

## 脂质代谢与器官损害

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.06.003

## 高脂高胆固醇饮食致 C57BL/6J 小鼠肺组织脂质蓄积的研究

王 双,朱婷婷,方 严,陈 婷,张 恋,练雪梅

(重庆医科大学公共卫生与管理学院营养与食品卫生学教研室、重庆医科大学脂质研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究高脂高胆固醇饮食(Paigen 饮食)是否可以导致 C57BL/6J 小鼠肺组织的脂质蓄积。方法:66 只 C57BL/6J 雄性 6~8 周龄小鼠随机分为 2 组,分别喂饲普通饮食和 Paigen 饮食,于喂养 12、16、20 周 3 个时间点,取主动脉做冰冻切片,油红 O 染色观察粥样硬化斑块形成情况;肺组织冰冻切片油红 O 染色,观察肺组织脂质蓄积情况;体外培养 A549 细胞观察用不同浓度低密度脂蛋白(Low density lipoprotein, LDL)处理后, A549 细胞内脂质蓄积情况。结果:Paigen 饮食可导致 C57BL/6J 小鼠主动脉粥样硬化;同时,不同时间点 C57BL/6J 小鼠肺组织油红 O 染色结果提示该饮食还可以导致 C57BL/6J 小鼠肺组织出现脂质蓄积,并随着时间延长而加剧;不同浓度 LDL 刺激 A549 细胞的油红 O 染色结果提示: A549 细胞的脂质蓄积与 LDL 处理的浓度间存在剂量效应关系。结论:Paigen 饮食可以导致 C57BL/6J 小鼠肺脏出现时间依赖性的脂质蓄积,其机制可能与肺泡 II 型上皮细胞的脂质代谢异常有关。

【关键词】高脂高胆固醇饮食;肺;脂代谢

【中国图书分类法分类号】R589.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-04-13

## High fat/high cholesterol diet induced lipid accumulation in pulmonary tissues of C57BL/6J mice

WANG Shuang, ZHU Tingting, FANG Yan, CHEN Ting, ZHANG Lian, LIAN Xuemei

(Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Public Health and Management, Center for Lipid Research, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate whether high fat/high cholesterol diet (Paigen diet) could lead lipid accumulation in pulmonary tissues of C57BL/6J mice. Methods: Sixty six C57BL/6J male mice were randomly divided into two groups and were treated with regular diet and high fat/high cholesterol diet respectively. The pulmonary tissues were collected at the 12th, 16th week and the 20th week after feeding respectively. The aorta atherosclerotic plaque and lipidosis in pulmonary tissues were determined by oil red O staining. A549 cells were cultured in vitro and were treated with different concentrations of low density lipoprotein (LDL) to observe the effect of cholesterol loading on alveolar lipid accumulation in vitro. Results: Aorta atherosclerosis plaques were observed in high fat/high cholesterol diet treated C57BL/6J mice. Oil red O staining of pulmonary tissues at different time points suggested that high fat/high cholesterol diet could lead to time-dependent lipid accumulation in pulmonary tissues of C57BL/6J mice. Oil red O staining of A549 cells implied that there was a dose-effect relationship between the lipidosis and the concentrations of LDL. Conclusion: High fat/high cholesterol diet could lead to time-dependent lipid accumulation in pulmonary tissues of C57BL/6J mice, which partly due to the disruption of lipid homeostasis in alveolar type II epithelial cells.

