

脂肪分化相关蛋白在兔动脉粥样硬化模型中的表达

袁中华, 杨永宗, 尹卫东, 易光辉, 王 佐, 杨保堂, 万载阳, 吴孟津

(南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化发病相关蛋白; 免疫组织化学法; 脂肪分化相关蛋白; 动脉粥样硬化; 兔; 疾病模型

[摘要] 研究脂肪分化相关蛋白与动脉粥样硬化发生和发展的关系。使用高胆固醇饲料喂养新西兰白兔 12 周, 复制动脉粥样硬化模型。用生物化学法测定血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、甘油三酯及动脉壁胆固醇含量; 苏丹 Ⅲ染色观察主动脉斑块面积; HE 染色观察主动脉及肝脏的病变; 免疫组织化学法观察脂肪分化相关蛋白在主动脉病变区及肝脏中的表达。结果发现, 喂高胆固醇饲料的动物血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、甘油三酯及动脉壁胆固醇含量显著升高, 主动脉病变面积为 $40.1\% \pm 7.3\%$, 脂肪分化相关蛋白在主动脉粥样硬化病变区免疫组织化学染色呈强阳性, 在肝脏中染色呈阴性。喂高胆固醇饲料能成功复制出兔动脉粥样硬化模型。脂肪分化相关蛋白在兔动脉粥样硬化病变中表达明显增高, 提示脂肪分化相关蛋白与动脉粥样硬化的发生发展密切相关。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

Expression of Adipophilin in the Rabbit Atherosclerotic Model

YUAN Zhong-Hua, YANG Yong-Zong, YIN Wei-Dong, YI Guang-Hui, WANG Zuo, YANG Bao-Tang, WAN Zai-Yang, and WU Meng-Jin

(Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Adipophilin; Atherosclerosis; Rabbit; Disease Model; Immunohistochemistry; Cholesterol

[ABSTRACT] **Aim** To explore the relationship between adipophilin and atherosclerosis. **Methods** The New Zealand white rabbits were fed with high cholesterol chow for 12 weeks and became the model of atherosclerosis. The level of serum total cholesterol, low density lipoprotein cholesterol, high density lipoprotein cholesterol, triglyceride, and cholesterol content of aortic wall were investigated. The areas of fatty streak of the aortae were measured after staining with Sudan Ⅲ. The aortic, and liver specimens with HE and immunohistochemistry staining were observed with light microscopes. **Results** In the animals fed with high cholesterol chow, the level of serum total cholesterol, low density lipoprotein cholesterol, high density lipoprotein cholesterol, triglyceride, and cholesterol content of aortic wall significantly increased. The areas of fatty streak in the aortae was $40.1\% \pm 7.3\%$ at the end of 12 weeks. The fatty streak of the aorta with immunohistochemistry staining was strongly positive, and the liver was negative with or without high cholesterol chow. **Conclusions** The New Zealand white rabbits could be made the model of atherosclerosis through feeding with high cholesterol chow for 12 weeks. Expression of adipophilin in atherosclerotic rabbits increased, which suggested the adipophilin was related to the development of atherosclerosis.

泡沫细胞形成是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As) 发生发展的核心环节, 它的典型改变是细胞内胆固醇酯聚集。Shiffman 等^[1]使用巨噬细胞与氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 共孵育, 发现脂肪分化相关蛋白(adipophilin) 基因表达的时间最早、量最高。Wang 等^[2]使用原位杂交法发现人 As 斑块中有脂肪分化相关蛋白的高表达, 提示脂肪分化相关蛋白与 As 发生发展密切相

关。脂肪分化相关蛋白在脂肪细胞分化的早期表达异常增高, 位于细胞内脂滴的周围, 细胞分化成熟后减少或缺如^[3]。脂肪分化相关蛋白存在于许多培养的细胞株和体内的乳腺上皮细胞、肾上腺皮质细胞、生殖细胞和酒精性肝硬化的脂肪变细胞, 它是各种细胞和疾病中脂质蓄积的特异标志^[4]。

本实验通过复制经典的 As 模型, 观察脂肪分化相关蛋白在动物模型上的表达, 从而揭示其与 As 的关系。

[收稿日期] 2003-10-13 [修回日期] 2004-05-15

[基金项目] 湖南省教育厅科研基金(01C191) 资助

[作者简介] 袁中华, 医学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化发病机制研究, E-mail 为 yzh5555@163.com。杨永宗, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化防治研究, 本文通讯作者。尹卫东, 教授, 博士研究生导师, 主要从事高脂血症与糖尿病防治研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯

