论著

文章编号:1000-5404(2010)16-1728-04

炎症促进清道夫受体基因敲除小鼠主动脉脂质积聚的分子机制

刘 宏[1],柳 青[1],雷 寒[2],李秀兰[1],陈 昱[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:临床研究中心[1],心血管内科[2])

【摘要】 **目的** 探讨炎症促进清道夫受体A和CD36双敲(SR double knockout, SR DKO) C57BL/6J小鼠主动脉固醇调节元件结合蛋白2(sterol regulatory element binding protein2, SREBP2)表达,加重主动脉脂质异常积聚的分子机制。**方法** 13只SR DKO雄性小鼠,按体质量大小,采用完全随机的方法,分为炎症组($n=6$)和对照组($n=7$)。喂养高脂饮食14周,检测血清炎症因子和脂质水平;油红O染色观察主动脉脂质积聚;实时定量PCR和免疫组织化学染色,分析主动脉低密度脂蛋白受体(LDLr)、调控其转录的SREBP2及SREBP2裂解激活蛋白(SCAP) mRNA和蛋白表达水平。**结果** 炎症组血清淀粉样蛋白A(SAA)水平比对照组明显增高[(10.32±2.88) ng/ml *vs* (5.50±2.67) ng/ml, $P<0.05$];主动脉切片油红O染色结果发现,炎症组比对照组脂质积聚明显增加;炎症组主动脉的SREBP2、SCAP和LDLr mRNA和蛋白表达水平比对照组明显增高($P<0.05$)。**结论** SR DKO小鼠在炎症状态下,促进主动脉胆固醇敏感器SCAP和SREBP2表达,上调LDLr,使胞内摄入胆固醇增加,加重主动脉脂质的异常积聚。

【关键词】 炎症;清道夫受体A;CD36;基因敲除;固醇调节元件结合蛋白
【中图法分类号】 R543.502;R364.5;R394.1 【文献标志码】 A

Inflammatory stress promotes lipid accumulation in aorta of scavenger double knockout mice

Liu Hong[1], Liu Qing[1], Lei Han[2], Li Xiulan[1], Chen Xian[1] ([1]Department of Clinical Research Center, [2]Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate whether inflammatory stress exacerbates lipid accumulation and the mechanism of up-regulation of sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) expression in the aorta of scavenger receptor double knockout (SR DKO) mice. **Methods** Male SR DKO mice fed with high lipid diet were randomly divided into the control group ($n=7$) and the inflammation group induced by 10% (w/v) 0.5 ml casein injection ($n=6$). After 14 weeks, the mice were sacrificed, and the blood sample of right atrium was collected and the aorta was taken. Inflammatory cytokines, such as serum amyloid A (SAA), IL-6 and TNF-α was determined by ELISA. Serum levels of total cholesterol (TC) and low-density lipid cholesterol (LDL-C) were detected by enzymatic assay. Frozen sections of aorta were stained with Red Oil O to visualize lipid accumulation. Both the mRNA and protein expressions of SREBP2, SREBP cleavage-activating protein (SCAP) and low density lipoprotein receptor (LDLr) in the aorta were measured by real-time polymerase chain reaction and immunohistochemical staining respectively. **Results** Increased of serum SAA was observed in inflammatory mice (10.32±2.88 *vs* 5.50±2.67 ng/ml, $P<0.05$). In the inflammatory mice, a increase in SREBP2, SCAP and LDLr mRNA level of the aorta, as well as mature SREBP2, SCAP and LDLr proteins abundance were found, when compared with control animals ($P<0.05$). **Conclusion** Inflammatory SR DKO mice are associated with increased SREBP2 gene expression of aortas. This is probably the cause for enhanced SCAP gene expression and, consequently, for increase cholesterol uptake through LDLr pathway and for promoting lipid accumulation in aortas of the mice with absence of uptake of modified LDL.

