

实验性糖尿病大鼠肝过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化及 D-双功能蛋白活性变化的初步研究*

李 静¹⁾ 宋光耀¹⁾ 姜玲玲²⁾** 张文杰¹⁾ 冯志山³⁾

(¹⁾ 河北省人民医院老年医学重点实验室, 石家庄 050051;

²⁾ 河北医科大学生物化学与分子生物学教研室, 石家庄 050017; ³⁾ 河北省人民医院检验科, 石家庄 050051)

摘要 为研究过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化及 D-双功能蛋白在糖尿病脂代谢紊乱中所起的作用, 分析了链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠肝脏过氧化物酶体数量和过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化及 D-双功能蛋白活性的改变, 并用蛋白质印迹检测过氧化氢酶和 D-双功能蛋白的表达量。发现糖尿病大鼠肝脏过氧化物酶体增殖, 过氧化氢酶蛋白量和酶活性显著增加, 过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化增强, D-双功能蛋白含量和酶活性显著降低, 脂酰 CoA 氧化酶、L-3-羟脂酰 CoA 脱氢酶活性显著增加。对过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化增强和 D-双功能蛋白活性降低与糖尿病脂代谢紊乱的关系进行了初步探讨。

关键词 过氧化物酶体, 脂肪酸 β -氧化, D-双功能蛋白, 糖尿病

学科分类号 Q244, R587.1

脂代谢紊乱贯穿了从糖尿病的发生到慢性并发症发展的全过程。I 型和 II 型糖尿病人群普遍存在血游离脂肪酸 (FFA) 水平异常升高的现象, 我们也发现糖尿病病人血浆 FFA, 特别是二十二烷酸 (C22:0), 二十四烷酸 (C24:0) 等极长链脂肪酸和花生四烯酸 (C20:4) 的水平明显升高^[1]。过氧化物酶体是饱和/不饱和的极长链脂肪酸进行 β -氧化的唯一场所。D-3 羟脂酰 CoA 脱水酶/D-3 羟脂酰 CoA 脱氢酶即 D-双功能蛋白 (D-bifunctional protein, D-BP) 是我们首次报道的参与过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化的一种酶^[2, 3], 在多不饱和脂肪酸、2-甲基支链脂肪酸和 D-异构体羟基脂肪酸的 β -氧化中起着至关重要的作用^[4]。糖尿病状态下血浆极长链脂肪酸和多不饱和脂肪酸水平的升高是否与过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化, 特别是 D-BP 活性的改变有关, 未见文献报道。本研究采用链脲佐菌素 (STZ) 选择性破坏大鼠胰岛的 β 细胞, 建立实验性糖尿病大鼠模型, 观察分析了肝脏过氧化物酶体形态数量的变化和过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化活性, 以及参与此途径的酶活性和酶含量的改变, 对过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化和 D-BP 与糖尿病高 FFA 血症发生的关系, 以及在糖尿病脂代谢紊乱中所起的作用进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 辅酶 A (CoA), DL- β -羟

丁酰 CoA, β -羟脂酰 CoA 脱氢酶, 软脂酰 CoA, 黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD), 7-羟基-6-甲氧基香豆素 (Scopoletin), 丙酮酸钠, 牛血清白蛋白 (BSA), 丙烯酰胺, 甲叉双丙烯酰胺, STZ 均为 Sigma 公司产品; 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 为 Biomol 公司产品; 过氧化物酶为 Biozyme 公司产品; 盐酸苯甲脒 (benzamidinium-HCl), 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 为 Amresco 公司产品; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔抗体为 Santa Cruz 公司产品; 血清总胆固醇 (TC) 和甘油三酯 (TG) 测定试剂盒购自美国 Beckman Coulter 公司; 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-c) 测定试剂盒购自伊利康生物技术有限公司; 其余试剂均为国产分析纯或优级纯。紫外-可见分光光度计 UV-330 型, 荧光分光光度计 650-60 型和透射电镜 H-7500 型均为日本日立公司产品; 全自动生化分析仪 LX20 型为美国 Beckman Coulter 公司产品。

1.1.2 实验动物: 选用 6 周龄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 雌雄各半, 由河北省实验动物中心提供, 按二级动物标准饲养。

