

不同时期高蛋白营养干预对宫内生长受限大鼠体成分和骨骼肌 mTOR 活性的影响

余慕雪¹, 沈振宇¹, 莫清萍², 丘小汕^{1*}

(中山大学附属第一医院 1.儿科; 2.黄埔院区儿科, 广东, 广州 510080)

摘要:【目的】探讨不同时期高蛋白营养干预对宫内生长受限(IUGR)大鼠体成分和骨骼肌哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)活性的影响。【方法】64只IUGR新生雄鼠出生时随机分为2组:IUGR对照组(CR)组40只、IUGR早期高蛋白干预组(EPR)组24只,另正常新生雄鼠24只为正常对照组(CN组)。4周龄时各组处理8只大鼠后CR组随机取16只大鼠组成IUGR延迟高蛋白干预组(DPR组)。3周哺乳期间CN组和CR组母鼠予基础饲料自由饮食,而EPR组母鼠予高蛋白饲料自由饮食;CN组和CR组断乳后予基础饲料自由饮食至12周龄,EPR组断乳后予高蛋白饲料自由饮食至4周龄、以后予基础饲料自由进食至12周龄;DPR组4~8周龄予高蛋白饲料、8~12周龄予基础饲料自由饮食。8、12周龄各组再处理8只大鼠。4、8、12周龄分别检测各组大鼠体成分、血清脂联素、血糖和胰岛素水平、骨骼肌纤维横截面积、骨骼肌mTOR活性。计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)。【结果】与CN组相比,CR组4、8、12周龄和DPR组12周龄体脂肪百分比增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而瘦体质量百分比、骨骼肌纤维横截面积、骨骼肌mTOR活性、血清脂联素水平减低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。CR组8、12周龄和DPR组12周龄HOMA-IR高于CN组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与CR组相比,EPR组4、8、12周龄以及DPR组8周龄体脂肪百分比减低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而瘦体质量百分比、骨骼肌纤维横截面积、骨骼肌mTOR活性、血清脂联素水平增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。EPR组8、12周龄和DPR组8周龄HOMA-IR低于CR组(P 值均 < 0.01)。【结论】出生到4周龄是高蛋白营养干预IUGR大鼠较合适的关键时期,近期和远期均可改善其体成分和胰岛素敏感性,与高蛋白干预上调骨骼肌mTOR活性、促进瘦体质量增长而减少体脂成分有关。

关键词: 宫内生长受限;体成分;高蛋白;mTOR

中图分类号: R723

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2012)06-0749-07

Effects of High Protein Nutrition Intervention on Body Composition and Skeletal Muscle mTOR Activity of IUGR Rats during Different Periods

YU Mu-xue¹, SHEN Zhen-yu¹, MO Qing-ping², QIU Xiao-shan^{1*}

(1. Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Pediatrics, Huangpu District, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510700, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effects of high protein nutrition intervention on body composition and skeletal muscle mTOR (mammalian target of rapamycin) activity of IUGR (intrauterine growth restriction) rats during different periods. 【Methods】There were 64 male IUGR rats: 40 IUGR rats in the IUGR control group (CR group), 24 IUGR rats in the early high protein intervention IUGR group (EPR group). There were 24 normal birth weight male rats in normal control group (CN group). At 4 weeks of age, 8 rats of these groups were executed and 16 rats in CR group were randomly assigned to the delay high protein intervention IUGR group (DPR group). All rats were lactated for 3 weeks and the mother rats of CN and CR group were provided free access to basic diet while the mother rats of EPR group were provided free access to high protein diet. After weaning rats in CN and CR group were provided free access to basic diet until 12 weeks of age. After weaning rats in EPR group were provided free access to high protein diet until 4 weeks of age. At 4 weeks of age they were provided free access to basic diet until 12 weeks of age. Rats in DPR group were provided free access to high protein diet from 4 weeks of age to 8 weeks of age, and then they were provided free access to basic diet until 12 weeks of age. At 8, 12 weeks of age, 8 rats of these groups were executed. The body composition, serum

收稿日期: 2012-02-18

基金项目: 广东省科技计划项目(2011B031800143, 2009B060700038, 2008B060600062)

