

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000554

高脂饮食所致母代超重对子代体质量和下丘脑摄食神经通路的影响

于 洋¹, 李继斌², 章誉尧¹, 柴水琴¹, 王 恒¹, 肖晓秋¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院脂糖代谢实验室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学公共卫生与管理学院营养与食品卫生学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:以高脂饮食诱导的雌性大鼠为模型,探讨母代超重对子代体质量和下丘脑摄食神经通路的影响及其机制。**方法:**雌性 SD 大鼠,高脂饲料喂养 14 周,建立母代超重模型,与健康成年雄鼠交配,子代于出生第 21 天断奶后给予正常饲料喂养,分别在动物幼年期(40 d)和成年期(160 d)处死动物。测定并比较 2 组子代出生、幼年期、成年期体质量及体器官质量。免疫组织化学染色观察下丘脑弓状核部位促进食欲的神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)和抑制食欲的阿片促黑色素原(proopiomelanocortin, POMC)表达。**结果:**超重母鼠子代有较高的出生体质量($t=4.18, P=0.000$),且动物幼年期雄性($t=3.46, P=0.009$)和雌性($t=21.99, P=0.000$)体质量均明显高于对照组子代,动物成年期雄性($t=2.69, P=0.028$)和雌性($t=2.49, P=0.037$)体质量虽仍高于对照组子代,但有向正常发展的趋势。高脂组子代体内性腺周围脂肪含量在幼年期($t=3.03, P=0.007$)和成年期($t=2.40, P=0.027$)均较对照组子代增多。免疫组织化学结果显示高脂组子代在幼年期及成年期下丘脑弓状核部位 NPY 表达均增多, POMC 表达在两组间未见明显差异。**结论:**高脂饮食诱导的母代超重可加重子代出生初期和幼年期肥胖的发生风险,但随着时间的推移,子代动物的体质量逐渐趋于正常,其作用机制可能与影响子代下丘脑摄食神经通路的正常调控有关。

【关键词】超重;肥胖;子代;下丘脑**【中图分类号】**R589**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-11-27

High fat diet-induced maternal overweight predisposes higher body weight and altered hypothalamic feeding neural pathway in the offspring

Yu Yang¹, Li Jibin², Zhang Yuyao¹, Chai Shuiqin¹, Wang Heng¹, Xiao Xiaochu¹

(1. Laboratory of Lipid & Glucose Metabolism, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Teaching and Research Section of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To examine the influences of high fat diet-induced maternal overweight on the development of obesity in the offspring and the potential molecular mechanisms with focus on the changes of hypothalamic feeding circuitry. **Methods:** Female SD rats were allowed to either high fat (HF) diet or normal chow (NC) diet for 14 weeks, and then mated with healthy male rats. The offspring born to HF or NC dams (designated as HF-O or NC-O) were assigned to normal chow diet. Birth weight and body weight of HF-O and NC-O were measured. Animals were sacrificed on postnatal day 40 and 160 (P40 and P160). The characteristics of orexigenic NPY (Neuropeptide Y) and anorexigenic POMC (Proopiomelanocortin) expression in the hypothalamus were determined by immunohistochemical staining. **Results:** Compared with NC-O, HF-O had higher birth weight ($t=4.18, P=0.000$), and higher body weight during childhood in male ($t=3.46, P=0.009$) and female ($t=21.99, P=0.000$). But HF-O tended to have normal body weights in male

($t=2.69, P=0.028$) and female ($t=2.49, P=0.037$) during adulthood although still higher than NC-O. HF-O also increased gonadal fat pad weight during childhood ($t=3.03, P=0.007$) and adulthood ($t=2.40, P=0.027$) compared with NC-O. Immunohistochemical staining showed the NPY levels were increased in the hypothalamic arcuate nucleus of HF-O compared with NC-O, but there was no significant change of POMC expression be-

作者介绍: 于 洋, Email: yuxiaoting5068@163.com,

研究方向: 内分泌与代谢。

通信作者: 肖晓秋, Email: xiaoxq@cqmu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (编号: 81270947); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (博导类) (编号: 20115503110008)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150310.2148.007.html> (2015-03-10)

tween the groups, both during childhood and adulthood. **Conclusion:** High fat diet-induced maternal overweight predisposes obese development in the offspring, especially at the beginning of the birth and childhood stage, which may possibly be associated with the altered hypothalamic feeding neural pathways.