【**Key words**】 inflammatory stress; scavenger receptor A; CD36; gene knock out; sterol regulatory element binding protein

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670869). Corresponding author: Liu Qing, E-mail: qingliu5566@yahoo.cn

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(30670869)
【通信作者】 柳 青, E-mail:qingliu5566@yahoo.cn

心脑血管疾病在导致人类死亡的疾病排名中位列首位,而动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的发生、发展与心脑血管疾病息息相关,对 AS 形成机制的研究也越来越受到重视。目前普遍认为 AS 是一种炎症性疾病,炎症在 AS 形成的各阶段起着重要的作用[1,2]。

清道夫受体(scavenger receptor,SR)包括 SR-A 和 CD36,具有结合和内吞修饰型 LDL 的特性,该过程不受胞内胆固醇浓度的影响,导致大量胆固醇异常积聚在细胞内,形成泡沫细胞。SR 摄取修饰型 LDL,导致 AS 的发生[3]。我们课题组前期体外实验结果表明炎症可打破细胞内胆固醇负反馈调节的稳态平衡,导致脂质代谢异常,通过低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor,LDLr)途径摄入大量胆固醇,加重脂质积聚[4]。在炎症状态下,缺乏 SR 途径摄入修饰型 LDL 的 SR-A 和 CD36 双敲(SR double knockout, SR DKO) C57BL/6J 小鼠,通过 LDLr 途径,在吸收、内吞和外排脂质方面的作用仍不清楚。因此,我们建立 SR DKO 小鼠的慢性系统性炎症模型,拟探讨炎症状态下主动脉脂质沉积的分子机制是否为促进主动脉细胞胆固醇稳态平衡的重要调节因素,即固醇调节元件结合蛋白 2(sterol regulatory element binding protein2, SREBP2)和 SREBP 裂解活化蛋白(SREBP cleavage activating protein, SCAP)的表达而使脂质大量沉积在主动脉中。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 SR DKO C57BL/6J 小鼠 4 ~ 6 周龄,体质量 18 ~ 24 g,为美国克利夫兰 Lerner 研究所 Maria Febbraio 博士惠赠;喂养条件:重庆医科大学实验动物中心无致病原环境,饲养笼和饮水均经高压蒸汽灭菌,每日光照 12 h。SR DKO 小鼠经高脂饮食喂养,高脂饮食成分为 21% 黄油、1.25% 胆固醇、19.5% 酪蛋白和 0.5% 胆酸钠。将小鼠完全随机分为炎症组($n=6$)和实验对照组($n=7$):炎症组进行 10%(质量体积比)酪蛋白隔天皮下注射 0.5 ml,诱导小鼠产生慢性系统性炎症[5]。对照组隔天皮下注射生理盐水 0.5 ml。实验时间为 14 周。小鼠禁食 12 h,腹腔注射戊巴比妥钠;从右心房采集小鼠血液,待血清析出后,分离血清;剥离主动脉,-80 ℃储存。

1.2 炎症因子测定

检测血清淀粉样蛋白 A(serum amyloid A,SAA)、IL-6 和 TNF-α,采用美国(R&D Ltd, USA)双抗夹心 ELISA 试剂盒,操作详见试剂盒说明书。

1.3 油红 O 染色法

观察主动脉脂质积聚:带有主动脉的心脏,经 OCT 包埋后,进行冰冻切片,厚度为 8 μm。染色步骤简述如下:10% 福尔马林盐溶液固定,油红 O(Sigma 公司)染色 5 ~ 10 min,苏木精复染 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脂质沉积。

1.4 实时定量 PCR

分析主动脉 LDLr 基因及调控其转录的 SREBP2、SCAP mRNA 表达水平。采用 Trizol 法抽提主动脉组织总 RNA,用 70% 乙醇洗涤 RNA 沉淀,干燥后,用 10 ~ 15 μl DEPC 水溶解。取 2 μl RNA 加入 500 μl DEPC 水,用紫外分光光度计定量检测 RNA 含量,将各标本标化成相同的浓度,贮存于 -80 ℃备用。

cDNA 制备:详细方法参照 ABI 公司操作说明书,将总 RNA 逆转录成 cDNA。

基因表达水平测定:采用 SYBR Green 荧光定量 RT-PCR 检测 LDLr、SREBP-2 和 SCAP mRNA Ct 值。根据 GenBank 中小鼠的靶基因序列,用 Primer Express 设计 RT-PCR 引物,引物序列见表 1。采用比较 Ct 值法 $-\triangle\triangle$Ct 来计算基因的表达水平,以 18S rRNA 为内参,比较 2 组小鼠 mRNA 表达量的差异。计算公式如下:炎症组相对于对照组基因表达水平的倍数 = exp($-\triangle\triangle$Ct)($\triangle\triangle$Ct = 炎症组 $\triangle$Ct - 对照组 $\triangle$Ct,$\triangle$Ct = 目的基因 Ct 值 - 18S rRNA Ct 值)。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列
SCAP	上游引物:5′-TGGAGCTTTTGAGACTCAGGA-3′
	下游引物:5′-TCGATTAAGCAGGTGAGGTCG-3′
SREBP2	上游引物:5′-TGAAGGACTTAGTCATGGGGAC-3′
	下游引物:5′-CGCAGCTTGTGATTGACCT-3′
LDLr	上游引物:5′-GAAGTCGACACTGTACTGACCACC-3′
	下游引物:5′-TGACTCAGACGAACAAGGCTG-3′
18S rRNA	上游引物:5′-CCTGGCACCCAGCACAAT-3′
	下游引物:5′-GCCGATCCACACACGGAGTACT-3′

