

## 大鼠孕期和哺乳期高蛋白饮食对子代代谢相关激素的影响

余远红,殷璐,丁叶,任甲翠,秦蕊,邵莹莹,胡漫丽,汪之项\*

(南京医科大学公共卫生学院儿少卫生与妇幼保健学系,江苏 南京 211166)

**[摘要]** 目的:探讨母体孕期和哺乳期高蛋白饮食对子代代谢相关激素的影响。方法:雌性 Wistar 大鼠交配成功后(F0代),随机分为3组:Pro I组、Pro II组、Pro III组,分别喂以不同蛋白含量的等热卡纯化饲料:Diet I(蛋白质:14%;碳水化合物:69.3%,E/E)、Diet II(蛋白质:24%;碳水化合物:59.3%,E/E)、Diet III(蛋白质:34%;碳水化合物:49.3%,E/E),相应饮食贯穿孕期和哺乳期。子代(F1代)出生后3 d(P3)剔除雌性并小窝喂养,于P21断乳后均以正常标准饲料喂养至实验结束(P77)。期间采集子代P21、P49、P77血样,并检测其代谢相关激素的水平。结果:P21时点,Pro I组F1代血清胰岛素样生长因子(IGF-1)水平低于Pro II组( $P<0.01$ );至P49时点,Pro II组、Pro III组 IGF-1水平均高于Pro I组( $P<0.01$ );至P77时点,Pro III组 IGF-1水平为3组中最高( $P<0.01$ )。P21时点,Pro II组F1代血清瘦素(Leptin)水平为3组中最高( $P<0.01$ );P49和P77时点,Pro I组 Leptin水平持续低于Pro II组和Pro III组( $P<0.05$ )。Pro III组F1代P49时点血浆神经肽Y(NPY)水平低于Pro I组( $P<0.01$ ),P77时点各组无差异( $P>0.05$ )。Pro III组P77时点胃促生长素(Ghrelin)水平高于Pro I组和Pro II组( $P<0.01$ ),P49时点各组无差异( $P>0.05$ )。结论:大鼠孕期和哺乳期高蛋白饮食可引起其子代外周血中 Leptin、Ghrelin、IGF-1水平升高,对外周血中 NPY浓度影响较小。

**[关键词]** 孕期;哺乳期;高蛋白;大鼠;瘦素;胰岛素样生长因子-1;胃促生长素;神经肽Y

**[中图分类号]** Q591

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)07-809-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170705

## The influence of maternal high-protein diet during pregnancy and lactation on metabolism related hormones of rats offspring

She Yuanhong, Yin Lu, Ding Ye, Ren Jiacui, Qin Rui, Shao Yingying, Hu Manli, Wang Zhixu\*

(Department of Maternal, Child and Adolescent Health, School of Public Health, NJMU, Nanjing 211166, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the impact of maternal high-protein diet on metabolism related hormones of rats offspring during pregnancy and lactation. **Methods:** Female Wistar rats (F0 generation) were mated and randomly assigned to three groups: Pro I, Pro II, Pro III, and were fed ad libitum with isocaloric purified diets: Diet I (protein, 14%; carbohydrate, 69.3%, E/E), Diet II (protein, 24%; carbohydrate, 59.3%, E/E) and Diet III (protein, 34%; carbohydrate, 49.3%, E/E) respectively. On the 3<sup>rd</sup> day after birth (P3), only 3 male rats (F1 generation) of each dam were kept. After 21 days of suckling period, rats of F1 generation from different groups were weaned onto the same normal diets till P77, when the research was over. Blood samples of offspring at P21/P49/P77 were kept and levels of hormone related to energy metabolism were detected. **Results:** Serum levels of IGF-1 of F1 generation were lower in Pro I than in Pro II ( $P<0.01$ ) at P21; IGF-1 levels were higher in both Pro II and Pro III than in Pro I ( $P<0.01$ ) at P49; IGF-1 levels of Pro III were higher than Pro I and Pro II ( $P<0.01$ ) at P77. Serum levels of Leptin of F1 generation were the highest in Pro II than in Pro I and Pro III ( $P<0.01$ ) at P21; Leptin levels of Pro I were lower than both Pro II and Pro III at P49 and P77 ( $P<0.05$ ). Plasma levels of NPY of Pro III were lower than Pro I and Pro II ( $P<0.01$ ) at P49, with no differences between groups at P77 ( $P>0.05$ ). Plasma levels of Ghrelin were higher in Pro III than in Pro I and Pro II ( $P<0.01$ ) at P77, with no differences between groups at P49 ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** Peripheral blood levels of leptin, ghrelin and IGF-1 were raised as a result of protein-rich diet during pregnancy and lactation in rats, with little influence on NPY levels.