【Key words】high fat/high cholesterol diet; lung; lipid metabolism

脂代谢异常的多器官损伤学说目前已经得到学界的共识,脂代谢异常所致心脑血管、胰腺、肝脏、肾脏等器官损伤已经得到了深入的研究<sup>[1-3]</sup>。但有关脂代谢异常与肺损伤的研究,国内外才刚刚起步。

作者介绍:王 双(1987-),女,硕士,

研究方向:脂代谢紊乱与肺损伤。

通信作者:练雪梅,女,教授, Email: xuemeilian@cqmu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81071907);重庆市自然科学基金资助项目(编号:CSTC, 2011BB5128)。

近年来,一些与脂代谢相关基因的基因敲除实验结果<sup>[4,5]</sup>提示,脂代谢异常可以导致肺组织异常的脂质蓄积和病理改变,但尚未见使用野生型小鼠进行“高脂饮食所致脂代谢紊乱与肺损伤”相关研究的报道。本研究以 C57BL/6J 小鼠作为研究对象,观察高脂高胆固醇饮食(Paigen 饮食)是否可以导致 C57BL/6J 小鼠肺组织的脂质蓄积,并探讨其可能的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

低密度脂蛋白(Low density lipoprotein, LDL)(广州奕源, 中国, 广州), 胎牛血清(Hyclone, 中国, 北京); 油红 O(生工, 中国, 上海)。

动物: 66 只 C57BL/6J 雄性 6~8 周龄小鼠(购自重庆医科大学实验动物中心)饲养在 SPF 环境中, 待适应 1 周后, 随机分成普通饮食组(RD 组)和高脂高胆固醇组(HF/HC 组), 分别喂饲普通饮食(D12102C, Research diets, 美国)和 Paigen 饮食(D12109C, Research diets, 美国), 其中 D12102C 含供能比 10% 的脂肪, 未添加胆固醇; D12109C 含供能比 40% 的脂肪、1.25% 胆固醇和 0.5% 胆酸盐; 待饲养至 12、16、20 周每组各处死 11 只。

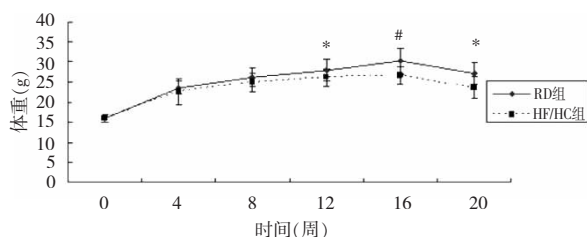
### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 A549(人肺腺癌细胞株)购自 ATCC (美国标准菌种收藏库), 细胞培养于含 10% 胎牛血清, 100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 DMEM 培养基, 培养在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的环境中。在进一步的处理之前, 细胞用含有 0.2% BSA 的无血清培养基培养 24 h。

A549 细胞用不同浓度的 LDL 处理 24 h 后观察脂质蓄积情况。处理浓度参照文献[6, 7], 所选浓度分别为 10、25、50、100 μg/ml 和 200 μg/ml。

1.2.2 A549 细胞油红 O 染色 A549 细胞接种于 24 孔板, 细胞爬片, 经实验干预后吸去培养基, PBS 洗涤 3 次。10% 多聚甲醛固定 30 min, 双蒸水洗涤 2 次, 1, 2-丙二醇固定 2 min 后吸尽, 室温下用油红 O 工作液染色 30 min, 双蒸水洗涤 3 次。苏木精复染 1~2 min, 自来水冲洗干净, 甘油明胶封片后, 显微镜明视野下观察并照相。每个组在高倍镜下随机选取 5 个视野, 重复 3 次实验, 用 Image J 软件进行定量分析。

1.2.3 一般情况观察 观察并记录各组小鼠的皮毛、行为状态、食欲及体重变化, 每隔 4 周称 1 次体重, 并绘制体重曲线, 如图 1。



与 RD 组相比, \*:  $P < 0.05$ ; #:  $P < 0.01$

图 1 小鼠体重变化折线图 ( $n=10$ )

Fig.1 Changes in body weight of mice ( $n=10$ )

1.2.4 标本制取 (1) 肺组织标本采集: 气管插管后, 通过气管向肺内注射 4% 多聚甲醛将肺吹起, 结扎后将肺连同心脏剪下; 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 左肺用 OCT 包埋剂包埋, 用作冰冻切片; 右肺留做石蜡切片。(2) 主动脉制备: 磷酸盐缓

