

长期游泳运动对高脂饲料喂养大鼠肝脏中 CYP7A1 及 D-双功能蛋白表达的影响

叶 春

(南京师范大学体育科学学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 探讨长期耐力运动对高脂饲料喂养的大鼠胆汁酸生成关键酶 CYP7A1 和 D-双功能蛋白(DBP)表达的影响。30 只大鼠随机分为高脂组(HC)、高脂运动组(HE)、正常组(C)。高脂组和高脂运动组采用高脂饲料喂养。高脂运动组喂养 4 周后,进行 16 周的游泳运动。20 周后,测定三组大鼠肝脏中 CYP7A1 和 DBP 的表达,血清中生化指标的变化以及粪便中的胆汁酸,并取肝脏作病理切片分析。测定结果显示,高脂运动组较高脂组肝脏的脂肪变性明显好转,血清中 chol、TG、LDL、CP 均趋向正常;高脂运动组肝脏中 CYP7A1、DBP 的表达明显增加。长期耐力运动能够使高脂喂养大鼠肝脏中 CYP7A1、DBP 表达显著增加,增加大鼠胆汁酸的产生和排泄,减轻高脂饲料喂养导致的脂类代谢失调。

[关键词] 游泳运动,高脂饲料,CYP7A1,DBP

[中图分类号] G804.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2018)01-0112-04

Long-term Swimming Enhance the Expression of D-bifunctional Protein and CYP7A1 in Rats Liver of High-fat Diet

Ye Chun

(School of Sport Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: To detect the effect of long term swimming on bile acid classic synthesis pathway in high fat diet rats. Thirty healthy male SD rats were randomly and equally divided into following 3 groups, normal control group (C, fed with standard diet), high fat diet fed control group (HC) and long-term exercise (HE). The rats in group CON were fed in diet control groups and fed with the standard diet. The rats in group HC were continuously fed with high-fat diet without exercise. The rats in group HC were fed with high-fat diet without exercise for 4 weeks, then with 90 min unloaded swimming 5 times per week. The whole duration of the study were 20 weeks, the serum concentration of Glu, Chol, TG, HDL, LDL, CP, and fecal bile acids were assayed. The body and liver weight of rats were recorded. The mRNA levels of hepatic DBP and CYP7A1 were detected by RT-PCR. Serum Glu, TG, chol and LDL were lower in HE group compared HC group ($P < 0.05$). The expression of CYP7A1 and DBP were up-regulation after long-term swimming. The expression of CYP7A1 and DBP could be up-regulated by long-term swimming, thus effectively increasing bile acid excreting and improving the disorders of lipid metabolism.

Key words: swimming, high fat diet, CYP7A1, DBP

胆汁酸是机体排泄胆固醇的重要途径,对机体胆固醇代谢平衡起着重要的作用。胆固醇在内质网(cholesterol 7 α -hydroxylase)的 CYP7A1 催化下,生成 7 α -羟胆固醇,这条途径是胆汁酸合成的经典途径,大部分胆汁酸是通过这个途径合成的,CYP7A1 是限速酶^[1]。固醇侧链的缩短是通过在过氧化物酶体内的一次 β 氧化完成。目前,从肝脏的过氧化物酶体中提取纯化出一种酶蛋白,这种酶蛋白可以催化 D-3 羟脂酰辅酶 A 的脱水与脱氢,被称为 D-双功能蛋白(D-bifunctional protein, DBP)^[2]。三羟胆甾烷酰基辅酶 A (trihydroxycholestanoyl-CoA, THC-coA)是胆汁酸合成的前体,离体实验已经证实 DBP 可以催化该物质 β -氧

收稿日期:2017-10-15.

基金项目:江苏省高校自然科学研究面上专款(09KJB34001).

通讯联系人:叶春,博士,讲师,研究方向:运动生化. E-mail:12144@njnu.edu.cn

化过程中的水化和脱氢反应^[3]. 敲掉 DBP 基因的小鼠血液中会积聚大量异常胆汁酸,表明 DBP 是胆汁酸合成所必需的^[4]. 进一步研究证实,糖尿病大鼠肝脏 DBP 表达明显降低,所以推测 DBP 可能就是糖尿病大鼠肝脏中出现脂肪沉积的原因^[5]. 本实验通过观察长期游泳运动对高脂饲料喂养大鼠肝脏中 CYP7A1 和 DBP 表达的变化,从胆汁酸角度探讨运动对胆固醇排泄的作用及其对非酒精性脂肪肝防治的机理.

