论著

文章编号:1000-5404(2009)15-1436-04

炎症对SRA/CD36双基因敲除小鼠肝LDL受体表达的影响

李秀兰[1],柳 青[1],雷 寒[2],刘 宏[1],陈压西[3],阮雄中[3] (重庆医科大学附属第一医院:[1]临床研究中心,[2]心内科,[3]感染性疾病教育部重点实验室脂质研究中心,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨炎症对清道夫受体A(scavenger receptor A, SRA)和CD36双基因敲除($SRA^{-/-}/CD36^{-/-}$)小鼠肝脏LDL受体表达的影响及其潜在机制。**方法** 将1~3月龄,体质量为18~23 g的$SRA^{-/-}/CD36^{-/-}$雄性小鼠随机分为对照组($n=7$),炎症组($n=6$),2组均喂以高脂饮食,炎症组小鼠采取皮下注射酪蛋白方法诱导产生慢性炎症模型,14周后应用实时荧光定量RT-PCR技术和免疫组化方法检测肝脏LDL受体基因及调控其转录的SREBP2、SCAP基因表达水平,并观察肝脏形态学及血生化指标的变化。**结果** 与正常对照相比,炎症状态时肝脏LDL受体、SREBP2、SCAP mRNA水平显著高于对照组($P<0.05$),蛋白表达的水平也较对照组明显升高;肝细胞内脂质沉积加重,炎性细胞浸润;血清总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平均明显降低($P<0.05$),高密度脂蛋白胆固醇、甘油三酯降低不明显。**结论** 炎症通过促进肝细胞内SREBP2、SCAP的表达,进而增强细胞膜表面LDL受体的表达,最终导致肝细胞内胆固醇沉积。

关键词: 炎症;SRA/CD36双基因敲除小鼠;低密度脂蛋白受体
中图法分类号: Q54; Q786; R575.5 **文献标识码:** A

Effects of inflammatory stress on LDL receptor expression in the liver of SRA/CD36 double knockout mice and its potential mechanisms

LI Xiu-lan[1], LIU Qing[1], LEI Han[2], LIU Hong[1], CHEN Ya-xi[3], RUAN Xiong-zhong[3] ([1]Department of Clinical Research Center, [2]Department of Cardiology, [3]Centre for Lipid Research, Key Laboratory for Infectious Diseases of Ministry of First Affiliated Hospital Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of inflammatory stress on low density lipoprotein (LDL) receptor (LDLr) expression in the liver of scavenger receptor A (SRA)/CD36 double knockout mice and its potential mechanisms. **Methods** Male SRA/CD36 double knockout mice with body weight from 18 grams to 23 grams and age from 1 month to 3 months were randomly divided into control group ($n=7$) and inflammation group ($n=6$). All mice were fed with high lipid diet containing 15% fat and 1.25% cholesterol, and 0.5% bile acid. Casein was injected subcutaneously in mice in the inflammation group to induce inflammatory stress. After 14 weeks, both mRNA and protein expressions of LDLr, sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) and SREBP cleavage-activating protein (SCAP) genes in the liver were examined by real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and immunohistochemistry staining, respectively. Serum levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), LDL and high-density lipoprotein (HDL) were measured by biochemical techniques. Serum concentration of serum amyloid protein (SAA) was determined by ELISA. Frozen sections of liver were stained with Oil Red O to visualize the lipid accumulation. **Results** Under inflammatory stress, the expressions of LDLr, SCAP and SREBP2 genes increased significantly as compared with those in the control group ($P<0.05$). Lipid accumulation in the liver also increased. Serum levels of TC and LDL-C, not TG and HDL-C were significantly lower ($P<0.05$). **Conclusion** Inflammatory stress can up-regulate the expressions of SREBP2, SCAP and LDLr genes in the liver of SRA/CD36 double knockout mice. This may contribute to the lipid accumulation in the liver.

