

LSS 功能缺失对 NAFLD 模型小鼠肠道功能的影响

白红枚¹, 杨振¹, 胡韦康¹, 王子涵¹, 周文静¹, 何清雅¹, 钟健¹,

李名聪², 刘莉³, 张朝阳³, 张素梅¹, 张胜权¹

[安徽医科大学¹基础医学院生物化学与分子生物学教研室、³科研实验中心, 合肥 230032;

²安徽医科大学附属合肥医院(合肥市第二人民医院)病理科, 合肥 230011]

摘要 目的 探究羊毛固醇合成酶(LSS)基因功能缺失后对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)模型小鼠肠道功能的影响。方法 利用CRISPR/Cas9系统建立LSS全身杂合敲除C57小鼠(LSS^{+/-})模型,用60%脂肪比的高脂饲料喂养6个月后,通过HE和油红O染色检测肝脏组织内脂肪沉积情况;HE染色观察小肠组织的形态变化;试剂盒检测肠道组织中总胆固醇含量的变化;苯酚红糊体检测小鼠的胃肠动力功能;Evans blue染色检测肠道通透性;Western blot检测LSS、紧密连接蛋白(Claudin)-4、Claudin-5、白细胞分化抗原36(CD36)、尼曼-匹克C1型类似蛋白1(NPC1L1)蛋白在小肠组织中的表达情况。结果 肝脏HE和油红O染色结果显示在高脂饮食组中LSS基因敲低小鼠的肝脏脂肪沉积低于野生型小鼠,LSS基因杂合敲除小鼠肠道组织中的总胆固醇含量降低($P < 0.01$),但肠组织HE染色未观察到两组小鼠之间存在形态差异,LSS基因杂合敲除小鼠的胃肠动力功能也未出现显著变化,Evans blue检测肠道通透性结果显示LSS基因杂合敲除在高脂饮食小鼠的肠道通透性降低($P < 0.05$),Claudin-5蛋白在LSS基因杂合敲除高脂饮食小鼠的肠道组织中表达量升高($P < 0.05$),而LSS蛋白在LSS杂合敲除小鼠肠道组织中表达量降低($P < 0.05$)。结论 在高脂饮食诱导的NAFLD模型中,LSS基因杂合敲除后通过调节肠道组织内胆固醇的代谢和上调Claudin-5的表达,减轻了高脂饮食诱导的肝脏脂肪沉积并改善了肠道的屏障功能。

关键词 羊毛固醇合成酶;胆固醇代谢;非酒精性脂肪肝病;肠道通透性;紧密连接蛋白;肠道屏障功能

中图分类号 R 575.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)09-1653-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.09.012

羊毛固醇合成酶(lanosterol synthase, LSS)的主要功能是催化(S)-2,3-氧化鲨烯转化为羊毛固醇,这一转化过程是胆固醇生物合成途径中的关键步骤。胆固醇除了组成细胞膜,还参与细胞内的多种信号转导过程,这些信号转导过程与细胞的增殖、分化和凋亡等密切相关^[1-4]。小肠作为人体胆固醇代谢的核心器官,其小肠上皮细胞合成的胆固醇不仅作为脂蛋白复合体的核心成分参与全身脂质运输和能量供给,更通过调控细胞膜流动性维持肠黏膜屏障的结构完整。这种由紧密连接蛋白构成的物理屏障与黏液层、免疫球蛋白共同形成的三重防御体系,能有效抵御病原微生物及毒素的侵袭。

胆固醇代谢紊乱是非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)进展的核心病理机制。其脂毒性效应可通过肝肠轴双向调控网络加剧肠道微生态失衡^[5-6]。基于以上研究背景,该研究采用CRISPR/Cas9系统建立LSS基因全身杂合敲除小鼠(LSS^{+/-})模型,然后通过6个月60%脂肪比的高脂饲料喂养建立NAFLD小鼠模型,研究LSS功能缺失后对高脂饮食诱导NAFLD模型小鼠肠道功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 20只8周龄雄性SPF级C57BL/6品系小鼠,体质量(15±5)g,购自安徽省实验动物中心,16只8周龄雄性利用CRISPR/Cas9技术构建的LSS基因全身杂合敲除小鼠(LSS^{+/-}),体质量(15±5)g,购自南京生物医药研究所,实验动物许可证号:SCXK(苏)2015-0001。所有小鼠于安徽医科大学动物中心SPF级环境中饲养,温度(18~22)℃,湿度40%~70%,明暗交替时间保持

2025-06-15 接收

基金项目:安徽省高校科研项目(编号:2022AH050651);安徽医科大学学校科研基金项目(编号:2022xkj107);蚌埠医学院科技项目自然科学基金重点项目(编号:2022byzd196)

作者简介:白红枚,女,硕士研究生;

张胜权,男,教授,硕士生导师,通信作者,E-mail: zhangshengquan@ahmu.edu.cn

在 12 h/12 h, 小鼠自由进食, 小鼠饲养和实验过程严格按照国标和安徽省实验动物中心管理饲养条例, 动物伦理批号(安徽医科大学: LLSC20221208)。

