

雌激素对小鼠肠道甜味传导相关蛋白表达的影响

李国梁¹, 陈梦玲², 郑敏², 王兵², 耿倩倩², 张羽歆³, 梁沛², 詹月华², 张根华^{1,2}

(1.苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123)

(2.常熟理工学院生物与食品工程学院, 江苏 常熟 215500)

(3.江苏省常熟中学, 江苏 常熟 215500)

[摘要] 雌激素与甜味感知紧密相连, 可以通过影响机体对甜味的感知能力而改变人们对碳水化合物的摄取, 但雌激素在肠道味觉中所起的作用尚不明确. 本实验以行卵巢切除术为手段构建雌激素缺乏小鼠模型, 采用实时荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹技术, 从分子和蛋白质水平检测雌激素对肠道内甜味传导相关的信号分子表达的影响. 实验结果发现, 卵巢切除后的小鼠, 血液内雌激素的含量明显降低, 体重显著性增加; 并且降低了十二指肠内 T1R3 的表达, 对 T1R2、TRPM5 也有一定的抑制作用, 暗示雌激素在小鼠肠道味觉感知中起着重要作用.

[关键词] 卵巢切除术, 雌激素, 肠道, C57BL/6 小鼠

[中图分类号] Q28 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2015)02-0098-07

Effects of Estrogen on Sweet-Associated Protein Expression in the Intestine of Mice

Li Guoliang¹, Chen Mengling², Zheng Min², Wang Bing², Geng Qianqian², Zhang Yuxin³,
Liang Pei², Zhan Yuehua², Zhang Genhua^{1,2}

(1.School of Biology and Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

(2.School of Biological and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

(3.Changshu High School of Jiangsu Province, Changshu 215500, China)

Abstract: Estrogen has been known to be associated with the perception of sweetness, which can modify people's intake of carbohydrates by affecting the perception of sweetness. However, the mechanism of how is the estrogen involved in the intestinal taste processing has not been fully understood. In this study, we have established the mouse model of estrogen deficiency, by the means of ovariectomy. The consequent modifications of the sweet taste transduction related signal expression have been analyzed on molecular and protein levels in intestine with qRT-PCR and Western blot technique. The results show that, with ovaries removed mice, estrogen levels in blood decreased markedly and the body weight increased significantly. Meanwhile, the expression of the duodenum T1R3 has been reduced, and those of T1R2 and TRPM5 have been inhibited to some extent as well. This study suggests that the estrogen plays an important role in mouse intestinal taste perception.

Key words: ovariectomy, estrogen, intestines, C57BL/6 mice

味觉是哺乳动物重要的化学感受器官, 哺乳动物味觉的识别主要依赖于分布在舌、上颚和咽部粘膜处的味蕾细胞及味觉感受体蛋白, 近年来大量研究发现, 味觉受体蛋白不仅只局限于味蕾细胞中, 也广泛存在于胃、肠道及各种胃肠道内分泌细胞系中, 与在味蕾细胞中一样, 行使味觉感受的功能, 电生理技术表明肠道中多种营养物质刺激(包括氨基酸、碳水化合物及脂类等)能够激活迷走神经的传入神经. 肠道内分泌细胞因其具有双极化细胞特点及顶端微纤毛特征, 而被研究者认为是肠道中的化学感受细胞, 而且与口腔味觉受体细胞相似, 肠道内分泌细胞中也具有充满激素和神经递质的颗粒, 因此被称为肠道味觉细胞或者肠道味觉样细胞^[1-5]. 除了内分泌细胞外, 肠道内还存在一种拥有味觉样细胞特点的刷状细胞, 免疫组

收稿日期: 2014-02-24.

基金项目: 国家自然科学基金(NSFC31200812)、江苏省高校自然科学基金(12KJB180001)、江苏省高校“青蓝工程”基金.

