

衰老对大鼠肝脏组织酰基辅酶 A 氧化酶水平的影响

王兆君¹, 叶平², 张秀锦², 王丽华¹

(1. 中国人民解放军海军总医院海军心血管内科专科中心, 北京市 100037;

2. 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; 衰老对酰基辅酶 A 氧化酶的影响; 逆转录聚合酶链反应; 衰老; 酰基辅酶 A 氧化酶; 非诺贝特; 脂质代谢

[摘要] 目的 观察衰老对大鼠肝脏组织酰基辅酶 A 氧化酶水平的影响, 从而探讨衰老过程中出现脂质代谢异常的可能机制。方法 雄性 SD 年轻大鼠(4~6 周龄) 16 只和老年大鼠(24 月龄) 16 只, 分别随机分为对照组和非诺贝特组(非诺贝特喂养 2 周, 每只给药总量为体重的 0.5%), 测定血清中甘油三酯和总胆固醇水平, 采用半定量逆转录聚合酶链反应检测大鼠肝脏组织酰基辅酶 A 氧化酶水平。结果 与年轻对照组比较, 老年对照组甘油三酯和总胆固醇水平升高, 大鼠肝脏组织酰基辅酶 A 氧化酶水平表达随年龄增长而减少。非诺贝特组与对照组比较, 给药后老年非诺贝特组甘油三酯水平下降。非诺贝特影响不同年龄组大鼠肝脏组织酰基辅酶 A 氧化酶水平。结论 衰老过程中大鼠肝脏组织酰基辅酶 A 氧化酶水平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

Effects of Aging on the Expression of Acyl-CoA Oxidase in Rat Liver

WANG Zhao-Jun¹, YE Ping², ZHANG Xiur-Jin², and WANG Li-Hua¹

(1. Department of Cardiovascular, Navy General Hospital, Beijing 100037; 2. Department of Geriatric Cardiology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

[KEY WORDS] Aging; Acyl-CoA Oxidase; Fenofibrate; Lipid Metabolism; Triglyceride; Total Cholesterol

[ABSTRACT] Aim To investigate effects of aging on acyl-CoA oxidase (ACO) expression in rat liver and explore the molecular mechanism of lipid metabolism during aging. Methods Young (4~6 weeks) and aged (24 months) (16 per group) male SD rats were estimated the lipid level, and both of them were randomly divided into control and fenofibrate group (fed with fenofibrate for 2 weeks, and total dose was 0.5% of body weight). The level of liver ACO mRNA was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Results The triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) levels of the aged control group increased significantly compared with the young control group.

The ACO mRNA level of the aged group decreased significantly compared with the young group. Fenofibrate reduced serum TG and TC in aged-fenofibrate groups. The ACO mRNA level of both groups were affected by fenofibrate. Conclusion The mechanism of lipid dysfunction during aging is probably associated with the decreased expression of ACO.

The ACO mRNA level of the aged group decreased significantly compared with the young group. Fenofibrate reduced serum TG and TC in aged-fenofibrate groups. The ACO mRNA level of both groups were affected by fenofibrate. Conclusion The mechanism of lipid dysfunction during aging is probably associated with the decreased expression of ACO.

衰老过程中常出现脂类代谢紊乱, 表现为高甘油三酯血症。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。酰基辅酶 A 氧化酶(acyl-CoA oxidase, ACO) 可促进脂肪酸在过氧化小体中的氧化, 具有降低血清甘油三酯的作用。本研究从 mRNA 水平比较年轻鼠与老年鼠肝脏酰基 CoA 氧化酶水平表达的不同, 以及激活剂非诺贝特对酰基 CoA 氧化酶水平表达的影响, 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 主要试剂

总 RNA 提取试剂、逆转录试剂盒、DL2000 分子质量核酸标准购自 Promega, 逆转录聚合酶链反应试剂盒、引物合成为上海生工生物工程公司。

1.2 动物分组

雄性 SD 大鼠 32 只, 由解放军总医院实验动物中心提供。4~6 周龄年轻大鼠 16 只, 24 月龄老年大鼠 16 只, 体重分别为 103.9 ± 1.3 g 和 676.1 ± 23.5 g, 分别再随机分为对照组和非诺贝特组, 每组各 8 只。自由取食饮水 14 天, 非诺贝特组给予非诺贝特(商品名力平之, 法国利博福尼制药公司提供, 批号为 11331-442973C), 给药总量为体重的 0.5%, 分 14 天给药, 每日灌胃 1 次。禁食 12 h 后, 于次日

[收稿日期] 2004-02-01 [修回日期] 2004-08-10

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

[作者简介] 王兆君, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事心血管疾病的研 究, E-Mail 为 leewang_cn@sina.com。叶平, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事老年心血管疾病的研 究。张秀锦, 硕士研究生, 主要从事老年心血管疾病的研 究。

