

短期生酮饮食对小鼠代谢的影响

陈 浩,林燕蝶,邹怡新,李 皓*

(南京医科大学病理生理学系,江苏 南京 211166)

[摘要] **目的:**探讨短期生酮饮食对小鼠能量代谢的影响。**方法:**将 Balb/c 小鼠随机分成 2 组,分别给予普通饮食或生酮饮食 4 d,每天称量体重并检测血糖变化。在第 4 天,取血检测甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、游离脂肪酸(FFA)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、 β -羟丁酸(β -HB)水平;称量肝脏重量,测定肝脏中 TG、胆固醇以及糖原含量;real-time PCR 检测肝脏组织中代谢相关基因的表达水平;制作肝脏 HE 染色切片,显微镜下观察肝脏病理学改变。**结果:**短期生酮饮食使小鼠体重明显减轻,血糖明显下降,血 TC、 β -HB、FFA 高于普通饮食小鼠。生酮饮食小鼠肝重/体重比增加,肝组织中的 TG 增多,糖原减少。real-time PCR 显示生酮饮食组小鼠脂肪酸氧化、氧化磷酸化以及酮体生成相关基因增加。显微镜下可见生酮饮食小鼠肝脏脂质蓄积明显增加。**结论:**生酮饮食可快速促进小鼠脂肪酸氧化和酮体生成。与长期生酮饮食不同的是,短期生酮饮食引起血 TC 显著增加和脂质合成基因 FAS 表达增多,而对肝脏无明显损伤作用。

[关键词] 生酮饮食;血糖;脂肪酸氧化

[中图分类号] Q591

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)08-937-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160808

Short-term effect of ketogenic diet on metabolism of mice

Chen Hao, Lin Yandie, Zou Yixin, Li Hao*

(Department of Pathophysiology, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate short-term effect of ketogenic diet on metabolism of mice. **Methods:** BALB/c mice were divided into two groups and placed on normal diet or ketogenic diet for 4 days. Body weight and blood glucose were monitored everyday. On the fourth day, the blood samples and livers were gathered and liver weight/body weight were calculated. Serum triglycerides(TG), total cholesterol(TC), free fatty acids(FFA), alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST), and beta hydroxybutyric acid(β -HB) were tested. The content of TG, cholesterol and glycogen in liver were detected. The expression levels of genes related to metabolism in livers were detected by real-time PCR. Liver pathology was also examined by HE staining. **Results:** Short-term ketogenic diet significantly reduced blood glucose and body weight of mice. Liver weight/body weight of short-term ketogenic mice was higher than that of control mice. A four-day feeding of ketogenic diet resulted in increased TC and β -HB in blood. Meanwhile, more TG and less glycogen were detected in the liver. Real-time PCR demonstrated that hepatic genes involved in fatty acid oxidation, oxidative phosphorylation and ketogenesis were increased. Accumulation of lipid was observed in the liver of ketogenic mice under a microscope. **Conclusion:** Short-term ketogenic diet induced fatty acid oxidation and ketogenesis in mice. Different from long-term ketogenic mice, elevated blood cholesterol and FAS mRNA levels were observed in short-term ketogenic mice without obvious liver damage.

[Key words] ketogenic diet; blood glucose; fatty acid oxidation

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(08): 937-941]

生酮饮食(ketogenic diet, KD)是一个高脂肪、低碳水化合物和适当蛋白质的配方饮食。它以脂肪取

代葡萄糖作为能量来源,具有降低血糖、促进酮体生成等代谢作用,在临床上早已被广泛运用于治疗儿童难治性癫痫^[1-2]。近年来,生酮饮食所引起的代谢变化也被用于多形性神经胶质瘤等肿瘤的辅助治疗中^[3]。生酮饮食模拟了饥饿的状态,但与饥饿的代谢变化不尽相同。文献报道,给予小鼠生酮饮食 9

