

免疫与感染

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000176

炎症促进 CCl_4 诱导的小鼠肝细胞脂质集聚与
SREBP-1-HMGCR 通路活化有关

田 琳, 谢友红, 刘 宏

(重庆医科大学附属第一医院消化内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨炎症促进四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)所致的小鼠单纯性脂肪变性进一步脂肪集聚的分子机制。**方法:**12 只 6~8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为对照组($n=6$)和炎症组($n=6$)。2 组均 CCl_4 皮下注射 2 周后,再分别给予皮下注射生理盐水或酪蛋白 16 周,18 周后处死小鼠,收集血清及肝组织标本,称量小鼠体质量及肝质量计算肝指数评估肝脏受损情况,ELISA 法检测血清炎症因子白介素-6(interleukin-6, IL-6),使用化学酶促比色法检测小鼠肝组织的脂质水平,油红 O 染色观察小鼠肝组织的脂质集聚情况,real-time PCR 检测小鼠固醇调节元件结合蛋白 1(sterol regulatory element binding proteins-1, SREBP-1)和 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, HMGCR)的基因表达水平,Western blot 检测 SREBP-1 和 HMGCR 的蛋白表达水平。**结果:**炎症组 IL-6 的表达比对照组明显升高($t=8.434, P=0.000$)。与对照组相比,炎症组的 SREBP-1 和 HMGCR 基因的表达明显上调($t=10.612, P=0.000; t=12.749, P=0.000$),Western blot 显示 SREBP-1 和 HMGCR 的蛋白表达趋势与基因一致。肝脏脂质检测显示炎症组比对照组的肝脏脂质明显升高($t=6.148, P=0.000; t=7.288, P=0.000$)。肝指数提示与对照组相比,炎症组的肝指数明显升高($t=8.452, P=0.000$),油红 O 染色显示炎症组的脂质集聚明显高于对照组。**结论:**炎症因子可能通过促进 SREBP-1-HMGCR 表达使 CCl_4 所致的小鼠脂肪变性肝细胞胆固醇内源性合成增加,加重肝脏脂质的异常集聚。

【关键词】炎症;四氯化碳;固醇调节元件结合蛋白 1;3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶

【中图分类号】R575.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-09-15

Inflammatory stress aggravating CCl_4 -induced hepatic lipid accumulation
in the mice via SREBP-1-HMGCR pathway

Tian Lin, Xie Youhong, Liu Hong

(Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate whether inflammatory stress aggravates hepatosteatosis induced by carbon tetrachloride (CCl_4) and the molecular mechanism. **Methods:** Male C57BL/6J mice of 6~8 weeks were randomly divided into control group ($n=6$) and inflammation group ($n=6$). Inflammation was induced via subcutaneous casein injection of casein for 16 weeks after the treatment of CCl_4 for 2 weeks. After 18 weeks, the liver indicator was measured to study the damage to the liver. Level of serum inflammatory factor interleukin-6 (IL-6) was determined by ELISA. Oil red O staining was used to evaluate lipid accumulation in the liver. Lipid levels of liver tissues were measured by chemical enzymatic assay. mRNA expression of SREBP-1 and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR) was measured by real-time PCR and the protein expression of SREBP-1 and HMGCR was analyzed by Western blot. **Results:** Expression of IL-6 was higher in inflammation group than in control group ($t=8.434, P=0.000$). Expression of HMGCR and SREBP-1 mRNA was significantly increased in inflammation group than in control group ($t=10.612, P=0.000; t=12.749, P=0.000$). Expressions of SREBP-1 and HMGCR protein were consistent with the mRNA levels based on Western blot. Hepatic lipid levels were significantly higher in inflammation group than in control group ($t=6.148, P=0.000; t=7.288, P=0.000$). Liver indicator of mice were significantly higher in inflammation group than in control group ($t=8.452, P=0.000$). Increased lipid accumulation demonstrated by Oil red O staining was observed in inflammation group. **Conclusion:** Inflammatory stress probably promotes cholesterol synthesis in fatty liver induced by CCl_4 via SREBP-1-HMGCR pathway, which may contribute to the abnormal lipid accumulation in the liver.