通讯联系人: 张根华, 博士, 教授, 研究方向: 食品感官科学. E-mail: zgh@csig.edu.cn

化结果表明该细胞具有与口腔味蕾细胞相似的化学感觉特征,表达有口腔甜、苦味感受的 $G\alpha$ -gustducin 和 TRMP5 通道蛋白^[6-8]. 雌激素可以通过影响甜味感知能力而改变人们对碳水化合物的摄取,雌激素代谢异常与甜味偏好紧密相连,绝经后女性饮食习惯的变化与肥胖、糖尿病、心血管疾病的发生密切相关^[9-12]. 关于雌激素影响甜味感知,尤其是对肠道中相关味觉蛋白表达的研究,目前仍然比较缺乏. 为初步探讨雌激素对小鼠肠道甜味感知的影响,本实验以行双侧卵巢切除术的 C57BL/6 小鼠为动物模型,初步探究雌激素对小鼠摄食、体重、十二指肠和空肠中甜味信号传导相关的关键分子 (T1R2/T1R3、 $G\alpha$ -gustducin、PLC β 2 和 TRPM5) 表达的影响,为进一步分析雌激素对味觉感知关系的研究提供理论基础.

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级健康的 7 周龄雌性 C57BL/6 小鼠,体重 17 g~21 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司. 小鼠在温度为(22±1)℃,湿度为 50%,照明时间为光照 12 h:黑暗 12 h 交替循环的动物房中单笼饲养,自由饮用去离子水和食物.

1.2 动物分组

小鼠在动物房适应性喂养 1 周之后,按体重平均分为 6 组:对照组 (Control)、双侧卵巢切除术 (Ovx) 1 周组、Ovx 2 周组、Ovx 4 周组、Ovx 6 周组和 Ovx 8 周组 (平均体重=(19.1±0.2)g, $n=13$). 小鼠在戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔注射麻醉下行双侧卵巢切除术,卵巢切除后的小鼠单笼饲养.

1.3 组织的取材

按照实验分组时间的不同,饲养结束后的小鼠断颈处死,采集小鼠的血液并提取小鼠相应的肠道组织,实验期间每周对小鼠进行称重并记录.

1.4 统计学分析

采用数据分析软件 Origin7 分析记录数据并绘图,所有数据以 (平均值±标准误) (Mean±SEM) 表示. 对照组与实验组小鼠体重之间的显著性比较采用成对 T 检验 (paired t -test),其他数据用 ANOVA 进行分析处理. 以 $P<0.05$ 定义为差异有统计学意义.

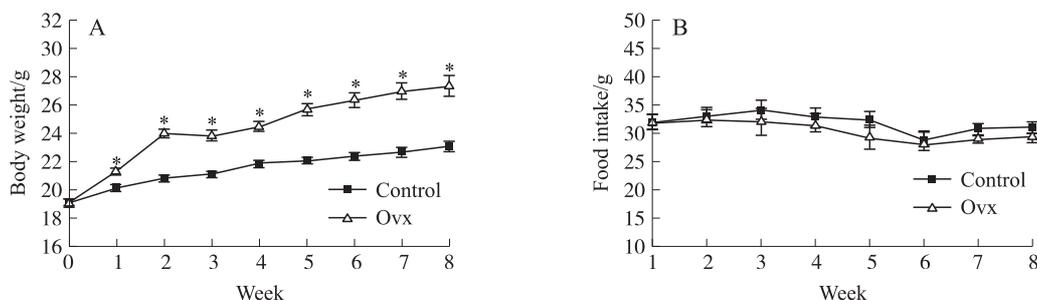
2 结果与分析

2.1 血液中 17 β -雌二醇 (E_2) 含量的测定

使用 17 β -Estradiol high sensitivity ELISA kit (Enzo Life Sciences) 检测小鼠血液中 E_2 的含量,发现对照组小鼠血液中 E_2 含量明显高于 Ovx 2 周组 ((20.6±4.6)pg/mL; (5.8±2.6)pg/mL, $P<0.05$),表明 Ovx 2 周之后成功抑制了小鼠内源性雌激素的产生,之后又进一步检测了小鼠体重与摄食的变化.

2.2 雌激素对对照组与实验组小鼠体重与摄食的影响

体重与饮食作为小鼠生理健康状况的一个重要指标,在整个实验过程中检测了小鼠体重与食物摄入量的变化. 图 1A 表示 8~16 周对照组与实验组小鼠体重的变化,图 1B 表示对照组与实验组小鼠摄食的变化情



A: 对照组与实验组小鼠每周体重的变化. * 表示对照小鼠的体重显著低于实验组, $+P<0.05$, $*P<0.005$. B: 对照组与实验组小鼠每周食物摄入量的变化. 以上数据以 (平均值±标准误) 形式表示, $n=13$