【Key words】overweight; obesity; offspring; hypothalamus

随着人们生活方式的改变,高脂肪高能量的饮食结构导致肥胖发病率迅速上升,暴露于超重及肥胖的孕龄期女性人数也不断增加,我国成年女性的超重率和肥胖率已达到 29.7% 和 12.1%^[1]。

肥胖发生最基本的原因是能量摄取与能量支出的平衡失调。下丘脑是调控能量平衡的中枢,其摄食调节神经元功能紊乱,是肥胖形成的关键环节^[2]。下丘脑弓状核(arcuate nucleus of hypothalamus, ARH)富含食欲增强和食欲抑制两大类神经元,神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY)是主要的食欲增强神经肽,阿片促黑色素原(proopiomelanocortin, POMC)则为主要的食欲抑制神经肽。当机体处于饥饿状态时, NPY 分泌增加,刺激机体产生进食行为;当机体处于饱腹状态时, ARH 摄食调控因子的表达量发生改变,使 POMC 分泌增多、NPY 分泌减少,通过抑制食欲进而控制食物的摄入来调节能量平衡^[3-4]。

母亲超重或肥胖造成宫内环境的改变,导致胎儿暴露在异常调控的生长环境中,使子代易发各种代谢性疾病^[5],胚胎期是 NPY 和 POMC 分泌及其神经调控环路形成的关键时期^[6],母代超重对子代下丘脑摄食调节肽的影响及潜在机制目前研究尚不充分。本研究采用高脂饮食诱导雌性大鼠超重模型,观察母代体质量增加对子代各时期体质量的影响及下丘脑关键摄食调节肽分泌特点,为母代超重所致不良结局的干预提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 所选取的 3 周龄雌性 SD 大鼠由重庆医科大学动物中心提供(许可证编号:SCXK(渝)2007-0001),饲养于 SPF 动物房,给予充足的饮水和食物。本研究得到作者所在单位实验动物伦理委员会的审查批准。

1.1.2 动物饲料 实验所用高脂饲料(D12451)、对照饲料(D12450B)均购自美国 Research Diets 公司。高脂饲料配方为 24%蛋白质,41%碳水化合物,24%脂肪,供能比例分别为

20%、35%和 45%;对照饲料配方为 19.2%蛋白质,67.3%碳水化合物,4.3%脂肪,供能比例分别为 20%、70%和 10%。

1.1.3 主要试剂 NPY 抗体[Neuropeptide Y (D7Y5A)XP® Rabbit mAb, #11976],购自美国 Cell Signaling Technology 公司;POMC 抗体(Anti-Proopiomelanocortin/POMC antibody produced in goat, SAB2500826),购自美国 Sigma 公司;免疫组化染色试剂盒为 PV-9000 二步法免疫组化检测试剂,购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 母代超重模型的建立 20 只 3 周龄雌性 SD 大鼠随机分为高脂饮食(high fat diet, HF)组和对照饮食(normal chow, NC)组,高脂组 12 只,对照组 8 只。持续喂养 14 周,选取高脂组体质量大于对照组 15%的大鼠作为母代超重模型。

1.2.2 子代模型的建立 高脂组母代和对照组母代分别与正常饲料喂养的健康雄性大鼠合笼交配。母代鼠孕期均采用正常饲料喂养至生产。高脂组子代(offspring of high fat diet mothers, 标记为 HF-O)和对照组子代(offspring of normal chow diet mothers, 标记为 NC-O)均选出生只数为 8~13 只的幼鼠用于后续实验。出生当天记为第 1 天,在幼鼠出生第 3 天调整只数为每窝 10、11 只,并尽量保证雌雄数量均等。至 21 天断乳后给予正常饲料喂养,各组随机保留雄鼠 10 只,雌鼠 10 只。