Key words: inflammatory stress; SRA/CD36 double knockout mice; low-density lipoprotein receptor

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2008CB517309)
Supported by the Preliminary Special Project for 973 Research Program of Ministry of Science and Technology of China (2008CB517309)
作者简介: 李秀兰,女,山西省阳泉市人,硕士研究生,主要从事脂质代谢方面的研究。E-mail:lixiulan80@yahoo.com.cn
通信作者: 柳 青,电话:(023)66768383,E-mail:qingliu5566@yahoo.cn
收稿日期: 2009-04-14;**修回日期:** 2009-05-19

低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor,LDLr)是低密度脂蛋白受体家族中的主要成员之一,它能与低密度脂蛋白(low-density lipoprotein,LDL)、载脂蛋白 B100 和载脂蛋白 E 的脂蛋白结合,调节胆固醇的体内平衡。LDLr 存在于哺乳动物和人体几乎所有的细胞膜表面上,但以肝细胞最为丰富。随着对 LDLr 基因表达调控水平研究的不断深入,发现细胞内胆固醇可通过一个负反馈调控机制来调控 LDLr 的转录[1]。正常状态下,当细胞内胆固醇水平升高时,LDLr 的转录就下降;当细胞内胆固醇被消耗时,LDLr 的转录就被激活。

Yokoyama 等[2]发现固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding protein,SREBP)活化后可识别结合 LDLr 基因启动区的固醇调节元件 1(sterol-responsive element,SRE-1),激活 LDLr 基因的转录,增强 LDL 受体的表达,由此认为 SREBP 是调控 LDLr 基因表达的转录因子。SREBP 的活化受到胞内胆固醇和 SREBP 裂解激活蛋白(SREBP cleavage-activating protein,SCAP)调节。SCAP 可以与 SREBP 在细胞内质网上结合成 SCAP-SREBP 复合物,对 SREBP 起稳定作用,并通过控制 SREBP 在亚细胞上定位而调节其活性[3]。Gierens 等[4]研究发现炎症因子 IL-6 可不受胆固醇浓度的影响通过诱导 SREBP1a、SREBP2 以及 Sp1、Sp3 分别与 HepG2 细胞 LDLr 基因启动区的 SRE-1 和重复序列 3 结合,导致 LDLr 基因的转录增加,LDLr 活性增强。Chen 等[5,6]体外实验也发现炎症因子(TNF-α、IL-1β)可上调 SCAP 及 SREBP2 的表达,促进 SCAP-SREBP2 从内质网向高尔基体的转移及 SREBP2 的活化,从而增强 LDLr 基因的表达,最终使胞外胆固醇经 LDLr 途径源源不断进入并沉积于细胞,但炎症在体内对肝细胞 LDLr 基因表达的影响及其潜在机制的研究不多见,因此本实验旨在通过建立小鼠体内炎症模型,探讨炎症对肝脏 LDLr 表达的影响及其潜在机制。

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组

$SRA^{-/-}/CD36^{-/-}$小鼠(具有 C57BL/6 遗传背景)由美国 Maria Febbraio 博士(美国 Cleveland 临床基金会 Lerner 研究所细胞生物学部)提供,于重庆医科大学实验动物中心 SPF 级小鼠房饲养、繁殖。选用 1 ~ 3 月龄,体质量(18 ~ 23 g)的雄性小鼠作为研究对象,各小鼠随机分为对照组(n = 7)和炎症组(n = 6),2 组都喂以高脂饲料(含 15% 脂肪,1.25% 胆固醇,0.5% 胆汁酸等),炎症组小鼠隔日皮下注射 10% 酪蛋白(Casein)0.3 ~ 0.5 ml,饲养 14 周后处死,处死前所有小鼠均禁食 24 h。留取各组小鼠血清及肝脏,并将肝脏分成 3 部分,一部分 OCT 包埋后迅速置于液氮罐冷冻,-40 ℃保存,另外两部分直接冻存于 -40 ℃,分别作石蜡切片和提取组织总 RNA。

1.2　血清生化指标检测

炎症指标血清淀粉样蛋白(Serum amyloid protein, SAA)的检测采用双抗夹心 ELISA 法,试剂盒为美国 Biotechnology Systems 产品;总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol,HDL-C)、甘油三酯(triglyceride, TG)含量用酶直接法及酶偶联比色法测定,试剂盒购自重庆百杰生物技术公司,具体操作严格按照说明书进行,其中对照组因血清量不定只检测 5 只小鼠标本。

