

mfat-1 小鼠胆固醇代谢特点及相关机制

李斌¹, 赵子建², 张晓霞³, 戴一凡², 米树华³

(1. 南华大学, 湖南省衡阳市 421001; 2. 南京医科大学, 江苏省南京市 210029;

3. 首都医科大学附属北京安贞医院特需医疗科, 北京市 100029)

[关键词] ω -3 多不饱和脂肪酸; ω -6/ ω -3 多不饱和脂肪酸; 胆固醇代谢标志物; 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶

[摘要] **目的** 探讨 mfat-1 小鼠高脂饮食后血清胆固醇水平、胆固醇合成与吸收效率的改变及相关机制。**方法** mfat-1 小鼠及 C57BL/6 小鼠各 12 只分别作为实验组和对照组, 高脂饲料喂养 4 周后, 心脏取血并取肝脏组织, 气相色谱法检测小鼠肝脏膜脂质内二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)、二十二碳五烯酸(DPA)、 α -亚麻酸(ALA)、亚油酸(LA)、花生四烯酸(AA)的含量及血浆中总胆固醇、胆固醇合成标志物(角鲨烯、2,4-脱氢胆固醇)及吸收标志物(菜油固醇、 β -谷固醇、豆固醇)水平的变化, ELISA 法检测两组小鼠肝脏中胆固醇合成限速酶 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMG-COAR)的表达水平。**结果** 实验组小鼠肝脏膜脂质内 ω -6/ ω -3 多不饱和脂肪酸(PUFA)比例显著低于对照组(1.70 比 6.04, $P < 0.01$), 血浆中胆固醇合成标志物角鲨烯、2,4-脱氢胆固醇水平明显低于对照组(分别为 0.63 ± 0.17 比 1.24 ± 0.36 , 3.89 ± 0.54 比 6.57 ± 1.06 , $P < 0.05$), 胆固醇合成限速酶 HMG-COAR 的表达较对照组显著降低(379.76 ± 22.37 比 443.98 ± 27.99 , $P < 0.01$); 胆固醇吸收标志物菜油固醇、 β -谷固醇和豆固醇水平也显著低于对照组(分别为 16.10 ± 2.28 比 21.24 ± 2.96 , 1.07 ± 0.18 比 1.76 ± 0.43 , 28.78 ± 5.60 比 42.30 ± 5.81 , $P < 0.01$); 总胆固醇水平较对照组降低(0.91 ± 0.07 比 1.16 ± 0.85 , $P < 0.01$)。**结论** mfat-1 小鼠通过抑制胆固醇的合成及吸收两种途径降低体内总胆固醇水平。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Characteristics of Cholesterol Metabolism and its Mechanism in mfat-1 Mice

LI Bin¹, ZHAO Zi-Jian², ZHANG Xiao-Xia³, DAI Yi-Fan², and MI Shu-Hua³

(1. University of South China, Hengyang, Hunan 421001; 2. Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029; 3. Department of VIP, Beijing Anzhen Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] ω -3 Poly Unsaturated Fat Tyacids; ω -6/ ω -3 Poly Unsaturated Fat Tyacids; Cholesterol Metabolism Markers; 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase

[ABSTRACT] **Aim** To observe the change of serum total cholesterol (TC) and efficiency of the synthesis and absorption of cholesterol in the mfat-1 mice after high fat diet, and to explore the relative mechanism. **Methods** 12 mfat-1 mice as experimental group and 12 C57BL/6 mice as control group were given high fat diet for 4 weeks. Blood was taken from the heart, and the liver tissue extracted four weeks later. The content of liver lipids eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexenoic acid(DHA), docosapentaenoic acid(DPA), α -linolenic acid(ALA), linoleic acid(LA), arachidonic acid(AA), serum TC, and the level of cholesterol synthesis markers (squalene, desmosterol), absorption markers (campesterol, β -sitosterol, stigmasterol), were determined with gas chromatogram. The express of cholesterol synthesis rate-limiting enzyme in liver, 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMG-COAR), were determined with ELISA. **Results** In the contents of liver membrane lipid, the ratio of ω -6/ ω -3 polyunsaturated fatty acids in the experimental group was significantly lower than that in the control group (1.70 vs 6.04, $P < 0.01$). The levels of liver HMG-COAR in the experimental group were significantly lower than those in the control group (379.76 ± 22.37 vs 443.98 ± 27.99 , $P < 0.01$). The levels of plasma TC, cholesterol synthesis markers (squalene, desmosterol) and absorption

