

[文章编号] 1000-4718(2006)07-1311-05

高脂高胆固醇膳食对小鼠 PPAR α 基因表达及机体胆固醇水平的影响

李燕¹, 凌文华²¹ 广州市疾病预防控制中心艾滋病防治科, 广东 广州 510080;² 中山大学北校区公共卫生学院营养系, 广东 广州 510089)

[摘要] 目的: 探讨高脂高胆固醇膳食对肝脏 PPAR α 基因表达及机体胆固醇水平的影响。方法: 7-8 周龄健康 C57 小鼠 75 只, 随机分为 5 组, 分别饲以相应配方饲料。结果: 与胆固醇膳食 (Chol) 相比, 胆固醇 + 多不饱和脂肪酸膳食 (Chol + PUFA) 可增加 ($P < 0.01$) 小鼠血清总胆固醇 (TC), 增加的部分主要集中在 HDL-C, 降低肝脏胆固醇含量 ($P < 0.01$); 胆固醇 + 单不饱和脂肪酸膳食 (Chol + MUFA) 小鼠血清 TC 不变, 肝脏胆固醇含量降低 ($P < 0.01$); 胆固醇 + 饱和脂肪酸 (Chol + SFA) 膳食可明显增加 ($P < 0.01$) 小鼠血清 TC, 增加的部分主要集中在 LDL-C, 增加肝脏胆固醇含量 ($P < 0.01$); 此外, Chol + PUFA 膳食组小鼠肝脏 PPAR α mRNA 和蛋白表达均高于 Chol 组 ($P < 0.01$), Chol + MUFA 和 Chol + SFA 膳食组小鼠肝脏 PPAR α mRNA 表达均明显低于 Chol 组 ($P < 0.01$)。结论: 在胆固醇基础上添加 PUFA 可诱导 PPAR α mRNA 和蛋白的高表达, 添加 MUFA、SFA 则抑制 PPAR α mRNA 的表达; PPAR α 基因表达的改变可能进一步影响机体胆固醇水平。

[关键词] 胆固醇; 脂肪酸类; 基因, PPAR α **[中图分类号]** R151.2**[文献标识码]** A

Effect of diet with high fats and cholesterol on PPAR α gene expression and body cholesterol level in mice

LI Yan¹, LING Wen-hua²¹ Department of AIDS Prevention, The Guangzhou Center of Disease Control, Guangzhou 510080, China; ² Department of Nutriology, College of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effects of dietary fats and cholesterol on liver PPAR α gene expression and body cholesterol (Chol) level in C57BL/6J mice. **METHODS:** The animals ($n = 75$) were randomly divided into five groups and respectively received formula mash for 6 weeks. **RESULTS:** As compared to Chol diet, Chol + PUFA diet produced significantly higher liver cholesterol ($P < 0.01$), serum total cholesterol (TC), focusing on HDL-C. While Chol + MUFA diet resulted in unchanged serum TC and lower liver cholesterol ($P < 0.01$). Chol + SFA diet resulted in higher liver cholesterol ($P < 0.01$) and serum TC, focusing on LDL-C. Furthermore, Chol + PUFA diet increased the mRNA and protein content of PPAR α ($P < 0.01$) in liver, while Chol + MUFA and Chol + SFA diets decreased the mRNA content of PPAR α significantly ($P < 0.01$). **CONCLUSIONS:** These results indicated that addition of fats containing PUFA to diet high in cholesterol increased PPAR α mRNA and protein expression, addition of fats containing MUFA or SFA to diet high in cholesterol decreased PPAR α mRNA expression. The change of PPAR α gene expression may further affect body cholesterol level.

[KEY WORDS] Cholesterol; Fatty acids; Genes, PPAR α

PPAR (peroxisome proliferators activate receptor) 是甾体激素受体超家族的成员, 能被脂肪酸及其代谢产物以及外源性过氧化酶体增殖剂 (peroxisome proliferators, PP) 激活, 进而调控一些参与脂类代谢的酶的基因表达, 并在脂质代谢过程中起着重要作用。在 PPAR 的几种亚型中, PPAR α 是肝中 PPAR