1.1.2 主要试剂 羧甲基纤维素、伊文思蓝(Evans blue, EB) (上海麦克林生化科技股份有限公司, 货号: c804618-25g, 314-13-6)、10% 多聚甲醛固定液、苏木精、伊红、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、Tris 盐缓冲液(Tris buffered saline tween, TBST)、(上海碧云天生物技术有限公司, 货号: P0147B、C0107、C0109、ST626、P0233)、苯酚红、油红 O 染料(北京索莱宝科技有限公司, 货号: p8460、G1260)、总胆固醇测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, 货号: A1114-4)、羊毛固醇合成酶(lanosterol synthase, LSS) 抗体[赛默飞世尔科技公司(中国), 货号: PA5-28238]、白细胞分化抗原 36(cluster of differentiation 36, CD36) 抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司, 货号: DF13262)、尼曼-匹克 C1 型类似蛋白 1(Niemann-Pick type C1-like 1 protein, NPC1L1) 抗体(上海赛默飞世尔公司, 货号: PA1-16800)、 β -actin 抗体[赛信通(上海)生物试剂有限公司, 货号: #4970]、紧密连接蛋白(Claudin)-4、Claudin-5 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司, 货号: 37-4900、29767-1-AP)。

1.1.3 主要仪器 生物组织自动脱水机(孝感市亚光医用电子技术有限公司, 型号: ZT-12P-1)、石蜡切片机(德国徕卡仪器有限公司, 型号: RM2235)、全波长读数仪[赛默飞世尔科技公司(上海), 型号: A51119700DPC]、化学发光成像系统(上海金鹏分析仪器有限公司, 型号: JP-K300)、荧光正置显微镜(日本尼康公司, 型号: 80i)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与建模 20 只 8 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6 品系小鼠, 随机分成两组, 每组 10 只, 一组采用普通饲料喂养 6 个月, 另一组采用 60% 脂肪比的高脂饲料喂养 6 个月, 建立 NAFLD 小鼠模型。16 只 8 周龄雄性利用 CRISPR/Cas9 技术构建的 LSS^{+/-} 也随机分成 2 组, 一组采用普通饲料喂养 6 个月, 另一组采用 60% 脂肪比的高脂饲料喂养 6 个月, 建立 NAFLD 小鼠模型。

1.2.2 肝脏和小肠组织病理染色 截取 2 cm 新鲜空肠段和肝脏放入预先准备好的组织固定液中进行固定, 组织固定好后依次进行脱水透明、浸蜡、包埋、

切片、烤片。烤好的片子先放入 2 个二甲苯溶液中各浸泡 15 min 进行脱蜡, 然后依次在无水乙醇 1、无水乙醇 2、90% 乙醇、80% 乙醇、70% 乙醇溶液中各浸泡 3 min, 最后放蒸馏水中清洗 1 min 就可以开始 HE 染色了。HE 染色的过程为: 先将所有的片子放入苏木精溶液中染色 8~10 min, 流水冲洗几秒后放入温热的蒸馏水中浸泡 8 min 进行反蓝, 再将片子放入伊红染料中染色 20 s, 用流水冲洗片刻后烘干, 最后用中性树胶进行封片, 显微镜下观察拍照。

1.2.3 肝脏油红 O 染色 将预先制作好的并保存在 -20 °C 冰箱中的肝脏冷冻切片放置到切片架上室温回温 5~10 min。然后将冷冻切片直接放入装入试剂 1 应用液(试剂 1 储备液: 试剂 1 稀释液 = 5: 2) 的染缸中染色 10~15 min, 37 °C 左右蒸馏水洗 5~20 s。试剂 2 复染液染色 3~5 min, 水洗约 30~60 s。未待表面水干透即可滴加试剂 3(水性封固剂) 于玻片表面进行封片, 最后于显微镜下观察并拍照。

1.2.4 小肠组织总胆固醇(total cholesterol, TC) 含量检测 根据试剂盒要求准确称取小肠组织质量, 按质量(g): 体积(mL) = 1: 9 的比例, 加入 9 倍体积的匀浆介质(无水乙醇), 冰水浴条件下机械匀浆, 4 °C、2 500 r/min 离心 10 min, 取上清液待测。利用 96 孔板, 每个样本取 2.5 μ L 到 250 μ L 的工作液中混匀, 37 °C 下孵育 10 min 后, 利用酶标仪测定 500 nm 波长下各个样品的吸光度值(A), 最后利用公式计算各个样品总胆固醇的含量。胆固醇含量(mmol/g 组织) = $(A_{\text{样本}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times C_{\text{标准}} / [W_{\text{样本质量}}(g) / V_{\text{乙醇}}(L)]$ 。

1.2.5 小鼠胃肠动力检测 造模完成的实验小鼠先禁食 24 h, 然后称取每只小鼠的体质量。每只小鼠灌胃 1.5 mL 事先配制好的苯酚红糊体(50 mg 苯酚红溶解于 100 mL 的去离子水中, 将苯酚红溶液加热到 70 °C 后, 向其中加入 1.5 g 的羧甲基纤维素, 磁力搅拌 30 min 后冷却至室温)。等待 20 min 后处死小鼠。然后用剪刀剪开小鼠的腹腔, 找到小鼠的胃和小肠组织, 用细线先对小鼠的贲门和幽门进行结扎, 然后迅速取出胃, 放在滤纸上进行称重并记录。接着用 PBS 冲洗胃里的内含物, 用滤纸吸干多余的组织液和 PBS, 再次称取并记录胃的净重, 胃排空率 = $[1 - (\text{总胃重} - \text{净总胃重}) / \text{总胃重}] \times 100\%$ 。同时迅速取出小鼠的小肠组织, 轻轻铺在 1

