

可乐代替饮用水对小鼠健康的影响

周兵勇^{1#} 黄鑫^{1,2#} 徐珂^{1,2} 陆鑫¹ 吉苗^{1,2} 李世慧¹ 孙红琴¹ 毋文静^{1*} 张瑾^{1*}

(¹嘉兴学院生物与化学工程学院, 嘉兴 314000; ²河北科技师范学院农学与生物科技学院, 秦皇岛 066000)

摘要 可乐是一种高糖碳酸饮料, 学者们普遍认为过量饮用可乐会影响机体糖脂代谢, 诱发肥胖, 但缺乏实验证据。该研究以6周龄雄性C57BL/6J小鼠为研究对象, 以可乐代替饮用水饲养小鼠3个月, 旨在确定可乐对小鼠体质量、糖脂代谢和行为的影响。结果表明, 与饮用水组小鼠相比, 可乐组小鼠采食量显著减少, 体质量、脂肪和肝脏的质量均显著下降。通过对脂肪组织基因表达情况进行分析发现, 可乐组小鼠的脂合成基因(*FAS*、*PPAR γ* 、*aP2*)、脂分解基因(*ATGL*、*LPL*、*HSL*)的表达水平均显著升高。行为学分析结果表明, 可乐组小鼠在旷场实验中表现出更高的活跃度, 在强迫游泳和悬尾实验中更容易放弃挣扎。综上所述, 可乐代替饮用水会抑制小鼠食欲, 减少体质量和脂肪的累积, 且能够增加其活跃度。

关键词 可乐; 小鼠; 健康; 脂肪积累

Effects of Cola as the Only Drinking Liquid on Mice Health

ZHOU Bingyong^{1#}, HUANG Xin^{1,2#}, XU Ke^{1,2}, LU Xin¹, JI Miao^{1,2}, LI Shihui¹,

SUN Hongqin¹, WU Wenjing^{1*}, ZHANG Jin^{1*}

(¹College of Biological Chemical Sciences and Engineering, Jiaxing University, Jiaxing 314000, China;

²College of Agronomy and Biotechnology, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao 066000, China)

Abstract Cola is a kind of carbonated drink with a high content of sugar, which affects glycolipid metabolism if drinking excessively. Thus, Cola is generally believed to be a factor of inducing obesity, but this opinion lacks of experimental evidence. In this study, in order to determine the effects of Cola on body weight, glycolipid metabolism and behavior of mice, 6-week-old male C57BL/6J mice were fed with Cola as the only drinking liquid for three months. The results showed the food intake, body weight, fat weight and liver weight of the mice in the Cola-drinking group significantly decreased compared with those of the mice in the water-drinking group. Gene expression analysis revealed that both adipogenesis genes (*FAS*, *PPAR γ* , *aP2*) and lipolytic genes (*ATGL*, *LPL*, *HSL*) in adipose tissues were up-regulated in the Cola-drinking group. In the behavioral analysis, Cola-drinking mice showed higher activity in open field experiments, and were more likely to give up struggling in forced swimming and tail suspension experiments. In summary, Cola as the only drinking liquid suppresses mice appetite, reduces body weight and fat accumulation, but increases their activity.

Keywords Cola; mice; health; fat accumulation

收稿日期: 2019-12-03 接受日期: 2020-04-07

嘉兴学院校级重点SRT计划项目(批准号: 851719471、851719463)、浙江省自然科学基金(批准号: LQ18C170002、LY17C170003)和嘉兴学院启动科研经费(批准号: 70516055)资助的课题

*共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0573-83643695, E-mail: wuwenjing19851020@163.com; zhangjin7688@163.com

Received: December 3, 2019 Accepted: April 7, 2020

This work was supported by the Project of Jiaxing University College Student Research Training (SRT) (Grant No.851719471, 851719463), the Zhejiang Natural Scientific Foundation (Grant No.LQ18C170002, LY17C170003), and the Initial Scientific Research Fund of Young Teachers in Jiaxing University (Grant No.70516055)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding authors. Tel: +86-573-83643695, E-mail: wuwenjing19851020@163.com; zhangjin7688@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5266>

随着社会经济的发展和人们生活水平的提高,肥胖人群不断增多。肥胖与多种疾病密切相关,严重威胁人类健康^[1]。学者们针对肥胖的诱因开展了研究,发现了饮食结构、生活习惯、运动和遗传等多种相关因素^[2]。其中饮食决定着机体摄入能量的多少,在肥胖发生过程中发挥重要作用。高脂高糖的饮食可以诱发肥胖^[3-4],每100 mL可乐含有10.6 g的糖,且蛋白质、脂肪的含量为零,是名副其实的高糖饮料,因此人们普遍认为,饮用可乐能够导致体质量增加。由于可乐成分复杂、配方保密,所以鲜有研究者聚焦可乐对体质量和健康的影响。

通过观察发现,一方面人们喜爱可乐的口感,另一方面又担心饮用可乐不利于身体健康。鉴于此,本实验室将“长期饮用可乐”视为一种生活习惯,以可乐代替饮用水喂养小鼠11周。本研究对小鼠的体质量、脂肪组织重量、成脂标志基因的表达水平和行为学指标进行分析,以评估可乐对小鼠健康的影响。结果表明,饮用可乐能够降低小鼠食欲,减缓体质量增加和脂肪累积,且血糖无异常。本研究提供了可乐对健康影响的实验证据,得出了与日常认知不同的实验结论。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验室从苏州大学-剑桥基因组中心购买C57BL/6J品系小鼠,将小鼠饲养于嘉兴学院医学院SPF级动物房中,通过扩繁得到实验所需小鼠。准备体质量20 g、6周龄的C57BL/6J雄性小鼠20只,将其随机分为两组:10只饮用水(Water)组小鼠以纯净水为唯一饮用水,10只可乐(Cola)组小鼠以可口可乐为唯一饮用水,按照实验要求,喂养11周。在喂养过程中,每周检测体质量、摄食量和血糖,观察小鼠状态^[5]。小鼠饲养条件为从早上9点开始进行12 h明暗循环,设定(25±1) °C恒定温度和40%~60%相对湿度。上述动物实验均遵照《中华人民共和国实验动物管理条例》的相关规定进行,并已通过嘉兴学院医学院动物实验及实验动物伦理委员会审查批准。