图 1 对照组与实验组小鼠体重及饮食的变化情况

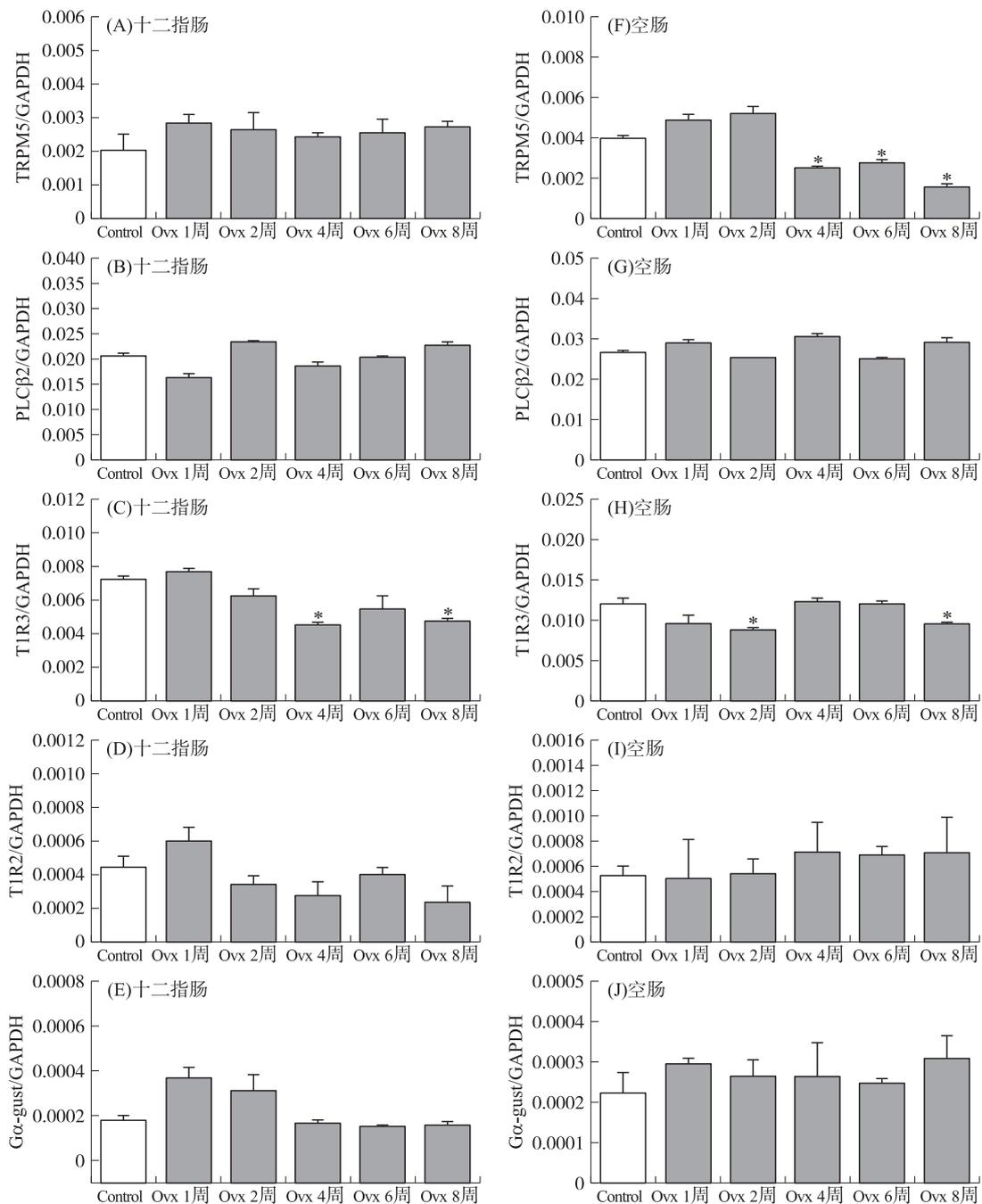
Fig.1 Changes in control and experimental groups of mice body weight and diet

况. 从图 1A 中可以看出, 对照组和实验组小鼠在实验过程中体重均呈线性方式增长, 实验组小鼠体重增加显著性大于对照组小鼠, 在 16 周时对照组小鼠与实验组小鼠体重分别为 $(23.11 \pm 0.37) \text{g}$ 和 $(27.34 \pm 0.73) \text{g}$. 在图 1B 中可以看到对照组与实验组小鼠在饮食上没有显著性差异. 这些数据表明, 与对照组小鼠相比, 实验组小鼠体内雌激素含量显著性降低, 而且体重显著性增加, 雌激素缺乏模型制备成功. 之后采用 qRT-PCR 和 Western blot 技术分析雌激素对小鼠十二指肠和空肠甜味传导相关受体蛋白表达的影响.