冲溶液心脏灌洗后, 分离主动脉做冰冻切片。

1.2.5 肺组织、主动脉油红 O 染色 肺组织、主动脉冰冻切片室温干燥 3 min, PBS 洗涤 3 次。10% 多聚甲醛固定 30 min, 双蒸水洗涤 2 次, 1, 2-丙二醇固定 2 min 后吸尽, 室温下用油红 O 工作液染色 30 min, 双蒸水洗涤 3 次。苏木精复染 1~2 min, 自来水冲洗干净, 甘油明胶封片后, 显微镜明视野下观察并照相。

### 1.3 统计学分析

数据采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。统计分析由 SPSS 17.0 统计软件处理, 两组间比较采用  $t$  检验, 多组间差异比较采用方差分析, 组间两两比较采用  $LSD$  检验。检验水准双侧  $\alpha=0.05$ 。

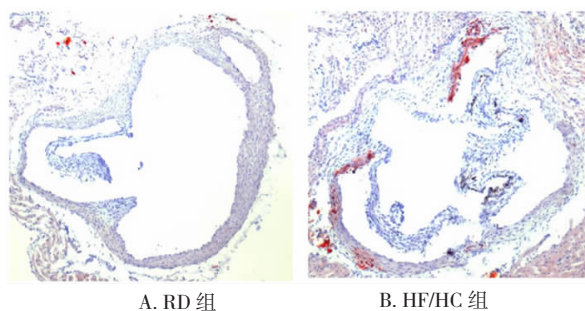
## 2 结果

### 2.1 小鼠体重增长状况

图 1 可以看出: 2 组小鼠体重增长情况良好, HF/HC 组与 RD 组相比较, RD 组小鼠体重增长较快, 大约在 16 周时达到最高值并达到稳定状态, 其中普通饮食组峰值为  $(30.2 \pm 3.2)$  g, 高脂高胆固醇组峰值为  $(26.7 \pm 2.21)$  g; 各时间点两组间比较经  $t$  检验可知: 12、16 周和 20 周 HF/HC 组明显低于 RD 组小鼠体重, 具有统计学差异 (其结果分别为 12 周  $t=2.185$ ,  $P=0.036$ ; 16 周  $t=2.966$ ,  $P=0.008$ ; 20 周  $t=2.819$ ,  $P=0.011$ )。而其他时间点则无明显统计学差异。

### 2.2 油红 O 染色观察 16 周小鼠主动脉粥样斑块的形成

图 2 中油红 O 的染色结果观察到: 16 周时, RD 组小鼠主动脉内壁没有粥样斑块形成, 而 HF/HC 组有较为明显的粥样斑块的形成。



C57BL/6J 小鼠普通饮食或 Paigen 饮食喂养 16 周后收取主动脉, 油红 O 染色检测主动脉冰冻切片的粥样斑块形成情况

图 2 C57BL/6J 小鼠 16 周主动脉油红 O 染色 (40 $\times$ )

Fig.2 Oil red O staining of C57BL/6J mice aortas at the 16th weeks (40 $\times$ )

