

虾红素对小鼠肌肉组织和骨骼肌细胞中能量代谢相关基因 mRNA 表达的影响

蒋林科, 孙超

西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100

摘要: 本试验用高、低浓度虾红素日粮饲喂昆明白系小鼠和处理原代培养小鼠骨骼肌细胞, 提取总 RNA, 检测各时段 UCP3、LXR α 基因 mRNA 表达量, 探讨虾红素对小鼠个体发育、肌肉能量代谢相关基因表达变化规律的影响。结果表明: 高浓度组与对照组相比, 小鼠体重增长明显减慢, 肌肉组织第 10 天、30 天以及骨骼肌细胞作用 24 h 时 UCP3 mRNA 表达量均显著下降 ($P < 0.05$), LXR α 基因 mRNA 表达量均显著上升 ($P < 0.05$), 72 h 达到极显著水平 ($P < 0.01$)。低浓度组与对照组相比, 肌肉组织中 UCP3、LXR α 基因 mRNA 表达差异均不显著 ($P > 0.05$); 虾红素作用骨骼肌细胞 24 h UCP3 基因 mRNA 表达量显著下降 ($P < 0.05$), LXR α 基因 mRNA 表达量显著上升 ($P < 0.05$)。结果提示虾红素对小鼠肌肉的能量利用有一定的调控作用。

关键词: 虾红素, 小鼠, 肌肉组织, 骨骼肌细胞, 能量代谢

Role of astacene in mice skeletal muscle and muscle cell mRNA expression of energy metabolism-related genes

Linke Jiang, and Chao Sun

College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

Abstract: In order to examine the role of astacene on mice body development and the expression of energy metabolism related genes in mice, we treated mice (Kunming white) and primary culture of mouse muscle cells with astacene of higher and lower concentration. Then the total mRNA was extracted from the muscle tissue and cells respectively, and the mRNA levels of UCP3 and LXR α were detected by RT-PCR in all the samples. Compared with the control group, the body weight of mice in high concentrations of astacene group grown slowly, and the expressions of UCP3 genes decreased significantly in muscle tissue of the 10th day and the 30th day as well as the cells of treated for 24 h ($P < 0.05$). The expression of LXR α gene increased significantly in all samples ($P < 0.05$) and reached its peak at 72 h ($P < 0.01$). With the treatment of lower concentration of astacene, the expressions of UCP3 and LXR α gene mRNA in muscle tissue did not alter much, but in muscle cells treated for 24 h, the mRNA level of UCP3 gene decreased significantly ($P < 0.05$), and LXR α gene increased significantly ($P < 0.05$). The results suggest that astacene has a role in regulating the energy use in mice muscle.

Keywords: astacene, mice, muscle tissue, skeletal muscle cell, energy metabolism

Received: October 16, 2008; **Accepted:** December 29, 2008

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30871785), National 11th Five Year Support Plan (No. 2006BAD04A11), New Century Excellent Researcher Award Program (No. NCET-06-0865).

Corresponding author: Chao Sun. Tel: +86-29-87092102; E-mail: sunchao2775@163.com

国家自然科学基金项目(No. 30871785), 国家十一五支撑计划(No. 2006BAD04A11), 教育部新世纪优秀人才计划(No. NCET-06-0865)资助。

虾红素 (Astacene, 3,3'-dihydroxy-2,3,2', 3'-tetrahydro-b,b'-carotene-b,b'-dione) 又名喇蛄素, 是从藻类等植物中提取的一种天然类胡萝卜素, 研究发现其与虾青素 (Astaxanthin 3,3'-dihydroxy-b, b'-carotene-4,4'-dione) 具有相似的结构(图 1)和功能^[1], 在抗衰老、提高肌体免疫力、强化肌体需氧代谢, 增强肌肉力量和耐力等方面具有重要的作用^[2-3]。肝 X 受体(Liver X receptors, LXRs)是 Willy 于 1995 年发现的一个胆固醇代谢的调节因子, 最近研究发现它在骨骼肌中也有较高表达^[4], 在肌体的糖类代谢和脂类氧化方面发挥重要作用。解耦联蛋白 3(Uncoupling protein 3, UCP3)是 1997 发现的线粒体内膜的转运蛋白, 主要表达在肌肉组织中, 与能量代谢密切相关^[5]。本试验以小鼠为研究对象, 用高、低 2 种浓度虾红素处理后, 检测不同时间段骨骼肌中能量代谢相关基因 *UCP3* 和 *LXR α* 表达量变化, 以期为进一步研究动物需氧代谢、增强肌肉力量和耐力等提供参考。

