

戴丽军,黄月玲,叶炳飞,等. 高糖高脂食物对 BALB/c 和 C57BL/6J 小鼠生长和代谢指标改变影响的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 69-77.

Dai LJ, Huang YL, Ye BF, et al. Effects of a high sucrose-high fat diet on alterations of growth and metabolism in BALB/c and C57BL/6J mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 69-77.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.009

高糖高脂食物对 BALB/c 和 C57BL/6J 小鼠生长和代谢指标改变影响的研究

戴丽军¹, 黄月玲¹, 叶炳飞¹, 邝桂星², 侯敏^{3*}, 安胜利^{4*}

(1. 广州医科大学实验动物中心, 广州 511436; 2. 广州市番禺区第六人民医院, 广州 511442;
3. 广州医科大学附属肿瘤医院, 广州 510095; 4. 南方医科大学公共卫生学院生物统计系, 广州 510515)

【摘要】 目的 通过近交系 BALB/c 和 C57BL/6J 小鼠, 对高糖高脂 (high-sucrose-high fat, HSHF) 食物在生长代谢方面进行平行研究, 探讨基于不同品系、不同性别的小鼠, HSHF 食物对其生长代谢的差异化影响。**方法** 2 个品系的仔鼠在第 25 天断奶后按性别分组饲养, 一组饲喂维持饲料 (标准食物), 另一组饲喂高糖高脂 (HSHF) 饲料。每两周称量 1 次体重至 24 周实验结束, 实施安乐死术后取材。分析生长曲线、血糖、血脂水平、脏器指数 (脾、肝、肺) 等参数和脏器组织病理。**结果** 动物生长曲线、血糖、血清低密度脂蛋白和甘油三酯的水平与其品系直接相关; 动物性别对这些参数有重要影响。HSHF 食物显著改变了雌性的生长曲线, 但对雄性无显著影响; 提高了代谢参数, 其中对血清脂质的影响具有品系或性别特异性。肝脂肪变化的程度、脾指数的变化均与品系和性别相关; 肺未见组织病理改变。**结论** HSHF 食物引起的小鼠生长代谢的改变与动物的品系和性别有着显著的相关性, 性别的相关性更多的是通过品系发挥作用。

【关键词】 品系; 性别; 高糖高脂食物; 生长发育; 代谢

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0069-09

Effects of a high sucrose-high fat diet on alterations of growth and metabolism in BALB/c and C57BL/6J mice

DAI Lijun¹, HUANG Yueling¹, YE Bingfei¹, KUANG Guixing², HOU Min^{3*}, AN Shengli^{4*}

(1. Laboratory Animal Center of Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China.
2. the Sixth People's Hospital of Panyu District, Guangzhou 511442. 3. Affiliated Cancer Hospital and Institute of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510095. 4. Department of Bio-Statistics, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515)

【Abstract】 Objective To study the effects of a high sucrose-high fat (HSHF) diet on growth and metabolism of inbred BALB/c and C57BL/6J mice in parallel. **Methods** Litters of the two strains were weaned and separated by sex on day 25. Males and females of each strain were randomly divided into two groups. One group was fed a standard diet and other a HSHF diet from weaning until termination of the study (24 weeks). The parameters analyzed were the growth

[基金项目] 广东省科技计划项目 (2013B060300023)。

[作者简介] 戴丽军 (1969—), 女, 副教授, 研究方向: 疾病动物模型。E-mail: lijundai@gzhmu.edu.cn

[通信作者] 侯敏 (1963—), 女, 副主任医师, 研究方向: 病理学。E-mail: gyminhou@163.com

安胜利 (1976—), 男, 副教授, 研究方向: 医学统计。E-mail: asl0418@126.com * 共同通信作者

curve, levels of blood glucose and serum lipids, organ index (spleen, liver and lungs), and histology of these organs.

Results The strain determined the basal patterns of the growth curve, levels of blood glucose and serum low-density lipoprotein and triglycerides. Sex played a role in some of these parameters. The HSHF diet significantly altered the basal growth curve of females, but not males. In terms of metabolic parameters, the HSHF diet mostly increased their values. However, alterations of serum lipids were specific to the strain or sex. The severity of fatty changes in the liver varied with the strain and sex. Alterations of the spleen index depended significantly on the strain and sex. No histological changes were observed in the lungs. **Conclusions** Alterations of growth and metabolism caused by the HSHF diet were significantly influenced by the strain and sex. However, sex mainly modified differences determined by the strain.

【Keywords】 strain; sex; high sucrose-high fat diet; growth; metabolism

长期以来,富含脂肪的食物与肿瘤发生风险之间的相关性一直是流行病学研究的重点^[1-2]。喜食高脂、高糖、高油、腌熏食品等的不良饮食习惯,富含脂肪和纤维含量低的食物,均会增加人类罹患癌症的风险并使肿瘤发生率显著升高^[3-4]。多项研究表明,高糖、高脂或高糖高脂(high-sucrose-high fat, HSHF)食物均会促进肿瘤的形成和发展,或升高死亡率^[5-7],但在肺肿瘤方面鲜有相关报道。本项目组前期试验发现 BALB/c 对乙基亚硝脒(ENU)敏感,适于制备原发性肺肿瘤模型,而 C57BL/6J 则相反。因此在后续的 HSHF 食物对小鼠原发性肺肿瘤的影响研究中,选用不同性别的两个近交系 BALB/c 和 C57BL/6J 来进行分析比较。实验观察到 HSHF 食物加速了 BALB/c 和 C57BL/6J 肺肿瘤的发展,这一加速作用存在品系和性别间的差异^[8]。

