

白藜芦醇对膳食诱导的肥胖小鼠甲状腺激素受体及脱碘酶的影响

郝立月^{1,2}, 段晓梅², 夏淑芳², 李丽婷², 乐国伟^{1,2}, 施用晖^{*1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 探讨白藜芦醇通过调节甲状腺激素代谢通路中的关键基因 SIRT1、PGC1 α 进而缓解机体氧化应激, 改善甲状腺激素及其相关受体水平, 调节能量代谢维持机体稳态。C57 雄性小鼠随机分成 3 组, 每周监测体质量, 分别测定血脂、甲状腺激素以及氧化应激指标。与 C 组相比, HFD 组小鼠体重、血脂显著升高 ($P < 0.05$); HFD 组小鼠肝脏 GSH/GSSG 和 T-AOC 在第 7 周末显著降低, MDA 显著上升 ($P < 0.05$); HFD 组 T4 以及 FT4 水平与 C 组相比显著升高 ($P < 0.05$), T3 以及 FT3 水平差异不显著; 添加白藜芦醇能显著上调 DIO1、TR β 、SIRT1、PGC1 α 的表达量。

关键词: 高脂日粮; 白藜芦醇; 甲状腺激素; SIRT1; PGC1 α ; DIO1; TR β

中图分类号: TS 201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)11—1169—05

Effects of Resveratrol on Thyroid Hormone Receptor and Deiodinase in Mice Fed with High-Fat Diet

HAO Liyue^{1,2}, DUAN Xiaomei², XIA Shufang², LI Liting², LE Guowei^{1,2}, SHI Yonghui^{*1,2}

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University; School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The research aimed to study the impact of high-fat diet on thyroid hormone receptor and deiodinase in mice, as well as the protective effect of resveratrol. Four-week-old C57BL/6 male mice were fed normal diet, high-fat diet (HFD), or HFD supplemented with 0.1% resveratrol, respectively, metabolic experiments were conducted in the 6th week, the mice were sacrificed at the end of the 7th week and oxidative stress biomarker, blood lipid and thyroid hormone were then examined. The gene expressions of SIRT1, PGC1 α , DIO1 and TR β were analyzed by RT-PCR. Compared with group C, body weight, blood lipid, MDA, T4 and FT4 levels of HFD mice were significantly increased ($P < 0.05$) whereas liver GSH/GSSG and T-AOC were remarkably reduced. Resveratrol obviously increased the expressions of DIO1, TR beta, SIRT1 and PGC1 alpha. Therefore, in a long term of high-fat feeding, the oxidative stress interfered with thyroid hormone but resveratrol could improve the metabolic abnormality by elevating the expressions of related genes SIRT1、PGC1 α 、

收稿日期: 2015-01-01

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAD33B05); 江苏高校优势学科建设工程资助项目。

* 通信作者: 施用晖(1955—), 女, 上海人, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事营养代谢与控制研究。E-mail: yhshi2009@126.com

DIO1 and TR β .**Keyword:** high-fat diet, resveratrol, thyroid hormone, SIRT1, PGC1 α , DIO1, TR β

甲状腺激素在调节能量代谢过程中扮演重要的角色,研究证明甲状腺激素能增加氧消耗,其水平异常对机体代谢率的改变有深远影响^[1-3]。研究发现,8周高脂膳食会显著上调雄性小鼠促甲状腺激素释放激素(TRH)的表达,升高血清TSH水平,但血清T4和T3的水平维持正常,外周组织中脱碘酶活性以及血清反T3(rT3)水平显著升高^[4],还有研究表明缺乏TR α 的小鼠能抵抗高脂膳食诱导的肥胖^[5],而敲除间脑中TRH前体能改善高脂膳食诱导的肥胖大鼠血压的升高^[6]。