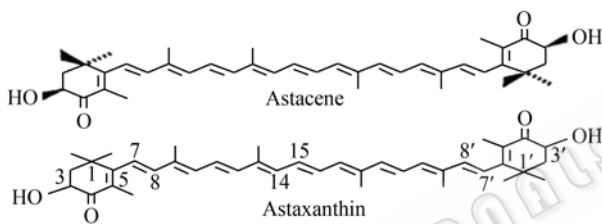


图 1 虾红素与虾青素的分子结构
Fig. 1 The molecular structure of astacene and astaxanthin.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物

20 日龄健康雄性昆明小白鼠(第四军医大学动物试验中心, 许可证号: SCXK(军(2007-007))); 13 日龄健康雄性昆明小白鼠(同上)。

1.1.2 试剂与仪器

DMEM、F12 培养基(GIBCO), 链蛋白酶(Sigma), 胎牛血清(兰州明海), 牛血清白蛋白(Amersco), H-10 虾红素(台湾惠弘, Huey Hung), RNA 提取试剂盒 TRIpure Reagent(百泰克生物技术有限公司), 反转录试剂盒 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas), *Taq* 酶(Fermentas), dNTP(西安沃尔森生物公司), 普通琼脂糖 DNA 回收

试剂盒购自(天根生化公司), pMD19-T vector (TaKaRa)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠饲喂及处理

54 只 20 日龄雄性昆明小白鼠预饲喂 5 d 之后, 随机分成 3 个组, 饲喂基础日粮的对照组、高浓度(3.071 g/kg 饲料)和低浓度(0.768 g/kg 饲料)虾红素处理组, 每组 18 只; 预饲喂 5 d 之后, 开始试验处理, 每天早 8 点投食, 投食之前称量各组采食量和体重。饲喂 10 d 和 30 d 时从各组内随机抽取 9 只小鼠致死, 迅速取腿部骨骼肌, 液氮冷冻, 提取总 RNA, -80°C 保存。

1.2.2 小鼠骨骼肌细胞培养及处理

无菌采集 13 日龄乳鼠后肢骨骼肌组织, 剪成 1 mm^3 左右的小组织块, 加链酶蛋白酶消化液置 37°C 振荡摇床内温育 30~45 min, 加有血清培养液终止消化, 过孔径为 200 目和 600 目的尼龙细胞筛, 1200 r/min 离心 7 min, 弃上清, 沉淀物用无血清培养液重悬, 1000 r/min 离心 7 min, 弃上清, 沉积的细胞团块用基础培养液制成细胞悬液, 细胞以 1×10^5 个/ cm^2 密度接种至直径 7 cm 培养皿中, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱内用 DMEM/F12 基础培养基培养, 每隔 3 d 换液 1 次。培养到第 4 天细胞汇合后, 分成 3 个组, 1 个空白对照组和 2 个分别用低浓度(5 $\mu\text{mol/L}$)和高浓度(15 $\mu\text{mol/L}$)的虾红素处理的试验组, 在处理 24 h 和 72 h 时, 提取总 RNA, -80°C 保存。

1.2.3 引物设计

根据 GenBank 已发表的小鼠基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件和 Oligo 6 软件, 设计 *UCP3*、*LXR α* 基因 PCR 扩增引物, 并同时设计内参 β -actin 基因扩增引物进行检测。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成, 序列见表 1。