2.3 雌激素对肠道甜味信号传导相关分子表达的影响

分别提取对照组和各实验组小鼠的十二指肠和空肠组织, 进一步做实时荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹实验, 从分子和蛋白质水平检测雌激素对肠道内甜味相关受体蛋白表达的影响.

图 2 表示使用 qRT-PCR 方法得到的对照组与实验组小鼠十二指肠和空肠中甜味相关基因 mRNA 表

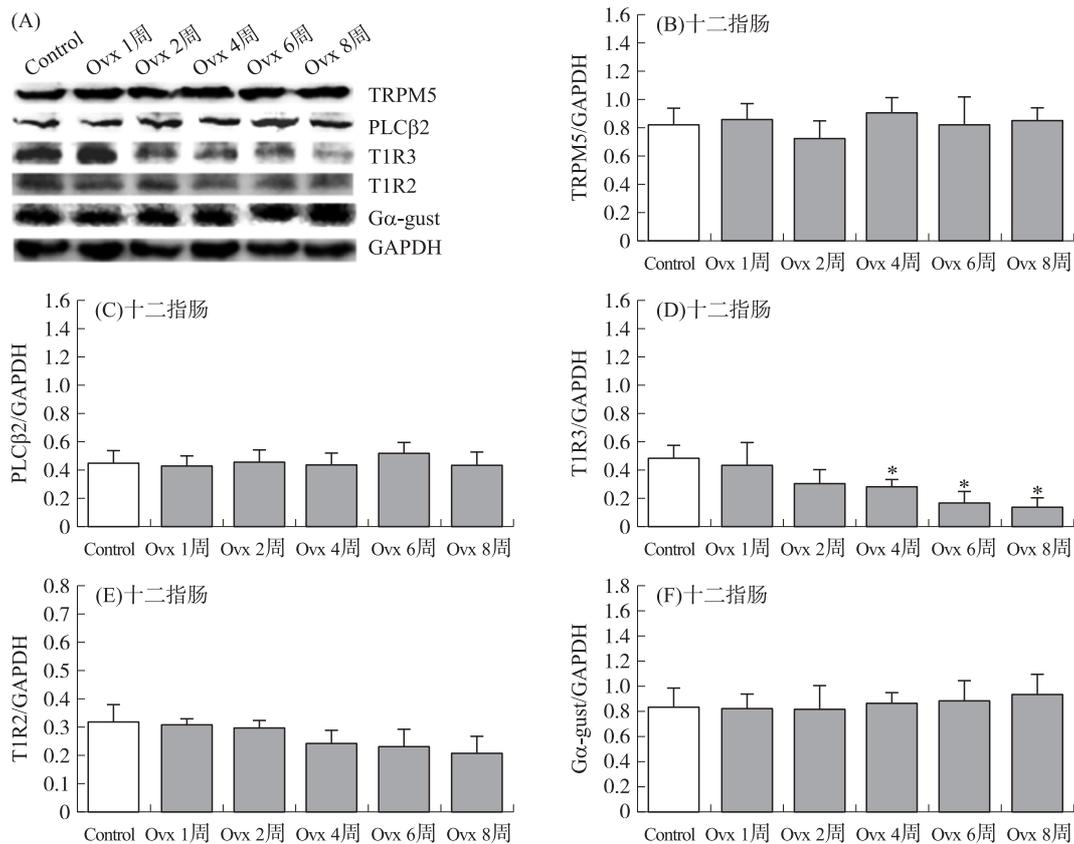


以上数据以(平均值±标准误)形式表示, * 各实验组与对照组比较 $P < 0.05, n = 13$

图 2 对照组与实验组小鼠十二指肠和空肠甜味相关基因 mRNA 表达量变化情况

Fig.2 The sweet taste interrelated genes mRNA expression levels in Duodenum and jejunum of control and experimental groups mice