1.3　肝脏脂质沉积的形态学观察

OCT 包埋肝脏做 8 μm 冷冻切片,10% 福尔马林盐溶液固定,油红 O 染色 10 ~ 15 min,苏木精复染核 1 min,流水冲洗返蓝 10 min 以上,水溶性封片剂封片,Leica 显微镜成像系统观察并拍照。

1.4　肝脏组织总 RNA 的提取及实时定量 RT-PCR 分析

分别取 2 组小鼠肝脏,Trizol 法抽提总 RNA,SYBR Green 荧光定量 RT-PCR 检测目的基因 mRNA 水平变化。根据 GenBank 中小鼠的靶基因序列,用 Primer Express 设计所需的 PCR 引物,其序列见表 1。以 β-actin 为内参,将其与目的基因一起在同等条件下进行 PCR 扩增,以目的基因拷贝数减去 β-actin 基因拷贝数得出目的基因 mRNA 相对表达量,再以炎症组各基因相对表达量减去对照组相应各基因平均 mRNA 相对表达量,然后以得到值的相对数作为常数 e 的指数求幂值,比较 2 组小鼠 mRNA 相对表达量。在数据处理中去除偏异较大值后对照组 n = 6,炎症组 n = 3。

表 1　RT-PCR 分析所用基因引物序列

基因	引物序列	产物大小(bp)
SCAP	上游:5′-AAGGGACCAGGTGGAACACA-3′	58
	下游:5′-GCGCGGCCACCTTGTA-3′	
SREBP2	上游:5′-CATCCCTTGGGCCAGAAGTT-3′	62
	下游:5′-TCCTTGGCTGCTGACTTGATC-3′	
LDLr	上游:5′-TTGGGTTGATTCCAAACTCCAT-3′	58
	下游:5′-CCGATTGCCCCCATTGA-3′	
β-actin	上游:5′-CGATGCCCTGAGGCTCTTT-3′	59
	下游:5′-TGGATGCCACAGGATTCCAT-3′	

1.5　免疫组织化学检测

肝脏组织石蜡包埋,5 μm 厚连续切片,切片常规脱蜡水化,抗原修复,滴加兔抗 LDLr 一抗(1∶200)(购自武汉博士德公司),自制 SCAP 一抗(1∶300),自制 SREBP2 一抗(1∶200),4 ℃过夜,按 PV-6001 试剂盒说明书行免疫组织化学染色,DAB 显色,镜下控制显色时间,苏木精复染核 3 min,1% 盐酸酒精分化,流水冲洗返蓝 15 min 以上,梯度酒精脱水,中性树胶封片,Leica 显微镜成像系统观察并拍照。抗原呈颗粒状或弥漫性着色,着色强度不同,分布亦不均匀,以能辨认有棕色颗粒或棕黄色着色的细胞为阳性细胞。

1.6　统计学方法

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据

分析，组间比较采用 Student' t 检验。

2 结果

2.1 小鼠血清炎症指标检测及血脂水平变化

血清 SAA 在对照组和炎症组中的浓度分别为(5.50 ± 2.67)、(10.32 ± 2.88) ng/ml。二者相比，炎症组 SAA 水平明显升高($P<0.05$)；表明炎症模型建立成功。血脂水平变化结果见表2：血清 TC 水平均明显降低($P<0.05$)，主要是由 LDL-C 的降低导致($P<0.05$)；血清 HDL-C、TG 浓度的虽略降低，但无统计学意义($P>0.05$)。

