

多不饱和脂肪酸饮食对载脂蛋白 E 缺失小鼠 含载脂蛋白 B100 脂蛋白代谢的影响*

张 暉 张燕燕 叶玲敏 潘 杰**

(山东师范大学生命科学学院, “动物抗性生物学” 省级重点实验室, 济南 250014)

摘要 探讨不同多不饱和脂肪酸饮食对载脂蛋白 E(apoE)缺失小鼠含 apoB100 脂蛋白代谢的影响。2 月龄雄性载脂蛋白 E 缺失小鼠添加 2% 紫苏籽油或红花油饮食干预 6 周, 检测其血脂和血清 apoB100 水平; 测定肝脏组织中 HMG-CoA 还原酶活性; 使用实时定量 PCR 分析肝组织中含 apoB100 脂蛋白代谢相关基因表达; 蛋白质印迹(Western blot)检测 PPAR α 蛋白表达; 油红 O 染色检测肝细胞中脂质积累。结果显示, 紫苏籽油饮食干预可降低血清 LDL-C 和 apoB100 水平, 降低肝组织中 HMG-CoA 还原酶活性以及 apoB100、FAS、HMG-CoAR、ACAT2、LRP、LDLR 和 SREBP-1c 基因 mRNA 的表达, 显著升高转录因子 PPAR α 的 mRNA 和蛋白质水平, 明显降低肝脏中脂质沉积。而红花油饮食干预后升高了小鼠血清甘油三酯和高密度脂蛋白胆固醇以及肝脏 apoB100 的 mRNA 表达水平, 降低 PPAR α 的 mRNA 和蛋白质水平, 明显促进肝脏中脂质积累。结果提示在饮食中添加紫苏籽油可有效降低含 apoB100 脂蛋白的代谢, 对动脉粥样硬化以及脂肪肝等疾病有更好的保护作用, 对于正常人群以及家族性 III 型高脂蛋白血症患者的日常膳食提供理论依据。

关键词 多不饱和脂肪酸, 载脂蛋白 E 缺失, apoB100, 脂代谢

学科分类号 Q547, R151

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0118

多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs)是指含有 2 个或 2 个以上双键且碳链长度为 18~22 个碳原子的直链脂肪酸。根据甲基端第 1 个双键的位置不同分为 n-3 系和 n-6 系 PUFAs。n-3 系 PUFAs 母体为 α 亚麻酸(α linolenic acid, ALA), 在 $\Delta 5$ 和 $\Delta 6$ 去饱和酶催化下可转化为二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexenoic acid, DHA)。n-6 系 PUFAs 母体为亚油酸(linoleic acid, LA), 可衍生为 γ 亚麻酸(γ linolenic acid, GLA)和花生四烯酸(arachidonic acid, AA)。高等动物不能自身合成 ALA 和 LA, 需从食物中获取, 被称之为必需脂肪酸。

研究发现, 膳食脂肪酸会对血脂以及心血管疾病产生不同的效应^[1-2], 不同类型的 PUFAs 可调控脂质代谢的过程, 其中 n-3 系 PUFAs 可降低血清总胆固醇(total cholesterol, TC)和甘油三酯(triglyceride, TG)水平^[3]。20 世纪 80 年代, EPA 和 DHA 类深海鱼油产品与药物联合用于治疗混合性

高脂血症, 取得较好的疗效, 然而深海鱼油来源相对匮乏, 且易氧化而对身体造成伤害。而 ALA 进入人体后, 能够转化成 EPA 和 DHA, 其抗氧化性优于比鱼油, 广泛分布于陆生植物中, 尤其在紫苏籽油和亚麻籽油中含量丰富。n-6 系 PUFAs 同样具有降低血清 TC 和低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL-C)水平的能力, 且 LA 在自然界中更易获得和摄取^[4-7], 尤其在红花油、玉米油和葵花籽油中含量丰富。

载脂蛋白 B100(apolipoprotein B100, apoB100)是肝细胞合成极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)的主要载脂蛋白, 是 VLDL 和 LDL 的主要结构蛋白, 对 VLDL 的组装分泌以及