1.2 方法

1.2.1 实验动物处理及取材: 将 SD 大鼠适应性喂养一周后, 随机分为体重和性别相匹配的糖尿病

* 河北省自然科学基金资助项目 (303472)。

** 通讯联系人。

Tel: 0311-6265639, E-mail: guiyang1959@Yahoo.com

收稿日期: 2004-06-18, 接受日期: 2004-08-02

组和对照组。禁食一夜后,糖尿病组大鼠按 65 mg/kg^[5]的剂量腹腔下一次性注射 1% 的 STZ (STZ 临用前用 0.1 mol/L, pH 4.5 的柠檬酸钠缓冲液配制),注射后 72 h,尾静脉采血测定禁食 6 h 后的空腹血糖 (FBG),血糖浓度高于 15 mmol/L^[6]的大鼠定为糖尿病大鼠。糖尿病组由 14 只糖尿病大鼠组成,对照组由相应的 14 只注射等量柠檬酸钠缓冲液的大鼠组成。糖尿病大鼠模型建立 2 周后,2% 戊巴比妥 (50 mg/kg) 麻醉下颈动脉插管取血,分离血清用于测定血糖,血清 TG、TC 和 HDL-c;取肝脏,用于制备电镜样品和肝匀浆。对照组大鼠于同一天作相同处理。

1.2.2 血糖和血脂的测定:采用 Beckman LX20 型全自动生化分析仪,葡萄糖氧化酶法测定血清葡萄糖,酶法测定血清 TG 和 TC,免疫比浊法测定 HDL-c。

1.2.3 电镜标本制备:大鼠肝组织按常规方法固定、脱水、包埋、切片、染色,透射电镜下观察过氧化物酶体数目及形态学的改变。

1.2.4 电镜下过氧化物酶体的定量观测:参照文献 [7],选糖尿病组和对照组大鼠肝电镜标本各 5 例,每例标本选 2 个包埋块,超薄切片。在电镜下各选一张切片,均在 40 000 倍下使肝细胞的胞质位于荧光屏中,计数每个视野中过氧化物酶体的数目,每张切片均观测 24 个视野。用荧光屏上的标尺直接测量过氧化物酶体的直径,每张切片均随机测量过氧化物酶体 20 个。过氧化物酶体面数密度 (N_A) 由下式求得:

$$N_A = \frac{N_x}{S}$$

N_x 为过氧化物酶体在荧光屏上的截面数, S 为荧光屏图像的样品面积 (100 μm^2)。

1.2.5 肝匀浆的制备:参照文献 [3],称取 1 g 大鼠肝脏,加 4 ml 匀浆缓冲液 (含 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液, pH 7.4, 0.5 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA Na_3 , 1 mmol/L 盐酸苯甲脒, 1 mmol/L PMSF, 0.1% Tween 20, 5 mmol/L β -巯基乙醇),在冰浴中匀浆。肝匀浆 3 000 r/min, 4℃ 离心 10 min,除去不溶物,上清液用于酶活性、蛋白质印迹以及蛋白质浓度的测定。

1.2.6 过氧化氢酶活性的测定:参照文献 [8],采用分光光度法,37℃ 下测定 H_2O_2 分解引起的 240 nm 处吸光度的降低速度来反映过氧化氢酶的活性。分析条件下,每分钟催化 1 μmol H_2O_2 分解

所需的过氧化氢酶量为 1 个酶活性单位 (U)。样品的酶活性以每毫克样品蛋白所含的酶活性单位数 (U/mg) 表示。

1.2.7 过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化的测定:参照文献 [9],在 37℃, KCN (线粒体脂肪酸 β -氧化抑制剂) 存在的条件下,测定由于软脂酰 CoA 氧化, NAD 还原所引起的 340 nm 处吸光度的增加速度,反映过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化的活性。分析条件下,每分钟还原 1 μmol NAD 所需的酶蛋白量为 1 个活性单位 (U)。样品的活性以每毫克样品蛋白所含酶活性的毫单位数 (mU/mg) 表示。