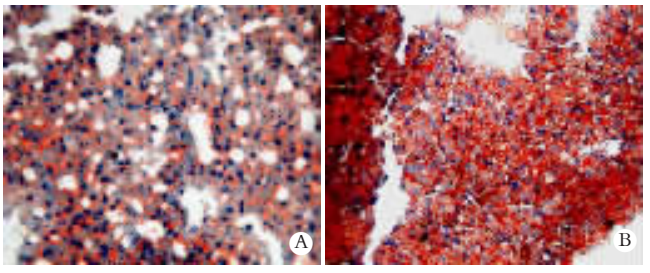
表2 小鼠血清脂质指标检测结果(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	TC	LDL-C	HDL-C	TG
对照组	5	2.34 ± 0.42	1.35 ± 0.26	0.68 ± 0.24	0.72 ± 0.12
炎症组	6	1.68 ± 0.17[a]	1.00 ± 0.16[a]	0.57 ± 0.21	0.60 ± 0.17

a：$P<0.05$，与对照组比较

2.2 肝脏形态学变化

图1显示 $SRA^{-/-}/CD36^{-/-}$ 小鼠对照组肝细胞内可见点或片状脂滴，而在炎症组内可见大量脂滴聚集成片，肝细胞间有大量炎症细胞浸润，即炎症促进肝细胞内脂质沉积。



A：$SRA^{-/-}/CD36^{-/-}$ 小鼠对照组；B：炎症组

图1 炎症组与对照组肝脏脂质沉积情况 (油红 O ×200)

2.3 小鼠基因表达变化特征

RT-PCR 定量分析结果显示：与对照组小鼠相比，炎症组小鼠 LDLr 基因表达升高了 4.9 倍($P<0.05$)；调控其表达的 SREBP2、SCAP mRNA 水平较对照组也明显升高($P<0.05$)，分别升高了 0.9 和 2.3 倍。

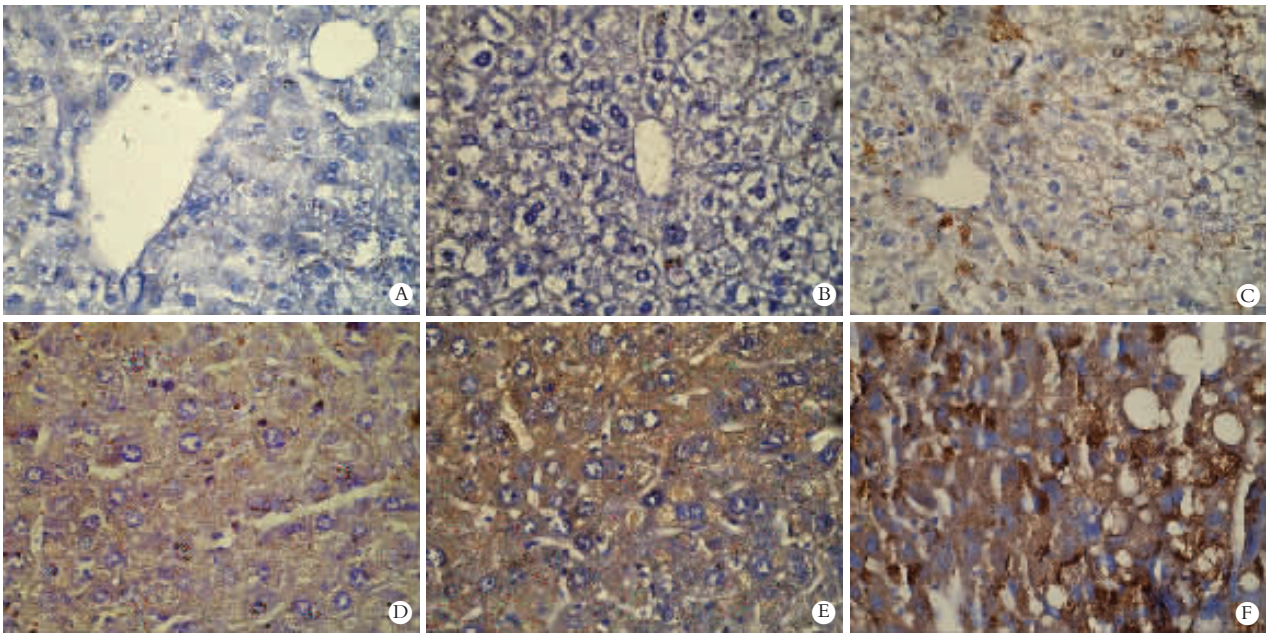
2.4 肝脏免疫组化结果

图2显示 SCAP 和 SREBP 蛋白主要分布于细胞质中，LDLr 蛋白位于细胞膜及细胞质内，抗原呈颗粒状或弥漫性棕色或棕黄色着色，着色强度不同，与对照组相比，炎症组中各蛋白表达量明显增多。

