

ABCA6 缺失对生酮饮食喂养的小鼠代谢的影响

蔡 运,陈 浩,张欣欣,李 皓*

(南京医科大学病理生理学系,江苏 南京 211166)

[摘要] 目的:检测 ATP 转运蛋白 6(ATP binding cassette transporter A6,ABCA6)基因缺失对生酮饮食喂养的小鼠代谢的影响。方法:给予小鼠生酮饮食(ketogenic diet,KD)或普通饮食(normal diet,ND)2周,通过 Western blot 检测肝脏 ABCA6 的表达水平;给予 ABCA6 敲除(KO)小鼠或对照(WT)小鼠 KD 或 ND 2周,检测小鼠的体重、血糖、血清甘油三酯(TG)、胆固醇(TCH)、游离脂肪酸(FFA)、酮体(β -HB)和转氨酶(AST、ALT)等指标,测定肝脏 TG 和 TCH 含量,并通过 real-time PCR 检测代谢相关基因的表达水平。结果:生酮饮食诱导小鼠肝脏 ABCA6 的表达;在普通饮食条件下,ABCA6 KO 小鼠与对照小鼠在体重、血糖及血清 TG、TCH、FFA、 β -HB 等代谢相关指标、肝脂质含量和代谢相关基因表达水平等方面无明显差别;在生酮饮食条件下,和 WT 小鼠相比,ABCA6 KO 小鼠的血糖、FFA 和 TCH 降低,肝脏 TG 蓄积更显著,肝脏 FAS、DGAT2、PCK1 和 HMGCS2 mRNA 显著增加。结论:ABCA6 缺失引起小鼠对生酮饮食的代谢障碍,ABCA6 可能参与肝脏的脂质代谢过程。

[关键词] ABCA6;生酮饮食;脂质代谢

[中图分类号] Q591.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)07-804-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170704

Deletion of ATP binding cassette transporter A6 affects the metabolic status of mice fed on a ketogenic diet

Cai Yun, Chen Hao, Zhang Xinxin, Li Hao*

(Department of Pathophysiology, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of ATP binding cassette transporter A6 (ABCA6) deletion on the metabolic status of mice fed on a ketogenic diet. **Methods:** ABCA6 knockout (KO) or wild type (WT) mice were placed on normal diet or ketogenic diet for 2 weeks, respectively. Expression of ABCA6 in the liver of mice fed on normal diet or ketogenic diet was determined by Western blot. Body weights were monitored. The blood samples and livers were harvested. Blood glucose and serum triglycerides (TG), total cholesterol (TCH), free fatty acids (FFA), ALT, AST, and beta hydroxybutyric acid (β -HB) were tested. The contents of TG and TCH in the liver were examined. The hepatic expression levels of genes related to metabolism were detected by realtime-PCR. **Results:** Feeding of ketogenic diet induced expression of ABCA6 in the liver. No significant difference was observed in body weight, blood glucose and the levels of TG, TCH, FFA, ALT, AST, and β -HB in serum of ABCA6 KO or WT mice fed on normal diet. A 2-week ketogenic diet feeding significantly reduced the levels of blood glucose, serum TCH, and serum FFA in ABCA6 KO mice when compared with WT mice. Meanwhile, more TG and higher mRNA levels of FAS, DGAT2, PCK1, and HMGCS2 were detected in the liver of ABCA6 KO mice fed on ketogenic diet. **Conclusion:** Deletion of ABCA6 impaired the metabolism of mice fed on ketogenic diet. ABCA6 may be involved in the lipid metabolism of the liver.

[Key words] ABCA6; ketogenic diet; lipid metabolism

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(07):804-808]

ABC 转运蛋白(ATP binding cassette transporter)是一组跨膜蛋白,以 ATP 为能源介导脂类、氨基

酸、多肽、糖类、离子等多种物质的跨膜转运^[1]。目前已知的人类 ABC 基因包括 A~G 7 个亚家族,共 49 个成员^[1]。人类 ABCA 亚家族包括 12 个蛋白质编码基因,其中,人的 ABCA6(ATP binding cassette transporter A6)由 1 617 个氨基酸构成,分子量

[基金项目] 国家自然科学基金(81270944)