1.5 免疫组织化学染色

带有主动脉的心脏 OCT 包埋,切片厚度 8 μm。一抗兔抗 LDLr(1∶250)(武汉博士德公司),一抗兔 SCAP(自制 1∶250),一抗鼠 SREBP2(自制 1∶250),4 ℃过夜,按即用型 S-P 试剂盒(北京中杉公司)说明进行免疫组织化学染色,DAB 显色,Leica 显微镜成像系统观察,出现棕色颗粒或棕黄色着色的细胞为阳性细胞。

1.6 统计学分析

采用 SAS 9.1 软件进行分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 炎症指标

SR DKO 炎症组小鼠的血清 SAA 浓度高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);对照组和炎症组的血清 TNF-α 浓度及 IL-6 浓度差异无统计学意义($P>0.05$),结果见表 2。

表 2 2 组小鼠血清炎症指标检测结果($\bar{x} \pm s$)

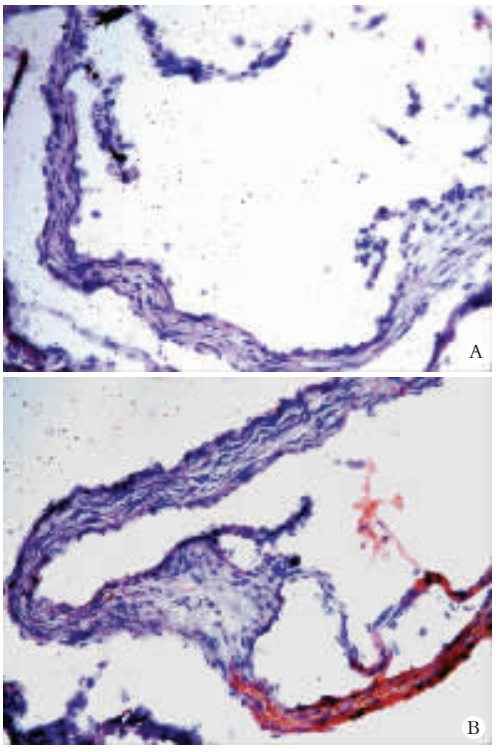
组别	n	SAA(ng/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNF-α(pg/ml)
对照组	7	5.50 ± 2.67	51.35 ± 12.88	60.00 ± 8.25
炎症组	6	10.32 ± 2.88[a]	56.50 ± 9.67	62.70 ± 8.59