的主要形式, PPAR α 和维甲酸氧甾醇受体 (retinoid X receptor α , RXR α) 组成异源二聚体, 在脂类代谢调节中起着枢纽作用。有研究表明链长 $n > 6$ 的脂肪酸如亚油酸在生理浓度都可激活 PPAR α ^[1]。此外, 体外实验表明 PPAR α 参与胆固醇代谢过程中的关键酶 CYP7A1 (cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7A1) 的

调节,进而影响胆固醇的内稳态^[2]。也就是说作为脂质和脂蛋白的调节物,PPAR α 可调控血浆胆固醇和甘油三酯水平。那么当膳食中同时富含胆固醇和不同类型脂肪酸时,PPAR α 的表达会怎么样呢?本研究用C57小鼠作为动物模型,探讨在高胆固醇膳食基础上添加富含不同类型脂肪酸的脂类对PPAR α 基因表达的影响以及PPAR α 基因表达的改变对机体胆固醇水平的影响。

材 料 和 方 法

1 实验动物及饲料

7-8周龄健康C57小鼠75只(中山大学北校区实验动物中心提供),随机分为5组,分别饲以相应配方饲料。第一组饲以AIN-93G配方饲料(basic control, BC)^[3],第二组饲以含10 g/kg胆固醇的AIN-93G修改的配方饲料(cholesterol, Chol),第三组饲以含10 g/kg胆固醇和140 g/kg富含多不饱和脂肪酸的红色油的AIN-93G修改的配方饲料(cholesterol + polyunsaturated fatty acid, Chol + PUFA),第4组饲以含10 g/kg胆固醇和140 g/kg富含单不饱和脂肪酸的橄榄油的AIN-93G修改的配方饲料(cholesterol + monounsaturated fatty acid, Chol + MUFA),第5组饲以含10 g/kg胆固醇和140 g/kg饱和脂肪酸(C 14:0)的AIN-93G修改的配方饲料(cholesterol + saturated fatty acid, Chol + SFA)。Chol + PUFA、Chol + MUFA、Chol + SFA组饲料均添加10 g/kg的亚麻籽油以避免n-3系列必需脂肪酸的缺乏,脂类供能占总能量构成比在后3组均为32.75%。小鼠自由摄食,饮高压消毒自来水。每3 d记录1次进食量,每周称体重,共计喂养6周,实验期满,眼眶取血后,脱颈椎处死小鼠。

2 血脂水平测定

自小鼠眼眶静脉采血后,分离血清,-20℃保存待测。总胆固醇(total cholesterol, TC)采用CHOD-PAP酶法。低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)采用直接法(酶法)。用日立7060全自动生化分析仪进行分析测定,并计算LDL-C/HDL-C比值。

3 肝脏胆固醇的抽提及测定^[4,5]

取各组小鼠新鲜肝脏。将肝脏置烤箱中烘干(温度110℃,时间为11h),用电子天平称取干重肝组织约300mg,研钵内磨碎,用氯仿:甲醇溶液(2:1)洗涤,滤纸过滤,最后定容至25mL。肝组织胆固醇含量用硫磷铁法测定。

4 PPAR α mRNA 表达水平的检测

采用RT-PCR(逆转录多聚酶链反应)方法检

表1 小鼠的饲料配方:根据AIN-93G修改的配方饲料

Tab 1 Dietary formulation of mice in different dietary groups (based on AIN-93G)

Ingredient (g/kg)	Group				
	BC	Chol	Chol + PUFA	Chol + MUFA	Chol + SFA
Cornstarch	397.486	383.278	269.618	269.618	269.618
Casein	200	200	200	200	200
Dextrinized cornstarch	132	127	89	89	89
Sucrose	100	96	68	68	68
Soybean oil	70	70	-	-	-
Safflower oil	-	-	140	-	-
Olive oil	-	-	-	140	-
Myristic acid	-	-	-	-	140
Linseed oil	-	-	10	10	10
Cholesterol	-	10	10	10	10
Fiber	50	50	50	50	50
Mineralmixture (AIN-93G-MX)	35	35	35	35	35
Vitaminmixture (AIN-93-VX)	10	10	10	10	10
L-cysteine	3	3	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Tert-butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014