作者简介: 余慕雪, 副主任医师, 博士, E-mail: yumuxue@163.com; * 通信作者: 丘小汕, 教授, 博士生导师, E-mail: xshqiu@163.com

adiponectin, blood glucose and insulin level, cross sectional area of skeletal muscle fibers, skeletal muscle mTOR activity were measured at 4, 8, 12 weeks of age. The homeostasis model assessment model for insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated. 【Results】 The percentage of fat mass was significantly higher in the CR group than in the CN group at 4, 8, and 12 weeks of age and the DPR group at 12 weeks of age ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The percentage of lean mass, cross sectional area of skeletal muscle fibers, skeletal muscle mTOR activity, serum adiponectin level were significantly lower in the CR group than in the CN group at 4, 8, and 12 weeks of age and the DPR group at 12 weeks of age ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). HOMA-IR was significantly higher in the CR group than in the CN group at 8, 12 weeks of age and the DPR group at 12 weeks of age ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The percentage of fat mass was significantly lower in the EPR group at 4, 8, and 12 weeks of age and in DPR group at 8 weeks of age than in the CR group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The percentage of lean mass, cross sectional area of skeletal muscle fibers, skeletal muscle mTOR activity, serum adiponectin level were significantly higher in the EPR group at 4, 8, and 12 weeks of age and in DPR group at 8 weeks of age than in the CR group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). HOMA-IR was significantly lower in the EPR group at 8, 12 weeks of age and in DPR group at 8 weeks of age than in the CR group ($P < 0.01$). 【Conclusions】 Birth to 4 weeks of age is the appropriate window period of high protein nutrition intervention of IUGR rats. High protein nutrition intervention from birth to 4 weeks of age improves the short and long term body composition and insulin sensitivity of IUGR rats. High protein nutrition intervention increases lean mass and decreases fat mass of IUGR rats possibly by activating mTOR of skeletal muscle.

Key words: IUGR; body composition; high protein; mTOR

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(6): 749-755]

宫内生长受限 (intrauterine growth restriction, IUGR)个体在宫外生长过程中易出现体脂过多积聚^[1]。我们的前期研究^[2]示 IUGR 大鼠生后早期给予高蛋白等饮食然后恢复基础饮食能减少腹部脂肪、避免胰岛素抵抗的发生且达到早期体格追赶生长。“发育可塑性”^[3]的观点认为环境因素可以造成同一基因型在生理状态、形态和行为的不同。不同时期高蛋白营养干预 IUGR 大鼠后恢复基础饮食, 对其近期和远期体成分构成和胰岛素敏感性的效果是否有差异? 高蛋白营养干预改善 IUGR 胰岛素敏感性的分子机制亦值得探索。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)在感受营养信号, 调节细胞生长与增殖中扮演重要角色。支链氨基酸, 尤其是亮氨酸, 激活 mTOR, 调节 mRNA 的翻译、介导蛋白质的合成^[4]。mTOR 可能参与了 IUGR 瘦体质量增长的调控。本研究拟在出生 ~ 4 周龄 (相当于人类出生~儿童期), 4~8 周龄 (相当于人类儿童期~青春期)两个不同时期, 高蛋白营养干预 IUGR 大鼠, 探讨其对 IUGR 大鼠体成分和骨骼肌 mTOR 活性的影响。

1 材料与方法

1.1 动物饲料

广东省医学动物实验中心配制 SPF 级动物饲料。参考美国营养学会 1993 年出版的啮齿类动物纯化生长饲料 (America Institute of Nutrition Purified

Rodent Diet 93, AIN93-G) 配制基础饲料^[5], 能量为 16.5 kJ/g, 其可利用蛋白质能量占 20%; 高蛋白饲料能量与基础饲料一致、增加可利用酪蛋白 100 g/kg、减少淀粉 100 g/kg, 其可利用蛋白质能量占 30%。动物饲料中蛋白质 (均为酪蛋白) 的氨基酸按饲料中的含量 (g/kg) 为, 丙氨酸: 4.6、精氨酸: 6.4、天冬氨酸: 12.2、半胱氨酸: 3.7、谷氨酸: 36.3、甘氨酸: 3.2、组氨酸: 4.6、异亮氨酸: 8.5、亮氨酸: 15.4、赖氨酸: 13.0、蛋氨酸: 4.6、苯丙氨酸: 8.8、脯氨酸: 20.5、丝氨酸: 9.7、苏氨酸: 6.7、色氨酸: 2.1、酪氨酸: 9.3、缬氨酸: 10.0。

1.2 实验动物和分组

广东省医学动物实验中心提供 SPF 级 Sprague-Dawley 大鼠, 动物实验室饲养室温 20 ~ 25 °C, 湿度 40% ~ 70%, 昼夜周期各 12 h。孕鼠限食法建立 IUGR 大鼠模型。雌雄性大鼠 2:1 合笼自然交配, 交配后雌性大鼠阴道涂片, 发现精子视为妊娠第 1 天, 然后雌性孕鼠分笼喂养。正常对照组孕鼠, 受孕后基础饲料自由饮食; IUGR 模型组孕鼠, 受孕后第 1 天开始限制饮食, 以自由饮食孕鼠前 1 d 食量的 40% 为进食量, 待自然分娩。以 IUGR 模型组孕鼠分娩鼠仔出生体质量和身长低于正常对照组孕鼠分娩鼠仔 -2 SD 以下者为 IUGR 鼠仔。哺乳期正常对照组和 IUGR 模型组的每窝鼠仔均控制在 8 只, 雄性鼠仔 5 ~ 8 只, 不足 8 只雄性鼠仔者, 保留部分雌性鼠仔。孕期正常新生雄鼠 24 只为正常对照组 (CN 组)。64 只新生