* 国家自然科学基金资助项目(81070685, 81100193)。

** 通讯联系人。

Tel: 0531-86180745, E-mail: jiepan@sdnu.edu.cn

收稿日期: 2015-02-01, 接受日期: 2015-07-14

转运具有重要的作用^[8-9]。肝细胞内过量合成 apoB100 导致血浆中 VLDL 和 LDL 水平升高, 可引发动脉粥样硬化等心脑血管疾病, 还可导致肝细胞内脂质积累, 引发脂肪肝。研究发现, 用不同种类中链脂肪酸处理鸡原代肝细胞, 其中饱和脂肪酸可明显减少 VLDL 的合成和分泌, 而不饱和脂肪酸却导致 VLDL 的合成和分泌增加^[10], 说明脂肪酸的不饱和度影响 VLDL 的合成和分泌。然而, n-3 系与 n-6 系 PUFAs 影响含 apoB100 脂蛋白代谢的机制尚不完全清楚。

载脂蛋白 E 缺失(apoE^{-/-})小鼠因 apoE 缺失导致 VLDL 和 LDL 在血液中积累, 自发产生高脂血症, 可模拟人类家族性 III 型高脂蛋白血症患者, 因此本实验在基础鼠粮中添加 n-3 系或 n-6 系 PUFAs 饮食干预, 探讨 n-3 系和 n-6 系 PUFAs 对 apoE^{-/-} 小鼠含 apoB100 脂蛋白代谢的影响, 以期对家族性 III 型高脂蛋白血症患者的日常膳食结构改善, 提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Rotor-Gene 3000 Real-time PCR 仪 (Corbett Research); 多功能酶标仪(Molecular Device); 超速离心机(Beckman L7-65); 倒置显微镜(Olympus IX-71)。

紫苏籽油(河南利诺生化有限责任公司, α 亚麻酸乙酯含量 81.77%); 红花油(河南许昌元化生物科技有限公司, LA 含量 81%); 游离胆固醇(free cholesterol, FC)、TC、TG、LDL-C 和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein, HDL-C)检测试剂盒(北京中生北控生物科技股份有限公司); 血清 apoB100 检测试剂盒(北京中生北控生物科技股份有限公司); Bradford 蛋白测定试剂盒(Tiagen); 二硫苏糖醇(华美生物工程有限公司); 半胱胺(上海华扩达生化科技有限公司); NADPH(华美生物工程有限公司); HMG-CoA(Sigma); 引物合成(上海博亚生物技术有限公司); Trizol(Invitrogen); DNase I (TaKaRa); Quant M-MLV 反转录酶(Tiagen); Taq 聚合酶(Promega); 10 000 xSybergreen (Molecular Probes); 油红 O 和苏木精(Amresco)。

1.2 小鼠饮食与分组

在基础鼠粮中分别添加 2%紫苏籽油和红花油配制含 5%总脂肪鼠粮, 添加紫苏籽油和红花油后鼠粮中 n-6 PUFAs/n-3 PUFAs 值分别为 1.28 和 68.26,

对照组为基础鼠粮, 气相-质谱分析确定三种饮食中脂肪酸组成, 详见表 1。干预组鼠粮于 45℃ 烘干, -20℃ 密闭保存。

Table 1 Fatty acids composition of the three diets

Fatty acids	g/100g		
	Perilla seed oil group	Safflower oil group	Control group
SFAs	10.25	12.64	16.77
C14:0	0.44	0.44	0.73
C16:0	8.22	9.42	13.69
C18:0	1.27	1.70	2.10
C20:0	0.15	0.15	0.25
MUFAs	12.95	15.92	19.70
C16:1	0.39	0.39	0.66
C18:1	12.39	15.36	18.76
C20:1	0.18	0.18	0.30
PUFAs	77.05	71.46	63.53
C18:2	43.29	70.43	61.81
C18:3	32.73	0	0
C20:5	0.65	0.65	1.08
C22:6	0.39	0.39	0.64
Ratio n-6 to n-3	1.28	68.26	35.98

SFAs: Saturated fatty acids; MUFAs: Monounsaturated fatty acids; PUFAs: Polyunsaturated fatty acids.