3 讨论

为建立一个稳定的炎症模型，本研究在 Baltz 等[7]的研究方法上作了改进，将皮下注射 10% 酪蛋白的频率改为隔日 1 次而非每日 1 次，这样既可保证炎症状态的稳定又可提高动物的存活率，并且我们在动物的饮食中添加了高浓度的胆固醇(浓度为 1.25%)。饲养 14 周后，炎症组血清中急性时相反应蛋白 SAA 的浓度较对照组显著升高，说明本研究在 $SRA^{-/-}/CD36^{-/-}$ 小鼠上成功建立了慢性炎症模型。

肝脏在胆固醇代谢中起着重要的作用，它不仅是合成胆固醇最活跃的器官，也是体内胆固醇排泄的重要器官。血浆中的胆固醇主要存在于 LDL 中，而 65% ~ 70% 的 LDL 是依赖肝细胞的 LDLr 途径清除，因此肝脏 LDLr 表达的水平对维持血浆胆固醇浓度稳定具有重要作用。在本研究中我们运用实时定量 RT-PCR 方法及免疫组织化学方法分别从 mRNA 水平和蛋白水平



A ~ C：分别为对照组 SREBP2 蛋白、SCAP 蛋白、LDLr 蛋白；D ~ F：分别为炎症组 SREBP2 蛋白、SCAP 蛋白、LDLr 蛋白

图2 对照组和炎症组肝脏组织免疫组化结果 (PV ×400)

检测炎症状态下肝细胞 LDLr 的表达情况,发现与对照组相比,炎症组中肝细胞 LDLr 在 mRNA 水平及蛋白水平的表达均显著上调,说明炎症可促进肝细胞 LDLr 基因的表达。同时本研究表明,炎症组肝细胞内脂质沉积加重,细胞间有大量炎症细胞浸润。这些结果就在体内进一步验证了 Chen 等[5,6]体外实验结果,即炎症可破坏胆固醇负反馈调节机制,通过促进 LDLr 表达使血清中的胆固醇经 LDLr 途径不断被摄入细胞并沉积下来。

本实验采用的小鼠为常用于构建动脉粥样硬化模型的 C57BL/6 小鼠,在给予高胆固醇饮食且敲除 SRA/CD36 基因的情况下,炎症组与对照组相比血清中总胆固醇浓度不升反降(主要由 LDL-C 的降低所致)就更加说明炎症状态下肝细胞 LDLr 表达的上调是造成细胞内高脂负荷而血清中胆固醇水平降低,主要是 LDL-C 浓度的降低的重要原因。

在胆固醇负反馈调节机制中,存在于细胞质内质网的核转录因子 SREBP2 和胆固醇敏感器 SCAP 是两个最主要的组成成分。Chen 等[5,6]体外实验表明,不论细胞内是否存在高胆固醇负荷,炎症因子都可促进肝细胞内 SREBP2、SCAP 的表达,并促使 SCAP 携带 SREBP2 由内质网向高尔基体的转移进而促进肝细胞表面 LDLr 的表达。在本模型中我们发现炎症状态下 SREBP2 和 SCAP 基因的 mRNA 水平均也显著上调,与对照组相比分别升高了 0.9、2.3 倍;免疫组化显示细胞质中 SREBP2 和 SCAP 蛋白弥散分布,明显多于对照组,由此我们在体内进一步验证和重现了 Chen 等[5,6]体外实验结果。