达量的变化. A~E 分别为味觉信号传导基因 TRPM5、PLC β 2、T1R3、T1R2 以及 G α -gustducin 在十二指肠内 mRNA 表达量的变化情况. F~J 为相应的基因在空肠内 mRNA 的表达量. 从图中可以看出 Ovx 4 周和 Ovx 8 周组 T1R3 在十二指肠中 mRNA 表达量显著低于对照组(图 2C), Ovx 2 周和 Ovx 8 周组 T1R2 在空肠中 mRNA 表达量显著低于对照组(图 2H), 在切除卵巢 4 周之后空肠内 TRPM5 mRNA 表达量与对照组相比显著降低(图 2F). 图 3、4 分别表示使用 Western Blot 方法得到甜味相关基因在小鼠十二指肠和空肠中蛋白表达量的情况. B、C、D、E、F 是对相应组织蛋白 Western blot 进行定量分析的结果. 从图中可以看出在十二指肠中切除卵巢 4 周之后 T1R3 蛋白表达量与对照组相比显著降低(图 3D). 在空肠中实验组 T1R3 蛋白表达量与对照组相比有降低的趋势, 而其他甜味相关基因的蛋白表达量在十二指肠和空肠中对对照组与实验组之间没有显著性差异.



以上数据以(平均值 \pm 标准误)形式表示, * 各实验组与对照组比较 $P < 0.05$, $n = 13$

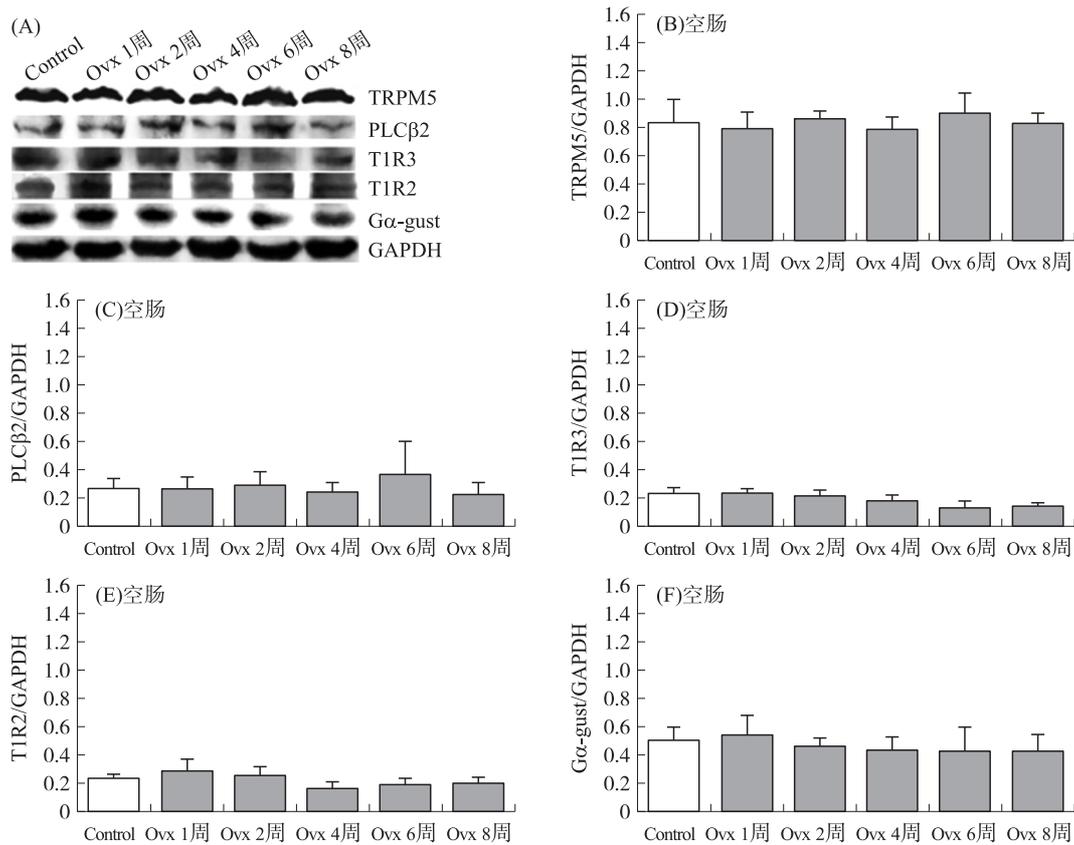
图 3 对照组与实验组小鼠十二指肠甜味相关基因蛋白表达量变化情况

Fig.3 The sweet taste interrelated genes protein expression levels in Duodenum of control and experimental groups mice