所有小鼠自出生第 22 天起饲喂基础鼠粮, 选取 2 月龄雄性小鼠(体重 26.0 ± 1.0 g), 随机分为 3 组, 每组 12 只。其中干预组分别饮食添加紫苏籽油和红花油鼠粮, 对照组饲喂基础鼠粮, 各组饮食持续 6 周或 13 周。每日添加新鲜鼠粮, 自由摄食, 每 3 天称量一次体重。

1.3 血脂分析

饮食干预小鼠 6 周后, 取血分离血清, 酶法分析血清 FC、TC 和 TG 含量, 直接法分析 LDL-C 和 HDL-C 含量, 所有操作按照试剂盒使用说明进行, CE 采用 TC-FC 计算所得。

1.4 血清 apoB100 浓度测定

免疫透射比浊法测定饮食干预 6 周的小鼠血清中 apoB100 浓度, 按试剂盒操作说明操作, 检测 340 nm 吸光度(A_{340})。

1.5 肝脏羟甲基戊二酸单酰 CoA(HMG-CoA)还原酶活性测定

取干预 6 周后的小鼠肝组织 2 g, 10 ml 匀浆缓冲液 (0.1 mol/L 蔗糖, 0.05 mol/L KCl, 0.04 mol/L

K₃PO₄, 0.03 mol/L EDTA, 10 mmol/L 二硫苏糖醇, pH 7.2)冰上匀浆. 12 000 *g* 4℃ 离心 15 min, 取上清, 105 000 *g* 4℃ 超速离心 1 h. 取沉淀用 0.5 ml 匀浆缓冲液重悬. 以 6℃~8℃/min 冷冻速度降至 -20℃, 过夜. 次日将微粒体溶液于室温缓慢融化. 用匀浆缓冲液定容至 1.0 ml, 加入 1.0 ml 甘油, 匀浆. 匀浆液 37℃ 水浴 1 h. 加入 2.0 ml 匀浆缓冲液, 100 000 *g* 25℃ 超速离心 60 min. 取上清液 1.0 ml, 备用. 利用 Bradford 法定量肝脏微粒体蛋白质浓度. HMG-CoA 还原酶活性测定参考 Caruso 等方法^[11]进行, 酶活力单位定义为每分钟 每毫克蛋白氧化 1 nmol NADPH 所需的酶量(nmol·min⁻¹·mg⁻¹).

1.6 脂代谢相关基因 mRNA 水平检测

Trizol 法提取饮食干预 6 周后的小鼠肝组织总 RNA, A₂₆₀/A₂₈₀ 测定总 RNA 纯度, 凝胶电泳检测总 RNA 质量, 利用反转录试剂盒反转录为 cDNA. 根据 GenBank 中基因 mRNA 的序列设计引物(表 2)进行实时荧光定量 PCR 反应, Sybergreen 法检测目的基因的扩增, β-actin 为内参基因. 所有反应均设 3 个重复. 每个样品的目的基因除以其管家基因, 为该基因校正后的相对含量. 各干预组基因相对含量与对照组相比, 为该基因相对于对照组的相对含量.

Table 2 Primers used for Real-time RT-PCR analysis

Genes	Primers	Oligonucleotide sequence (5'→3')	Annealing temperature/(℃)	Length/bp
apoB100	F	TCGAGCACAGATGACCAGAGT	59	201
	R	CTTAGAAGCCTTGGGCACAT		
FAS	F	ACCCAAGCGGTCTGGAAAG	59	212
	R	CGGATGCCTCTGAACCACTC		
HMG-CoAR	F	CGAGCCACGACCTAATGAAGA	59	255
	R	GCTCCCATCACCAAGGAATAAT		
LPL	F	CTTCTTGATTACACGGAGGT	59	229
	R	ATGGCATTTCACAAACACTG		
ACAT2	F	CCTTACTTTCTTACTGATGGGACA	58	147
	R	GGACCAGGAGACTATTCTTGCTA		
LRP	F	GCGGATGCTGACTGTATGGAC	60	194
	R	TTGGGAGGGCAGATGAACC		
LDLR	F	TACCTACCCCTCAAGACAGATG	59	196
	R	CAGCCCAGCTTTGCTCTTAT		
SREBP1c	F	TGGCTTGGTGATGCTATGTT	59	257
	R	TAAGGGGTGGGAGTAGAGG		
PPARα	F	TCTGTGGGCTCACTGTTCT	59	165
	R	AGGGCTCATCCTGTCTTTG		
β-Actin	F	CCTCTATGCCAACACAGTGC	59	211
	R	GTACTCCTGCTTGCTGATCC		

F: Forward primer; R: Reverse primer.