IUGR新生雄鼠出生时随机分为2组:IUGR对照组(CR)组40只、IUGR早期高蛋白干预组(EPR)组24只。4周龄时各组处理8只大鼠后CR组随机取16只大鼠进入IUGR延迟高蛋白干预组(DPR组)。CN组和CR组在3周哺乳期间母鼠予基础饲料自由饮食,而EPR组母鼠予高蛋白饲料自由饮食;断乳后CN组和CR组予基础饲料自由饮食至12周龄实验结束;EPR组断乳后予高蛋白饲料自由饮食至4周龄,满4周龄予基础饲料自由进食至12周龄实验结束;DPR组大鼠在4~8周龄予高蛋白饲料自由饮食,8~12周龄予基础饲料自由饮食至实验结束。8、12周龄各组再处理8只大鼠。

1.3 主要试剂和仪器设备

血糖试剂盒(上海复旦张江生物医药股份有限公司)、胰岛素放免试剂盒(中国原子能高科有限公司)、Rat Adiponectin ELISA试剂盒(美国 Millipore)、mTOR (7C10) Rabbit mAb(美国 cell Signaling)、Phospho-mTOR (Ser2448) Antibody(美国 cell Signaling)、小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(上海康成生物公司)、PMSF(碧云天生物技术研究)、RIPA裂解液(强)(碧云天生物技术研究)、BCA法蛋白定量检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)、BX60显微镜(日本 Olympus)、Micropublisher 5.0 RTV 高性能数码显微摄像头(加拿大 QImaging)、Image-Pro Plus 5.1 图像处理析软件(美国 Media Cybernetics)、Hologic QDR 4500A 双能 X 线吸收仪(美国 HOLOGIC)、ODYSSEY 红外荧光扫描成像系统(美国 Gene Company)。

1.4 动物处理和实验指标测定

1.4.1 体格指标测定和体成分分析 4、8、12周龄各组大鼠随机取8只大鼠,禁食12h,腹腔内注射100 g/L水合氯醛3 mL/kg麻醉后,取俯卧位采用双能 X 线吸收仪其附属小动物软件分析得到:①体质量(body mass, BM)、②体脂肪量(fat mass, FM)、体脂肪百分比(FM%),③瘦体质量(lean mass, LM)、瘦体质量百分比(LM%),④骨矿物质含量(bone mineral content, BMC)、骨矿物含量百分比(BMC%)等。

1.4.2 血糖、血胰岛素和血脂联素测定 各组8只大鼠在4、8、12周龄完成体成分分析次日,禁食12h,腹腔内注射100 g/L水合氯醛3 mL/kg麻醉,眼眶后静脉丛采血1.0~2.0 mL,血标本立即

离心,吸取血清检测马上采用氧化酶-过氧化物酶法测定检测血糖,其余血清低温冻存。然后分离大鼠右后肢股二头肌骨骼肌组织-80℃冷冻保存。统一采用放射免疫法测定血清胰岛素水平、酶联免疫吸附法测定血清脂联素水平。计算胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment model for insulin resistance, HOMA-IR)^[6]。

1.4.3 骨骼肌纤维横截面积 每组8只大鼠的股二头肌中段5 mm按垂直于肌纤维的方向,40 g/L多聚甲醛溶液固定、石蜡包埋作横切片、常规HE染色。Olympus BX60显微镜下采用Image-Pro Plus 5.1 中文版软件进行图像分析,同一标本在400倍高倍显微镜下任选10个视野,测量每个视野的骨骼肌纤维横截面积,取算术平均值为该标本的骨骼肌纤维横截面积。

1.4.4 骨骼肌 mTOR 总蛋白和磷酸化蛋白测定 取约50 mg骨骼肌组织,研磨后加入400 μ L组织细胞裂解液进行超声粉碎,4℃、12 000 $\times g$ 离心15 min,留取上清;取2 μ L上清,BCA法测定蛋白质浓度,其余分装后储于-80℃冰箱备用。常规Western blotting方法制备蛋白样品、垂直电泳、湿法转膜、孵育一抗、孵育二抗,ODYSSEY红外荧光扫描成像系统扫描图像并进行灰度分析。半定量分析各检测骨骼肌 mTOR、p-mTOR 和内参照 GAPDH 的含量,计算各个实验组与同周龄正常对照组的检测蛋白的表达相对量。