1.2 试剂及仪器

TRIzol试剂购自Invitrogen公司;反转录试剂盒购自TaKaRa公司;SYBR Green试剂购自康为世纪生物科技有限公司;DEPC购自Sigma公司;酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒和甘油三酯试剂盒购自南京

建成公司;葡萄糖购自生工生物工程(上海)股份有限公司;胰岛素购自丹麦诺和诺德公司;BCA蛋白质测定试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;抗体均购自CST公司;引物由通用生物有限公司合成。

MP珠磨仪购自MP BIO公司;核酸测定仪和实时定量PCR仪购自Thermo公司;血糖仪购自三诺生物传感股份有限公司;多功能酶标仪购自Tecan公司;多功能凝胶成像系统购自Bio-Rad公司;电子秤购自Ohaus公司。

1.3 饲料转化效率和器官指数的测定

根据测出的小鼠体质量、摄食量和各器官的质量,分别通过以下公式计算得到小鼠的饲料转化效率和器官指数:饲料转化效率=体重增加的质量/消耗的饲料质量,器官指数=器官质量/小鼠体质量。

1.4 葡萄糖耐受性实验(glucose tolerance test, GTT)

小鼠禁食12 h后,称重,测血糖并记为小鼠0 min时的血糖值。测完后让小鼠适应30 min,开始腹腔注射葡萄糖溶液,注射剂量为2 g/kg。注射完后在15 min、30 min、60 min、90 min、120 min和150 min测量小鼠的血糖值^[6]。

1.5 胰岛素敏感性实验(Insulin Sensitivity Test, IST)

将小鼠禁食6 h,称重,测血糖记为小鼠0 min的血糖值。测完后让小鼠适应30 min,然后开始腹腔注射稀释好的胰岛素溶液,注射剂量为0.5 U/kg。注射后15 min、30 min、60 min、90 min、120 min和150 min测量小鼠的血糖值^[7]。

1.6 行为学实验

通过旷场^[8]、悬尾^[9]、Morris水迷宫^[10]以及强迫游泳^[9,11]等行为学实验,分析长期饮用可乐对小鼠活跃程度、抗压能力和学习记忆能力的影响。

1.7 取样与测量

利用乙醚迷晕小鼠,通过眼眶静脉取血后,断颈处死小鼠,取后颈部皮下棕色脂肪、腹股沟白色脂肪、附睾白色脂肪和肝脏组织,称重后冻存于-80 °C冰箱。将血液置于4 °C条件下静置过夜,然后于3 500 r/min、4 °C离心20 min,取上清^[12],利用ELISA试剂盒检测血清中脂联素(adiponectin, ADPN)含量;利用甘油三酯试剂盒检测血清甘油三酯(triglyceride, TG)含量。

1.8 qRT-PCR检测

利用TRIzol裂解法提取样品的总RNA,根据反转录试剂盒步骤进行反转录,采用ThermoFisher Quant-

Studio 3定量PCR仪检测食欲相关基因[厌食前阿片色素皮质激素(pro-opiomelanocotin, *POMC*)、促食欲素相关肽(agouti-related peptide, *AgRP*)]、脂分解基因[过氧化物酶体增殖剂激活受体- γ (peroxisome proliferators-activated receptors- γ , *PPAR γ*)、脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, *FAS*)、脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白(adipocyte fatty acid binding protein, *aP2*)]和脂合成基因[脂肪甘油三酯脂酶(fatty triglyceride lipase, *ATGL*)、脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, *LPL*)、激素敏感性脂肪酶(hormone-sensitive lipase, *HSL*)]在组织中的相对表达水平。25 μ L反应体系包括: 12.5 μ L SYBR Premix Ex Taq™ (2 \times)、1 μ L上游引物(10 μ mol/L)、1 μ L下游引物(10 μ mol/L)、2 μ L cDNA模板、8.5 μ L ddH₂O。qRT-PCR的扩增程序如下: 95 $^{\circ}$ C预变性30 s; 95 $^{\circ}$ C变性5 s, 60 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 共40个循环。机器默认溶解曲线, 每个实验均重复3次。以 β -actin为内参基因, 以^{2- $\Delta\Delta$ C_t}法计算基因相对表达丰度^[13], 引物序列见表1。

1.9 Western blot分析

提取腹股沟脂肪和附睾脂肪组织的总蛋白, 使用BCA蛋白质测定试剂盒测定蛋白浓度, 加入1/4体积的蛋白上样缓冲液, 混合后煮沸变性10 min。将变性后的蛋白质进行10% SDS-PAGE电泳, 然后将

蛋白质转移至PVDF膜上, 用5%脱脂奶粉常温封闭2 h, 之后用一抗(1:500)于4 $^{\circ}$ C孵育过夜; 第2天洗膜后, 用5%脱脂奶粉稀释辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1000)常温孵育1.5 h, 再次洗膜后, 加发光液, 利用Bio-Rad成像系统曝光, 使用Image Lab软件测定灰度值, 以 β -tubulin作为内参, 计算目标蛋白与内参灰度值的比值得到其相对表达水平^[14]。

1.10 数据分析

采用Prism 6.0软件作图, 利用SPSS 18.0软件进行统计分析, 实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 各组间的差异用 t 检验(Student's t test)进行检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠体质量和脂肪积累的分析

为了明确饮用可乐对机体健康的影响, 本研究以雄性C57BL/6J小鼠为模型, 开展了3个月的可乐代替饮用水的饲养实验, 检测了小鼠体质量、摄食量及血糖的变化。结果表明, 与Water组相比, Cola组小鼠的体质量(图1A和图1B)和采食量(图1C)均显著降低, 而饲料转化效率和血糖并无差异(图1D和图1E)。对小鼠下丘脑中与食欲相关的基因的表达