1 方法

1.1 大鼠饲养和管理

采用纯系雄性 SD 大鼠 30 只,体重 180 g~210 g,由南京中医药大学实验动物中心提供,随机分为高脂组(HC)、高脂运动组(HE)、正常组(C),每组 10 只. 高脂组和高脂运动组采用高脂饲料喂养,高脂饲料配比为标准饲料加 10%的猪油和 1.5%的胆固醇;正常组采用国家标准啮齿类动物混合饲料喂养.

大鼠适应性喂养 4 周之后,高脂运动组进行 16 周的游泳运动. 在 100 cm×50 cm×50 cm 的塑料箱内放入干净的自来水,水温保持在 (30±2)℃,每周中有 5 d 进行游泳运动,每天 1 次,每次 90 min. 各组分笼饲养,自由摄食与饮水,动物造模共进行 20 周. 高脂运动组最后一次游泳后 24 h、且空腹 12 h,称体重,以 3%戊巴比妥腹腔注射麻醉,留取血清、肝脏. 正常组和高脂组采取同样方法称体重,留取血清和肝脏. 处死大鼠前 3 d 分组搜集粪便,用于粪便胆汁酸(fecal bile acids, FBA)的测量.

1.2 指标测定

1.2.1 称取大鼠体重及肝指数(肝湿重/体重×100%).

1.2.2 采用日立 7600-020 全自动生化仪测定血清中 GLU、chol、TG、HDL、LDL 和 CP(C 肽).

1.2.3 粪便中胆汁酸的测定

参照文献的方法,用无水乙醇从各组大鼠干燥恒重的粪便中提取出胆汁酸,用日立 7600-020 全自动生化仪测定胆汁酸,以每克干燥粪便中含有胆汁酸的微摩尔数表示粪便中胆汁酸的含量.

1.2.4 肝脏经甲醛固定,石蜡包埋,切片,常规 HE 染色,在光镜下观察.

1.2.5 肝组织中 CYP7A1 和 DBP 的测定

采用异硫氰酸胍一步法提取肝组织总 RNA,以 β -actin 为内参照,RT-PCR 法测定 CYP7A1、DBP 的相对表达量,用凝胶成像系统分析琼脂糖凝胶电泳分离的扩增产物的灰度值. 相对表达量以 β -actin RNA 的灰度值之比表示. 大鼠 DBP 引物 5'-AAGTGATGAAGACTGGGATA-3',下游引物 5'-TGTAGGCAAACAGGAGAA-3',产物 793 bp. 大鼠 CYP7A1 引物:5'-GCCGTCCAAGAAATCAAGCAGT-3',下游引物 5'-TGTGGGCAGCGAGAA-CAAAGT-3',引物自行设计,由上海生工公司合成.

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 进行统计分析. 资料经过方差齐性检验,数据用(均数±标准差)表示. 组间差异比较用 *t* 检验.

2 结果

2.1 长期耐力运动对大鼠血脂、血糖水平和粪便中胆汁酸排出量的影响

高脂组大鼠血清中,空腹血糖、胆固醇(Chol)、LDL 以及 C 肽(CP)较正常组明显增加,粪便中胆汁酸排出明显减少. 高脂运动组空腹血糖、胆固醇、甘油三酯(TG)及 LDL 均较高脂组明显下降,HDL 和粪便胆汁酸排出较高脂组明显增加(表 1).

表 1 各组大鼠血脂、血糖水平及 FBA 排出

Table 1 Blood lipids and fecal bile acid in rat groups($n=10, \bar{x} \pm s$)

	正常组	高脂组	高脂运动组
空腹血糖	3.380 0±0.383	4.350±0.300 **	3.920±0.29 [#]
Chol	2.288 9±0.410	3.190±0.600 **	1.240±0.31 ^{##}
TG	1.810 0±0.300	2.000±0.450	1.087±0.19 ^{##}
HDL	0.940 0±0.280	0.986±0.220	1.258±0.25 [#]
LDL	0.350 0±0.100	0.607±0.180 **	0.400±0.11 [#]
CP	0.346 0±0.060	0.417±0.060 *	0.387±0.60
粪便中胆汁酸	0.786 0±0.143	0.450±0.272 *	7.554±1.89 ^{##}

注:与正常组比较,** $P<0.01$,* $P<0.05$;与高脂组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$.

2.2 长期耐力运动对体重和肝指数的影响

高脂饲料喂养 20 周的大鼠体重和肝指数明显增加 ($P<0.01$). 经过 16 周耐力运动,大鼠体重和肝指数均显著下降 ($P<0.01$).

表 2 各组大鼠的体重和肝指数
Table 2 Body and liver wet weight in rat groups($n=10, \bar{x}\pm s$)

	正常组	高脂组	高脂运动组
体重(g)	556.44±29.04	654.66±47.02 **	571.22±41.22 ##
肝指数(%)	2.36±0.39	3.60±0.53 **	3.13±0.10 ##

注:与正常组比较, ** $P<0.01$, * $P<0.05$;与高脂组比较, ## $P<0.05$, ### $P<0.01$.