1.2.8 过氧化物酶体 D-BP 活性的测定:参照文献 [2, 3], 37℃ 下,先用 β -羟脂酰 CoA 脱氢酶催化 DL-3-羟丁酰 CoA 中的 L-型完全转化为 3-酮丁酰 CoA,剩下 D-型作为底物,再加入待测样品,测定由于酮酰 CoA 生成而引起的 303 nm 处吸光度的增加速度,来反映 D-BP 的脱氢酶活性。反应缓冲液含 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 50 mmol/L KCl, 25 mmol/L MgCl_2 , 0.1% BSA, 0.2 mmol/L NAD, 1 mmol/L 丙酮酸钠和 26 μmol /L DL-3-羟丁酰 CoA。分析条件下,每分钟转化 1 μmol D-3-羟丁酰 CoA 所需的 D-BP 量为 1 个酶活性单位 (U)。样品的酶活性以每毫克样品蛋白所含酶活性的毫单位数 (mU/mg) 表示。

1.2.9 L-3-羟脂酰 CoA 脱氢酶活性的测定:参照文献 [2, 3],以 DL-3-羟丁酰 CoA 为底物,37℃ 下,通过测定由于酮酰 CoA 生成而引起的 303 nm 处吸光度的增加速度,来反映 DL-羟脂酰 CoA 脱氢酶的活性,减去同一样品 D-BP 的脱氢酶活性,即为 L-3-羟脂酰 CoA 脱氢酶的活性。分析条件下,每分钟转化 1 μmol L-3-羟丁酰 CoA 所需的 L-3-羟脂酰 CoA 脱氢酶量为 1 个酶活性单位 (U)。样品的酶活性以每毫克样品蛋白所含酶活性的毫单位数 (mU/mg) 表示。

1.2.10 过氧化物酶体脂酰 CoA 氧化酶活性的测定:参照文献 [10],采用荧光分光光度法,测定软脂酰 CoA 氧化所生成的 H_2O_2 的量来反映脂酰 CoA 氧化酶的活性。反应缓冲液含 69 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 35 μmol /L 软脂酰 CoA, 50 μmol /L FAD, 200 mmol/L NAD, 1 μmol /L Scopoletin, 3 U/ml 过氧化物酶, 0.6 g/L BSA, 0.01% Triton X-100。分析条件下,每分钟生成 1 μmol H_2O_2 所需的脂酰 CoA 氧化酶量为 1 个酶活性单位 (U)。样品的酶活性以每毫克样品蛋白所含酶活性的毫单

位数 (mU/mg) 表示.

1.2.11 蛋白质印迹检测肝过氧化氢酶和 D-BP 的表达量: 采用 5% 浓缩胶和 10% 分离胶不连续系统进行电泳分离, 胶中蛋白质电转移至硝酸纤维膜上, 印迹膜在 5% BSA 中 4℃ 封闭过夜. 分别在 1:1 000 稀释的自制兔抗大鼠过氧化氢酶抗体和兔抗大鼠 D-BP 抗体中室温温育 4 h, Tween 20-PBS 洗 3 次; 然后加入 1:1 000 稀释的 HRP 标记羊抗兔二抗, 室温温育 2 h, Tween 20-PBS 洗 3 次, 将转印膜浸入 4-氯-1-萘酚显色液, 出现兰紫色条带后即用水洗膜终止反应, 晾干拍照. 结果用 Totallab 图像分析软件进行分析.

1.2.12 蛋白质定量: 以牛血清白蛋白为标准, 用 Lowry 改良法测定.

1.3 统计学处理

实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理分析, 两组间比较采用方差分析及 *t* 检验, 检验以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义.

2 结 果

2.1 糖尿病大鼠血清生化指标的变化

糖尿病大鼠 (DM) 与对照组 (control) 相比,

FBG 增加了 3.67 倍 ($P < 0.001$); 血清 TG 增加了 2.49 倍 ($P < 0.001$); 血清 HDL-c 降低了 1.22 倍 ($P < 0.01$); 血清 TC 各组无明显区别 ($P > 0.05$) (表 1).

Table 1 Biochemical characteristics in rats

	mmol/L		
	DM group	Control group	<i>P</i>
FBG	21.59 ± 2.91	5.89 ± 0.62	9.9 × 10 ⁻¹² **
TG	0.77 ± 0.31	0.31 ± 0.09	3.7 × 10 ⁻⁴ **
TC	0.77 ± 0.17	0.84 ± 0.07	0.41
HDL-c	0.36 ± 0.08	0.44 ± 0.05	6.7 × 10 ⁻³ *

FBG: Fasting blood glucose. TG: Triglyceride. TC: Total cholesterol. HDL-c: High-density lipoprotein cholesterol. Compared with control group, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, $n = 14$.