此外,随着近年来对非酒精性脂肪肝研究的关注,发现炎性细胞因子在肝脏脂质代谢障碍引发脂肪肝中扮演了重要角色,但是具体影响机制尚不清楚。在本研究中我们观察到炎症可诱导 $SRA^{-/-}/CD36^{-/-}$ 小鼠 LDLr、SREBP2、SCAP 基因表达上调进而导致细胞内胆固醇的沉积,促进肝细胞发生脂肪变性[8]。这与汪晓红等[9]在体外研究非酒精性脂肪肝胆固醇代谢情况及可能的机制中发现的结果相同。该研究以软脂酸诱导建立肝细胞脂肪变性模型,在细胞水平初步研究 TC 代谢及其合成通路相关基因的表达变化,发现脂肪变性肝细胞存在 TC 代谢紊乱,肝细胞内 TC 含量增加,TC 合成通路相关基因 SREBP-2 及其靶基因羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(hydroxymeth-ylglutaryl CoA reductase,HMGCR)、LDLr mRNA 表达上调,并随脂肪变性程度加重而更为明显,因此本研究结果提示:炎症通过干扰 SCAP 介导的细胞内胆固醇对 LDLr 的反馈调节,在引发或促进肝细胞的脂肪变性和脂肪肝形成中可能具有重要作用。值得一提的是,Ma 等[10]在载脂蛋白 E 基因敲除小鼠体内研究非酒精性脂肪肝形成机制也有同样的发现。

本实验通过构建 $SRA^{-/-}/CD36^{-/-}$ 小鼠炎症模型,分析了炎症对肝细胞 LDLr 表达的影响及可能机制,阐明炎症可使 SCAP 介导的 LDL 受体表达失调,从而导致肝细胞内脂质沉积的发生。这一机制的阐明可能对炎症在引发或促进肝细胞的脂肪变性和脂肪肝形成机制的研究有帮助;可对未来临床药物研究用以逆转炎症所致细胞内脂质沉积,降低或减轻炎症对肝细胞的损伤提供参考,将药物设计聚焦于 SCAP-SREBP2-LDLr 途径的任一环节可能成为研究的热点。

参考文献:

[1] Goldstein J L, Brown M S. The LDL receptor and the regulation of cellular cholesterol metabolism[J]. J Cell Sci Suppl, 1985, 3:131 – 137.

[2] Yokoyama C, Wang X, Briggs M R, *et al*. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene[J]. Cell, 1993, 75(1):187 – 197.

[3] Rawson R B. The SREBP pathway--insights from Insigs and insects [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(8): 631 – 640.

[4] Gierens H, Nauck M, Roth M, *et al*. Interleukin-6 stimulates LDL receptor gene expression via activation of sterol-responsive and Sp1 binding elements[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(7):1777 – 1783.

[5] Chen Y, Ruan X Z, Li Q, *et al*. Inflammatory cytokines disrupt LDL-receptor feedback regulation and cause statin resistance: a comparative study in human hepatic cells and mesangial cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 293(3):F680 – F687.

[6] Chen Y X, Ruan X Z, Huang A L, *et al*. Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in HepG2 cells induced by inflammatory cytokines[J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(24): 2185 – 2190.

[7] Baltz M L, Gomer K, Davies A J, *et al*. Differences in the acute phase responses of serum amyloid P-component (SAP) and C3 to injections of casein or bovine serum albumin in amyloid-susceptible and -resistant mouse strains[J]. Clin Exp Immunol, 1980, 39(2):355 – 360.

[8] 马正伟,刘利东,李　昆,等. 不同脂肪乳剂对肝移植大鼠脂代谢及氮平衡的影响[J]. 中华消化外科杂志,2007,6(2):112 – 116.

[9] 汪晓红,范竹萍,邱德凯,等. 脂肪变性肝细胞胆固醇代谢及合成相关基因的表达[J]. 上海交通大学学报:医学版, 2007,27(9): 1111 – 1114.

[10] Ma K L, Ruan X Z, Powis S H, *et al*. Inflammatory stress exacerbates lipid accumulation in hepatic cells and fatty livers of apolipoprotein E knockout mice[J]. Hepatology, 2008, 48(3):770 – 781.

(编辑　吴培红)