[收稿日期] 2013-11-19

[基金项目] 北京市自然科学基金(7112040)

[作者简介] 李斌, 硕士研究生, 研究方向为冠心病与血脂代谢, E-mail 为 libin1008@126.com。通讯作者米树华, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 长期从事冠心病、血脂异常、糖尿病等方面的临床及科研工作, E-mail 为 mishuhua@hotmail.com。

markers (campesterol, β -sitosterol, stigmaterol) in the experimental group were significantly lower than those in the control group (0.91 ± 0.07 vs 1.16 ± 0.85 , $P < 0.01$; 0.63 ± 0.17 vs 1.24 ± 0.36 , 3.89 ± 0.54 vs 6.57 ± 1.06 , $P < 0.05$; 16.10 ± 2.28 vs 21.24 ± 2.96 , 1.07 ± 0.18 vs 1.76 ± 0.43 , 28.78 ± 5.60 vs 42.30 ± 5.81 , $P < 0.01$, respectively).

Conclusion The mfat-1 mice can inhibit cholesterol synthesis and absorption, thus decrease the total cholesterol.

高胆固醇血症尤其是低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 的升高是造成动脉粥样硬化的独立危险因素之一^[1]。基础研究提示, ω -3 多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA) 能够显著降低血清胆固醇水平^[2], 但未能临床研究中得到证实^[3], 这种差异可能与 ω -3PUFA 在体内含量不同有关。mfat-1 小鼠携带 ω -3 脂肪酸去饱和酶 (fat-1) 基因, 可以有效提高体内 ω -3PUFA 含量^[4], 能够更明确观察对胆固醇的作用及可能机制。本研究通过检测 mfat-1 小鼠体内胆固醇合成及吸收标志物水平的变化, 探讨 ω -3PUFA 对体内胆固醇水平的影响, 为临床降低血清总胆固醇水平提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料

mfat-1 小鼠由南京医科大学赵子健、戴一凡教授馈赠。C57BL/6 小鼠购自斯贝福实验动物科技有限公司。高脂饲料购自北京华卓康生物科技股份有限公司。总胆固醇、5 α -胆甾烷、胆固醇、2,4-脱氢胆甾烷醇、菜油固醇、豆固醇、 β -谷固醇、角鲨烯标准品均购自 Sigma 公司。3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, HMG-CoAR) ELISA 试剂盒购自上海研谨生物科技有限公司。使用 Agilent 公司 6890N 气相色谱仪; 美国伯乐 680 酶标仪。

1.2 mfat-1 小鼠基因组 DNA 提取及 PCR 鉴定

小鼠 2 周龄时剪 0.5 cm 鼠尾, 加鼠尾裂解液及蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 温浴 12 h; 顺次加入氯仿、无水乙醇抽提基因组 DNA, 75% 乙醇洗涤, 无菌蒸馏水溶解。半定量 PCR 鉴定 fat-1 基因的表达。

1.3 动物分组及实验方法

随机挑选 8 周龄 mfat-1 及 C57BL/6 雄性小鼠各 12 只分别作为实验组和对照组, 适应性喂养 2 周改为高脂饲料, 实验动物房温度 (22 ± 5) $^{\circ}$ C, 湿度 (50 ± 10)%, 明暗周期 12/12。4 周后心脏取血, 离心后进行胆固醇代谢标志物检测; 剪取肝脏组织, 液氮保存, 分别行肝脏脂质成分及 HMG-CoA 还原