2.2 糖尿病大鼠肝过氧化物酶体的形态学改变

透射电镜下可见过氧化物酶体呈圆形或卵圆形, 单层膜内包有中等电子密度的细颗粒状基质, 其中有结晶状的核心, 即核样体 (nucleoid). 与对照组相比, 糖尿病大鼠肝细胞中过氧化物酶体形状不规则, 其中核样体电子密度明显降低 (图 1).

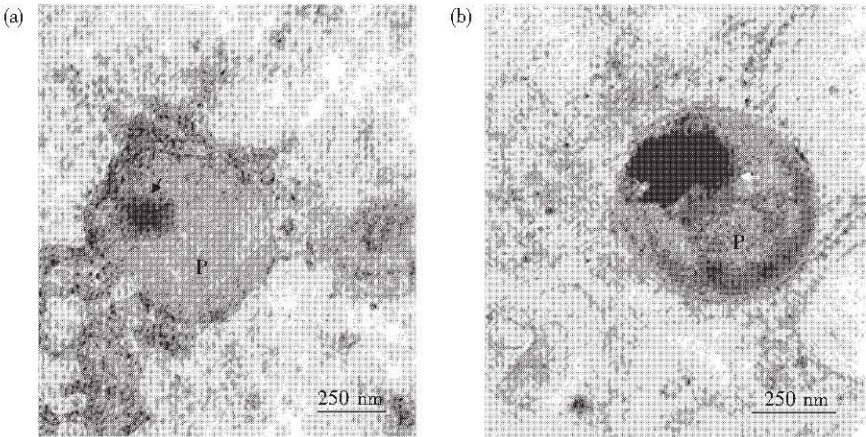


Fig. 1 Magnification of the electron micrograph of liver peroxisomes (P) from diabetic (a) and control (b) rats. Nucleoids of the peroxisomes are indicated by arrow. Note the size and nucleoid electro-dense of the peroxisomes in the diabetic rat compared to the control rat. ×40 000.

2.3 肝细胞过氧化物酶体的形态计量观察

与对照组相比, 糖尿病大鼠肝细胞中过氧化物酶体的面数密度和直径明显增大, 表明糖尿病大鼠肝过氧化物酶体数量明显增多, 单个过氧化物酶体体积增大 (表 2).

Table 2 Section number density and diameter of liver peroxisomes in rats

	DM group	Control group	<i>P</i>
Section number density (number/100 μm ²)	5.89 ± 0.53	3.12 ± 0.40	4.2 × 10 ⁻³ **
Diameter/μm	0.56 ± 0.11	0.48 ± 0.09	1.5 × 10 ⁻² *

Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 5$.

2.4 糖尿病大鼠肝过氧化物酶体中酶活性的改变
与对照组相比,糖尿病大鼠肝过氧化氢酶活性增加了 58% ($P < 0.001$),过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化活性增加了 63% ($P < 0.001$),脂酰 CoA

氧化酶活性增加了 59% ($P < 0.01$), L-3-羟酰 CoA 脱氢酶活性增加了 85% ($P < 0.01$);但是, D-BP 活性却降低了 58% ($P < 0.001$) (表 3).

Table 3 Enzyme activities of liver peroxisomes in rats

	DM group	Control group	P
Catalase/ (U • mg ⁻¹)	220.37 ± 24.56	139.76 ± 30.83	1.3 × 10 ^{-6**}
Peroxisomal fatty acid β -oxidation/ (mU • mg ⁻¹)	7.92 ± 2.30	4.86 ± 1.33	2.1 × 10 ^{-4**}
Acyl-CoA oxidase/ (mU • mg ⁻¹)	0.27 ± 0.09	0.17 ± 0.06	2.3 × 10 ^{-3*}
L-3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/ (mU • mg ⁻¹)	39.54 ± 8.05	21.33 ± 6.75	7.7 × 10 ^{-3*}
D-BP/ (mU • mg ⁻¹)	11.61 ± 2.73	27.44 ± 7.96	3.7 × 10 ^{-4**}

Compared with control group, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, $n = 14$.

2.5 糖尿病大鼠肝过氧化氢酶和 D-BP 表达的变化
与对照组相比,糖尿病大鼠肝过氧化氢酶蛋白

表达量明显增高, D-BP 蛋白表达量明显减少 (图 2).