* 通信作者(Corresponding author),E-mail: haoli@njmu.edu.cn

约为160 kDa^[2-3]。ABCA6 在肝脏中的表达量很高,在心、肺、子宫中也有表达^[4],但其功能目前仍然未知。

肝脏是重要的代谢器官。我们以往的研究发现,ABCA6 基因的转录受胰岛素调控的转录因子 FoxO 的调节^[5]。通过免疫组化检测我们发现,ABCA6 分布于肝细胞的胞质内,并集中于胞核的一侧,很可能定位于反式高尔基体^[5]。这些研究结果提示,ABCA6 可能在肝脏的物质代谢中发挥作用。

生酮饮食(ketogenic diet, KD)是一个高脂肪、低碳水化合物和适当蛋白质的配方饮食。它以脂肪取代葡萄糖作为能量来源,具有促进脂肪酸氧化和酮体生成、抑制脂质合成和糖异生的代谢效应^[6]。本研究观察了生酮饮食喂养下小鼠肝脏 ABCA6 表达水平的变化,并检测了 ABCA6 基因缺失对生酮饮食喂养的小鼠血液生化指标、肝脏脂质含量及代谢相关基因表达的影响,为进一步研究 ABCA6 的功能提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

在南京医科大学实验动物中心饲养繁育的清洁级健康雄性 ABCA6 敲除(KO)小鼠和对照(WT)小鼠(武汉康威达基因科技有限公司),7 周龄,体重 20~25 g。

胆固醇及甘油三酯测试试剂盒(浙江东瓯);转氨酶、 β -羟丁酸仪和血糖、糖原测定试剂盒(南京建成有限公司);血糖仪和血糖试条(长沙三诺生物传感股份有限公司);游离脂肪酸检测试剂盒(日本和光纯药工业株式会社)。

1.2 方法

1.2.1 动物饲养

分别将体重接近的 ABCA6 KO 或 WT 小鼠随机分为 2 组,每组 6~7 只,给予生酮饮食(KD,含猪油 70%,酪蛋白 20%,纤维素 5.5%,预混料 4.5%)或

普通饮食(normal diet, ND)2 周。实验期间小鼠可自由饮水。

1.2.2 血液生化检测

采血前用 50 °C 左右温水浸泡尾部约 2 min,血管充血后,棉球消毒、擦干鼠尾,用消毒手术剪剪去尾尖 5~10 mm,用血糖试纸测定血糖。在生酮饮食饲喂第 4 天,取小鼠全血,室温静置 20 min,5 000 r/min 离心 15 min,取上清,得到血清。用试剂盒检测甘油三酯(TG)、胆固醇(TCH)、游离脂肪酸(FFA)、酮体(β -羟丁酸, β -HB)以及丙氨酸转氨酶(ALT)和天门冬氨酸转氨酶(AST)。

1.2.3 肝脏脂质含量检测

取 50 mg 左右的肝脏称重,加入 0.1 mmol/L 的 NaCl 500 μ L 匀浆,加入 1.5 mL 氯仿:甲醇(2:1)37 °C 抽提脂质 2 h 后离心,取下层有机相 500 μ L,氮气吹干,以含 1% Triton X-100 的无水乙醇溶液溶解,用试剂盒检测 TG 和 TCH。

1.2.4 Western blot

取肝脏组织约 50 mg,加入蛋白裂解液 300 μ L,BCA 法测定蛋白含量。取 50 μ g 蛋白,SDS-PAGE 电泳分离后转膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,一抗(1:200)4 °C 孵育过夜,TBS-T 漂洗 3 次后,用 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h,TBS-T 漂洗 3 次后用 ECL 显影液显影成像。

1.2.5 Real-time PCR 检测

TRIzol 法提取肝组织总 RNA,用 Taqman 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,引物由上海英俊生物有限公司合成(表 1)。Real-time PCR 应用 SYBR Premix ExtaqTM(TaKaRa 公司,日本),反应体系:SYBY Premix ExtaqTM 10 μ L,模板 5 μ L,引物 2.5 μ L,灭菌蒸馏水 2.5 μ L。反应条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 30 s,循环 40 次。用 Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System 进行检测,分析扩增曲线和分离曲线,处理数据,得出结果。