张白纸上,测量其总长度和红色半固体浆糊正前面之间的距离,小肠推进率 = (红色糊体前距/小肠总长度) × 100%。

1.2.6 EB 检测小鼠肠道通透性 手术取出小鼠的空肠,用注射器吸取 PBS 冲洗肠道内容物,反复几次直到冲洗干净,从小肠近端剪取约 10 cm 长的一段空肠,先将肠的一端用夹子夹紧,再用 1 mL 注射器于空肠另一端开口处注射 0.2 mL 的 1.5% (15 g/L) 的 EB(用 PBS 溶解),再用夹子将这端开口夹紧,使整个空肠大约为 6 cm。将空肠囊置于装有生理盐水的皿中,于冰上孵育 30 min。用 3 个都装有 6 mmol/L 乙酰半胱氨酸的烧杯,将孵育好的空肠囊从两边剪开,取中间约 3 cm 长的一段空肠依次在 3 个烧杯中清洗 3 min,洗去多余的染料。将清洗好的 3 cm 空肠段放在滤纸上,37 °C 干燥 24 h 之后称重,得到空肠段的质量。将干燥后的小肠囊放入 1 mL 甲酰胺的 EP 管中,然后 50 °C 下烘箱孵育 24 h(这一步是为了洗脱 EB)。孵育结束后取出小肠将剩下的 1 mL 甲酰胺于 612 nm 处测定吸光度,通过之前测定好的标准曲线计算 EB 的量。

1.2.7 Western blot 检测肠道中 LSS、CD36、NPC1L1、Claudin-1、Claudin-5 蛋白的表达情况 称取 100 mg 左右的空肠组织,按质量加入 RIPA 裂解液(1 g 组织/mL),用研磨器研磨到没有明显组织块后,将组织匀浆放置冰上静置 30 min,然后 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液。经 BCA 法测定蛋白浓度。加入 5 × 的 SDS 蛋白上样缓冲液煮沸 10 min 进行蛋白变性,取变性蛋白 25 μg 经过 10% SDS-PAGE 电泳,利用湿转法将蛋白电泳转印到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。然后一抗 [β-actin、LSS、CD36、NPC1L1、Claudin-1 (均 1 : 500)、Claudin-5 (1 : 1 000)] 4 °C 冰箱孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入辣根过氧化物酶标记二抗 (HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG/HRP-conjugated goat anti-mouse IgG) 室温下孵育(稀释比例 1 : 20 000) 2 h,再用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,最后通过 Immobilon ECL Ultra Western HRP 底物化学发光液发光、显影,化学发光成像系统拍照,最后用 ImageJ 分析软件分析各个蛋白电泳条带的灰度值。

1.2.8 统计学处理 数据采用 SPSS 26.0 软件和 GraphPad Prism 9.0 进行统计学分析,符合正态分布

与方差齐性的计量资料以($\bar{x} \pm s$) 表示,两组均数的比较采用 *t* 检验,多组间比较采用双因素方差分析,组间事后两两比较采用 Tukey 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LSS 基因杂合敲除对小鼠肝脏组织的影响

通过 HE 和油红 O 染色显示,普通饲料组喂养的小鼠,LSS 基因杂合敲除以后对小鼠的肝脏组织无影响,在高脂饮食诱导的 NAFLD 模型中,LSS 基因杂合敲除以后小鼠肝脏组织中的脂肪沉积明显降低(图 1A);并且在高脂饲料组中 LSS 基因杂合敲除小鼠的肝体比值也明显低于野生小鼠模型($t = 4.414$, $P = 0.0006$) (图 1B)。由此可知,LSS 基因的缺失能减少 NAFLD 的肝内脂肪沉积,对 NAFLD 有着很好的预防作用。

2.2 LSS 基因杂合敲除对小鼠小肠组织形态和组织中胆固醇的影响

HE 染色观察各组小鼠小肠组织的形态变化,显示高脂饲料喂养的小鼠小肠组织结构比普通饲料喂养的小鼠肠道组织更大,小肠上的绒毛结构也比普通饲料喂养的绒毛结构更长,但在 LSS 基因杂合敲除小鼠和野生型小鼠小肠组织之间,小肠组织形态和绒毛结构未见显著的形态差异(图 2A)。通过总胆固醇检测试剂盒发现在高脂饮食组中 LSS 基因杂合敲除小鼠的小肠组织中总胆固醇含量低于野生型小鼠($t = 4.818$, $P = 0.0085$) (图 2B)。由此可见,LSS 基因杂合敲除以后会降低小肠组织中胆固醇的含量,但却对小鼠小肠组织形态无显著影响。

2.3 LSS 基因杂合敲除后对小鼠胃肠动力的影响

胃肠动力功能是消化系统的重要组成部分,胃肠动力功能的正常运作是保证消化系统健康、物质吸收和整体身体健康的关键因素。通过对各组实验小鼠胃肠动力的检测显示,高脂饮食使得小鼠的小肠推进率升高($t = 2.735$, $P = 0.0256$),而 LSS 基因杂合敲除以后对小鼠的胃排空率和小肠推进率均无显著影响,结果如图 3 所示。

2.4 LSS 基因杂合敲除后能降低小鼠肠道组织的肠道通透性

EB 为非渗透性染料,当肠道黏膜屏障受损严重时,EB 染料就能通过黏膜之间的间隙渗入到肠组织中,EB 染料渗透的越多代表肠道黏膜屏障受损越严重。高脂组中 EB 染料的渗透量普遍高于

