

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2013.02.08

# 大米蛋白调控成熟期大鼠 LDLR 基因及蛋白表达

彭雪<sup>1,2</sup>, 杨林<sup>1\*</sup>, 刘巧红<sup>1</sup>, 李娅楠<sup>1</sup>, 李凯<sup>3</sup>

(1. 哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090; 2. 辽宁大学轻型产业学院, 辽宁 沈阳 110036;  
3. 哈尔滨工业大学生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150001)

**摘要:**为了探讨大米蛋白对成熟期大鼠胆固醇代谢调控因子—低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor, LDLR)的调控作用,以18周龄雄性Wistar成熟期大鼠为研究对象,应用大米蛋白及酪蛋白为食物蛋白源,饲喂无胆固醇及富含胆固醇饲料,经18日自由摄食后,测定实验鼠血浆总胆固醇、血浆高密度胆固醇水平及肝脏LDLR基因及蛋白表达水平。对照酪蛋白,大米蛋白均能显著降低大鼠血浆总胆固醇、血浆非高密度胆固醇水平及动脉粥样硬化指数,并且,显著刺激肝脏LDL基因及蛋白表达水平。实验结果表明,大米蛋白降低成熟期大鼠血浆胆固醇水平的作用功效与膳食胆固醇添加与否无关,大米蛋白降低胆固醇的作用机制之一是能够有效刺激LDLR的表达,从而抑制LDL-C的转运入血。

**关键词:**大米蛋白;胆固醇;LDLR;成熟期大鼠

中图分类号:Q518.2 文献标识码:A 文章编号:1672-5565(2013)-02-120-04

## Rice Protein Affects Gene and Protein Expressions of LDLR in Adult Rats

PENG Xue<sup>1,2</sup>, YANG Lin<sup>1\*</sup>, LIU Qiao-hong<sup>1</sup>, LI Ya-nan<sup>1</sup>, LI Kai<sup>3</sup>

(1. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2. Light Industry College, Liaoning University, Shenyang 110036, China; 3. School of Life Science and Biotechnology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China)

**Abstract:** To elucidate the effects of rice protein on low-density lipoprotein receptor (LDL) which is a regulatory factor in cholesterol metabolism, male Wistar 18-week-old rats were fed cholesterol-free/-enriched diets (1% cholesterol and 0.25% sodium cholate) with 14% (as crude protein) of rice protein and casein ad libitum for 18 days. Plasma levels of total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and hepatic gene and protein expressions of LDLR were measured. Rice protein significantly reduced plasma TC, non-HDL-C and atherogenic index in comparison to casein ( $P < 0.05$ ). Also, hepatic gene and protein expression of LDLR were significantly increased in adult rats fed rice protein as compared with casein ( $P < 0.05$ ). The present results suggest that the stimulation of LDLR expression to decrease plasma LDL-C is one of major hypocholesterolemic mechanisms exerted by rice protein, regardless of dietary cholesterol.

**Key words:** Rice Protein; Cholesterol; LDLR; Adult Rats

低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor, LDLR)是调控胆固醇代谢的关键因子之一,其主要作用是通过与低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)结合,将LDL-C转运至肝脏,从而降低血浆LDL-C水平、维持机体胆固醇正常的动态平衡<sup>[1]</sup>。肝脏是胆固醇代谢的重要器官,也是LDLR大量表达的主要靶点<sup>[2]</sup>。

研究表明,增加LDLR基因及蛋白表达量,可以促使循环途径中胆固醇逆转运回肝脏,从而有效降低血浆胆固醇水平。

大米是我国居民的主要膳食蛋白源<sup>[3-4]</sup>。近年来,大米蛋白降低机体胆固醇水平的作用功效已引起世人的广泛关注<sup>[5-8]</sup>,但对于大米蛋白降低机体胆固醇水平的作用机制尚不十分清楚。特别是,迄

收稿日期:2013-01-06;修回日期:2013-04-18.

基金项目:国家自然科学基金(31071526)、黑龙江省自然科学基金(C201027)、黑龙江省博士后科研启动基金。

作者简介:彭雪,女,硕士研究生,食品科学与工程专业。

\*通讯作者:杨林,女,博士,副教授、博士生导师,主要从事生命与食品科学的研究,E-mail: ly6617@hit.edu.cn.

