

牛磺酸对高胆固醇血症小鼠胆固醇/胆汁酸吸收与排出的影响

陈 文¹,西村 直道²,横越 英彦³

(1.北京联合大学应用文理学院,生物活性物质与功能食品北京市重点实验室,北京 100191;

2.名寄市立大学,日本名寄 096-8641;3.静冈县立大学营养化学研究室,日本静冈 422-8526)

摘 要:为探讨牛磺酸对高胆固醇血症小鼠胆固醇/胆汁酸代谢的影响,本文以 10 周龄雄性 C57BL/6 小鼠为实验对象,根据体重和血清胆固醇水平随机分为 6 组,对照组(N)、高胆固醇膳食组(C)、高胆固醇/胆盐膳食组(CB)以及分别与这三组相对应的牛磺酸添加组(NT、CT、CBT)。给与各组相应膳食 1 周后,测定血清和肝脏胆固醇含量,粪胆汁酸和中性固醇含量,以及胆固醇/胆汁酸稳态相关因子肝脏 ABCG5/ABCG8、BSEP,空肠 ABCG5/ABCG8,回肠 BABP、BAT mRNA 表达。结果显示:分别与 C、CB 组相比较,CT、CBT 组小鼠血清和肝脏胆固醇显著降低($P < 0.05$)、粪胆汁酸量明显增加($P < 0.05$)、粪中性固醇量无显著变化;与 N 组相比较,C/CT/CB/CBT 四组小鼠肝脏 ABCG5/ABCG8、BSEP,空肠 ABCG5/ABCG8 mRNA 表达增加,但四组间无显著差异;与 N 组相比较,C/CT/CB/CBT 四组小鼠回肠 BAT mRNA 表达明显减少,CT 组比 C 组进一步降低。以上结果提示,牛磺酸增加了高胆固醇血症小鼠粪胆汁酸的排出,并不影响粪中性固醇的排出,并且在无外源性胆盐的条件下显示抑制回肠 BAT mRNA 表达的倾向。

关键词:牛磺酸,胆汁酸,胆固醇,小鼠

Effect of taurine on absorption and excretion of cholesterol/bile acids in hypercholesterolemic mice

CHEN Wen¹, Nishimura Naomichi², Yokogoshi Hidehiko³

(1.College of Arts & Science of Beijing Union University, Beijing Key Laboratory of

Bioactive Substances and Functional Foods, Beijing 100191, China;

2.Department of Human Life and Development, Nanyo City University, Nanyo 096-8641, Japan;

3.Laboratory of Nutritional Biochemistry, The University of Shizuoka, Shizuoka 422-8526, Japan)

Abstract: In order to examine the effect of taurine on metabolism of cholesterol and bile acids, 10-weeks-old male C57BL/6 mice were divided into 6 groups: control group (N), high cholesterol diet group (C), high cholesterol and cholate diet group (CB), and their 1% taurine-supplemented groups (NT, CT, CBT, respectively) based on their serum cholesterol levels and body weights. After mice were fed with the respective diets for a week, following indexes were determined: the level of serum and liver cholesterol, fecal bile acids and neutral sterol, mRNA expression of factors involved in cholesterol/bile acids homeostasis (liver ABCG5/ABCG8 and BSEP, jejunum ABCG5/ABCG8, ileum BABP and BAT). The results showed: compared to that of C and CB group respectively, serum and liver cholesterol concentrations in CT and CBT groups were significantly decreased, fecal bile acids level was markedly increased, and no difference in fecal neutral sterol level. The mRNA levels of liver ABCG5/ABCG8 and BSEP, and jejunum ABCG5/ABCG8 were significantly increased in C/CT/CB/CBT groups compared to that in N group, but there was no difference in four groups. I-BAT mRNA level notably reduced in C/CT/CB/CBT groups compared to that in N group, and the decreased tendency was observed in CT group compared to C group. The above results suggested taurine enhanced fecal bile acids excretion but not affected fecal neutral sterol excretion, and tended to decrease ileum BAT gene expression by high cholesterol diet without exogenous cholate in mice.