1.2.4 总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

按照 TRIpure Reagent 总 RNA 提取试剂盒说明书, 提取原代培养骨骼肌细胞在处理 24 h、72 h 的总 RNA, 以及饲喂试验各组取样的总 RNA, 用 1% 的琼脂糖凝胶进行检测, 并用反转录试剂盒合成第一条链 cDNA。

1.2.5 PCR 扩增

PCR 反应体系(25 μL): 14.3 μL 灭菌的二蒸水、

表 1 PCR 引物参数

Table 1 Parameters of PCR primers

Gene	Primer (5'-3')	Cycle	T_m (°C)	Length of amplified fragments (bp)
β -actin	F: ACCCATCCACATCCTCCTGC R: GCTGCTGAGAAGCCGAAACC	29	53.8	399
UCP3	F: ACTGCTGCTGACACGAGA R: GACAACACTGTGGGCTGA	29	57.3	266
LXR α	F: TTAGGGATAGGGTTGGAGTC R: TGAGCCTGTTCTCTTCTTG	30	52.9	290

2.5 μ L 10 \times PCR buffer, 2.5 μ L 2.5 mmol/L dNTP Mix, 1 μ L 10 μ mol/L Primer I, 1 μ L 10 μ mol/L Primer II, 0.2 μ L 0.5 U/ μ L *Taq* 酶, 1 μ L cDNA 模板, 利用 My Cyclor™ Thermal Cyclor (BIO-RAD)进行扩增(反应条件及各基因引物参数见表 1)。

1.2.6 基因检测

利用 RT-PCR 扩增技术, 从提取骨骼肌和培养的骨骼肌细胞总 RNA 中扩增骨骼肌中 *UCP3*、*LXR α* 基因, 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, SynGene Bio-image system 凝胶成像系统分析图像, 测定各条带的 OD 值, 以 β -actin 的检测 OD 值为内参比较。

1.2.7 数据统计分析

应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 采用单因素方差(One-way ANOVA)分析, 进行 LSD 多重比较 ($n=6$), 利用 Pearson 相关分析法分析数据相关性, 试验数据以平均数 \pm 标准差(Means \pm SE)表示。

2 结果与分析

2.1 虾红素对小鼠日增重变化的影响

由图 2 可知, 与对照组相比, 高浓度虾红素组对小鼠体重增加有显著抑制作用($P<0.05$), 而低浓度虾红素组差异不显著($P>0.05$), 说明虾红素对小鼠的体重增加有抑制作用。

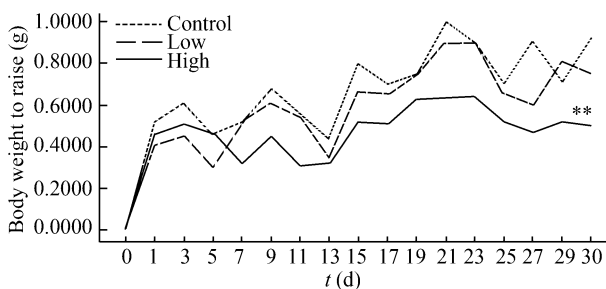


图 2 虾红素对小鼠体重增加的影响

Fig. 2 Effect of astaxene for mice weight raise.

2.2 虾红素对小鼠肌肉组织中能量代谢相关基因 mRNA 表达的影响

2.2.1 虾红素对小鼠肌肉组织中 *LXR α* 基因的表达影响

如图 3A 所示, 高浓度虾红素处理组 (3.071 g/kg) 在第 10 天和第 30 天时分别与对照组相比表达量显著上调 ($P<0.05$), 低浓度虾红素处理组 (0.768 g/kg) 第 10 天与对照组相比差异不显著 ($P>0.05$), 第 30 天时差异达到显著 ($P<0.05$)。说明虾红素对 *LXR α* 基因的影响不但与处理浓度强相关, 也表现出与低剂量有一定的时间依赖性关系。