1.2.3 子代动物体质量监测 测定子代动物出生、幼年期(40 d 龄, P40)和成年期(160 d 龄, P160)体质量。

1.2.4 子代动物内脏器官质量测定 分别于子代动物幼年期和成年期处死动物(每批次雄鼠雌鼠各 5 只),测定内脏器官(包括肝、胰腺、性腺周围脂肪等)质量。

1.2.5 免疫组化观察下丘脑弓状核部位神经肽表达 动物禁食 16 h 后,再喂食 1 h,之后采用 10%水合氯醛 0.4 ml/100 g 腹腔注射麻醉动物,麻醉好的动物固定于鼠板上,剪开胸腔暴露心脏,将头皮针从左心尖(左心室)插入,剪开右心耳,推注 PBS 缓冲液,直至右心耳流出清亮液体,此时开始推注 4%多聚甲醛直至动物身体僵硬为止。将动物断头取脑,置于 4%多聚甲醛中固定 48~72 h,脱水,石蜡包埋切片,切片厚度为 0.45 μm 。免疫组织化学染色观察下丘脑弓状核部位 NPY 和 POMC 表达。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学分析。数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用两独立样本 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 高脂喂养诱导母代超重模型

本研究以实验组体质量比对照组平均体质量增加 15% 作为大鼠超重标准,超过 20% 为肥胖。选取符合实验要求的母代鼠,高脂组和对照组各 5 只。初始体质量对照组平均 (55.08 ± 6.36) g,高脂组平均 (54.50 ± 6.17) g,2 组间体质量无差异 ($t=0.15, P=0.887$),见图 1A。分别采用 2 种饲料喂养 14 周后,明显可见高脂组体质量逐渐高于对照组,且随着时间的推移差距增大,见图 1B。14 周后,对照组平均体质量 (254.80 ± 6.53) g,高脂组平均体质量 (297.40 ± 8.65) g,高脂组体质量比对照组增加 17%,母代妊娠前体质量差异明显 ($t=8.79, P=0.000$),见图 1C。

2.2 母代超重对子代体质量的影响

与对照组子代相比,高脂组子代明显具有较高的出生体质量 ($t=5.21, P=0.000$)。比较两组幼年期处死前体质量可见,高脂组子代体质量与对照组相比增加 20% 以上 (其中雄性

41.57%,雌性 71.79%),表现出明显的肥胖特征。比较两组成年期体质量发现,实验组雄性体质量增加 17%,符合超重标准;但实验组雌性体质量增加仅为 11%,非常接近正常。表明高脂组子代各时期体质量虽然均高于对照组,但随着时间的推移,超重母鼠子代的体质量有逐步趋向正常发展的趋势,这一特征在雌性动物中表现尤为明显。具体结果见表 1。

2.3 高脂组子代性腺周围脂肪含量增加

比较子代幼年期脏器质量发现,高脂组子代肝 ($t=0.82, P=0.422$) 和胰 ($t=0.81, P=0.431$) 质量与对照组子代相比均无明显差异,但性腺周围脂肪含量明显增多 ($t=3.03, P=0.007$)。比较成年期脏器质量可见,高脂组子代肝质量与对照组相比仍无明显差异 ($t=1.61, P=0.124$),但胰质量 ($t=2.54, P=0.020$) 和性腺周围脂肪含量均明显升高 ($t=2.40, P=0.027$)。分析结果见表 2。

2.4 高脂组子代下丘脑弓状核 NPY 表达增多

免疫组化结果显示,在子代幼年期,高脂组动物下丘脑弓状核部位 NPY 染色较对照组颜色深,且染色范围更广,可视为 NPY 表达较多 (图 2A)。观察同时期的 POMC 染色,两