1.7 PPARα 蛋白水平检测

取饮食干预 6 周后的小鼠肝组织 100 mg, 常法抽提总蛋白, 用 Bradford 法测定蛋白质浓度, 变性后电泳, 蛋白转移至 PVDF 膜, 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h, PPARα 一抗(1:100, Santacruz)4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 10 min×4 次, HRP 偶联羊抗鼠二抗(1:10 000, Jackson)室温孵育 2 h, TBST 洗膜 10 min×4 次, ECL 反应 2 min, 暗室中曝光、显影和定影. HRP 偶联内参 GAPDH 一抗孵育 2 h 后 TBST 洗膜 10 min×4 次, ECL 反应 2 min, 曝

光、显影和定影. 利用 QuantiScan 3.0 软件测量目的蛋白和内参蛋白条带灰度值, 相对表达量以 PPARα 灰度值与内参 GAPDH 灰度值比值表示.

1.8 组织形态学分析

取饮食干预 13 周的小鼠肝脏组织, 4%甲醛溶液固定 48 h, 自来水漂洗后 30%蔗糖溶液渗透 12 h, 连续冷冻切片(6~8 μm), 切片进行油红 O 染色, 苏木素复染, 甘油封片后于 640 倍光镜下显微拍照.

1.9 统计学分析

实验所得数据(形态学除外)采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,

用 SPSS 17.0 软件进行独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 小鼠体重增长

干预期间小鼠生长状态良好, 各组小鼠体重均随着年龄的增长而增加。各时间点数值统计分析, 各组小鼠间无显著差异($P > 0.05$)。

2.2 小鼠血脂变化

饮食干预 6 周, 与对照组相比, 添加紫苏籽油饮食后显著降低了血清 LDL-C 水平($P < 0.05$), 而饮食中添加红花油显著升高了血清 TG 和 HDL-C 水平, 显著降低了 LDL-C 水平($P < 0.05$)(表 3)。两种饮食对血清 FC、CE 和 TC 水平均未有显著性影响($P > 0.05$)。

Table 3 Serum lipids of three different diets mice

	Perilla seed oil group	Safflower oil group	Control group
$c(\text{FC})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	5.65 ± 0.96	6.37 ± 1.36	6.03 ± 1.55
$c(\text{CE})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	9.29 ± 1.27	8.87 ± 1.26	8.61 ± 1.50
$c(\text{TC})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	15.06 ± 1.75	15.00 ± 2.51	14.64 ± 2.86
$c(\text{TG})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	1.79 ± 0.37	$2.23 \pm 0.81^*$	1.56 ± 0.58
$c(\text{LDL-C})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	$6.44 \pm 1.49^*$	$6.68 \pm 1.35^*$	7.77 ± 1.69
$c(\text{HDL-C})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	3.11 ± 0.67	$4.06 \pm 0.99^*$	2.82 ± 0.74

Values are $\bar{x} \pm s$, $n=12$. $^*P < 0.05$, compared with the control group.

2.3 血清 apoB100 含量测定

血清 apoB100 测定结果显示: 与对照组相比, 饮食中添加 2% 紫苏籽油干预 6 周, 能显著降低血清 apoB100 水平($P < 0.05$), 而添加红花油饮食并没有影响 apoB100 含量($P > 0.05$, 图 1)。

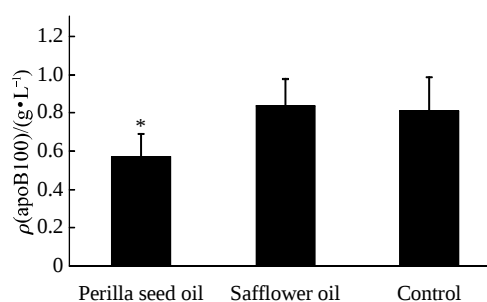


Fig. 1 Serum apoB100 concentration of different dietary intervention

Data are shown as $\bar{x} \pm s$. $^*P < 0.05$, compared with the control group.