表 1 基因名称及引物序列

Table 1 Genes and sequence of real-time RT-PCR primers

基因名称(鼠源)	序列(5'→3')
HADH(hydroxyacyl dehydrogenase)	F:ACTACATCAAATGGGCTCTCAG,R:AGCAGAAATGGAATGCCGACC
HMGCS2(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2)	F:AGAGAGCGATGCAGGAACTT,R:AAGGATGCCCACATCTTTTGG
UCP2(uncoupling protein 2)	F:ACTTTCCCTCTGGATACCGC,R:ACGGAGGCAAAGCTCATCTG
FAS(fatty acid synthase)	F:GGTTACTACTGTGCTAGGTGTTG,R:TCCAGGCGCATGAGGCTCAGC
PCK1(phosphoenolpyruvate carboxykinase 1)	F:CTGCATAACGGTCTGGACTTC,R:GCCTTCCACGAACCTCCTCAC
DGAT2(diacylglycerol O-acyltransferase 2)	F:TCTTGGGTTATCTCGCTGCT,R:AACGCCTCATAAAGGCACAC

1.3 统计学方法

每组试验都独立重复3次。采用SPSS13.0统计软件,分析结果以均数±标准误($\bar{x}\pm s$)表示,各组间结果比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD检验, $P\leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生酮饮食对小鼠肝脏 ABCA6 表达的影响

将体重接近的 WT 小鼠随机分为 2 组,分别给予生酮饮食(KD)和普通饮食(ND)2周,对肝脏进行 Western blot 检测,结果显示,和 ND 组相比,KD 组小鼠肝脏 ABCA6 的表达水平明显增加(图 1),提示 ABCA6 蛋白可能参与小鼠对生酮饮食的代谢过程。

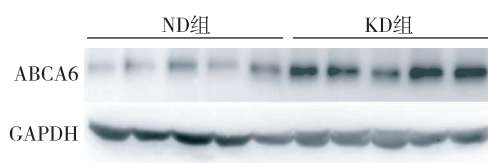


图 1 生酮饮食对小鼠肝脏 ABCA6 表达的影响

Figure 1 Effects of ketogenic diet on ABCA6 expression levels in mice liver

2.2 ABCA6 缺失对生酮饮食喂养的小鼠体重和血液生化指标的影响

为研究 ABCA6 的功能,我们构建了 ABCA6 KO 小鼠。对 KO 小鼠和 WT 小鼠的肝脏进行检测,可见 WT 小鼠肝组织中有大量 ABCA6 表达,而 KO 小鼠则完全检测不到,提示 ABCA6 敲除成功(图 2A)。

此前,我们已报道短期(4 d)KD 饮食可致小鼠体重下降^[7],与之一致,本研究观察到 WT 小鼠在给予 KD 饮食后体重明显降低,在 5 d 左右体重下降到最低值,此后体重逐渐上升,但仍显著低于 ND 喂养的小鼠;在 ND 或 KD 喂养条件下,ABCA6 缺失对小鼠体重均无显著影响(图 2B)。

对两种基因型小鼠血糖、血清 TG、TCH、FFA 和 β -HB 等代谢相关指标的检测显示,在 ND 条件下,WT 和 KO 小鼠在上述指标方面无显著差异(图 2C~I)。已知 KD 有降低血糖、升高 FFA 和 β -HB 的效应^[6]。本研究结果显示,KD 喂养 2 周后 WT 和 KO 小鼠的血糖均明显降低,且 KO 小鼠的血糖显著低于 WT 小鼠(图 2C)。KD 饮食对两种基因型小鼠血清 TG 均无明显影响(图 2D),但 KO 小鼠血清 TCH 在 KD 喂养后明显低于 WT 小鼠(图 2E)。KD 喂养导致两种基因型小鼠血清 FFA 均明显升高,但 KO 小鼠血清

