文章编号:1000-5404(2005)11-1083-03

论著

饮用纯净水对大鼠肝脏载脂蛋白 AⅠ和 B 基因表达的影响

赵 清[1],高京生[2],舒为群[1],邱志群[1],陈济安[1] (第三军医大学军事预防医学院:[1] 环境卫生学教研室,[2] 健康教育学教研室,重庆 400038)

提 要: 目的 观察饮用纯净水及加镁纯净水对大鼠肝脏载脂蛋白 AⅠ和载脂蛋白 B 基因表达的影响,探讨纯净水致血脂异常的作用机制。**方法** 健康 Wistar 大鼠 60 只,随机分为自来水组(对照组)、纯净水组和加镁纯净水组(纯净水 + 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$),每组 20 只。大鼠饲养至 6 个月时处死,取肝脏用 RT-PCR 法检测肝脏 apoAⅠ、apoB mRNA 表达量。**结果** 饮用纯净水可使大鼠肝脏 apoB mRNA 表达水平升高,肝脏 apoAⅠ mRNA 表达水平下降,但无显著性差异;加镁纯净水组大鼠肝脏 apoAⅠ mRNA 表达水平,比单纯饮用纯净水组上升,肝脏 apoB mRNA 水平与纯净水组比有下降,但无显著性差异。**结论** 提示肝脏 apoAⅠ、apoB 转录水平的表达可能不是纯净水致血脂异常的主要调控因素,可能存在转录后水平或肝外组织的调控,其作用机制尚待进一步研究。

关键词: 纯净水;载脂蛋白 AⅠ;载脂蛋白 B;基因表达
中图法分类号: R123; R322.47; R394.3 **文献标识码**: A

Effects of purified drinking water on hepatic expression of apolipoprotein AⅠ and B in rats

ZHAO Qing[1], GAO Jing-sheng[2], SHU Wei-qun[1], QIU Zhi-qun[1], CHEN Ji-an[1] ([1]Department of Environmental Hygiene, College of Preventive Medicine, 2Health Education, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of purified drinking water on the hepatic expression of apolipoprotein AⅠ and B in rats. **Methods** Sixty rats of both sexes were equally randomized into 3 groups. They were the tap water group (TW), purified water group (PW) and purified water + magnesium sulfate group (PW + Mg). The rats of 3 groups were fed with 3 kinds of water respectively for 6 months. **Results** When the data of TW and PW were compared, there was an increasing tendency of apoliprotein B expression and a decreasing tendency of apolipoprotein AⅠ expression in the liver of PW rats. When the data of PW and PW + Mg were compared, there was a decreasing of apolipoprotein B expression and an increasing tendency of apolipoprotein AⅠ expression in the liver of the PW + Mg rats. Nevertheless, no significant difference of the hepatic expression of apolipoprotein AⅠ and B was found among the 3 groups. **Conclusion** The findings of our study indicate that the feeding of PW or PW + Mg to the rats exerts little effect on the hepatic expression of apolipoprotein AⅠ and B in the rats.

Key words: purified water; apolipoprotein AⅠ; apolipoprotein B; gene expression

纯净水是一种典型的软水,其水质特征是镁及其他矿物元素含量极低[1,2]。研究表明,饮用软水(镁和钙含量较低)可引起血镁下降,血脂增高,增加动脉粥样硬化(AS)的发生率[3]。本研究前期亦表明,长期饮用纯净水可引起雌性大鼠血镁浓度显著降低[纯净水组(1.54 ± 0.19) mmol/L *vs* 自来水组(1.81 ± 0.27) mmol/L, $P < 0.05$][4],血脂(甘油三酯 TG、胆固醇 CH、低密度脂蛋白 LDL)显著增高[4,5]。有关软水及饮水中镁与血脂及心血管系统疾病关系的研究报道较多,而其作用机制尚不清楚。本实验在前期研究基础上,进一步观察饮用纯净水及加镁纯净水对载脂蛋白 AⅠ(apoAⅠ)和载脂蛋白 B(apoB)基因在肝脏转录水平的影响,探讨软水致血脂异常的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 健康 Wistar 大鼠 60 只,断乳 1 月龄,由本校实验动物中心提供,体质量(68.12 ± 15.68)g。大鼠在饲养室适应 1 周后,按完全随机法随机分为自来水组(对照组,TW)、纯净水组(PW)和加镁纯净水组(PW + Mg)。每组 20 只,雌雄各半,雌雄分笼饲养。饲养环境条件控制在湿度 50%