SIRT1同样在能量代谢过程中起重要作用。例如在长期饥饿的条件下,SIRT1去乙酰化并激活PGC1- α ,促进脂肪酸的氧化并改善葡萄糖稳态^[7-9]。白藜芦醇是一种多酚类物质,它可以上调SIRT1的酶活性,用白藜芦醇处理小鼠能够抵抗高脂饮食引起的肥胖和代谢综合征^[10]。研究发现SIRT1与甲状腺激素受体(Thyroid Hormone Receptors TRs)存在表面重叠部分,在糖异生,脂肪酸氧化,线粒体功能方面呈现部分相辅生理作用^[11-12]。而TR β 在甲状腺激素信号通路中发挥重要作用,作者意在研究白藜芦醇能否通过调节甲状腺激素信号通路关键基因SIRT1以及TR β ,进而改善甲状腺激素代谢紊乱维持机体正常水平。

1 材料与方法

1.1 原料及试剂

白藜芦醇:上海诺特生物科技公司产品;7900HT Fast Real-Time PCR仪:ABI公司产品;Trizol裂解液:美国Biomiga公司产品;荧光染料SBY:Bioneer公司产品;基因引物:上海杰瑞生物工程公司产品;丙二醛(MDA)试剂盒:南京建成生物工程研究所产品;其余试剂均为分析纯。

1.2 动物饲喂及分组

4周龄C57BL/6雄性小鼠,正常饲料预饲1周后,将其随机分成3组:正常日粮组(Control)、高脂日粮组(HFD,含质量分数20%脂肪)以及高脂日粮添加质量分数0.1%白藜芦醇(HFD+Rsv)。小鼠同室

分笼饲养,自由饮水,温度控制在(23 $\pm$ 2)℃,湿度60%,12 h/12 h昼夜循环光照。

1.3 血样及组织样品采集

小鼠实验前禁8~10 h,肝素钠抗凝制备血浆,保存于-80℃冰箱备用。

取肝脏称质量后用预冷的生理盐水中漂洗,拭干后置于冰上,分别迅速放入trizol中,-80℃保存,用于总RNA提取。称取一定量的肝脏制成质量分数10%的匀浆液,-20℃保存备用。

1.4 指标测定

血浆甘油三酯、总胆固醇及高、低密度脂蛋白含量、丙二醛(MDA)含量、总抗氧化能力(T-AOC)均按照试剂盒说明书进行操作。GSH和GSSG含量测定条件采用荧光分光光度法,组织中蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝比色法测定。

血浆三碘甲状腺原氨酸(T3)、甲状腺素(T4)以及游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)、游离甲状腺素(FT4)和促甲状腺激素(TSH)采用酶联免疫法(ELISA法)测定,按照厦门慧嘉生物技术有限公司试剂盒说明书进行操作。

1.5 肝脏总RNA的提取及转录

组织中总RNA的提取参照Trizol法,提取后的RNA通过测定260 nm/280 nm吸光度比值检测其纯度,并通过甲醛变性电泳检测RNA的质量。

取2.0 μ gRNA,加入dNTP 2.0 μ L,OligdT 2.0 μ L,70℃水浴5 min后,至于冰上,加入5RT buffer 5.0 μ L,40 U/mL Rnase Inhibitor 0.25 μ L,M-MLV逆转录酶0.5 μ L,DEPC水9.25 μ L后进行扩增,扩增温度和时间:37℃,1.5 h;95℃,3 min。逆转录所得cDNA保存于-20℃备用。

1.6 实时荧光定量PCR

cDNA原液稀释10倍备用。

RT-PCR反应体系(10.0 μ L)如下:cDNA 0.5 μ L,10 μ mol/L上下游引物各0.4 μ L,SBY green(20 U)5.0 μ L,Rox 0.3 μ L,无菌水3.4 μ L。