综上所述, 雌激素缺失之后小鼠体重显著性增加, 下调部分甜味相关基因在小鼠十二指肠和空肠内的表达量, 尤其是十二指肠内 T1R3 在分子和蛋白方面的表达量均有显著性降低. 该结果可能暗示雌激素缺失会影响肠道内的甜味感知, 对小鼠摄食的口后效应产生某些方面的影响.

3 讨论

甜味是人类和很多动物天生所喜爱和偏好的味道之一, 不仅赋予食物愉悦的口感, 而且还赋予食物丰富的能量, 是动物食物的重要组成部分. 雌激素作为一种内源性激素表现出的对甜味感知能力的影响已经受到关注^[13,14], 但雌激素与肠道味觉感知是否也有联系, 是否对肠道中相关味觉基因的表达产生影响尚未见相关报道. 本实验采用去除卵巢的 C57BL/6 小鼠模型, 观察雌激素对小鼠体重、摄食及肠道内甜味相关基因表达的影响, 探讨雌激素影响肠道甜味感知的分子机制. 实验结果显示, 去除雌激素后小鼠体重显著性增加, 肠道内甜味传导相关的信号分子发生了一些变化. 虽然甜味信号传导中的关键分子 G α -gustducin 的表达并没有发生明显的变化, 但是甜味受体分子 T1R3 在 mRNA 和蛋白水平表达降低, 十二指肠



以上数据以平均值±标准误形式表示, * 各实验组与对照组比较 $P < 0.05, n = 13$

图 4 对照组与实验组小鼠空肠甜味相关基因蛋白表达量变化情况

Fig.4 The sweet taste interrelated genes protein expression levels in jejunum of control and experimental groups mice

中 T1R2 在 mRNA 和蛋白水平上表达量也有下降的趋势,在空肠中 TRPM5 在 mRNA 水平表达量降低,但蛋白水平上并没有显著性变化.

卵巢切除后的小鼠子宫由于缺乏雌激素的作用,动情周期消失. 本研究中,在卵巢切除后小鼠体重明显增加,与对照组比较差异显著. 虽然小鼠体重增加,但食物的摄入量并没有发生显著变化,主要是由于腹部脂肪大量堆积造成,提示雌激素的缺乏影响了机体脂肪代谢,研究认为,雌激素可以改变脂肪细胞的形态,抑制脂肪细胞肥大,同时影响血浆脂蛋白的产生与清除,可以降低总胆固醇和增加高密度脂蛋白胆固醇,也可以增加血浆甘油三酯和极低密度脂蛋白的产生^[15-17]. 肠道一直被认为是食物消化和吸收的器官,而对于肠道的化学感受即人们如何感知肠道中的化合物,进而调控食欲和控制摄食量,所知甚少. 近几年的研究表明,肠道不仅仅是消化和吸收的器官,同时也是味觉感受器官,动物肠道的粘膜上存在着表达味觉受体和味觉相关因子的细胞,调控着多种肠道激素的分泌以及葡萄糖转运体 SGLT-1 和 GLUT-2 的表达. 甜味剂的刺激可以影响这些激素的分泌及载体的表达,从而影响机体对葡萄糖的吸收和利用. 研究也发现,各种味觉物质受体在顶端微绒毛处含量最为丰富,这与小肠上刷细胞相似. 而实际上研究者发现小肠刷细胞上也表达各种味觉传导信号,在一定程度上发挥着小肠中味觉物质的化学感知功能^[1,6,7]. 肠道味觉的研究有助于解释肠道消化吸收功能的调控机理,同时也为糖尿病、肥胖、代谢失调及其他饮食相关疾病的治疗提供新的切入点^[1-4]. 甜味主要由味觉受体第一家族成员 T1R2、T1R3 构成的异源二聚体来感受^[18-20]. 甜味、鲜味受体除了存在于各种动物舌面和软腭味蕾中外,近年来的研究表明,T1Rs 成员在小鼠和人类的胃、小肠、结肠及内分泌细胞中也有表达,利用基因敲除小鼠和体外内分泌细胞模型 GLUTag、STC-1、NCI-H716 细胞,研究者证明甜味受体 T1R2/T1R3 在肠道甜味感受及葡萄糖动态平衡调节中的作用,肠道内甜味物质通过与肠道内分泌细胞顶端的甜味受体相互作用,促进肠道激素的释放^[21-25]. 当甜味物质与甜味受体结合后,激活异源三聚体 G 蛋白 gustducin 或 $G\alpha_{12}$,导致 $G\beta\gamma$ 亚单位释放进而激活 PLCβ2,PLCβ2 水解磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸产生两种细胞内信使三磷酸肌醇(IP_3)或二脂酰甘油

