

基础研究

DOI: 10.11699/cyxh20130902

小鼠早期营养过剩诱导子代肥胖动物模型的建立

纪金金, 董 志

(重庆医科大学药学院药理教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察小鼠早期营养过剩对子代肥胖的影响,为研究儿童肥胖机制提供实验基础。**方法:**通过减少哺乳期间幼鼠只数建立早期营养过剩动物模型即母代模型,实验组在子代出生第 3 天调整为 3 只/窝,对照组调整为 10 只/窝。母乳喂养 21 d 后给予小鼠标准饲料喂养至第 8 周,与同龄正常雄性 ICR 小鼠交配,得早期营养过剩子代和正常小鼠子代,在小鼠出生第 3 天,均调整为 10 只/窝。每周测定子代体质量,母乳喂养 21 d 后给予小鼠标准饲料喂养,并测定第 23~29 天进食量。在第 30 天处死小鼠,HE 染色观察性腺周围白色脂肪组织形态。**结果:**第 8 周合笼时,早期营养过剩母代平均体质量为 (40.75 ± 0.89) g,正常母代平均体质量为 (33.01 ± 1.71) g ($t=4.021, P=0.007$)。与正常小鼠子代相比,早期营养过剩小鼠的子代体质量增加($F=465.387, P=0.000$),进食量增加($t=3.709, P=0.006$),脂肪细胞体积增大($t=4.487, P=0.001$)。**结论:**小鼠早期营养过剩增加了子代肥胖的危险。

【关键词】母代;早期营养过剩;子代;肥胖**【中国图书分类法分类号】**R589.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-11-06

Establishment of obesity model in offspring rats induced by early overfeeding

JI Jinjin, DONG Zhi

(Teaching and Research Section of Pharmacology, College of Pharmacy, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of early overfeeding on the obesity of offspring rats and to provide references for exper-**作者介绍:**纪金金, Email: 502728178@qq.com,

研究方向:药理学。

通信作者:董 志, Email: zhidong073@hotmail.com。**基金项目:**国家自然科学基金面上资助项目(编号:81173066);国家科技重大专项重大新药创制资助项目(编号:2010ZX09401-306-1-1);重庆市自然科学基金重点资助项目(编号:CSTC2009BA5086)。**ment in child obesity. Methods:** Early overfeeding female rat model was established on the 3rd d after birth by reducing the litter size to 3 pups per litter (small litter, SL), which was in contrast to the normal litter size of 10 pups per litter (NL). The pups were weaned onto regular chow after breast feeding for 21 d. At the 8th week, these rats were bred with normal male rats and offsprings of the early overfeeding and control rats were

sensitivity and resistance to weight gain in mice null for the Ahsg gene [J]. Diabetes, 2002, 51(8): 2450-2458.

[15] Siddiq A, Lepretre F, Herberg S, et al. A synonymous coding polymorphism in the alpha2-Heremans-schmid glycoprotein gene is associated with type 2 diabetes in French Caucasians [J]. Diabetes, 2005, 54(8): 2477-2481.

[16] 李建华, 彭惠民. AHSG 基因 SNPs 与 2 型糖尿病相关性研究 [J]. 湖北民族学院学报(医学版), 2006, 23(3): 5.

Li J H, Peng H M. Study on AHSG gene SNPs and their correlation with type 2 diabetes mellitus [J]. Journal of Hubei Institute for Nationalities (Medical Edition), 2006, 23(3): 5.

[17] Baldini M, Lohman I C, Halonen M, et al. A Polymorphism* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999, 20(5): 976-983.

[18] Wray G A, Hahn M W, Abouheif E, et al. The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes [J]. Mol Biol Evol, 2003, 20(9): 1377-

1419.

[19] Wen A Q, Wang J, Feng K, et al. Effects of haplotypes in the interleukin 1beta promoter on lipopolysaccharide-induced interleukin 1beta expression [J]. Shock, 2006, 26(1): 25-30.

[20] Gu W, Shan Y A, Zhou J, et al. Functional significance of gene polymorphisms in the promoter of myeloid differentiation-2 [J]. Ann Surg, 2007, 246(1): 151-158.