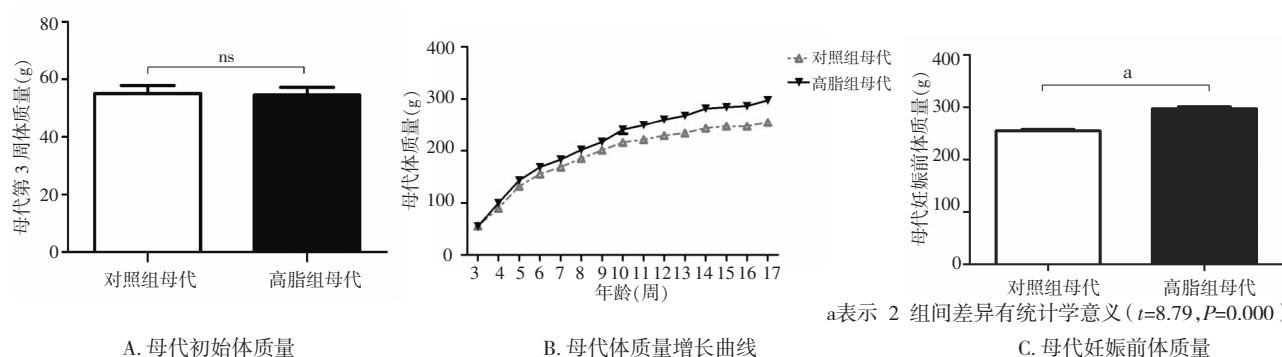


图1 母代体质量比较 ($n=5$)

Fig.1 Body weight of maternal rats ($n=5$)

表1 子代体质量比较 ($\bar{x} \pm s, g$)

Tab.1 Body weight of offspring rats ($\bar{x} \pm s, g$)

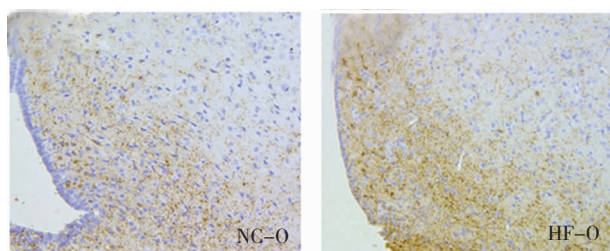
组别	出生体质量 ($n=30$)	幼年期		成年期	
		雄性($n=5$)	雌性($n=5$)	雄性($n=5$)	雌性($n=5$)
NC-O	6.42 ± 0.53	27.86 ± 7.35	21.98 ± 1.08	345.18 ± 39.86	241.50 ± 19.81
HF-O	7.22 ± 0.66	39.44 ± 1.37	37.76 ± 1.19	404.80 ± 29.48	268.06 ± 13.26
t 值	5.21	3.46	21.99	2.69	2.49
P 值	0.000	0.009	0.000	0.028	0.037

表2 子代脏器质量值 ($\bar{x} \pm s, g$)

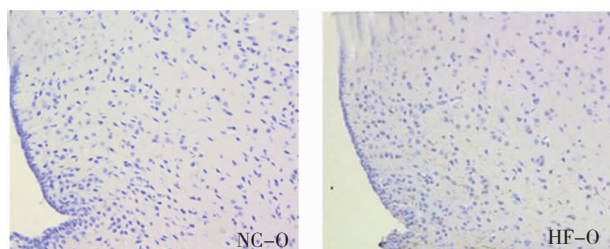
Tab.2 Organ weight of offspring rats ($\bar{x} \pm s, g$)

组别	幼年期($n=10$)			成年期($n=10$)		
	肝重	胰重	脂肪重	肝重	胰重	脂肪重
NC-O	6.34 ± 0.50	0.52 ± 0.06	1.22 ± 0.30	9.23 ± 1.50	1.03 ± 0.20	3.61 ± 0.71
HF-O	6.63 ± 1.00	0.49 ± 0.10	1.68 ± 0.37	10.36 ± 1.65	1.35 ± 0.35	4.37 ± 0.72
t 值	0.82	0.81	3.03	1.61	2.54	2.40
P 值	0.422	0.431	0.007	0.124	0.020	0.027

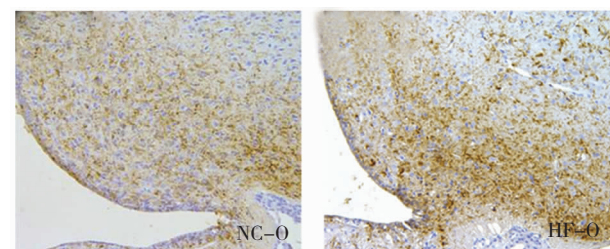
组间无明显差异(图 2B)。成年期高脂组子代 NPY 阳性染色细胞仍较对照组明显增多(图 2C),但 POMC 染色与对照组相比颜色深浅及范围相近,表达改变不明显(图 2D)。