(DAG),最终导致味觉诱导通道顺势受体蛋白 TRPM5 打开.而且这些相应蛋白 gustducin^[26]、PLCβ2^[27]、TRPM5^[28]的基因敲除型小鼠对甜、鲜、苦味感知能力的丧失或大幅度减弱,充分证明它们在上述味觉感受中的作用. TRPM5 在胃肠道的内分泌细胞和刷细胞^[29],以及胰岛 β 细胞中也有表达^[30].而且免疫共定位实验证明 Gα-gustducin、PLCβ2、TRPM5 与甜味受体 T1R2/T1R3 在味蕾中存在共表达,说明上述蛋白同甜味受体一起共同参与了甜味物质的感受与传导.在本实验中,缺乏雌激素的小鼠肠道内 T1R3、T1R2 和 TRPM5 表达量的降低可能导致机体对甜味剂刺激的感受度降低,进而影响肠道相关激素的分泌及葡萄糖转运体的表达,造成小鼠需要摄入更多的甜味物质才能达到对甜味的感知,过多甜味物质的摄入又影响了机体的糖类代谢,使小鼠腹腔内堆积了大量的脂肪,导致体重显著增加.雌激素的缺失使十二指肠内 T1R3 的表达量在卵巢切除一段时间后开始有显著性变化,或许是因为需要一个时间积累的效应.另外,除 T1R3 外,其他与甜味相关的基因表达量并没有显著性的变化,可能是在肠道内 T1R3 基因与甜味的传导最为密切;另一方面,卵巢去除后,其他相关激素——例如肾上腺素、甲状腺素和其他固醇类激素对雌激素的缺失可能会起到补偿作用,使甜味传导的相关基因表达量没有显著性的变化.但是关于这些改变的相关性还有待于进一步探究.

4 结论

本研究成功构建了双侧卵巢切除小鼠模型,初步探讨了小鼠实验性卵巢切除对肠道甜味传导相关的信号分子表达的影响,结果显示卵巢切除的小鼠体重显著性增加,并且降低了十二指肠内 T1R3 在分子和蛋白水平上的表达,对 T1R2 和空肠内 TRPM5 在分子水平上的表达也产生了抑制作用,预示雌激素在小鼠肠道味觉中起着重要的作用,为今后使用该模型及类似研究方法提供了实验参考依据.

[参考文献]

- [1] McLaughlin S K,McKinnon P J,Margolskee R F. Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins[J]. *Nature*,1992,357(6 379):563-569.
- [2] Busque S M,Kerstetter J E,Geibel J P,et al. L-type amino acids stimulate gastric acid secretion by activation of the calcium-sensing receptor in parietal cells[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*,2005,289(4):G664-G669.
- [3] Hira T,Nakajima S,Eto Y,et al. Calcium-sensing receptor mediates phenylalanine-induced cholecystokinin secretion in enteroendocrine STC-1 cells[J]. *Febs J*,2008,275(18):4 620-4 626.
- [4] Dyer J,Salmon K S,Zibrik L,et al. Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells[J]. *Biochem Soc Trans*,2005,33(Pt 1):302-305.
- [5] Bezencon C,le Coutre J,Damak S. Taste-signaling proteins are coexpressed in solitary intestinal epithelial cells[J]. *Chem Senses*,2007,32(1):41-49.
- [6] Hofer D,Puschel B,Drenckhahn D. Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alpha-gustducin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1996,93(13):6 631-6 634.
- [7] Hass N,Schwarzenbacher K,Breer H. A cluster of gustducin-expressing cells in the mouse stomach associated with two distinct populations of enteroendocrine cells[J]. *Histochem Cell Biol*,2007,128(5):457-471.
- [8] Bezencon C,Furholz A,Raymond F,et al. Murine intestinal cells expressing Trpm5 are mostly brush cells and express markers of neuronal and inflammatory cells[J]. *J Comp Neurol*,2008,509(5):514-525.
- [9] Carr D B,Utzschneider K M,Hull R L,et al. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome[J]. *Diabetes*,2004,53(8):2 087-2 094.
- [10] Ferrara C M,Lynch N A,Nicklas B J,et al. Differences in adipose tissue metabolism between postmenopausal and perimenopausal women[J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2002,87(9):4 166-4 170.
- [11] Tchernof A,Despres J P. Sex steroid hormones, sex hormone-binding globulin, and obesity in men and women[J]. *Horm Metab Res*,2000,32(11/12):526-536.
- [12] dos Reis C M,de Melo N R,Meirelles E S,et al. Body composition,visceral fat distribution and fat oxidation in postmenopausal women using oral or transdermal oestrogen[J]. *Maturitas*,2003,46(1):59-68.
- [13] Curtis K S,Stratford J M,Contreras R J. Estrogen increases the taste threshold for sucrose in rats[J]. *Physiol Behav*,2005,