表1 qRT-PCR引物序列

Table 1 The primer sequences used for qRT-PCR analysis

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>POMC</i>	F: TTA AGC CGG TGG GCA AGA R: GGA CCT GCT CCA AGC CTA AT
<i>AgRP</i>	F: CTT TGG CGG AGG TGC TAG AT R: TGC GAC TAC AGA GGT TCG TG
<i>aP2</i>	F: AAG AAG TGG GAG TGG GCT TTG R: CTC TTC ACC TTC CTG TCG TCT G
<i>PPARγ</i>	F: CCA AGA ATA CCA AAG TGC GAT CA R: CCC ACA GAC TCG GCA CTC AAT
<i>FAS</i>	F: AGT TGC CCG AGT CAG AGA A R: CGT CGA ACT TGG AGA GAT CC
<i>HSL</i>	F: GCT GGG CTG TCA AGC ACT GT R: GTA ACT GGG TAG GCT GCC AT
<i>ATGL</i>	F: TTC GCA ATC TCT ACC GCC TC R: AAA GGG TTG GGT TGG TTC AG
<i>LPL</i>	F: CCA ATG GAG GCA CTT TCC A R: TGG TCC ACG TCT CCG AGT C
β -actin	F: GTC CCT GAC CCT CCC AAA AG R: GCT GCC TCA ACA CCT CAA CCC

量进行检测, 在可乐(Cola)组小鼠下丘脑中抑制食欲 *POMC* 基因的表达显著升高(图1F), 促进食欲 *AgRP* 基因表达显著降低(图1G)。

将小鼠处死解剖后, 进一步分析其脂肪和肝脏组织。发现Cola组小鼠的腹股沟脂肪、附睾脂肪、棕色脂肪和肝脏的质量均极显著低于Water组 ($P < 0.01$, 图2A~图2D), 并且单位体质量的脂肪占比显著降低 ($P < 0.01$, 图2E)。

2.2 小鼠行为学分析

利用旷场实验、悬尾实验、强迫游泳实验和 Morris 水迷宫实验, 分析可乐代替饮用水对小鼠活跃度、抗压能力、学习能力和记忆能力的影响。

将实验小鼠置于旷场实验箱中, 摄像机记录其活动规律。对影像进行分析发现, Cola组小鼠的水平运动次数、中央区活动时间和粪便粒数都与 Water组差异不显著, 但其垂直运动次数有显著上升(图3A), 因此推断饮用可乐增强了小鼠的兴奋度。

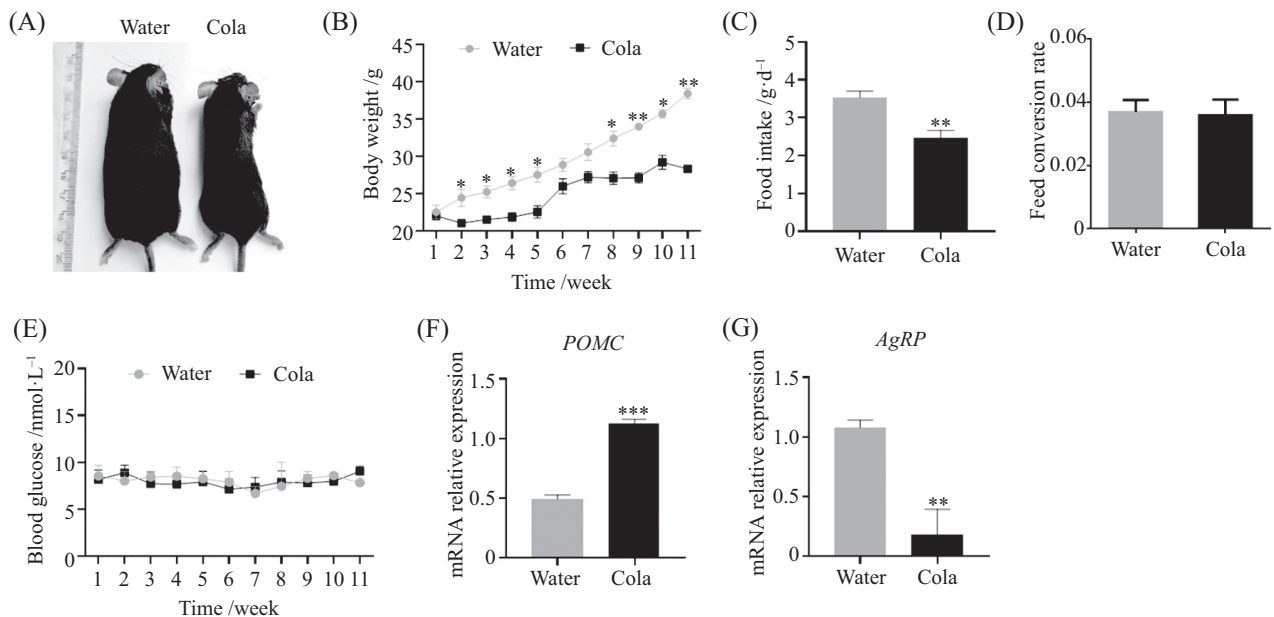
在悬尾实验(图3B)和强迫游泳实验(图3C)中, Cola组小鼠起初挣扎比Water组更剧烈, 但绝对不动时间均显著高于Water组, 因此推断长期饮用可乐可能导致小鼠在压力环境下更容易放弃。

采用 Morris 水迷宫实验对小鼠的学习记忆能力进行分析, 在连续5天隐藏平台获得实验(图3D)和第6天空间探索实验(图3E)中, Cola组小鼠与 Water组小鼠的学习记忆能力无显著性差异, 所以推断长期饮用可乐对小鼠的学习能力和记忆力无显著影响。

2.3 小鼠胰岛素敏感性、葡萄糖耐受性、血清 TG 和 ADPN 含量分析

小鼠禁食 12 h 后, 通过腹腔注射葡萄糖 (2 g/kg), 于注射后 15 min、30 min、60 min、90 min、120 min 和 150 min, 取尾静脉血液, 以检测血糖浓度。结果显示, Cola组小鼠的血糖浓度在 15 min 时显著高于 Water组小鼠(图4A), 两组数据在其他时间点无显著性差异, 通过计算两组的曲线下面积发现, 两组数据整体无显著性差异。为了进一步验证此结果, 对小鼠胰岛素敏感性进行了检测。发现与 Water组小鼠相比, Cola组小鼠的血糖浓度在注射胰岛素 60 min 后低于 Water小鼠, 在 90 min 时达到极显著差异水平(图4B), 但通过计算两组曲线下面积发现, 两组数据整体无显著性差异。因此, 推断饮用可乐3个月对小鼠的葡萄糖耐受性和胰岛素耐受性无显著影响。

