

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2003)11-06-0498-03

# 大鼠过氧化体增殖物激活型受体 $\alpha$ 在衰老过程中表达差异及与脂质代谢的关系

王兆君, 叶平, 张秀锦

(中国人民解放军总医院老年心内科, 北京市 100853)

[关键词] 生理学; 过氧化体增殖物激活型受体  $\alpha$  在衰老过程中的表达差异; 逆转录-聚合酶链反应; 过氧化体增殖物激活型受体; 衰老; 脂质代谢; 动脉粥样硬化; 大鼠

[摘要] 观察过氧化体增殖物激活型受体  $\alpha$  在衰老过程中表达差异, 在分子水平上探讨衰老过程中出现脂质代谢异常的可能机制。选用SD年轻大鼠(6~8周龄)和老年大鼠(24月龄), 测定血清甘油三酯和总胆固醇水平, 采用逆转录-聚合酶链反应检测大鼠肝脏过氧化体增殖物激活型受体  $\alpha$  及其目标基因 mRNA 水平, 用 Western 印迹法检测过氧化体增殖物激活型受体蛋白的表达。结果发现, 与年轻鼠组比较, 老年鼠组血清甘油三酯和总胆固醇水平升高, 过氧化体增殖物激活型受体  $\alpha$  mRNA 及蛋白表达随年龄增长而减少, 目标基因的表达也受年龄的影响。结果提示, 衰老过程中过氧化体增殖物激活型受体  $\alpha$  表达减少可能与老年脂质代谢异常有关。

[中图分类号] Q4

[文献标识码] A

## The Difference Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\alpha$ during Aging and the Relation to Lipid Metabolism

WANG ZhaoJun, YE Ping, and ZHANG XiurJin

(Department of Geriatric Cardiology, General Hospital of People Liberation Army, Beijing 100853, China)

[KEY WORDS] Peroxisome Proliferator-Activated Receptor; Aging; Lipid Metabolism; Atherosclerosis; Rats; Triglyceride; Total Cholesterol

[ABSTRACT] **Aim** To investigate difference expression of peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  (PPAR  $\alpha$ ) during aging and explore the molecular mechanism of perturbation in lipid metabolism during aging. **Methods** We used two group SD rats to estimate the lipid level of young (6~8 weeks) and aged (24 months) groups. The levels of triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) were examined. The levels of liver PPAR  $\alpha$  and target genes mRNA were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and PPAR  $\alpha$  protein were determined by western blotting respectively. **Results** The TG and TC level of the aged group increased significantly. The PPAR  $\alpha$  mRNA and protein level of the aged group significantly decreased compared with the young group. Target gene levels were changed during aging. **Conclusion** The mechanism of lipid dysfunction during aging is probably associated with the decreased expression of PPAR  $\alpha$ .

衰老过程中常出现脂类代谢紊乱, 常表现为高甘油三酯血症。大量流行病学调查研究表明, 高甘油三酯血症是动脉粥样硬化和冠状动脉疾病发病的独立危险因素<sup>[1]</sup>。过氧化体增殖物激活型受体  $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , PPAR $\alpha$ ) 主要表达于肝脏、肾脏、心脏等脂肪氧化器官, 经配体贝特类调脂药激活后影响参与脂质代谢的基因的表达来调节脂质平衡。本文从 mRNA 和蛋白水平比较了年轻老鼠与老年老鼠肝脏组织 PPAR $\alpha$  表达的不同, 为探讨衰老对脂质代谢的影响提供分子依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

总 RNA 提取试剂、反转录试剂盒、DL2000 分子量核酸标准购自 Promega, PCR 试剂盒购自上海生工生物工程公司。羊抗 PPAR  $\alpha$  多抗、羊抗 actin 多抗、ECL 试剂盒购自 Santa Cruz 公司。辣根过氧化物酶标记的兔抗羊 IgG(H+L) 购自北京中山生物技术有限公司。低分子量蛋白标准购自百灵克公司, 硝酸纤维素滤膜购自 Roche 公司。

### 1.2 动物

年轻大鼠(6~8周龄雄性 SD 大鼠)8只, 老年大鼠(24月龄雄性 SD 大鼠)8只, 由解放军总医院实验动物中心提供。自由取食饮水, 禁食 12 h, 于次日 9:00~11:00, 经 10% 水合氯醛 0.3 mL/kg 麻醉后, 于下腔静脉取血 3 mL, 动物处死, 取肝组织液氮保存。