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(59838300)
Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (59838300)
作者简介:赵 清(1972-),女,云南省昆明市人,硕士,实验师,主要从事水质与健康方面的研究。电话:(023)68752294
通讯作者:舒为群,电话:(023)68752294,E-mail: wqshu@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2004-10-10;**修回日期**:2005-01-31

~70%及温度(20±3)℃,光照 12 h。动物自由摄食和饮水,组间除饮水外其它条件均一致。

1.1.2 实验用水 纯净水(市售):由自来水经砂滤、活性炭过滤、超滤、反渗透、臭氧处理而得,水中镁离子浓度为 0.015 mg/L;加镁纯净水:市售桶装纯净水添加 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$;自来水:由重庆市政供水系统提供的管道自来水,在本实验中作为对照。纯净水符合国家瓶装饮用纯净水卫生标准(GB17324-1998),自来水符合国家生活饮用水卫生标准(GB5749-85)。

1.1.3 饲料 全部喂饲为按中华人民共和国国家标准"实验动物全价营养饲料"(GB14924-94)要求配制的基础饲料,饲料中镁离子浓度为 2.1 mg/kg。

1.1.4 主要试剂与仪器 Tripure(Sigma 公司),*Taq* DNA 聚合酶,M-MuLV 逆转录酶(Promega 公司),dNTP,Oligo $d(T)_{18}$,RNase 抑制剂(MBI 公司),载脂蛋白 apoAⅠ、apoB 测定试剂盒(伊利康生物技术有限公司);Du-640 紫外分光光度计(Beckman 公司),PCR 基因扩增仪(Beckman 公司),电泳仪(BIO-RAD 公司),Gel Doc 2000 凝胶图像成像系统(BIO-RAD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 血清载脂蛋白 AⅠ(apoAⅠ)、载脂蛋白 B(apoB)含量

大鼠饲养至 6 个月时处死,用 1%戊巴比妥钠腹腔麻醉,采空腹静脉血测定血清 apoAⅠ、apoB 含量,采用单试剂免疫多点定标比浊法。

1.2.2 RT-PCR 法检测肝脏 apoAⅠ、apoB mRNA 表达水平

取血后迅速取肝脏经灭菌生理盐水清洗后,取 0.5 g 肝组织用灭菌锡箔纸包裹,迅速投入液氮保存。每组随机抽取 10 个样本(雌雄各半),用 Tripure 试剂抽提肝组织总 RNA。提取的 RNA 进行逆转录,cDNA 合成总体积为 20 μl,总 RNA 5 μg,Oligo $d(T)_{18}$ 2 μl,5×Buffer 4 μl,dNTP 2 μl,Rnase in 0.5 μl,M-MuLV 1 μl,加适量 DEPC 处理水,42 ℃ 60 min 反应后,95 ℃ 5 min 灭活逆转录酶待用。根据 GenBank 检索的大鼠 apoAⅠ和 apoB 基因序列设计引物,以 β-actin 为内参照。apoAⅠ引物为:GAACAAGGACCTGGAGAATG(上游),CCGGCCTTGGTATGATACTC(下游),预期扩增片段为 314 bp。apoB 引物为:ATCCAACTTAGGCCAACAGG(上游),TACTGTCCAGCCAACCACAC(下游),预期扩增片段为 336 bp。β-actin 引物为:TAAAGACCTCTATGCC-AACACAGT(上游),CACGATGGAGGGGCCGGACTCATC(下游),预期扩增片段为 250 bp。逆转录后产物再进行 PCR 扩增,反应体系为:cDNA 3 μl,上、下游引物各 2 μl(20 μmol/L),10×Buffer 2.5 μl,dNTP 0.5 μl,$MgCl_2$ 1.5 μl,*Taq* 酶 0.5 μl,加 ddH_2O 至 25 μl。扩增条件为:95 ℃预变性 10 min,94 ℃变性 50 s,58 ℃(apoAⅠ)、59 ℃(apoB、β-actin)退火 50 s,72 ℃延长 1 min,35 次循环后,72 ℃ 延伸 10 min。

PCR 产物于含 0.5 mmol/L 溴化乙锭(EB)的 2% 琼脂糖凝胶中电泳,电泳后将电泳凝胶置于 Gel Doc 2000 凝胶图像分析系统,扫描测得 PCR 电泳条带的光密度 INT×面积值,先将上述目的基因 PCR 产物扫描值与各自的 β-actin 表达产物扫描值相比,然后以样本/对照的比值表示基因表达水平。