检测血清中 TG 的含量发现, Cola组小鼠血清中

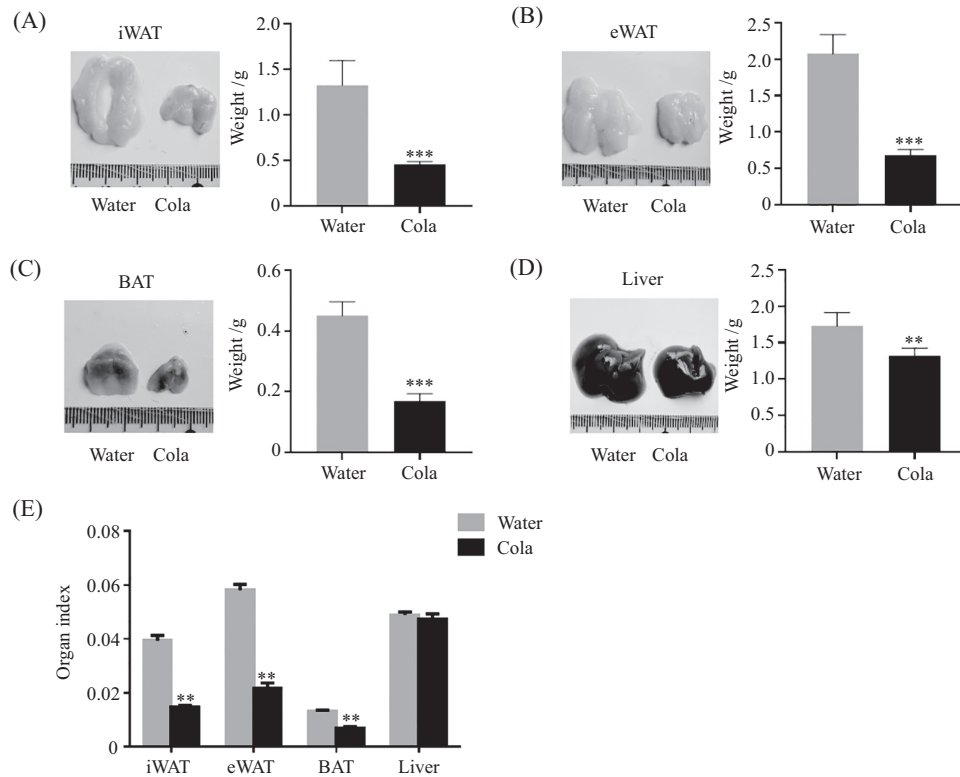


A: 体型对比; B: 体质量对比; C: 摄食量对比; D: 饲料消化率对比; E: 血糖对比; F: 下丘脑中 *POMC* 基因表达; G: 下丘脑中 *AgRP* 基因表达。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与 Water 组比较。

A: body shape comparison; B: body weight comparison; C: food intake comparison; D: feed conversion rate comparison; E: blood glucose comparison; F: mRNA relative expression of *POMC* in hypothalamic tissue; G: mRNA relative expression of *AgRP* in hypothalamic tissue. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Water group.

图1 可乐代替饮用水对小鼠体型、体质量、摄食量和血糖的影响

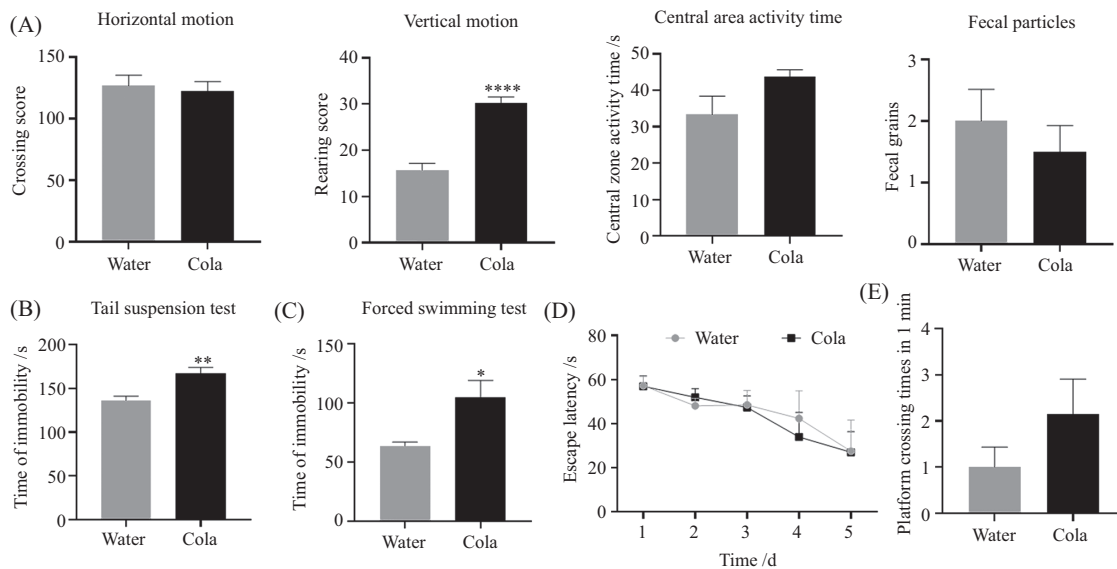
Fig.1 The effects of Cola as the only drinking liquid on body shape, body weight, food intake and blood glucose



A: 腹股沟脂肪(iWAT); B: 附睾脂肪(eWAT); C: 棕色脂肪(BAT); D: 肝脏(Liver); E: 脏器指数。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与Water组比较。
A: inguinal fat (iWAT); B: epididymal fat (eWAT); C: brown fat (BAT); D: liver; E: organ index. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0011$ vs Water group.

