

网络出版时间: 2015-11-18 10:12:34 网络出版地址: <http://www.cnki.net/KCMS/detail/34.1065.R.20151118.1012.008.html>

ApoE 基因敲除高脂血症小鼠下颌下腺超微结构 及上游刺激因子 1 表达观察

李 静^{1,2}, 黄大可³, 桂 丽³, 贾雪梅¹

摘要 目的 观察载脂蛋白 E (ApoE) 基因敲除高脂血症 (HLP) 对小鼠下颌下腺超微结构以及上游刺激因子 1 (USF1) 表达影响。方法 10 只野生型小鼠予普通饲料喂养作为对照组, 10 只 ApoE 基因敲除小鼠予高脂饲料喂养作为高脂组。造模 6 个月后, 取眼眶血检测血脂; 取小鼠下颌下腺组织分别进行光镜、电镜和免疫组织化学观察。结果 与对照组比较, 高脂组胆固醇、三酰甘油和极低密度脂蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$)。HE 染色观察到, 高脂组小鼠下颌下腺的腺泡明显萎缩, 细胞排列紊乱。电镜下, 可见高脂组小鼠导管上皮内线粒体嵴断裂, 腺细胞内粗面内质网囊状扩张, 结构松散零乱。免疫组化显示, 高脂组 USF1 表达下降; 平均光密度值与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 HLP 可导致小鼠下颌下腺超微结构出现病理改变, USF1 表达减少。

关键词 高脂血症; 超微结构; 上游刺激因子 1; 下颌下腺; 小鼠

中图分类号 R 332

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)12-1725-04

2015-07-01 接收

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金研究项目 (编号: KJ2012A164)

作者单位: 安徽医科大学¹ 组织学与胚胎学教研室、³ 综合实验室, 合肥 230032

² 安徽医学高等专科学校图文信息中心, 合肥 230601

作者简介: 李 静, 女, 馆员, 硕士研究生;

贾雪梅, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: jiaxueme@126.com

高脂血症 (hyperlipidaemia, HLP) 是指血清中总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglycerides, TG)、低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 过高或血清高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL) 过低的一种全身代谢异常综合征。研究^[1]表明, HLP 是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS)、冠心病、高血压、糖尿病及胆石症等多种疾病的重要诱发因素。研究^[2]表明, HLP 可导致下颌下腺的形态结构异常及分泌功能降低。上游刺激因子 1 (upstream stimulatory factor, USF1) 广泛参与控制和调节体内糖、脂代谢相关基因的表达。USF1 作为家族联合性高脂蛋白血症 (familial combined hyperlipidemia, FCHL) 中第一个相关基因, 可以引起患者血液中 TC 和 (或) TG 含量上升^[3]。目前 USF1 与家族性混合型 HLP 以及代谢综合征的相关性是大家普遍关注的问题。尽管 USF1 在人体中广泛存在, 但 HLP 时下颌下腺中 USF1 的表达以及超微结构的变化尚未见有关报道。载脂蛋白 E 基因 (apolipoprotein E, ApoE) 敲除小鼠由于脂质代谢障碍, 在病变早期迅速出现明显的 HLP, 是目前建立 HLP 较理想的典型动物模型。该实验用 ApoE 基因敲除小鼠给予高脂饮食复制 HLP 动物模型, 对其下颌下腺进行形态学 USF1 表达变化的观察, 以期探讨 HLP 对下颌下腺形态及分泌功能的影响提供形态学依据。

from different mushroom cultivation plants from January to May and August to December (Sample collection was carried out once each month). The acaroid mites were separated and identified from the samples with stereoscopy and microscopy, galvanothermy and tullgren techniques. The richness index, biodiversity and species evenness were estimated with Shannon-Wiener index, Margalef index and Pielou index, respectively. **Results** Five species of acaroid mites, belonging to 4 genera under 3 families, were identified from the total samples. Annual Shannon-Wiener indices were from 1.606 to 1.683, and peaked in March and April, but were lowest in January. The Margalef indices were ranged from 0.502 to 0.982, which was highest in April and lowest in August. Pielou indices stayed between 1.003 and 1.493, which was maximal in August and minimal in November. **Conclusion** A variety of species of acaroid mites breed in the edible mushrooms in Huainan, for which effective measures should be taken to prevent the mushrooms from quality degradation and yield reduction.