作者介绍:田 琳, Email: 715126826@qq.com,

研究方向:非酒精性脂肪肝。

通信作者:谢友红, Email: 172763320@qq.com。

基金项目:重庆市卫生局面上资助项目(编号:2009-2-312)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000176.html

【Key words】inflammation; carbon tetrachloride; sterol regulatory element binding proteins-1; 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase

近年来随着生活水平的提高,非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease,NAFLD)已经成为仅次于病毒性肝炎危害我国人民健康的第二大肝病,其中非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steato-hepatitis,NASH)作为其疾病发展的重要中间阶段也越来越引起人们的兴趣,但其分子机制至今尚不完全清楚^[1]。已有研究表明炎症因子在促进肝细胞脂肪变性及加重肝细胞脂质代谢紊乱中起了重要作用^[2],但其具体分子机制仍不清楚。固醇调节元件结合蛋白 1(sterol regulatory element binding proteins-1,SREBP-1)是一种在肝脏中含量丰富的核转录因子,在细胞核内参与生脂相关酶 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase,HMGCR)的诱导表达,生脂相关酶含量的增加进一步使肝细胞甘油三酯(triglyceride,TG)、总胆固醇(total cholesterol,TC)合成增加,脂质的异常堆积导致了肝脂肪变性的发生^[3-4]。本研究中,通过四氯化碳(carbon tetrachloride,CCl₄)诱导小鼠肝细胞单纯性脂肪变的模型,再给予皮下注射酪蛋白诱导 C57BL/6J 小鼠慢性系统性炎症的产生,探讨炎症是否通过 SREBP-1-HMGCR 途径诱导脂质在肝脏的进一步集聚。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠(购自重庆医科大学实验动物中心)12 只,体质量 20~26 g,于重庆医科大学动物中心无特定病原体(specific pathogen free,SPF)室饲养。随机分为 2 组,对照组($n=6$):隔天皮下注射 CCl₄(0.3 ml/100 g 鼠质量)2 周后,再隔天皮下注射生理盐水(normal saline,NS)0.5 ml 16 周。炎症组($n=6$):隔天皮下注射 CCl₄(0.3 ml/100 g 鼠质量)2 周后,再隔天皮下注射 10%酪蛋白(Casein)0.5 ml 16 周。CCl₄均预先溶于植物油中,质量分数为 40%。实验结束后,留取小鼠血清和肝脏组织,-80℃保存。

1.2 肝指数的检测

乙醚麻醉后称小鼠体质量,经左心室冰生理盐水对肝脏灌注,沥干肝脏水分后称肝质量,计算肝脏系数。肝脏系数=肝脏湿质量(g)/小鼠体质量(g)。

1.3 炎症因子测定

采用小鼠白介素-6(interleukin-6,IL-6)的 ELISA 试剂盒(购自北京欣博盛生物科技有限公司)检测血清中的 IL-6 浓度,操作步骤严格按照说明书进行。

1.4 小鼠肝组织中胆固醇和甘油三酯的含量测定

分别取 0.1 g 肝组织充分研磨后各加入 1 ml 胆固醇抽提剂(氯仿:甲醇=2:1),TG 抽提剂(正庚烷:异丙醇=2:3.5),超声破碎后 4℃离心,采用化学酶促比色法检测小鼠肝组织中

TG 和 TC 含量。

1.5 油红 O 染色

取部分新鲜肝组织用 4%多聚甲醛固定,制作冰冻切片,10%福尔马林盐溶液固定 30 min,1,2-丙二醇孵育 2 min 后,油红 O(Sigma 公司)染色 10~15 min,苏木精复染 1 min,流水冲洗返蓝 10 min,甘油封片,显微镜下观察肝组织脂肪肝病程度。