要深入探讨 HSHF 食物对肺肿瘤演进过程的作用机制,首先就要了解 HSHF 食物对正常动物生长代谢的影响。因此本文就不同食物条件下,实验对照组 BALB/c 和 C57BL/6J 部分生长代谢指标的差异化改变进行了比较分析,试图找出高糖高脂食物与两个小鼠品系在遗传和性别上的相关性,为进一步研究 HSHF 食物对肿瘤发生发展的作用机制提供对照参考和背景资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物

BALB/c 和 C57BL/6J 小鼠购自广州中医药大学实验动物中心[SCXK(粤)2018-0034], SPF 级,4~6 周龄,15~18 g,雌性 40 只,雄性 15 只,实验所用动物为其子代,数量见表 1。动物饲养及实验在广州医科大学实验动物中心[SYXK(粤)2021-0168]完成,均通过广州医科大学实验动物福利伦理委员会审批(2014-068),实验过程遵循 3R 原则。技术人员均具备在该设施中从事动物实验的资质。

1.2 主要试剂与仪器

Co₆₀ 辐照灭菌的维持饲料和 HSHF 饲料(含

200 g/kg 蔗糖和 150 g/kg 猪油)由广东省医学实验动物中心提供;饲料组分、动物交配方法及妊娠天数的确定等,笔者前期已进行详细描述^[8];TCHO 试剂盒(140307,上海丰汇);LDL 试剂盒、HDL 试剂盒、TG 试剂盒(7021200707、7020200707、7032170614,长春汇力)。自动组织病理处理器(徕卡,上海,中国);血糖仪(Accu-Chek Active,罗氏,中国);紫外分光光度计(UV-7502 型,上海鑫茂,中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及实验过程

仔鼠出生后第 25 天断奶,称重后,按品系、性别随机分为维持饲料组(标准食物)和 HSHF 饲料组(HSHF 食物)分笼饲养,每笼 4~5 只。从断奶到实验结束(满 24 周),每两周测量 1 次体重(精确度:0.01 g)。

1.3.2 样品采集和处理

样本采集前,小鼠禁食 4 h。称量最终体重。麻醉后采血,4℃ 离心收集血清,按 0.5 mL 等份分装,-80℃ 保存备用。

1.3.3 标本处理

采血结束时测定血糖,处死小鼠后,解剖收集全肺(包括气管)、肝和脾样本,称量湿重(精确度:0.001 g)。通过气管向肺内注入磷酸缓冲福尔马林后将全肺、整个脾和来自最大肝叶的一块肝组织放

表 1 用于样本采集的小鼠数量

Table 1 Numbers of mice used for sample collection			
小鼠 Mouse	性别 Sex	标准食物组 Group of the standard diet	高脂高糖食物组 Group of the HSHF diet
BALB/c	雌性 Female	24	19
	雄性 Male	20	18
C57BL/6J	雌性 Female	7	12
	雄性 Male	10	11

入固定液中,固定 24~48 h,按标准程序进行石蜡包埋,5 mm 切片,HE 染色。

1.3.4 血脂指标测定

各组随机选取 5 只小鼠的血清,按照试剂盒的说明程序测量总胆固醇(TCHO)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)。测量前,将血清置于室温下,样品在 37℃ 水浴中孵育 10 min(TG、LDL 和 HDL)或 15 min(TC)后,测定光密度值(OD)并转换为实际浓度(mmol/L)。

组织病理评估:各组随机选取 3~4 只小鼠肺、脾和肝的病理切片进行评估。

1.3.5 数据分析生长曲线

通过每两周称量的体重计算。器官指数是小鼠器官的湿重与其最终体重的比值,反映器官相对于最终体重的比例。因为这些器官指数均为小数,为便于阅读和绘图,将以实际值乘以系数表示。肺、脾指数所乘系数为 1000,肝指数所乘系数为 100。

1.3.6 相对比值

为了更直观地反映 HSHF 食物的影响,以便从更多维度体现其变化幅度,本文引入了相对比值的概念,即各指标的 HSHF 食物组平均值与标准食物组平均值之比。例如:相对生长曲线为 HSHF 食物组与标准食物组在各观察时间点的平均体重之比;相对器官指数是两种食物的器官指数平均值之比;相对血糖值是两种食物的血糖平均值之比;血脂各指标的相对比值是两种食物的血脂各指标平均值之比。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件,通过重复测量及方差分析方法,对小鼠性别、品系、食物等因素进行统计分析。所有数据均以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较因是否服从正态分布或方差齐性而相应地采用独立样本 t 检验或非参数检验 Mann-Whitney U test;计数资料以绝对数和相对数指标表示,组间比较用 χ^2 检验;不同时间的体重变化用重复测量方差分析,固定时间点,按照性别分层,不同品系间的单独效应分析采用独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同品系小鼠的生长曲线及 HSHF 食物对小鼠生长曲线的影响

图 1 表示不同性别小鼠的生长曲线(图 1A、图 1B)和相对生长曲线(图 1C、图 1D),反映从断奶到

24 周龄不同性别 BALB/c 和 C57BL/6J 的生长模式。

同一性别的两个品系,生长曲线存在显著差异(图 1A、图 1B),HSHF 食物显著改变了小鼠的基础生长模式。两性品系间生长曲线差异显著,品系与年龄的交互作用具有统计学意义(雌性 $F=4.146$, $P=0.000$;雄性 $F=3.207$, $P=0.003$),即 HSHF 食物对小鼠生长曲线的影响具有品系的差异,后经过二次统计学分析,品系的差异仅在雌性中显著($F=18.869$, $P=0.000$),在雄性中不显著($F=0.154$, $P=0.697$),在雌、雄小鼠的相对生长曲线图中看得比较清楚(图 1C、图 1D)。在 HSHF 饲料影响下,雄性小鼠生长曲线的模式在品系间明显不同(图 1C),而雌性小鼠的生长变化趋势非常一致(图 1D)。