[基金项目] 国家自然科学基金(81070678);南京医科大学 2014 年大学生创新训练计划项目

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

周后可观察到明显的体重下降, 血浆游离脂肪酸(FFA)、酮体明显升高, 血糖明显降低, 肝脏糖异生明显被抑制, 对胰岛素敏感性的增强^[4]。长期饲喂生酮饮食能够改善年幼的 ob/ob 小鼠的肝脏脂肪变^[5]。最近的研究发现, 生酮饮食能够改善糖尿病肾病^[6]。目前, 生酮饮食对人和小鼠的代谢影响均在长期(5 周或以上)使用后进行检测。生酮饮食在短期内对机体的代谢效应与长期有何不同, 目前尚无报道。本研究观测了短期生酮饮食对小鼠血液生化指标、肝脏糖脂含量及代谢相关基因表达的影响, 并对其与长期生酮饮食的异同进行了比较和分析。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级健康雄性 Balb/c 小鼠, 7 周龄, 体重 20~25 g, 由北京维通利华实验动物有限公司提供。生酮饮食由上海普路腾生物科技有限公司提供, 其成分为猪油(70%)、酪蛋白(20%)、纤维素(5.5%)以及预混料(4.5%)。

HE 染液、胆固醇及甘油三酯(TG)试剂盒(浙江东瓯诊断产品有限公司), 丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒、 β -羟丁酸(β -HB)检测试剂盒及糖原测定试剂盒(南京建成有限公司), 血糖试条(长沙三诺生物公司), FFA 试剂盒(日本和光纯药工业株式会社)。

1.2 方法

1.2.1 动物饲养

将体重接近的小鼠随机分为 2 组, 分别给予生酮饮食(KD 组)和普通饮食(ND 组)4 d。实验开始时, 所有小鼠均先禁食过夜再给予食物。实验期间小鼠可自由饮水。

1.2.2 血液生化检测

采血前用 50℃ 左右温水浸泡尾部约 2 min, 血管充血后, 棉球消毒、擦干鼠尾, 用消毒手术剪剪去尾尖 5~10 mm, 用血糖试纸测定血糖。在生酮饮食饲喂第 4 天, 取小鼠全血, 室温静置 20 min, 以 5 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 得到血清。用试剂盒检测 TG、总胆固醇(TC)、FFA、酮体以及 ALT、AST。

1.2.3 肝脏脂质含量和糖原检测

取 50 mg 左右的肝脏称重, 加入 0.1 mmol/L 的 NaCl 500 μ L 匀浆, 加入 1.5 mL 氯仿: 甲醇(2:1)37℃ 抽提脂质 2 h 后离心, 取下层有机相 500 μ L, 用氮气吹干, 以含 1% TritonX-100 的无水乙醇溶液溶

解, 用试剂盒检测 TG 和 TC。新鲜肝脏称重后, 按样本重量(mg): 碱液体积(μ L)为 1:3 一起加入试管中, 沸水浴煮 20 min, 将所得到的糖元水解液用试剂盒检测肝糖原含量。

1.2.4 real-time PCR 检测

TRIzol 法提取肝组织总 RNA, 用 Taqman 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 引物(序列见表 1)由上海英俊生物有限公司合成。real-time PCR 应用 SYBR Premix Extaq™(TaKaRa 公司, 日本), 反应体系为: SYBY Premix Extaq™ 10 μ L, 模板 5 μ L, 引物 2.5 μ L, 灭菌蒸馏水 2.5 μ L。反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 30 s, 循环 40 次。用 Applied Biosystems 7500 real-time PCR System 进行检测, 分析扩增曲线和分离曲线。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Name and sequence of real-time RT-PCR primers

名称(鼠源)	序列(5'→3')
HADH	F: ACTACATCAAAATGGGCTCTCAG R: AGCAGAAATGGAATGCGGACC
HMGCS2	F: AGAGAGCGATGCAGGAAACTT R: AAGGATGCCACATCTTTTGG
UCP2	F: ACTTTCCTCTGGATACCGC R: ACGGAGGCAAAGCTCATCTG
FAS	F: GGTTACTACTGTGCTAGGTGTTG R: TCCAGGCGCATGAGGCTCAGC
SCD	F: TTCTTGGGATACACTCTGGTGC R: CGGGATTGAATGTTCTTCTCGT

1.2.5 HE 染色

取各组肝组织标本制成 5 μ m 厚的石蜡切片, 二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水, 苏木素染色 5 min, 流水冲洗 10 min, 1% 盐酸脱色, 流水冲洗 10 min, 伊红染色, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。在普通光学显微镜下观察各组小鼠肝组织病理变化。