2.4 肝脏 HMG-CoA 还原酶活性测定

分离肝脏微粒体体外测定 HMG-CoA 还原酶活性, 结果表明: 与对照组相比, 添加紫苏籽油饮食后能够显著抑制 HMG-CoA 还原酶活性($(30\ 585 \pm 5\ 934) \text{ vs } (44\ 176 \pm 6\ 158)$, $P < 0.05$), 而添加红花油饮食后有增加 HMG-CoA 还原酶活性的趋势, 但无统计学意义($P > 0.05$, 图 2)。

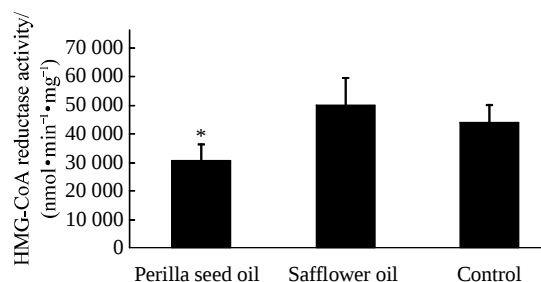


Fig. 2 HMG-CoA reductase activities of different dietary groups in liver

HMG-CoA reductase activity in mice liver microsomes was determined in the presence of the perilla seed oil or safflower oil. Data are shown as $\bar{x} \pm s$. $^*P < 0.05$, compared with the control group.

2.5 脂代谢相关基因 mRNA 表达

为进一步阐明 PUFAs 调控含 apoB100 脂蛋白的代谢机制, 本实验选择了与 apoB100 代谢相关的基因进行 Real-time RT-PCR 分析, 结果表明: 与对照组相比, 饮食中添加紫苏籽油可以显著降低 apoB100、FAS、HMG-CoA 还原酶、ACAT2、LRP 和 LDLR 基因 mRNA 的表达, 同时可以显著降低转录因子 SREBP-1c 的 mRNA 水平, 显著升高转录因子 PPAR α 的 mRNA 水平($P < 0.05$, 图 3)。而饮食中添加红花油, 能够显著升高肝脏 apoB100 的 mRNA 水平, 显著降低 PPAR α 的 mRNA 水平($P < 0.05$)。两种 PUFAs 饮食干预对 LPL 表达均无影响($P > 0.05$)。

2.6 PPAR α 蛋白表达变化

利用蛋白质印迹(Western blot)方法分析不同 PUFAs 饮食干预 6 周小鼠肝脏组织中转录因子 PPAR α 的蛋白质水平, 结果显示, 饮食中添加紫苏籽油, 可以显著促进小鼠肝脏 PPAR α 蛋白表达, 而添加红花油饮食, 显著降低 PPAR α 蛋白表达(图 4)。

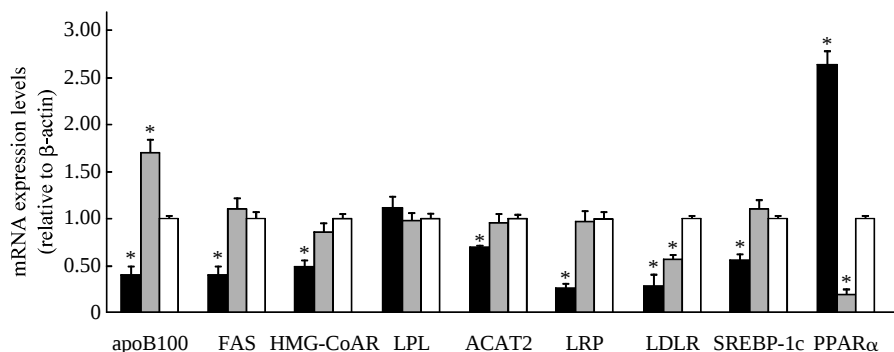


Fig. 3 Effect of different diets on hepatic genes mRNA level involved in apoB100 containing lipoprotein metabolism

Expression levels of mRNA are indicated as fold differences compared with mice fed the control diet. Data are shown as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, compared with the control group. ■: Perilla seed oil; ▒: Safflower oil; □: Control.