[收稿日期] 2003-04-21 [修回日期] 2003-10-08

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划(G2000057007)(973课题)

[作者简介] 王兆君, 女, 1974年出生, 北京市人, 在读硕士研究生, 从事老年心血管疾病血脂的研究。E-Mail: leewang\_cn@sina.com。叶平, 女, 1953年出生, 浙江省杭州市人, 博士研究生导师, 主要从事老年心血管疾病血脂的研究。张秀锦, 女, 1972年出生, 山东省聊城市人, 硕士, 从事老年心血管疾病血脂的研究。

### 1.3 血脂水平的测定

下腔静脉取血 3 mL, 静置 20 min, 2 000 r/min 离心 20 min。取上清 200  $\mu$ L, 以甘油磷酸氧化酶法和胆固醇氧化酶法分别测定甘油三酯 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 水平。

### 1.4 逆转录—聚合酶链反应

使用总 RNA 提取试剂提取组织总 RNA, RNA 沉淀保存于乙醇,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存不超过 1 月。使用前用适量无 RNA 酶水充分溶解 RNA 沉淀, 以紫外线分光光度仪测定 260 nm、280 nm 的吸光度值 ( $\text{OD}_{260}$ 、 $\text{OD}_{280}$ ) 以估计样品量和纯度。使用 Promega 反转录试剂盒的反转录体系以 5  $\mu\text{g}$  总 RNA 反转录生成 40  $\mu\text{L}$  产物, 反转录体系在  $42^{\circ}\text{C}$  反应 60 min,  $95^{\circ}\text{C}$  反应 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$  冷浴 5 min, 即完成 cDNA 的合成。配 PCR 体系扩增 PPAR  $\alpha$ 、脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase, LPL)、载脂蛋白 C (apolipoprotein C) apo C、酰基 CoA 合成酶 (acyl CoA synthetase, ACS)、酰基 CoA 氧化酶 (acyl CoA oxidase, ACO)、内参照 GAPDH, 引物见表 1 (Table 1)。PPAR  $\alpha$ 、载脂蛋白 C、ACO 扩增条件:  $94^{\circ}\text{C}$  变性 1 min、 $48^{\circ}\text{C}$  退火 1 min、 $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共 30 次循环, 继续  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。LPL、ACS、内参照 GAPDH 扩增条件  $51^{\circ}\text{C}$  退火 1 min。取 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭 1  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) 电泳, 紫外灯下凝胶成像分析系统记录结果, 待测基因 mRNA 相对表达量以其扩增带吸光度值与相应内参照扩增带吸光度值的比值表示。

表 1. 引物序列

Table 1. Sequence of primers used

	引物序列	扩增片段
PPAR $\alpha$	上游引物 TGCATGTCCTGGAGACCGTCAC	523 bp
	下游引物 ACTCGTTCITGATGACC	
LPL	上游引物 CTTGGAGATGTGGACCAGC	337 bp
	下游引物 GTGCCATACAGAGAAATCT	
apo C	上游引物 ATGCAGCCCCGAATGC	305 bp
	下游引物 TCCTCATGGTGGCC	
ACS	上游引物 TGCATGTCCTGGAGACCGTCAC	484 bp
	下游引物 TGCGCCATTTCTCTAAGGA	
ACO	上游引物 GCCCTCAGCTATGGTATTAC	633 bp
	下游引物 AGGAACTGCTCTCACAATGC	
GAPDH	上游引物 CCAATGGAGAAGGCTGGGG	194 bp
	下游引物 CAAAGTGTTCATGGATGACC	

### 1.5 Western blot 检测

取组织约 100 mg, 用冰预冷的组织裂解液 1 mL 充分匀浆, 然后转移至离心管中, 加入 3 mol/L 蔗糖

溶液, 充分混匀,  $4^{\circ}\text{C}$  条件下以 20 000 g 离心 30 min。弃去上清, 风干沉淀, 以核蛋白提取液充分溶解沉淀, 再次  $4^{\circ}\text{C}$  条件下以 20 000 g 离心 30 min, 吸出上清, 每管 40  $\mu\text{L}$  分装,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存待用<sup>[2]</sup>。各上样 40  $\mu\text{L}$ , SDS-PAGE 电泳, 转膜, 封闭, 加入 1:100 稀释的羊抗 PPAR  $\alpha$  一抗及 1:2 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗。ECL 检测试剂盒显影, X 光片压片曝光, KODAK 凝胶成像分析系统分析结果。检测后的膜重新封闭 10 min, 于清除缓冲液孵育 30 min, TBST 清洗两次, 再封闭过夜, 重复上述步骤进行内参照 actin (一抗 1:500 稀释, 二抗 1:2000 稀释) 的结合。PPAR  $\alpha$  蛋白相对表达量以其特异性结合条带与 actin 结合条带的吸光度比值表示。