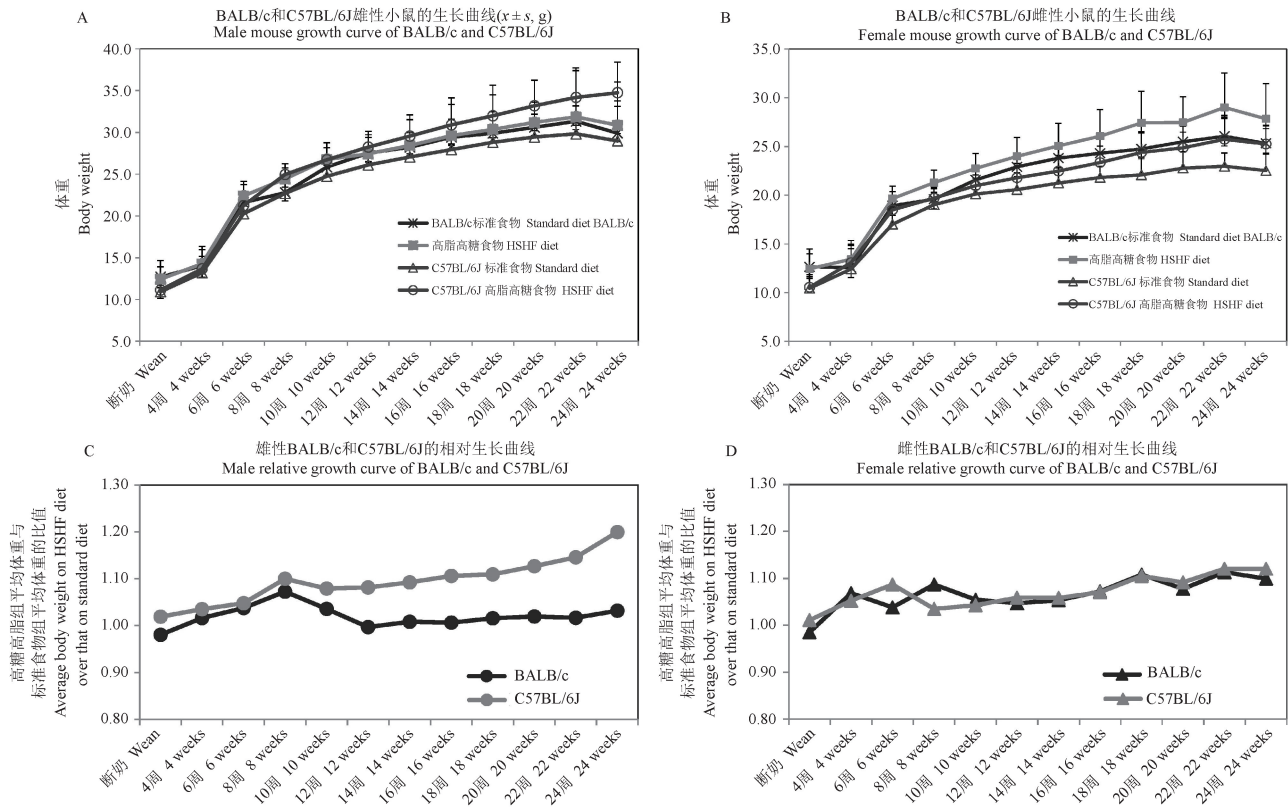
2.2 不同品系、不同性别小鼠血糖水平及 HSHF 食物对小鼠血糖升高的影响

在标准食物组,小鼠血糖在品系间($F=38.499$, $P=0.000$)和性别间($F=12.344$, $P=0.001$)间均存在显著差异(图 2A),且品系与性别的交互作用(品系 $\times$ 性别)有统计学意义($F=12.160$, $P=0.001$)。结果表明 C57BL/6J 的血糖水平高于 BALB/c 的(品系差异),在 C57BL/6J,雄性的血糖高于雌性的(性别差异);而在 BALB/c,雌性高于雄性的(品系与性别的交互作用),也证实了血糖水平存在品系和性别的差异(图 2A)。

HSHF 食物显著提高了小鼠的血糖($F=25.481$, $P=0.000$),但是所增加的幅度因品系和性别而有所不同,主要是显著地增加雄性的血糖,分别为 C57BL/6J 雄性 1.22 倍, BALB/c 雄性 1.24 倍,雄性显著高于雌性的($F=4.674$, $P=0.033$)(图 2B),且性别与食物的交互作用存在显著相关,意味着 HSHF 食物对雄性血糖的影响要显著大于对雌性的,而且逆转了 BALB/c 品系雌雄性基础血糖的模式。

2.3 品系和性别对血清脂质及 HSHF 食物对血脂变化的影响

所测定的血清脂质数值列入表 2,表 3 则列举了品系、性别、食物与各血脂指标的统计学分析结果。在标准食物组,4 个血脂指标存在品系之间或性别之间差异,其中 BALB/c 的 TG 水平远高于 C57BL/6J 的(表 2)。品系因素在 LDL 和 TG 中作用显著,性别因素在 HDL、LDL 和 TCHO 中作用显著,似乎只有 LDL 同时受到了品系和性别的影响(表 3)。