2.2.2 虾红素对小鼠肌肉组织中 *UCP3* 基因的表达影响

由图 3 B 可见, 高浓度虾红素处理组 (3.071 g/kg) 与对照组相比 *UCP3* mRNA 表达量显著降低 ($P<0.05$), 处理第 10 天与第 30 天对比差异显著 ($P<0.05$), 低浓度虾红素处理组 (0.768 g/kg) 与对照组对比差异不显著 ($P>0.05$)。高、低试验组之间 *UCP3* 基因 mRNA 表达量变化显著 ($P<0.05$), 说明虾红素对 *UCP3* 基因有负调控作用, 具有浓度和时间的双重依赖性。

2.3 虾红素对原代培养骨骼肌细胞形态变化的影响

如图 4 所示, 低浓度虾红素 (5 μ mol/L) 处理骨骼肌细胞 24 h (图 4B) 与对照 (图 4A) 相比, 细胞形态无明显变化, 多为细长型, 72 h 时 (图 4C) 与对照 (图 4D) 相比, 细胞变短变大, 扁平贴壁; 高浓度虾红素 (15 μ mol/L) 处理骨骼肌细胞 24 h (图 4E) 和 72 h (图 4F) 分别与对照组 (图 4A、4D) 相比, 细胞变短, 扁平, 多为不规则多边形。这些变化提示, 虾红素可能有助于促进骨骼肌细胞提早向肌管和肌纤维分化, 最后有助于肌体能量代谢利用。

2.4 虾红素对小鼠骨骼肌细胞能量代谢相关基因 mRNA 表达的影响

2.4.1 虾红素对肌细胞 *LXR α* 基因 mRNA 表达的影响

图 5 A 结果显示, 低浓度虾红素 (5 μ mol/L) 处理

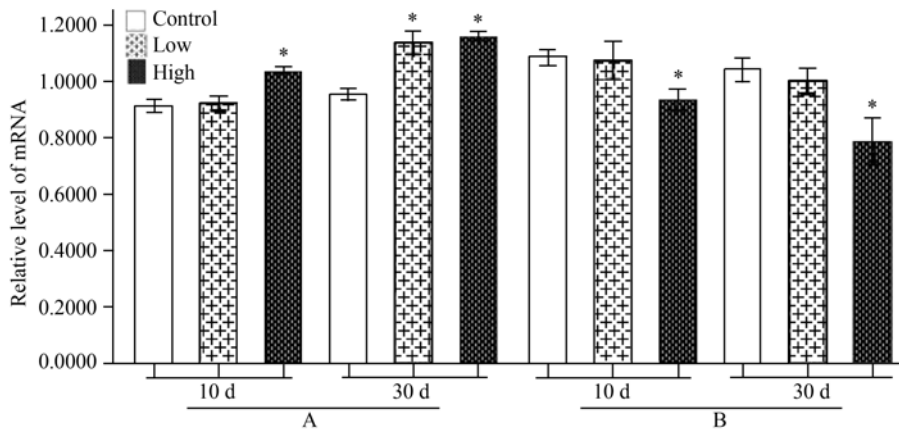


图 3 虾红素对小鼠 $LXR\alpha$ 和 $UCP3$ 基因 mRNA 表达的影响

Fig. 3 Expression of mice $LXR\alpha$ and $UCP3$ mRNA on deal astacene. (A) Amplification result of expression of each group $LXR\alpha$ mRNA on deal 10 days and 30 days. (B) Amplification result of expression of each group $UCP3$ mRNA on deal 10 days and 30 days.