酶活性的检测。

1.4 肝脏脂质成分及血胆固醇代谢标志物的检测

甲醇-氯仿提取法提取肝脏组织中的脂质, 以 14% BF₃/MeOH 酯化后进行气相色谱分析, 通过将保留时间与标准品对比, 分析肝脏脂质含量。血浆样品前处理: 血清皂化后加入正己烷萃取, 氮吹吹干, 衍生后样品溶液转移至进样瓶内衬管中, 上机测试。内标单点法定量检测胆固醇合成及吸收标志物含量。将上述经处理后血清样品稀释至适合浓度, 用外标单点法定量测定血清中胆固醇含量。

1.5 酶联免疫分析法测小鼠肝脏组织 HMG-CoAR 的活性

于肝脏组织加入 PBS (pH7.4), 匀浆充分, 离心后收集上清, 通过 ELISA 定量分析检测 HMG-CoAR 的活性。严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 最后用酶联仪在 450 nm 波长依序测量各孔的光密度 (OD 值), 每样品重复 3 次, 通过标准曲线计算样品中小鼠 HMG-CoAR 浓度。

1.6 统计学处理

对实验中的数据进行统计学分析处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 如满足正态分布应用独立样本 t 检验, 非正态分布应用秩和检验, 数据处理采用 SPSS17.0 软件包, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 mfat-1 小鼠的 PCR 鉴定结果

fat-1 基因长度为 438 bp, 经 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外荧光下观察, 可以在 438 bp 处检测到 fat-1 基因片段 (图 1)。

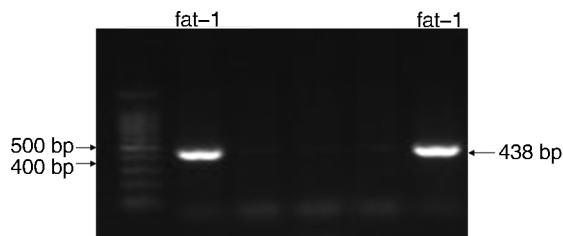


图 1. fat-1 基因 PCR 鉴定结果

Figure 1. The identification of PCR for the fat-1 gene

2.2 小鼠肝脏膜脂质各组分含量

实验组小鼠体内总 ω -3PUFA [二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳六烯酸 (docosahexenoic acid, DHA)、二十二碳五烯酸 (docosapentaenoic acid, DPA)、 α -亚麻酸 (α -linolenic acid, ALA)] 含量显著高于对照组, 而 ω -6PUFA [亚油酸 (linoleic acid, LA)、花生四烯酸 (arachidonic acid, AA)、肾上腺酸] 含量明显降低, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。实验组总 ω -6/ ω -3PUFA 值显著低于对照组 ($P < 0.05$; 表 1)。

表 1. 小鼠肝脏膜脂质成分的含量 (%) ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1. The contents of lipid in the livers of both groups (%) ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

分 组	对照组	实验组
ALA (C18:3)	0.13 \pm 0.04	0.08 \pm 0.01
EPA (C20:5)	0.16 \pm 0.07	0.75 \pm 0.12
DPA (C22:5)	1.05 \pm 0.21	2.69 \pm 0.68 ^a
DHA (C22:6)	3.50 \pm 1.01	4.49 \pm 0.95
总 ω -3	4.79 \pm 0.54	8.06 \pm 0.76 ^a
LA (C18:2)	19.51 \pm 2.54	7.74 \pm 1.24 ^a
AA (C20:4)	7.53 \pm 1.67	5.04 \pm 1.14
肾上腺酸 (C22:4)	1.89 \pm 0.43	0.93 \pm 0.13
总 ω -6	28.93 \pm 1.68	13.71 \pm 0.98 ^a
ω -6/ ω -3	6.04	1.7 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比。

2.3 血清中胆固醇及胆固醇代谢标志物水平

实验组小鼠体内总胆固醇含量显著低于对照组, 胆固醇合成标志物水平 (角鲨烯、2,4-脱氢胆固醇) 及胆固醇吸收标志物水平 (菜油固醇、 β -谷固醇、豆固醇) 均低于对照组小鼠, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$; 表 2)。

2.4 HMG-CoAR 活性

高脂饲养后, 实验组小鼠肝脏中 HMG-CoAR 的活性 (379.76 \pm 22.37 U/L) 显著低于对照组小鼠 (443.98 \pm 27.99 U/L), 两组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