1.3 统计学方法

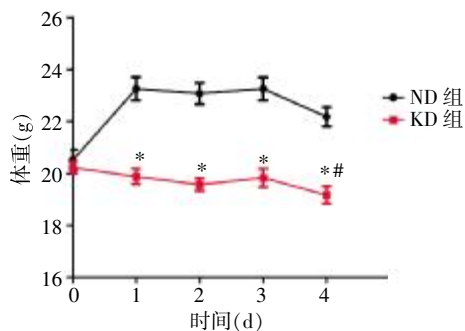
每组实验均独立重复 3 次。采用 SPSS13.0 统计软件, 实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 短期生酮饮食对体重的影响

为排除小鼠可能因不适应生酮饮食而造成进食时间的延迟, 在实验开始前将所有小鼠均先禁食过夜, 再给予食物, 以保证生酮饮食(KD 组)和普通饮食组(ND 组)小鼠基本同时进食。禁食后给予普

通饮食 1 d 的小鼠体重有明显增加,而给予生酮饮食 1 d 的小鼠体重无明显变化,体重明显低于 ND 组。随着喂养天数增至 4 d, KD 组小鼠体重明显低于生酮饮食喂养前体重(图 1)。在另外的实验中,在 4 d 后继续给予小鼠生酮饮食,发现 KD 组小鼠的体重在第 5~6 天后停止下降并开始逐渐上升,2 周左右可恢复到实验开始时的体重,此后小鼠体重继续增加,但仍明显低于 ND 组小鼠(结果未显示),与有关报道长期生酮饮食对小鼠体重的影响一致^[3]。



与 ND 组比较, * $P < 0.001$; 同组内与 0 d 比较, * $P < 0.05$ ($n=6$)。

图 1 短期生酮饮食对小鼠体重的影响

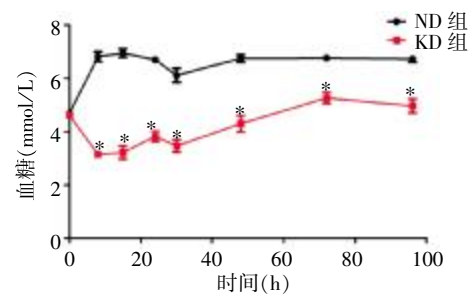
Figure 1 Effect of the short-term ketogenic diet on body weight of mice

2.2 生酮饮食对血液生化指标的影响

对血糖的检测结果发现,与 ND 组相比生酮饮食喂养 8 h 即可导致小鼠血糖明显下降。此后 KD 组小鼠血糖略有上升,但始终低于 ND 组(图 2)。可见,生酮饮食降低血糖的效应是迅速而持久的。KD 组 4 d 后,血清 β -HB 和 FFA 明显高于 ND 组,与长期生酮饮食的影响一致(表 2)。但是,研究发现,与长期生酮饮食导致 ALT 升高不同, KD 组 4 d 时血清 ALT 和 AST 与对照组相比无明显差异,提示肝脏损伤的发生速度较慢,生酮饮食早期引起的代谢变化并非肝脏受损所致。还发现,尽管长期生酮饮食对血清 TC 和 TG 无明显影响, KD 组 4 d 时 TC 显著升高,而 TG 无变化,提示短内生酮饮食引起的脂质代谢变化主要与饮食成分的改变有关,而长期生酮饮食的效应中则有机体的慢性适应性反应参与。

2.3 生酮饮食对肝脏糖、脂含量的影响

研究发现, KD 组 4 d 后,小鼠的肝重体重比明显高于对照小鼠(图 3A)。肝脏脂质含量检测结果显示, KD 组小鼠肝脏 TG 明显增加,而 TC 无明显变化。同时,肝糖原含量明显减少(图 3B)。对两组小鼠的肝脏进行 HE 染色,可见 KD 组小鼠的肝细胞明显增大,肝索结构不规则,肝血窦缝隙减小,肝细胞内部有大量脂滴集聚(图 3C)。这些变化提示,短期