测PPAR α mRNA表达。(1)用经典RNA提取法试剂盒(上海,生工)提取细胞总RNA,将RNA溶于DEPC(diethyl pyrocarbonate)水中,紫外分光光度计测A₂₆₀/A₂₈₀。(2)用MMLV第一链cDNA合成试剂盒(上海,生工)合成第一链。(3)PCR引物设计:PPAR α 引物序列:上游5'-CCTGGAAAGTCCCT-TATCT-3',下游5'-GCCCTTACAGCCTTCACAT-3'。产物大小319bp。内对照 β -actin引物序列:上游5'-GGACTCCTATGTGGGTGACGAGG-3',下游5'-GGGAGAGCATAGCCCTCCTAGAT-3',产物大小366bp。PCR反应体系为:10×PCR缓冲液2.5μL,4种dNTP混合液2.5μL,25mmol MgCl₂1.5μL,上游及下游引物各1.4μmol/L,逆转录产物1μL,Tag酶2U,灭菌水补足至25μL。PPAR α 反应条件为:94℃预变性4min。扩循环为:94℃变性30s,56℃退火45s,72℃延伸45s,循环35次。72℃延伸10min。 β -actin反应条件为:94℃预变性4min,扩循环为:94℃变性30s,68℃退火45s,72℃延伸45s,循环35次。72℃延伸10min。PCR产物于2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,应用Bio2RadVDS图像系统测定吸光度值,以PPAR α 与 β -actin吸光度比值作为PPAR α mRNA相对定量表达水平。

5 PPAR α 蛋白表达的检测^[6]

蛋白杂交(Western blotting)法测定PPAR α 蛋白表达。提取肝脏核蛋白,考马斯亮蓝法测定总蛋白浓度。Western blotting:10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分

离蛋白。电转膜法将蛋白转移到 PVDF 膜上,封闭,杂交,1:600 兔 IgG 多克隆抗体(Santa Cluz Biotechnology, Santa Cluz, USA)及 1:8 000 相应的羊抗兔 IgG II 抗(Santa Cluz Biotechnology, Santa Cluz, USA)杂交,化学发光反应,X 光片压片曝光,凝胶成像系统测定积分吸光度值分析结果。

6 统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件包建立数据库,并进行统计分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组均数进行方差齐性检验(homogeneity of variances)(方差不齐时,可经变量变换达到齐性)和单因素方差分析(One-way ANOVA);各组间的两两比较采用 SNK 法。

结 果

1 小鼠一般情况

在实验动物喂养的 6 周期间,5 个组小鼠的体重均有增长的趋势。结束时的平均体重,BC 组小鼠低于其余几组($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 各组动物膳食摄入及体重变化

Tab 2 Food intake and weight variation in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Group	Food intake (g/d)	Weight at the beginning(g)	Final weight (g)
BC	2.42 ± 0.64	16.98 ± 0.73	20.39 ± 0.89
Chol	2.54 ± 0.35	17.43 ± 1.02	21.95 ± 1.03*
Chol + PUFA	2.62 ± 0.33	17.62 ± 0.87	21.45 ± 0.92*
Chol + MUFA	2.47 ± 0.41	17.12 ± 0.75	21.65 ± 0.97*
Chol + SFA	2.23 ± 0.31	17.01 ± 0.97	21.79 ± 1.20*

* $P < 0.01$ vs BC group.

2 血脂水平

在胆固醇基础上添加不同类型脂肪酸血脂变化有很大不同。Chol + PUFA 组小鼠血清 LDL - C/HDL - C 比 Chol 组降低 30% ($P < 0.01$), LDL - C 不变,但 TC 高 27% ($P < 0.01$), HDL - C 高 44% ($P < 0.01$); Chol + MUFA 组小鼠血清 HDL - C 比 Chol 组低 12% ($P < 0.01$), LDL - C/HDL - C 高 21% ($P < 0.01$), TC、LDL - C 不变; Chol + SFA 组小鼠血清 TC、LDL - C 和 LDL - C/HDL - C 分别比 Chol 组增加 56%、150%、120% ($P < 0.01$), HDL - C 不变。Chol + PUFA 组小鼠血清 LDL - C 分别明显低于、HDL - C 分别明显高于 Chol + MUFA、Chol + SFA 组小鼠。见表 3。

3 肝脏胆固醇含量

各组小鼠肝脏胆固醇含量均明显高于 BC 组 ($P < 0.01$)。在胆固醇膳食基础上添加不同类型脂肪酸小鼠肝脏胆固醇含量变化有很大不同。Chol +

PUFA 组和 Chol + MUFA 组小鼠肝脏胆固醇含量比 Chol 组分别低 40% 和 25% ($P < 0.01$); Chol + SFA 组比 Chol 组高近 2 倍 ($P < 0.01$), 见图 1。