### 1.6 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 STATA 软件包进行  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 衰老对血脂水平的影响

与年轻鼠组比较, 老年鼠组空腹血脂 TG、TC 均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 见表 2 (Table 2)。

### 2.2 衰老对过氧化体增殖物激活型受体 $\alpha$ mRNA 和蛋白表达的影响

与年轻鼠组比较, 老年鼠组 PPAR  $\alpha$  mRNA 表达明显减少 ( $P < 0.05$ ); Western blot 分析显示, 老年鼠组 PPAR  $\alpha$  蛋白表达也明显减少 ( $P < 0.01$ )。

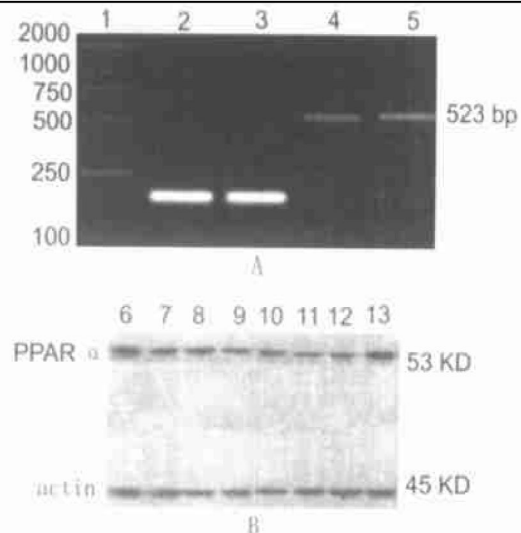


图 1. 衰老对过氧化体增殖物激活型受体  $\alpha$  mRNA 和蛋白的表达影响

A: PPAR  $\alpha$  mRNA; B: PPAR  $\alpha$  蛋白。1: Marker DL2000; 2: 年轻组 GAPDH; 3: 老年组 GAPDH; 4: 年轻组 PPAR  $\alpha$ ; 5: 老年组 PPAR  $\alpha$ ; 6~9: 年轻组; 10~13: 老年组。

Figure 1. The effect of aging on the expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  mRNA and protein

### 2.3 过氧化体增殖物激活型受体 $\alpha$ 目标基因 mRNA 水平比较

老年组 LPL、ACS 和 ACO mRNA 表达明显降低 ( $P < 0.05$ )。老年组载脂蛋白 C ④ mRNA 表达明显升高 ( $P < 0.05$ )。见表 2 (Table 2)。

表 2. 老年组与年轻组血脂水平、过氧化体增殖物激活型受体  $\alpha$  目标基因表达的比较

Table 2. The comparison of lipid levels, the target gene expression levels of PPAR  $\alpha$  between the aged and young groups

指 标	老年组	年轻组
甘油三酯 (mmol/L)	1.16 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>	0.71 $\pm$ 0.19
总胆固醇 (mmol/L)	2.31 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>	1.91 $\pm$ 0.39
脂蛋白脂肪酶	0.44 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.54 $\pm$ 0.07
载脂蛋白 C ④	0.72 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.58 $\pm$ 0.14
酰基 CoA 合成酶	0.70 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.80 $\pm$ 0.08
酰基 CoA 氧化酶	0.94 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.02 $\pm$ 0.07

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与年轻组比较。

## 3 讨论

高脂血症在衰老过程中呈高发显型, 尤以高甘油三酯血症多见。本研究发现老年大鼠组 TG、TC 水平均高于年轻大鼠组, 证实本研究选用的两组不同年龄的大鼠在血脂水平上的差异。