1.5 统计学方法

计量资料以表示。采用SPSS 13.0统计软件进行统计分析。正常新生大鼠与IUGR新生大鼠出生体质量比较采用 t 检验。CN组、CR组、EPR和DPR组之间体质量、体成分、血糖、胰岛素、HOMA-IR、血清脂联素水平、骨骼肌纤维横截面积、骨骼肌 mTOR、p-mTOR 的表达相对量等各指标比较采用方差分析,组间两两比较采用LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组体质量和体成分分析

24只正常新生雄性大鼠(CN组)出生体质量是 (7.06 ± 0.40) g,64只IUGR新生IUGR雄性大鼠出生体质量是 (5.05 ± 0.30) g,显著低于CN组($t = 25.255, P = 0.000$)。4、8、12周龄各组的体质量

表 1 各组大鼠 4、8、12 周龄体质量和体成分分析

Table 1 Body weight and body composition at 4, 8, and 12 weeks of age (n=8, $\bar{x} \pm s$)

Group	4th week				8th week				12th week			
	BM/g	FM/%	LM/%	BMC/%	BW/g	FM/%	LM/%	BMC/%	BW/g	FM/%	LM/%	BMC/%
CN	85.0 ± 5.4	13.59 ± 1.2	84.3 ± 1.2	2.14 ± 0.13	276.8 ± 14.0	13.1 ± 1.7	84.5 ± 1.7	2.38 ± 0.10	428.9 ± 16.4	14.1 ± 1.7	83.3 ± 1.7	2.61 ± 0.10
CR	78.0 ± 3.4 ¹⁾	15.41 ± 1.1 ¹⁾	82.4 ± 1.1 ¹⁾	2.18 ± 0.10	281.5 ± 16.1	16.5 ± 2.0 ¹⁾	81.2 ± 2.0 ¹⁾	2.32 ± 0.15	429.2 ± 15.0	18.6 ± 2.2 ¹⁾	78.8 ± 2.1 ¹⁾	2.60 ± 0.07
EPR	86.1 ± 5.2 ²⁾	13.81 ± 1.4 ⁴⁾	84.0 ± 1.3 ⁴⁾	2.21 ± 0.20	277.8 ± 13.0	13.2 ± 1.0 ²⁾	84.5 ± 1.7 ²⁾	2.35 ± 0.08	427.8 ± 16.8	14.1 ± 1.6 ²⁾	83.4 ± 1.7 ²⁾	2.56 ± 0.10
DPR	-	-	-	-	254.5 ± 188 ¹²⁾	11.1 ± 1.2 ²³⁾	86.5 ± 1.2 ²³⁾	2.38 ± 0.05	414.7 ± 21.6	16.0 ± 1.2 ²³⁾	81.4 ± 1.2 ²³⁾	2.64 ± 0.06
F	6.864	5.234	5.309	0.449	4.916	17.186	15.854	0.844	1.180	12.006	11.969	1.111
P	0.005	0.014	0.014	0.644	0.007	0.000	0.000	0.482	0.335	0.000	0.000	0.361

BM: body mass, FM: fat mass, LM: lean mass, BMC: bone mineral content; CN: normal control, CR: IUGR control, EPR: early high protein intervention IUGR; DPR: DPR: delay high protein intervention IUGR; 1) compared with CN group, $P < 0.01$; 2) compared with CR group, $P < 0.01$; 3) compared with CN group, $P < 0.05$; 4) compared with CR group, $P < 0.05$.

和体成分分析指标见表 1。4 周龄时 CR 组体质量显著低于 CN 组和 EPR 组(P 值均 < 0.01), 而 CN 组与 EPR 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。8 周龄时 CN 组、CR 组和 EPR 组体质量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), DPR 组体质量显著低于 CN 组和 CR 组(P 值均 < 0.01)。12 周龄时各组体质量差异无统计学意义(P 值均 > 0.05)。4、8、12 周龄时 CR 组瘦体质量百分比显著低于 CN 组和 EPR 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、体脂肪百分比显著高于 CN 组和 EPR 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 CN 组和 EPR 组体脂肪百分比、瘦体质量百分比无差异(P 值均 > 0.05)。DPR 组 8 周龄时瘦体质量百分比显著高于 CN 组($P < 0.05$)和 CR 组($P < 0.01$)、体脂肪百分比显著低于 CN 组 ($P < 0.05$) 和 CR 组 ($P < 0.01$); 12 周龄时 DPR 组瘦体质量百分比显著低于 CN 组 ($P < 0.05$)、体脂肪百分比显著高于 CN 组($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠 4、8、12 周龄血清脂联素水平

Table 2 Serum adiponectin level at 4, 8, and 12 weeks of age (n = 8, $\mu\text{g/mL}$)

Group	4th week	8th week	12th week
CN	7.8 ± 0.6	7.4 ± 0.7	5.9 ± 0.4
CR	6.8 ± 0.7 ¹⁾	6.4 ± 0.6 ¹⁾	4.7 ± 0.6 ¹⁾
EPR	7.6 ± 0.7 ⁴⁾	7.2 ± 0.7 ⁴⁾	5.8 ± 0.6 ²⁾
DPR	-	7.0 ± 0.5 ⁴⁾	5.1 ± 0.6 ³⁾
F	4.741	4.012	7.457
P	0.020	0.017	0.001

CN, CR, EPR, DPR: same as table 1. 1) compared with CN group, $P < 0.01$; 2) compared with CR group, $P < 0.01$; 3) compared with CN group, $P < 0.05$; 4) compared with CR group, $P < 0.05$.