今,尚缺乏大米蛋白调控胆固醇代谢相关因子的基因及蛋白表达水平研究。因此,为了充分研究大米蛋白调控胆固醇代谢的作用机制,本研究选用 18 周龄 Wistar 成熟期大鼠,采用无胆固醇和富含胆固醇的膳食条件,以动物性酪蛋白作为对照,研究探讨大米蛋白对成熟期大鼠血浆胆固醇水平、LDLR 基因及蛋白表达水平的调控作用,旨在深入解析大米蛋白调控胆固醇代谢的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物及饲料

实验饲料:以碱法提取的大米蛋白(rice protein,龙粳 26 号,本研究室自制)<sup>[9]</sup>、酪蛋白(casein,购于甘肃华羚酪蛋白股份有限公司)为主要蛋白源,配制成粗蛋白为 14% 的无胆固醇(cholesterol-free)及富含胆固醇(cholesterol-enriched)实验饲料(AIN-93M),其中,富含胆固醇饲料中添加 1% 胆固醇及 0.25% 胆酸钠。

实验动物:18 周龄的雄性 Wistar 成熟期大鼠(购于北京维通利华实验动物技术有限公司),随机分成 4 组,即无胆固醇膳食条件的酪蛋白组(CF)、大米蛋白组(RF)及富含胆固醇膳食条件的酪蛋白组(CC)、大米蛋白组(RC),每组 6 只大鼠。实验鼠在代谢饲养箱中单笼饲养,自由摄食、饮水,喂养 18 日后,进行样品采集。

### 1.2 样品的采集

经 12 小时绝食后,进行样品采集、制备,方法参见杨林等<sup>[10-11]</sup>。

### 1.3 指标检测及数据处理

(1) 血浆胆固醇水平测定:血浆总胆固醇(total cholesterol, TC)、血浆高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平分别采用贝克曼 CX-5 全自动生化分析仪进行测定。

血浆非高密度脂蛋白胆固醇(non high density lipoprotein cholesterol, non-HDL-C)的含量依据以下公式进行计算: $\text{non-HDL-C} = \text{TC} - \text{HDL-C}$ 。

(2) AI 动脉硬化指数(atherogenic index, AI)的计算: $\text{AI} = (\text{TC} - \text{HDL-C}) / \text{HDL-C}$ 。

(3) 实时定量 PCR 法测定基因表达<sup>[12]</sup>:将装有肝组织的冷冻管从冰箱中取出,采用 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)法提取肝组织 RNA。紫外分光光度计测定 OD 值,以期确定大鼠肝组织中总 RNA 提取的纯度和完整性,即 A260/A280 比值在 1.8~2.0 之间,无蛋白检出。并且,测定 RNA 浓度。

总 RNA 1  $\mu\text{g}$ ,以逆转录试剂盒(PrimeScript 1st Stand cDNA Synthesis Kit,购于 Takara 公司)逆转录为 cDNA,再以 cDNA 为模板,依据不同基因的引物(由上海生工生物工程有限公司合成,见表 1),进行荧光定量 PCR 扩增(Perfect Real Time Kit,购于 Takara 公司)。每一样品取 cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ,上下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ ,SYBR Premix Ex Taq II(2 $\times$ )5  $\mu\text{L}$ ,ROX Reference Dye II(50 $\times$ )0.2  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 3.0  $\mu\text{L}$ ,最后反应总体积 10  $\mu\text{L}$ 。反应条件均为:先在 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s,然后 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s、57  $^{\circ}\text{C}$  30 s、72  $^{\circ}\text{C}$  34 s 共 40 个循环。在 ABI 7500 real time PCR 仪上进行操作,经由 7 500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA) 软件分析下得到 CT 值,经由内参 GAPDH 校正,校正值得通过  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  进行分析。

表 1 测定基因的引物序列

基因名称	上游引物	下游引物
HMG-COA R	TGGCTATGACTGC- CTATGCC	GGTGAAGAG- CAGAAACCCTATG
GAPDH (内参)	ACAGCAACAGGCTG- GTGGAC	TTTGAGGGTG- CAGCGAACT