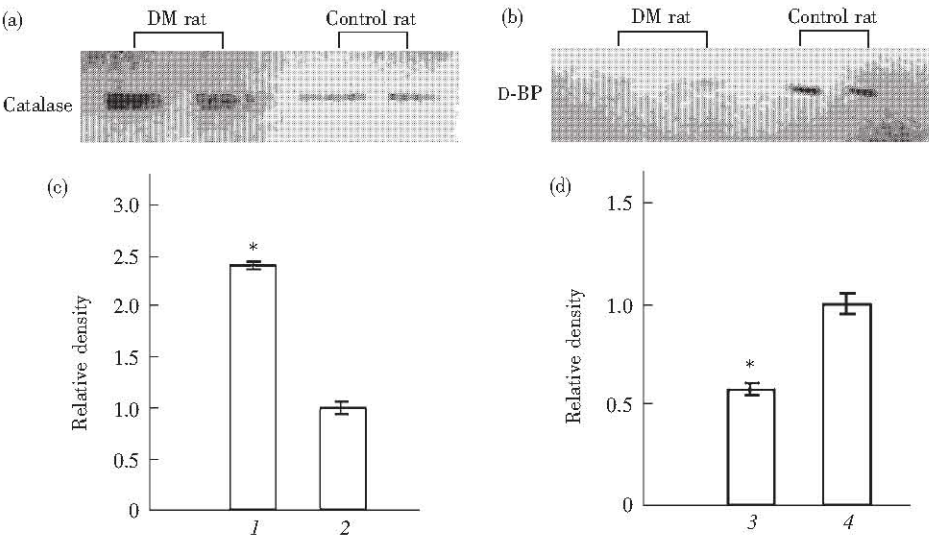


Fig. 2 Expression of catalase and D-BP of liver in rats

(a) and (b): Western blotting; (c) and (d): Relative density. 1: Catalase in diabetic rats; 2: Catalase in control rats; 3: D-BP in diabetic rats; 4: D-BP in control rats; Compared with control group, * $P < 0.01$, $n = 5$.

3 讨 论

真核细胞的线粒体和过氧化物酶体都能进行脂肪酸的 β -氧化^[11]. 碳链长度小于 20 个碳的脂肪酸主要在线粒体内氧化供能,而碳链长度大于 20 个碳的饱和/不饱和和极长链脂肪酸、2-甲基支链脂肪酸及胆汁酸合成代谢中间产物主要在过氧化物酶体中氧化^[12],生成的中短链脂肪酸然后转入线粒体彻底氧化.

糖尿病状态下,由于胰岛素作用缺陷引起的葡萄糖利用障碍使组织更多地依赖脂质氧化供给能量^[13]. 血中随脂肪动员增强而产生的大量 FFA 及其代谢产物,是过氧化物酶体增植物激活受体 (peroxisome proliferator activated receptors, PPARs) 的天然配体. 活化的 PPAR α 与视黄醇 X 受体形成异源二聚体,结合在特异性的 DNA 序列上,除使参与过氧化物酶体增殖的蛋白质基因表达外,还使参与过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化的脂酰 CoA 氧化

酶^[14], 以及参与线粒体脂肪酸 β -氧化的肉碱软脂酰转移酶^[15]的基因活化表达, 导致线粒体和过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化增强^[16~18], 以满足大量脂肪酸分解代谢的需要. Asayama 等^[19]研究发现, STZ 诱导的糖尿病大鼠肝脏 PPAR α 的 mRNA 表达增加, 过氧化物酶体中长链脂肪酸的活化与氧化, 以及极长链脂肪酸的利用率均增加, 表明糖尿病状态下, 脂肪组织向肝脏提供的大量脂肪酸激活了肝 PPAR α , 诱导其靶基因的表达. Yokota 等^[5]用免疫组化和免疫电镜的方法, 证明 STZ 诱导的糖尿病大鼠肌肉组织中过氧化物酶体增殖, 单个过氧化物酶体体积增大, 其中过氧化氢酶和脂酰 CoA 氧化酶的含量增加. 与上述报道相似, 本研究中 STZ 糖尿病大鼠肝脏过氧化物酶体增殖, 其标志酶过氧化氢酶蛋白量和酶活性显著增加, 过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化及其限速酶脂酰 CoA 氧化酶的活性也较对照组明显增高.