2.2 各组血清脂联素水平

各组大鼠在 4、8、12 周龄的血清脂联素水平见表 2。4、8、12 周龄血清脂联素水平 CR 组显著低于 CN 组和 EPR 组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 而

表 3 各组大鼠 4、8、12 周龄空腹血糖、胰岛素水平和 HOMA-IR

Table 3 Fasting blood glucose, insulin and HOMA-IR at 4, 8, and 12 weeks of age (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

Group	4th week			8th week			12th week		
	Glucose/ (mmol/L)	Insulin/ (mU/L)	HOMA-IR	Glucose/ (mmol/L)	Insulin/ (mU/L)	HOMA-IR	Glucose/ (mmol/L)	Insulin/ (mU/L)	HOMA-IR
CN	5.1 ± 0.7	5.7 ± 1.0	1.26 ± 0.12	5.2 ± 0.4	6.5 ± 1.0	1.51 ± 0.30	5.4 ± 0.7	7.2 ± 0.7	1.76 ± 0.36
CR	5.2 ± 0.7	5.5 ± 1.0	1.25 ± 0.24	5.3 ± 0.6	8.5 ± 0.9 ¹⁾	2.03 ± 0.37 ¹⁾	5.6 ± 0.8	9.3 ± 0.7 ¹⁾	2.30 ± 0.44 ¹⁾
EPR	5.1 ± 0.4	5.5 ± 0.8	1.24 ± 0.20	5.3 ± 0.7	6.4 ± 0.6 ²⁾	1.49 ± 0.21 ²⁾	5.4 ± 0.6	7.1 ± 0.8 ²⁾	1.71 ± 0.35 ²⁾
DPR	-	-	-	5.2 ± 0.7	6.6 ± 1.0 ²⁾	1.53 ± 0.31 ²⁾	5.6 ± 0.7	8.6 ± 0.8 ^{1), 4)}	2.11 ± 0.25 ³⁾
F	0.021	0.095	0.043	0.049	10.796	5.781	0.147	14.893	5.052
P	0.979	0.910	0.958	0.985	0.000	0.003	0.931	0.000	0.006

CN, CR, EPR, DPR: same as table 1. 1) compared with CN group, $P < 0.01$; 2) compared with CR group, $P < 0.01$; 3) compared with CN group, $P < 0.05$; 4) compared with CR group, $P < 0.05$.

CN组和EPR组之间差异无统计学意义(P 值均 >0.05)。8周龄DPR组血清脂联素水平显著高于CR组($P<0.05$),CN组、EPR组和DPR组间血清脂联素水平差异无统计学意义(P 值均 >0.05)。12周龄DPR组血清脂联素水平低于CN组($P<0.05$)。

2.3 各组空腹血糖、胰岛素水平和 HOMA-IR

各组大鼠 4、8、12 周龄空腹血糖、胰岛素水平和 HOMA-IR 见表 3。4 周龄各组大鼠 HOMA-IR 差异无统计学意义(P 值均 >0.05)。8 周龄 CN 组、EPR 组和 DPR 组 HOMA-IR 之间无差异($P>0.05$)、但均显著低于 CR 组($P<0.01$)。12 周龄 CR 组、DPR 组 HOMA-IR 显著高于 CN 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.4 各组骨骼肌纤维横截面积

见表 4。4、8、12 周龄时 CR 组骨骼肌纤维横截面积显著小于 CN 组和 EPR 组(P 值均 <0.01)，CN 组和 EPR 组比较差异无统计学意义(P 值均 >0.05)。DPR 组 8 周龄时骨骼肌纤维横截面积显著大于 CR 组($P<0.01$)，与 CN 组、EPR 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。12 周龄 DPR 组骨骼肌纤维横截面积显著小于 CN 组($P<0.01$)。

2.5 各组骨骼肌 mTOR 总蛋白和磷酸化蛋白的表达

各组基础状态骨骼肌总 mTOR 和 p-mTOR 的表达相对量见图 1 和表 5。4、8、12 周龄各组骨骼肌总 mTOR 的表达相对量差异均无统计学意义(P 值均 >0.05)。4、8、12 周龄 p-mTOR 的表达相对量 CR 组显著低于 CN 组和 EPR 组(P 值均 <0.01)，