PCR扩增条件:预变性95℃,5 min;变性95℃,20 s,退火60℃或62℃(不同基因退火温度不

同),30 s,延伸 72 ℃,20 s,所有基因均为 45 个循环;终末延伸 72 ℃,5 min。

根据溶解曲线评估 RT-PCR 产物的特异性。以 β -actin 内参基因,检测各模板的 C_t 值,进行相对定量,结果均为相对于正常组基因的改变量。

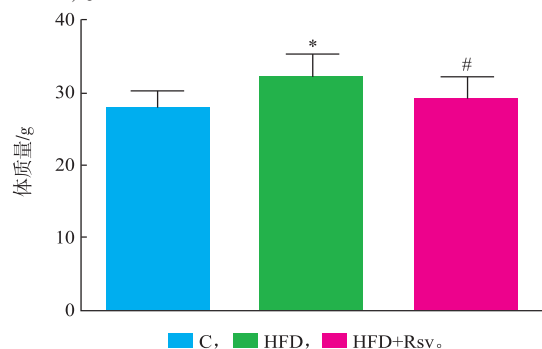
1.7 数据统计分析

结果均以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,运用 SPSS 17.0 软件对数据进行单因素方差分析(ANOVA),并用 Tukey 检验进行组间比较,显著水平为 $P < 0.05$,极显著水平为 $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 高脂膳食对小鼠体质量的影响及白藜芦醇的干预效果

小鼠饲喂前,各组体质量没有显著性($P > 0.05$)差异。由图 1 小鼠体质量变化可知,与 C 组相比,HFD 组小鼠体质量在 7 周显著($P < 0.05$)升高,与 HFD 组相比,HFD+Rsv 组能够显著降低小鼠体质量($P < 0.05$)。



注:*代表与正常组相比较,显著差异为 $p < 0.05$,#代表与高脂膳食组相比,显著差异为 $p < 0.05$,下同。

图 1 白藜芦醇对高脂膳食小鼠体质量的影响($n=6, \bar{x} \pm SD$)
Fig. 1 Effect of Rsv on the body weight of mice fed HFD ($n=6, \bar{x} \pm SD$)

2.2 高脂膳食对小鼠血脂的影响及白藜芦醇的干预

表 1 为 7w 小鼠血脂代谢水平情况,血浆甘油三酯(TG)水平、血浆总胆固醇(TCH)各组之间无显著差异。高、低密度脂蛋白(HDL-C 和 LDL-C)在第

7 周与正常组相比,高脂组血浆 LDL-C 水平出现显著($P < 0.05$)性差异,白藜芦醇可以降低 LDL 水平并且升高 HDL 水平,提示白藜芦醇可以改善高脂膳食引起的血脂代谢异常。

2.3 高脂膳食对小鼠机体氧化还原状态的影响及白藜芦醇的干预

与正常组相比,高脂组小鼠肝脏 GSH/GSSG 和 T-AOC 在第 7 周末显著降低,MDA 显著上升($P < 0.05$),添加白藜芦醇可以改善机体氧化还原状态,结果见表 2。

2.4 高脂膳食对小鼠甲状腺激素水平的影响及白藜芦醇的干预

甲状腺激素水平与机体代谢水平相关,由表 3 可知 T3 水平各组差异不显著,高脂组 T4 水平显著高于正常组和白藜芦醇组,高脂组和白藜芦醇 FT3 的水平比显著高于正常组,TSH、FT4 水平高脂组与其他组差异显著。

2.5 高脂膳食对甲状腺激素信号通路相关关键基因的影响以及白藜芦醇的干预

RT-PCR 结果显示高脂组 $TR\beta$ 、 $DIO1$ mRNA 表达水平下调,提示高脂膳食条件下 $TR\beta$ 、 $DIO1$ 可能受到影响,白藜芦醇能够上调 $TR\beta$ 、 $DIO1$ mRNA 水平。在甲状腺激素相关通路中作者研究了 SIRT1、 $PGC1-\alpha$ 。RT-PCR 结果显示白藜芦醇能显著上调 SIRT、 $PGC1-\alpha$,结果见图 2。

2.6 小鼠代谢情况

图 3 为各组小鼠代谢水平情况,高脂组氧气消耗显著低于白藜芦醇组和正常组,高脂组小鼠活动水平低于白藜芦醇组和正常组但不显著。

3 讨论

研究表明 SIRT1 能够减少脂肪组织的积累并且能够增加肝、肌肉组织脂肪代谢,此外能够增加糖异生和胰岛素敏感性。和 SIRT1 类似,甲状腺激素受体 TR 也与机体能量代谢水平相关。研究表明甲状腺激素发挥作用需要与受体 TR 结合进而调节