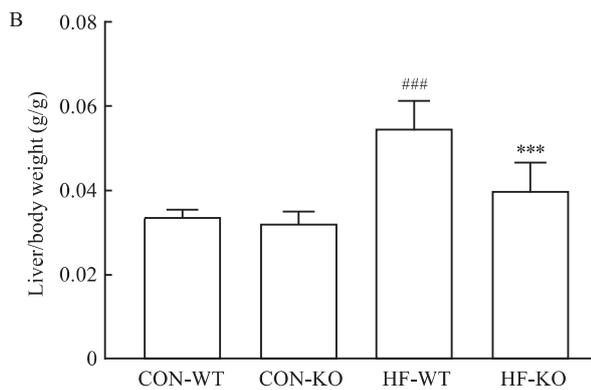
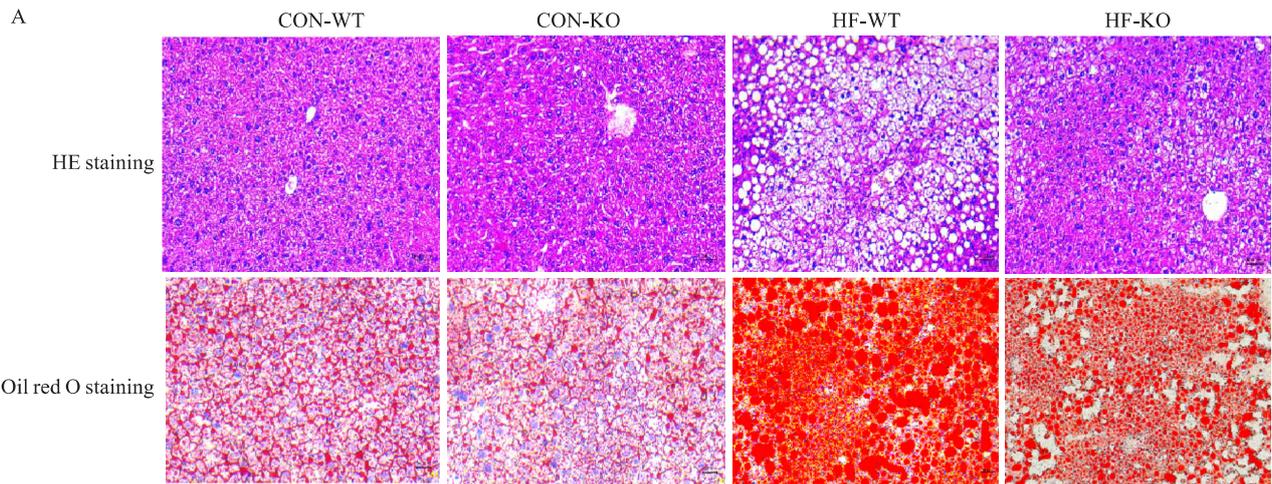


图1 各组实验小鼠肝脏组织的损伤情况

Fig.1 Liver tissue damage of experimental mice in each group

A: The results of HE and oil red O staining of liver tissue of experimental mice in each group $\times 10$; B: The statistical results of the liver to body weight ratio of each experimental group of mice; CON-WT: wild-type mice on a normal diet; CON-KO: $LSS^{+/-}$ mice on a normal diet; HF-WT: wild-type mice on a high-fat diet; HF-KO: $LSS^{+/-}$ mice on a high-fat diet; ^{###} $P < 0.001$ vs CON-WT group; ^{***} $P < 0.001$ vs HF-WT group.

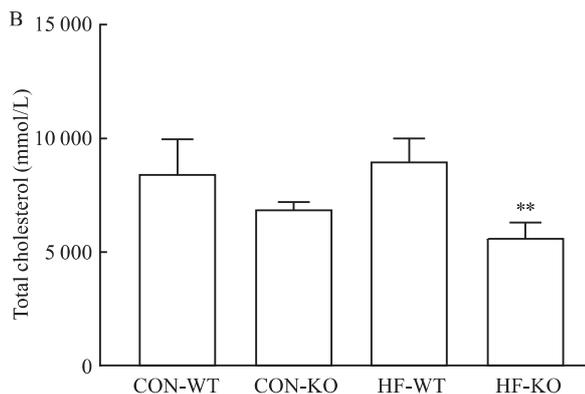
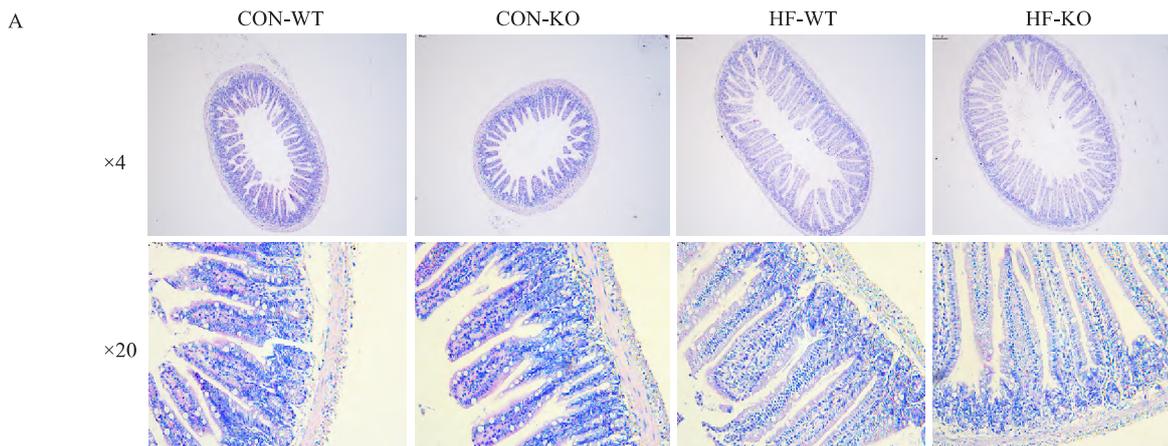


图2 小鼠小肠组织切片 HE 染色

Fig.2 Small intestinal tissue sections of mice were stained with HE

A: The HE staining results of the small intestinal tissue in each experimental group; B: The data analysis of total cholesterol content in the small intestine in each experimental group; CON-WT: wild-type mice on a normal diet; CON-KO: $LSS^{+/-}$ mice on a normal diet; HF-WT: wild-type mice on a high-fat diet; HF-KO: $LSS^{+/-}$ mice on a high-fat diet; ^{**} $P < 0.01$ vs HF-WT group.