[21] Saad M F, Knowler W C, Pettitt D J, et al. A two-step model for development of non-insulin-dependent diabetes [J]. Am J Med, 1991, 90(2): 229-235.

[22] Cui L, Zhao H, Zhang B, et al. Genotype-phenotype correlations of PCOS susceptibility SNPs identified by GWAS in a large cohort of Han Chinese women [J]. Hum Reprod, 2013, 28(2): 538-544.

[23] Mather K J, Kwan F, Corenblum B. Hyperinsulinemia in polycystic ovary syndrome correlates with increased cardiovascular risk independent of obesity [J]. Fertil Steril, 2000, 73(1): 150-156.

(责任编辑:冉明会)

generated. Offsprings of both two groups were culled and raised as 10 pups per dam and weaned onto regular chow on the 21st d. Body weight and daily food intake were routinely recorded. Rats were killed on the 30th d and HE staining was performed to observe the morphology of epididymal fat. **Results:** Body weight of early overfeeding female rats was (40.75 ± 0.89) g while that of control female rats was (33.01 ± 1.71) g ($t=4.021, P=0.007$). Compared with those of offspring of control rats, offspring of early overfeeding rats showed significant body weight gain ($F=465.387, P=0.000$) and hyperplasia ($t=3.709, P=0.006$). Adipocyte size in epididymal fat was larger in early overfeeding rats than in control rats ($t=4.487, P=0.001$) based on HE staining observation. **Conclusion:** Maternal obesity can induce the risk of obesity in offspring.

【Key words】maternal generation; early overfeeding; offspring generation; obesity

随着生活水平的提高,儿童肥胖已成为世界各国关注的焦点^[1]。肥胖及相关疾病不仅影响儿童的正常发育,而且增加儿童和青少年的社会及心理问题^[2]。研究表明儿童肥胖是由遗传和环境多因素造成的。母代肥胖是子代肥胖的主要原因之一,因为宫内环境和出生后早期营养对饮食回路的形成有一定的作用^[3]。动物模型是基础研究的重要方法之一。高脂饮食诱导和转基因是经典的肥胖动物模型,近几年也有文献报道通过减少哺乳期喂养的动物只数造成早期营养过剩的肥胖模型^[4]。已有相关文献^[5]报道高脂饮食诱导的母代肥胖对子代肥胖的影响,而通过减少哺乳期动物只数造成的早期营养过剩诱导的母代肥胖模型对子代的肥胖报道甚少。本文通过早期营养过剩诱导母代肥胖的动物模型研究母代肥胖对子代肥胖的影响。

1 材料与方法

1.1 动物饲料

标准小鼠饲料(包含 10%脂肪、70%碳水化合物、20%蛋白质),购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号为“沪饲审(2008)04002”。

1.2 实验动物及模型建立

1.2.1 第 1 代动物 8 周龄 ICR 小鼠(SPF 级),体质量(20.0 ± 2.0) g,雌雄只数比例 2:1,共 12 只,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。饲养于重庆医科大学动物中心,温度(24 ± 2)°C,湿度(60 ± 5)%。

1.2.2 第 2 代动物(即文中的母代) 待购买的 ICR 小鼠适应环境后,将其按雌雄比例为 2:1 合笼。幼鼠出生只数在 8~12 只的动物被用于后续实验研究。动物出生当天记为第 1 天,在小鼠出生第 3 天,随机调整为 10 只/窝,喂养至第 21 天,筛选出其中的雌性小鼠,自由饮食、饮水,给予标准小鼠饲料喂养 8 周,至其性成熟,作为正常母代;在小鼠出生第 3 天,随机调整为 3 只/窝,喂养至第 21 天,筛选出其中的雌性小鼠,自由饮食、饮水,给予标准小鼠饲料喂养 8 周,至其性成熟,作为早期营养过剩母代。

1.2.3 第 3 代动物(即文中的子代) 将 8 周性成熟的正常

母代和早期营养过剩母代都与同龄正常雄性小鼠交配,其子代分别定义为早期营养过剩子代和正常子代。2 组小鼠均在出生第 3 天,随机调整为 10 只/窝。母乳喂养 21 d,自由摄取标准小鼠饲料,自由饮水。