a:$P<0.05$,与对照组小鼠比较

2.2 主动脉根部形态学

图 1 显示 SR DKO 小鼠对照组主动脉根部切片可见点或

片状脂滴，而在炎症组内可见大量脂滴聚集成片。

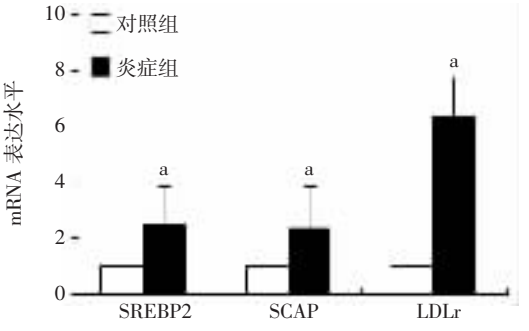


A：对照组 B：炎症组

图1　各组小鼠主动脉油红O染色观察　（×200）

2.3　各组主动脉的mRNA水平

RT-PCR定量分析结果显示，与对照组相比，炎症组小鼠主动脉SCAP、SREBP2和LDLr基因表达水平比对照组明显增高（$P<0.05$），见图2。



a：$P<0.05$，与对照组比较

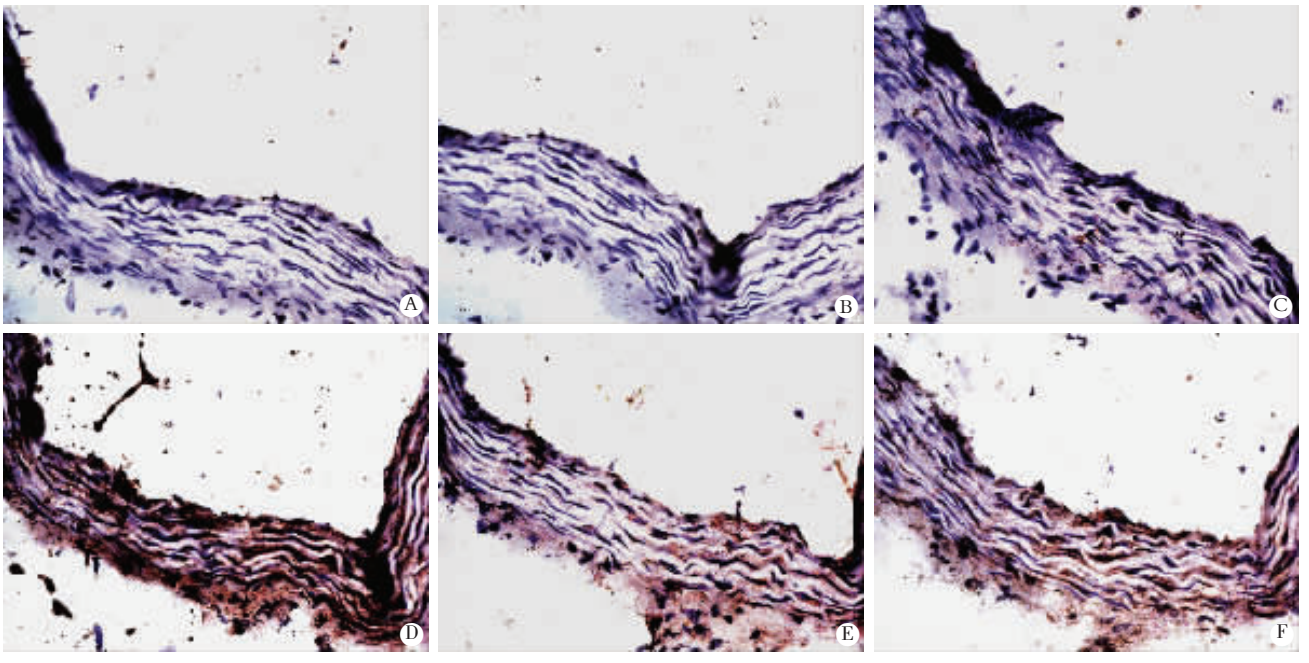
图2　各组小鼠主动脉SREBP2、SCAP和LDLr mRNA的表达

2.4　主动脉切片免疫组化结果

主动脉根部心瓣膜SCAP和SREBP2蛋白主要分布于胞质中，LDLr蛋白位于胞膜及胞质内，抗原呈棕色或棕黄色颗粒状或弥漫着色，与对照组相比，炎症组这3种蛋白表达量明显增高，见图3。

3　讨论

细胞脂质的异常积聚是AS早期病理学变化。80年代SR的发现，使AS研究取得新的进展。LDL的氧化修饰学说认为SR识别、结合和吞入氧化修饰的LDL（Ox-LDL），该过程并不受胞内胆固醇水平的负反馈调节，使细胞无限制地摄入脂质，形成脂质的异常积聚，导致泡沫细胞形成。因此，Ox-LDL和SR在AS发生、发展过程中起着重要作用[3]。近年来的研究结果表明，该学说并不能完全阐明LDL导致AS发病机制。