图2 可乐代替饮用水对小鼠脂肪组织和肝脏质量的影响

Fig.2 The effects of Cola as the only drinking liquid on the weights of adipose tissue and liver of mice

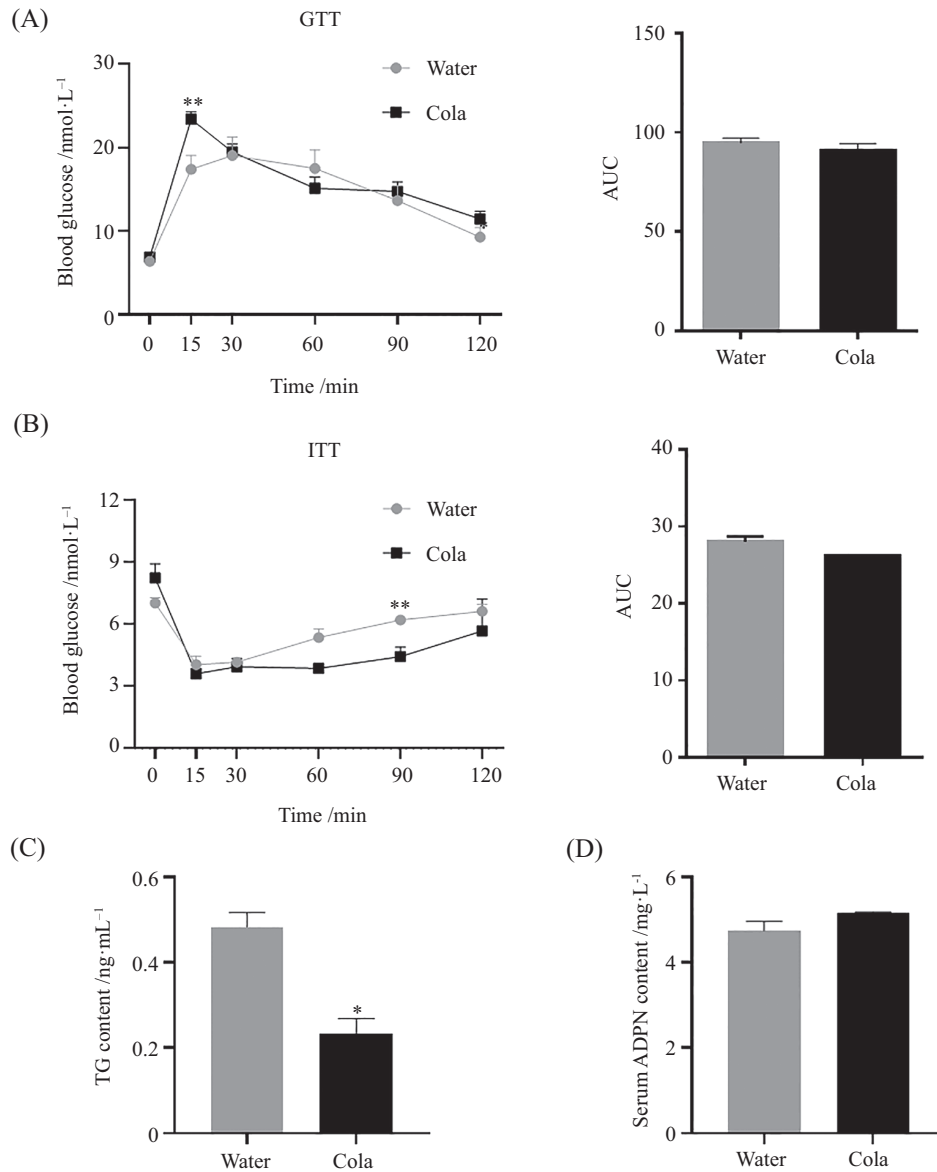


A: 旷场实验; B: 悬尾实验中小鼠不动时间; C: 强迫游泳中小鼠不动时间; D: Morris水迷宫逃避潜伏期实验: 小鼠在1~5天隐藏平台获得实验中逃避潜伏期时间($n=10$); E: Morris水迷宫探索实验: 小鼠在第6天探索实验中1 min内穿越原平台位置次数($n=10$)。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, 与Water组比较。

A: results of the open field test; B: the immobility time of mice in the tail suspension test; C: the immobility time of mice in forced swimming test; D: the escape latency of the mice in the water maze test on the hidden platform 1st to 5th days ($n=10$); E: the number of times of the mice crossed the original platform position within 1 min in the 6th on the escape experiment in the water maze test ($n=10$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ vs Water group.

图3 可乐代替饮用水对小鼠行为的影响

Fig.3 The effect of Cola as the only drinking liquid on mice behavior



A: 小鼠葡萄糖耐受性分析和曲线下面积; B: 小鼠胰岛素敏感性和曲线下面积; C: 小鼠血清中甘油三酯含量; D: 小鼠血清中ADPN蛋白的变化。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与Water组比较。

A: glucose tolerance and area under curve (AUC); B: insulin sensitivity and AUC; C: serum triglyceride content; D: serum ADPN content. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Water group.

图4 可乐代替饮用水对小鼠葡萄糖耐受性、胰岛素敏感性和血清中TG、ADPN的影响

Fig.4 The effects of Cola as the only drinking liquid on glucose tolerance, insulin sensitivity, TG and ADPN in serum of mice