与 ND 组比较, * $P < 0.001$ ($n=6$)。

图 2 短期生酮饮食对小鼠血糖的影响

Figure 2 Effect of the short-term ketogenic diet on blood glucose of mice

表 2 血液生化指标

Table 2 Blood biochemical index

指标	(n=6, $\bar{x} \pm s$)	
	ND 组	KD 组
血糖(mmol/L)	6.73 \pm 0.31	4.96 \pm 0.63 **
TG(mmol/L)	0.60 \pm 0.02	0.51 \pm 0.01
TC(mmol/L)	4.99 \pm 0.03	8.79 \pm 0.04 **
FFA(mEq/L)	0.70 \pm 0.12	0.93 \pm 0.14 *
β -HB(μ mol/L)	0.51 \pm 0.07	0.99 \pm 0.08 **
ALT(U/L)	82.8 \pm 15.5	76.5 \pm 25.1
AST(U/L)	210.0 \pm 15.9	182.0 \pm 32.4

与 ND 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ 。

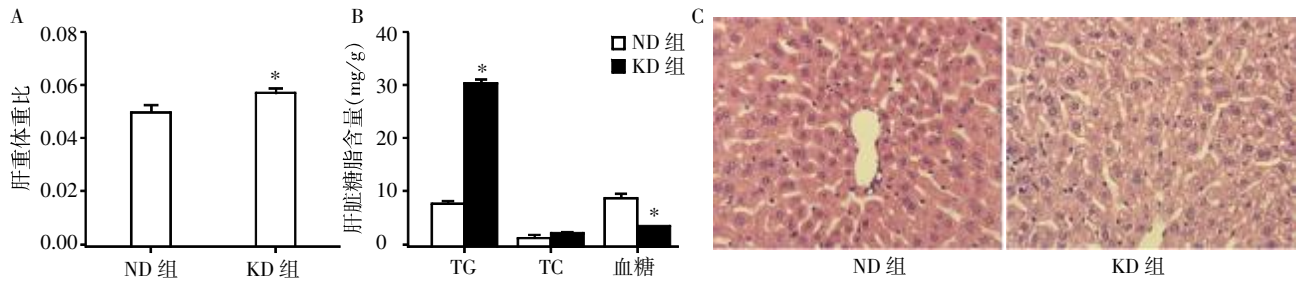
生酮饮食已造成明显的肝脏脂质沉积和脂肪变。

2.4 生酮饮食对代谢相关基因表达的影响

检测肝脏中参与脂质代谢的部分基因 mRNA 表达水平。结果显示, KD 组小鼠肝脏参与脂肪酸氧化的 HADH、UPC2 表达明显增加,酮体合成的限速酶 HMGCS2 的表达显著上调,催化脂质合成的 FAS 增加、SCD 下降,两者呈现相反的变化。已知长期生酮饮食促进脂肪酸氧化和酮体生成,抑制脂质合成和糖异生。可见,短期生酮饮食引起的小鼠代谢相关基因变化与长期生酮饮食基本一致,但对 FAS 的作用则相反(图 4)。

3 讨论

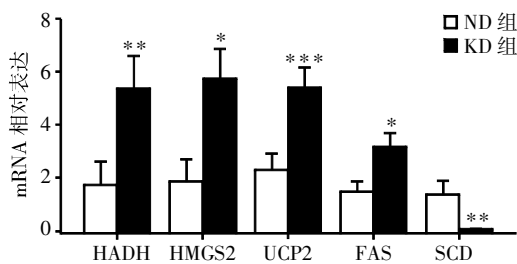
普通饮食以碳水化合物为主。机体摄入碳水化合物后,经消化吸收转化为葡萄糖,葡萄糖先进行糖酵解生成丙酮酸,再经过有氧氧化生成 ATP 来维持生命活动。只有在葡萄糖缺乏的条件下,如禁食时机体才通过脂肪水解供能:脂肪酸在肝脏中通过 β 氧化供能,也能生成酮体,包括乙酰乙酸(acetoacetate)、 β -HB 和丙酮酸(acetone),通过血液循环运输到肝脏以外的组织器官(主要是脑组织)代替葡萄糖提供 ATP。生酮饮食作为一种高脂肪低碳水化合



A: 肝重体重比; B: 肝脏糖脂含量; C: 肝脏切片 HE 染色, 显示 KD 组肝细胞肿胀变大, 内含大量脂肪空泡, 肝索结构不规则($\times 400$)。与 ND 组相比, $*P < 0.001 (n=6)$ 。

