

不同形态的果糖对 SD 大鼠炎症因子及内脏组织的影响

赵艳艳¹, 周星¹, 谢正军^{*1}, 徐学明¹, 金征宇²

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

摘要: 探讨长期喂养游离态果糖和结合态果糖对大鼠炎症因子及内脏组织病理的影响。雄性 SD 大鼠 40 只, 随机分为 4 个实验组及 1 个对照组, 经过 11 w 喂养后, 处死解剖, ELISA 法检测血清及肝脏单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 与肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的质量分数, 苏木素-伊红 (HE) 染色法观察肝脏、胰脏组织病理学变化。结果显示, 与对照组相比, 含果糖实验组大鼠血清及肝脏 MCP-1 与 TNF- α 的质量分数均高于对照, 其中游离态果糖组 (F/G) 血清 MCP-1 与 TNF- α 质量分数显著低于结合态果糖组 (SU) ($P < 0.05$)。同时, 肝脏组织 HE 染色显示含果糖实验组均有不同程度的脂肪沉积, SU 和 F/ST (果糖/淀粉组) 组脂质沉积现象比 F/G 组严重; 各组大鼠胰脏组织差异不明显, 但 SU 与 F/ST 组胰岛有轻微的颗粒样变性。因此推断: 长期摄入不同形态高果糖均可能引起肝脏炎症及脂质沉积, 结合态果糖可能会比游离态果糖引起更为严重的组织损伤。

关键词: 游离态果糖; 结合态果糖; 炎症因子; 肝脏; 胰脏

中图分类号: Q 493 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)02—0157—06

Effects of Free and Bound Fructose on Inflammatory Factors and Viscera Histopathology in Sprague-Dawley Rat

ZHAO Yanyan¹, ZHOU Xing¹, XIE Zhengjun^{*1}, XU Xueming¹, JIN Zhengyu²

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Long-term effects of free and bound fructose on inflammatory factors and viscera histopathology in Sprague-Dawley rat were investigated. Male rats were randomized into four experimental groups and a control group. Each group was fed a diet containing 68% of total calories as different composition of carbohydrate for 11 weeks. At the end of the experiment, rats were sacrificed by anesthesia and were autopsied. Serum monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by ELISA method. The pathological changes of liver and pancreas were directed with hematoxylin & eosin (H&E) staining. The results showed that the levels of serum and liver TNF- α and MCP-1 in fructose-fed rats were higher than the control.

收稿日期: 2013-07-10

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (31230057)。

* 通信作者: 谢正军 (1964—), 男, 江苏扬州人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事淀粉糖开发方面的研究。

E-mail: xiejz@jiangnan.edu.cn

Moreover, the bound fructose (i.e. sucrose) showed higher serum MCP-1 than the free fructose (F/G) ($P < 0.05$). Meanwhile, all of the three fructose containing diets induced various levels of hepatic steatosis, especially the SU and F/ST diet showed more severe fatty liver than F/G. The impairment of pancreas was unobvious, only the SU and F/ST groups showed slightly granular degeneration. It was suggested that long-term intake of high dose of fructose maybe induce inflammation and liver impairment, and bound fructose might produce more severe damage to health than the free fructose.

Keywords: free fructose, bound fructose, inflammation factor, liver, pancreas

果糖摄入量与肥胖、2型糖尿病和代谢综合征等流行病密切相关^[1]。目前,果葡糖浆和蔗糖是人类摄入果糖的主要来源。果葡糖浆是由淀粉水解并异构化制得的,由于其甜味独特、成本低廉,在食品领域得到了广泛应用^[2]。常用的果葡糖浆-55含55%果糖和45%葡萄糖,其与蔗糖的区别在于果糖在果葡糖浆中以游离态存在,而在蔗糖中果糖与葡萄糖以结合态存在。目前,针对游离态和结合态果糖在大鼠体内代谢上的差异的研究较少。果葡糖浆-55和蔗糖含有果糖和葡萄糖的比例基本相同,热量相近,且均是通过胃肠道吸收代谢,理论上来说,这两种物质在代谢上并无明显差异^[3-5]。但是,近来有证据表明,蔗糖比其单体组分(葡萄糖和果糖)产生更高的血糖和甘油三酯^[6];与之相反, Sanchez-Lozada等专门研究不同形态的果糖对大鼠肝脏的影响时发现,游离态的果糖和葡萄糖能够比蔗糖产生更高的血清脂质及肝脏脂肪病变^[7]。关于游离态果糖与结合态果糖在体内代谢上是否存在差异,仍然存在很大的争议。