**[Key words]** pregnancy; lactation; high-protein; rats; leptin; IGF-1; ghrelin; NPY

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(07):809-813]

**[基金项目]** 江苏高校优势学科建设工程资助项目

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: zxwang@njmu.edu.cn

有明确证据表明,生命早期营养状况影响个体发育阶段生理结构、神经内分泌调节系统和内稳态环境的形成,而这些改变通过编程作用增加其成年后慢性代谢性疾病的发生风险<sup>[1-2]</sup>。借助于大鼠模型,可以较好地观察母体高蛋白饮食对子代的影响<sup>[3]</sup>。但目前相关研究大多仅涉及极高蛋白含量的母体饮食<sup>[4]</sup>,因而其实验结果容易受到极低碳水化合物含量的影响,参考价值比较有限。本研究利用蛋白含量梯度升高,且碳水化合物含量处于正常范围的3种等热卡纯化饲料,对大鼠孕期和哺乳期进行干预,探讨母体高蛋白饮食对子代代谢相关激素的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 实验动物

SPF级Wistar大鼠:雌性36只(63~69 d);雄性20只(70~76 d),由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2012-0001。动物饲养于SPF级动物室,饲养环境温度(22±2)℃,相对湿度50%~60%,昼夜比为12 h:12 h。本实验方案经南京医科大学实验动物福利伦理审查委员会审核通过,批准编号:IACUC-1601065。

##### 1.1.2 动物饲料

本实验全程使用纯化饲料:Diet I、Diet II、Diet III、Diet AIN-93G(美国营养学会啮齿类动物纯化饲料-生长繁殖)、Diet AIN-93M(美国营养学会啮齿类动物纯化饲料-维持)<sup>[5]</sup>。Diet I、Diet II、Diet III分别在AIN-93G配方基础上调整蛋白质和碳水化合物的比例,使其蛋白质供热比分别为14%、24%、34%,且饲料热卡不变。饲料总热量、宏量营养素供热百分比及酪蛋白含量见表1。实验饲料均由南通特洛菲饲料科技有限公司提供,生产许可证号:苏饲证(2014)06092。

表1 饲料总热量、宏量营养素供热百分比及酪蛋白含量  
Table 1 Total calories,percentage of calories derived from macronutrients and casein content in different diets

饲料	总热量(kcal/kg)	宏量营养素供热百分比(%)			酪蛋白含量(g/kg)
		蛋白质	碳水化合物	脂肪	
Diet I	3 766.0	14.0	69.3	16.7	141.5
Diet II	3 766.0	24.0	59.3	16.7	245.8
Diet III	3 766.0	34.0	49.3	16.7	350.9
AIN-93G	3 766.0	19.3	64.0	16.7	200.0
AIN-93M	3 601.0	14.1	75.9	10.0	140.0

#### 1.1.3 主要仪器

Thermo Micro17R 冷冻离心机(美国赛默飞世尔科技有限公司),SpectraMax iD3 多功能酶标仪(美国美谷分子仪器有限公司),BD Vacutainer 真空静脉血样采集容器(美国碧迪医疗器械有限公司)。