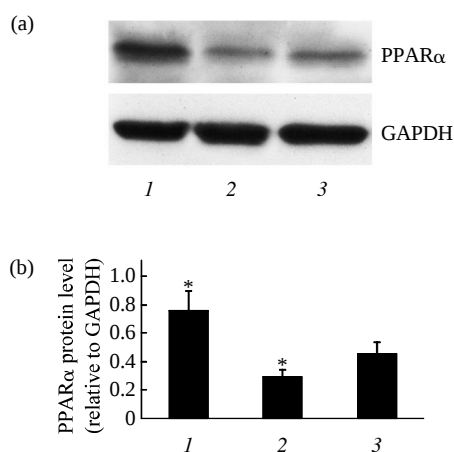


Fig. 4 PPARα protein level was detected with Western blot

(a) Liver protein was extracted for measurement of PPARα by Western blot. (b) Results of Western blot were quantified by QuantiScan 3.0 software, presented as PPARα/GAPDH ($\bar{x} \pm s$). * $P < 0.05$, compared with the control group. 1: Perilla seed oil; 2: Safflower oil; 3: Control.

2.7 肝脏组织病理形态学分析

饮食干预 13 周后, 小鼠肝脏固定后经冷冻切片, 油红 O 染色、苏木素复染, 结果显示, 与对照组相比, 紫苏籽油干预组小鼠肝脏油红 O 阳性染色细胞明显减少, 着色较轻(图 5a), 而红花油干预组肝脏油红 O 阳性染色细胞明显增多, 几乎所有肝细胞内均有明显可见的油红 O 着色, 且着色较重(图 5b)。

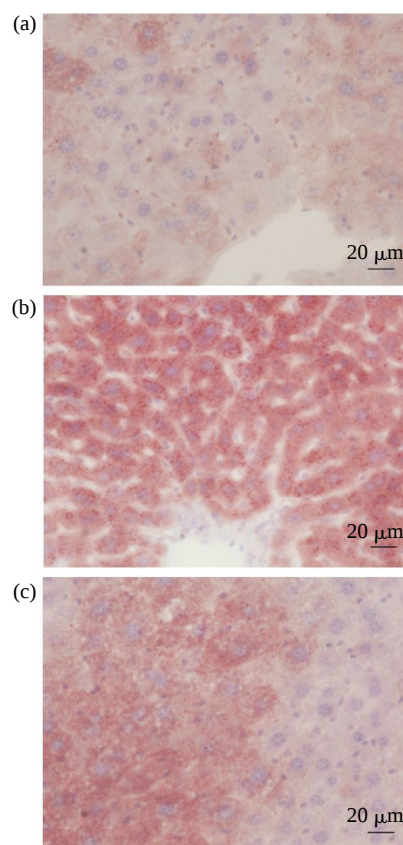


Fig. 5 Histopathological analysis of liver

The representative result of liver morphology after 13 weeks intervention. Mice were treated with perilla seed oil or safflower oil by daily oral administration for 13 weeks. Liver was removed and fixed. Cryostat sections were prepared and stained with Oil Red O (red). The nuclei were counterstained with Hematoxylin (blue). (a) Perilla seed oil group. (b) Safflower oil group. (c) Control group.

3 讨 论

本实验利用 apoE^{-/-} 小鼠模拟人类家族性Ⅲ型高脂蛋白血症患者, 通过在基础鼠粮中添加紫苏籽油或红花油饮食干预, 探讨 n-3 或 n-6 系 PUFAs 对含 apoB100 脂蛋白代谢的影响。