TG的含量显著低于Water小鼠(图4C), 但Cola组小鼠和Water组小鼠的ADPN无显著差异(图4D)。

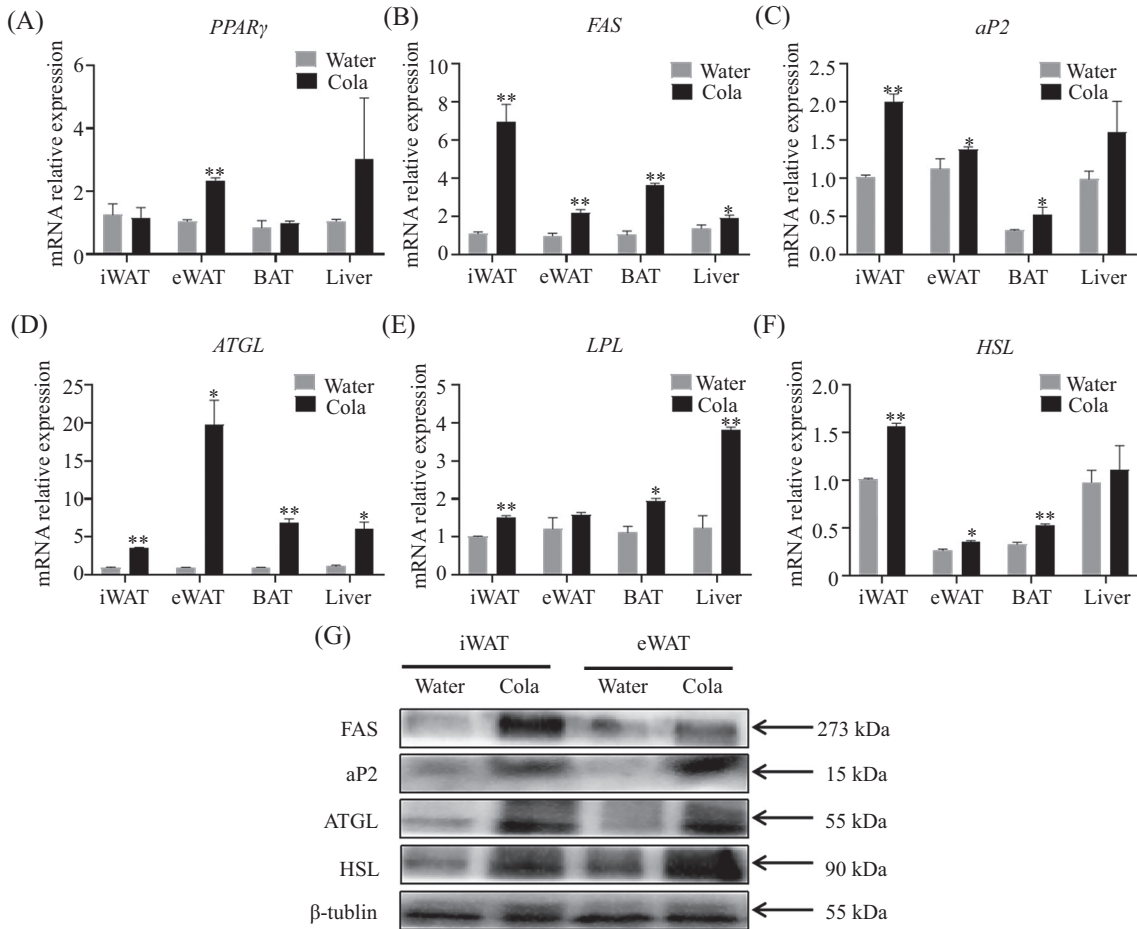
2.4 小鼠成脂标志基因和其蛋白表达丰度分析

利用qRT-PCR和Western blot分析Water组和Cola组小鼠腹股沟脂肪组织、附睾脂肪组织、棕色脂肪组织和肝脏组织中成脂标志基因及其蛋白的表达情况。与Water组小鼠相比, Cola组小鼠的脂肪和肝脏组织中脂肪细胞分化标志基因*PPAR γ* (图5A)、脂合成基因*FAS*、*aP2*(图4B和图4C)和脂分解基因*ATGL*、*LPL*、

HSL(图4C~图4E)的表达量均升高, 且*FAS*、*aP2*、*ATGL*、*HSL*蛋白在腹股沟脂肪和附睾脂肪中的表达也均上升, 提示长期饮用可乐不仅加强了脂生成, 也加强了脂分解, 即长期饮用可乐导致小鼠脂肪代谢速度有所提升。

2.5 小鼠p38MAPK信号通路分析

提取腹股沟脂肪和附睾脂肪组织的总蛋白进行Western blot分析, 以检测p-p38、p38和 β -tublin的蛋白表达水平(图6A)。经灰度分析发现, 与Water组小鼠相比,



A~F: 脂肪标志基因 *PPAR γ* 、*FAS*、*aP2*、*ATGL*、*LPL*、*HSL* 在小鼠腹股沟脂肪组织(iWAT)、附睾脂肪组织(eWAT)、棕色脂肪组织(BAT)和肝脏组织(Liver)中的表达; G: *FAS*、*aP2*、*ATGL*、*HSL* 蛋白在腹股沟脂肪和附睾脂肪中的表达水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 Water 组比较。

A~F: the expression of fat marker genes *PPAR γ* , *FAS*, *aP2*, *ATGL*, *LPL*, *HSL* in inguinal adipose tissue (iWAT), epididymal adipose tissue (eWAT), brown adipose tissue (BAT) and liver tissue (Liver); G: levels of *FAS*, *aP2*, *ATGL*, *HSL* protein in inguinal fat and epididymal fat. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Water group.

图5 可乐代替饮用水对小鼠脂肪标志基因和蛋白丰度表达的影响

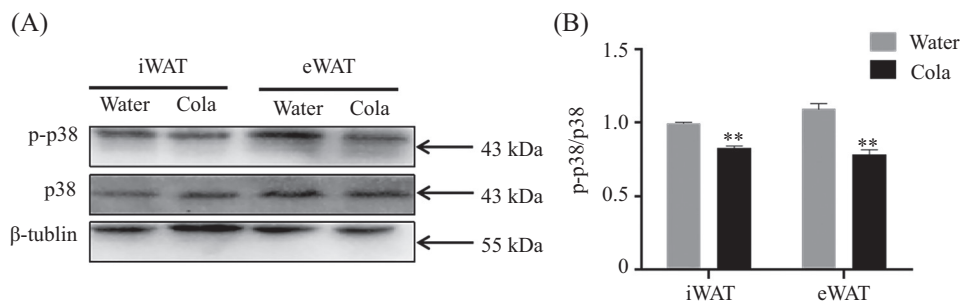
Fig.5 The effect of Cola as the only drinking liquid on the expression of adipose marker genes and protein abundance in mice

Cola组小鼠的脂肪组织中p38磷酸化水平显著下降(图6B)。此结果提示,长期饮用可乐能降低脂肪组织中p38信号通路的活性。

3 讨论

肥胖人群中糖尿病、高血压、高血脂、心脑血管疾病以及一些癌症的发病率显著高于普通人群,解析肥胖的成因有助于预防肥胖的发生^[3]。在肥胖形成的诸多原因中,饮食结构是重要因素之一^[15]。因此,模拟人群饮食习惯的实验动物模型被广泛用于阐明肥胖和代谢紊乱的机制。本研究通过可乐代替饮用水,得到大量饮用高糖饮料形成的肥胖动物模型。在以前的研究中发现,无论是长期饮用含有高浓度葡萄糖水还是饮用高