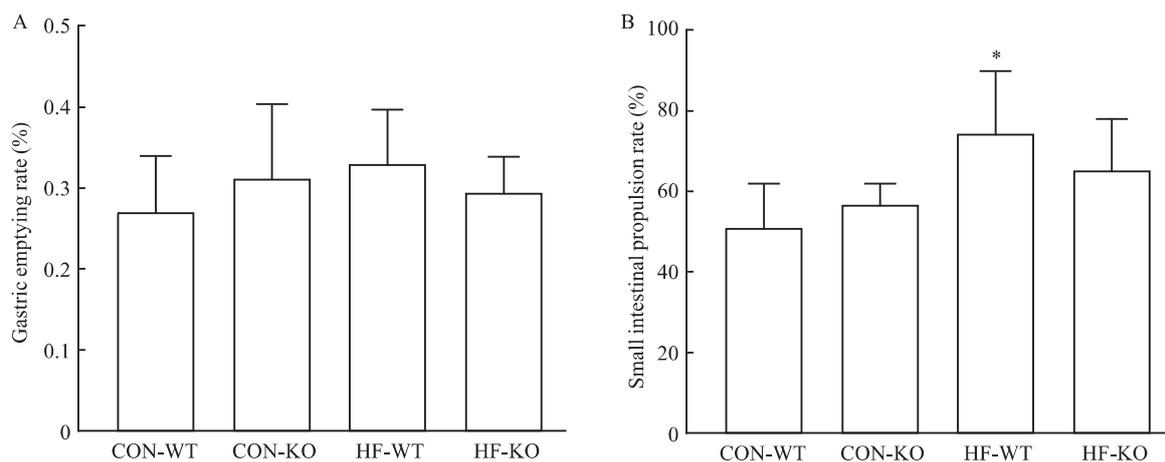


图3 小鼠胃肠动力检测结果

Fig. 3 Results of gastrointestinal motility tests in mice

A: The gastric emptying rate of experimental mice in each group; B: The small intestinal propulsion rate of each experimental group of mice; CON-WT: wild-type mice on a normal diet; CON-KO: *LSS*^{+/-} mice on a normal diet; HF-WT: wild-type mice on a high-fat diet; HF-KO: *LSS*^{+/-} mice on a high-fat diet; * $P < 0.05$ vs CON-WT group.

普通饲料喂养的小鼠 ($t = 2.944$, $P = 0.0073$), 但是 *LSS* 基因杂合敲除高脂饮食小鼠的 EB 染料的渗透量却明显低于高脂饮食正常小鼠 ($t = 2.497$, $P = 0.0187$) (图4)。由此可见, 长期高脂喂养会增加小鼠肠道黏膜的通透性, 但是 *LSS* 基因杂合敲除以后会降低小鼠肠道黏膜的通透性, 对肠道黏膜屏障有一定的保护作用。

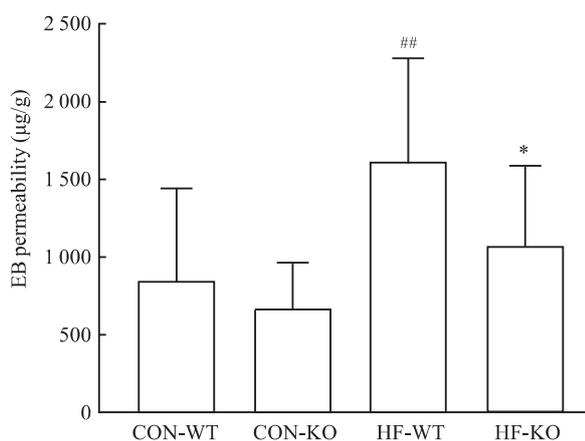


图4 小鼠小肠组织的肠道通透性情况

Fig. 4 Intestinal permeability of small intestinal tissues of mice

CON-WT: wild-type mice on a normal diet; CON-KO: *LSS*^{+/-} mice on a normal diet; HF-WT: wild-type mice on a high-fat diet; HF-KO: *LSS*^{+/-} mice on a high-fat diet; ## $P < 0.01$ vs CON-WT group; * $P < 0.05$ vs HF-WT group.

2.5 *LSS* 基因杂合敲除后增加了高脂饮食组小鼠

肠道组织中的 Claudin 蛋白的表达水平 Claudin 蛋白是肠上皮细胞间紧密连接蛋白的重要组成部分, 参与维持肠道组织黏膜屏障, 防止有害物质进入体内。通过 Western blot 实验检测了 4 组实验小鼠肠道组织中的 Claudin-1 和 Claudin-5 的蛋白表达情况。结果显示 Claudin-1 和 Claudin-5 这两种紧密连接蛋白在高脂饲料野生型小鼠组的表达量低于普通饲料野生型小鼠组 ($t_{\text{Claudin-1}} = 4.259$, $P = 0.0131$; $t_{\text{Claudin-5}} = 12.000$, $P = 0.0003$)。在普通饲料组中, Claudin-1 在野生型小鼠和 *LSS* 基因杂合敲除小鼠的肠道组织中表达无显著差异, Claudin-5 则在 *LSS* 基因杂合敲除小鼠的肠道组织中表达量要低于野生型小鼠 ($t = 3.278$, $P = 0.0306$)。而在高脂饲料组中, Claudin-5 在 *LSS* 基因杂合敲除小鼠的肠道组织中表达量高于野生型小鼠 ($t = 3.297$, $P = 0.0300$) (图5)。证明 *LSS* 基因杂合敲除以后可能通过增强小鼠肠道组织 Claudin-5 蛋白的表达量, 从而增强肠道的黏膜屏障。