表 3 不同实验组小鼠血脂水平

Tab 3 Serum lipid concentrations in mice fed with different diets ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Group	TC (mmol/L)	LDL - C (mmol/L)	HDL - C (mmol/L)	LDL - C/HDL - C
BC	2.43 ± 0.11	0.35 ± 0.04	1.81 ± 0.11	0.20 ± 0.02
Chol	3.24 ± 0.09	0.59 ± 0.02	1.80 ± 0.07	0.33 ± 0.01
Chol + PUFA	4.11 ± 0.14 [△]	0.58 ± 0.02	2.59 ± 0.12 [△]	0.23 ± 0.01 [△]
Chol + MUFA	3.26 ± 0.20*	0.63 ± 0.02 ^{△*}	1.58 ± 0.07 ^{△*}	0.40 ± 0.02 ^{△*}
Chol + SFA	5.04 ± 0.14 ^{△*}	1.48 ± 0.05 ^{△*}	1.85 ± 0.06*	0.73 ± 0.02 ^{△*}

[△] $P < 0.01$ vs Chol group; * $P < 0.01$ vs Chol + PUFA group.

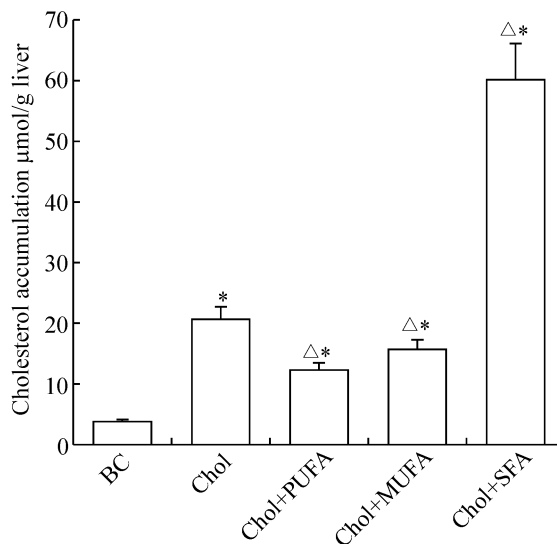


Fig 1 Cholesterol accumulation of mouse liver in different groups.

* $P < 0.01$ vs BC group; [△] $P < 0.01$ vs Chol group.

图 1 不同膳食组小鼠肝脏胆固醇含量

4 PPAR α mRNA 表达

单独添加胆固醇对 PPAR α mRNA 表达无影响。在胆固醇基础上添加不同类型脂肪酸, Chol + PUFA 组小鼠肝脏 PPAR α mRNA 表达高了 50% ($P < 0.01$); Chol + MUFA 和 Chol + SFA 组小鼠 PPAR α mRNA 表达分别低 78% 和 77% ($P < 0.01$), 见图 2。

5 PPAR α 蛋白的表达

单独添加胆固醇对 PPAR α 蛋白表达无影响。Chol + PUFA 组小鼠肝脏 PPAR α 蛋白表达比 Chol 组高 87% ($P < 0.01$); Chol + MUFA 和 Chol + SFA 组小鼠肝脏 PPAR α 蛋白表达无统计学差异, 见图 3。