- 86(3):281-286.
- [14] Frye C A, Crystal S, Ward K D, et al. Menstrual cycle and dietary restraint influence taste preferences in young women[J]. *Physiol Behav*, 1994, 55(3):561-567.
- [15] Carey D G, Jenkins A B, Campbell L V, et al. Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women; direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM[J]. *Diabetes*, 1996, 45(5):633-638.
- [16] Naaz A, Zakroczymski M, Heine P, et al. Effect of ovariectomy on adipose tissue of mice in the absence of estrogen receptor alpha (ERalpha); a potential role for estrogen receptor beta (ERbeta) [J]. *Horm Metab Res*, 2002, 34(11/12):758-763.
- [17] Stubbins R E, Holcomb V B, Hong J, et al. Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance[J]. *Eur J Nutr*, 2012, 51(7):861-870.
- [18] Nelson G, Hoon M A, Chandrashekar J, et al. Mammalian sweet taste receptors[J]. *Cell*, 2001, 106(3):381-390.
- [19] Li X, Staszewski L, Xu H, et al. Human receptors for sweet and umami taste[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(7):4692-4696.
- [20] Adler E, Hoon M A, Mueller K L, et al. A novel family of mammalian taste receptors[J]. *Cell*, 2000, 100(6):693-702.
- [21] Mace O J, Affleck J, Patel N, et al. Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2[J]. *J Physiol*, 2007, 582(Pt 1):379-392.
- [22] Mace O J, Lister N, Morgan E, et al. An energy supply network of nutrient absorption coordinated by calcium and T1R taste receptors in rat small intestine[J]. *J Physiol*, 2009, 587(Pt 1):195-210.
- [23] Le Gall M, Tobin V, Stolarczyk E, et al. Sugar sensing by enterocytes combines polarity, membrane bound detectors and sugar metabolism[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213(3):834-843.
- [24] Jang H J, Kokrashvili Z, Theodorakis M J, et al. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(38):15069-15074.
- [25] Margolskee R F, Dyer J, Kokrashvili Z, et al. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(38):15075-15080.
- [26] Wong G T, Gannon K S, Margolskee R F. Transduction of bitter and sweet taste by gustducin[J]. *Nature*, 1996, 381(6585):796-800.
- [27] Dotson C D, Roper S D, Spector A C. PLCbeta2-independent behavioral avoidance of prototypical bitter-tasting ligands[J]. *Chem Senses*, 2005, 30(7):593-600.
- [28] Damak S, Rong M, Yasumatsu K, et al. Trpm5 null mice respond to bitter, sweet, and umami compounds[J]. *Chem Senses*, 2006, 31(3):253-264.
- [29] Glendinning J I, Bloom L D, Onishi M, et al. Contribution of alpha-gustducin to taste-guided licking responses of mice[J]. *Chem Senses*, 2005, 30(4):299-316.
- [30] Brixel L R, Monteilh-Zoller M K, Ingenbrandt C S, et al. TRPM5 regulates glucose-stimulated insulin secretion[J]. *Pflugers Arch*, 2010, 460(1):69-76.

[责任编辑:黄敏]