1.3 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件行方差分析。

2 结果

2.1 纯净水及加镁纯净水对大鼠血清 apoAⅠ、apoB 含量的影响

纯净水组(PW)血清 apoB 含量均比自来水组(TW)显著升高($P<0.05$),同时加镁纯净水组(PW+Mg)apoB 含量显著低于纯净水组($P<0.05$);apoAⅠ含量各组间变化不大,无统计学意义;apoAⅠ、apoB 含量无论是在同性及不同性别之间均无显著差异。见表 1。

表 1 3种饮水对大鼠血清 apoAⅠ、apoB 含量的影响(g/L,$\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of three kirds of water on the levels of serum apoproteins AⅠ and B in rats (g/L, $\bar{x} \pm s$)

Group	Sex	apoAⅠ (n)	F	P	apoB (n)	F	P
TW		0.07±0.03(18)			0.17±0.04(19)		
PW	Both	0.07±0.03(14)	0.004	0.99	0.20±0.05[a](15)	3.38	0.04
PW+Mg		0.07±0.03(16)			0.17±0.05[b](19)		
TW		0.07±0.03(9)			0.15±0.03(9)		
PW	F	0.07±0.03(7)	0.07	0.94	0.19±0.04(8)	1.57	0.23
PW+Mg		0.08±0.04(8)			0.16±0.07(9)		
TW		0.08±0.04(9)			0.18±0.04(10)		
PW	M	0.07±0.03(7)	0.03	0.97	0.22±0.06(7)	2.24	0.13
PW+Mg		0.07±0.03(8)			0.18±0.03(10)		

a: $P<0.05$, *vs* TW; b: $P<0.05$, *vs* PW

2.2 纯净水及加镁纯净水对大鼠肝脏 apoAⅠ、apoB mRNA 表达的影响

肝脏 apoAⅠ mRNA 水平,纯净水组与自来水组比较有下降趋势,加镁纯净水组与纯净水组比较有上升,但无显著差异。肝脏 apoB mRNA 水平,与自来水组比较纯净水组可见上升,加镁纯净水组与纯净水组比较可见下降,但组间未见显著差异。肝脏 apoAⅠ、apoB mRNA 水平无论是在同性及不同性别之间均无显著差异。见表 2。

表 2 3种饮水对大鼠肝脏 apoAⅠ、apoB mRNA 表达的影响($n=5$,$\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of three kinds of water on the levels of hepatic expression of apoproteins AⅠ, B mRNA in rats ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Sex	apoAⅠ	F	P	apoB	F	P
TW		1.66±0.49			1.16±0.37		
PW	Both	1.45±0.36	0.61	0.55	1.39±0.65	0.44	0.65
PW+Mg		1.57±0.28			1.27±0.41		
TW		1.82±0.69			0.94±0.14		
PW	F	1.43±0.43	0.56	0.59	1.24±0.32	1.38	0.30
PW+Mg		1.56±0.39			1.03±0.31		
TW		1.50±0.10			1.38±0.42		
PW	M	1.46±0.34	0.26	0.78	1.54±0.92	0.08	0.93
PW+Mg		1.58±0.19			1.52±0.36		

3　讨论

3.1　纯净水对大鼠血清 apoAⅠ、apoB 含量的影响

我们前期研究结果显示，饮用纯净水 5 个月可显著增高血中 TC、TG、LDL-C 水平，而 HDL-C 变化较小。在本次实验中，大鼠饮用纯净水 6 个月，血清 apoAⅠ含量与对照组自来水组比较未观察到明显变化，与前期结果有一致性。结果显示，饮用纯净水可使大鼠血清 apoB 含量显著增高（$P<0.05$），与前期结果饮用纯净水使 LDL-C 水平显著增高一致。apoB 是引起动脉硬化的主要危险因素，apoB 及含 apoB 的 LDL 水平升高与 AS 发病率呈正相关。提示长期饮用纯净水可通过影响大鼠血清载脂蛋白 B 含量，从而影响 LDL-C 的转运和代谢，胆固醇由内皮细胞转向肝脏的过程受阻，使血中 LDL 增加引起血脂异常改变。