### 2.3 不同时间点 2 组小鼠肺组织油红 O 染色观察脂质蓄积情况

图 3 可以观察到: HF/HC 组小鼠在 12 周脂质蓄积不明显, 16 周脂质蓄积较为显著, 20 周肺组织脂质蓄积进一步增加。

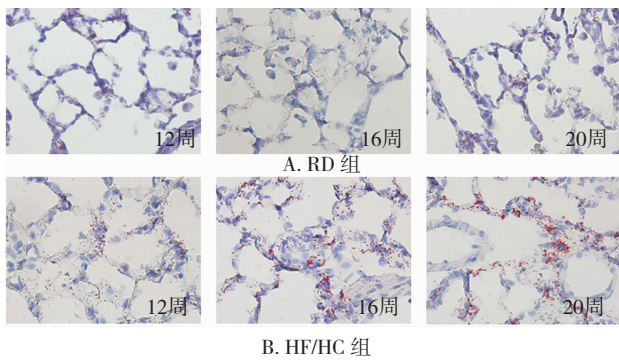
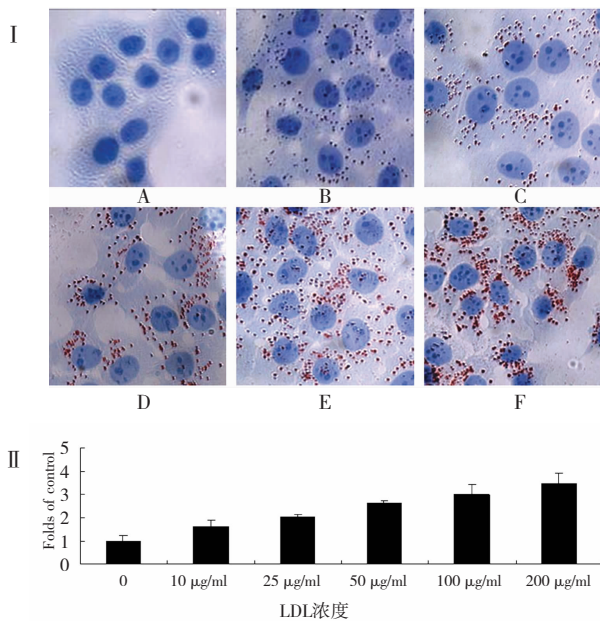


图 3 C57BL/6J 小鼠各时间点肺组织油红 O 染色结果(400×)

Fig.3 Observation of lipid accumulation in frozen sections of C57BL/6J mice pulmonary tissues at different time points(400×)

#### 2.4 不同浓度 LDL 刺激 A549 细胞的油红 O 染色观察脂质蓄积情况

图 4 显示:随着 LDL 浓度的增高,A549 细胞内脂质蓄积呈剂量依赖性增加。方差分析结果显示:不同浓度 LDL 处理组间的  $F=153.414(P<0.001)$ ,任意 2 组间比较差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。



I: A. 在无血清培养基中培养 24 h 后 A549 细胞的油红 O 染色情况; B. 培养基中含 10 μg/ml LDL; C. 培养基中含 25 μg/ml LDL; D. 培养基中含 50 μg/ml LDL; E. 培养基中含 100 μg/ml LDL; F. 培养基中含 200 μg/ml LDL (400×)

II: 半定量结果用 Image J 软件分析,数据采用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,  $n=15$

图 4 不同浓度 LDL 处理的 A549 细胞的油红 O 染色及半定量结果

Fig.4 Observation of lipid accumulation in A549 after treatment with different concentrations of LDL

### 3 讨论

近年来,一些脂代谢相关基因的基因敲除小鼠

实验均观察到肺组织异常的脂质蓄积。如三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 基因敲除小鼠的肺组织出现肺泡 II 型上皮细胞的泡沫化和肺间隔巨噬细胞浸润以及胆固醇蓄积<sup>[8]</sup>;6 月龄 ABCG1<sup>-/-</sup>小鼠肺巨噬细胞和肺泡 II 型上皮细胞大量胆固醇蓄积,肺表面活性物质中磷脂沉积,肺组织出现慢性炎症反应<sup>[9]</sup>;肺泡 II 型上皮细胞内 SCAP 基因缺失可以影响肺的脂质内环境稳态<sup>[10]</sup>。溶酶体酸性脂肪酶(Lysosomal acid lipase, LAL)是细胞溶酶体内水解胆固醇酯、甘油三酯的关键酶。本课题组早期的研究发现:LAL 基因敲除小鼠(LAL<sup>-/-</sup>小鼠)的肺组织也存在明显的随年龄增长而逐渐加剧的慢性肺部炎症反应,以及肺泡 II 型上皮细胞和肺巨噬细胞异常的脂质蓄积<sup>[9]</sup>。但高脂饮食,尤其是富含胆固醇的高脂饮食是否会导致小鼠肺组织的脂质代谢异常,目前国内外研究较少。