表 4 各组大鼠 4、8、12 周龄骨骼肌纤维横截面积

Table 4 Cross sectional area of skeletal muscle fibers at 4, 8, 12 weeks of age ($n=8, \bar{x} \pm s, \mu\text{m}^2$)

Group	4th week	8th week	12th week
CN	313 $\pm$ 33	1297 $\pm$ 137	3354 $\pm$ 328
CR	205 $\pm$ 22 ¹⁾	949 $\pm$ 113 ¹⁾	2612 $\pm$ 296 ¹⁾
EPR	298 $\pm$ 26 ²⁾	1202 $\pm$ 126 ²⁾	3176 $\pm$ 300 ²⁾
DPR	—	1256 $\pm$ 111 ²⁾	2802 $\pm$ 260 ¹⁾
<i>F</i>	36.289	13.109	10.427
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

CN, CR, EPR, DPR: same as table 1. 1) compared with CN group, $P<0.01$; 2) compared with CR group, $P<0.01$.

CN 组与 EPR 组比较差异无统计学意义(P 值均 >0.05)。8 周龄 DPR 组 p-mTOR 的表达相对量显著高于 CR 组($P<0.01$)，与 CN 组、EPR 组比较差异无统计学意义(P 值均 >0.05)。12 周龄 DPR 组 p-mTOR 的表达相对量显著低于 CN 组($P<0.05$)。

3 讨 论

前期研究基础上,我们在两个不同时期高蛋白干预 IUGR 大鼠,参考标准化的 AIN93-G 饲料^[5]配制基础饲料和高蛋白饲料,并采用目前较理想、精确的双能 X 线体成分分析技术^[7]进行体成分分析。本研究显示 IUGR 大鼠出生后宫内营养供给不足的状态得到改善,体质量出现追赶生长,但是基础饮食的 IUGR 大鼠体脂增长相对多于瘦体质量、伴机体胰岛素敏感性下降。人群调查亦显示 IUGR 出生后体格追赶生长时,肥胖、糖耐量异常

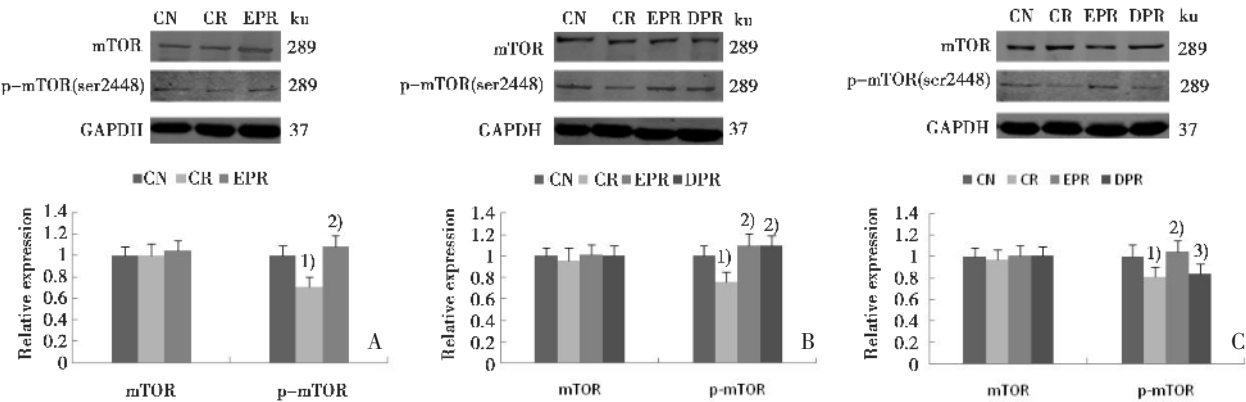


图 1 各组大鼠 4、8、12 周龄骨骼肌 mTOR、p-mTOR 的表达

Fig.1 Expression of total mTOR, mTOR phosphorylation in skeletal muscle at 4, 8, and 12 weeks of age

CN, CR, EPR, DPR: same as table 1. $n=6$; A: 4th week; B: 8th week; C: 12th week. 1) compared with CN group, $P<0.001$; 2) compared with CR group, $P<0.01$; 3) compared with CN group, $P<0.05$.