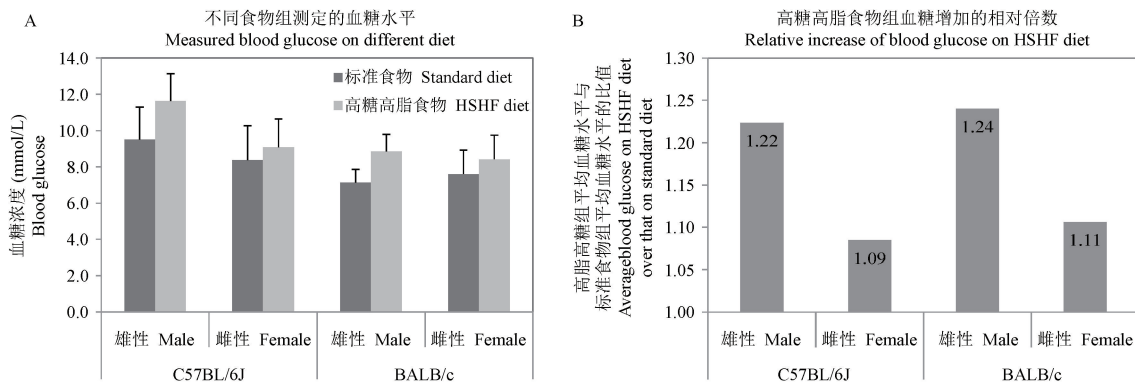


注: A、B: 断奶至 24 周龄, 两个品系不同性别小鼠的生长曲线(平均体重); C、D: 两个品系不同性别小鼠的相对生长曲线。

图 1 高糖高脂(HSHF)食物对小鼠生长曲线的影响($\bar{x} \pm s$, g)

Note. A/B, Growth curve was graphed by the average body weight from weaning to 24 weeks and presented by sex. C/D, Relative growth curve in the female or the male group of BALB/c and C57BL/6J.

Figure 1 Effects of the HSHF diet on the growth curve



注: A: 血糖水平在品系和性别间差异显著; B: HSHF 食物的相对血糖指数更清楚地显示了血糖增加的幅度。

图 2 HSHF 食物对血糖水平的影响

Note. A, Levels of blood glucose in both strains and sexes. B, Magnitudes of increases in the blood glucose were shown more clearly by the relative increases of blood glucose on the HSHF diet.

Figure 2 Effects of the HSHF diet on levels of blood glucose

HSHF 食物组与标准食物组的比值直观地反映了 HSHF 食物对血脂水平的影响(如表 2 第 5~6 行所示)。与标准食物比, HSHF 食物不同程度地提高了除雌性 TG 外的其它血脂指标(表 2), 其中 HDL 和 TCHO 升高显著。HSHF 食物对 TG 的影响主要

反映在性别与食物以及品系与食物显著的交互作用(性别×食物; 品系×食物, 表 3), 即: HSHF 食物提高了两个品系雄性的 TG, 而降低了雌性的 TG(表 2); HSHF 食物所引起的不同性别小鼠 TG 升高或降低的幅度, BALB/c 的均高于 C57BL/6J 的(表 3)。

2.4 不同品系的肝指数基础模式及 HSHF 食物引起的肝脂肪变性程度的影响

肝指数在品系间存在显著差异($F=53.884, P=0.000$), 而性别间差异不明显($F=0.026, P=0.872$), 换句话说, 就是不同的品系肝指数的基础模式可能不同, 在本实验所应用的 C57BL/6J 中, 雌、雄性的肝指数几乎是一致的, 而在 BALB/c 中, 雄性的肝指数值要高于雌性的, 尽管没有统计学差异(图 3A)。

HSHF 食物显著提高了肝指数($F=179.897, P=0.000$), 其中 C57BL/6J 雄性和 BALB/c 雌性增加幅度较大, 而 BALB/c 的增加幅度又比 C57BL/6J 大得多(图 3A), 相对肝指数更直观地反映了其增加幅度(图 3B)。通过比较品系与食物以及性别与食物之间的交互作用, 可以了解到 HSHF 食物对肝

的影响在品系($F=31.544, P=0.000$)和性别($F=4.193, P=0.043$)间存在显著差异; 品系间, 对 BALB/c 的影响大于 C57BL/6J; 性别间, 在 BALB/c 对雌性的影响大于雄性, 而在 C57BL/6J 则正好相反(图 3A、图 3B)。

组织病理检查显示: 标准食物组单层肝细胞构成的肝板辐射到终末肝小静脉, 肝窦清晰可见(图 3C)。HSHF 食物组肝细胞增大, 肝窦消失, 肝细胞胞浆呈泡沫状, 部分胞浆中出现不同大小的空泡(图 3D), 说明 HSHF 食物引起了肝的脂肪变性。

总之, 小鼠的品系和性别对 4 个血脂指标水平起着复杂的决定作用。HSHF 食物选择性地显著提高 HDL 和 TCHO, 并显著影响特定品系和性别的 TG, 对 LDL 则无明显影响(表 3)。

表 2 血清脂质水平($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Levels of serum lipids

食物分组 Group of diet	品系 Strains	雌性 Female				雄性 Male			
		高密度脂蛋白 HDL	低密度脂蛋白 LDL	总胆固醇 TCHO	甘油三酯 TG	高密度脂蛋白 HDL	低密度脂蛋白 LDL	总胆固醇 TCHO	甘油三酯 TG
标准食物 Standard diet	C57BL/6J	1.540±0.078	0.494±0.084	1.886±0.225	0.866±0.101	2.010±0.419	0.446±0.097	2.226±0.409	0.874±0.204
	BALB/c	1.432±0.150	0.322±0.008	1.634±0.135	1.854±0.203	2.002±0.281	0.282±0.036	2.288±0.302	1.430±0.287
高糖高脂食物 HSHF diet	C57BL/6J	2.120±0.333	0.642±0.075	3.952±0.388	0.864±0.068	3.222±0.453	0.902±0.074	4.950±0.453	0.908±0.132
	BALB/c	2.374±0.431	0.776±0.239	3.998±1.045	1.586±0.129	3.556±0.350	0.570±0.039	4.376±0.398	1.498±0.124
高糖高脂食物/ 标准食物 HSHF diet/ standard diet	C57BL/6J	1.377	1.300	2.095	0.998	1.063	2.022	2.224	1.039
	BALB/c	1.658	2.410	2.447	0.855	1.776	2.021	1.913	1.048