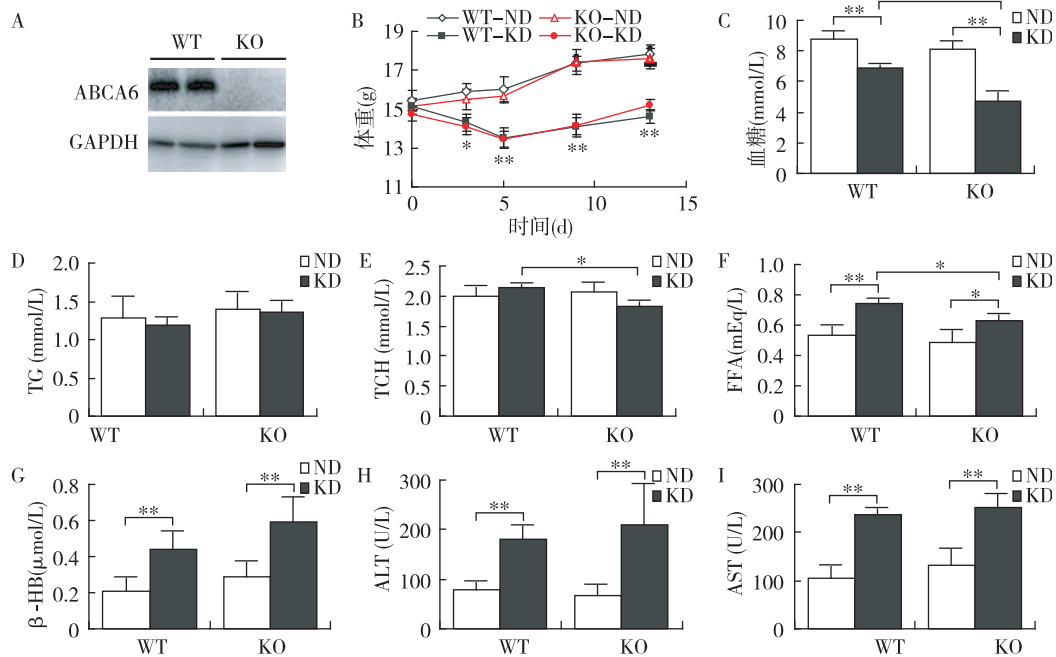
FFA 显著低于 WT 小鼠(图 2F)。两种基因型小鼠的血清 β -HB 在 KD 喂养 2 周后均显著升高,但两种基因型小鼠间差异无统计学意义(图 2G)。考虑到生酮饮食可能引起小鼠肝损伤^[8],我们检测了肝损伤血清标志物 ALT 和 AST。结果显示,与 ND 相比,KD 喂养 2 周后小鼠血清 ALT 和 AST 显著升高,但两种基因型小鼠间并无显著性差异(图 2H、I)。可见,虽然在以糖为主要能源的普通饮食喂养下,ABCA6 的缺失对小鼠血清代谢指标的影响并不明显,但在以脂肪酸代替糖提供能量的生酮饮食喂养下,ABCA6 的缺失对小鼠糖、脂代谢均有影响。因此推测,ABCA6 缺失可能引起脂肪酸代谢障碍;生酮饮食喂养时 KO 小鼠血糖低于 WT 小鼠,可能是其更多地利用糖提供能量所致。上述结果提示 ABCA6 可能参与肝脏的物质代谢,特别是脂质的代谢过程。

2.3 ABCA6 缺失对生酮饮食喂养的小鼠肝脏脂质含量及基因表达的影响

肝脏脂质含量的检测结果显示,KD 导致两种基因型小鼠肝脏 TG 明显增加,KO 小鼠比 WT 小鼠增加得更显著(图 3A);肝脏 TCH 含量则无明显变化(图 3B)。肝脏中参与糖、脂代谢的部分基因 mRNA 表达水平的检测结果显示,普通饮食喂养下,两种基因型小鼠代谢相关基因的表达水平无明显差异(图 3C);KD 喂养 2 周后,WT 小鼠肝脏中参与线粒体脂肪酸氧化的 HADH、UCP2 表达明显增加,酮体合成的限速酶 HMGCS2 的表达显著上调,催化脂质合成的 FAS、DGAT2 则明显被抑制,糖异生限速酶 PCK1 表达显著减少(图 3C),这些变化与文献报道的生酮饮食的代谢效应相一致^[6]。KD 喂养的 ABCA6 KO 小鼠 FAS、DGAT2 和 PCK1 的表达显著高于 WT 小鼠(图 3C),说明 ABCA6 的缺失导致 KD 的代谢效应减弱,提示 KO 小鼠可能存在对 KD 的代谢障碍;和 KD 喂养的 WT 小鼠相比,KO 小鼠 HMGCS2 的表达增加更显著,而 HADH、UCP2 表达无明显差异(图 3C),提示肝脏中可能存在对 ABCA6 缺失的代偿机制。