2.6 *LSS* 基因杂合敲除后影响脂质物质的吸收

高脂饮食使肠道组织内 *LSS* 蛋白表达量显著上升 ($t = 3.729$, $P = 0.0203$), 但 *LSS* 基因杂合敲除后导致肠道组织中的 *LSS* 蛋白表达量降低 ($t = 7.257$, $P = 0.0019$)。CD36 是长链游离脂肪酸转运蛋白, 而 NPC1L1 是肠道胆固醇吸收的核心蛋白。高脂饮食使小鼠小肠组织内的 NPC1L1 蛋白表达量上调 ($t = 7.663$, $P = 0.0016$)。在普通饲料组中, *LSS* 基因杂

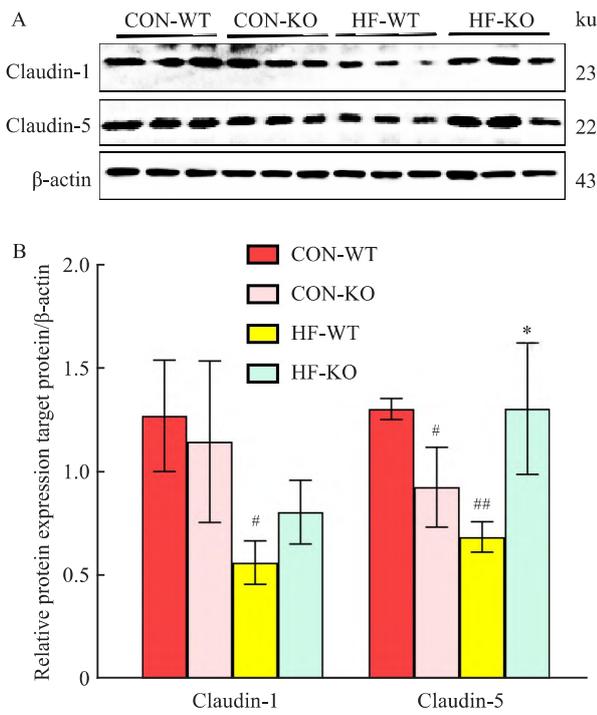


图5 紧密连接蛋白在各组实验小鼠小肠组织中的表达情况

Fig. 5 The expression of tight junction proteins in small intestinal tissue of each experimental group of mice

A: Western blot was used to detect the expression of Claudin-1 and Claudin-5 in the small intestine of mice in each group; B: Comparison of the relative expression of Claudin-1 and Claudin-5 proteins; CON-WT: wild-type mice on a normal diet; CON-KO: *LSS*^{+/-} mice on a normal diet; HF-WT: wild-type mice on a high-fat diet; HF-KO: *LSS*^{+/-} mice on a high-fat diet; [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01 vs CON-WT group; ^{*}*P* < 0.05 vs HF-WT group.

合敲除后使小鼠小肠组织内 CD36 和 NPC1L1 蛋白表达量升高 ($t_{CD36} = 3.872, P = 0.0180$; $t_{NPC1L1} = 4.178, P = 0.0139$) (图6)。由此推论,在普通饲料组, *LSS* 基因杂合敲除后导致肠道组织内的胆固醇合成异常,从而代偿性地增加小鼠肠道对胆固醇和脂肪酸的吸收。

3 讨论

LSS 是胆固醇生物合成途径中的关键酶,催化羊毛甾醇的合成,这是胆固醇和其他甾醇类物质的前体。*LSS* 功能缺失会导致胆固醇合成减少,导致小肠细胞内胆固醇含量降低。在以往的研究中显示, *LSS* 中的双等位基因突变与白内障、少毛症和掌跖角化病-先天性脱发综合征等疾病有关^[7-9],此外 *LSS* 功能的缺失还能通过促进脂肪酸 β-氧化及

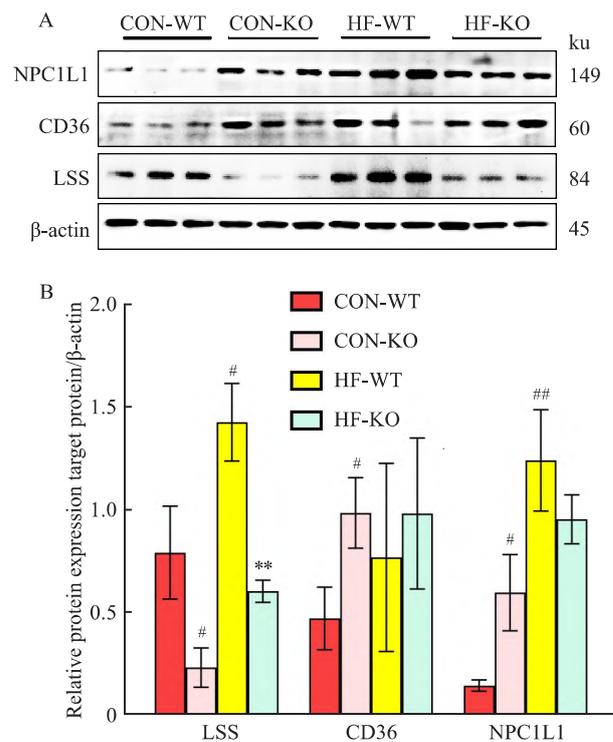


图6 LSS、CD36、NPC1L1 蛋白在小鼠小肠组织的表达情况

Fig. 6 The expression of LSS, CD36, and NPC1L1 proteins in the small intestine of mice

A: Western blot was used to detect the expression of LSS, CD36 and NPC1L1 proteins in the intestinal tract of each group of experimental mice; B: Comparison of relative expression levels of LSS, CD36 and NPC1L1 proteins; CON-WT: wild-type mice on a normal diet; CON-KO: *LSS*^{+/-} mice on a normal diet; HF-WT: wild-type mice on a high-fat diet; HF-KO: *LSS*^{+/-} mice on a high-fat diet; [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01 vs CON-WT group; ^{**}*P* < 0.01 vs HF-WT group.