高胆固醇血症是心脑血管疾病的高危因素之一, 欧洲血脂异常防治指南把降低 LDLC 作为血脂干预的首要指标^[5]。近年来针对 ω -3PUFA 进行的流行病学调查发现, 增加膳食中 ω -3PUFA 的含量, 可以显著降低冠心病的发病率与死亡率^[6]。多项

表 2. 两组小鼠血清样品中胆固醇含量及胆固醇吸收、合成标志物测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2. The makers of absorption and synthesis for the cholesterol and cholesterol in the serum of both groups ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

项 目	对照组	实验组	P
角鲨烯 (mg/L)	1.24 \pm 0.36	0.63 \pm 0.17	< 0.01
2,4-脱氢胆固醇 (mg/L)	6.57 \pm 1.06	3.89 \pm 0.54	< 0.01
菜油固醇 (mg/L)	21.24 \pm 2.96	16.10 \pm 2.28	< 0.01
豆固醇 (mg/L)	1.76 \pm 0.43	1.07 \pm 0.18	< 0.01
β -谷固醇 (mg/L)	42.30 \pm 5.81	28.78 \pm 5.60	< 0.01
总胆固醇 (g/L)	1.16 \pm 0.85	0.91 \pm 0.07	< 0.01
角鲨烯/TC (mg/g)	1.08 \pm 0.31	0.70 \pm 0.18	0.02
2,4-脱氢胆固醇/TC (mg/g)	5.72 \pm 1.02	4.30 \pm 0.67	0.01
菜油固醇/TC (mg/g)	18.4 \pm 2.42	17.79 \pm 2.93	0.56
豆固醇/TC (mg/g)	1.54 \pm 0.41	1.18 \pm 0.19	0.02
β -谷固醇/TC (mg/g)	36.89 \pm 6.46	31.99 \pm 7.74	1.12

临床及流行病学研究显示^[7], ω -3PUFA 可影响血压, 并具有抗氧化、抗炎、抗血小板聚集等作用, 但其对胆固醇水平的影响尚不十分明确。一些细胞及动物实验显示, ω -3PUFA 可降低血中胆固醇水平, 但临床研究却显示, 其主要影响血清中甘油三酯水平, 对胆固醇无明显作用。两者的差异可能与 ω -3PUFA 在体内含量不同有关。

mfat-1 小鼠携带 ω -3 脂肪酸不饱和酶 (ω -3 fatty acids desaturase) 基因, 可以把体内 ω -6PUFA 转化为 ω -3PUFA, 从而显著提高组织和器官中 ω -3PUFA 含量, 降低 ω -6/ ω -3PUFA 比例。因此, mfat-1 小鼠是研究 ω -3PUFA 对胆固醇影响的理想模型。本研究中, 利用气相色谱对 mfat-1 小鼠肝脏脂质分析显示, mfat-1 小鼠肝脏中含有的 ω -3PUFA 明显高于野生型 (8.06 \pm 0.76 比 4.79 \pm 0.54), ω -6/ ω -3PUFA 比例明显降低 (1.70 比 6.04)。表明 ω -3 脂肪酸不饱和酶基因在 mfat-1 小鼠体内良好表达。

我们的研究结果显示, 在给予 4 周高脂饮食后, 实验组小鼠血清中总胆固醇水平较对照组小鼠显著降低, 其合成标志物水平角鲨烯、2,4-脱氢胆固醇显著低于对照组小鼠, 角鲨烯/TC、2,4-脱氢胆固醇/TC 比值显著低于对照组小鼠。胆固醇的合成标志物 (角鲨烯、2,4-脱氢胆固醇) 的下降及其与总胆固醇比值的降低反映 mfat-1 小鼠内源性胆固醇的合成效率降低^[8,9]。