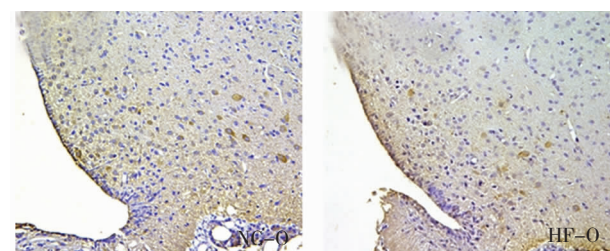
A. 子代幼年期弓状核 NPY 染色图



B. 子代幼年期弓状核 POMC 染色图



C. 子代成年期弓状核 NPY 染色图



D. 子代成年期弓状核 POMC 染色图

图 2 子代动物下丘脑弓状核部位免疫组化染色结果 (200 ×)

Fig.2 Immunohistochemical results in arcuate nucleus of hypothalamus of offspring rats (200 ×)

3 讨论

育龄期妇女超重或肥胖能导致多种不良结果,如排卵功能障碍、不孕、流产、难产、早产、先兆子痫,以及妊娠期糖尿病等^[7]。此外,育龄期妇女超重肥胖也将影响下一代的健康。随着生活方式的转变,育龄期妇女超重和肥胖的发生率明显增加。有

研究表明,母亲妊娠期及哺乳期进食高脂饮食影响子代弓状核瘦素敏感性,使子代易发肥胖^[8]。生命早期的营养状况对个体生长发育具有重要影响^[9],本研究通过选取产仔数相近的子代和调整每窝哺乳幼崽数,以避免早期营养状况的差异对实验结果产生影响^[10]。胚胎期是下丘脑 NPY 和 POMC 形成的关键时期^[5],早期营养环境对摄食相关神经元正常发育具有重要影响。母代超重或肥胖引起宫内环境改变,可能通过影响子代下丘脑摄食神经通路的发育,最终导致子代肥胖的发生。为避免进食状况对摄食相关神经肽表达的影响,实验操作中采取了禁食再喂食^[11]处理。

本研究发现超重母亲子代出生体质量、幼年期及成年期体质量均高于正常对照组;同时,高脂组子代性腺周围脂肪含量亦高于对照组子代,提示高脂饮食诱导的母代超重可影响子代各时期体质量。肥胖的发生与下丘脑摄食神经通路的异常调控有关,高脂组子代弓状核部位 NPY 表达增多,使得动物摄食行为异常,可能是子代易发肥胖的原因之一。

但同时实验数据表明,母代超重增加子代肥胖的发生风险,主要表现为子代的高出生体质量和幼年期肥胖,随着年龄的增长,子代体质量有逐步向正常发展的趋势。能量摄取与能量支出的平衡失调是肥胖发生最基本的原因,超重母亲的子代下丘脑 NPY 表达增多,使子代进食增多,发生肥胖。在子代成长发育过程中,受能量代谢失衡的刺激,个体可能会代偿性的增加能量支出以平衡能量收支。故而出现在上述结果,可能的原因有:(1)母代超重对子代的影响有限;(2)子代出生后,环境的调控或表观遗传学的改变可能参与了其体质量的调节,较为有效的扭转了由于先天影响所致的不利结局。另外,子代进食和消化吸收存在差异,以及实验观察动物数量偏低(每组 5 只)也有可能对实验结果存在一定的影响。

超重母鼠子代幼年期及成年期下丘脑弓状核部位 NPY 阳性染色细胞均比对照组多,表明肥胖的发生与下丘脑摄食神经通路的异常调控有关。但是随着时间的推移,超重母鼠子代的体质量逐步趋向正常,而超重母鼠子代成年期下丘脑弓状核部位 NPY 阳性染色细胞仍比对照组多,提示实验组子代鼠体质量的变化可能不仅仅受 NPY 的调控,还有另外一些控制饮食或者能量代谢的相关因素影响^[12-13]。有效