表 5 各组大鼠 4、8、12 周龄骨骼肌 mTOR、p-mTOR 的表达相对量

Table 5 Arbitrary unit of total mTOR, mTOR phosphorylation in skeletal muscle at 4, 8, 12 weeks of age (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

Group	4th week		8th week		12th week	
	mTOR	p-mTOR	mTOR	p-mTOR	mTOR	p-mTOR
CN	1.000 ± 0.085	1.000 ± 0.089	1.000 ± 0.083	1.000 ± 0.100	1.000 ± 0.081	1.000 ± 0.113
CR	0.997 ± 0.112	0.707 ± 0.092 ¹⁾	0.954 ± 0.122	0.761 ± 0.091 ¹⁾	0.971 ± 0.092	0.808 ± 0.094 ¹⁾
EPR	1.048 ± 0.091	1.079 ± 0.104 ²⁾	1.013 ± 0.092	1.102 ± 0.109 ²⁾	1.007 ± 0.097	1.044 ± 0.102 ²⁾
DPR	—	—	1.004 ± 0.095	1.096 ± 0.093 ²⁾	1.012 ± 0.084	0.837 ± 0.094 ³⁾
F	0.548	25.363	0.430	15.699	0.257	8.097
P	0.589	0.000	0.734	0.000	0.856	0.001

CN, CR, EPR, DPR; same as table 1. 1) compared with CN group, $P < 0.01$; 2) compared with CR group, $P < 0.01$; 3) compared with CN group, $P < 0.05$.

的发生率较正常出生体质量个体高^[8]。文献报道母鼠摄入较高蛋白饲料乳汁的蛋白质含量高于摄入较低蛋白饲料者^[9]。本研究在出生和 4 周龄时高蛋白营养干预 IUGR 大鼠 4 周,可以改善其体成分,瘦体质量增长增加,跟高蛋白干预上调骨骼肌 mTOR 活性,并经脂肪-肌肉轴改善机体胰岛素敏感性有关,而出生时高蛋白营养干预 IUGR 大鼠在近期和远期均可改善其体成分和胰岛素敏感性。

骨骼肌是机体蛋白质合成的主要场所^[10]、亦为机体瘦体质量的主要组成部分^[11]。当宫内营养供给减少,宫内发育个体为保证脑、心脏、肾上腺等重要器官的发育,对骨骼肌营养物质供应减少^[12],如在孕期限食的牛和羊动物模型研究中,牛胎和羊胎骨骼肌 p-mTOR 表达下降,伴肌细胞数量和肌肉体质量减少^[13]。mTOR 丝氨酸磷酸化是其活性表达的形式,Yao 等^[14]在添加精氨酸的新生猪模型中,骨骼肌 p-mTOR 表达提高,用放射性苯丙氨酸标记检测法测出蛋白质的合成速度提高。骨骼肌纤维体质量增加有赖于蛋白质合成的速度大于降解的速度^[15]。本研究 CR 组大鼠瘦体质量百分比、骨骼肌横截面积以及分子层面上骨骼肌 p-mTOR 表达较 CN 组大鼠低下,推测 IUGR 大鼠骨骼肌在宫内营养供给不足状态下,营养物质“重分配”^[12],已经出现骨骼肌 mTOR 活性下调,不利于其骨骼肌蛋白质的合成,宫外基础饲料自由饮食下,IUGR 大鼠可能持续宫内 mTOR 活性下调状态,而骨骼肌 mTOR 活性下调是 IUGR 瘦体质量减少的机制之一。

本研究 EPR 组和 DPR 组高蛋白营养干预 4 周,瘦体质量成分、骨骼肌横截面积和 mTOR 磷酸

化水平较 CR 组高。蛋白质是新生机体生长发育重要的营养物质^[16]。我们的研究对象为处于生长期的 IUGR 大鼠,予以高蛋白等高热量饲料进行营养干预,饲料中蛋白/能量比增加,使机体瘦体质量成分适当增长,防止过多体脂增长积聚。我们增加 10%的蛋白质干预,一方面维持新生机体正氮平衡保证新生组织的生长^[16],补足 IUGR 大鼠出生时骨骼肌体质量的不足;另一方面亮氨酸作为主要的支链氨基酸,是 mTOR 营养通路的主要上游刺激因子,进入细胞通过 class III PI3K 途径或通过人类酵母空泡蛋白分类相关蛋白 34 激活 mTOR^[15]。减少氨基酸的培养液中 p-mTOR 表达下降^[17]。高蛋白营养干预 IUGR 推测也可能通过增加亮氨酸等支链氨基酸发挥上调 mTOR 信号通路的效应,促进骨骼肌生长、瘦体质量增加。

脂肪组织释放的内分泌和代谢介质交联骨骼肌介导胰岛素抵抗的作用,脂联素是脂肪组织特异分泌的脂肪因子,为机体的胰岛素增敏剂,血清脂联素水平和体脂呈负相关^[18]。临床研究示高蛋白饮食可以减少肥胖个体的体脂成分,改善机体胰岛素敏感性^[19]。本研究 EPR 组和 DPR 组高蛋白营养干预 4 周,显示出生时早期高蛋白营养干预 IUGR 大鼠,8 周龄和 12 周龄其体成分、血清脂联素水平、胰岛素敏感性改善;而延迟蛋白营养干预 IUGR 大鼠,仅 8 周龄其体成分、血清脂联素水平、胰岛素敏感性改善。“程序化”观点认为在程序化调控过程中存在着关键“窗口期”,即最为关键或者敏感时期,这时期各种因素可造成组织或系统发育发生不可逆的改变^[20]。本研究示 IUGR 大鼠体成分发育的关键“窗口期”在 4 周龄以前,4 周龄前后不同时期高蛋白干预,产生的效应强度不