讨 论

本研究显示,在胆固醇的基础上添加脂肪酸,血

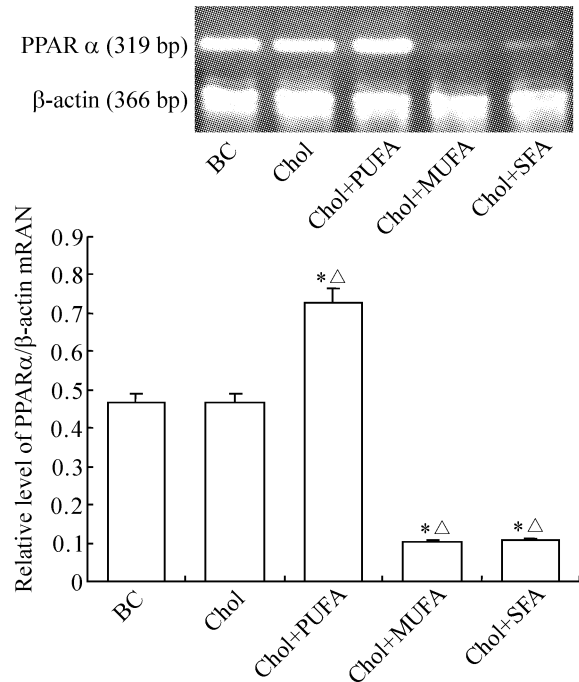


Fig 2 PPARα mRNA expression of mouse liver in different groups. * $P < 0.01$ vs BC group; $\Delta P < 0.01$ vs Chol group.

图2 不同膳食组小鼠肝脏 PPARα mRNA 的表达

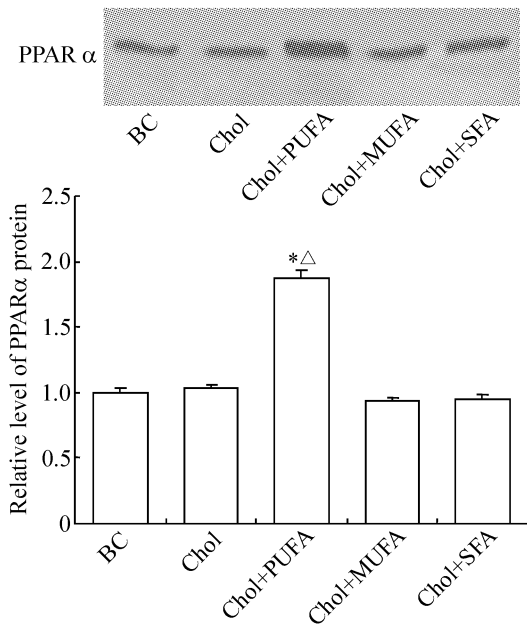


Fig 3 PPARα protein expression of mouse liver in different groups. * $P < 0.01$ vs BC group; $\Delta P < 0.01$ vs Chol group.

图3 不同膳食组小鼠肝脏 PPARα 蛋白的表达

清胆固醇和肝脏胆固醇的变化与脂肪酸的类型有关。LDL - C 的升高和 HDL - C 的下降以及肝脏胆固醇的堆积对心血管疾病都是不利因素,所以本实验结果与以往的研究基本一致,提示虽然不饱和脂肪酸对心血管疾病预防有积极意义,但要适量。

PPAR 属于核内受体家族,是甾体激素受体超家族的成员,PPAR 能被脂肪酸及其代谢产物以及外源性 PP 激活,进而调控参与脂类代谢的某些酶的基因表达并在脂质代谢过程中起着重要作用。PPAR 有多种亚型,主要有 PPARα、PPARβ(亦称 PPARδ)和 PPARγ,不同的亚型在组织分布和功能上都有明显差异。PPARα 是肝中 PPAR 的主要形式,PPARα 和 RXRα 组成异源二聚体,在脂类代谢调节中起着枢纽作用。

有研究表明生理浓度的链长 $n > 6$ 的脂肪酸,尤其是长链多不饱和脂肪酸,如亚油酸、花生四烯酸等都可激活 PPARα^[7]。PPARα 使人肝脂肪酸氧化/甘油酯化平衡趋向于分解代谢途径,从而降低甘油三酯,使 VLDL 合成减少,而达到抗高脂血症的作用。本研究发现,膳食中单独添加胆固醇并不影响 PPARα 基因的表达;在胆固醇膳食基础上进一步添加不同脂类,膳食脂肪酸可影响小鼠肝脏 PPARα 的基因表达,脂肪酸类型不同相应的效应也不同。膳食 PUFA 可诱导小鼠肝脏 PPARα mRNA 和蛋白的高表达;而与以往研究^[8,9]不同的是,膳食中 MUFA、SFA 可抑制 PPARα mRNA 的表达,PPARα 蛋白表达也降低,但无统计学差异。以上结果与以往的体外研究结果不一致表明:脂肪酸对 PPARα 表达的影响在体内外有较大差异;脂肪酸对 PPARα 表达的影响与脂肪酸负荷量、作用(喂养)时间等有关。此外, MUFA、SFA 可抑制 PPARα mRNA 的表达,但对 PPARα 蛋白表达未产生明显影响,原因可能是在 PPARα 蛋白表达过程中还有其它因素参与调节,也可能与喂养时间有关。