9:00~11:00 经 10% 水合氯醛 0.3 mL/kg 麻醉后, 下腔静脉取血 3 mL, 动物处死, 取肝组织液氮保存。

1.3 血脂测定

取血上清液 200 μ 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)和总胆固醇(total cholesterol, TC)水平。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测

使用总 RNA 提取试剂提取组织总 RNA。以 1.5 μ g 总 RNA 反转录生成 15 μ L cDNA 产物。PCR 体系扩增 ACO (上游引物 GCCCTCAGC-TATGGTATTAC, 下游引物 AGGAACTGCTCT-CACAATGC)、内参照为 GAPDH (上游引物 CCATGGAGAAGGCTGGGG, 下游引物 CAAAGTTGTCATGGATGACC), 扩增片段分别为 633 bp 和 194 bp。扩增条件为 ACO 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min \rightarrow 48 $^{\circ}$ C 退火 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 次循环, 继续 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; GAPDH 51 $^{\circ}$ C 退火, 其余条件同上。KODAK 凝胶成像分析系统记录结果。

1.5 统计学方法

用 STATA4.0 软件包对所得数据进行分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据处理根据多因素方差分析的结果, 采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 衰老对血脂水平的影响

老年对照组空腹 TG 和 TC 比年轻对照组显著升高, 老年非诺贝特组空腹 TG 和 TC 水平下降, 年轻非诺贝特组 TG 和 TC 无明显差异(表 1, Table 1)

2.2 衰老对酰基辅酶 A 氧化酶的影响

老年大鼠组 ACO mRNA 表达明显降低($P < 0.05$)。非诺贝特给药后, 诱导 ACO mRNA 组织表达, 年轻和老年大鼠组激活程度相似(表 1 和图 1, Table 1 and Figure 1)。

3 讨论

过氧化体增殖物激活型受体 α (peroxisome proliferator activated receptor α , PPAR α) 是一种重要的转录因子, 在脂肪酸氧化器官如肝脏和心脏中高度表达, 成为研究脂类代谢的分子基础的热点。动物实验中, 在 mRNA 和蛋白水平上证实 PPAR α 表达随年龄减少, 可能通过其多个目标基因来调节脂质代谢^[1,2]。已知 PPAR α 能调节多种在基因启动子

区具有过氧化体增殖反应元件的目标基因的转录, 如 ACO、脂蛋白脂肪酶、酰基辅酶 A 合成酶, 这些基因编码参与脂质代谢的关键酶或蛋白, 而 TG 的调节

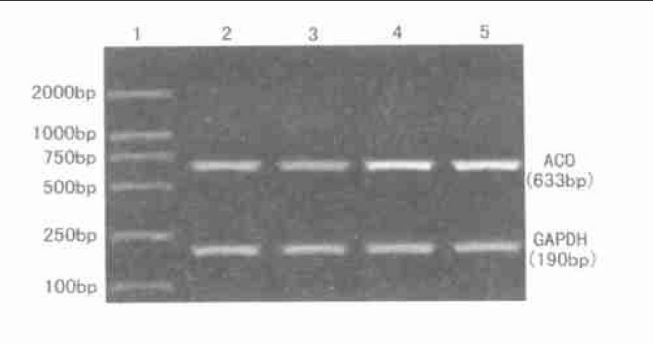


图 1. 衰老对酰基辅酶 A 氧化酶表达的影响 1 为 Marker, 2 为年轻对照组, 3 为老年对照组, 4 为年轻非诺贝特组, 5 为老年非诺贝特组; 上排为 ACO (633 bp); 下排为 GAPDH (190 bp)。

Figure 1. The difference expression of Acyl-CoA oxidase during aging

表 1. 四组甘油三酯和总胆固醇水平及酰基辅酶 A 氧化酶的表达水平

Table 1. Levels of TG and TC and expression of Acyl-CoA oxidase in the four groups

指 标	甘油三酯 (mmol/L)	总胆固醇 (mmol/L)	ACO mRNA
年轻对照组	0.71 \pm 0.19	1.91 \pm 0.39	1.02 \pm 0.07
老年对照组	1.16 \pm 0.41 ^b	2.31 \pm 0.65 ^a	0.94 \pm 0.08 ^a
年轻非诺贝特组	0.70 \pm 0.12	1.95 \pm 0.31	1.86 \pm 0.20 ^b
老年非诺贝特组	0.81 \pm 0.14 ^c	1.72 \pm 0.56 ^c	1.45 \pm 0.12 ^{bd}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与年轻对照组比较; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与老年对照组比较。

正是通过这些关键酶或蛋白的作用来实现的。酰基辅酶 A 合成酶是 PPAR α 的靶基因之一, 主要分布于肝脏和肾脏, 可促进肝脏摄取经脂蛋白脂肪酶脂解生成的游离脂肪酸, 并转化为乙酰辅酶 A, 防止脂肪酸进入细胞后的流失。