表 1 白藜芦醇对高脂膳食小鼠血脂的影响($n=6, \bar{x} \pm SD$)

Table 1 Effect of antioxidants on lipid profiles of mice fed HFD in the 7th week($n=6, \bar{x} \pm SD$)

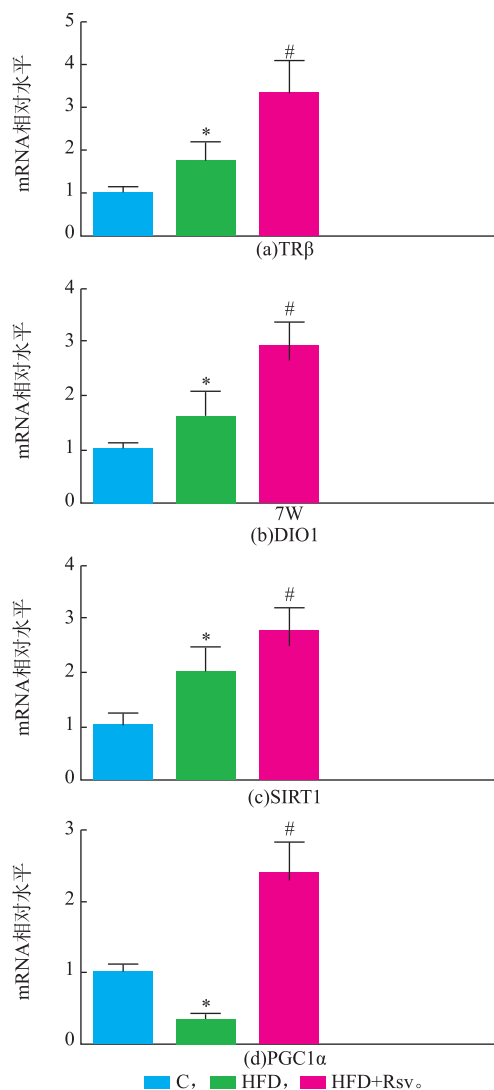
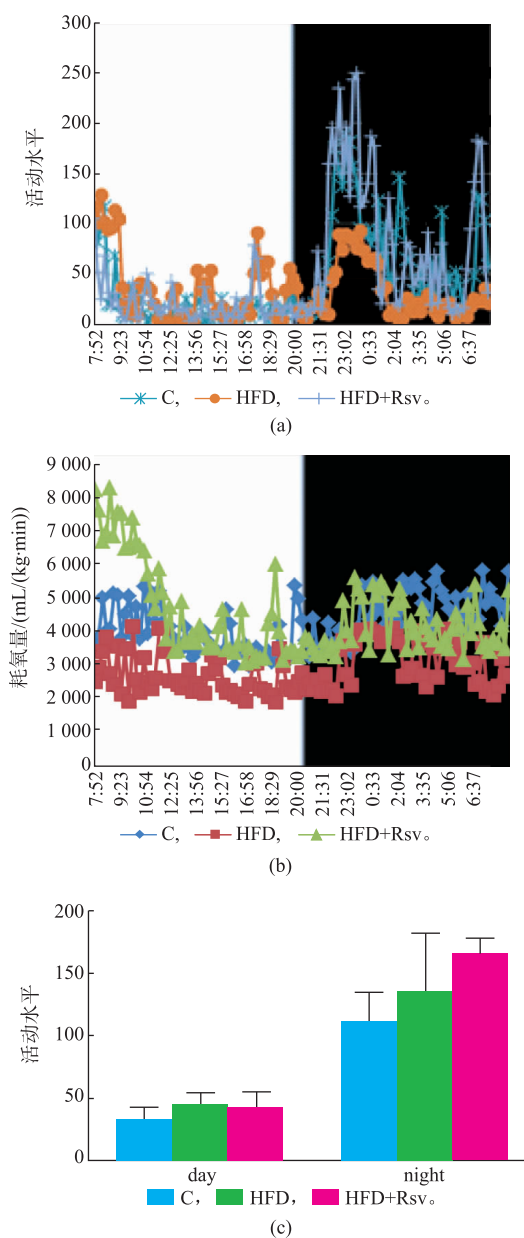
	HDL	LDL	TG	CHOL
C	2.4335 $\pm$ 0.96	1.5095 $\pm$ 0.37	0.6719 $\pm$ 0.16	4.3788 $\pm$ 1.12
HFD	6.8525 $\pm$ 0.71*	3.3701 $\pm$ 0.78*	1.6568 $\pm$ 0.54	6.7105 $\pm$ 1.17
HFD+Rsv	10.48 $\pm$ 1.85*#	1.5338 $\pm$ 0.38#	1.7107 $\pm$ 0.12	5.5744 $\pm$ 0.84