(triglyceride, TG) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 试剂盒购自上海荣盛生物技术有限公司; 脂肪分化相关蛋白抗体购自美国 Research Diagnostic 公司; 即用型免疫组织化学超敏 S-P 试剂盒和 DAB 试剂盒购自苏州迈新生物技术开发公司; 其余为国产试剂。

1.2 实验动物及分组

新西兰白兔(由南华大学实验动物学部提供)共 34 只, 体重 1.8~2.2 kg, 雌雄各半, 分笼饲养。每天每只 150 克定量喂食, 自由饮水。饲以普通饲料一周, 观察实验家兔一般状况, 适应环境。根据血清 TC 水平, 随机分组。每月测体重一次。实验动物分成对照组和实验组, 每组 12 只。对照组喂普通饲料, 实验组喂高胆固醇饲料。高胆固醇饲料由普通饲料+2%胆固醇配制。饲喂高胆固醇饲料的动物每天每只 75 g 高胆固醇饲料+75 g 普通饲料, 即每天每只动物 1.5 g 胆固醇。实验共进行 12 周。

1.3 血脂测定

于第 0、4、8 及 12 周取耳缘静脉血 3 mL, 1 000 g 离心 5 min, 取血清测 TC、TG 和 HDLC。低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 由公式 $LDLC = TC - (HDLc + TG \div 5)$ 计算。

1.4 主动脉病变面积的测定

参考文献[5]的方法, 颈总动脉放血处死动物, 取出兔主动脉弓至髂动脉分枝处全部主动脉。清除血管外组织, 洗去残血, 纵向剪开。将动脉标本在 70% 乙醇中浸泡 5 min, 用 Herxheimers 液(苏丹Ⅲ 5 g、70% 乙醇 500 mL、丙酮 500 mL)中浸泡 20 min, 取出后用 80% 乙醇分色约 20 min, 自来水冲洗 1 h。病变区呈深红色, 描出整条血管和病变的轮廓, 计算病变面积与血管面积之比。

1.5 主动脉壁胆固醇含量测定

颈总动脉放血处死动物, 取出兔主动脉弓至髂动脉分枝处全部主动脉。彻底清除血管外组织, 洗去残血, 乙酸酐直接测定法测动脉壁胆固醇含量。

1.6 主动脉和肝脏的显微形态观察

颈总动脉放血处死动物, 取出兔主动脉和肝脏, 使用 10% 甲醛固定, 做常规石蜡切片, HE 染色后于显微镜下观察并拍照。

1.7 免疫组织化学

各组动物的主动脉、肝脏石蜡切片经烤片、乙醇梯度水化后, 用即用型免疫组织化学超敏 S-P 试剂盒, 按说明操作。一抗(脂肪分化相关蛋白抗体)浓度为 1:20, 使用 DAB 试剂盒显色, 阳性部位显棕褐色。经苏木素复染、1% 盐酸酒精分色、返蓝后乙醇

梯度脱水、透明, 中性树胶封片。

1.8 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 显著性检验使用双侧 t 检验, 检验水准为 0.05。

2 结果

2.1 体重变化

在整个实验过程中, 动物的体重逐渐增加, 对照组在 0 周体重为 1.8 ± 0.2 kg, 第 12 周为 2.4 ± 0.2 kg; 实验组在 0 周为 1.8 ± 0.2 kg, 第 12 周为 2.4 ± 0.1 kg。经统计学检验, 两组之间差别无显著性。

2.2 血脂改变

实验组动物经过高胆固醇饲喂, TC 迅速升高, 而对照组动物在整个实验过程中 TC 变化很小, 在 4、8 及 12 周实验组与对照组相比差别有显著性。经高胆固醇饲料喂养后, LDLC、TG 也明显升高, 与对照组相比差别亦有显著性。而 HDLC 虽然略有升高, 但差别无显著性(表 1, Table 1)。

表 1. 兔血脂的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$, mg/dL)