2.3 肝脏的病理变化

南京医科大学病理系针对本实验出具的大鼠病理组织学检查报告显示,正常组大鼠的肝脏未见病理学变化. 高脂组 10 只大鼠的肝脏均见弥散性肝细胞脂肪变性(+++), 汇管区可见少量炎性细胞(+), 肝脏脂肪变性程度与正常组相比有显著性差异. 高脂运动组 9/10 大鼠肝细胞轻微脂肪变性, 汇管区未见炎性细胞浸润, 余下 1/10 大鼠肝细胞索排列较整齐, 未见水样变性及脂肪变性. 结果提示:高脂组大鼠肝细胞出现明显脂肪变性, 并出现轻度非酒精性脂肪肝炎的病理表现. 高脂运动组肝脏的脂肪变性较高脂组明显好转.

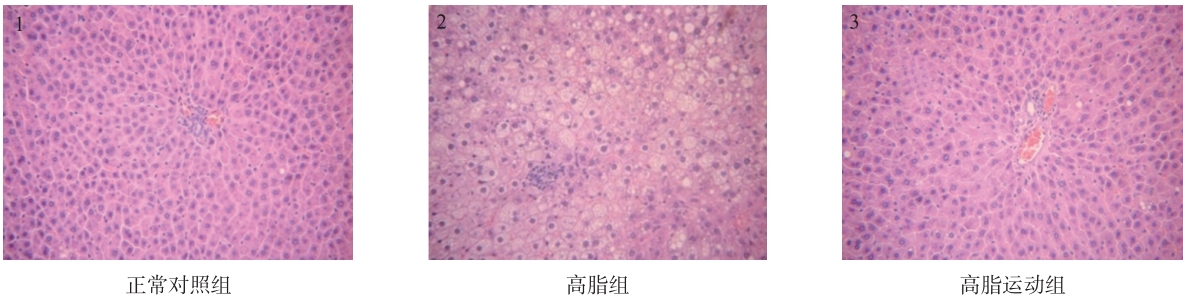


图 1 各组大鼠肝脏的组织形态学改变(HE 染色×200)

Fig. 1 Light microscopy of liver lobular architecture in rat groups

2.4 肝脏中 CYP7A1、DBP 的表达情况

结果显示,高脂组大鼠肝脏中 CYP7A1 和 DBP 的表达较正常组明显下降 ($P<0.01$). 高脂运动组 CYP7A1 和 DBP 表达较高脂组显著增加 ($P<0.01$).

表 3 各组大鼠肝脏中 CYP7A1、DBP 相对值比较
Table 3 RT-PCR results of liver genes in rat groups($\bar{x}\pm s$)

	CYP7A1	DBP
正常组	3.766 7±0.438 8	1.156 0±0.414
高脂运动组	3.885 2±1.014 6 ##	2.390 0±0.728 ##
高脂组	0.487 0±0.246 9 **	0.206 8±0.267 **

注:与正常组比较, ** $P<0.01$, * $P<0.05$;与高脂组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

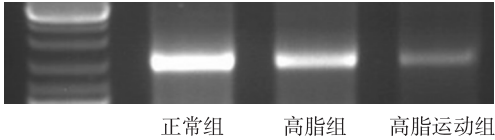


图 2 各组大鼠 CYP7A1 表达情况

Fig. 2 Hepatic mRNA expression of CYP7A1 in rat groups

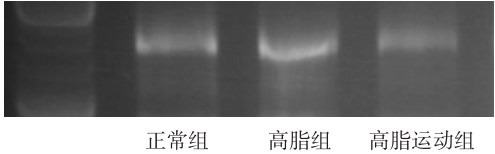


图 3 各组大鼠 DBP 表达情况

Fig. 3 Hepatic mRNA expression of DBP in rat groups

3 讨论

高脂饲料喂养 20 周后大鼠血脂水平、体重及肝指数显著升高;肝脏病理切片显示肝细胞已经出现明显脂肪变性,表明大鼠高脂血症模型建立成功. 胆汁酸是机体胆固醇主要转化产物,同时也是机体排泄胆固醇的重要途径. 以往研究表明,在高胆固醇的膳食条件下,体内的胆固醇合成几乎处于停滞状态,所以降解和排泄胆固醇是机体降低胆固醇的主要方式^[6]. CYP7A1 是肝脏中胆固醇合成胆汁酸经典途径的限速酶,它的表达值决定胆汁酸生成量,对于维持机体胆固醇代谢平衡起着至关重要的作用. 并且 CYP7A1 表达直接受到上游基因、饮食、激素和药物等许多因素的影响^[7]. 促使胆固醇转化为胆汁酸的另一个重要

酶是 DBP. 某些疾病如 Zellweger 综合症, 患者无法合成 DBP, 体液中会有大量不成熟胆汁酸(C_{27} 胆汁酸)以及长链脂肪酸堆积^[8]. 最近有研究结果表明 DBP 能够正向调节 CYP7A1^[9].

