, Jang C, Neinst M, et al. Comprehensive quantification of fuel use by the failing and nonfailing human heart[J]. Science, 2020, 370(6514): 364 – 368
- Selvaraj S, Kelly DP, Margulies KB. Implications of altered ketone metabolism and therapeutic ketosis in heart failure[J]. Circulation, 2020, 141(22): 1800 – 1812
- 倪健, 唐其柱. 酮体代谢对心脏疾病影响的研究进展[J]. 中华心血管病杂志, 2018, 46(3): 243 – 246
- Deng Y, Xie M, Li Q, et al. Targeting mitochondria – inflammation circuit by β – hydroxybutyrate mitigates HFpEF[J]. Circ Res, 2021, 128(2): 232 – 245
- Underwood E, Redell JB, Zhao J, et al. A method for assessing tissue respiration in anatomically defined brain regions[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 13179
- Li J, Wu H, Liu Y, et al. High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR[J]. Exp Anim, 2020, 69(3): 326 – 335
- Kumar AA, Kelly DP, Chirinos JA. Mitochondrial dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction[J]. Circulation, 2019, 139(11): 1435 – 1450
- Zhou B, Tian R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure[J]. J Clin Invest, 2018, 128(9): 3716 – 3726
- Peoples JN, Saraf A, Ghazal N, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease[J]. Exp Mol Med, 2019, 51(12): 1 – 13
- 吴庆, 薛润青, 徐曼, 等. 肥胖所致心肌重构及相关线粒体稳态失衡机制研究进展[J]. 生理学报, 2019, 71(2): 216 – 224
- Puchalska P, Crawford PA. Multi – dimensional roles of ketone bodies in fuel metabolism, signaling, and therapeutics [J]. Cell Metab, 2017, 25(2): 262 – 284
- Murphy NE, Carrigan CT, Margolis LM. High – Fat ketogenic diets and physical performance: a systematic review[J]. Adv Nutr, 2021, 12(1): 223 – 233
- Campisi J, Kapahi P, Lithgow GJ, et al. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing[J]. Nature, 2019, 571(7764): 183 – 192

(收稿日期: 2021 – 08 – 22)

(修回日期: 2021 – 09 – 15)

姜黄素对阿尔茨海默病模型大鼠海马区 GSK3 β 蛋白表达的影响

俞柏翎 叶茂盛 潘 锋 周 勇 邴旦明

摘 要 **目的** 探讨姜黄素对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆及海马区糖原合成酶激酶 3 β (GSK3 β) 蛋白表达的影响。**方法** 将 60 只 SD 雄性大鼠分为 4 组,即假手术组、A β 模型组、低剂量姜黄素干预组和高剂量姜黄素干预组。假手术组注射生理盐水,模型组和干预组直接注射 A β_{1-42} 于大鼠海马区,姜黄素干预组分别采用剂量 150、300mg/kg 姜黄素给予大鼠连续灌胃 30 天。采用 Morris 水迷宫测试大鼠学习记忆能力,比较 GSK3 β 蛋白表达阳性细胞的单位面积和平均吸光度值,采用 Western blot 法检测 GSK3 β 蛋白表达水平。**结果** 与假手术组、模型组比较,姜黄素干预组大鼠的逃避潜伏时间和穿越平台次数均有显著改善 ($P < 0.05$)。姜黄素干预组大鼠海马区 GSK3 β 蛋白表达均明显减弱,其阳性面积单位和平均吸光度值均低于 A β 模型组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 姜黄素可明显改善阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆能力,抑制大鼠海马区 GSK3 β 蛋白的表达,改善 A β 诱导的神经细胞损伤。

关键词 阿尔茨海默病 姜黄素 GSK3 β 蛋白 细胞凋亡**中图分类号** R741**文献标识码** A**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.02.011

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2018KY604)

作者单位:310003 杭州,浙江省中西医结合医院老年病科

通信作者:叶茂盛,电子信箱:maoshengyea@126.com