表 3 采用单因素方差分析的血脂统计分析结果

Table 3 Statistical results of serum lipids analyzed by univariate analysis of variance

比较类别 Compare categories	高密度脂蛋白 HDL		低密度脂蛋白 LDL		总胆固醇 TCHO		甘油三酯 TG	
	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值
	F value	P value	F value	P value	F value	P value	F value	P value
品系 Strain	0.836	0.367	8.865	0.006**	0.073	0.789	175.466	0.000**
性别 Sex	63.331	0.000**	79.787	0.000**	119.653	0.000**	2.372	0.133
食物 Diet	20.900	0.000**	0.000	1.000	8.271	0.007**	5.647	0.024*
品系×性别 Strain×sex	1.405	0.245	3.631	0.066	0.320	0.576	0.436	0.514
品系×食物 Strain×diet	0.258	0.615	0.014	0.906	0.136	0.715	10.605	0.003**
性别×食物 Sex×diet	2.533	0.121	0.014	0.906	1.016	0.321	4.278	0.047*
品系×性别×食物 Strain×sex×diet	1.249	0.272	0.000	1.000	2.103	0.157	2.651	0.113

注: 与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

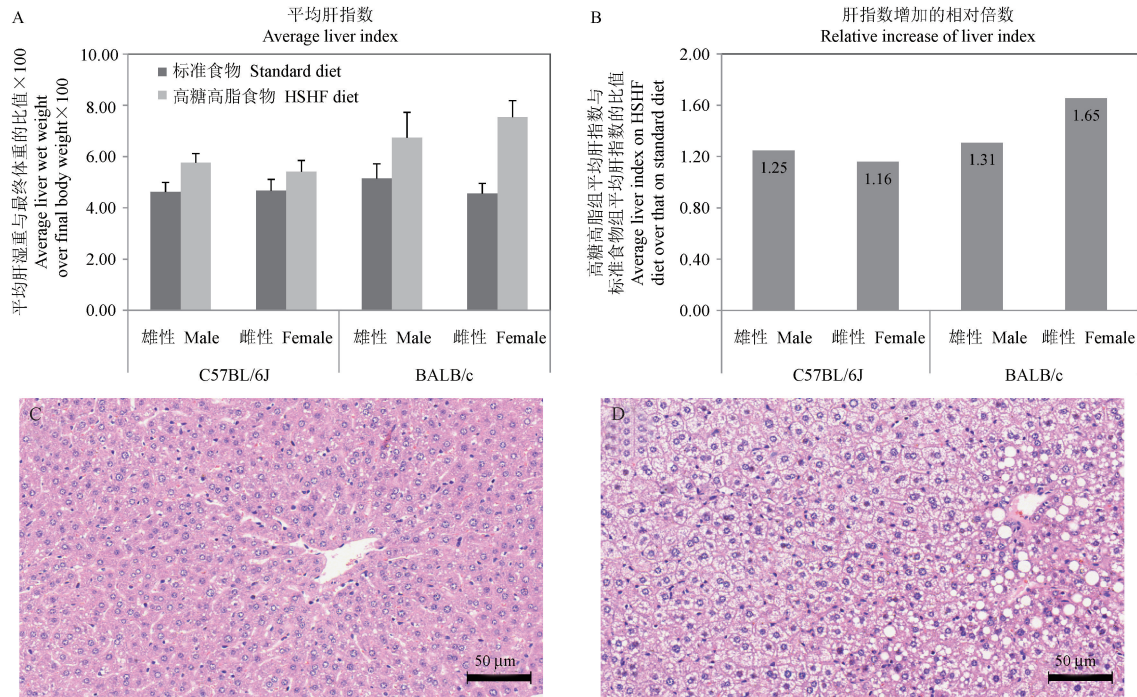
笔者尝试通过对泡沫状胞浆肝细胞百分比和空泡状(忽略大小)胞浆肝细胞数量的半定量评分系统(表 4)来评估 HSHF 食物引起的肝脂肪化的程度。该评分系统的实际评估效果良好,通过统计 HSHF 食物组中 3 或 4 只小鼠的平均得分,直观反映了肝脂肪化的严重程度(表 5)。结果显示: BALB/c 雄性得分最低,即其所受影响最小,脂肪化程度最低。对应比较显示,组织病理结果与肝指标及半定量评价结果基本一致。图 3B 中 BALB/c 雄性的相对肝指数较高可能是基于其最终体重相对较轻的原因(图 1B)。

总之,食物引起的小鼠肝脂肪化具有品系和性别的特异性。从组织学上来看,这种特异性主要表

现在标志着肝细胞脂肪变性程度的胞浆空泡化肝细胞的数量上。

2.5 不同品系两性小鼠的脾指数及 HSHF 食物对小鼠脾指数的影响

小鼠脾指数在品系 ($F = 26.611, P = 0.000$) 和性别 ($F = 4.397, P = 0.038$) 间存在显著差异, C57BL/6J 的基础模式为雌性的脾指数高于雄性的,而 BALB/c 的则相反(图 4A)。HSHF 食物改变了脾指数,但统计分析结果处于临界状态 ($F = 3.923, P = 0.050$),可能与脾指数变化的趋势不同所致(图 4A),在 C57BL/6J 小鼠,脾指数只是略有升高(图 4B),而在 BALB/c 小鼠,脾指数明显缩小,且雄性的缩小要显著大于雌性的(图 3B),脾指数的基础



注:A:小鼠肝指数;B:小鼠相对肝指数;C:标准食物组的肝组织病理改变;D:HSHF 食物组的肝组织病理改变。

图 3 HSHF 食物对肝的影响

Note. A, Average liver index in both sexes of C57BL/6J and BALB/c mice. B, Relative liver index in both sexes of C57BL/6J and BALB/c mice. C, Liver histology on the standard diet. D, Liver histology on the HSHF diet.