结果表明, 添加紫苏籽油饮食干预显著降低血清 LDL-C 和 apoB100 水平, 抑制 HMG-CoA 还原酶活性, 降低 FAS 及其调控基因 SREBP-1c、apoB100、HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达水平, 说明 n-3 系 PUFAs 能够抑制肝脏脂肪酸和胆固醇的合成以及 VLDL 的合成组装, 这与已报道的研究结果是一致的^[12-14]。而添加红花油饮食后同样显著降低了血清 LDL-C 浓度, 升高了 apoB100 mRNA 水平, 其血清中含量虽然有升高的趋势但无显著性差异。研究表明, apoB100 除了合成受到调控外, 其泛素化降解和自噬降解也是调控其细胞内含量的重要途径^[15-16], 血浆中 apoB100 水平可能与 apoB100 的合成、降解有关。也有研究显示 n-3 系 PUFAs 可增强新合成的 apoB100 的降解^[17], 提示紫苏籽油饮食后可以抑制 apoB100 的合成, 同时促进 apoB100 的降解, 最终导致血清中较低的 apoB100 含量。红花油饮食后对 FAS 和 HMG-CoA 还原酶的表达以及 HMG-CoA 还原酶活性无明显作用, 说明 n-6 系 PUFAs 对脂肪酸和胆固醇的合成过程无明显影响, 但本实验中血清中 LDL-C 水平明显降低, 与已报道的结果一致^[4-7], 其机制可能与 LDL 的清除有关。另外, 本实验还对 VLDL 代谢相关基因 ACAT2、LPL、LRP 和 LDLR 的 mRNA 表达进行了分析, 结果提示与红花油相比, 紫苏籽油饮食可以降低 VLDL 的转运代谢。

PPAR α 是重要的调控脂肪酸分解的转录因子, PUFAs 是其重要配体, 可以激活 PPAR α 的活性。本实验检测了肝脏 PPAR α mRNA 和蛋白质水平的表达, 结果显示紫苏籽油饮食后显著升高了 PPAR α mRNA 和蛋白质水平, 而红花油饮食则显著降低 PPAR α mRNA 和蛋白质水平。提示 n-3 或 n-6 系 PUFAs 对 PPAR α 的调控有差异。与红花油相比, 紫苏籽油饮食抑制肝细胞内脂肪酸和胆固醇的合成, 同时促进脂肪分解, 这与肝细胞内脂质积累明显减少的结果是一致的。

综上所述, 饮食中添加紫苏籽油和红花油, 显著降低了 apoE^{-/-} 小鼠血清 LDL 水平, 与红花油相比, 紫苏籽油饮食可以显著降低肝脏脂肪酸和胆固

醇的合成, 降低含 apoB100 脂蛋白的合成, 同时促进脂质分解, 降低肝细胞内脂质积累, 对动脉粥样硬化及脂肪肝等疾病有更好的保护作用, 对正常人群特别是家族性Ⅲ型高脂蛋白血症患者日常膳食提供数据支持。

参 考 文 献

- [1] Fernandez M L, West K L. Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *J Nutr*, 2005, **135**(9): 2075-2078
- [2] Mori TA. Dietary n-3 PUFA and CVD: a review of the evidence. *Proc Nutr Soc*, 2014, **73**(1):57-64
- [3] Jump D B, Depner C M, Tripathy S. Omega-3 fatty acid supplementation and cardiovascular disease. *J Lipid Res*, 2012, **53**(12): 2525-2545
- [4] Kinsell L W, Partridge J, Boling L, *et al.* Dietary modification of serum cholesterol and phospholipid levels. *J Clin Endocrinol Metab*, 1952, **12**(7): 909-913
- [5] Ahrens EH Jr, Insull W Jr, Blomstrand R, *et al.* The influence of dietary fats on serum-lipid levels in man. *Lancet*, 1957, **272**(6976): 943-953
- [6] Czernichow S, Thomas D, Bruckert E. n-6 Fatty acids and cardiovascular health: a review of the evidence for dietary intake recommendations. *Br J Nutr*, 2010, **104**(6): 788-796
- [7] van Schalkwijk D B, Pasman W J, Hendriks H F, *et al.* Dietary medium chain fatty acid supplementation leads to reduced VLDL lipolysis and uptake rates in comparison to linoleic acid supplementation. *PLoS ONE*, 2014, **9**(7): e100376
- [8] Higgins J A. Evidence that during very low density lipoprotein assembly in rat hepatocytes most of the triacylglycerol and phospholipid are packaged with apolipoprotein B in the Golgi complex. *FEBS Lett*, 1988, **232**(2): 405-408
- [9] Young S G. Recent progress in understanding apolipoprotein B. *Circulation*, 1990, **82**(5): 1574-1594
- [10] Sato K, Cho Y, Tachibana S, *et al.* Impairment of VLDL secretion by medium-chain fatty acids in chicken primary hepatocytes is affected by the chain length. *J Nutr*, 2005, **135**(7): 1636-1641
- [11] Caruso M G, Notarnicola M, Santillo M, *et al.* Enhanced 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human colorectal cancer not expressing low density lipoprotein receptor. *Anticancer Res*, 1999, **19**(1A): 451-454
- [12] Conquer J A, Holub B J. Supplementation with an algae source of docosahexaenoic acid increases (n-3) fatty acid status and alters selected risk factors for heart disease in vegetarian subjects. *J Nutr*, 1996, **126**(12): 3032-3039
- [13] Davidson M H, Maki K C, Kalkowski J, *et al.* Effects of docosahexaenoic acid on serum lipoproteins in patients with combined hyperlipidemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Coll Nutr*, 1997, **16**(3): 236-243
- [14] Mozaffarian D, Wu J H. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol*, 2011, **58**(20): 2047-2067