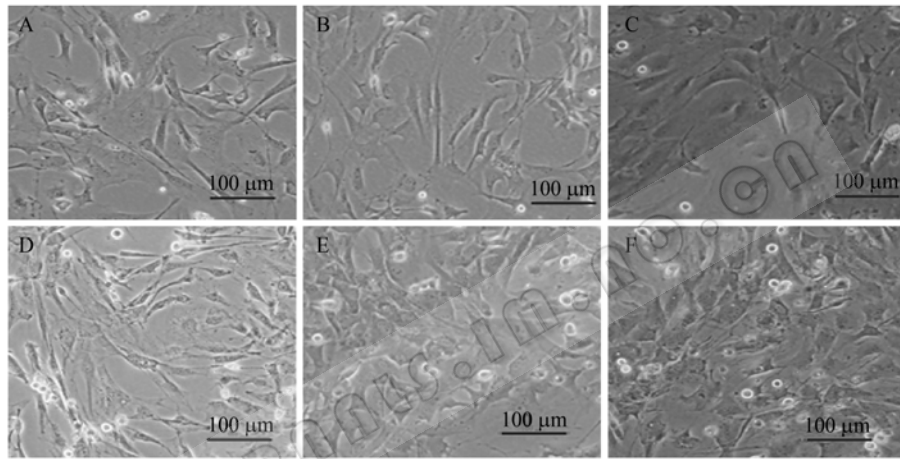


图 4 虾红素对原代培养骨骼肌形态变化的影响

Fig. 4 Effect of astacene on primary culture of mouse skeletal muscle. (A) Control group for 24 h. (B) Group treated by astacene 5 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. (C) Group treated by astacene 5 $\mu\text{mol/L}$ for 72 h. (D) Control group for 72 h. (E) Group treated by astacene 15 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. (F) Group treated by astacene 15 $\mu\text{mol/L}$ for 72 h.

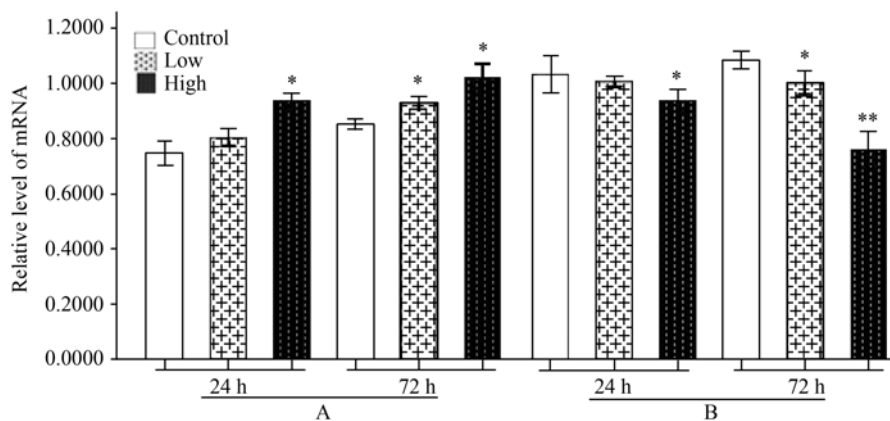


图 5 虾红素对肌肉细胞 $LXR\alpha$ 和 $UCP3$ 基因 mRNA 表达的影响

Fig. 5 Expression of $LXR\alpha$ and $UCP3$ mRNA on deal astacene in mice muscle cell. (A) Amplification result of expression of $LXR\alpha$ mRNA in the astacene after on deal 24 h and 72 h. (B) Amplification result of expression of $UCP3$ mRNA in the astacene after on deal 24 h and 72 h.

骨骼肌细胞, 24 h *LXR α* 基因 mRNA 表达量与对照组相比差异不显著($P>0.05$), 72 h 时与对照组相比差异达到显著($P<0.05$)。高浓度虾红素(15 $\mu\text{mol/L}$)作用骨骼肌细胞 24 h 和 72 h 时 *LXR α* 基因 mRNA 表达量与对照组相比差异均显著($P<0.05$)。说明虾红素对小鼠骨骼肌中 *LXR α* 基因的表达具有正调控作用, 且与低浓度虾红素存在时间依赖性。

2.4.2 虾红素对肌细胞 *UCP3* 基因 mRNA 表达的影响

如图 5 B 所示, 低浓度虾红素(5 $\mu\text{mol/L}$)处理骨骼肌细胞 24 h, *UCP3* 基因 mRNA 表达量与对照组相比差异不显著($P>0.05$), 72 h 时与对照组相比差异显著($P<0.05$)。高浓度虾红素(15 $\mu\text{mol/L}$)作用骨骼肌细胞 24 h, 肌细胞中 *UCP3* 基因 mRNA 表达量与对照组相比显著下降($P<0.05$), 72 h 下降达到极显著水平($P<0.01$)。提示虾红素对小鼠骨骼肌细胞中 *UCP3* 基因的表达有较强的抑制作用, 并与低剂量作用有一定的时间依赖性。