Figure 3 Effects of the HSHF diet on the liver

表 4 半定量评价肝脂肪改变程度的评分系统

Table 4 Scoring criteria to semiquantify the severity of liver fatty changes

泡沫状胞浆肝细胞 Foamy cytoplasm		空泡状胞浆肝细胞 Vacuoles in cytoplasm	
占肝细胞的百分比(%) Percentage of liver cells	评分 Scores	细胞数量 Amount of cells	评分 Scores
≤50%	1	很少 Few	1
>50% and ≤70%	2	有一些 Some	2
>70%	3	很多 Many	3

模式被改变,这一改变可由品系与食物之间存在的显著交互作用($F=6.939, P=0.010$)证实。

小鼠脾组织病理检查结果显示:脾细胞小,白色髓质不明显。与标准食物相比,HSHF 食物所引起的组织学或细胞学变化需要更加深入细致的研究,有待进一步探讨。

2.6 组织病理观察 HSHF 食物对肺的影响

小鼠肺指数在性别间存在显著差异($F =$

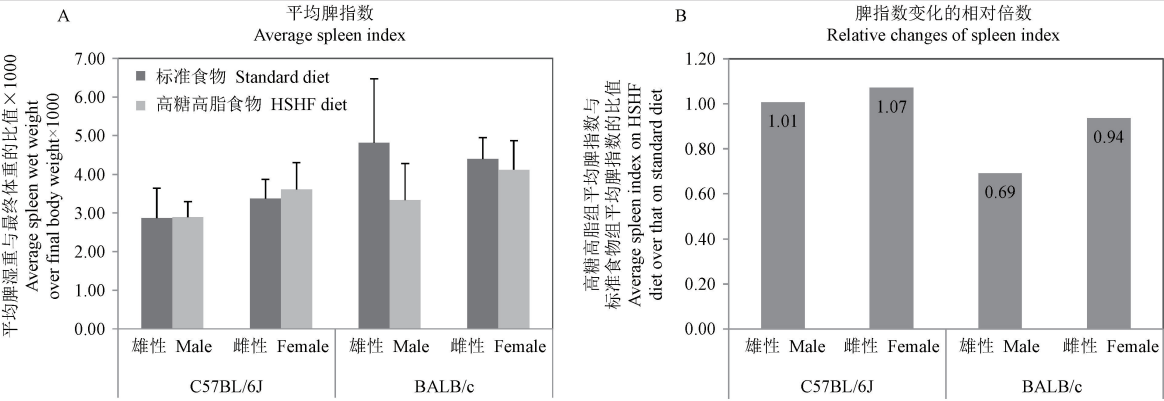
$18.580, P=0.000$),两个品系的肺指数雌性的均大于雄性的(图 5)。没有观察到品系与食物之间或性别与食物之间的交互作用,虽然 HSHF 食物(除 BALB/c 雄性外)的肺指数呈下降趋势,但差异无统计学意义($F=3.079, P=0.082$)(图 5A)。

肺组织病理观察结果显示,与标准食物相比,HSHF 食物对小鼠肺组织没有产生任何可观察到的组织病理变化(图 5B)。

表 5 HSHF 食物影响肝脂肪变性程度的半定量评价

Table 5 Semiquantified severity of fatty changes in the liver on the HSHF diet

品系/性别 (小鼠数量)	泡沫状胞浆肝细胞的平均评分	空泡状胞浆肝细胞的平均评分	肝脂肪化的严重程度 (两个评分之和)
Strain and sex (Number of mice)	Average scores of foamy cytoplasm	Average scores of vacuoles	Severity of fatty changes (Addition of 2 scores)
BALB/c 雄性 (4)	2.75	1.25	4.00
BALB/c male			
BALB/c 雌性 (3)	3.00	2.00	5.00
BALB/c female			
C57BL/6J 雄性 (3)	3.00	2.00	5.00
C57BL/6J male			
C57BL/6J 雌性 (3)	3.00	1.67	4.67
C57BL/6J female			

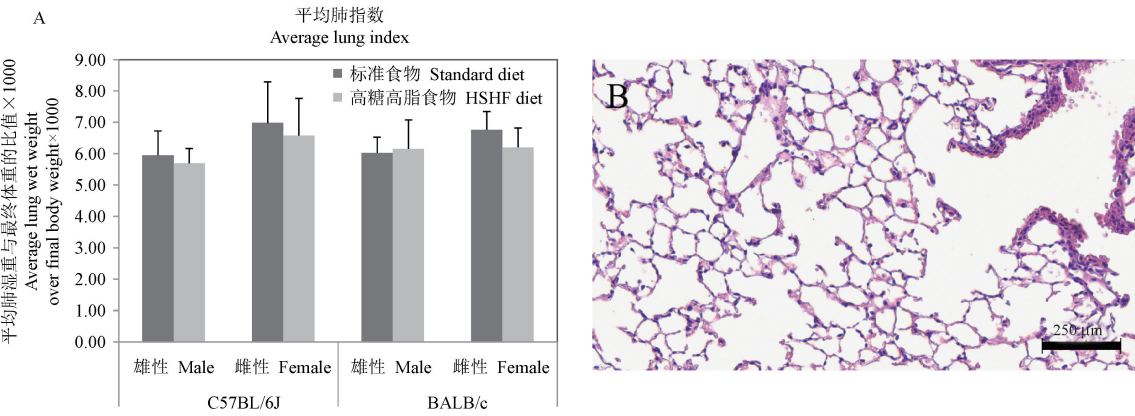


注:A:平均脾指数;B:高糖高脂组脾指数变化的相对倍数。

图 4 高糖高脂(HSHF)食物对小鼠脾的影响

Note. A, Average spleen index. B, Relative changes of the spleen index on the HSHF diet.