Key words: taurine; bile acids; cholesterol; mice

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)12-0172-04

收稿日期: 2009-10-19

作者简介: 陈文(1966-), 女, 博士, 副教授, 主要从事营养与功能食品的教学与研究工作。

基金项目: 北京市教委科技发展计划面上项目(KM200511417002); 北京市属高等学校人才强教计划资助项目(2008); 北京市委组织部北京市优秀人才培养资助项目(2007)。

多年来的研究表明,牛磺酸(2-氨基乙磺酸)在改善心血管功能方面有广泛作用,临床及动物实验均证实牛磺酸具有缓解动脉粥样硬化、高血压和胰岛素抵抗等效应^[1-3],被认为是广谱的心血管细胞保护剂。降低血清胆固醇是其重要的生理作用之一。有研究表明,牛磺酸是通过提高胆固醇合成胆汁酸

的限速酶——胆固醇 7 α 羟化酶 (CYP7A1) mRNA 表达以及酶活性来促进胆固醇的降解,提高胆汁酸的合成,从而起到降低胆固醇作用的^[4]。关于牛磺酸是否影响胆固醇的吸收、胆汁酸在肠肝循环中的再吸收等问题,未见报道。三磷酸腺苷结合盒 (ATP binding cassette, ABC) 转运体是一组跨膜蛋白,与 ATP 结合在胞膜和内质网、过氧化物酶体、线粒体等细胞器膜上,介导脂质、氨基酸等多种分子的耗能转运。近年来,有研究报道 ABCG5 和 ABCG8 与脂质代谢有关,调节胆固醇的转运,在胆固醇的吸收和胆汁的分泌等方面起重要作用^[5]。而在胆汁酸的肠肝循环中,又有多种蛋白质参与其转运^[6],胆盐输出泵 (bile salt export pump, BSEP) 将肝脏合成的胆汁酸泵入胆小管,胆汁酸转运体 (bile acid transporter, BAT) 将胆汁酸重吸收入小肠粘膜细胞,与胆汁酸结合蛋白 (bile acid binding protein, BABP) 结合,实现胆汁酸的再吸收。因此,本文从上述影响胆固醇/胆汁酸代谢的相关因子的角度,探讨牛磺酸对胆固醇/胆汁酸吸收与排泄的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇试剂盒 购自 Wako 纯药工业株式会社;RNA 抽提试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司;反转录试剂盒 购自 QIAGEN K.K.公司;PCR 引物 由 KURABO 合成。

扫描仪 Storm 820 Molecular Dynamics Amersham Pharmacia Biotech.

1.2 实验动物及分组

10 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 (购自日本 SLC 株式会社),在光-暗周期为 12h、温度 23 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 的环境下单笼饲养,1 周后依据小鼠的体重和血清胆固醇水平随机分为 6 组:对照组 (N 组)、高胆固醇膳食组 (C 组)、高胆固醇/胆盐膳食组 (CB 组) 以及分别与这三组相对应的牛磺酸添加组 (NT 组、CT 组、CBT 组)。N 组给与小鼠基础饲料,NT 组给与添加了 1% 牛磺酸的基础饲料,C 组给与高胆固醇饲料 (99% 基础饲料 + 1% 胆固醇),CT 组给与添加了 1% 牛磺酸的高胆固醇饲料,CB 组给与高胆固醇/胆盐饲料 (99% 基础饲料 + 1% 胆固醇 + 0.25% 胆盐),CBT 组给与添加了 1% 牛磺酸的高胆固醇/胆盐饲料,各组小鼠均自由进食饮水,饲养 1 周。

1.3 样本采集

采集实验最后 48h 的粪便,冷冻干燥后于 -20 $^{\circ}$ C 保存,以测定粪胆汁酸、中性固醇的含量;禁食一夜后,于上午采集尾血,静置 30min 后离心分离出血清,以测定血脂水平;恢复给食,于同日夜 11:00 时许,用乙醚麻醉后处死小鼠,迅速解剖取出肝脏、空肠、回肠, -70 $^{\circ}$ C 保存,用于总 RNA 的提取,另取部分肝脏于 -20 $^{\circ}$ C 保存,用以测定肝脏脂质含量。