浓度果葡糖浆水均会造成机体肥胖^[2,16]。可乐是高糖的碳酸饮料,其组分含有果葡糖浆和葡萄糖,在一般的认知中,长期饮用可乐会引起机体肥胖,但是在本研究中,打破了这一认知。我们发现饮用可乐的小鼠体质量显著低于饮用水的小鼠体质量,而且血糖无异常,且脂肪积累减少。通过对小鼠的摄食量进行检测发现,饮用可乐的小鼠摄食量显著低于饮用水的小鼠摄食量,结合下丘脑中控制食欲的两个基因 *POMC* 和 *AgRP* 的表达水平分析,推断饮用可乐抑制了小鼠的食欲,减少了采食量,从而导致小鼠体质量和白色脂肪的质量显著降低。可乐配方中除了糖类外,还含有二氧化碳和咖啡因等食品添加剂。有研究表明,在餐前0.5~4.0 h摄入咖啡因是有抑制食欲的作用的^[17],这



A: p-p38和p38在小鼠脂肪组织中的丰度分析; B: p-p38和p38丰度比的定量分析。iWAT, 腹股沟脂肪组织; eWAT, 附睾脂肪组织。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与Water组比较。

A: Western blot studies examining p-p38 and p38 in the adipose tissues of mice; B: quantitative analysis of the abundance ratio of p-p38 and p38. iWAT, inguinal adipose tissue; eWAT, epididymal adipose tissue. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Water group.

图6 可乐代替饮用水对小鼠p38MAPK信号通路的影响

Fig.6 The effect of Cola as the only drinking liquid on p38MAPK signaling pathway in mice

或许是长期饮用可乐导致小鼠食欲降低的原因。

脂肪组织的沉积也与多种调控因子有关, 其中最关键的促进因子有PPAR γ 、FAS和aP2等, 它们参与脂肪细胞分化和脂肪酸合成, 是脂肪细胞成脂的标志性基因^[18-20]。PPAR γ 属于核激素受体, 能够促使纤维细胞或老骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化^[21]。FAS是脂肪酸合成的关键酶, 动物体内脂肪沉积所需要的脂肪酸大多数来自于脂肪酸的从头合成, 脂肪酸从头合成由脂肪酸催化乙酰辅酶A和丙二酸单酰辅酶合成脂肪酸, 进而合成甘油三酯^[22]。aP2是脂肪细胞的一个终末分化标记物和细胞质脂质伴侣^[23], 在脂肪酸代谢和脂肪沉积途径中促进细胞摄取长链脂肪酸^[24]。通过qRT-PCR和Western blot分析发现, 长期饮用可乐使PPAR γ 、aP2和FAS的mRNA及蛋白表达水平均显著升高。脂肪组织中甘油三酯的积累是一个动态的过程, 包含甘油三酯合成和水解。所以, 脂解过程可以从另一方面揭示脂肪细胞分化的原理, HSL是激素敏感性甘油三酯脂肪酶, 是脂肪分解限速酶, 在脂肪动员中起决定性作用, 其活化形式为磷酸化形式, 可直接作用于脂肪, 使甘油三酯水解为甘油二酯^[25]。ATGL是脂解过程中的限速酶, 对脂解起到关键作用^[26]。LPL也是脂质代谢关键酶, 主要在脂肪组织和骨骼肌实质细胞的粗面内质网合成, 随后要经过复杂的细胞内加工, 其活性和浓度是影响机体血脂浓度的关键因素^[27]。本研究发现, 可乐能够促进脂肪组织中ATGL、LPL和HSL的mRNA表达, 这暗示了长期饮用可乐加快小鼠体内脂代谢的发生, 从而抑制脂肪沉积。

p38 MAPK信号通路为MAPK家族的重要成员, 能够将细胞外信号传递入细胞内, 并对炎症反应、细胞

生长、分化、凋亡等细胞生命活动发挥调节作用^[28]。ZHANG等^[29]的研究表明, p38MAPK蛋白相关信号通路的激活与代谢综合征(metabolic syndrome, MS)大鼠脂肪组织的增生密切相关。SB203580可以通过阻断p38信号传导途径抑制小鼠3T3-L1细胞系分化为脂肪细胞, 其表现为脂滴形成减少, 脂肪细胞特异性基因表达降低等^[30]。在小鼠细胞中的研究发现, p38MAPK的活性在前体脂肪细胞分化过程中逐渐降低; 并且p38MAPK的抑制剂PD169316可促进脂肪细胞分化标志基因CCAAT/增强子结合蛋白 β 和过氧化物酶增值物激活受体- γ 的表达^[31]。在我们的前期研究中也发现, 抑制p38的活性可以显著降低脂肪细胞中的脂解作用^[32]。本实验进一步探究了饮用可乐对p38 MAPK信号通路中关键蛋白表达的影响。Western blot结果表明, 饮用可乐小鼠的脂肪组织中p38的磷酸化水平显著降低, 提示可乐可能通过抑制p38的活性, 进而抑制脂肪的沉积。

为了深入评估可乐对小鼠健康的影响, 本文采用了一系列压力环境, 对可乐组小鼠的行为学与生理学进行分析。在强迫游泳实验和悬尾实验中, 可乐组小鼠静止不动的时间比饮用水组小鼠的长, 推断可乐能够导致小鼠在压力环境下更容易放弃; 在旷场实验中, 可乐组小鼠对新环境的自主活动性均显著上升。这些研究揭示, 长期饮用可乐是能够影响生物体的行为的。

综上所述, 饮用可乐可能通过抑制食欲, 减少小鼠的摄食量, 进而降低小鼠体重和血清中TG的含量。

参考文献 (References)

- [1] KOSOVA E, BERGMARK B, PIAZZA G. Fat embolism syndrome [J]. *Circulation*, 2015, 131(3): 317-20.
- [2] 李东锋, 杨波, 杨汉东, 等. 代谢综合征患者血清抵抗素与血脂、