1.6 Real-time PCR

取小鼠肝脏,用 Trizol 法提取肝组织总 RNA,取 20 μl DEPC 水稀释后测定浓度及 A_{260nm}/A_{280nm} 值(正常值为 1.8~2.0),标化到相同浓度后,使用逆转录试剂盒(TAKARA)逆转录成 cDNA,每 20 μl 体系加 2 μl 的 RNA,反应条件为:37℃ 15 min,85℃ 5 s。采用 SYBR Green 荧光定量 PCR 检测肝组织的 SREBP-1、HMGCR 的 Ct 值,以 β-actin 作为内参照。反应体系为 20 μl,反应参数设置为:95℃ 30 s 预变性,95℃ 5 s,58℃ 30 s,70℃ 1 min,共 40 个循环。结果用相对定量 ΔΔCt 计算,即实验组相对于对照组基因表达水平的倍数=2^{-ΔΔCt},其中 ΔΔCt=实验组 ΔCt-对照组 ΔCt,ΔCt=目的基因 Ct 值-内参基因 Ct 值。real-time PCR 引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 的引物序列

Tab.1 Primer sequence of real-time PCR	
基因	引物序列
SREBP-1	上游引物:5'-GCTGTTGGCATCCTGCTATC-3'
	下游引物:5'-TAGCTGGAAGTGACGGTGGT-3'
HMGCR	上游引物:5'-CCGGCAACAACAAGATCTGTG-3'
	下游引物:5'-ATGTACAGGATGGCGATGCA-3'
β-actin	上游引物:5'-ACGGCCAGGTCATCACTATTG-3'
	下游引物:5'-CACAGGATTCCATACCCAAGAAG-3'

1.7 Western blot 检测 SREBP-1 及 HMGCR 蛋白表达

按蛋白提取试剂盒说明提取小鼠肝组织总蛋白,用 BCA 法进行蛋白定量并标化,每孔蛋白上样量约为 80~100 μg,β-actin 作为内参照蛋白。样品加变性缓冲液煮沸 10 min。SDS-PAGE 凝胶电泳,然后转至 PVDF 膜。5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,一抗 SREBP-1(1:500)(santa cruz)、HMGCR(1:200)(北京博奥森)、β-actin(1:5 000)(北京中杉金桥),4℃过夜孵育,TBST 漂洗 10 min×3 次。加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(联科生物技术有限公司),37℃孵育 1 h,TBST 漂洗 10 min×3 次。ECL 光化学法进行显色。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行分析,所有结果均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 肝指数比较

由图 1 可看出,炎症组的肝指数较对照组明显升高,差异有统计学意义($t=8.452, P=0.000$),具体数据见表 2。

2.6 SREBP-1 及 HMGCR 的 Western blot 表达

图 5 Western blot 结果显示:与对照组相比,炎症组 SREBP-1 及 HMGCR 蛋白表达均明显增高,与基因表达趋势一致($t=6.677, P=0.003; t=10.798, P=0.000$),具体数据见表 2。

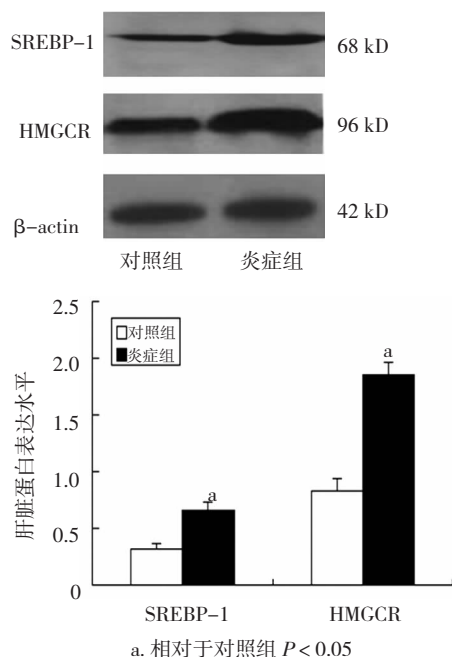


图 5 各组肝组织 SREBP-1 及 HMGCR 的蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig.5 Protein expression of SREBP-1 and HMGCR in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3 讨论

近年来 NAFLD 与代谢综合征 (metabolic syndrome, MS) 的关系越来越密切,被认为是 MS 的肝脏表现^[5],但其发病机制至今仍不清楚。“二次打击学说”为目前普遍被人们所接受的 NAFLD 的发病机制。“第一次打击”主要为以 TG、游离胆汁酸、TC 为主的脂质集聚,这个过程与胰岛素抵抗密切相关。“第二次打击”为促进疾病发展的关键过程,为肝细胞的一个炎症反应,大量的炎症因子及趋化因子异常释放,在“第一次打击”的基础上导致肝组织进一步损伤^[6]。近年来,越来越多的研究发现,炎症在 NAFLD 的发病进程中起着至关重要的作用,被认为是疾病最终进程的核心点^[7-8],但其具体调节脂质集聚的分子机制仍不清楚。