Key words acaroid mites; edible mushroom; Huainan

1 材料与方法

1.1 试剂 USF1 的抗体和 SP 免疫组化试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 动物模型复制及标本制备 10 只野生型小鼠与 10 只 ApoE 基因敲除小鼠购自中国协和医科大学, 清洁级, 分为两组; 10 只野生型小鼠予普通饲料喂养作为对照组; 10 只 ApoE 基因敲除小鼠予高脂饲料(胆固醇 0.5%、猪油 10%、蛋黄粉 10%、维持料 59.5%、蔗糖 20%) 喂养作为高脂组; 单笼饲养 12 周, 自由摄食饮水。在此期间各组动物均不限制饮食和饮水。造模 6 个月后, 禁食 12 h 将两组小鼠分别经眼眶采血送检各组 TG、TC、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL) 水平。取下颌下腺组织, 用 10% 福尔马林固定, 常规石蜡包埋, 切片厚 4 μm, 进行染色处理。

1.3 HE 染色 切片脱蜡至水, 入苏木精染色 20 min, 再进行盐酸乙醇分色、蓝化, 入伊红染色 1 min, 脱水、透明、封片, 显微镜观察。

1.4 电镜处理 将下颌下腺组织切成 3 mm 大小, 固定于 1% 锇酸, 环氧树脂 Epon-812 包埋, 超薄切片, 醋酸铀及柠檬酸铅双重染色, 在日产 JEO L-1230 透射电镜下观察并摄影。

1.5 免疫组织化学染色 采用免疫组织化学 SP 法染色。所用抗体及稀释度如下: 一抗为兔抗鼠 USF1 的抗体, 稀释度分别为 1 : 80, 37 °C 孵育 40 min 后, 置 4 °C 过夜; 二抗为羊抗兔 IgG 血清, 37 °C 孵育 15 min; 辣根酶标记链酶卵白素工作液, 37 °C 孵育 30 min。DAB 显色后脱水、透明和封片。用 PBS 替代第一抗体作阴性对照。

1.6 计算机图像分析 在光镜(10 × 40 倍) 下, 利用 Nikon 彩色数码 CCD 摄像头捕获各组下颌下腺 HE 切片中腺泡和导管图像, 捕获各组免疫组化染色切片中 USF1 的图像, 每张切片随机选取 8 个视野, 再用 metamorph 生物图像软件计算各组 USF1 免疫阳性细胞的平均光密度(average optical density, MOD) 值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 分析各组 USF1 免疫阳性细胞的 MOD 值, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组资料比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 血脂结果 与对照组比较, 高脂组 TC、TG、

VLDL 表达差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 两组小鼠 TG、TC、VLDL 的比较(*n* = 10 $\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	高脂组	<i>t</i> 值
TC(mmol/L)	2.97 ± 0.39*	33.37 ± 16.38	4.872
TG(mmol/L)	1.10 ± 0.67*	5.17 ± 2.70	3.940
VLDL(mmol/L)	0.52 ± 0.16	9.83 ± 4.11	5.946

与高脂组比较: * *P* < 0.05

2.2 HE 染色结果 对照组小鼠下颌下腺由分泌部和导管部组成, 分泌部为混合性腺泡。腺泡饱满, 结构清晰, 腺泡细胞为锥体形, 胞质染色较浅, 细胞核圆形且靠近基底部。导管部包括闰管、颗粒曲管(granular convoluted tubule, GCT)、纹状管和排泄管 4 部分组成, 其中 GCT 是一段长而粗的弯曲小管, 是啮齿类动物特有的结构。高脂组小鼠下颌下腺的腺泡出现轻度萎缩现象, 细胞排列紊乱, GCT 导管上皮细胞萎缩, 细胞顶部胞质中嗜酸性分泌颗粒减少, 结缔组织增生(图 1)。