MCP-1和TNF- α 是脂肪细胞分泌的两种炎症因子,大量研究表明,这两种炎症因子与代谢综合征的发生有着密切的联系。TNF- α 在炎症反应的发生、发展过程中发挥关键作用,是引起肝损伤的NO合成的重要调节者^[8]。但是,不同形态果糖代谢上的差异是否与这两种炎症因子有关,国内外对其研究较少。此外,肝脏是果糖最主要的代谢场所,胰腺是调节血糖的主要器官,内脏组织病变是体内代谢紊乱最直观的体现。

本研究旨在通过研究长期摄入不同形态果糖的大鼠MCP-1和TNF- α 以及肝脏、胰腺组织病理上的差异,为果糖形态不同所引起的代谢上的差异做出进一步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级雄性SD大鼠:体重100~120g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物合格证编号2007000539824。

1.1.2 试剂 考马斯亮蓝法蛋白定量试剂盒:南京建成生物工程研究所;TNF- α 酶联免疫试剂盒:上海江莱生物科技有限公司;MCP-1酶联免疫试剂盒:上海江莱生物科技有限公司;10%的福尔马林,4%甲醛溶液。

1.1.3 器材 高速冷冻离心机:SCR 20BC;电子分析天平:AB104-N;电动组织匀浆机:德国IKA;分光光度计:V-1800;酶标仪:Gene 5;石蜡病理切片机:HS2205;光学显微镜:UB202i。

1.2 实验方法

1.2.1 动物饲养及分组 清洁级雄性SD大鼠40只,适应性喂养2w后随机分为5组,每组8只,分别喂食等热量含不同种类碳水化合物的单纯日粮,饲料配方参照文献^[9]。正常对照组(68%淀粉,ST组),蔗糖组(68%蔗糖,SU组),果糖葡萄糖组(34%果糖+34%葡萄糖,F/G组),果糖淀粉组(34%果糖+34%淀粉,F/ST组)以及葡萄糖淀粉组(34%葡萄糖+34%淀粉,G/ST组)。大鼠自由摄食饮水,每周称体质量1次,每天称量采食量。

1.2.2 血清、全血及内脏组织收集 喂养到第11周末,停食不停水12h,断尾取血,过量乙醚迷晕后,脱颈处死,解剖,心脏取血,在低温(4℃)下3000r离心10min,得血清,取肝脏、胰腺、睾周脂肪及肾周脂肪等组织,称质量,计算肝指数及内脏脂肪系数。肝脏(取相同部分)和胰腺用10%的福尔马林固定,其余部分-70℃低温冻存,待测。

肝指数=肝脏质量/体质量;

内脏脂肪系数=内脏脂肪质量/体质量

1.2.3 血清及肝脏 TNF- α 、MCP-1 的测定

1)血清及肝脏总蛋白质质量分数的测定:血清用生理盐水按血清:生理盐水=1:49 的比例稀释待测。肝脏按质量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的生理盐水,冰水浴条件机械匀浆,取上清液,稀释待测。考马斯亮蓝法测定总蛋白质质量分数。

2)血清及肝脏 TNF- α 、MCP-1 的测定:按照 TNF- α 、MCP-1 Elisa 试剂盒说明书要求进行测定。

1.2.4 肝脏和胰脏的病理变化检查 取已固定好的肝脏和胰脏组织各一块(约 10 mm \times 10 mm \times 2 mm),经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制成厚度为 4 μ m 的切片,进行苏木精-伊红(HE)染色^[10],中性树胶封固,光学显微镜下观察。

1.2.5 统计学处理 在 SPSS 16.0 软件上进行数据

分析。数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较采用 ANOVA 方差分析。

2 结果与分析

2.1 喂养 11 w 后各组大鼠指标检测结果

实验正式开始时,各组大鼠体重无差异,不同饲料喂养 11 w 后,SU 组大鼠体重有高于对照 ST 组的趋势,但是无显著性差异,与对照组相比,其他各实验组大鼠体重差异性均不显著,但是 F/G 组大鼠体重显著低于 SU 组($P<0.05$)。3 个含果糖的实验组(SU、F/G 和 F/ST)其内脏脂肪系数(肾周脂肪+睾周脂肪)明显高于对照组($P<0.05$),但 3 个实验组之间并无显著性差异,此外,肝指数显著性只体现在 F/ST 组,见表 1。