表 2 白藜芦醇对高脂膳食小鼠机体氧化还原状态的影响 ($n=6, x \pm SD$)Table 2 Effect of antioxidants on hepatic redox state of mice fed HFD in the 7th week ($n=6, x \pm SD$)

	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)	T-AOC(mmol/L)	GPX	GSH/GSSG
C	200.59 $\pm$ 35.24	3.04 $\pm$ 0.67	0.87 $\pm$ 0.09	23.70 $\pm$ 3.87	0.19 $\pm$ 0.03
HFD	336.92 $\pm$ 45.66*	10.65 $\pm$ 1.75*	0.61 $\pm$ 0.08*	16.72 $\pm$ 2.84	0.15 $\pm$ 0.02
HFD+Rsv	360.73 $\pm$ 75.07*	2.358 $\pm$ 0.35#	0.80 $\pm$ 0.07#	21.85 $\pm$ 4.81	0.22 $\pm$ 0.03#

表 3 白藜芦醇对高脂膳食小鼠甲状腺激素的影响 ($n=6, x \pm SD$)Table. 3 Effect of antioxidants on thyroid hormones of mice fed HFD in the 7th week ($n=6, x \pm SD$)

	T3(μ g/L)	T4(μ g/L)	FT3(pmol/L)	FT4(pmol/L)	TSH(U/L)
C	229.33 $\pm$ 34.87	141.26 $\pm$ 21.01	22.35 $\pm$ 3.71	8.88 $\pm$ 0.96	556.45 $\pm$ 78.23
HFD	222.99 $\pm$ 38.91	161.34 $\pm$ 119.81*	27.64 $\pm$ 4.54*	16.93 $\pm$ 3.61*	674.16 $\pm$ 102.12*
HFD+Rsv	222.73 $\pm$ 21.81	151.23 $\pm$ 17.81	25.46 $\pm$ 3.17*	10.52 $\pm$ 2.51	707.50 $\pm$ 116.97*

图 2 白藜芦醇对高脂膳食小鼠甲状腺激素信号通路关键基因的影响 ($n=6, x \pm SD$)Fig. 2 RNA Expressions of DIO1, TRβ, SIRT1 and PGC1α ($n=6, x \pm SD$)

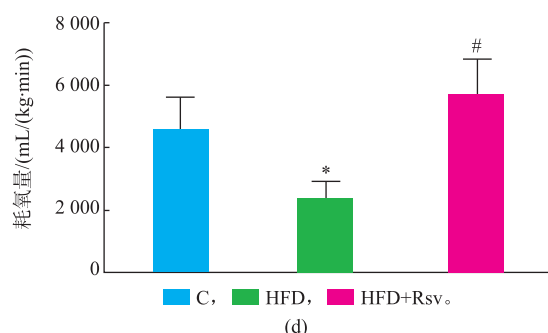


图3 白藜芦醇对高脂膳食小鼠代谢水平的影响 ($n=6, x \pm SD$)