#### 1.2 方法

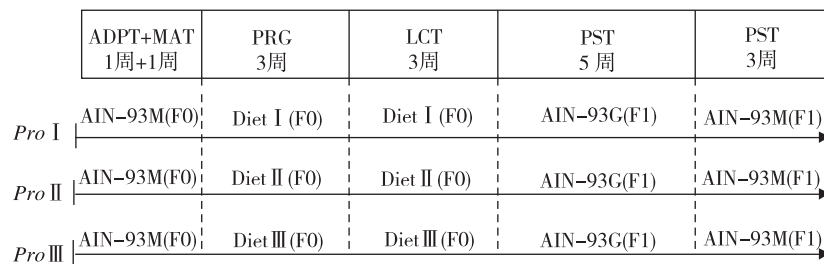
##### 1.2.1 动物分组和处理

Wistar大鼠适应性喂养1周后,每天18:00按雌:雄比2:1合笼,次日8:00做阴道拭子,涂片后在光镜下观察到精子认为怀孕,并将每日怀孕的大鼠随机分为3组,记为Pro I组、Pro II组、Pro III组。

Pro I组、Pro II组、Pro III组各阶段饲料喂养情况见图1。实验中,母代记为F0,子代记为F1。每窝产仔数在11~17只之间的纳入后续实验。各组F1出生后第3天(P3),舍弃雌性F1,每一窝留取体重处于(本窝雄性子代体重)中位数上下的3只雄性F1,分别在P21、P49、P77时点禁食8 h后处死,留取相关标本。实验期间所有动物自由进食、饮水。

##### 1.2.2 实验期间观察指标

①空腹体重(body weight, BW)与身长(body length, BL)。F1代P3、P7、P14时点BW:仔鼠与母鼠分开4 h后称量所得体重,F1代P21、P49、P77时点BW:禁食(不禁水)8 h后称量所得体重。BL:大鼠在



ADPT:adaptation,适应喂养期;MAT:mating,交配期;PRG:pregnancy,孕期;LCT:lactation,哺乳期;PST:post-weaning,断乳后;(F0)、(F1)分别表示饲料喂养对象为F0代、F1代。各段线条长度不代表时间长度。

图1 Pro I组、Pro II组、Pro III组各阶段饲料喂养情况

Figure 1 Diets in each phase of three groups

异氟烷麻醉下平躺于水平桌面上,腹部朝上,脊柱伸直,下颌尽量后仰,与桌面平行,用钢卷尺量取鼻尖至肛门的距离;②Lee's 指数:评价成年大鼠肥胖程度的指数,计算公式为  $1000 \times (BW)^{1/3} / BL$ ;③体重增加值(weight gain, WG);④摄食量(food intake, FI);⑤喂养效率(food efficiency, FE):相应时间段 WG 与 FI 的比值;⑥内脏脂肪垫质量百分比(visceral fat mass %, VFM%): 双侧肾周及附睾脂肪垫质量之和记为 VFM, VFM 与 BW 的百分比记为 VFM%。

### 1.2.3 血液样本采集及相关激素水平测定

大鼠从 7:00 开始,禁食(不禁水)8 h 后,于 15:00 腹腔注射 7.5% 水合氯醛,0.4 mL/100 g BW,待其完全麻醉后,经心尖取血。取 1 mL 以乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝并加入抑肽酶 25 kU/ $\mu$ L[由于胃促生长素(Ghrelin)、神经肽 Y(NPY)属于易分解的多肽,必须经抑肽酶处理],4  $^{\circ}$ C, 1 500 g, 离心 5 min, 提取血浆,用于测定 Ghrelin 和 NPY;另取 1 mL 未加抗凝剂全血,4  $^{\circ}$ C, 1 500 g, 离心 5 min, 提取血清,用于测定瘦素(Leptin)、胰岛素样生长因子 1(IGF-1)。Ghrelin、NPY、Leptin、IGF-1 检测均采用 ELISA 方法(试剂盒均购自美国 R&D Systems 公司)。

### 1.3 统计学方法

数据均采用 SPSS 21.0 软件进行处理分析,结果均以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)对子代血浆 Ghrelin、NPY 水平和血清 Leptin、IGF-1 水平进行不同组别的差异比较。对存在统计学差异的数据同时进行方差齐性检验,方差齐者用 LSD 法进行组间比较,方差不齐者采用  $T^2$  检验进行组间比较。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 F0 代孕期及哺乳期 FI 及 F1 代基本生长情况