含 40%脂肪(供能比)、1.25%胆固醇和 0.5%胆酸盐的 Paigen 饮食通常被称作致动脉粥样硬化饮食或 Paigen 饮食,在动脉粥样硬化研究中已得到广泛应用<sup>[11]</sup>。图 1 结果显示,Paigen 饮食喂养的小鼠增重没有对照组小鼠明显,这与文献报道的一致<sup>[11]</sup>,可能与合成饲料中胆固醇的毒性有关。本文采用 Paigen 饮食观察其对 C57BL/6J 小鼠肺组织脂质代谢的影响,发现该饮食在导致 C57BL/6J 小鼠主动脉出现动脉粥样硬化(图 2)的同时,也会导致小鼠肺组织出现随时间延长而逐渐加剧的脂质蓄积(图 3)。

肺是机体重要的呼吸和免疫器官,其结构和细胞构成较为复杂。肺泡 II 型上皮细胞(AT II 细胞)被认为是肺泡上皮细胞的祖细胞类型,具有增殖分化为肺泡 I 型上皮细胞的能力。同时,肺泡 II 型上皮细胞具有许多重要的代谢及生物合成功能,如参与脂蛋白复合物、表面活性物质的合成和分泌等,对平衡肺组织磷脂和中性脂代谢稳态以及维持肺的张力具有重要的意义<sup>[12]</sup>。A549 细胞是人肺腺癌细胞株,由于其生物学特性与 AT II 细胞类似,因此常用作研究 AT II 细胞功能的细胞模型<sup>[13]</sup>。图 4 结果显示:随着 LDL 浓度的增高,A549 细胞内脂质蓄积呈剂量依赖性增加,提示胆固醇刺激可以加重 A549 细胞内的脂质蓄积,同时也提示肺泡 II 型上皮细胞可能是 Paigen 饮食所致肺组织异常脂质蓄积的靶细胞之一。

综上所述,Paigen 饮食可以导致 C57BL/6J 小鼠肺组织在 12、16、20 周出现逐渐加重的脂质蓄积,肺泡 II 型上皮细胞可能是受累靶细胞之一,但肺泡 II 型上皮细胞异常脂质蓄积的病理生理学效应,如

## 全反式维甲酸对阿霉素肾病小鼠肾脏保护作用研究

王晓丽, 崔晶晶, 阳海平, 刘 伟, 李 秋

(重庆医科大学附属儿童医院临床免疫研究室, 重庆 400014)

**【摘 要】**目的:探讨全反式维甲酸(All-trans retinoic acid, ATRA)对阿霉素肾病模型小鼠的肾脏保护作用。方法:将 30 只 BALB/c 小鼠,随机分为正常组、阿霉素肾病模型组(模型组)和阿霉素肾病 ATRA 治疗组(ATRA 治疗组),分别腹腔注射给药至 10 周。免疫组化分析肾脏凋亡蛋白 Fas 抗原及 Fas 抗原配体(Fas ligand, FasL)的表达水平,Real-time PCR 技术检测肾脏 Fas 抗原、FasL 的 mRNA 表达。结果:模型组与对照组比较,尿蛋白、血脂总胆固醇(Total cholesterin, TC),  $(3.09 \pm 0.89)$  mmol/L、甘油三酯(Triglyceride, TG),  $(1.33 \pm 0.29)$  mmol/L 水平明显升高( $P$  值均小于 0.05);ATRA 治疗组与模型组比较 TC、TG 分别为  $(1.27 \pm 0.31)$  mmol/L、 $(1.12 \pm 0.45)$  mmol/L 明显降低( $P$  均小于 0.05)。免疫组化分析:模型组与正常组比较, Fas 抗原、FasL 表达增加,分别为  $(650.141 \pm 153.997)$ 、 $(350.190 \pm 204.220)$ ,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),治疗组与模型组比较, Fas 抗原、FasL 表达减少,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Real-time PCR 分析,模型组与正常组相比较,肾组织的 Fas 抗原、FasL 的表达明显升高,分别为  $(2.953 \pm 1.558)$ 、 $(3.680 \pm 0.273)$  ( $P < 0.05$ );ATRA 治疗组与模型组相比较 Fas 抗原、FasL 明显增强,分别为  $(0.601 \pm 0.249)$ 、 $(0.729 \pm 0.730)$  ( $P < 0.05$ )。结论:ATRA 可能通过降低肾脏 Fas 抗原、FasL 的表达而对肾脏起到保护作用。