促进胆固醇转变为胆汁酸,从而预防 NAFLD 的发展^[10]。而在本研究中实验结果显示,高脂饮食诱导的 NAFLD 小鼠肠道组织内 *LSS* 蛋白的表达量显著上调,而 *LSS* 功能缺失以后显著降低了 NAFLD 模型小鼠肝脏组织内的脂肪沉积,且 *LSS* 基因杂合敲除以后不仅使小鼠肠道组织内的胆固醇含量降低,还对肠道功能产生了多种影响。

小肠黏膜表面覆盖着单层柱状上皮细胞,这些细胞通过紧密蛋白相互连接,形成了肠道的第一道防线,它们不仅具有吸收营养物质的功能,还通过其完整性阻止了有害物质的入侵。而胆固醇能够调节磷脂双分子层的流动性,降低膜的通透性,防止磷脂分子结晶,并增强膜的柔韧性。胆固醇还可能通过影响紧密连接蛋白的表达和分布,促进紧密连接的形成和稳定,以维持小肠上皮细胞的结构性和完整

性,从而防止病原体和有害物质的入侵^[11]。本研究也进一步证实了胆固醇稳态对肠道黏膜屏障的重要性,*LSS* 功能缺失使高脂饮食小鼠肠道组织上的紧密连接蛋白 Claudin-5 的表达量升高,降低了小鼠的肠道通透性,预防了肠道内的有害物质进入肝脏,对非酒精性脂肪性肝病的预防有着积极的作用。

小肠上皮细胞 CD36 和 NPC1L1 蛋白是负责脂肪酸和胆固醇吸收的主要转运蛋白,该蛋白的表达和活性受到多种因素的调控,包括膳食胆固醇含量、胆汁酸、激素(如胰岛素、胰高血糖素样肽-1)以及肠道微生物代谢产物等^[12-14]。在本研究中,高脂饮食会使小鼠小肠上皮细胞中的 NPC1L1 蛋白显著上调;而 *LSS* 基因杂合敲除以后,使普通饮食组小鼠肠道上皮细胞中的 CD36 蛋白上调,高脂饮食组 CD36 和 NPC1L1 蛋白无显著变化,但小鼠小肠组织内的总胆固醇含量显著降低。*LSS* 蛋白作为胆固醇合成过程中的关键蛋白,其功能缺失后导致小肠上皮细胞内的胆固醇合成功能降低,从而代偿性地增加了小肠上皮细胞对胆固醇和脂肪酸的吸收。具体机制需进一步验证。

综合以上的研究结果表明,长期高脂饮食会使小鼠肠道组织中 *LSS* 蛋白的表达量上升,膳食胆固醇和脂肪酸的吸收增加,肠道黏膜屏障功能降低。而 *LSS* 基因杂合敲除以后降低了小鼠肠道组织中总胆固醇含量和肠道通透性,但是对小鼠的状态、肠道组织形态和胃肠动力功能却无显著的影响。且 *LSS* 蛋白表达量的下降还可能通过降低肠组织内胆固醇的含量影响着肠道对膳食胆固醇以及脂肪酸的吸收。最后 *LSS* 功能缺失使肠道组织上的紧密连接蛋白 Claudin-5 的表达量升高,降低了小鼠的肠道通透性,预防了肠道内的有害物质进入肝脏,对 NAFLD 的预防有着积极的作用。综合以上的研究结果,肠道组织内的 *LSS* 基因有望成为新的治疗 NAFLD 的靶点。