(4) 蛋白印迹(western blotting)检测:采用动植物总蛋白微量提取试剂盒(北京天恩泽基因科技有限公司)进行肝脏蛋白质的提取,并进行肝脏总蛋白质含量的测定(考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒,南京建成生物工程研究所)。蛋白样品分装后,立即贮存于 - 80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱、备用。

取等体积蛋白 15  $\mu\text{l}$  进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转移至 NC 膜,5% 封闭液封闭 1h, TBST 洗膜三次,加入兔抗大鼠 LDLR 抗体标记,室温孵育 1h 后,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。次日,再次洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗标记,室温孵育 1h,洗膜,加入 ECL 染色 5min 后,进行荧光成像检测。以  $\beta$ -actin 条带作为对照,检测 LDLR 条带的光密度值,进行 LDLR 蛋白表达量的分析。

(5) 数据分析处理<sup>[13]</sup>:采用 SPSS 17.0 统计软件,one-way ANOVA 进行显著性检验。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, $P < 0.05$  为显著性差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 大米蛋白调控血浆胆固醇水平的作用效果

成熟期大鼠经过 18 日的自由摄食后,各实验组大鼠的血浆胆固醇含量列于表 2。

如表 2 所示,与酪蛋白组相比,在无胆固醇及富含胆固醇的膳食条件下,大米蛋白能够显著降低成熟期大鼠血浆总胆固醇(TC)达 17.54% 及 23.10%

( $P < 0.05$ )。这一结果提示我们,大米蛋白具有降低血浆胆固醇水平的作用效果,并与胆固醇添加与否无关。

表 2 膳食蛋白对成熟期大鼠血浆及肝脏胆固醇水平的影响

Table 2 Effects of dietary proteins on plasma cholesterol levels

	CF	RF	CC	RC
TC (mg/dL)	68.59 ± 2.97 <sup>a</sup>	56.56 ± 3.36 <sup>b</sup>	103.31 ± 4.93 <sup>a</sup>	79.45 ± 9.99 <sup>b</sup>
HDL (mg/dL)	42.44 ± 3.54	40.25 ± 5.66	66.42 ± 3.82	55.64 ± 4.55
non-HDL (mg/dL)	26.15 ± 1.81 <sup>a</sup>	16.31 ± 3.37 <sup>b</sup>	36.89 ± 4.31 <sup>a</sup>	23.81 ± 8.27 <sup>b</sup>
AI	0.64 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.57 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.15 <sup>b</sup>

与血浆 TC 变化趋势相似,在无胆固醇的膳食条件下,对照 CF,RF 显著降低成熟期大鼠血浆 non-HDL-C 水平达 37.62% ( $P < 0.05$ );同时,在富含胆固醇的膳食条件下,与 CC 相比,RC 组大鼠血浆 non-HDL-C 水平显著降低了 35.46% ( $P < 0.05$ )。

但是,与血浆 TC 及 non-HDL-C 的作用效果相反,RF 与 RC 组大鼠血浆 HDL-C 水平均与 CF 及 CC 组相似,且无显著性差异( $P > 0.05$ )。这一实验结果提示我们,大米蛋白降低血浆胆固醇水平主要是通过降低 non-HDL-C 来实现的。

如表 2 所示,大米蛋白显著降低血浆 non-HDL-C 的结果是直接导致动脉粥样硬化指数(AI)的显著降低( $P < 0.05$ )。这一实验数据更加有力地支持了杨等的实验观察,即大米蛋白能够有效降低冠心病、动脉粥样硬化症的发生。并且,实验结果显示,大米蛋白降低机体胆固醇水平、有效预防动脉粥样硬化症的作用效果并未受膳食胆固醇的影响。

研究表明,血浆 non-HDL-C 主要由低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)与极低密度脂蛋白胆固醇(very-low-density lipoprotein cholesterol, VLDL-C)组成,因此,本实验所得结果,充分提示我们,大米蛋白降低血浆胆固醇的作用机制一定与 LDLR 有关。