排除受孕失败、产仔过多或过少的情况,最终每

组有 8 窝大鼠纳入实验。各组 F0 代孕期及哺乳期 FI 无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。F1 代 P3 时点,Pro II 组 [(9.77 $\pm$ 0.81)g] 和 Pro III 组 [(9.58 $\pm$ 0.54)g] BW 均高于 Pro I 组 [(9.18 $\pm$ 0.68)g] ( $P < 0.01, P < 0.05$ )。出生后至断乳,Pro II 组 F1 代 BW 均处于各组最高水平 ( $P < 0.05$ )。断乳后 3 组 F1 代各时段 FI、WG、FE 及各时点 BW、Lee's 指数均无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。P49 和 P77 时点,Pro II 组、Pro III 组 VFM% 均高于 Pro I 组 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 F1 代断乳后各时点血清 IGF-1、Leptin 水平

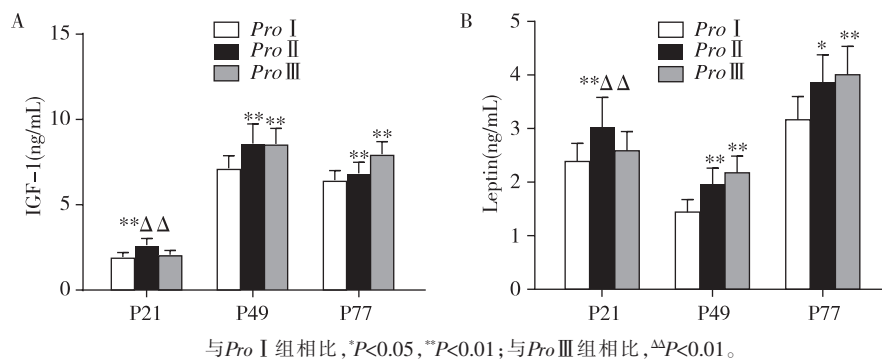
如图 2A 所示,Pro II 组 F1 代 P21 时点血清 IGF-1 水平高于 Pro I 组和 Pro III 组 ( $P < 0.01$ );至 P49 时点,Pro II 组、Pro III 组 IGF-1 水平均高于 Pro I 组 ( $P < 0.01$ );至 P77 时点,Pro III 组 IGF-1 水平为 3 组中最高 ( $P < 0.01$ )。图 2B 所示,P21 时点,Pro II 组 F1 代血清 Leptin 水平为 3 组中最高 ( $P < 0.01$ );P49 和 P77 时点,Pro I 组 Leptin 水平持续低于 Pro II 组和 Pro III 组 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 F1 代断乳后各时点血浆 Ghrelin、NPY 水平

如表 2 所示,Pro III 组 F1 代 P49 时点血浆 NPY 水平低于 Pro I 组和 Pro II 组 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ),各组 P77 时点 NPY 水平无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。各组 F1 代 P49 时点血浆 Ghrelin 水平无统计学差异 ( $P > 0.05$ ),至 P77 时点,Pro III 组 Ghrelin 水平高于 Pro I 组和 Pro II 组 ( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

本研究利用蛋白含量梯度升高,且碳水化合物含量处于正常范围的 3 种等热卡纯化饲料,探讨大鼠母体孕期及哺乳期高蛋白饮食对子代生长及代谢相关激素的影响。实验设计中充分考虑到碳水化合物含量变化可能对结果产生的影响,并将这种影响控制到最低。此外,本实验全程采用纯化饲料。与日粮型饲料相比,纯化饲料的成分数据更加稳定可



与Pro I组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与Pro III组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 2 F1 代 P21、P49、P77 血清 IGF-1、Leptin 水平

Figure 2 Serum levels of IGF-1 and leptin of F1 generation at day 21, 49, 77 after birth

表2 F1代P49、P77时点血浆 Ghrelin、NPY 水平  
Table 2 Plasma concentration of Ghrelin and NPY of F1 generation at P49 and P77 (n=8,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	Ghrelin(pg/mL)		NPY(pg/mL)	
	P49	P77	P49	P77
Pro I	2 343.07±295.54	2 451.09±294.25	761.38±72.03	849.65±66.95
Pro II	2 376.59±288.34	2 283.14±267.83 <sup>ΔΔ</sup>	722.54±64.37 <sup>Δ</sup>	845.89±66.57
Pro III	2 288.95±270.34	2 975.15±288.78 <sup>**</sup>	644.82±61.49 <sup>**</sup>	896.93±59.81