参考文献

- [1] 李艳玲,李昱昊,孙晓梅,等.羊毛固醇合成酶杂合敲除小鼠全脑转录组学分析[J].安徽医科大学学报,2022,57(9):1389-93. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.009.
- [1] Li Y L, Li Y H, Sun X M, et al. Whole-brain transcriptome analysis of wool sterol synthase heterozygous knockout mice [J]. Acta Univ Med Anhui, 2022, 57(9): 1389-93. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.009.
- [2] Di Vincenzo F, Del Gaudio A, Petito V, et al. Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review [J]. Intern Emerg Med, 2024, 19(2): 275-93. doi: 10.1007/s11739-023-03374-w.
- [3] Marra F, Svegliati-Baroni G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis [J]. J Hepatol, 2018, 68(2): 280-95. doi: 10.1016/j.jhep.2017.11.014.
- [4] Musso G, Gambino R, Cassader M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis [J]. Prog Lipid Res, 2013, 52(1): 175-91. doi: 10.1016/j.plipres.2012.11.002.
- [5] Schnabl B, Brenner D A. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases [J]. Gastroenterology, 2014, 146(6): 1513-24. doi: 10.1053/j.gastro.2014.01.020.
- [6] Mouries J, Brescia P, Silvestri A, et al. Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development [J]. J Hepatol, 2019, 71(6): 1216-28. doi: 10.1016/j.jhep.2019.08.005.
- [7] Besnard T, Sloboda N, Goldenberg A, et al. Biallelic pathogenic variants in the lanosterol synthase gene *LSS* involved in the cholesterol biosynthesis cause alopecia with intellectual disability, a rare recessive neuroectodermal syndrome [J]. Genet Med, 2019, 21(9): 2025-35. doi: 10.1038/s41436-019-0445-x.
- [8] Mori M, Li G, Abe I, et al. Lanosterol synthase mutations cause cholesterol deficiency-associated cataracts in the Shumiya cataract rat [J]. J Clin Invest, 2006, 116(2): 395-404. doi: 10.1172/JCI20797.
- [9] 孙晓梅,李名聪,李涛,等. *LSS* 基因功能缺失对雄性小鼠生殖的影响[J].安徽医科大学学报,2022,57(2): 208-12. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.009.
- [9] Sun X M, Li M C, Li T, et al. The effects of knockout of *LSS* on female mice fertility [J]. Acta Univ Med Anhui, 2022, 57(2): 208-12. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.009.
- [10] 李名聪.羊毛固醇合成酶(*LSS*)基因缺失对 C57 小鼠非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的影响[D].合肥:安徽医科大学,2021. doi: 10.26921/d.cnki.ganyu.2021.001000.
- [10] Li M C. The effect of lanosterol synthase (*LSS*) gene deletion on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in C57 mice [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2021. doi: 10.26921/d.cnki.ganyu.2021.001000.
- [11] Deiana M, Calfapietra S, Incani A, et al. Derangement of intestinal epithelial cell monolayer by dietary cholesterol oxidation products [J]. Free Radic Biol Med, 2017, 113: 539-50. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.390.
- [12] Parini P, Melhuish T A, Wotton D, et al. Overexpression of transforming growth factor β induced factor homeobox 1 represses NPC1L1 and lowers markers of intestinal cholesterol absorption [J]. Atherosclerosis, 2018, 275: 246-55. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.06.867.
- [13] Chang E, Kim L, Choi J M, et al. Ezetimibe stimulates intestinal glucagon-like peptide 1 secretion via the MEK/ERK pathway rather than dipeptidyl peptidase 4 inhibition [J]. Metabolism, 2015,

64(5): 633–41. doi: 10.1016/j.metabol.2015.02.001.

[14] de Vogel-van den Bosch H M, de Wit N J W, Hooiveld G J E J, et al. A cholesterol-free, high-fat diet suppresses gene expression

of cholesterol transporters in murine small intestine [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 294(5): G1171–80. doi: 10.1152/ajpgi.00360.2007.

Effects of LSS function deficiency on intestinal function in NAFLD model mice

Bai Hongmei¹, Yang Zhen¹, Hu Weikang¹, Wang Zihan¹, Zhou Wenjing¹, He Qingya¹, Zhong Jian¹, Li Mingcong², Liu Li³, Zhang Chaoyang³, Zhang Sumei¹, Zhang Shengquan¹

[¹Dept of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, ³Research and Experiment Center, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Pathology, Affiliated Hefei Hospital of Anhui Medical University(The Second People's Hospital of Hefei), Hefei 230011]

Abstract Objective To investigate the effect of loss of function of lanosterol synthase(*LSS*) gene on intestinal function in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease(NAFLD) induced by a high-fat diet. **Methods** *LSS* gene heterozygous knockout C57 mice (*LSS*^{+/-}) were established using the CRISPR/Cas9 system. After being fed a high-fat diet with 60% fat content for 6 months, the fat deposition in liver tissues was detected by HE and Oil red O staining, the morphological changes of small intestine tissue were detected by HE staining. The changes in total cholesterol content in intestinal tissue were detected by kits. The gastrointestinal motility function of mice was detected by phenol red paste. The intestinal permeability was detected by Evans blue staining, and the expression of *LSS*, tight junction protein (Claudin-1, Claudin-5, cluster of differentiation 36 (CD36), and Niemann-Pick type C1-like 1 protein (NPC1L1) proteins in small intestinal tissues were detected by Western blot. **Results** The results of HE and Oil red O staining of liver tissues showed that liver fat deposition in *LSS* gene heterozygous knockout mice was lower than that in wild-type mice in the high-fat diet group. The total cholesterol content in intestinal tissue of *LSS* gene heterozygous knockout mice decreased ($P < 0.01$), but no morphological differences were observed between the two groups of mice by HE staining of intestinal tissues. The gastrointestinal motility function of *LSS* gene heterozygous knockout mice did not show significant changes. The intestinal permeability of *LSS* gene heterozygous knockout mice in the high-fat diet group decreased as detected by Evans blue ($P < 0.05$). The expression levels of Claudin-5 protein in the intestinal tissue of *LSS* gene heterozygous knockout mice in the high-fat diet group increased ($P < 0.05$), while the expression of *LSS* protein in the intestinal tissues of *LSS* heterozygous knockout mice decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** In the NAFLD model induced by a high-fat diet, *LSS* gene heterozygous knockout reduces liver fat deposition induced by a high-fat diet and improves intestinal barrier function by regulating cholesterol metabolism in intestinal tissues and up-regulating the expression of Claudin-5.

Key words lanosterol synthase; cholesterol metabolism; non-alcoholic fatty liver disease; intestinal permeability; tight junction protein; intestinal barrier function

Fund programs Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2022AH050651); Scientific Research Project of Anhui Medical University (No. 2022xkj107); Natural Science Key Project of Bengbu Medical College (No. 2022byzd196)

Corresponding author Zhang Shengquan, E-mail: zhangshengquan@ahmu.edu.cn