过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化途径的第二步和第三步反应, 即烯脂酰 CoA 经水合、脱氢生成 3-酮脂酰 CoA 的反应, 由一种具有烯脂酰 CoA 水合酶/3-羟脂酰 CoA 脱氢酶活性的双功能蛋白催化. 已经证实过氧化物酶体中存在两种双功能蛋白: L-双功能蛋白^[20] (L-bifunctional protein, L-BP) 和 D-双功能蛋白. L-BP 催化反式烯脂酰 CoA 转化为 L 型 3-羟脂酰 CoA, 进而脱氢为 3-酮脂酰 CoA; 而 D-BP 催化反式烯脂酰 CoA 水合生成的中间产物为 D 型 3-羟脂酰 CoA, 并以其为底物催化其脱氢. 底物专一性研究表明, L-BP 主要在饱和脂肪酸、非支链脂肪酸的氧化中起作用; 而 D-BP 不仅是唯一与多不饱和脂肪酸、2-甲基支链脂肪酸的烯脂酰 CoA 氧化有关的酶^[4,21], 而且对 D-BP 缺陷病人的研究还发现, D-BP 也是参与极长链直链脂肪酸, 例如二十四烷酸 β -氧化的主要酶^[22]. 在肝脏中 D-BP 与 L-BP 的含量几乎相等, 每克蛋白质中大约含 2.5 mg^[4], 说明两种双功能蛋白在肝细胞的过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化中起同等重要的作用. 高等生物体内有两种多功能酶具有 L-3-羟脂酰 CoA 脱氢酶活性, 分别是存在于过氧化物酶体中的 L-BP, 和线粒体中具有烯脂酰 CoA 水合酶/L-3-羟脂酰 CoA 脱氢酶/3-酮脂酰 CoA 硫解酶活性的三功能蛋白^[23]. 已知, 糖尿病时线粒体和过氧化物酶体的脂肪酸 β -氧化活性是同时增加的^[16], 本研究发现, 糖尿病大鼠肝过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化活性与肝 L-3-羟脂酰 CoA 脱氢酶活性也同时升高, 说明糖尿病时线粒体

和过氧化物酶体直链饱和脂肪酸、L-异构体羟基脂肪酸的 β -氧化增强. 但是, 本研究同时观测到 D-BP 的蛋白量和酶活性显著降低, 因而多不饱和脂肪酸、支链脂肪酸和 D-异构体长链羟基脂肪酸的 β -氧化很可能减弱, 导致不饱和极长链脂肪酸的中间产物 D-异构体、支链脂肪酸的堆积. 这一发现与我们观察到的 II 型糖尿病患者血浆极长链脂肪酸和花生四烯酸水平明显升高的现象相符, 提示 D-BP 活性降低可能是造成糖尿病时血浆脂肪酸谱异常的原因之一.

糖尿病时脂肪动员产生的大量长链和极长链脂肪酸, 只有 L-异构体可分别在线粒体和过氧化物酶体中进行 β -氧化供能. 而很可能由于 D-BP 蛋白量和酶活性的显著降低使大量多不饱和脂肪酸、支链脂肪酸和极长链脂肪酸的 D-异构体不能在过氧化物酶体中被氧化, 而在肝脏中堆积, 肝脏以其为原料合成及释放 TG 增多. 同时机体 VLDL-TG 清除障碍和 LPL 活性显著降低^[24], 导致血中 TG 浓度升高. 机体中一半以上的脂肪酸是不饱和脂肪酸, 由于大量的多不饱和脂肪酸以及极长链脂肪酸在过氧化物酶体中 β -氧化障碍, 导致机体能量供给不足, 为满足机体所需, 脂肪动员继续加强, 大量 FFA 释放入血, 形成恶性循环, 所以 D-BP 蛋白量和酶活性的降低可能是造成糖尿病时高 FFA 血症和高 TG 血症并存的原因之一.

糖尿病性神经病变是 I 型和 II 型糖尿病常见并发症, 病理改变之一表现为神经纤维发生节段性髓鞘脱失. 对极长链脂肪酸氧化酶缺陷而致的肾上腺白质营养不良 (adrenoleukodystrophy, ALD) 的研究显示^[25], 大量极长链脂肪酸由于过氧化物酶体 β -氧化障碍而在神经系统堆积, 致使组成髓鞘的卵磷脂和神经鞘磷脂中含有过多的极长链脂肪酸, 改变了髓鞘的正常分子结构, 使其稳定性下降, 大量髓鞘因此脱失. D-BP 缺陷病人也表现为同样的神经系统广泛脱髓鞘病变. 糖尿病时是否因 D-BP 蛋白量和活性的下降, 使机体内大量不饱和极长链脂肪酸和支链脂肪酸堆积, 从而通过上述机理引起神经系统脱髓鞘, 导致糖尿病性神经病变, 值得进一步探讨.