与Pro I组相比, \*\*P<0.01; 与Pro III组相比, <sup>Δ</sup>P<0.05, <sup>ΔΔ</sup>P<0.01。

靠。因此,本实验对于研究母体高蛋白饮食对子代的作用具有较高的参考价值。

断乳后,各组F1代的摄食量和体重、Lee's指数等指标均无差异,但青春后期,高蛋白组F1代内脏脂肪垫质量百分比高于低蛋白组。已有研究表明,生命早期体内异常的激素水平(如IGF-1)可影响前脂肪细胞的分化<sup>[6-7]</sup>以及骨骼肌形成能力<sup>[3]</sup>。虽然本文未涉及孕期母体激素水平的研究,但根据已有观察数据及文献,推测上述现象可能是生命早期编程作用的结果<sup>[1-3]</sup>,涉及躯干/四肢脂肪比升高和(或)骨骼肌生长受限<sup>[1-2,6]</sup>。本文将着重讨论大鼠孕期和哺乳期高蛋白饮食对子代代谢相关激素的影响,关于子代生长相关指标的影响不再详述。

Leptin是一种由肥胖基因编码并主要由白色脂肪组织分泌的蛋白激素<sup>[6]</sup>。研究表明,人和动物血清Leptin水平与体内白色脂肪组织含量相关,但与BW无关<sup>[7]</sup>。本实验中,Pro II组、Pro III组子代断乳后各时点血清Leptin水平均高于Pro I组,并与各子代VFM%的趋势相同。提示大鼠母体孕期和哺乳期高蛋白饮食可增加子代内脏脂肪沉积,且子代血清Leptin水平相应升高。

Ghrelin是生长激素促分泌素受体的内源性配体,主要由胃分泌。其与受体结合后可以产生广泛的生物学效应,包括促进生长激素释放、增强食欲、维持能量正平衡等<sup>[8]</sup>。Ghrelin与Leptin均可作用于下丘脑食欲调节中枢的NPY/AGRP系统<sup>[9]</sup>,从而进行食欲调节,但两者的调节作用相反。本实验中,P77时点Pro III组子代血浆Ghrelin水平最高,可能成为其后续食欲和食量增加的前奏。值得注意的是,Pro III组子代在P77时点同时具有较高的Ghrelin和Leptin水平<sup>[10]</sup>。作为共同通路的重要食欲调节因子,NPY的体内水平显得至关重要。本实验中,P49时点Pro III组子代血浆NPY水平低于其他两组,可能是P49时点Pro III组较高Leptin水平的负反馈调节效应<sup>[9]</sup>。至P77时点,3组NPY水平无差异,可能是Ghrelin和Leptin等共同作用的结果<sup>[9-10]</sup>。限于本实

验的观察时程,P77后各组子代相关激素水平并不明确。

IGF-1作为一类与胰岛素结构相似的生长因子,可以促进碳水化合物代谢,增强蛋白质、脂质、糖原合成,抑制脂肪降解,并促进细胞增殖与分化<sup>[11]</sup>。研究显示,婴儿时期高蛋白饮食可增加其血清IGF-1水平,并显著增加婴儿早期生长速率<sup>[12-13]</sup>。本实验中,Pro II组与Pro III组子代断乳后各时点血清IGF-1水平均较高,并且与各子代VFM%趋势相同,提示母体孕期和哺乳期高蛋白饮食可能增加子代血清IGF-1水平,且其内脏脂肪沉积相应增加。

与其他同类研究<sup>[4]</sup>相比,在本实验的观察时程内并未发现大鼠孕期和哺乳期高蛋白饮食对子代食量的影响。我们推测,“小窝喂养”方式对子代大鼠食量的影响可能超过并掩盖了母鼠饮食中蛋白含量的作用<sup>[14]</sup>。另一方面,本实验中关于子代食量的数据均为子代大鼠日常食用标准纯化饲料的量,并不能全面反映子代食欲和食量。各子代对某些特殊饲料(如高脂高糖饲料)的喜好程度<sup>[15]</sup>是否有差异,仍需重新设计实验进行后续研究。此外,还需要有关肝组织IGF-1 mRNA和下丘脑NPY mRNA表达水平<sup>[16-17]</sup>的实验数据,才能进一步阐明孕期和哺乳期高蛋白饮食对子代相关激素的影响。