3 讨论

研究发现, 虾红素的长共轭双键链, 终端环结构上的羟基和不饱和酮基, 以及羟基和酮基所构成的 α -羟基酮是虾红素具有各种生物学功能的主要原因^[6]。Miki 发现, 虾红素淬灭单线态氧和捕捉自由基的作用是 β -胡萝卜素的 10 多倍, VE 的 500 多倍, 具有“超级 VE”的美称^[7]。Manabe 等通过培养人的肾小球膜细胞, 用高糖培养基诱发建立高血糖模型肾病后, 研究发现虾青素主要是通过清除细胞线粒体上 ROS 和抑制高糖的作用来抑制糖尿病性肾病的发作^[8]。Hix 等在试验动物和细胞系上研究证实, 虾青素可以有效的阻止癌细胞的扩散^[9]。

Wataru 等在 *ICR* 小鼠试验证明, 虾青素可以提高肌体对氧气利用率和持久耐力, 使肌肉组织中脂肪酸转移酶含量增加, 减少肌体脂肪沉积^[2,10], 这与本试验结果相吻合。Aysun 等用丽体鱼试验, 发现饲喂虾红素之后可以明显的提高鱼的繁殖能力和生存能力, 并且可以加深肌肉的颜色^[11], 有研究证实用虾红素处理小鼠后增加了 II 型肌纤维的比例, 从而使肉质颜色变深, 运动能力加强。本试验中用 3.071 g/kg 浓度虾红素处理小鼠 30 d 后 *UCP3* 基因表达明显下降。有研究证实人的骨骼肌中 *UCP3* 超

表达使糖摄取、糖和脂类的氧化增强^[12], 促进能量以热能的形式释放^[13,14]。而 *UCP3* 降低时有利于 ATP 的生成, 可以加强肌肉力量和耐受力。这可以间接地说明虾红素在促进骨骼肌能量代谢方面确实有重要作用。Eili 等证明在脂肪组织中 *UCPs* 受到 *PPAR γ* 的调控, *LXR α* 的高表达可以间接的上调 *UCPs* 的表达^[15], 本试验中虾红素上调了 *LXR α* 基因的表达量, 但却下调了 *UCP3* 的表达。提示这可能与组织表达差异有关, 虾红素可能通过其它通路对肌肉组织中 *UCP3* 的表达起到负调控作用。

肝 X 受体(Liver X receptors, *LXRs*)有 *LXR α* 和 *LXR β* 两种亚型, 在肝脏中大量表达, 参与肌体的多种生理调节。最近研究发现在占到人体重 40%的骨骼肌中有 *LXR α* 大量表达^[4], Ross 等证实, *LXRs*能促进肌肉和脂肪组织中葡萄糖量上调^[16], Thomasm 等证实用胰岛素作用后, 在调节有活性的 *GLUT4* 基因转录过程中 *LXR α* 发挥主要作用^[17]。本试验结果显示虾红素有促进肌肉组织中 *LXR α* 上调的功能。提示虾红素在骨骼肌中可能通过上调 *LXR α* 的表达量而间接对肌肉中糖代谢起到一定的调控作用。Susan 等通过转染人的 T-淋巴瘤细胞使 *Bcl-2* 超表达后发现, 抑制介导细胞凋亡的 *Bcl-2* 超表达时并不伴随着抗氧化物的增加^[18]。最近, Tripathi 等在小鼠上证实, 虾红素可抑制抗癌药物环磷酰胺对雄性小鼠生殖细胞的毒害作用并对受损细胞有很好的修复作用, 提高生殖细胞的数量和质量^[19]。虾红素对肌体能量代谢方面现在研究大多都在活体宏观阶段, 在其作用机理、作用通路靶点上研究得很少, 寻找肌体中虾红素的作用靶位点有待进一步探讨研究。