表 1 各组大鼠喂养 11 w 后的平均体质量、料重比、肝指数及内脏脂肪指数

Table 1 Body weight, food(Δ BW), liver index and visceral fat coefficient after 11 weeks of specific diet ($\bar{x}\pm s, n=8$)

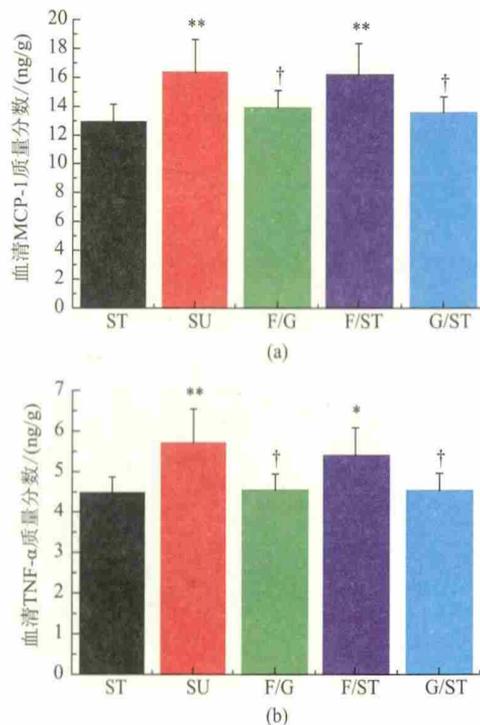
指标	体质量/g	料重比/(g/g)	肝指数/%	内脏脂肪系数/%
ST	639.93 \pm 34.11	6.71 \pm 0.58	2.57 \pm 0.18	4.20 \pm 0.17
SU	670.79 \pm 41.47	5.65 \pm 0.56*	2.80 \pm 0.30	5.67 \pm 0.97*
F/G	608.90 \pm 54.88**	6.51 \pm 0.56	2.76 \pm 0.19	5.31 \pm 0.48*
F/ST	619.20 \pm 52.69	6.24 \pm 0.50	2.93 \pm 0.22*	5.53 \pm 1.32*
G/ST	624.41 \pm 79.61	6.80 \pm 0.15	2.58 \pm 0.14	5.05 \pm 1.53

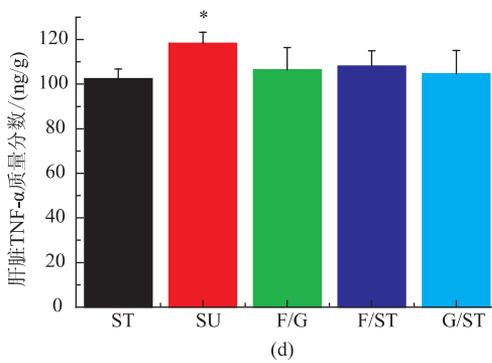
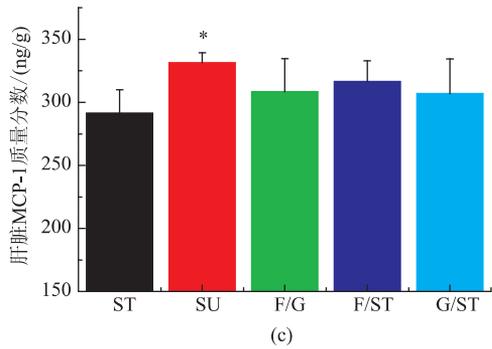
注:与对照组(ST)比较,* $P<0.05$;与 SU 组比较,** $P<0.05$ 。

2.2 血清及肝脏 MCP-1 及 TNF- α

血清及肝脏中炎症因子(MCP-1 及 TNF- α)的酶联免疫法测试结果见图 1。与对照组相比,饲喂 SU 和 F/ST 两种饲料的大鼠血清中的 MCP-1 显著高于对照($P<0.01$),其他两个实验组(F/G 与 G/ST)有高于对照组的趋势,但差异不显著,而与 SU 组相比,其血清中的 MCP-1 显著降低($P<0.05$)。4 个实验组大鼠肝脏中 MCP-1 质量分数均高于对照,但只有 SU 组差异显著($P<0.05$),各实验组之间差异无统计学意义,但 SU 组有高于 F/G 组的趋势。

各组大鼠间血清及肝脏中的 TNF- α 的变化趋势与 MCP-1 基本一致,SU 及 F/ST 两组血清中的 TNF- α 显著高于对照,而肝脏中的 TNF- α 质量分数只有 SU 组显著升高,F/G、F/ST 及 G/ST 之间差异无统计学意义。