- 肥胖和胰岛素抵抗关系的研究[J]. 中国临床医学(LI D F, YANG B, YANG H D, et al. The rRelationship of the serum resistin level, lipid level, obesity and insulin resistance in patients with metabolic syndrome [J]. Chinese Clinical Medicine), 2005, 12(2): 206-8.
- [3] DE MELLO A H, SCHRAIBER R B, GOLDIM M P S, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids have beneficial effects on visceral fat in diet-induced obesity model [J]. *Biochem Cell Biol*, 2019, 97(6): 693-701.
- [4] TAPPY L, LE K A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity [J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(1): 23-46.
- [5] MATIAS A M, ESTEVAM W M, COELHO P M, et al. Differential effects of high sugar, high lard or a combination of both on nutritional, hormonal and cardiovascular metabolic profiles of rodents [J]. *Nutrients*, 2018, 10(8): e1071.
- [6] 孔唯力, 黄鑫, 徐珂, 等. CTRP6基因缺失对小鼠白色脂肪组织“棕色化”的影响[J]. 中国细胞生物学学报(KONG W L, HUANG X, XU K, et al. Allele deficiency of CTRP6 affects the browning of white adipose tissue in mice [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2018, 40(12): 52-61.
- [7] LEI X, SELDIN M M, LIFFLE H C, et al. C1q/TNF-related protein 6 (CTRP6) links obesity to adipose tissue inflammation and insulin resistance [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(36): 14836-50.
- [8] 孙瑜孺, 孙理军. 左归丸、右归丸对肾虚体质大鼠行为学与PSD-95蛋白表达的影响[J]. 中医学报(SUN Y R, SUN L J. Impact of Zuo Gui Pill and You Gui Pill on the expression of PSD-95 of rats with kidney deficiency [J]. Chinese Medical Journal), 2016, 31(3): 394-7.
- [9] BORBELY É, HAJNA Z, NABI L, et al. Hemokinin-1 mediates anxiolytic and anti-depressant-like actions in mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 59: 219-32.
- [10] VORHEES C V, WILLIAMS M T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 848-58.
- [11] LI X, NEED A B, BAEZ M, et al. Metabotropic glutamate 5 receptor antagonism is associated with antidepressant-like effects in mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 319(1): 254-9.
- [12] NG Q Y, LEE K W, BYRNE C, et al. Plasma endotoxin and immune responses during a 21-km road race under a warm and humid environment [J]. *Ann Acad Med Singapore*, 2008, 37(4): 307-14.
- [13] WU W, YIN Y, ZHONG J, et al. Cell therapy could be a potential way to improve lipoprotein lipase deficiency [J]. *Lipids Health Dis*, 2017, 16(1): 189.
- [14] WU W, ZHANG J, ZHAO C, et al. CTRP6 regulates porcine adipocyte proliferation and differentiation by the AdipoR1/MAPK signaling pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(27): 5512-22.
- [15] PENG X, YAO Y. Carbohydrates as Fat Replacers [J]. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2017, 8: 331-51.
- [16] MAERSK M, BELZA A, STODKILDE-JORGENSEN H, et al. Sucrose-sweetened beverages increase fat storage in the liver, muscle, and visceral fat depot: a 6-mo randomized intervention study [J]. *Am J Clin Nutr*, 2012, 95(2): 283-9.
- [17] SCHUBERT M M, IRWIN C, SEAY R F, et al. Caffeine, coffee, and appetite control: a review [J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2017, 68(8): 901-12.
- [18] ZHENG L F, CHEN P J, ZHOU Y Z, et al. Fat deposition in skeletal muscle and its regulation [J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2017, 69(3): 344-50.
- [19] JANG B C. Artesunate inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by reducing the expression and/or phosphorylation levels of C/EBP- α , PPAR- γ , FAS, perilipin A, and STAT-3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 474(1): 220-5.
- [20] GE X N, BASTAN I, DILEEPAN M, et al. FABP4 regulates eosinophil recruitment and activation in allergic airway inflammation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 315(2): 227-40.
- [21] FINCK B N, KELLY D P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(3): 615-22.
- [22] SMITH S, WITKOWSKI A, JOSHI A K. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase [J]. *Prog Lipid Res*, 2003, 42(4): 289-317.
- [23] TUNCMAN G, ERBAY E, HOM X, et al. A genetic variant at the fatty acid-binding protein ap2 locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(18): 6970-5.
- [24] KO J H, NAM D, UM J Y, et al. Bergamottin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells and weight regulation in diet-induced obese mice [J]. *Am J Chin Med*, 2018, 46(3): 601-15.
- [25] XIA B, CAI G H, YANG H, et al. Adipose tissue deficiency of hormone-sensitive lipase causes fatty liver in mice [J]. *PLoS Genet*, 2017, 13(12): e1007110.
- [26] SATHYANARAYAN A, MASHEK M T, MASHEK D G. ATGL promotes autophagy/lipophagy via SIRT1 to control hepatic lipid droplet catabolism [J]. *Cell Rep*, 2017, 19(1): 1-9.
- [27] KERSTEN S. Physiological regulation of lipoprotein lipase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1841(7): 919-33.
- [28] CUADRADO A, NEBREDA A R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling [J]. *Biochem J*, 2010, 429(3): 403-17.
- [29] 张雅萍, 祝之明, 闫振成, 等. 曹廷兵代谢综合征大鼠肥胖特征及ERK1/2和p38MAPK的作用研究[J]. 解放军医学杂志(ZHANG Y P, ZHU Z M, NIAN Z C, et al. Characteristics of obesity and role of ERK1/2 and p38MAPK in production of adipose tissue in rat with metabolic syndrome [J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army), 2006, 31(8): 794-7.
- [30] SOMWAR R, KOTERSKI S, SWEENEY G, et al. A dominant-negative p38 MAPK mutant and novel selective inhibitors of p38 MAPK reduce insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without affecting GLUT4 translocation [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(52): 50386-95.
- [31] AOUADI M, LAURENT K, PROT M, et al. Inhibition of p38MAPK increases adipogenesis from embryonic to adult stages [J]. *Diabetes*, 2006, 55(2): 281-9.
- [32] WU W, ZHANG J, ZHAO C, et al. CTRP6 regulates porcine adipocyte proliferation and differentiation by the AdipoR1/MAPK signaling pathway [J]. *J Agr Food Chem*, 2017, 65(27): 5512-22.