3 讨论

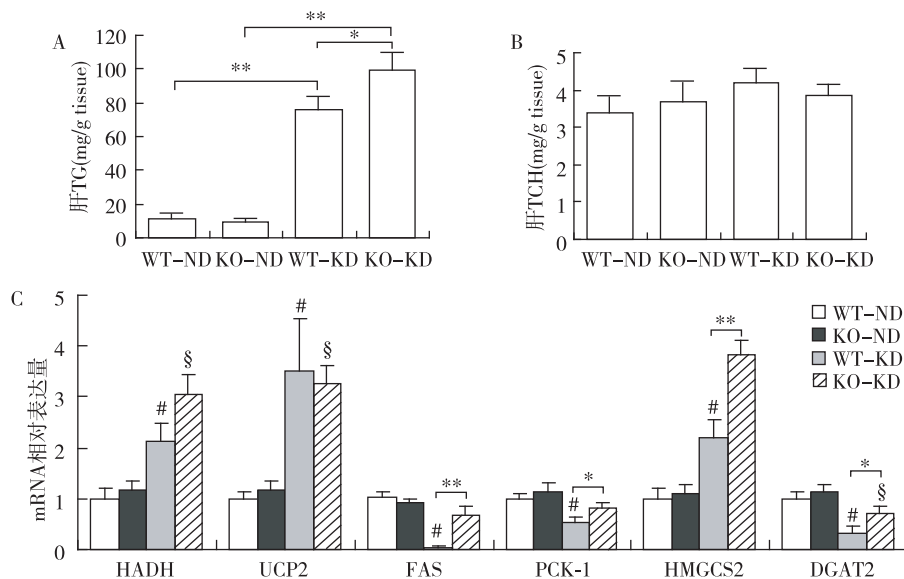
生酮饮食作为一种高脂肪、低碳水化合物的配方饮食,在临床上被广泛运用于治疗儿童难治性癫痫^[9-10]。近年来,生酮饮食所引起的代谢变化也被用于多形性神经胶质瘤等肿瘤的辅助治疗中^[11]。在本研究中,我们发现生酮饮食诱导小鼠肝脏 ABCA6 的表达;在普通饮食条件下,ABCA6 KO 小鼠与对照小鼠在血糖、TG、TCH、FFA、 β -HB 等代谢相关指标、



A:WB 检测小鼠肝脏 ABCA6 表达水平;B:KD 对小鼠体重的影响(与 ND 组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$, $n=6\sim7$);C~I:KD 喂养 2 周后,检测血糖、血清 TG、TCH、FFA、 β -HB、ALT、AST 等指标(* $P<0.05$,** $P<0.01$, $n=6\sim7$)。

图 2 生酮饮食对小鼠体重和血液生化指标的影响

Figure 2 Effects of ketogenic diet on body weight and serum biochemical index of WT and ABCA6 KO mice



A:KD 喂养的 ABCA6 KO 小鼠肝脏 TG 含量明显高于 WT 小鼠 (* $P<0.05$,** $P<0.01$, $n=6\sim7$);B: 两种基因型小鼠肝脏 TCH 含量无明显差别;
C:给予小鼠 KD 或 ND 2 周,提取小鼠肝脏组织 mRNA 进行 real-time PCR 检测(与 WT-ND 相比,* $P<0.05$;与 KO-ND 相比,§ $P<0.05$;与 WT-KD 相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$, $n=6\sim7$)。

图 3 KD 对小鼠肝脏脂质含量及基因表达的影响

Figure 3 Effects of ketogenic diet on hepatic lipid contents and expression of genes involved in metabolism