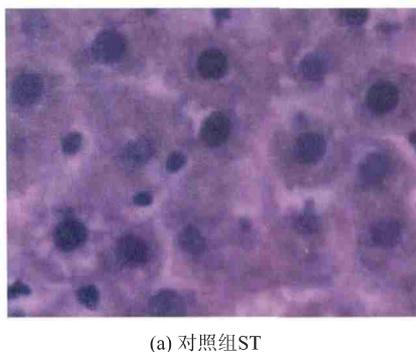


注:与对照组(ST)比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与SU组比较,[†] $P < 0.05$ 。

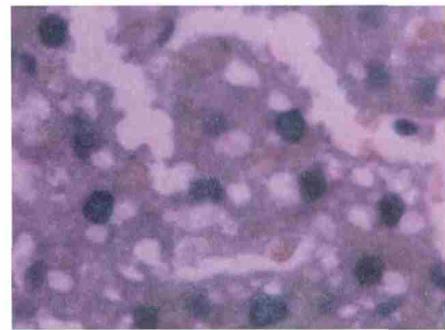
图1 各组大鼠血清及肝脏 MCP-1 和 TNF- α 的质量分数
Fig. 1 Serum and liver levels of MCP-1 and TNF- α in rats fed specific diet

2.3 各组大鼠肝脏、胰脏病理变化

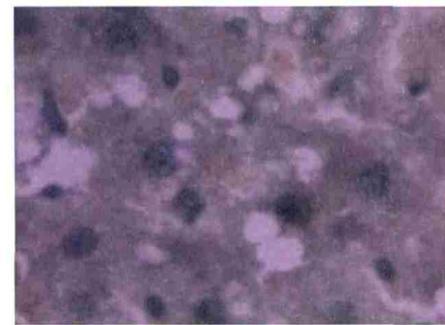
肝脏组织 HE 染色切片显示:对照组(图 2a)大鼠肝小叶结构完整清晰,肝细胞结构正常,呈多边形、单核或双核,基本无脂滴;含果糖实验组(图 2b、c、d)肝细胞脂滴数量明显增多,部分肝细胞脂肪变性,尤其 SU 组(图 2b)和 F/ST 组(图 2d)脂肪滴沉积明显,大部分肝细胞已经脂肪变性,受损;而 F/G 组有轻微的脂质沉积,多数肝细胞结构尚完整;葡萄糖组(图 2e)肝细胞结构基本正常,脂滴少见。



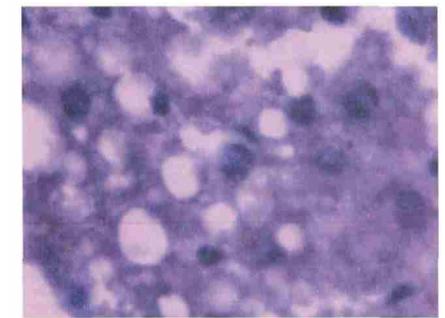
(a) 对照组ST



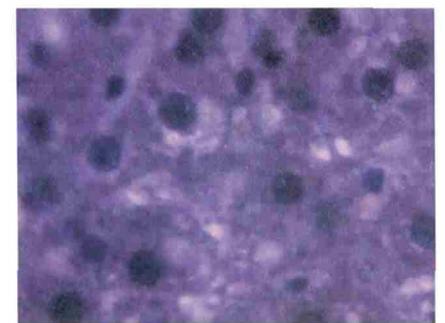
(b) 实验组一SU



(c) 实验组二F/G



(d) 实验组三F/ST



(e) 实验组四G/ST

图2 各组大鼠肝脏组织病理变化($\times 400$)

Fig. 2 Histological structure of rat liver sections (magnification $\times 400$)

胰脏组织 HE 染色切片显示:对照组(图 3a)胰岛大小数量正常,大小均一,形状规则,界限清楚;实验组(图 3b、c、d、e)胰岛病变不明显,SU 组(图 3b)和 F/ST(图 3d)组有轻微的胰岛增生及颗粒样变性。