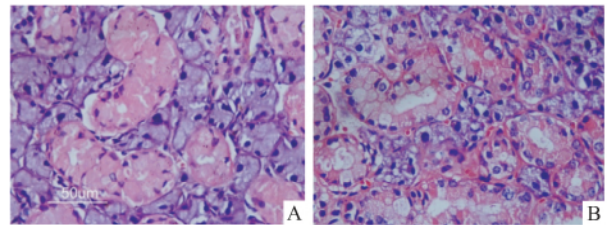


图 1 小鼠下颌下腺组织 HE × 400

A: 对照组; B: 高脂组

2.3 电镜结果 正常小鼠下颌下腺导管上皮细胞内线粒体发达, 线粒体嵴清晰完整; 高脂组线粒体出现嵴断裂、紊乱、消失、基质溶解(图 2)。正常小鼠下颌下腺腺细胞内粗面内质网丰富, 网腔均匀且分布规则, 高脂组局部粗面内质网呈囊状扩张, 结构松散零乱(图 3)。

2.4 免疫组化染色结果 阴性对照实验结果显示为阴性。USF1 阳性表达主要定位于小鼠下颌下腺

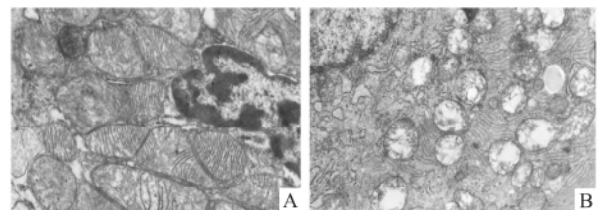


图 2 小鼠下颌下腺导管上皮内粒体 × 10 000

A: 对照组; B: 高脂组

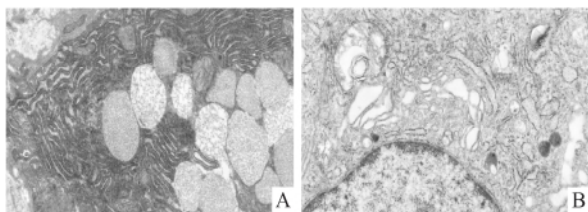


图3 小鼠下颌下腺腺泡细胞内粗面内质网 $\times 10\ 000$
A: 对照组; B: 高脂组

的腺泡及导管上皮细胞的细胞质和细胞核,免疫组化染色以出现棕黄色颗粒或黄色颗粒为阳性着色,对照组小鼠下颌下腺导管上皮细胞质和细胞核均出现明显的棕黄色至棕褐色颗粒,高脂组小鼠下颌下腺导管上皮细胞质和细胞核呈现浅黄色颗粒,且细胞质内着色颗粒明显减少(图4)。

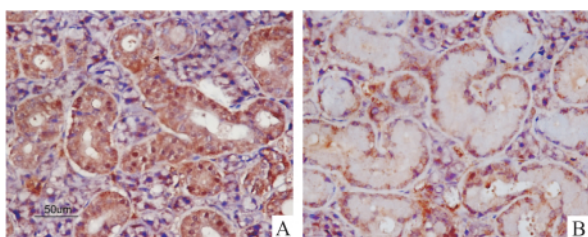


图4 小鼠下颌下腺 USF1 表达 SP $\times 400$
A: 对照组; B: 高脂组

2.5 计算机图像分析结果 对照组小鼠下颌下腺内 USF1 的 MOD 值为 (0.67 ± 0.12) ,高脂组为 (0.56 ± 0.06) ,两者差异有统计学意义($t = 2.657$, $P = 0.016$)。

3 讨论

HLP 是由于外源性脂质摄入过多,或体内脂质代谢紊乱等各种原因导致的血浆中 TC、TG 和(或) LDL 过高和(或) HDL 过低的一种全身脂代谢异常。临床研究^[4-6]证明,HLP 是诱发 AS 和心脑血管疾病的重要危险因素,对人体健康的损害主要表现在对心血管系统的损伤。下颌下腺产生的多种生物活性物质主要通过旁分泌方式分泌到细胞间隙,直接或间接调节颌下腺的分泌活动,进而调节机体多种生理功能。本实验中 ApoE 基因敲除小鼠给予高脂饮食 6 个月后,其血中 TC、TG 明显升高,提示 HLP 小鼠动物模型造模成功。