作者介绍:王晓丽(1983-),女,硕士,

研究方向:肾病综合征的发病机制。

通信作者:李 秋,女,教授,Email:liqiu809@126.com。

基金项目:教育部博士点基金资助项目(编号:20095503110003);重庆医科大学校级重点课题基金资助项目(编号:重医大[2010]22 号-XBZD201013)。

在肺组织慢性炎症或肿瘤发生中的作用仍需得到更深入的研究。

## 参 考 文 献

- [1] Hansson G K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. N Engl J Med, 2005, 352: 1685-1695.
- [2] Cannon C P. Mixed dyslipidemia, metabolic syndrome, diabetes mellitus, and cardiovascular disease: clinical implications[J]. Am J Cardiol, 2008, 102(12A): 5L-9L.
- [3] 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 Phys, 2007, 293(3): 680-687.
- [4] Out R, Hoekstra M, Reeni B, et al. Macrophage ABCG1 deletion disrupts lipid homeostasis in alveolar macrophages and moderately influences atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(10): 2295-2300.
- [5] Lian X, Yan C, Qin Y, et al. Neutral lipids and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  control pulmonary gene expression and inflammation triggered pathogenesis in lysosomal acid lipase knockout mice[J]. Am J Pathol, 2005, 167(3): 813-821.
- [6] 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.

[7] 陈昱杨, 陈 曜, 赵 蕾, 等. 炎症干扰 PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ -ABCA1 途径介导的肾小球系膜细胞胆固醇外流[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(12): 2400-2404.

Chen Y Y, Chen Y, Zhao L, et al. Inflammation disrupts cholesterol efflux in human kidney mesangial cells via PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ -ABCA1 pathway[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2010, 26(12): 2400-2404.

[8] McNeish J, Aiello R J, Guyot D, et al. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1[J]. PNAS, 2000, 97(8): 4245-4250.

[9] Baldón á, Tarr P, Vales C, et al. Deletion of the transmembrane transporter ABCG1 results in progressive pulmonary lipidosis[J]. J Bio Chem, 2006, 281(39): 29401-29410.

[10] Besnard V, Wert S E, Stahlman M T, et al. Deletion of scap in alveolar type II cells influences lung lipid homeostasis and identifies a compensatory role for pulmonary lipofibroblasts[J]. J Biol Chem, 2009, 284(6): 4018-4030.

[11] Ishida B Y, Blanche P J, Nichols A V, et al. Effects of atherogenic diet consumption on lipoproteins in mouse strains C57BL/6 and C3H[J]. J Lipid Res, 1991, 32(4): 559-568.

[12] Sutherl L M, Edwards Y S, Murray A W. Alveolar type II cell apoptosis[J]. Comp Biochem Phys A, 2001, 129(1): 267-285.

[13] Foster K A, Oster C G, Mayer M M, et al. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism[J]. Exp cell Res, 1998, 243(2): 359-366.

(责任编辑:冉明会)