同。早期高蛋白干预在 IUGR 大鼠发育关键“窗口期”改善其骨骼肌 mTOR 的低活性状态,骨骼肌达到了程序化的生长、瘦体质量百分比达到跟正常出生体质量大鼠相当的水平,同时机体胰岛素敏感性改善;而 4 周龄始高蛋白营养干预,可改善 IUGR 大鼠骨骼肌 mTOR 低活性状态和促进瘦体质量增长,但是效应强度不及 4 周龄前进行干预,8 周龄恢复基础饲料 IUGR 大鼠骨骼肌 mTOR 又处于低活性状态,不利于瘦体质量增长,12 周龄时瘦体质量百分比低于正常出生体质量大鼠、胰岛素敏感性下降。

综上所述,我们旨在探讨营养干预 IUGR 体成分发育的分子机制和较佳时间点,示出生到 4 周龄是高蛋白营养干预 IUGR 大鼠较合适的关键时期,近期和远期均可改善其体成分和胰岛素敏感性,与高蛋白干预上调骨骼肌 mTOR 活性、促进瘦体质量增长而减少体脂成分有关,为防治 IUGR 成年期发生代谢综合征提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Neitzke U, Harder T, Plagemann A. Intrauterine growth restriction and developmental programming of the metabolic syndrome: a critical appraisal [J]. *Microcirculation*, 2011, 18(4): 304-311.
- [2] 丘小汕,沈振宇,黄婷婷,等.早期营养干预改善 IUGR 大鼠胰岛素抵抗及其与血清瘦素的关系 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2003, 24(6): 568-572.
- [3] Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, et al. Developmental plasticity and human health[J]. *Nature*, 2004, 430(6998): 419-421.
- [4] Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism[J]. *Cell*, 2006, 124(3): 471-484.
- [5] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GJ. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet [J]. *J Nutr*, 1993, 123(11): 1939-1951.
- [6] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man.[J]. *Diabetologia*, 1985, 28(7): 412-419.
- [7] Moran JM, Lavado-Garcia JM, Pedrera-Zamorano JD. Methods for nurses to measure body composition[J]. *Rev Lat Am Enfermagem*, 2011, 19(4): 1033-1038.
- [8] Varvarigou AA. Intrauterine growth restriction as a potential risk factor for disease onset in adulthood [J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2010, 23(3): 215-224.
- [9] Derrickson EM, Lowas SR. The effects of dietary protein levels on milk protein levels and postnatal growth in laboratory mice (*Mus musculus*) [J]. *J Mammal*, 2007, 88(6): 1475-1481.
- [10] Drummond MJ, Rasmussen BB. Leucine-enriched nutrients and the regulation of mammalian target of rapamycin signalling and human skeletal muscle protein synthesis [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2008, 11(3): 222-226.
- [11] Vicente-Rodriguez G. How does exercise affect bone development during growth? [J]. *Sports Med*, 2006, 36(7): 561-569.
- [12] Morrison JL, Duffield JA, Muhlhausler BS, et al. Fetal growth restriction, catch-up growth and the early origins of insulin resistance and visceral obesity [J]. *Pediatr Nephrol*, 2010, 25(4): 669-677.
- [13] Zhu MJ, Ford SP, Means WJ, et al. Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring [J]. *J Physiol*, 2006, 575(Pt 1): 241-250.
- [14] Yao K, Yin YL, Chu W, et al. Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs [J]. *J Nutr*, 2008, 138(5): 867-872.
- [15] Miyazaki M, Esser KA. Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals [J]. *J Appl Physiol*, 2009, 106(4): 1367-1373.
- [16] Premji SS, Fenton TR, Sauve RS. Higher versus lower protein intake in formula-fed low birth weight infants [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006, (1): CD003959.
- [17] Chiang GG, Abraham RT. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(27): 25485-25490.
- [18] Rabe K, Lehrke M, Parhofer K G, et al. Adipokines and insulin resistance [J]. *Mol Med*, 2008, 14(11-12): 741-751.
- [19] Te ML, Levers MT, Williams SM, et al. Comparison of high protein and high fiber weight-loss diets in women with risk factors for the metabolic syndrome: a randomized trial [J]. *Nutr J*, 2011, 10:40.
- [20] Langley-Evans S C, McMullen S. Developmental origins of adult disease [J]. *Med Princ Pract*, 2010, 19(2): 87-98.

(编辑 张恩健)