- [15] Christian P, Sacco J, Adeli K. Autophagy: Emerging roles in lipid homeostasis and metabolic control. *Biochim Biophys Acta*, 2013, **1831**(4): 819–824
- [16] Yeung S J, Chen S H, Chan L. Ubiquitin-proteasome pathway mediates intracellular degradation of apolipoprotein B. *Biochemistry* (NY), 1996, **35**(43): 13843–13848
- [17] Caviglia J M, Gayet C, Ota T, *et al.* Different fatty acids inhibit apoB100 secretion by different pathways: unique roles for ER stress, ceramide, and autophagy. *J Lipid Res*, 2011, **52** (9): 1636–1651

Effect of Polyunsaturated Fatty Acids on The Metabolism of apoB100-Containing Lipoproteins in Apolipoprotein E Deficient Mice*

ZHANG Liang, ZHANG Yan-Yan, YE Ling-Min, PAN Jie

(College of Life Sciences, Shandong Normal University, Key Laboratory of Animal Resistance Biology, Shandong Province, Jinan 250014, China)

Abstract To explore the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on the metabolism of apoB100-containing lipoproteins in apolipoprotein E deficient (apoE^{-/-}) mice, which exists similar symptoms with human type III familial hyperlipoproteinemia, two months old male apoE^{-/-} mice were fed the perilla seed oil or safflower oil diet and the control diet, respectively, for 6 weeks. Serum lipids, apoB100 and hepatic HMG-CoA reductase were determined after 6 weeks intervention. The hepatic genes mRNA abundance involved in apoB100 containing lipoprotein metabolism were detected with real time RT-PCR. The hepatic PPAR α protein expression was determined by Western blot. The hepatic lipid accumulation was detected by Oil Red O staining after frozen section. The results showed that the mice fed with the perilla seed oil diet decreased the serum LDL-C and apoB100 and HMG-CoA reductase activity. The hepatic genes such as FAS, apoB100, HMG-CoAR, ACAT2, LRP, LDLR and SREBP-1c were decreased significantly compared with the control group. The mRNA and protein expression of PPAR α increased significantly in mice fed the perilla seed oil diet, while decreased significantly in mice fed the safflower oil diet compared with the control group. The mice fed the safflower oil diet increased the serum triglyceride and HDL-C and the hepatic apoB100 mRNA level compared with the control group. The hepatic lipid accumulation was decreased in the mice fed the perilla seed oil diet, and was increased in the safflower oil diet compared with the control group. The results indicated that dietary perilla seed oil decreased obviously the metabolism of apoB 100-containing lipoprotein, which was benefit for the atherosclerosis and the fatty liver diseases, providing theoretical basis for the dietary of population and the human type III familial hyperlipoproteinemia.

Key words poly unsaturated fatty acids, apolipoprotein E deficient, apolipoprotein B100, lipid metabolism

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0118

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81070685, 81100193).

**Corresponding author.

Tel: 86-531-86180745, E-mail: jiepan@sdu.edu.cn

Received: February 1, 2015 Accepted: July 14, 2015