图 3 短期生酮饮食对小鼠肝脏糖脂含量的影响

Figure 3 Effect of the short-term ketogenic diet on lipid and glycogen of liver in mice



与 ND 组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001 (n=6)$ 。

图 4 短期生酮饮食对肝脏脂质代谢基因表达的影响

Figure 4 Effect of the short-term ketogenic diet on the expression of genes in liver involved in lipid metabolism

物的配方饮食,使得机体以脂肪作为能量代谢的主要物质,模拟了饥饿的状态,但与饥饿不同的是,生酮饮食对糖异生是抑制而非促进的。

生酮饮食的利弊均有文献报道。生酮饮食能够减少小鼠和大鼠癫痫的发生,其原因可能与提供能量的物质由糖类转变为脂肪^[7]、增加了腺苷酸并降低了 DNA 的甲基化^[8]、海马成分的改变^[9]等有关。也有文献报道生酮饮食能够改善阿尔茨海默病的症状^[10]、对中风有保护作用^[11]、改变自闭症模型小鼠的症状^[12]等。长期饲喂生酮饮食能够使小鼠的棕色脂肪组织的氧化磷酸化蛋白以及解偶联蛋白 1 的水平增加^[13]。但是,生酮饮食却能加重小鼠维生素 H 的缺乏^[14]、损伤 FGF21 信号通路增加肝脏以及白色脂肪组织的炎症反应。长期饲喂生酮饮食的小鼠尽管会出现肝脏脂肪变以及炎症,但是不影响小鼠的生存率^[15]。

对短期生酮饮食引起的代谢变化进行了研究。结合已报道的长期生酮饮食的代谢效应,可以将生酮饮食引起的代谢改变按其随时间变化的特点分成以下几类:①在短期内即出现,并在长期生酮饮食后持续存在的变化,如血糖的下降、酮体和 FFA

的增加、肝脂质沉积和糖原减少;②在短期内发生,而长期生酮饮食后即消失的变化,如血清 TC 水平在短期内显著升高;③在短期内不发生,但长期生酮饮食后会出现的变化,如肝损伤。短期与长期生酮饮食在代谢方面的差异可能有以下原因:①机体代偿反应的发生速度相对较慢,因此,在长期生酮饮食时才表现出来;②由代谢变化继发引起的改变需要的时间较长,如肝脂肪沉积发生速度快,而其继发引起的脂肪性肝炎出现较晚。也注意到,短期生酮饮食的小鼠肝脏中,促进脂肪酸合成的基因 FAS 显著升高,这可能与肝脏在短时间内出现的脂肪酸氧化迅速增强有关,而长期生酮饮食的小鼠肝脏 FAS 显著下调^[3],则可能是肝脏长期脂肪沉积对 FAS 表达产生了负反馈调节作用。

通过本研究,对生酮饮食引起的代谢变化有了更清楚的认识,为在临床和科研中应用这些代谢变化提供了实验依据。

【参考文献】

- [1] Wilder RM. The effect of ketonemia on the course of epilepsy[J]. Mayo Clin Bulletin, 1921, 2: 307-308
- [2] Caraballo R, Noli D, Cachia P. Epilepsy of infancy with migrating focal seizures: three patients treated with the ketogenic diet[J]. Epileptic Disord, 2015, 17(2): 194-197
- [3] Champ CE, Palmer JD, Volek JS, et al. Targeting metabolism with a ketogenic diet during the treatment of glioblastoma multiforme[J]. J Neurooncol, 2014, 117(1): 125-131
- [4] Kennedy AR, Pissios P, Otu H, et al. A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007, 292(6): E1724-E1739
- [5] Okuda T, Morita N. A very low carbohydrate ketogenic diet prevents the progression of hepatic steatosis caused by hyperglycemia in a juvenile obese mouse model[J]. Nutr Diabetes, 2012, 2: e50
- [6] Poplawski MM, Mastaitis JW, Isoda F, et al. Reversal of