过氧化体增殖物激活型受体  $\alpha$  (PPAR  $\alpha$ ) 是调节脂代谢相关基因的上游转录因子, 配体贝特类调脂药激活 PPAR  $\alpha$  后调配下游脂代谢相关基因转录活性<sup>[3]</sup>。在体内 PPAR  $\alpha$  表达受多种因素影响, 如: 激素。糖皮质激素可上调其表达且呈昼夜节律, 本研究选择上午 9~11 时取得标本可排除糖皮质激素水平改变所带来的影响。衰老过程中伴随着少数基因表达方式的改变, 可能决定了一些表型的出现, 如脂代谢紊乱。Lee 等<sup>[4]</sup>用高密度寡聚核苷酸矩阵筛查了 6 347 种基因, 结果发现衰老使与应激反应相关的基因表达升高, 而与代谢和生物合成相关的基因表达减少。PPAR  $\alpha$  mRNA 水平表达是否受年龄影响国内外报道较少。有报道老年大鼠 (23 月) 心脏 PPAR  $\alpha$  mRNA 和蛋白水平表达均降低, 而经运动诱导后其表达又升高, 证实运动可改善年龄因素所致 PPAR  $\alpha$  表达降低<sup>[5]</sup>。PPAR  $\alpha$  在肝脏、心脏等脂肪酸氧化活跃的器官高表达, 心脏与肝脏均是脂肪酸氧化后提供能量, 对肝内 PPAR  $\alpha$  表达有一定的参考性。Sangnino 等<sup>[6]</sup>发现老年鼠 (18 月) 较年轻鼠肝脏 PPAR  $\alpha$  蛋白水平表达降低 76%, 与脂肪酸代谢

相关的下游基因肉毒碱棕榈酰转移酶 iv mRNA 水平比较也降低 56%。本研究发现在同等营养状态下, 肝脏 PPAR  $\alpha$  表达在老年鼠组 (24 月) 减少, 证实年龄因素致 PPAR  $\alpha$  表达水平降低。

给予 PPAR  $\alpha$  激活剂贝特类调脂药可显著降低甘油三酯水平<sup>[7]</sup>, 在多个水平即目标基因上调节甘油三酯和脂肪酸的代谢, PPAR  $\alpha$  对于甘油三酯的作用正是通过激活目标基因来完成的。载脂蛋白 C ④是 PPAR  $\alpha$  的目标基因, 其作用是抑制脂蛋白脂肪酶对甘油三酯的脂解, 与 LPL 呈负相关, 两组比较老年组偏高, LPL 老年组降低; ACS 是 PPAR  $\alpha$  的目标基因, 促进脂肪酸进入细胞后防止流出, 从而增强肝对游离脂肪酸的摄取和酯化, 是脂肪酸能否进入细胞的关键酶, 两组比较老年组降低; ACO 也是 PPAR  $\alpha$  的目标基因, 其作用是使极长链脂肪酸进入过氧化体  $\beta$  氧化的关键酶, 两组比较老年组降低。上述目标基因是甘油三酯脂解为脂肪酸, 脂肪酸进入细胞, 再进行  $\beta$  氧化的关键步骤, 本研究发现老年鼠 PPAR  $\alpha$  mRNA 和蛋白表达明显减少, 同时目标基因有显著改变, 提示 PPAR  $\alpha$  的表达减少可能与老年脂代谢异常有关, 参与粥样硬化的形成。同时发现, 非诺贝特治疗冠心病伴高脂血症患者 12 周后血循环中炎症因子水平降低<sup>[8]</sup>, 提示 PPAR  $\alpha$  也可通过炎症因子途径参与调脂和防治粥样硬化。

### [参考文献]

- [1] Austin MA. Epidemiology of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. *Am J Cardiol*, 1999, **83** (9B): 13F-16F
- [2] 王兆君, 张秀锦. 评价改良的大鼠肝脏组织两步蛋白提取法. *海军总医院学报*, 2003, **16** (3): 179-180
- [3] 叶平. 过氧化体增殖物激活型受体与脂质代谢. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (4): 369-372
- [4] Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science*, 1999, **285** (5432): 1390-1393
- [5] Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Tanabe T, Takanashi M, Irukayama-Tomobe Y, et al. Aging-induced decrease in the PPAR-alpha level in hearts is improved by exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, **283** (5): H1750-1760
- [6] Sangnino E, Bojarano R, Vazquez CM. Increased triglyceride burden in old rats is originated by sex-related changes in liver expression of PPAR  $\alpha$  and biosynthetic enzymes. *Proceedings of Second International Symposium on PPARs*, Florence, Italy, 2003, 30
- [7] Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, et al. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med*, 1999, **341** (6): 410-418
- [8] 叶平. 过氧化体增殖物激活型受体在控制炎症反应中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (3): 296-262

(此文编辑 文玉珊)