REFERENCES

- [1] Liu GX, Hu Q, Sommerfeld M, *et al.* Astacene is a major secondary carotenoid in the green alga *Palmelloccoccus miniatus*. *J Phycol*, 2003, **39**(S1): 36.
- [2] Aoi W, Naito Y, Takanami Y, *et al.* Astaxanthin improves muscle lipid metabolism in exercise via inhibitory effect of oxidative CPT1 modification. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **366**(4): 892–897.
- [3] Ikeuchi M, Koyama T, Takahashi J, *et al.* Effects of astaxanthin supplementation on exercise-induced fatigue in mice. *Biol Pharm Bull*, 2006, **29**(10): 2106–2110.
- [4] Muscat GE, Wagner BL, Hou J, *et al.* Regulation of cholesterol homeostasis and lipid metabolism in skeletal

- muscle by liver X receptor. *J Biol Chem*, 2002, **277**(43): 40722–40728.
- [5] Enerbaeck S, Jacobsson A, Simpson EM, *et al.* Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*, 1997, **387**(6628): 90–94.
- [6] Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J*, 1995, **9**(15): 1551–1558.
- [7] Lu BJ, Xiao AF, Li LJ, *et al.* Technological process of cell disruption for extracting astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* by acid method under autoclave conditions. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(7): 1285–1292.
卢宝驹, 肖安风, 李利君, 等. 高温湿热酸法破壁提取法夫酵母胞内虾青素. *生物工程学报*, 2008, **24**(7): 1285–1292.
- [8] Manabe E, Handa O, Naito Y, *et al.* Astaxanthin protects mesangial cells from hyperglycemia-induced oxidative signaling. *J Cell Biochem*, 2008, **103**(6): 1925–1937.
- [9] Hix LM, Frey DA, McLaws MD, *et al.* Inhibition of chemically-induced neoplastic transformation by a novel tetra-sodium diphosphate astaxanthin derivative. *Carcinogenesis*, 2005, **26**(9): 1634–1641.
- [10] Ikeuchi M, Koyama T, Takahashi J, *et al.* Effects of astaxanthin in obese mice fed a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, **71**(4): 893–899.
- [11] Kop A, Durmaz Y. The effect of synthetic and natural pigments on the colour of the cichlids(*Cichlasoma severum* sp. Heckel 1840). *Aquacult Int*, 2008, **16**(2): 117–122.
- [12] Garcia-martinez C, Sibille B, Solanes G, *et al.* Overexpression of UCP3 in cultured human muscle lowers mitochondrial membrane potential, raises ATP/ADP ratio, and favors fatty acid vs. glucose oxidation. *FASEB J*, 2001, **15**(11): 2033–2035.
- [13] Han DH, Nolte LA, Ju JS, *et al.* UCP-mediated energy depletion in skeletal muscle increases glucose transport despite lipid accumulation and mitochondrial dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, **286**(3): 347–353.
- [14] Luo GF, Wen XH, Yang GS. Role of leptin in porcine preadipocyte differentiation and mRNA expression of PGC-1 α and UCPs. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2007, **23**(1): 51–55.
罗桂芳, 文旭辉, 杨公社. 瘦素(Leptin)对猪前体脂肪细胞分化及 PGC-1 α 和 UCPs mRNA 表达的影响. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, **23**(1): 51–55.
- [15] Dressel U, Allen TL, Pippal JB, *et al.* The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *J Mol Endocrinol*, 2003, **17**(12): 2477–2493.
- [16] Ross SE, Erickson RL, Gerin I, *et al.* Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism. *Mol Cell Biol*, 2002, **22**(16): 5989–5999.
- [17] Commerford SR, Varqas L, Dorifman SE, *et al.* Dissection of the insulin-sensitizing effect of liver X receptor ligands. *J Mol Endocrinol*, 2007, **21**(12): 3002–3012.
- [18] Thomson SJ, Cox AG, Cuddihy SL, *et al.* Inhibition of receptor-mediated apoptosis upon Bcl-2 overexpression is not associated with increased antioxidant status. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **375**(1): 145–150.
- [19] Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. *Toxicology*, 2008, **248** (2-3): 96–103.