1.4 生化指标分析

1.4.1 血清总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 的测定 分别用总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇试剂盒进行测定。由 TC 和 HDL-C 计算出 LDL + VLDL 值。

1.4.2 肝脏胆固醇 (TC) 的测定 用氯仿:甲醇 (2:1) 将肝脏匀浆后过滤^[7],取部分滤液通 N₂ 挥发去除提取剂,待溶剂挥干后加入含 10% TritonX-100 的异丙醇溶解脂质,随后用试剂盒测定胆固醇含量。

1.4.3 粪胆汁酸、中性固醇水平的测定 粪便冷冻干燥后,以 Sheltawy M.J^[8] 的方法测定胆汁酸,用 Moundras C.^[9] 的方法测定中性固醇含量。

1.4.4 组织中 ABCG5、ABCG8、BSEP、BABP、BAT mRNA 水平的测定 用 Trizol 试剂提取组织中总 RNA。用 Northern Blot 法测定肝脏 CYP7A1、ABCG5、ABCG8、BSEP、空肠 ABCG5、ABCG8,以及回肠 BABP、BAT mRNA 的表达水平,以目的基因和 GAPDH 的灰度值之比,并以 N 组为参比来表示各目的因子 mRNA 的相对表达量。制备 BSEP cDNA 探针时,PCR 引物为: 5'-CAGCATTACAGCTCATTTCAGAGA-3', 5'-ACACTAGTAACCGAACTCG-3',产物 504bp。制备 BAT cDNA 探针时,引物为:5'-CATGACCACTTGCTCCACAC-3',5'-CAAAAAGGTCGAGCAGAAACG-3',产物 519bp。ABCG5、ABCG8、BABP 的 cDNA 探针来自于静冈县立大学营养生理研究室。

1.5 统计学分析

数据以均数 $\pm$ 标准差 (x $\pm$ s) 表示,用 SPSS 统计软件进行 t 检验,P < 0.05 表示差异有显著性。

2 结果与分析

2.1 牛磺酸对高胆固醇血症小鼠血清、肝脏胆固醇水平的影响

小鼠自由摄食、饮水 1 周后,各组间体重、摄食量、肝脏重量均无显著差异。

由表 1 可见,C、CB 组小鼠血清总胆固醇水平明显高于 N 组 (P < 0.05),这主要是由于 LDL + VLDL 的

表 1 牛磺酸对高胆固醇血症小鼠血清、肝脏胆固醇水平的影响 (x $\pm$ s)

组别	血清 (mmol/L)			肝脏 (μ mol/g)
	TC	HDL-C	LDL + VLDL	TC
N 组	3.45 $\pm$ 0.14	2.04 $\pm$ 0.07	1.41 $\pm$ 0.10	22.23 $\pm$ 0.32
NT 组	3.27 $\pm$ 0.20	2.00 $\pm$ 0.07	1.27 $\pm$ 0.15	23.01 $\pm$ 1.15
C 组	4.41 $\pm$ 0.23 *	2.14 $\pm$ 0.18	2.27 $\pm$ 0.19 *	34.14 $\pm$ 1.12 *
CT 组	3.55 $\pm$ 0.31#	1.87 $\pm$ 0.12	1.68 $\pm$ 0.21#	29.01 $\pm$ 0.52#
CB 组	4.48 $\pm$ 0.13 *	1.39 $\pm$ 0.09 *	3.10 $\pm$ 0.17 *#	53.45 $\pm$ 2.54 *#
CBT 组	3.50 $\pm$ 0.12##	1.88 $\pm$ 0.13##	1.62 $\pm$ 0.14##	39.38 $\pm$ 1.50##

注: * :与 N 组比较有显著性差异 (P < 0.05); # :与 C 组比较有显著性差异 (P < 0.05); ## :与 CB 组比较有显著性差异 (P < 0.05),表 2 同。

显著增加引起的,特别是CB组LDL+VLDL水平不仅明显高于N组,比C组也有显著性上升($P < 0.05$)。牛磺酸添加的CT、CBT组小鼠血清总胆固醇分别低于C、CB组($P < 0.05$),主要在于LDL+VLDL的减少。与N组相比较,C组HDL水平无明显变化,但CB组HDL显著降低($P < 0.05$),CBT组HDL得到明显提升($P < 0.05$)。从肝脏胆固醇水平看出,CT、CBT组比C、CB组分别下降了约15%和26%($P < 0.05$),说明牛磺酸有效地降低了肝脏胆固醇含量。