肝脂质含量和代谢相关基因表达水平等方面无明显差别;在生酮饮食条件下,和 WT 小鼠相比,ABCA6 KO 小鼠的血糖、FFA 和 TCH 降低,肝脏 TG 蓄积更显著,KD 对 FAS、DGAT2 和 PCK1 的抑制效应减弱,提示 ABCA6 KO 小鼠可能存在脂质代谢障碍。

文献报道,ABCA6 mRNA 水平在巨噬细胞分化过程中升高,并且在乙酰化低密度脂蛋白(Ac-LDL)刺激后明显下降,提示 ABCA6 可能参与维持细胞的胆固醇平衡^[12]。根据对荷兰人的基因组检测发现,ABCA6 的变异型与胆固醇水平有关^[13]。这些研究结

果与本文推测的 ABCA6 可能参与脂质代谢相一致。ABCA6 缺失对代谢的影响在以脂肪酸为主要能源的生酮饮食喂养时表现出来,而在以糖为主要能源的普通饮食条件下并不明显,提示 ABCA6 的功能在脂肪酸氧化增强的代谢状态下更有意义。

目前我们还不清楚 ABCA6 参与脂质代谢的具体环节。就脂肪酸氧化而言,存在线粒体脂肪酸 β 氧化、微粒体脂肪酸 ω 氧化和过氧化物酶体的脂肪酸 β 氧化等多种方式^[14],因此,ABCA6 在脂质代谢中的具体功能及其转运的底物尚待进一步研究。我们注意到,和 WT 小鼠相比,ABCA6 的缺失并不影响 KD 喂养时血清酮体的升高,且肝脏酮体合成的限速酶 HMGCS2 的表达显著上调,提示肝脏中存在对 ABCA6 缺失的代偿机制,这种代偿是否通过酶活性的变化或者其他代谢通路实现,尚需要进一步研究。

通过本研究,我们对 ABCA6 在生酮饮食引起的代谢变化中的作用有了初步认识,为进一步探索 ABCA6 能提供了新线索。

[参考文献]

- [1] Dean M, Annilo T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates[J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2005, 6: 123-142
- [2] Kaminski WE, Piehler A, Wenzel JJ. ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1762(5): 510-524
- [3] Kaminski WE, Wenzel JJ, Piehler A, et al. ABCA6, a novel subclass ABC transporter[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 285(5): 1295-1301
- [4] Wenzel JJ, Kaminski WE, Piehler A, et al. ABCA10, a novel cholesterol-regulated ABCA6-like ABC transporter [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306(4): 1089-1098
- [5] Gai J, Ji M, Shi C, et al. FoxO regulates expression of ABCA6, an intracellular ATP-binding-cassette transporter responsive to cholesterol[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(11): 2651-2659
- [6] Kennedy AR, Pissios P, Otu H, et al. A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292(6): E1724-E1739
- [7] 陈浩, 林燕蝶, 邹怡新, 等. 短期生酮饮食对小鼠代谢的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(8): 937-941
- [8] Asrih M, Altirriba J, Rohner-Jeanrenaud F, et al. Ketogenic Diet impairs FGF21 signaling and promotes differential inflammatory responses in the liver and white adipose tissue[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126364
- [9] Wilder RM. The effect of ketonemia on the course of epilepsy[J]. *Mayo Clin Bulletin*, 1921, 2: 307-308
- [10] Caraballo R, Noli D, Cachia P. Epilepsy of infancy with migrating focal seizures: three patients treated with the ketogenic diet. *epileptic disord*[J]. *Epileptic Disord*, 2015, 17(2): 194-197
- [11] Champ CE, Palmer JD, Volek JS, et al. Targeting metabolism with a ketogenic diet during the treatment of glioblastoma multiforme[J]. *J Neurooncol*, 2014, 117(1): 125-131
- [12] Klucken J, Büchler C, Orsó E, et al. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(2): 817-822
- [13] Van Leeuwen EM, Karssen LC, Deelen JA, et al. Genome of the Netherlands population-specific imputations identify an ABCA6 variant associated with cholesterol levels [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6065
- [14] Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system[J]. *Annu Rev Nutr*, 2001, 21: 193-230

[收稿日期] 2017-03-15

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnmu.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
 审理情况。