## 2.2 大米蛋白调控成熟期大鼠 LDLR 基因表达水平的作用效果

如图 1 所示,在无胆固醇的膳食条件下,与 CF 相比,RF 组成成熟期大鼠肝脏 LDLR 的 mRNA 水平显著提高了 56.25% ( $P < 0.05$ ),表明大米蛋白具有显著刺激肝脏 LDLR 基因表达的功能。同时,在添加 1% 外源胆固醇的膳食条件下,大米蛋白同样具有刺激 LDLR 表达的作用。数据显示,对照 CC,RC 组大鼠 LDLR 的基因表达量升高了 24.34%,但与 CC 组无显著性差异( $P > 0.05$ )。

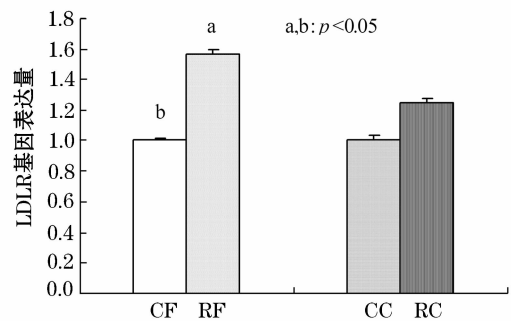


图 1 膳食蛋白对肝脏 LDLR 基因表达水平的影响

Fig. 1 Effects of dietary proteins on hepatic LDLR gene expression

以上结果充分证实了我们的猜想,即大米蛋白降低血浆胆固醇的作用机制之一是通过刺激 LDLR 的表达,进而促进与血浆中过剩的 LDL-C 结合、并转运至肝脏进行代谢。这一实验观察,有力地支持了大米蛋白降低血浆 non-HDL-C 水平的作用效果,并且,进一步解析了大米蛋白有效降低血浆胆固醇的作用机制。

## 2.3 大米蛋白调控成熟期大鼠 LDLR 蛋白表达水平的作用效果

如图 2 所示,在无胆固醇及富含胆固醇的膳食条件下,大米蛋白均能有效地促进了肝脏 LDLR 的蛋白表达。这一结果与大米蛋白调控 LDLR 基因表达水平的作用效果相一致,更加充分支持了大米蛋白调控 LDLR 基因表达的作用效果,并且,进一步表明了大米蛋白对 LDLR 表达具有上调、促进作用,与膳食胆固醇添加与否无关。

实验结果表明,无论是否添加外源胆固醇,LDLR 作为将血浆 LDL-C 逆转运回肝脏的关键受体蛋白,均能受到膳食蛋白(大米蛋白及酪蛋白)的显著调控,从而在胆固醇代谢中发挥重要作用。

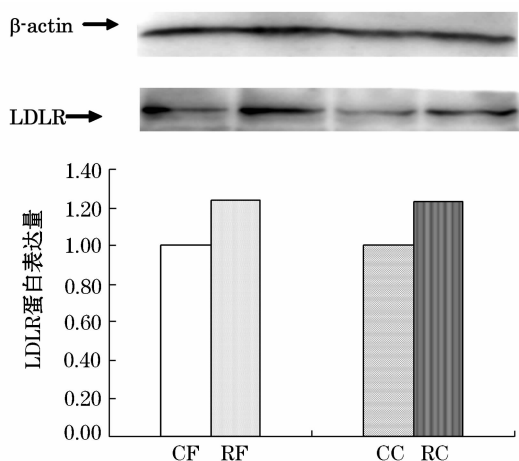


图2 膳食蛋白对肝脏 HMG-CoA R 基因表达水平的影响

Fig. 2 Effects of dietary proteins on hepatic HMG-CoA R gene expression

基因的表达与蛋白质的相互作用具有一定的相关性<sup>[14-15]</sup>。研究指出,LDLR 基因链含有特定的固醇调节元件,其固醇调节元件可以刺激 LDLR 基因的表达,进而促进 LDLR 蛋白表达量的增加。由此可以看出,胆固醇的代谢过程是一个十分复杂的过程,存在着诸多关键调控因子<sup>[16-17]</sup>,其作用机制尚需深入、细致地研究与探讨。