2.2 牛磺酸对高胆固醇血症小鼠粪便中胆汁酸、中性固醇排出量的影响

由表2可见,与N组相比较,C、CB组小鼠粪便中胆汁酸的排出量都明显增加($P < 0.05$),提示无论在有无外源性胆盐的条件下,高胆固醇饲料都能增加粪胆汁酸的排出,CT、CBT组小鼠粪胆汁酸则分别显著高于C、CB组($P < 0.05$),表明牛磺酸进一步增加了粪胆汁酸的排出量。从粪便中性固醇的含量可以看出,C、CB组都远远高于N组,但饲料中牛磺酸的添加并不影响粪便中性固醇排出量。

表2 牛磺酸对高胆固醇血症小鼠粪便中胆汁酸、中性固醇含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	胆汁酸($\mu\text{mol/g}$)	中性固醇($\mu\text{mol/g}$)
N组	16.50 ± 0.17	0.99 ± 0.05
NT组	17.18 ± 0.45	1.09 ± 0.33
C组	$27.32 \pm 0.67^*$	$94.1 \pm 2.7^*$
CT组	$31.71 \pm 1.43^\#$	$97.9 \pm 2.9^*$
CB组	$61.60 \pm 1.85^{* \#}$	$109 \pm 5^{* \#}$
CBT组	$71.18 \pm 2.08^{\# \#}$	$107 \pm 2^{* \#}$

2.3 牛磺酸对小鼠胆固醇/胆汁酸稳态相关因子mRNA表达的影响

图1给出了影响胆固醇、胆汁酸从肝脏排出的相关因子mRNA表达的Northern Blot结果。与N组相比较,C/CT组小鼠肝脏ABCG5和ABCG8 mRNA表达增加,CB/CBT组则进一步增加($P < 0.05$)。从肝脏BSEP mRNA水平看,C/CT/CB/CBT组间无明显不同,但四组都显著高于N组($P < 0.05$)。这些数据表明ABCG5、ABCG8、BSEP mRNA表达受饲料中胆固醇负荷的影响,并不受牛磺酸的影响,提示牛磺酸不影响胆固醇、胆汁酸从肝脏向胆汁的排出。

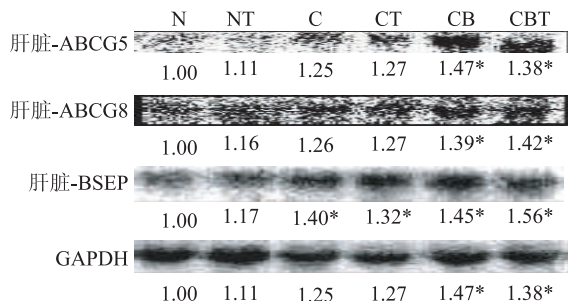


图1 Northern Blot分析ABCG5、ABCG8、BSEP mRNA在肝脏中的表达

注:N:对照组,C:高胆固醇膳食组,

CB:高胆固醇/胆盐膳食组;NT、CT、CBT:分别与

N、C、CB组相对应的牛磺酸添加组;

*:与N组比较有显著性差异($P < 0.05$),图2、图3同。

由图2看出,C/CB组小鼠空肠ABCG5和ABCG8 mRNA表达量比N组显著增加($P < 0.05$),与CT/CBT组相比则无明显不同,这与小鼠粪便中性固醇的排出结果相一致,表明牛磺酸不影响胆固醇的吸收。

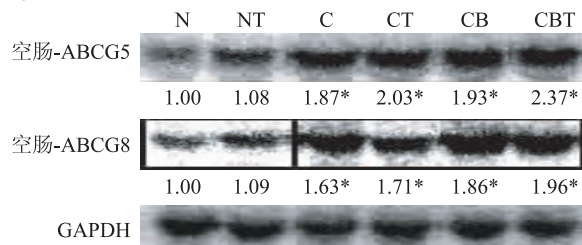


图2 Northern Blot分析ABCG5和ABCG8 mRNA在空肠中的表达

由图3可知,六组间回肠BABP mRNA表达无差异,而回肠BAT mRNA表达则完全不同,C/CT/CB/CBT四组BAT mRNA水平均低于N组,其中CT组与C组比较有减少,而CBT组与CB组相比无显著变化。提示牛磺酸可能影响胆汁酸在回肠的再吸收。