Table 1. Serum lipids concentrations of the rabbits

指标	0	第 4 周	第 8 周	第 12 周
TC				
实验组	65.9 ± 24.7	772.8 ± 270.7 ^a	832.0 ± 181.5 ^a	842.5 ± 121.5 ^a
对照组	65.1 ± 17.9	72.6 ± 50.5	68.8 ± 9.8	70.8 ± 12.8
LDLC				
实验组	45.8 ± 51.4	669.9 ± 240.8 ^a	637.4 ± 145.5 ^a	615.9 ± 154.6 ^a
对照组	38.7 ± 14.9	32.7 ± 5.5	37.0 ± 10.2	36.0 ± 11.2
TG				
实验组	82.7 ± 70.4	106.6 ± 18.0 ^a	115.1 ± 21.2 ^a	123.4 ± 51.6 ^a
对照组	78.7 ± 58.5	65.0 ± 5.4	65.2 ± 10.5	75.2 ± 15.5
HDLc				
实验组	13.7 ± 2.8	18.1 ± 6.1	20.3 ± 3.6	17.0 ± 2.5
对照组	14.0 ± 1.5	16.66 ± 2.2	13.6 ± 1.6	15.6 ± 1.6

a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.3 主动脉病变

病变动脉壁被染成深红色, 实验组病变广泛分布在胸主动脉和腹主动脉, 动脉内膜不光滑, 脂斑和脂质条纹突起; 而对照组主动脉内膜光滑, 无深红色的病变区(图 1, Figure 1)。实验组病变面积与血管面积之比为 $40.1\% \pm 7.3\%$, 对照组为 0, 两组差别有显著性($P < 0.05$)。

2.4 主动脉壁胆固醇含量的变化

经高胆固醇饲料喂养后, 动脉壁胆固醇含量明显升高。在第 12 周, 实验组主动脉壁胆固醇含量为

$13.6 \pm 2.4 \text{ mg/g}$, 对照组为 $1.3 \pm 0.5 \text{ mg/g}$, 两组差别有显著性 ($P < 0.05$)。

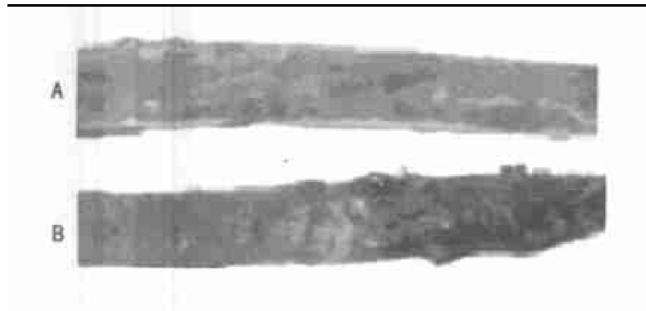


图 1. 苏丹染色后的兔主动脉 A 为对照组, B 为实验组。

Figure 1. Photos of aortic specimen from the two groups stained with Sudan.

2.5 脂肪分化相关蛋白的表达

HE 染色可见, 对照组主动脉内膜无增厚 (图 2A, Figure 2A); 实验组主动脉内膜增厚明显, 增厚的内膜充满泡沫细胞 (图 2C, Figure 2C)。对照组 (图 3A, Figure 3A) 和实验组 (图 3B, Figure 3B) 肝细胞形态正常, 无脂肪变。

通过免疫组化染色可见, 对照组主动脉内膜呈阴性 (图 2B, Figure 2B), 实验组主动脉内膜呈阳性, 布满棕褐色颗粒, 在高倍镜下可以看到这些棕褐色颗粒主要分布在泡沫细胞质内 (图 2D, Figure 2D), 中膜和外膜免疫组织化学染色阴性; 而对照组 (图 3C, Figure 3C) 和实验组 (图 3D, Figure 3D) 肝脏没有显示棕褐色的阳性反应。