脂肪酸代谢的最终结果是 β 氧化生成 ATP。在哺乳动物中, 过氧化体对 β 氧化有重要影响, 其生理性底物包括长链脂肪酸、中长链二羧酸和多不饱和脂肪酸。与线粒体中 β 氧化的结构和功能相比, 过氧化体更适合于代谢长链脂肪酸, 大鼠过氧化体中有多种 β 氧化酶, 提示过氧化体的脂质氧化体系对应底物的多样性, 特别是对长链脂肪酸的多样性。ACO 是脂肪酸在过氧化体中进行氧化的第一步, 也是限速步骤。本研究发现老年鼠比年轻鼠 TG 水平

高 65%, ACO mRNA 表达降低, 提示在衰老过程中对长链脂肪酸 β 氧化作用减弱。

酰基辅酶 A 氧化酶(ACO) 基因是过氧化体氧化增殖的标志。有研究表明, PPAR 基因敲除小鼠缺乏 PPAR α 不能进行过氧化体增殖。研究发现在小鼠肝小叶中心有脂肪堆积^[3]。ACO 基因敲除小鼠缺乏 ACO, 肝细胞严重脂肪变性和自发过氧化体增殖^[4,5]。对 ACO 基因的序列分析发现, 在 ACO 基因启动子存在 2 个 PPRe, 过氧化体增殖物激活物诱导其转录率提高 ACO 的活性。

贝特类调脂药非诺贝特是人工合成的外源性激活剂, 是原发性高甘油三酯血症的首选药物。本研究发现, 非诺贝特治疗 14 天老年大鼠空腹 TG 水平下降 43%。非诺贝特给药后, 诱导 ACO mRNA 表达, 年轻大鼠和老年大鼠激活程度相似。在衰老过程中, 虽 ACO 基因表达减少, 但经过调脂药非诺贝特的激活, 可使老年 ACO 基因表达升高, 增加长链脂肪酸的 β 氧化。多数基础研究工作认为, PPAR α 激活剂不影响 PPAR α 本身的表达或较少影响, 激活剂通过激活 PPAR α , 影响其转录调控活性, 在多个

水平调控 TG 和脂肪酸的代谢^[6]。

上述实验结果说明, 虽然老年易发生脂质代谢紊乱, 但若给予调脂治疗, 可明显改善高甘油三酯血症, 有利于减少心血管发病的高危因素, 为临床积极治疗老年人的血脂异常提供了重要的实验依据。

[参考文献]

- [1] 王兆君, 叶平, 张秀锦. 大鼠过氧化体增殖物激活受体 α 在衰老过程中表达差异及与脂质代谢的关系. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(6): 285-287
- [2] 王兆君, 叶平, 张秀锦. 衰老对大鼠过氧化体增殖物激活受体 α 表达的影响及与脂质代谢的关系. 中华老年心脑血管病杂志, 2004, 6(2): 110-112
- [3] Bell DR. An overview of the symposium on Peroxisomes: biology and role in toxicology and disease. *Hum Exp Toxicol*, 1995, 14(10): 846-849
- [4] Fan CY, Pan J, Chu R, Lee D, Kluckman KD, Usuda N, et al. Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-Coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem*, 1996, 271(40): 24 698-710
- [5] Fan CY, Pan J, Usuda N, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK, et al. Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor α natural ligand metabolism. *J Biol Chem*, 1998, 273(25): 15 639-645
- [6] 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
(此文编辑 文玉珊)

《中国动脉硬化杂志》第三届编辑委员会

(2002-08-03 组建, 2004-08-03 调整)

名誉主编: 蔡海江*

主 编: 杨永宗*

副 主 编: 唐朝枢* 陈保生* 廖端芳* 叶平* 胡必利*

秘 书 长: 胡必利(兼)

编 委 (按姓名拼音字母顺序排列):

陈琪*	陈瑗	陈生弟	陈文培	陈孝曙	范乐明*	高广道	高钰琪	葛均波
顾瑛	关永源	何作云	胡维诚*	黄达德	霍勇	金惠铭	黎健	李建军
李元建*	林曙光*	凌文华	凌亦凌	刘秉文	刘德文	刘国庆	刘乃丰	卢建
欧阳静萍	潘敬运	阮长耿	阮秋蓉*	沈卫峰*	宋剑南	栗秀初	徐玉林*	王家富
王建枝	王士雯	王树人*	韦立新*	温进坤*	沃兴德	吴可贵	吴立玲*	吴其夏
吴满平*	吴伟康	肖献忠	徐仓宝*	杨宝峰	杨向红*	杨英珍	易光辉	尹卫东
詹思延	张运	张道友	张闾珍	赵克森	赵水平*	周新	朱广瑾	朱晓东

特邀编委: 陈富生 范江霖

注: 姓名右上角标* 者为常务编委

中国动脉硬化杂志编辑部

胡必利(教授, 主任)

朱雯霞(编辑)

文玉珊(编辑)

常玲(一级校对, 编辑干事)