CCl_4 作为一种趋肝毒物至今仍被广泛应用于脂肪肝模型的制备^[9-10], CCl_4 进入肝细胞后在细胞色素 P_{450} 还原酶作用下生成三氯甲基自由基,此物质激发肝细胞膜脂质过氧化反应和内质网应激,使肝细胞发生损伤^[11-12],促进脂质集聚,完成“第一次打击”,在此基础上皮下注射酪蛋白,使 C57BL/6J 小

鼠形成慢性系统性炎症,完成“第二次打击”^[12-14]。SREBPs 是一种重要的核转录因子,包括 SREBP-1 和 SREBP-2,其中 SREBP-1 在肝脏中含量丰富,在内质网以一种无活性的蛋白前体存在,在细胞内低胆固醇状态下,与 SREBP 裂解激活蛋白 (SREBP cleavage-activating protein, SCAP) 形成复活体后,从内质网转运至高尔基体,在高尔基体被蛋白酶裂解后释放出氨基酸末端,该活性片段进入细胞核调节 HMGCR 等相关靶基因的表达^[15-17]。其中, HMGCR 为调控胆固醇内源性合成的最重要的限速酶,通过促进胆固醇的内源性合成,从而使肝细胞的脂质进一步集聚^[18-19]。

本研究结果提示: C57BL/6J 小鼠经 2 周 CCl_4 注射后再给予 16 周的酪蛋白注射,用 ELISA 试剂盒检测后显示炎症组的 IL-6 浓度明显比对照组高,说明小鼠慢性系统性炎症模型构建成功。进一步检测发现:炎症组 SREBP-1 和 HMGCR 的基因和蛋白表达水平明显高于对照组,表明炎症作为一个独立的危险因素,通过上调 SREBP-1 的表达,从而促进下游靶基因 HMGCR 的表达,促使胆固醇合成增加,肝组织脂质集聚。油红 O 染色和肝组织中 TG、TC 的测定进一步说明了这一结果。各组小鼠肝指数的表达趋势也说明了炎症组的肝损害在 CCl_4 导致的“第一次打击”上进一步加剧。

综上所述,本实验通过体内实验证实了炎症微环境对 CCl_4 导致的单纯性脂肪变进行“第二次打击”,通过上调 SREBP-1 的表达,使下游靶基因 HMGCR 的表达增加,促进胆固醇的内源性合成,使肝细胞异常大量的脂质集聚。阐明炎症可能是 NAFLD 发病机制中独立的危险因素,该研究成果也可为 NAFLD 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 SREBP-1-HMGCR 途径的任一环节可能成为研究的热点。

参 考 文 献

- [1] Das SK, Balakrishnan V. Role of cytokines in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Indian J Clin Biochem, 2011, 26(2): 202-209.
- [2] Brauersreuther V, Viviani GL, Mach F, et al. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(8): 727-735.
- [3] Sato R. Sterol metabolism and SREBP activation[J]. Arch Biochem Biophys, 2010, 501(2): 177-181.
- [4] Shimano H. SREBP-1c and TFE3, energy transcription factors that regulate hepatic insulin signaling[J]. J Mol Med, 2007, 85(5): 437-444.
- [5] Souza MR, Diniz MF, Medeiros-Filho JE, et al. Metabolic syndrome