本实验电镜结果表明,高脂组小鼠下颌下腺导管上皮细胞线粒体嵴断裂,腺上皮内部分粗面内质

网囊状扩张,提示 HLP 可以导致下颌下腺超微结构的改变。细胞生命活动所需要能量和蛋白质绝大部分由线粒体和粗面内质网提供,两者形态结构和数量的变化均受细胞内外环境影响;同时在细胞和组织发生病变或损伤时,线粒体和粗面内质网均是较敏感的反映指标。本实验观察到高脂组小鼠下颌下腺线粒体出现嵴断裂、紊乱,部分粗面内质网呈囊状扩张等形态结构改变势必影响其分泌和合成功能。这可能由于 HLP 时持续升高的 TG 和游离脂肪酸易造成机体胰岛素抵抗,使葡萄糖氧化减少,无氧酵解增加,导致葡萄糖等能量代谢障碍^[7-8]。

ApoE 基因作为血浆脂蛋白的重要成分,是机体内重要的胆固醇载体,同时也是 HLP、AS 等疾病发生、发展的重要分子靶标。本实验结果显示,ApoE 基因敲除高脂组小鼠下颌下腺中 USF1 的表达明显下降,可以推测出 ApoE 基因敲除和高脂饮食对小鼠下颌下腺中 USF1 表达具有下调作用。

USF1 是真核生物体内广泛分布的一种多功能蛋白质,在机体的生长发育、免疫应答和炎症反应等方面发挥着重要的作用。近年来,大量的细胞生化分子实验研究表明:USF 广泛参与控制和调节糖、脂代谢相关基因的表达^[9]。Putt et al^[10]从 USF 基因的单核苷酸多态性方面研究,发现 USF 基因的某些多态性的变化会出现相应个体患 FCHL 的几率上升,同时在易患个体中,ApoE 的表达量明显下降;Lee et al^[11]研究荷兰患 FCHL 的家庭成员发现 USF 的基因多态性与个体 TG 及 ApoE 的血清水平具有显著关联。本实验结果显示,高脂组小鼠下颌下腺中 USF1 的表达明显下降。推测 ApoE 基因敲除和高脂饮食对小鼠下颌下腺中 USF1 表达具有下调作用;而 USF1 的分泌减少将影响血脂代谢水平。其可能机制有:① HLP 时大量脂肪细胞产生,肿瘤坏死因子- α ^[12]、瘦素^[13]等细胞因子的高表达在胰岛素抵抗发展过程中起着重要作用,使葡萄糖代谢障碍,导致机体合成 USF1 所需能量不足;② HLP 时,血液中血脂浓度长期处于较高水平,内皮型一氧化氮合酶的表达下调使一氧化氮合成减少,进而影响血管舒张功能和血管内皮功能导致下颌下腺供血下降^[14],引起组织缺血低氧,导致 USF1 的合成下降。

下颌下腺是具有内、外分泌功能的腺体,其对机体各种生理功能的重要调节作用日渐受到人们的普遍关注和重视。本实验通过建立 HLP 小鼠模型观察到 HLP 可导致下颌下腺超微结构病理改变,USF1