糖尿病患者组织中 H_2O_2 浓度升高, 脂质过氧化增强^[26,27] 是糖尿病的又一重要生化特征. 根据我们的研究结果, 糖尿病时不但过氧化物酶体增殖, 脂肪酸 β -氧化和脂酰 CoA 氧化酶的活性增加, 而且过氧化物酶体膜的通透性也变大^[28], 结果使

大量生成的 H_2O_2 溢出过氧化物酶体, 进入细胞浆乃至细胞外, 这可能是糖尿病时, 组织 H_2O_2 浓度升高, 引起与过氧化增强有关的糖尿病心血管并发症的原因之一. 虽然, 本研究也发现糖尿病大鼠肝过氧化氢酶的含量增多并且活性升高, 但能否有效地清除如此大量的过氧化氢, 仍需进一步研究.

参 考 文 献

- 1 宋光耀, 马慧娟, 叶蔚, 等. 不同糖耐量人群血浆脂肪酸谱与胰岛素抵抗. 中华内分泌代谢杂志, 2004, **20** (3): 197 ~ 199
Song G Y, Ma H J, Ye W, *et al.* Chin J Endocrinol Metab, 2004, **20** (3): 197 ~ 199
- 2 Jiang L L, Miyazawa S, Hashimoto T. Purification and properties of rat D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase: D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/ D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional Protein. J Biochem (Tokyo), 1996, **120** (3): 633 ~ 641
- 3 Jiang L L, Kobayashi A, Matsuura H, *et al.* Purification and properties of human D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase: medium-chain enoyl-CoA hydratase is D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase. J Biochem, 1996, **120** (3): 624 ~ 632
- 4 Jiang L L, Kurosawa T, Sato M, *et al.* Physiological role of D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein. J Biochem (Tokyo), 1997, **121** (3): 506 ~ 513
- 5 Yokota S, Asayama K. Proliferation of myocardial peroxisomes in experimental rat diabetes: a biochemical and immunocytochemical study. Virchows Archiv B Cell Pathol, 1992, **63** (1): 43 ~ 49
- 6 Osmundsen H, Brodal B, Hovik R. A luminometric assay for peroxisomal beta-oxidation. Effects of fasting and streptozotocin-diabetes on peroxisomal beta-oxidation. Biochem J, 1989, **260** (1): 215 ~ 220
- 7 郑晓刚, 张泰和, 周晓军, 等. 慢性乙型肝炎和肝硬化中肝细胞微体的电镜细胞化学及其定量研究. 电子显微学报, 1994, **13** (3): 177 ~ 182
Zheng X G, Zhang T H, Zhou X J, *et al.* J Chin Electron Microscopy Society, 1994, **13** (3): 177 ~ 182
- 8 Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer H U ed. Methods of Enzymatic Analysis. New York: Academic Press, 1974. 673
- 9 Lazarow P B, De Duve C. A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver poroxisomes: enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. Proc Natl Acad Sci USA, 1976, **73** (6): 2043 ~ 2046
- 10 Walusimbi-Kisitu M, Harrison E H. Fluorometric assay for rat liver peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase activity. J Lipid Research, 1983, **24** (8): 1077 ~ 1084
- 11 Kunau W H, Dommes V, Schuiz H. β -oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: A century of continued progress. Prog Lipid Res, 1995, **34** (4): 267 ~ 342
- 12 Singh I. Biochemistry of peroxisomes in health and disease. Mol Vell Biochem, 1997, **167**: 1 ~ 29
- 13 Fritz I B. Factors influencing the rates of long-chain fatty acid oxidation and synthesis in mammalian systems. Physio Rev, 1961, **41**: 52 ~ 129
- 14 Tugwood J D, Isseemann I, Anderson R G, *et al.* The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. EMBO J, 1992, **11** (2): 433 ~ 439
- 15 Torra I P, Gerois P, Staels B. Peroxisome proliferator activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis. Curr Opin Lipidol, 1999, **10**: 151 ~ 159
- 16 Debeer L J, Mannaerts G P. The mitochondrial and peroxisomal pathway of fatty acid oxidation in rat liver. Diabete Metabol, 1983, **9**: 134 ~ 140
- 17 Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their eddects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. Biochim Biophys Acta, 1996, **1302**: 93 ~ 109
- 18 Asayama K, Yokota S, Kato K. Peroxisomal oxidases in various tissues of diabetic rats. Diabetes Res Clin Practice, 1991, **11**: 89 ~ 94
- 19 Asayama K, Sandhir R, Faruk G, *et al.* Increased peroxisomal fatty acid β -oxidation and enhanced expression of peroxisome proliferator-activated receptor- α in diabetic rat liver. Mol Cell Biochem, 1999, **194**: 227 ~ 234
- 20 Osumi T, Hashimoto T. Purification and properties of mitochondrial and peroxisomal 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase from rat liver. Arch Biochem Biophys, 1980, **203** (1): 372 ~ 383
- 21 Reddy J K, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. Annu Rev Nutr, 2001, **21**: 193 ~ 230
- 22 Suzuki Y, Jiang L L, Souri M, *et al.* D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/ D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein deficiency: A newly identified peroxisomal disorder. Am J Hum Genet, 1997, **61** (5): 1153 ~ 1162
- 23 Jiang L L, Miyazawa S, Souri M, *et al.* Structure of D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein. J Biochem, 1997, **121** (2): 364 ~ 369
- 24 Farese R V. Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal -weight humans. Metabolism, 1991, **40** (2): 214 ~ 216
- 25 Mosser J, Douar A M, Sarde C O, *et al.* Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. Nature, 1993, **361** (6414): 726 ~ 730
- 26 Baynes J W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes, 1991, **40** (4): 405 ~ 412
- 27 孔庆芝, 张宝福, 崔炼. II型糖尿病患者机体脂质过氧化及抗氧化能力研究. 中国糖尿病杂志, 1994, **2** (4): 215 ~ 217
Kong Q Z, Zhang B F, Cui L. Chin J Diabetes Mellitus, 1994, **2** (4): 215 ~ 217
- 28 韦春玲. 糖尿病大鼠肝脏过氧化物酶体膜性质及 β -氧化活性变化的研究: [学位论文]. 石家庄: 河北医科大学基础医学院, 2003
Wei C L. Alterations in peroxisomal membrane properties and β -oxidation activity of liver in diabetic rats: [Thesis]. Shijiazhuang: Basic institute of Hebei Medical University, 2003