免疫与感染

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000182

铬还原酶 T 体外合成及活性鉴定

谭小庆, 邓 鹏, 吴 颖, 白群华, 贾 燕, 肖 虹

(重庆医科大学公共卫生与管理学院卫生检验教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:克隆沙雷氏菌 CQMUS2 中铬还原酶 T(Chromate reductase T, ChrT)的全基因,构建其原核表达载体并转化至大肠杆菌中表达蛋白,分析表达产物的活性。**方法:**应用 PCR 技术,以耐铬沙雷氏菌 CQMUS2 基因组 DNA 为模板扩增 ChrT 全基因,将该基因连接至表达载体 pET-28a(+)并转化进大肠杆菌感受态细胞 *E.coli* BL21(DE3)表达,用酶促反应鉴定重组 ChrT 酶的活性和 Cr(VI)还原能力,探索其最适 pH 和温度。**结果:**克隆出的 ChrT 全基因为 567 bp,编码 188 个氨基酸,分子量约 20 kD;IPTG 诱导 10 h 后,在大肠杆菌中成功表达了目的蛋白,其碱基序列和分子量与 ChrT 酶一致;纯化后,ChrT 酶能还原酶促反应体系中的 Cr(VI),使实验组 Cr(VI)含量明显低于对照组($P=0.000$),其酶活可达 997 U/L;ChrT 酶的最适 pH 为 6.5~7.5,最适温度为 37 ℃。**结论:**ChrT 酶具有 Cr(VI)还原活性,为进一步研究高效除铬基因工程菌奠定了基础。

【关键词】沙雷氏菌;铬还原酶;克隆;表达;六价铬;还原

【中图分类号】Q786

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-12-19

In vitro synthesis and activity identification of Chromate reductase T

Tan Xiaoqing, Deng Peng, Wu Ying, Bai Qunhua, Jia Yan, Xiao Hong

(Teaching and Research Section of Health Laboratory Science, College of Public Health and Administration, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To clone the full length gene of Chromate reductase T(ChrT) from *Serratia* sp. CQMUS2, to construct the prokaryotic expression vector and to transform it into *E.coli* to express protein, and to analyze the activity of expression products.

作者介绍:谭小庆, Email: tanxq1001@sina.cn,

研究方向:微生物与环境污染治理。

通信作者:肖 虹, Email: xhk20@163.com。

基金项目:重庆市自然科学基金计划资助项目(编号:2010BB5360)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000182.html>

Methods: The ChrT gene was cloned from DNA template of *Serratia* sp. CQMUS2, a chromium-resistant bacteria by PCR and was connected with prokaryotic vector pET-28a(+). Then the

and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Arq Gastroenterol*, 2012, 49(1): 89-96.

[6] Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two 'hits'? [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(4): 842-845.

[7] Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, et al. Inflammasome mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity [J]. *Nature*, 2012, 482(7384): 179-185.

[8] Shimano H. SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family [J]. *FEBS J*, 2009, 276(3): 616-621.

[9] 林胜利, 卓德祥, 王晓红, 等. 氧化损伤与内质网应激在四氯化碳致大鼠肝脂肪变性中的作用机制 [J]. *中国生物化学与分子生物学杂志*, 2006, 22(5): 422-430.

[10] Kubota N, Kado S, Kano M, et al. A high-fat diet and multiple administration of carbon tetrachloride induces liver injury and pathological features associated with non-alcoholic steatohepatitis in mice [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2013, 40(7): 422-430.

[11] Boll M, Weber LW, Becker E, et al. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites [J]. *Z Naturforsch C*, 2001, 56(7-8): 649-659.

[12] Boll M, Weber LW, Becker E, et al. Pathogenesis of carbon tetrachloride-induced hepatocyte injury bioactivation of CCl₄ by cytochrome P450 and effects on lipid homeostasis [J]. *Z Naturforsch C*, 2001, 56(1-

2): 111-121.

[13] Ma KL, Ruan XZ, Powis SH, 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.

[14] Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease [J]. *Hepatology*, 2011, 54(4): 795-809.

[15] Knebel B, Haas J, Hartwig S, et al. Liver-specific expression of transcriptionally active SREBP-1c is associated with fatty liver and increased visceral fat mass [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31812.

[16] Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor [J]. *Cell*, 1997, 89(3): 331-340.

[17] Van Rooyen DM, Farrell GC. SREBP-2: a link between insulin resistance, hepatic cholesterol, and inflammation in NASH [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(5): 789-792.

[18] Parker RA, Garcia R, Ryan CS, et al. Bile acid and sterol metabolism with combined HMG-CoA reductase and PCSK9 suppression [J]. *J Lipid Res*, 2013, 54(9): 2400-2409.

[19] Sharpe LJ, Brown AJ. Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) [J]. *Biol Chem*, 2013, 288(26): 18707-18715.

(责任编辑:冉明会)