表达减少。但是关于 HLP 导致小鼠下颌下腺导管上皮 USF1 表达下调的分子机制等问题还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 胡大一, 王家宏. 我国血脂异常防治现状[J]. 中国实用内科杂志 2009 29(1): 2-4.
- [2] 崔芳芹, 贾雪梅, 汪 渊, 等. 高脂血症大鼠下颌下腺内 AQP1 和 AQP5 表达及意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2012 21(1): 74-7.
- [3] Baxevasis A D. The molecular biology database collection: an on-line compilation of relevant database resources[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 1-7.
- [4] 朱中玉, 高传玉, 黄克均, 等. 低密度脂蛋白胆固醇/高密度脂蛋白胆固醇及甘油三酯/高密度脂蛋白胆固醇比值与冠心病关系的探讨[J]. 中国循环杂志 2003 18(4): 273-5.
- [5] Gardner A W, Afaq A. Management of lower extremity peripheral arterial disease[J]. *J Cardiopulm Rehabil Prev* 2008 28(6): 349-57.
- [6] 亚白柳, 李 林. 高脂血症与微循环功能障碍研究进展[J]. 医学综述 2011 17(20): 3041-3.
- [7] 王晓凌, 姜玲玲, 邢立勇, 等. 高脂饲养诱导大鼠胰岛素抵抗的动态观察[J]. 中国老年学杂志 2008 28(7): 664-6.
- [8] 陈 莉, 陈冠军, 陈 兵, 等. 白藜芦醇改善高脂血症小鼠脂肪组织胰岛素抵抗的机制探讨[J]. 安徽医科大学学报 2014 49(8): 1104-9.
- [9] Wang R, Liang H, Li H, et al. USF1 inhibition protects against oxygen-and-glucose-deprivation-induced apoptosis *via* the downregulation of miR-132 in HepG2 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2014 446(4): 1053-9.
- [10] Putt W, Palmén J, Nicaud V, et al. Variation in USF1 shows haplotype effects, gene: gene and gene: environment associations with glucose and lipid parameters in the European Atherosclerosis Research Study II[J]. *Hum Mol Genet* 2004 13(15): 1587-97.
- [11] Lee J C, Weissglas-Volkov D, Kytälä M, et al. USF1 contributes to high serum lipid levels in Dutch FCHL families and U. S. whites with coronary artery disease[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007 27(10): 2222-7.
- [12] 鲁 谨, 邹大进, 张家庆. 肿瘤坏死因子- α 致胰岛素抵抗[J]. 中国病理生理杂志 1999 15(12): 1146-8.
- [13] Stepan C M, Bailey S T, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes[J]. *Nature* 2001 409(6818): 307-12.
- [14] 江一峰, 曹晓娥, 王 丽, 等. 高脂血症小鼠心脏和肺组织中 eNOS 及 HO-1 的表达[J]. 复旦学报(医学版) 2008 35(3): 342-7.

Observation of submandibular gland ultrastructure and upstream stimulatory factor 1 expression in hyperlipidemic ApoE knockout mice

Li Jing^{1,2}, Huang Dake³, Gui Li³, et al

(¹*Histology and Embryology Teaching and Research Section*, ³*Comprehensive Laboratory*, Anhui Medical University Hefei 230032; ²*Library and Information Center*, Anhui Medical College, Hefei 230601)

Abstract Objective To observe the expression of apolipoprotein E (ApoE) gene knocking out hyperlipidemia (HLP) in mice submandibular gland ultrastructure and upstream stimulating factor 1 (USF1). **Methods** Take 10 wild mice fed with normal feed as control group, 10 ApoE knockout mice fed with high fat as hyperlipidemia group. Six months after the model was set up, blood fat in orbital blood was tested. The submandibular gland tissues of the mice were observed by using light microscopy, electron microscopy and immunohistochemistry staining. **Results** Compared with the control group, the cholesterol, triglycerides and very low-density lipoprotein of high-fat group were significantly higher ($P < 0.05$). HE staining was observed, the acini of the submandibular glands in hyperlipidemia group was atrophied obviously, and the cells were in disorder. Under electron microscopy, the submandibular gland cell mitochondria crests of mice in hyperlipidemia group were fractured, and rough endoplasmic reticulum cystically expanded, which was loose and messy. Immunohistochemical results showed that the USF1 expression in hyperlipidemia group decreased; the difference in average optical density value and the control group was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** HLP can result in pathological changes in the mouse submandibular gland ultrastructure and reduction in USF1 expression.

Key words hyperlipidemia; ultrastructure; upstream stimulatory factor 1; submandibular gland; mice