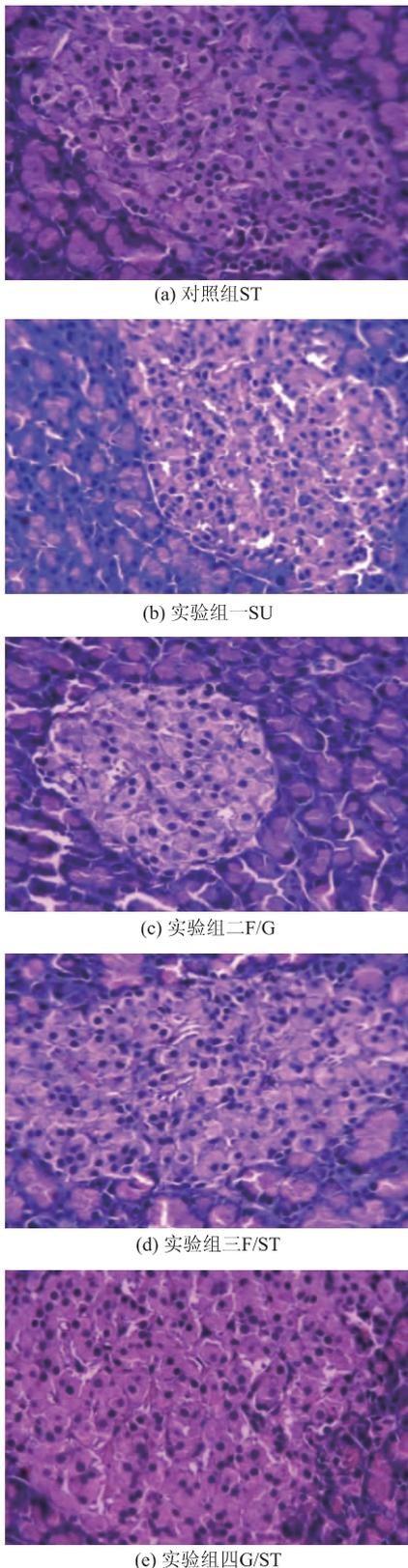


图3 各组大鼠胰腺组织病理变化(×400)

Fig. 3 Histological structure of rat pancreas sections (magnification×400)

3 结语

为了探讨游离态果糖和结合态果糖在代谢上的差异,作者对比了经过不同含糖饲料喂养 11 w 之后的大鼠血清及肝脏炎症因子 MCP-1 和 TNF- α 以及肝脏、胰腺组织病理上的变化。研究表明,与游离态果糖(F/G)相比,结合态果糖(SU)会引起更为严重的代谢综合征症状,具体表现在体重显著增加、血清及肝脏炎症因子浓度升高、肝脏脂质沉积严重以及胰腺组织轻微病变等。此外,无游离葡萄糖(G)组 F/ST 比有游离 G 组 F/G 表现出更为严重的炎症因子水平及肝脏脂质沉积,推测游离 G 可能对 F/G 的代谢起到了一定的阻碍作用。

大量研究表明,代谢综合征(MS)患者体内存在低度的炎症状态,低度的系统性慢性炎症反应可能是 MS 各组分之间相互联结的枢纽^[11]。本实验中,结合态果糖组(SU)的血清 TNF- α 质量分数显著高于游离态果糖组(F/G)。动物实验及临床试验均表明, TNF- α 不仅是脂肪肝早期阶段的媒介,更有可能导致更为严重的肝脏损伤^[12-14]。有研究报道,在小儿非酒精性脂肪肝患者中,血清中的 TNF- α 与肝损伤指数呈显著正相关^[14]。这进一步说明,结合态果糖有更易产生代谢综合征的趋势和可能性,而且这种差异与 TNF- α 有关。此外,在本研究 11 w 的实验周期里, SU 组肝脏的 MCP-1 及 TNF- α 质量分数有高于 F/G 组的趋势,但差异并不显著,若实验周期延长,炎症因子在肝脏中的表现可能会更加明显。

肝脏是人体功能最活跃的合成和分解代谢器官之一,是果糖首要的代谢场所,若 SU 与 HFCS 代谢之间有差异,则应该最先在肝脏中显现^[7]。在本研究中,含果糖组(SU、F/G 及 F/ST)均有不同程度的肝脏脂肪沉积,而对照组与 G/ST 组则没有明显的肝脏病变,这进一步证实了果糖易引起代谢综合征这一论断。其中,与 F/G 组相比, SU 与 F/ST 组肝脏脂质沉积现象更为严重,我们推断游离态葡萄糖(G)的出现可能对 F/G 中果糖起到了抑制作用。虽然之前有研究表明,果糖与葡萄糖代谢的通路是相互独立的^[15],但是该研究采用的是短期静脉注射的方法,检测分别注射蔗糖和果糖+葡萄糖溶液的患者 3 h 之后的血清常规指标,由于实验周期太短,所以并不排除长期实验中果糖与葡萄糖有相互影响的可能。胰腺是维持血糖正常的最主要的器官,但