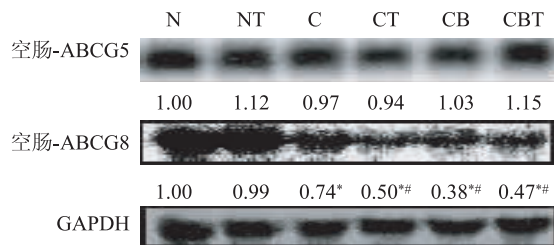


图3 Northern Blot分析BABP和BAT mRNA在回肠中的表达

3 讨论

降低血清胆固醇是牛磺酸重要的生理功能之一,一方面由于其能够与游离胆汁酸结合成牛磺胆酸;另一方面它又能够提高CYP7A1的活性,这两个因素都使得牛磺酸促进了胆汁酸的合成与分泌^[4]。2005年我们曾报道^[10],高胆固醇膳食(无外源性胆盐)并不诱导小鼠CYP7A1 mRNA的大量表达,高胆固醇/胆盐膳食由于含外源性胆汁酸而抑制了小鼠CYP7A1的表达,牛磺酸仅在有无外源性胆盐的条件下才能诱导CYP7A1的表达、提高酶的活性,提示牛磺酸解除了胆汁酸对CYP7A1的反馈性抑制。但无论在有外源性胆盐的高胆固醇膳食条件下,牛磺酸却都能起到降低血清和肝脏胆固醇水平、促进粪胆汁酸排出的作用。因此,有必要从牛磺酸对胆固醇/胆汁酸吸收与排泄的角度探讨牛磺酸的降胆固醇作用机制。

三磷酸腺苷结合盒(ATP binding cassette, ABC)转运体是一组跨膜蛋白,介导脂质、氨基酸等多种分子的耗能转运。ABCG5和ABCG8是ABC转运体的家族成员,两者相互结合形成异二聚体成为完整的ABC转运体后发挥作用,主要表达在肝脏和小肠。2002年,Yu L等^[11-12]报道ABCG5和ABCG8参与了饮食胆固醇吸收以及胆固醇排入胆汁过程,其表达增加后能够引起肝脏胆固醇分泌增加、小肠胆固醇

吸收减少、以及中性固醇排泄增多。在胆汁酸的肠肝循环中,有多种蛋白质参与其转运^[6]。胆汁酸在肝脏合成后由胆盐输出泵 BSEP 泵入胆小管,后随胆汁排入小肠,结合胆汁酸在回肠通过胆汁酸转运体 BAT 被重吸收入小肠粘膜细胞,再与胞内胆汁酸结合蛋白 BABP 相结合,实现胆汁酸从小肠粘膜细胞的肠腔面向基底侧面的转运。本文针对这些影响胆固醇/胆汁酸稳态的相关因子,探讨了牛磺酸对胆固醇/胆汁酸吸收与排泄的影响。

本实验的结果显示,无论有无外源性胆盐的参与,高胆固醇膳食都能诱导小鼠(C/CB组)肝脏和小肠 ABCG5/G8 mRNA 的大量表达,这与小鼠粪便中性固醇的大量排出相一致,表示饮食中胆固醇的负荷促进了肝脏胆固醇的分泌、抑制了小肠胆固醇的吸收。而牛磺酸添加组小鼠(CT/CBT) ABCG5/G8 的表达和粪中性固醇的排泄量都未进一步增加,提示牛磺酸并不是通过抑制高胆固醇血症小鼠胆固醇的吸收而起到降胆固醇作用的。从肝脏 BSEP 的表达水平看出,高胆固醇负荷的 C/CT/CB/CBT 四组均高于对照组,但四组间无差别,提示牛磺酸可能不影响胆汁酸从肝脏的泵出,但需要进一步探讨牛磺酸是否影响 BSEP 蛋白表达水平。