1.3 体质量和进食量测定

每周固定时间测定体质量(梅特勒-托利多电子天平 PL2002-IC)。早期营养过剩子代组和正常子代组在 21 d 断奶后,小鼠每笼 1 只饲养,于第 23~29 天每天早上 9:00 测定其饲料重,并计算每天进食量(梅特勒-托利多电子天平 PL2002-IC)。

1.4 脂肪组织 HE 染色

第 30 天,用 10%水合氯醛(0.004 ml/g)麻醉处死小鼠,取性腺周围白色脂肪组织,称重(梅特勒-托利多电子天平 AB104-S)后固定于 4%多聚甲醛中 48 h。梯度酒精脱水,石蜡包埋,切片(4.5 μ m),HE 染色。镜下观察并拍照(Olympus BX51,日本),用 Image J 1.40 软件进行脂肪细胞体积分析。

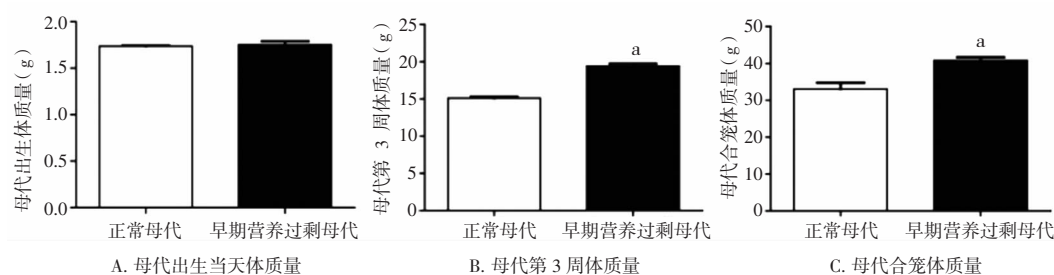
1.5 统计分析

用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,实验结果用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用两样本均数比较的 t 检验对各组累积进食量和脂肪细胞大小进行统计学分析,采用重复测量方差分析对子代体质量进行统计学分析。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 母代体质量结果

因为本研究中母代肥胖是早期营养过剩造成的,故选出出生当天、第 3 周断奶时和第 8 周性成熟合笼 3 个关键时间点分别测定母代体质量。出生当天,正常母代组平均体质量为 (1.74 ± 0.01) g,早期营养过剩母代平均体质量为 (1.75 ± 0.04) g,出生体质量差异没有统计学意义($t=0.384, P=0.714, n=4$)(图 1A);第 3 周断奶时,正常母代组平均体质量为 (15.12 ± 0.17) g,早期营养过剩母代组平均体质量为 (19.41 ± 0.33) g,说明通过减少哺乳期动物只数,造成了动物的早期营养过剩($t=11.440, P=0.000, n=4$)(图 1B);断奶后 2 组小鼠均给予标准小鼠饲料,自由饮食、饮水至其第 8 周性成熟时,正常母代组平均体质量为 (33.01 ± 1.71) g,早期营养过剩母代组平均体质量为 (40.75 ± 0.89) g,表明母鼠体质量增加是由早期营养过剩引起的($t=4.021, P=0.007, n=4$)(图 1C)。



注: a, 与正常母代相比, 差异有统计学意义

图 1 母代体质量值

Fig.1 Body weight of female rats

表 1 正常子代和早期营养过剩子代体质量值 ($\bar{x} \pm s, g$)

Tab.1 Body weight of offsprings of control rats and offsprings of early overfeeding rats ($\bar{x} \pm s, g$)

组别	0周	1周	2周	3周	4周
正常子代	1.89 ± 0.07	5.48 ± 0.08	9.36 ± 0.10	13.94 ± 0.42	24.27 ± 0.21
早期营养过剩子代	2.07 ± 0.27	5.89 ± 0.15	10.97 ± 0.21	18.73 ± 0.25	30.64 ± 0.25
F 值			465.387		
P 值			0.000		