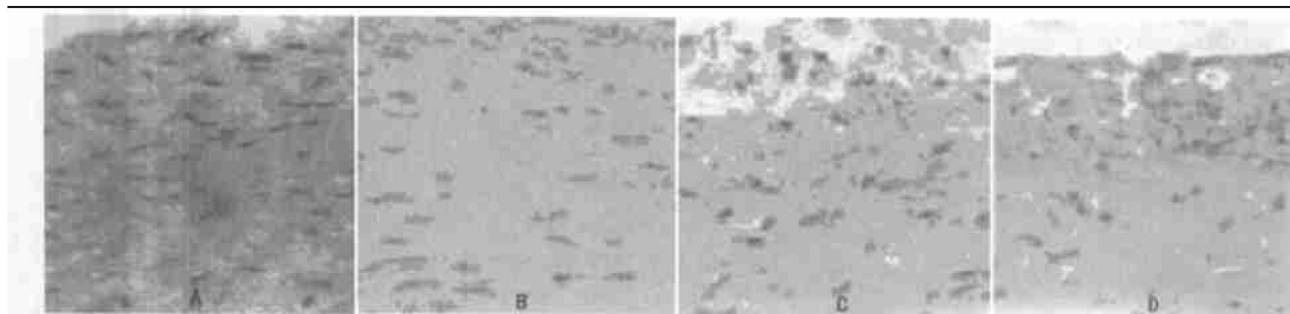


图 2. 主动脉的光学显微镜照片 ($\times 100$)

Figure 2. Microphotos of aortic specimen from the two groups

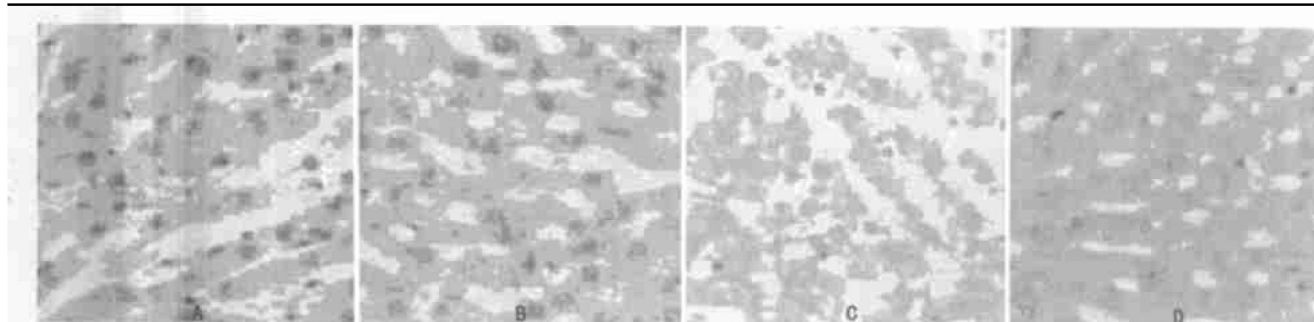


图 3. 肝脏的光学显微镜照片 ($\times 100$)

Figure 3. Microphotos of liver specimen from the two groups

3 讨论

动脉粥样硬化的研究依赖于许多动物模型^[5,6], 在本实验中, 通过高胆固醇饲料对新西兰白兔 12 周的喂养, 动物的血清 TC 和 LDLC 均大幅度地升高, 对动物造成一个很强的高胆固醇环境。进而引起动脉壁胆固醇积聚和主动脉脂斑和脂纹形成, 病变面积由 0 上升到 $40.1\% \pm 7.3\%$ 。在显微镜下, 可以观察到主动脉内膜增厚, 充满了泡沫细胞。说明复制 As 的动物模型是成功的, 由于单纯是使用高胆固醇饲料, 所以就剔除了其它因素对疾病的影响。

使用免疫组织化学的方法直接观察不同组织中

脂肪分化相关蛋白的表达, 由于 As 主要的发病部位是大、中动脉, 所以我们选择主动脉进行观察, 可以看到脂肪分化相关蛋白在病变主动脉内膜中染色呈强阳性, 说明该蛋白在此部位表达极度升高。在高倍显微镜下, 还可以进一步地观察到这些呈阳性的棕褐色颗粒均分布在细胞质内, 这与脂肪分化相关蛋白是在细胞内脂滴周围分布相吻合^[7]。另外, 由于高胆固醇饲喂动物, 可能受损的器官为肝脏, 我们重点观察了肝脏的变化。本实验发现, 动物模型的肝脏在 HE 染色切片上没有观察到肝细胞脂肪变性, 脂质并没有在肝脏中积聚, 说明高胆固醇饲喂对动物的肝脏损害并不严重; 在免疫组织化学染