本实验中,不同膳食对小鼠回肠 BABP 的表达无影响,但对回肠 BAT 的影响则完全不同。四组高胆固醇负荷(C/CT/CB/CBT)膳食降低了小鼠回肠 BAT mRNA 水平。其中,无外源性胆盐添加的 CT 组 BAT mRNA 水平比 C 组减少,提示牛磺酸可能抑制胆汁酸的再吸收,而有外源性胆盐添加的 CBT 组与 CB 组无明显变化,提示牛磺酸并未抑制胆汁酸的再吸收。这与我们 2005 年的报道相一致^[10],牛磺酸仅在有外源性胆盐的条件下才诱导 CYP7A1 的表达,表明牛磺酸解除了胆汁酸对 CYP7A1 的反馈性抑制,因此并不抑制胆汁酸的再吸收。本实验中粪胆汁酸的结果显示,无论在有外源性胆盐的高胆固醇膳食条件下,牛磺酸都促进了胆汁酸的排出。

综上所述,无论有无外源性胆盐的负荷,牛磺酸都可促进高胆固醇血症小鼠胆汁酸的排出而不影响胆固醇的吸收,在无外源性胆盐的条件下,牛磺酸可能抑制高胆固醇血症小鼠胆汁酸的再吸收。关于牛磺酸对胆汁酸再吸收的影响机制及其与 CAP7A1 表达机制的关系有待进一步探讨。

参考文献

- [1] Shigeru M, Yukiko K, Takanobu S, et al. Taurine Suppresses Development of Atherosclerosis in Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL) Rabbit s [J]. Atherosclerosis, 2002, 163:79-87.
- [2] Militante J D, Lombardini J B. Treatment of Hypertention with Oral Taurine: Experimental and Clinical Studies [J]. Amino Acids, 2002, 23:381-393.
- [3] Franconi F, DiLeo M A, Bennardini F, et al. Is Taurine Beneficial in Reducing Risk Factors for Diabetes Mellitus? [J]. Neurochem Res, 2004, 29:143-150.
- [4] Yokogoshi Y, Mochizuki H, Nanami K, et al. Dietary taurine enhances cholesterol degradation and reduces serum and liver cholesterol concentrations in rats fed a high-cholesterol diet [J]. Journal of Nutrition, 1999, 129:1705-1712.
- [5] 王勇, 韩天权, 张圣道. ABCG5 和 ABCG8 与胆固醇代谢关系的研究进展[J]. 国际外科学杂志, 2006, 33(2):125-128.
- [6] 李长虹, 王伟, 王绿娅, 等. 回肠胆汁酸结合蛋白的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006, 26(2):102-105.
- [7] Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues [J]. Journal of Biological Chemistry, 1957, 226:497-509.
- [8] Sheltawy M J, Losowsky M S. Determination of fecal bile acid by an enzymatic method [J]. Clinica Chimica Acta, 1975, 64:127-132.
- [9] Moundras C, Behr S R, Remesy C, et al. Fecal losses of sterols and bile acids induced by feeding rats guar gum are due to greater pool size and liver bile acid secretion [J]. J Nutr, 1997, 127:1068-1076.
- [10] W Chen, K Suruga, N Nishimura, et al. Comparative regulation of major enzymes in bile acids biosynthesis pathways by cholesterol, cholic acid and taurine in mice and rats [J]. Life Sciences, 2005, 77(7):746-757.
- [11] Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, et al. Over expression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol [J]. J Clin Invest, 2002, 110(5):671-680.
- [12] Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, et al. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(25):37-42.

(上接第 171 页)

[4] ALONSO L R, MUZQUIZ A R. The effect of extrusion cooking on mineral bioavailability in pea and kidney bean seed meals [J]. Animal Feed Science and Technology, 2001(3):1-13.

[5] 吴晓斌, 任凤莲, 等. 百合皂苷的提取、纯化及其鉴定 [J]. 广州化学, 2005, 30(2):36-40.

[6] 崔恒林, 徐斌, 董英. 苦瓜皂甙的提取过程研究 [J]. 江苏大学学报, 2004, 25(5):372-375.