PPARα 除参与诱导脂质代谢的关键酶外,还参与许多脂蛋白的代谢,如 PPARα 能减少 Apo - A - III 基因表达,导致 LPL 活性增加,从而使血中富含胆固醇的脂蛋白如乳糜微粒及 VLDL 加速分解,进而降低富含胆固醇的 LDL - C 的水平^[10]。此外, PPARα 还能通过干预脂蛋白代谢而改变血浆中脂肪酸和胆固醇的转运。体外实验表明 PPARα 参与了胆固醇代谢过程中的关键酶 CYP7A1 的调节,进而影响胆固醇的内稳态^[2]; Chinetti 等^[11] 也发现, PPARα 的激活剂可诱导 ABC - 1 高表达,从而增加巨噬细胞胆固醇外流; Barbier 等^[12] 的研究还表明 PPARα 激活后通过促使胆汁酸的生成达到控制胆固醇代谢的目的。此外,以高胆固醇血症的豚鼠为动物模型的体内研究表明, PPARα 的激活可以降低 LDL - C、增加 HDL - C^[13]。本研究也表明, PPARα 高表达的 Chol + PUFA 组小鼠和 PPARα 低表达的

Chol + MUFA、Chol + SFA 组小鼠相比,Chol + PUFA 组小鼠血清 LDL - C 明显降低、HDL - C 明显升高,肝脏胆固醇含量也显著降低。综上所述,PPAR α 对脂肪酸胆固醇的代谢调控涉及到多个环节和多个其它中间物的参与,详细的机制需进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Zhu Y, Alvares K, Huang Q, et al. Cloning of a new member of the peroxisome proliferator - activated receptor gene family from mouse liver[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(36): 26817 - 26820.
- [2] Marrapodi M, Chiang JY. Peroxisome proliferator - activated receptor alpha (PPAR alpha) and agonist inhibit cholesterol 7 alpha - hydroxylase gene (CYP7A1) transcription[J]. *J Lipid Res*, 2000, 41(4): 514 - 520.
- [3] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 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.
- [4] 舒 晔,赵纪春,张明仪,等. 兔胆囊结石成石过程中脂质代谢的变化及高密度脂蛋白制剂对其影响的研究[J]. *华西医科大学学报*, 1999, 30(1): 64 - 67.
- [5] 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所编著. 食物营养成分测定法[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社,1991. 45 - 50.
- [6] Buttery LD, Springall DR, Chester AH, et al. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite[J]. *Lab Invest*, 1996, 75(1): 77 - 85.
- [7] Zhu Y, Alvares K, Huang Q, et al. Cloning of a new member of the peroxisome proliferator - activated receptor gene family from mouse liver[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(36): 26817 - 26820.
- [8] Endo A. Chemistry, biochemistry, and pharmacology of HMG - CoA reductase inhibitors[J]. *Klin Wochenschr*, 1988, 66(10): 421 - 427.
- [9] Cohen JC. Contribution of cholesterol 7alpha - hydroxylase to the regulation of lipoprotein metabolism[J]. *Curr Opin Lipidol*, 1999, 10(4): 303 - 307.
- [10] Auwerx J, Schoonjans K, Fruchart JC, et al. Transcriptional control of triglyceride metabolism: fibrates and fatty acids change the expression of the LPL and apo C - III genes by activating the nuclear receptor PPAR[J]. *Atherosclerosis*, 1996, 124(Suppl): S29 - S37.
- [11] Chinetti G, Lestavel S, Bocher, et al. PPAR - alpha and PPAR - gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway[J]. *Nat Med*, 2001, 7(1): 23 - 24.
- [12] Barbier O, Duran - Sandoval D, Pineda - Torra I, et al. Peroxisome proliferator - activated receptor alpha induces hepatic expression of the human bile acid glucuronidating UDP - glucuronosyltransferase 2B4 enzyme[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(35): 32852 - 32860.
- [13] Rimando AM, Nagmani R, Feller DR, et al. Pterostilbene, a new agonist for the peroxisome proliferator - activated receptor alpha - isoform, lowers plasma lipoproteins and cholesterol in hypercholesterolemic hamsters[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(9): 3403 - 3407.