本实验中并没有明显的胰岛病变,只在SU组和F/ST组中有轻微的颗粒样变性,究其原因可能与试验周期短有关,类似的结果在文献[16]也有报道。

作者经研究认为,高糖的饮食模式容易引起机体炎症及内脏组织病变,其中结合态果糖,即蔗糖

的危害性大于游离态果糖(F/G),具体的炎症通路还需要进一步探讨。同时,炎症因子的水平可以作为预测代谢综合征的参考指标,并为预防糖尿病并发症提供依据。

参考文献:

- [1] Livesey G. Fructose ingestion:dose-dependent responses in health research [J]. **Journal of Nutrition**,2009,139 (6):S1246-S1252.
- [2] 王兴安,巫冠中. 果糖的代谢及其对健康的影响[J]. 药学与临床研究,2011(3):244-246.
WANG Xingan,WU Guanzhong. Fructose metabolism and its impact on health [J]. **Pharmaceutical and Clinical Research**, 2011(3):244-246.(in Chinese)
- [3] Rippe J M,Angelopoulos T J. Sucrose,high-fructose corn syrup,and fructose,their metabolism and potential health effects:what do we really know?[J]. **Advances in Nutrition**,2013,4(27):236-245.
- [4] Akgun S,Ertel N H. The effects of sucrose,fructose,and high-fructose corn syrup meals on plasma glucose and insulin in non-insulin-dependent diabetic subjects[J]. **Diabetes Care**,1985,8(3):279-283.
- [5] Melanson K J,Zukley L,Lowndes J,et al. Effects of high-fructose corn syrup and sucrose consumption on circulating glucose, insulin,leptin,and ghrelin and on appetite in normal-weight women[J]. **Nutrition**,2007,23(2):103-112.
- [6] Thompson R G, Hayford J T,Hendrix J A. Triglyceride concentrations:the disaccharide effect [J]. **Science**,1979,206(4420):838-839.
- [7] Sanchez-Lozada L G,Mu W,Roncal C,et al. Comparison of free fructose and glucose to sucrose in the ability to cause fatty liver [J]. **Eur J Nutr**,2010,49(1):1-9.
- [8] 尹学哲,许惠仙,赵文玺. 草苈蓉水萃取物对脂多糖与 D-氨基半乳糖所致小鼠肝脏氧化应激和细胞凋亡的影响[J]. 食品与生物技术学报,2013(5):469-473.
YIN Xuezhe,XU Huixian,ZHAO Wenxi,et al. Effect of aqueous fraction of *Boschniakia rossica* on hepatic oxidative stress and hepatocyte apoptosis of mice with acute liver injury induced by Lipopolysaccharide and D-galactosamine [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013(5):469-473.(in Chinese)
- [9] Thresher J S,Podolin D A,Wei Y,et al. Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance [J]. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**,2000,279(4):R1334-1340.
- [10] 孙文. 高果糖诱导大鼠肝脏脂质沉积的机制及非诺贝特的干预作用[D]. 石家庄:河北医科大学,2011.
- [11] 陈启钊. 代谢综合征患者炎症介质的变化[J]. 中华高血压杂志,2007(8):687-688.
CHEN Qizhao. Changes of inflammatory mediators in patients with metabolic syndrome[J]. **Chin J Hypertension**,2007(8):687-688.(in Chinese)
- [12] Crespo J,Cayon A,Fernandez-Gil P,et al. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors,p55 and p75,in nonalcoholic steatohepatitis patients[J]. **Hepatology**,2001,34(6):1158-1163.
- [13] Ding W X,Yin X M. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury [J]. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**,2004,8(4):445-454.
- [14] Manco M, Marcellini M, Giannone G,et al. Correlation of serum TNF-alpha levels and histologic liver injury scores in pediatric nonalcoholic fatty liver disease[J]. **American Journal of Clinical Pathology**,2007,127(6):954-960.
- [15] Cook G C. Comparison of the absorption and metabolic products of sucrose and its monosaccharides[J]. **Clin Sci**,1970,38:687-697.
- [16] Aida Zarfeshani MSAMaHka. Evaluating of high fructose diet to induce hyperglycemia and its inflammatory complications in rats [J]. **Pakistan Journal of Nutrition**,2012,11(1):991-998.