Fig. 3 Oxygen intake and locomotion level ($n=6, x \pm SD$)

相应的靶基因。核受体 PGC1 α 也参与此过程。已有研究表明 SIRT1 和 PGC1 α 可能结合 T3 进而加强甲状腺激素发挥作用,可以促进 PGC1 α 的乙酰化水平,但此过程需要一定的 T3 水平^[12]。此外 SIRT1 可作为 TR β 的辅助因子,不完全依赖 PGC1 α 乙酰

化水平。由 RT-PCR 结果显示高脂膳食条件下机体 SIRT1、PGC1 α 、TR β 表达下调,添加白藜芦醇可以改善其 mRNA 水平。

由代谢实验可知高脂膳食条件下,机体氧气消耗量显著降低,白藜芦醇可以增加机体耗氧量和活动水平提高小鼠代谢水平。甲状腺激素与能量代谢水平相关,高脂膳食条件下 TSH 水平上升,T4 水平显著高于正常组,T3/T4 比率下降,过多的 T4 不能转换成 T3 发挥作用,可能 DIO1 表达受到影响。RT-PCR 结果表明高脂膳食条件下肝脏 DIO1 表达下调,甲状腺激素信号通路受到影响。

综上所述,由 SIRT1 和 PGC1 α 、TR β 、DIO1 mRNA 表达水平可知 SIRT1 和 PGC1 α 可能与 TR β 、DIO1 相互作用共同调节甲状腺激素信号通路,添加白藜芦醇可以改善机体氧化应激程度,改善甲状腺激素代谢紊乱,从而维持正常的体重及血脂水平。

参考文献:

- [1] GAMI A S, WITT B J, HOWARD D E, et al. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49: 403-414.
- [2] ROBERTS C K, VAZIRI N D, LIANG K H, et al. Reversibility of chronic experimental syndrome x by diet modification[J]. *Hypertension*, 2001, 37(5): 1323-1328.
- [3] LOMBA A, MILAGRO F I, GARCIA-DIAZ D F, et al. Obesity induced by a pair-fed high fat sucrose diet: Methylation and expression pattern of genes related to energy homeostasis[J]. *Lipids Health Dis*, 2010, 9: 60.
- [4] ARAUJO R L, ANDRADE B M, PADRON A S, et al. High-fat diet increases thyrotropin and oxygen consumption without altering circulating 3,5,3'-triiodothyronine (T3) and thyroxine in rats; The role of iodothyronine deiodinases, reverse t3 production, and whole-body fat oxidation[J]. *Endocrinology*, 2010, 151(7): 3460-3469.
- [5] PELLETIER P, GAUTHIER K, SIDELEVA O, et al. Mice lacking the thyroid hormone receptor-alpha gene spend more energy in thermogenesis, burn more fat, and are less sensitive to high-fat diet-induced obesity [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(12): 6471-6486.
- [6] BIRTO P D, RAMOS C F, PASSOS M C F, et al. Adaptive changes in thyroid function of female rats fed a high-fat and low-protein diet during gestation and lactation[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2006, 39: 809-816.
- [7] DOMINY J, LEE Y, Gerhart-Hines Z, et al. Nutrient-dependent regulation of PGC-1alpha's acetylation state and metabolic function through the enzymatic activities of Sirt1/GCN5[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804: 1676-1683.
- [8] PURUSHOTHAM A, SCHUG T T, XU Q, et al. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation[J]. *Cell Metab*, 2009, 9: 327-338.
- [9] SCHUG T T, LI X. Sirtuin 1 in lipid metabolism and obesity[J]. *Ann Med*, 2011, 43: 198-211.
- [10] LAGOUGE M, ARGMAN C, GERHART-HINES Z, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha[J]. *Cell*, 2006, 127: 1109-22.
- [11] LIU Y Y, BRENT G A. Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2010, 21: 166-73.
- [12] WEITZEL J M, RADTKE C, SEITZ H J. Two thyroid hormone-mediated gene expression patterns in vivo identified by cDNA expression arrays in rat[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: 5148-5155.