Figure 4 Effects of the HSHF diet on the spleen



注:A:平均肺指数;B:高糖高脂组小鼠肺组织镜下未见明确病理改变。

图 5 HSHF 食物对肺的影响

Note. A, Lung index in mouse. B, Histology of the lung on the HSHF diet did not show any recognizable morphological changes

Figure 5 Effects of the HSHF diet on the lung

3 讨论

本研究的不足之处是实验所用 C57BL/6J 仔鼠数量较少,导致 BALB/c 和 C57BL/6J 数量不均,虽然实验中增加了 C57BL/6J 雌性母鼠的数量,但由于 C57BL/6J 仔鼠的存活率较低,所以在有限的实验时间内 C57BL/6J 的后代数量仍较 BALB/c 为少,这有可能影响结果分析的质量。笔者在之前的报道中对这一现象进行了仔细分析^[9],一个合理的解释是,实验中腹腔注射的酸性磷酸盐缓冲液可能对孕期和哺乳期的 C57BL/6J 影响更大。考虑到使用的是全同胞兄妹交配的近交系后代,且数量已能满足统计分析要求,因此笔者认为本实验中 C57BL/6J 仔鼠的数量是足以反映真实情况的。

本研究通过对 BALB/c 和 C57BL/6J 的生长曲线、血糖、血脂、器官指数及器官组织病理等指标进行观察分析,探讨了在标准食物上两个近交系小鼠的生长代谢模式及其在 HSHF 食物上的差异化反应。结果显示,每个研究指标几乎都存在品系间的差异,虽然也观察到性别对各指标的复杂化影响(血糖和血脂),但这些影响仍需通过品系与性别的交互作用而由品系起最终决定作用,说明 BALB/c 和 C57BL/6J 在遗传上具有较大差异,而且这些差异直接决定了两个品系各自的生长代谢模式。HSHF 食物对各指标的影响,也取决于品传及性别。

尽管存在各自代谢途径上的差异^[10-11],HSHF 食物对生长代谢的影响效果可能与高脂食物类似^[12],高糖高脂食物中糖的比例较高会加重脂肪的影响效应。本文实验中,HSHF 饲料的热量值为 4.4 cal/g,维持饲料为 3.4 cal/g^[8],从断奶到 24 周龄,连续 HSHF 食物,会导致 BALB/c 和 C57BL/6J 小鼠的肥胖、高血糖、血脂异常和肝脂肪变性^[13]等。有研究描述和讨论了动物对高脂食物的不同反应^[14-15],与之相比,本研究有 4 点新发现:

首先,HSHF 食物对动物生长的影响可能具有性别特异性。实验中,只有 BALB/c 雄性在经过一个快速生长期后,在每个观察时间点其生长曲线都只出现了小幅增长(图 1B);血糖(图 2B)和 TG(表 2)升幅最大;而肝脂肪化程度最低(表 5)。其 HDL 的增加(表 2)表明肝细胞正在努力运输多余的脂肪到外周组织。综合上述结果设想: BALB/c 雄性小鼠可能不能良好地适应 HSHF 食物,因此 HSHF 饲料的摄入量最少。表明,对增加的膳食脂肪,不仅

不同品系小鼠的反应不同^[16],而且不同性别小鼠的反应也不一致。

其次,HSHF 食物对小鼠脾的影响可能也具有品系和性别的特异性。脾指数(图 4A)在两个品系之间、在同一品系的两个性别之间均存在显著差异。HSHF 食物提高了 C57BL/6J 的脾指数,但降低了 BALB/c 的脾指数,但在脾的组织 and 细胞水平没有观察到明显变化。由于在类似的研究中很少有关于脾改变的报道,因此 HSHF 食物引起两个品系小鼠脾指数变化的原因还有待进一步研究^[17]。BALB/c 雄性对 HSHF 饲料的摄入量下降、脾指数却大幅降低(图 4B)说明在生长发育阶段 HSHF 食物对这一品系雄性小鼠脾的影响是巨大的,同时也表明 HSHF 食物的影响不只局限于代谢系统,也可涉及到更广泛的系统^[12]。

第三,组织病理结果显示,HSHF 食物对肺的影响是有限的。整体看来,肺指数有极小幅度的下降,这可能是源于动物最终体重的增长(图 5A)。BALB/c 雄性小鼠肺指数升高,可能是因为其肥胖个体较少、最终体重增长幅度较小所致。据报道,HSHF 食物可通过影响肺细胞的代谢而影响肺的代谢组分^[18];但在本实验中,与标准食物组相比,HSHF 食物组的 HE 染色切片上未观察到明显的组织病理改变(图 5B)。

最后,本文建立了一种对肝脂肪变性程度进行有效评估的半定量评分方法(图 3D),将该评分方法与相应的血脂检测结果进行比照,可以更清晰地解释 HSHF 食物对动物肝代谢的影响。本文尝试借助该方法建立一种分析模式,通过比照印证多种相对精准的结果,多方位地对食物影响动物生长代谢的复杂性进行剖析,从而进一步提高数据的可靠性和分析的有效性。