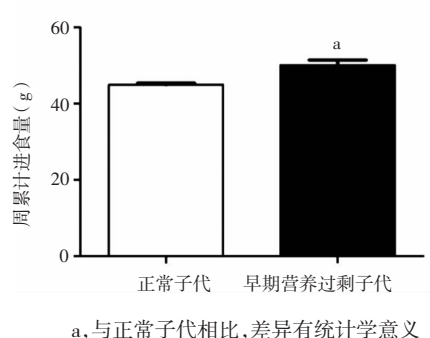
注: 正常子代和早期营养过剩子代 2 组组间比较 ($n=6$)

2.2 子代体质量结果

正常子代和早期营养过剩子代小鼠出生后每周固定时间测定其体质量, 2 组小鼠的出生体质量没有统计学差异。从第 2 周开始, 早期营养过剩子代小鼠体质量明显高于正常子代。第 2 周, 早期营养过剩子代组比正常子代组平均体质量约多 12.37%; 第 3 周, 多 30.19%, 第 4 周, 多 25%。重复测量方差分析结果表明, 与正常子代比较, 早期营养过剩子代表现出肥胖特征, 即体质量增加 (表 1)。

2.3 进食量结果

第 23~29 天, 每天测定正常子代和早期营养过剩子代的进食量, 并计算 1 周累计进食量, 正常子代 1 周累计进食量平均值为 (44.66 ± 1.12) g, 早期营养过剩子代 1 周累计进食量平均值为 (50.74 ± 0.48) g。结果表明, 早期营养过剩子代表现出食欲增强, 进食量增多, 差异有统计学意义 ($t=3.709$, $P=0.006$, $n=6$) (图 2)。



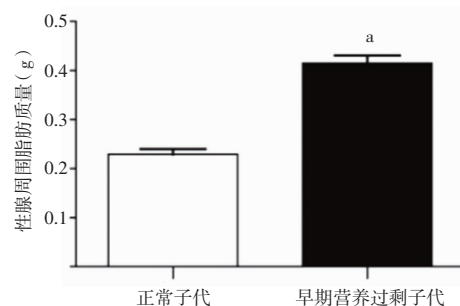
a, 与正常子代相比, 差异有统计学意义

图 2 子代从第 23~29 天 1 周的累计进食量

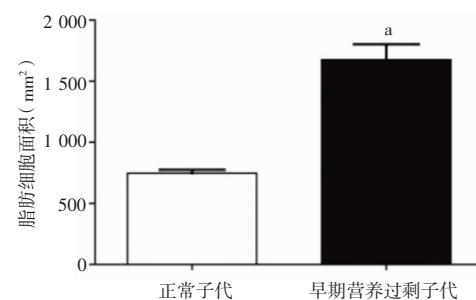
Fig.2 Accumulative food intake of offsprings of control rats and offsprings of early overfeeding rats from the 23rd d to the 29th d

2.4 脂肪组织及 HE 染色观察结果

第 30 天, 处理动物, 得小鼠性腺周围脂肪组织并称质量, 正常子代组脂肪平均质量为 (0.23 ± 0.01) g, 早期营养过剩子代组脂肪平均质量为 (0.42 ± 0.02) g, 与正常子代组小鼠比较, 早期营养过剩子代组脂肪组织明显增多 ($t=10.160$, $P=0.000$, $n=6$, 图 3A)。HE 染色结果表明早期营养过剩子代小鼠脂肪细胞体积明显增大 (图 3C、D), 量化结果显示其差异有明显的统计学意义 ($t=4.487$, $P=0.001$, $n=6$, 图 3B)。