选择更为适当的分子机制指标进行观察,是本实验后续开展中一个较为重大的突破口。

此外,本研究还发现高脂组后代成年期胰质量高于对照组,与其他报道结果一致^[14],但超重和肥胖对胰腺功能的影响及其相关机制有待进一步研究。

综上所述,本研究结果提示高脂饮食所致母代超重可加重子代出生初期和幼年期肥胖的发生风险,但随着时间的推移,子代动物的体质量有趋向正常发展的趋势,其作用机制可能与影响子代下丘脑摄食神经通路的正常调控有关。女性围产期超重或肥胖可造成“母代-子代”双重不利影响,控制育龄期女性体质量已成为一个亟待解决的公共卫生问题。目前普遍较为接受的办法是通过限制能量摄入、增加能量消耗等方式来进行有效的体质量控制,进而减少或避免不利的生殖结局^[15]。有效的管理孕期体质量,进一步探讨母代超重或肥胖影响子代肥胖发生的具体分子机制,有望从源头上控制肥胖的发生,改善母子两代人的健康。

参 考 文 献

- [1] Zhang F, Dong L, Zhang CP, et al. Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus in Chinese women from 1999 to 2008[J]. *Diabet Med*, 2011, 28(6): 652-657.
- [2] Stefanidis A, Wiedmann NM, Adler ES, et al. Hypothalamic control of adipose tissue[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2014, 28(5): 685-701.
- [3] Zheng F, Kim YJ, Chao PT, et al. Overexpression of neuropeptide Y in the dorsomedial hypothalamus causes hyperphagia and obesity in rats[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2013, 21(6): 1086-1092.
- [4] Wardlaw SL. Hypothalamic proopiomelanocortin processing and the regulation of energy balance[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 660(1): 213-219.
- [5] Chen H, Simar D, Morris MJ. Maternal obesity impairs brain glucose metabolism and neural response to hyperglycemia in male rat offspring[J]. *J Neurochem*, 2014, 129(2): 297-303.
- [6] Padilla SL, Carmody JS, Zeltser LM. Pomc-expressing progenitors give rise to antagonistic populations in hypothalamic feeding circuits[J]. *Nat Med*, 2010, 16(4): 403-405.
- [7] Fisher SC, Kim SY, Sharma AJ, et al. Is obesity still increasing among pregnant women? Prepregnancy obesity trends in 20 states, 2003-2009[J]. *Prev Med*, 2013, 56(6): 372-378.
- [8] Sun B, Purcell RH, Terrillion CE, et al. Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity[J]. *Diabetes*, 2012, 61(11): 2833-2841.
- [9] Savona-Ventura C, Savona-Ventura S. The inheritance of obesity[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2014, pii: S1521-6934(14)00203-X. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2014.07.023[Epub ahead of print]
- [10] Glavas MM, Kirigiti Ma, Xiao XQ, et al. Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet[J]. *Endocrinology*, 2010, 151(4): 1598-1610.
- [11] Wu Q, Lemus MB, Stark R, et al. The temporal pattern of cfos activation in hypothalamic, cortical, and brainstem nuclei in response to fasting and refeeding in male mice[J]. *Endocrinology*, 2014, 155(3): 840-853.
- [12] Vella KR, Ramadoss P, Lam FS, et al. NPY and MC4R signaling regulate thyroid hormone levels during fasting through both central and peripheral pathways[J]. *Cell Metab*, 2011, 14(6): 780-790.
- [13] Bolton JL, Bilbo SD. Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet; focus on inflammatory mechanisms[J]. *Dialogues Clin Neurosci*, 2014, 16(3): 307-320.
- [14] Di Ciaula A, Portincasa P. Fat, epigenome and pancreatic diseases. Interplay and common pathways from a toxic and obesogenic environment[J]. *Eur J Intern Med*, 2014, 25(10): 865-873.
- [15] Marsh CA, Hecker E. Maternal obesity and adverse reproductive outcomes: reducing the risk[J]. *Obstet Gynecol Surv*, 2014, 69(10): 622-628.

(责任编辑:冉明会)

《重庆医科大学学报》

邮发代号:78-132