HMG-CoAR 是胆固醇内源性合成过程的限速酶, 其活性及表达的高低也决定着血浆胆固醇

的水平^[10],我们的研究显示,实验组小鼠肝脏内胆固醇合成的限速酶 HMG-CoAR 的活性显著低于对照组,提示 HMG-CoAR 活性的下降是胆固醇合成效率降低的机制之一。DHA 或 EPA 可能具有抑制 HMG-CoAR 活性的作用^[11]。人体胆固醇来源包括肝脏合成与肠道吸收两个途径,胆固醇代谢平衡受到肝脏合成与肠道吸收的双重调节。体内 LDLC 水平与肠道胆固醇的吸收呈正相关^[12],而抑制肠道胆固醇的吸收可显著降低血浆 LDLC 水平。植物固醇如菜油固醇、豆固醇、 β -谷固醇作为胆固醇的吸收标志物反映外源性胆固醇的吸收效率,其浓度及其与总胆固醇的比值可以反映机体外源性胆固醇的吸收效率^[13]。本研究显示, *mfat-1* 小鼠体内菜油固醇、豆固醇、 β -谷固醇均显著低于对照组。这一结果表明 *mfat-1* 小鼠可以通过抑制肠道对胆固醇的吸收来降低血清中总胆固醇,其作用途径之一可能是高含量的 ω -3PUFA 可以降低调节胆固醇吸收的转运蛋白尼曼-匹克 1 型如 1 基因(Niemann-Pick C1 like 1, NPC1L1) 的表达^[14]。

综上所述, ω -3 脂肪酸去饱和酶基因在 *mfat-1* 小鼠体内成功表达,可以明显提高组织内 ω -3PUFA 含量,降低体内 ω -6PUFA/ ω -3PUFA 比例,进而通过抑制胆固醇的合成及吸收这两种途径来降低体内胆固醇含量。

[参考文献]

- [1] Rosamond W, Flegal K, Furie K, et al. Heart disease and stroke statistics-2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee[J]. *Circulation*, 2008, 117(4): e25-146.
- [2] Bauchner H, Fontanarosa PB. The debut of dueling viewpoints[J]. *JAMA*, 2012, 307(14): 1 532.
- [3] Kourounakis AP, Katselou MG, Matralis AN, et al. Squalene synthase inhibitors: An update on the search for new antihyperlipidemic and antiatherosclerotic agents [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(29): 4 418-439.
- [4] Kang JX. A transgenic mouse model for gene-nutrient interactions [J]. *J Nutrigenet Nutrigenomics*, 2008, 1:

172-177.

- [5] ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS) [J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(24): 1 769-818.
- [6] Bang HO, Dyerberg J, Hjorne N. The composition of food consumed by Greenland Eskimos [J]. *Acta Med Scand*, 1976, 200: 69-73.
- [7] Hung P, Kaku S, Yunoki S, et al. Dietary effect of EPA rich and DHA rich fish oils on the immune function of Sprague-Dawley rats [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63(1): 135-140.
- [8] Kourounakis AP, Katselou MG, Matralis AN, et al. Squalene synthase inhibitors: An update on the search for new antihyperlipidemic and antiatherosclerotic agents [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(29): 4 418-439.
- [9] 刘洋, 王绿娅, 王启辉, 等. 体内胆固醇代谢标志物与血脂水平的相关性研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(7): 610.
- [10] 欧海龙, 严忠海, 焦飞. 利用 RNA 干扰技术抑制小鼠羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶基因的表达 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(2): 129-134.
- [11] Chen JN, Jiang Y, Liang YT, et al. DPA n-3, DPA n-6 and DHA improve lipoprotein profiles and aortic function in hamsters fed a high cholesterol diet [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 221: 397-404.
- [12] Wang DQ. Regulation of intestinal cholesterol absorption [J]. *Annu Rev Physiol*, 2007, 69: 221-248.
- [13] Miettinen TA, Gylling H, Nissinen MJ. The role of serum non-cholesterol sterols as surrogate markers of absolute cholesterol synthesis and absorption [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2011, 21(10): 765-769.
- [14] Alvaro A, Rosales R, Masana L, et al. Polyunsaturated fatty acids down-regulate in vitro expression of the key intestinal cholesterol absorption protein NPC1L1: no effect of monounsaturated noursaturated fatty acids [J]. *J Nutr Biochem*, 2010, 21: 518-525.

(此文编辑 许雪梅)