Study on The Activities of Peroxisomal β -Oxidation and D-Bifunction Protein in Livers of Experimental Diabetic Rats *

LI Jing¹⁾, SONG Guang-Yao¹⁾, JIANG Ling-Ling²⁾ **, ZHANG Wen-Jie¹⁾, FENG Zhi-Shan³⁾

¹⁾ *Hebei Provincial Geriatric Key Laboratory, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China;*

²⁾ *Department of Biochemistry and Molecular Biology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;*

³⁾ *Clinical Laboratory, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China)*

Abstract In order to clarify the role of peroxisomal fatty acid β -oxidation and D-bifunction protein (D-BP) in lipid metabolism disorder of diabetes mellitus (DM), the number of peroxisomes by electronic microscope and the activities of major enzymes involved in peroxisomal β -oxidation in livers from STZ-induced diabetic and normal rats are compared respectively. Catalase and D-BP protein level was determined by Western blot. In the livers of STZ-induced diabetic rats, the peroxisomes proliferated and showed some morphological changes, while the protein amount and activity of catalase significantly increased. Although the activities of acyl-CoA oxidase, L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and fatty acid β -oxidation of peroxisome in the diabetic rat liver were significantly increased, the protein amount and activity of D-BP in the diabetic rat liver was decreased compared to control rats. The relationship between decreased D-BP activity and lipid metabolism disorder in DM was also discussed.

Key words peroxisome, fatty acid β -oxidation, D-bifunction protein, diabetes mellitus

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of Hebei (303472).

** Corresponding author. Tel: 86-311-6265639, E-mail: guiyang1959@Yahoo.com

Received: June 18, 2004 Accepted: August 2, 2004