综上,大鼠孕期和哺乳期高蛋白饮食可引起其子代外周血中Leptin、Ghrelin、IGF-1水平升高,对外周血中NPY浓度影响较小,但目前的证据并不能确定高蛋白组子代较多的内脏脂肪沉积与上述激素水平的因果关系,具体机制仍有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Gonzalez-Bulnes A, Astiz S, Ovilo CA, et al. Early-postnatal changes in adiposity and lipids profile by transgenerational developmental programming in swine with obesity/leptin resistance [J]. J Endocrinol, 2014, 223(1): M17-M29
- [2] Vickers MH. Developmental programming and transgenerational transmission of obesity [J]. Ann Nutr Metab,



- 2014,64(Suppl 1):26-34
- [3] Jahan-Mihan A,Rodriguez J,Christie C,et al. The role of maternal dietary proteins in development of metabolic syndrome in offspring[J]. *Nutrients*,2015,7(11):9185-9217
- [4] Desclée de Maredsous C,Oozeer R,Barbillon P,et al. High-protein exposure during gestation or lactation or after weaning has a period-specific signature on rat pup weight,adiposity,food intake,and glucose homeostasis up to 6 weeks of age[J]. *J Nutr*,2016,146(1):21-29
- [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] Pérez-Pérez A,Vilarino-García T,Fernández-Riejós P,et al. Role of leptin as a link between metabolism and the immune system[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*,2017, S1359-6101(16):30160-30163
- [7] Pahwa R,Adams-Huet B,Jialal I. The effect of increasing body mass index on cardio-metabolic risk and biomarkers of oxidative stress and inflammation in nascent metabolic syndrome[J]. *J Diabetes Complications*,2017,31(5):810-813
- [8] Cui HX,Lopez M,Rahmouni K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity[J]. *Nat Rev Endocrinol*,2017,13(6):338-351
- [9] McConn BR,Cline MA,Gilbert ER. Dietary macronutrient composition and central neuropeptide Y injection affect dietary preference and hypothalamic gene expression in chicks[J]. *Nutr Neurosci*,2017,10:1-11
- [10] Churm R,Davies JS,Stephens JW,et al. Ghrelin function in human obesity and type 2 diabetes:a concise review[J]. *Obes Revi*,2017,18(2):140-148
- [11] Lind MV,Larnkjaer A,Molgaard CA. Dietary protein intake and quality in early Life:impact on growth and obesity[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*,2017,20(1):71-76
- [12] Michaelsen KF,Larnkjaer A,Molgaard C. Amount and quality of dietary proteins during the first two years of Life in relation to NCD risk in adulthood[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*,2012,22(10):781-786
- [13] Larnkjaer A,Molgaard C,Michaelsen KF. Early nutrition impact on the insulin-like growth factor axis and later health Consequences[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*,2012,15(3):285-292
- [14] Portella AK,Silveira PP,Laureano DP,et al. Litter size reduction alters insulin signaling in the ventral tegmental area and influences dopamine-related behaviors in adult rats[J]. *Behav Brain Res*,2015,278:66-73
- [15] Hallam MC,Barile D,Meyrand M,et al. Maternal high-protein or high-prebiotic-fiber diets affect maternal milk composition and gut microbiota in rat dams and their offspring[J]. *Obesity (Silver Spring)*,2014,22(11):2344-2351
- [16] Poskitt E,Breda J. Complementary feeding and non communicable diseases:Current knowledge and future research needs[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*,2012,22(10):819-822
- [17] Michaelsen KF,Larnkjaer A,Molgaard C. Early diet,insulin-like growth factor-1,growth and later obesity[J]. *World Rev Nutr Diet*,2013,106:113-118

[收稿日期] 2017-03-16

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》在第三届中国学术期刊评价中被评为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”! 本次共有 6448 种中文学术期刊参与评价,经过综合评价后得到期刊相应的等级,共计 1939 种学术期刊进入核心期刊区。