3.2　纯净水对大鼠肝脏 apoAⅠ、apoB mRNA 表达的影响

本实验中，饮用纯净水 6 个月未发现对大鼠肝脏 apoAⅠ mRNA 表达有显著影响，与血清 apoAⅠ含量水平有一致性。推测可能与饮水时间有关，也可能除了肝脏以外，肝外组织（如小肠）在 apoAⅠ的合成代谢中也起重要作用。实验结果显示，饮用纯净水可使肝脏 apoB mRNA 表达水平有上升，但上升水平不显著。而实验中观察到饮用纯净水可使血清 apoB 含量显著升高，存在 apoB mRNA 变化与 apoB 分泌量的不一致。提示饮用纯净水可上调肝脏 apoB mRNA 表达水平，但转录调控可能不是肝脏合成 apoB 的主要调控因素，对 apoB 的调控可能主要在转录后水平[6,7]。

3.3　加镁纯净水对大鼠血清载脂蛋白及肝脏载脂蛋白基因表达的影响

饮水中镁的含量与心血管疾病有明显负相关，镁是心血管疾病的保护因子[8,9]。本结果显示，与纯净水组比较，大鼠饮用加镁纯净水可显著降低 apoB 含量（$P<0.05$）。提示饮水途径补充镁可影响载脂蛋白含量，从而调节血脂异常，起到保护作用。推测可能是镁作为酶的激活剂，通过催化和激活脂代谢酶的活性，使其活性增加，从而加速周围组织中胆固醇的酯化和含 apoB 的 LDL 的代谢和清除，使血脂成分发生逆转。缺镁亦能影响载脂蛋白基因的表达，Fathiha 等的研究表明，镁缺乏大鼠与对照组大鼠相比肝脏 apoB 的 mRNA 表达显著增加，而肝脏载脂蛋白 E（apoE）的 mRNA 表达显著下降[10]。本次实验观察到饮用补充了 $MgSO_4$ 的纯净水组大鼠肝脏 apoAⅠ mRNA 水平，比单纯饮用纯净水组有上升，肝脏 apoB mRNA 水平与纯净水组比可见下降，但组间未见显著差异。提示镁可上调肝脏 apoAⅠ mRNA 水平，下调肝脏 apoB 的转录。血清 apoAⅠ水平与肝脏 apoAⅠ mRNA 水平均无显著性改变，有一致性。血清 apoB 水平有显著下降，而肝脏 apoB mRNA 水平下调不显著，提示肝脏 apoB 合成率可能受转录后翻译水平的调节。基因表达水平未见显著改变，可能与镁摄入量和时间有关。

参考文献：

[1] 赵　清，舒为群，李国平，等. 纯净水、净化水、凉开水、自来水的水质分析及其卫生学意义[J]. 重庆环境科学，2001，23（5）：46－48.

[2] 张建华. 郑州市桶装饮用纯净水卫生质量检测结果分析[J]. 郑州大学学报（医学版），2003，38(5)：814.

[3] Sherer Y，Shaish A，Levkovitz H，*et al*. Magnesium fortification of drinking water suppresses atherogenesis in male LDL-receptor-deficient mice[J]. Pathobiology，1999，67(4)：207－213.

[4] 张照英，舒为群. 长期饮用纯净水对血脂、钙镁离子、丙二醛、一氧化氮和血浆内皮素含量的影响[J]. 中国动脉硬化杂志，2003，11(4)：367－368.

[5] 舒为群，李国平，赵　清，等. 长期饮用纯净水对大鼠心肾相关指标的影响[J]. 中国公共卫生，2002，18(6)：706－708.

[6] Dixon J L，Furukawa S，Ginsberg H N. Oleate stimulates secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from HepG2 cells by inhibiting early intracellular degradation of apolipoprotein B[J]. J Biol Chem，1991，266(8)：5080－5086.

[7] Sparks J D，Sparks C E. Insulin modulation of hepatic synthesis and secretion of apolipoprotein B by rat hepatocytes[J]. J Biol Chem，1990，265(15)：8854－8862.

[8] Ravn H B，Korsholm T L，Falk E. Oral magnesium supplementation induces favorable antiatherogenic changes in ApoE-deficient mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，2001，21(5)：858－862.

[9] Itoh K，Kawasaka T，Nakamura M. The effects of high oral magnesium supplementation on blood pressure，serum lipids and related variables in apparently healthy Japanese subjects[J]. Br J Nutr，1997，78(5)：737－750.

[10] Nassir F，Mazur A，Giannoni F，*et al*. Magnesium deficiency modulates hepatic lipogenesis and apolipoprotein gene expression in the rat[J]. Biochim Biophys Acta，1995，1257(2)：125－132.

（编辑　汪勤俭）