A～C：对照组 D～F：炎症组 A、D：LDLr B、E：SREBP2 C、F：SCAP

图3　免疫组化染色检测主动脉切片LDLr及其调控基因SREBP2和SCAP的蛋白表达　（S-P ×400）

我们前期体外实验证实：通过 LDLr 途径摄入外源性胆固醇，对维持细胞内胆固醇的内稳态平衡起着重要作用[6]。细胞在生理状态下，胞内胆固醇依赖于胞内胆固醇水平的反馈调节，摄入外源性的胆固醇，以维持胆固醇胞内浓度的稳态平衡，即通过 SCAP-SREBPs-LDLr 途径，实现胞内胆固醇浓度稳态平衡。膜结合的转录因子 SREBPs 是一类与胆固醇调节元件 1(SRE1)特异结合的蛋白，而 LDLr 基因启动子中含有 SRE1[7]，SREBPs 可促进 LDLr 基因转录和表达。SREBP2 在增加胞内胆固醇浓度方面有着重要作用。研究证实：SCAP 是内质网(ER)的一种膜蛋白，其中第 2～6 个跨膜区形成胆固醇敏感区，为细胞内胆固醇的敏感器，调控 SREBPs[8]。胞内胆固醇降低时，SCAP 在内质网结合 SREBPs，并转运至高尔基体，被蛋白酶(S1P，S2P)水解并释放具有活性的 N 末端转录因子片段，进入细胞核，结合 LDLr 靶基因启动子上的胆固醇调节元件 SRE1，从而激活 LDLr 转录；胞内胆固醇水平升高后，SCAP-SREBP 复合物滞留内质网，LDLr 基因转录停止。在炎症状态下，细胞在较高胞内胆固醇浓度时，SCAP 还能从内质网转出，运载 SREBP2 至高尔基体，修饰成为具有转录活性的 N-末端片段 bHLH，并进入细胞核内，与 LDLr 启动子结合，促进 LDLr 表达，最后导致肾系膜细胞和肝细胞等外周细胞大量摄入胆固醇，形成脂质异常积聚。我们前期体外实验发现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和外周细胞内 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，外周细胞和肝细胞胆固醇的外源性摄入增加，从而造成胆固醇酯在肾系膜细胞 HMCs 和肝细胞 HepG2 内异常积聚[4]。

SR DKO 小鼠经 14 周高脂饮食喂养后，炎症组血清急性时相反应蛋白 SAA 的浓度比对照组明显增高，表明已成功建立小鼠慢性系统性炎症模型，表明 SR DKO 小鼠出现慢性系统性的炎症状态[9]；2 组小鼠血清 TNF-α 和 IL-6 水平无显著性差异，可能与体内实验采用的小鼠为 SR DKO 有关。Kuchibhotla 等[10]的研究结果也证实 SR-A 和 CD36 敲除后，某些炎症因子表达水平未增高，是由于某些炎症基因表达受到抑制所造成。

我们在高脂饮食喂养同时进行 Casein 注射诱导炎症的 SR DKO 小鼠模型中发现：LDLr mRNA 和蛋白水平增高，使主动脉大量摄取胆固醇；LDLr 上游调控蛋白，即核转录因子 SREBP2，在炎症状态时，主动脉 SREBP2 mRNA 表达明显增高，上调了 2.5 倍；胆固醇敏感器 SCAP mRNA 表达也明显增高，上调 2.4 倍，表明核转录因子 SREBP2 促进靶基因 LDLr 的转录。所以，慢性炎症的长期存在，破坏了细胞脂质代谢的反馈调节，刺激肝细胞和外周细胞 LDLr 反馈调节内稳态平衡，LDL 胆固醇大量转运至肝细胞和外周细胞，加剧了胆固醇酯的异常积聚[11-13]。

因此，我们认为酪蛋白皮下注射诱导 SR DKO 小鼠产生的炎症，打破由胆固醇介导的 SCAP-SREBP-LDLr 的反馈调节机制，导致主动脉细胞异常摄入胆固醇，这可能是脂质异常积聚并进展为泡沫细胞形成，进一步形成 AS 的新机制。

参考文献：

[1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-126.
[2] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. Nature, 2002, 420(6917): 868-874.
[3] Moore K J, Freeman M W. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(8): 1702-1711.
[4] Ruan X Z, Varghese Z, Powis S H, *et al*. Dysregulation of LDL receptor under the influence of inflammatory cytokines: a new pathway for foam cell formation[J]. Kidney Int, 2001, 60(5): 1716-1725.
[5] 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.
[6] Ruan X Z, Moorhead J F, Tao J L, *et al*. Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in vascular smooth muscle cells by inflammatory cytokines[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(5): 1150-1155.
[7] Eberle D, Hegarty B, Bossard P, *et al*. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis[J]. Biochimie, 2004, 86(11): 839-848.
[8] Shimomura I, Shimano H, Horton J D, *et al*. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells[J]. J Clin Invest, 1997, 99(5): 838-845.
[9] 李秀兰，柳青，雷寒，等. 炎症对 SRA/CD36 双基因敲除小鼠肝 LDL 受体表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2009，31(15)：1436-1439.
[10] Kuchibhotla S, Vanegas D, Kennedy D J, *et al*. Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A Ⅰ/Ⅱ[J]. Cardiovasc Res, 2008, 78(1): 185-196.
[11] 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.
[12] 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.
[13] 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.

(收稿：2010-03-02 修回：2010-04-08)
(编辑 王 红)