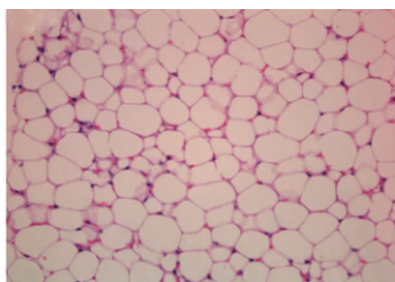


A. 子代性腺周围白色脂肪湿质量

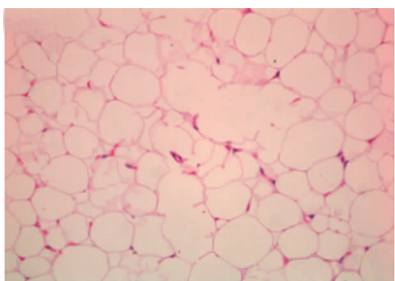


B. 子代脂肪细胞量化图 (即 C、D 图的量化结果)

a, 与正常子代相比, 差异有统计学意义



C. 正常子代性腺周围白色脂肪 HE 染色图



D. 早期营养过剩子代性腺周围白色脂肪 HE 染色图

图 3 与正常子代相比,早期营养过剩子代性腺周围白色脂肪细胞体积显著增大

Fig.3 Increased adipocyte size of epididymal fat in offsprings of early overfeeding rats than in offsprings of control rats

3 讨 论

中国疾病预防控制中心数据显示,我国 18 岁以下的肥胖人群已达 1.2 亿人,5 岁以下城市儿童超重肥胖率已上升到 8.5%,无论城乡,青少年超重、肥胖检出率均呈持续增长的趋势。有研究报告显示,中国有 12% 的儿童超重,中国青少年患糖尿病的比例相当于美国同龄人的 4 倍^[5]。肥胖促使青少年出现代谢综合征,严重影响儿童生长发育。因此,通过建立动物模型研究儿童肥胖及其相关机制显得尤为重要。

本研究采用早期营养过剩诱导母代肥胖动物模型,建立其子代肥胖的动物模型。母代体质量结果表明,由早期营养过剩造成母代肥胖的动物模型成功建立。本文选取正常雄性分别与正常母代和早期营养过剩母代交配,得正常子代和早期营养过剩子代,整个实验过程中,早期营养过剩造成的母代肥胖是唯一变量,因此可以从遗传学角度研究母代肥胖是否能够引起子代肥胖。研究结果表明,与正

常子代比较,早期营养过剩子代的进食量显著增加,体质量也显著增多;同时,观察到早期营养过剩子代性腺周围白色脂肪组织湿重增加,细胞体积明显增大,显示早期营养过剩诱导的母代肥胖能够引起其子代肥胖,提示模型建立成功。

目前从遗传学角度研究母代肥胖对子代肥胖的影响主要集中在母代高脂饮食诱导的肥胖对子代肥胖的影响及其机制的初步探讨^[6],本文研究母代早期营养过剩对子代幼年肥胖的动物模型的建立以及其初步评价,为研究儿童肥胖提供了新的动物模型,也为其肥胖机制的研究提供了一定的实验基础。因为随着生活水平的提高以及我国的国情(即计划生育),早期营养过剩可能是造成我国儿童肥胖的主要原因之一。儿童肥胖进一步造成其成年的肥胖,从而影响其下一代的肥胖,形成一个肥胖的恶性循环,本研究的动物模型为研究肥胖机制,肥胖相关性代谢疾病以及肥胖药物治疗提供了新的动物模型。

总之,本研究从体质量增加,性腺周围白色脂肪湿重以及其形态学特征确定了母代早期营养过剩诱导子代肥胖模型的成功建立,课题组还将用这一模型进一步研究儿童肥胖机制。

参 考 文 献

- [1] Karnik S, Kanekar A. Childhood obesity: a global public health crisis[J]. Int J Prev Med, 2012, 3(1): 1-7.
- [2] Schwartz M B, Puhl R. Childhood obesity: a societal problem to solve[J]. Obes Rev, 2003, 4(1): 57-71.
- [3] Li M, Sloboda D M, Vickers M H. Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: evidence from animal models[J]. Exp Diabetes Res, 2011(2011): 592408.
- [4] Glavas M M, Kirigiti M A, Xiao X Q, 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.
- [5] Dunn G A, Bale T L. Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice[J]. Endocrinology, 2009, 150(11): 4999-5009.
- [6] Li Y, Yang X, Zhai F, et al. Childhood obesity and its health consequence in China[J]. Obes Rev, 2008, 9(s1): 82-86.

(责任编辑:冉明会)