色中,也没有观察到脂肪分化相关蛋白在动物肝脏的表达。提示脂肪分化相关蛋白仅在 As 病变的部位高表达,它与 As 的发生和发展密切相关。

几乎所有的器官,包括酵母、植物和动物以及某些原核生物都有贮存中性脂质的能力,这些中性脂质以脂滴的形式存在,都有一个中性脂质的核,外面有单层的磷脂和膜蛋白构成的膜^[8-10]。这些膜蛋白多是 oleosins 和 oleosins 样的蛋白,属于结构蛋白家族。在动物细胞中,与脂滴有关的膜蛋白有脂肪分化相关蛋白、perilipins、vimentin 和 capsular 蛋白等等,其中脂肪分化相关蛋白和 perilipins 研究较多,它们的 cDNA 已被克隆。但是,它们的功能尚不清楚,仅仅推测可能与脂滴结构的维持或者脂质分解或合成有关。

Heid 等^[4]率先注意到脂肪分化相关蛋白与疾病的关系,在酒精性肝硬化的脂肪变细胞中发现有脂肪分化相关蛋白的表达。Wang 等^[2]首先把脂肪分化相关蛋白与 As 联系起来,它使用原位杂交的方法,在人颈 As 斑块中发现有脂肪分化相关蛋白的高表达。从本质上来说,As 的核心问题是细胞内脂质,尤其是胆固醇酯大量的聚集,使血管平滑肌细胞和巨噬细胞转变为泡沫细胞。Shiffman 等^[1]的实验充分说明了脂肪分化相关蛋白与细胞内脂质聚集的关系。泡沫细胞只有进一步的发展,才能形成 As 疾病,在此过程中有许多影响因素。那么,脂肪分化相关蛋白与 As 的关系究竟是怎样的,在本实验中,我们发现在兔 As 病变部位脂肪分化相关蛋白高表达。但是,脂肪分化相关蛋白表达增高是 As 的原因还是结果,本文并没有涉及。Larigauderie 等^[11]使用 siRNA 抑制 THP-1 细胞脂肪分化相关蛋白的表达,发现能够减少由乙酰化低密度脂蛋白诱导的细胞内胆固醇

酯聚集。作者^[12]使用反义的脂肪分化相关蛋白寡核苷酸也能够抑制由氧化型低密度脂蛋白诱导细胞内胆固醇聚集。把这些结果与本实验结果相联系,可以为 As 发生发展的机理研究提供新的线索。

[参考文献]

- [1] Shiffman D, Mikita T, Tai JTN, Wade DP, Porter JG, Seilhamer JJ, et al. Large scale gene expression analysis of cholesterol loaded macrophage. *J Biol Chem*, 2000, **275** (48): 37 324-332
- [2] Wang XK, Reape TJ, Li X, Rayner K, Webb CL, Burnand KG, et al. Induced expression of adipophilin mRNA in human macrophages stimulated with oxidized low-density lipoprotein and in atherosclerotic lesions. *FEBS Letter*, 1999, **462**: 145-150
- [3] Jiang HP, Serrero G. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 7 856-860
- [4] Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res*, 1998, **294** (2): 309-321
- [5] 郭延松, 吴宗贵, 杨军柯, 黄高忠. 三种大鼠动脉粥样硬化模型复制方法的比较. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (5): 465-469
- [6] 杨小毅, 杨永宗, 谭健苗, 袁中华, 万载阳. 一种纯系小鼠动脉粥样硬化病理模型的建立. *中国动脉硬化杂志*, 1996, **4** (1): 54-57
- [7] Londres C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol*, 1999, **10** (1): 51-58
- [8] Murphy DJ. Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Prog Lipid Res*, 1993, **32**: 247-280
- [9] Huang AH. Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol*, 1996, **110**: 1 055-061
- [10] Napier JA, Stobart AK, Shewry PR. The structure and biogenesis of plant oil bodies: the role of the ER membrane and the oleosin class of proteins. *Plant Mol Biol*, 1996, **31**: 945-956
- [11] Larigauderie G, Fuman C, Jaye M, Lasselin C, Copin C, Fruchart JC, et al. Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (3): 504-510
- [12] Yuan ZH, Yang YZ, Yin WD, Yi GH, Wu MJ. Induced expression of adipophilin with high cholesterol diet in rabbit atherosclerotic lesions and reduced lipid accumulation with adipophilin antisense in mouse macrophages *Prog. Biochem Biophys*, 2003, **30** (4): 549-554

(此文编辑 文玉珊)