胆汁酸经过肠肝循环后绝大部分被重吸收, 只有约 5% 由粪便排出. 因此, 粪胆汁酸量的多少可间接反映肝脏合成胆汁酸的速度^[10]. 本实验结果表明, 经过 20 周高脂饲料喂养后, DBP 和 CYP7A1 表达明显下降, 大鼠粪便排出的胆汁酸明显减少, 血液中胆固醇显著升高, 肝脏脂肪存积明显, 这可能是胆固醇在肝脏中存积的原因. 之前有研究显示, 高脂饲料喂养大鼠 2 周后, DBP 和 CYP7A1 表达会上升, 粪便胆汁酸排出明显增加, 与本实验结果相反. 结合其他文献结果分析, 原因可能与饲料喂养时间长短有关, 长期高脂饲料喂养导致大鼠肝脏中炎症因子表达明显增加, 从而抑制了 CYP7A1 的表达, 减少了胆汁酸的合成^[11]. 本实验高脂饲料喂养长达 20 周, 远超过前述实验的喂养时间.

本实验结果表明, 高脂饲料喂养的大鼠经过长期游泳运动以后, CYP7A1 以及 DBP 表达显著增加, 血液中胆固醇出现明显下降, 大鼠粪便中胆汁酸也明显增加, 肝脏病理切片显示脂肪肝表相明显改善. 这一结果表明, 长期运动改善大鼠胆固醇代谢的原因可能是由于运动上调了合成胆汁酸关键酶 CYP7A1 和 DBP 的表达, 增加胆汁酸的产生, 促进胆固醇的排泄, 减轻胆固醇在肝脏内堆积.

[参考文献]

- [1] 李燕, 凌文华. 胆固醇和脂肪酸对 CYP7A1 的调节[J]. 国外医学(内科学分册), 2004, 31(1): 1-4.
- [2] JIANG L L, MIYAZAW A S, HASHIMO T T. Purification and properties of rat D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein[J]. J Biochem, 1996, 120: 633-641.
- [3] JIANG L L, KUROSAWA T, SATO M. Physiological role of D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein[J]. J Biochem, 1997, 121: 506-513.
- [4] BAES M, HUYGHE S, CARMELIET P, et al. Inactivation of the peroxisomal multifunctional protein-2 in mice impedes the degradation of not only 2-methyl-branched fatty acids and bile acid intermediates but also of very long chain fatty acids[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 16 329-16 336.
- [5] 王晓玲, 姜玲玲, 史哲, 等. 2 型糖尿病肥胖大鼠肝脏脂肪沉积及过氧化酶体脂肪酸 β -氧化的变化[J]. 解放军医学杂志, 2009, 34(9): 1 062-1 065.
- [6] 陈文, 张静, 常平, 等. 牛磺酸对高胆固醇血症大鼠胆固醇/胆汁酸代谢的影响[J]. 中国食品学报, 2009, 9(6): 21-25.
- [7] SCHWARZ M, RUSSELL D W, DIETSCHY J M, et al. Alternate pathways of bile acid synthesis in the cholesterol α -hydroxylase knockout mouse are not upregulated by either cholesterol or cholestyramine feeding[J]. J Lipid Res, 2001, 42(10): 1 594-1 603.
- [8] CLAYTON P T, PATEL E, LAWSON A M, et al. Bile acid profiles in peroxisomal 3-oxoacylcoenzyme A thiolase deficiency[J]. J Clin Invest, 1990, 85: 1 267-1 273.
- [9] 马颖, 姜玲玲, 石如玲, 等. 同时激活肝 X 受体和过氧化物酶体增殖剂激活受体 α 对大鼠胆汁酸合成的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2007, 29(3): 384-387.
- [10] 石如玲, 赵朝贤, 朱海暴, 等. 大鼠肝脏 D-双功能蛋白活性增加与胆汁酸合成的关系[J]. 基础医学与临床, 2006, 26(7): 720-723.
- [11] 王素玲, 王切, 姜玲. 胆汁酸合成增加与肝 D-双功能蛋白表达增强、活性升高的相关性[J]. 第四军医大学学报, 2008(6): 516-518.

[责任编辑: 黄 敏]