### 3 结论

综上所述,在无胆固醇及富含胆固醇的膳食条件下,大米蛋白能够显著降低成熟期大鼠血浆胆固醇水平,是一种可以有效调控机体胆固醇代谢的植物蛋白。有效刺激低密度脂蛋白受体的表达可能是大米蛋白降低血浆胆固醇水平的作用机制之一。

#### 参考文献 (References)

- [1] Osono Y, Woollett LA, Herz J, Dietschy JM. Role of the low density lipoprotein receptor in the flux of cholesterol through the plasma and across the tissues of the mouse [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1995, 95(3):1124-1132.
- [2] Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans [J]. *Journal of Lipid Research*, 1993, 34:1637-1659.
- [3] 宋伟,张利达,尹京苑. 水稻胚乳特异性基因的挖掘及顺式元件分析 [J]. *生物信息学*, 2012, 10(3):183-189.
- [4] 任鄞胜,肖培村,陈勇,吕启明,王玉平,赵慧霞,李仕贵. 水稻全基因组编码抗病基因同源序列分析 [J]. *生物信息学*, 2010, 8(2): 91-97.

- [5] Yang L, Kadowaki M. Effects of rice protein from two cultivars, Koshihikari and Shunyo, on hepatic cholesterol secretion by isolated perfused livers of rats fed cholesterol-enriched diets [J]. *Annals of Nutrition Metabolism*, 2009, 54(4):283-290.
- [6] Yang L, Kadowaki M. Addition of methionine to rice protein affects hepatic cholesterol output inducing hypocholesterolemia in rats fed cholesterol-free diets [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2011, 14(5):445-453.
- [7] Yang L, Chen JH, Zhang H, Qiu W, Liu QH, Peng X, Li YN, Yang HK. Alkali treatment affects in vitro digestibility and bile acid binding activity of rice protein due to varying its ratio of arginine to lysine [J]. *Food Chemistry*, 2012, 132(2): 925-930.
- [8] Yang L, Chen JH, Xu T, Zhou AS, Yang HK. Rice protein improves oxidative stress by regulating glutathione metabolism and attenuating oxidative damage to lipids and proteins in rats [J]. *Life Sciences*, 2012, 91(11-12): 389-394.
- [9] Yang L, Chen JH, Xu T, Qiu W, Zhang Y, Zhang LW, Xu F, Liu HB. Rice protein extracted by different methods affects cholesterol metabolism in rats due to its lower digestibility [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(11):7594-7608.
- [10] 杨林,王士磊,张兰威,渡边令子,门脇基二. 大米蛋白水平对成熟期大鼠体质量及体脂水平的影响 [J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(6):587-591.
- [11] Yang L, Kumagai T, Kawamura H, Watanabe T, Kubota M, Fujimura S, Watanabe R, Kadowaki M. Effects of rice proteins from two cultivars, Koshihikari and Shunyo, on cholesterol and triglyceride metabolism in growing and adult rats [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007, 71(3):694-703.
- [12] Yang L, Chen JH, Xu T, Nie MH, Yang HK. Hypocholesterolemic effect of rice protein is due to regulating hepatic cholesterol metabolism in adult rats [J]. *Gene*, 2013, 512(2): 470-476.
- [13] 欧阳玉梅. 基因表达数据聚类分析技术及其软件工具 [J]. *生物信息学*, 2010, 8(2): 104-109.
- [14] 沈艳,刘战民,尹京苑. 利用基因共表达网络分析蛋白质的相互作用 [J]. *生物信息学*, 2010, 8(1): 16-19.
- [15] 任丽萍,章琳,洪贵妮,郭政. 基于蛋白质互作评价差异表达基因的重复性 [J]. *生物信息学*, 2011, 9(3): 181-184.
- [16] Yang L, Chen JH, Lv J, Wu Q, Xu T, Zhang H, Liu QH, Yang HK. Rice protein improves adiposity, body weight and reduces lipids level in rats through modification of triglyceride metabolism [J]. *Lipids in Health Disease*, 2012, 11:24.
- [17] 杨林,张兰威,蒙琦,王士磊,渡边令子,门脇基二. “春阳”大米蛋白对大鼠胆固醇代谢的调控作用 [J]. *华中农业大学学报*, 2009, 28(3): 326-329.