本实验中小鼠生长代谢结果显示,遗传(品系)差异是造成小鼠不同食物环境下生长代谢发生改变的首要原因。小鼠基因组成确立了其食物诱导肥胖引起生长代谢相关改变的基本模式^[19]。其他因素如性别,将在特定情况下发挥影响作用:在高脂食物作用下,性别是主要的影响因素(78%)^[14]。本研究提供了一些证据,表明性别的影响可能依赖于基因。血糖水平是遗传决定性状受性别影响的典型例子(从统计学上看是遗传与性别交互作用的结果)。遗传和性别的交互作用在高脂或 HSHF 食物引起的各种疾病中都有报道^[20-22]。

综上所述, HSHF 食物对小鼠生长代谢的影响是复杂的;遗传是主要的决定因素,性别以性别特异性或遗传-性别特异性的方式通过遗传起作用。本研究为食物对动物生长代谢的影响提供了基础数据和系统分析,同时也为探讨 HSHF 食物对 ENU 诱导的肺肿瘤的作用提供了前提和帮助。

参考文献:

- [1] Gordon-Dseagu VLZ, Thompson FE, Subar AF, et al. A cohort study of adolescent and midlife diet and pancreatic cancer risk in the NIH-AARP diet and health study [J]. *Am J Epidemiol*, 2017, 186(3): 305-317.
- [2] Yang JJ, Yu D, Takata Y, et al. Dietary fat intake and lung cancer risk; a pooled analysis [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(26): 3055-3064.
- [3] 万绍平, 易芳, 王青青, 等. 中国肿瘤健康教育现状与对策分析 [J]. *肿瘤预防与治疗*, 2019, 32(11): 955-961.
- [4] 苗晋鑫, 宋韶鹤, 李秀敏. 结直肠癌小鼠模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(2): 267-272.
- [5] 骆文锦, 陈香均, 马林强, 等. 肥胖动物模型的研究及应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(10): 16-21.
- [6] Kearns CE, Apollonio D, Glantz SA. Sugar industry sponsorship of germ-free rodent studies linking sucrose to hyperlipidemia and cancer: An historical analysis of internal documents [J]. *PLoS Biol*, 2017, 15(11): e2003460.
- [7] Zhu Y, Aupperlee MD, Haslam SZ, et al. Pubertally initiated high-fat diet promotes mammary tumorigenesis in obesity-prone FVB mice similarly to obesity-resistant BALB/c mice [J]. *Transl Oncol*, 2017, 10(6): 928-935.
- [8] Dai L, Huang Y, Ye B, et al. Natural evolution of lung tumors induced by N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) and the impact of a high sucrose-high fat diet on tumor evolution assessed by tumor histology in inbred BALB/c and C57BL/6J mice [J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(11): 4735-4745.
- [9] 戴丽军, 黄月玲, 周敏仪, 等. 妊娠晚期腹腔注射酸性磷酸缓冲液对两个近交系小鼠繁育生理影响的对比分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(10): 27-32.
- [10] Fernandes-Lima F, Monte TL, Nascimento FA, et al. Short exposure to a high-sucrose diet and the first 'hit' of nonalcoholic fatty liver disease in mice [J]. *Cells Tissues Organs*, 2015, 201(6): 464-472.
- [11] Soto M, Chaumontet C, Mauduit CD, et al. Intermittent access to a sucrose solution impairs metabolism in obesity-prone but not obesity-resistant mice [J]. *Physiol Behav*, 2016, 154: 175-183.
- [12] Burchfield JG, Kebede MA, Meoli CC, et al. High dietary fat and sucrose results in an extensive and time-dependent deterioration in health of multiple physiological systems in mice [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(15): 5731-5745.
- [13] 饶文婷, 罗尚菲, 张雅心, 等. 阿魏酸对高脂血症小鼠肝脂肪变性及肠道菌群的调节作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(1): 36-42.
- [14] Ingvorsen C, Karp NA, Lelliott CJ. The role of sex and body weight on the metabolic effects of high-fat diet in C57BL/6N mice [J]. *Nutr Diabetes*, 2017, 7(4): e261.
- [15] 张森, 洪芬芳, 杨树龙. 肝脂质代谢与动脉粥样硬化治疗 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(8): 122-127.
- [16] Ehrich TH, Kenney JP, Vaughn TT, et al. Diet, obesity, and hyperglycemia in LG/J and SM/J mice [J]. *Obes Res*, 2003, 11(11): 1400-1410.
- [17] Buchan L, St Aubin CR, Fisher AL, et al. High-fat, high-sugar diet induces splenomegaly that is ameliorated with exercise and genistein treatment [J]. *BMC Res Notes*, 2018, 11(1): 752.
- [18] Showalter MR, Nonnecke EB, Linderholm AL, et al. Obesogenic diets alter metabolism in mice [J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0190632.
- [19] Sinasac DS, Riordan JD, Spiezio SH, et al. Genetic control of obesity, glucose homeostasis, dyslipidemia and fatty liver in a mouse model of diet-induced metabolic syndrome [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2016, 40(2): 346-355.
- [20] Henderson-Redmond AN, Lowe TE, Tian XB, et al. Increased ethanol drinking in "humanized" mice expressing the mu opioid receptor A118G polymorphism are mediated through sex-specific mechanisms [J]. *Brain Res Bull*, 2018, 138: 12-19.
- [21] Rebholz SL, Jones T, Herrick RL, et al. Hypercholesterolemia with consumption of PFOA-laced Western diets is dependent on strain and sex of mice [J]. *Toxicol Rep*, 2016, 3: 46-54.
- [22] Saqui-Salces M, Tsao AC, Gilliland MG, et al. Weight gain in mice on a high caloric diet and chronically treated with omeprazole depends on sex and genetic background [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017, 312(1): G15-G23.

[收稿日期] 2022-05-31