- diabetic nephropathy by a ketogenic diet[J]. *PLoS One*, 2011,6(4):e18604
- [7] Mantis JG, Meidenbauer JJ, Zimick NC, et al. Glucose reduces the anticonvulsant effects of the ketogenic diet in EL mice[J]. *Epilepsy Res*, 2014,108(7):1137-1144
- [8] Lusardi TA, Akula KK, Coffman SQ, et al. Ketogenic diet prevents epileptogenesis and disease progression in adult mice and rats[J]. *Neuropharmacology*, 2015,99:500-509
- [9] Chwiej J, Skoczen A, Matusiak K, et al. The influence of the ketogenic diet on the elemental and biochemical compositions of the hippocampal formation[J]. *Epilepsy Behav*, 2015,49(1):40-46
- [10] Brownlow ML, Benner L, D'Agostino D, et al. Ketogenic diet improves motor performance but not cognition in two mouse models of Alzheimer's Pathology[J]. *PLoS One*, 2013,8(9):e75713
- [11] Shaafi S, Mahmoudi J, Pashapour A, et al. Ketogenic diet provides neuroprotective effects against ischemic stroke neuronal damages[J]. *Adv Pharm Bull*, 2014,4(Suppl 2):479-481
- [12] Ruskin DN, Svedova J, Cote JL, et al. Ketogenic diet improves core symptoms of autism in BTBR mice [J]. *PLoS One*, 2013,8(6):e65021
- [13] Srivastava S, Baxa U, Niu G, et al. A ketogenic diet increases brown adipose tissue mitochondrial proteins and UCP1 levels in mice[J]. *IUBMB Life*, 2013,65(1):58-66
- [14] Yuasa M, Matsui T, Ando S, et al. Consumption of a low-carbohydrate and high-fat diet (the ketogenic diet) exaggerates biotin deficiency in mice[J]. *Nutrition*, 2013,29(10):1266-1270
- [15] Asrih M, Altirriba J, Rohner-Jeanrenaud F, et al. Ketogenic diet impairs FGF21 signaling and promotes differential inflammatory responses in the liver and white adipose tissue[J]. *PLoS One*, 2015,10(5):e126364
- [收稿日期] 2016-02-23

(上接第 936 页)

- (5):477-485
- [5] Sharp A, Pichert G, Lucassen A, et al. RNA analysis reveals splicing mutations and loss of expression defects in MLH1 and BRCA1[J]. *Hum Mutat*, 2004,24(3):272
- [6] Andreadis A. Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005,1739(2-3):91-103
- [7] Zou F, Gopalraj RK, Lok J, et al. Sex-dependent association of a common low-density lipoprotein receptor polymorphism with RNA splicing efficiency in the brain and Alzheimer's disease[J]. *Hum Mol Genet*, 2008,17(7):929-935
- [8] Tazi J, Bakkour N, Stamm S. Alternative splicing and disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009,1792(1):14-26
- [9] Lu C, Ren W, Su XM, et al. CREB and Sp1 regulate the human CD2AP gene promoter activity in renal tubular epithelial cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008,474(1):143-149
- [10] Shih NY, Li J, Karpitskii V, et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein [J]. *Science*, 1999,286(5438):312-315
- [11] Kim JM, Wu H, Green G, et al. CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility[J]. *Science*, 2003,300(5623):1298-300
- [12] 赵 非, 黄松明, 张爱华, 等. CD2AP 在大鼠肾病模型中的表达及意义[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2004,24(1):12-14
- [13] Xu HG, Ren W, Zou L, et al. Transcriptional control of human CD2AP expression; the role of Sp1 and Sp3 [J]. *Mol Biol Rep*, 2012,39(2):1479-1486
- [14] Zou L, Xu HG, Ren W, et al. Transcriptional activation of the human CD2AP promoter by E2F1[J]. *PLoS One*, 2012,7(8):e42774
- [15] Gilbert W. Why genes in pieces? [J]. *Nature*, 1978,271(5645):501
- [16] Hang J, Wan R, Yan C, et al. Structural basis of pre-mRNA splicing[J]. *Science*, 2015,349(6253):1191-1198
- [17] Yan C, Hang J, Wan R, et al. Structure of a yeast spliceosome at 3.6-angstrom resolution [J]. *Science*, 2015,349(6253):1182-1191
- [18] Solomon SS, Majumdar G, Martinez-Hernandez A, et al. A critical role of Sp1 transcription factor in regulating gene expression in response to insulin and other hormones[J]. *Life Sci*, 2008,83(9-10):305-312
- [收稿日期] 2016-02-17