

安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: LSS 缺失通过下调 NPC1L1 与激活 CD36/TLR4/JNK 通路改善 MASLD
作者: 王子涵, 白红枚, 何清雅, 周文静, 钟健, 江小丽, 张素梅, 张胜权
收稿日期: 2026-03-02
网络首发日期: 2026-04-24
引用格式: 王子涵, 白红枚, 何清雅, 周文静, 钟健, 江小丽, 张素梅, 张胜权. LSS 缺失通过下调 NPC1L1 与激活 CD36/TLR4/JNK 通路改善 MASLD[J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260423.1747.004>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

LSS 缺失通过下调 NPC1L1 与激活 CD36/TLR4/JNK 通路改善 MASLD

王子涵, 白红枚, 何清雅, 周文静, 钟 健, 江小丽, 张素梅, 张胜权

(安徽医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 合肥 230032)

摘要 目的 探究胆固醇合成关键酶 LSS 肠道缺失是否通过调控肠道胆固醇吸收与免疫应答影响 MASLD 进展。**方法** 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 LSS 杂合敲除 ($LSS^{+/-}$) 小鼠及野生型 (WT) 对照, 分别饲喂高脂饲料 (HFD) 或普通饲料 (CHOW)。通过基因型鉴定验证模型; 采用肝脏 H&E 和油红 O 染色评估脂肪变性; 利用免疫组化检测肠道 NPC1L1 和 CD36 蛋白定位与表达; 通过 Western blot 分析肠道 JNK 磷酸化和 TLR4 蛋白水平; 通过实时荧光定量聚合酶链式反应 (qPCR) 检测 TLR4 和 IL-6 的 mRNA 表达。**结果** $LSS^{+/-}$ 小鼠经基因型鉴定及小肠 LSS 蛋白检测验证成功。肝脏 H&E 及油红 O 染色显示, 与 CHOW 喂养的 WT 小鼠相比, HFD 喂养的 WT 小鼠肝脏脂质空泡显著增多; 而与 HFD 喂养的 WT 小鼠相比, HFD 喂养的 $LSS^{+/-}$ 小鼠肝脏脂质沉积明显减轻, 血清 ALT 水平亦显著降低 ($P < 0.05$)。免疫组化检测显示, 与 WT 小鼠相比, $LSS^{+/-}$ 小鼠小肠绒毛中胆固醇吸收蛋白 NPC1L1 的表达在 CHOW 及 HFD 条件下均下调 (HFD 组 $P < 0.001$); 而脂肪酸转运蛋白 CD36 在 $LSS^{+/-}$ 小鼠小肠中表达上调 (CHOW 组 $P < 0.05$, HFD 组 $P < 0.01$)。Western blot 结果显示, 与 WT 小鼠相比, $LSS^{+/-}$ 小鼠小肠中 TLR4 蛋白表达在 CHOW 及 HFD 条件下均显著升高 (CHOW 组 $P < 0.05$, HFD 组 $P < 0.05$); 在 CHOW 条件下, $LSS^{+/-}$ 小鼠 JNK 磷酸化水平显著升高 ($P < 0.05$); 在 HFD 条件下, 总 JNK 蛋白表达增加, 但磷酸化水平无显著变化。qPCR 检测显示, 与 WT 小鼠相比, $LSS^{+/-}$ 小鼠小肠中 TLR4 mRNA (CHOW 组 $P < 0.01$, HFD 组 $P < 0.0001$) 及 IL-6 mRNA (CHOW 组 $P < 0.001$, HFD 组 $P < 0.01$) 均显著上调。**结论** LSS 缺失通过诱导肠道胆固醇吸收限制、脂肪酸利用促进及免疫通路激活的协同重编程, 抵抗肝脏脂质沉积, 提示肠道 LSS 是 MASLD 的潜在治疗靶点。

关键词 代谢障碍相关脂肪肝病; LSS; 肠-肝轴; 胆固醇吸收; 肠道免疫; 脂肪肝模型

中图分类号 R 34

文献标志码 A

Intestinal LSS deficiency ameliorates MASLD by activating a

2026-03-02 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (编号: 2108085MH266)

作者简介: 王子涵, 男, 硕士研究生;

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

metabolic-immune-dependent gut barrier

Wang Zihan, Bai Hongmei, He Qingya, Zhou Wenjing, Zhong Jian, Jiang Xiaoli, Zhang Sumei,
Zhang Shengquan

(*Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Anhui
Medical University, Hefei 230032*)

Abstract Objective To investigate whether intestinal deficiency of lanosterol synthase (LSS), a key enzyme in cholesterol synthesis, influences the progression of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) by regulating intestinal cholesterol absorption and immune response. **Methods** LSS heterozygous knockout (LSS^{+/-}) mice and wild-type (WT) controls were generated using CRISPR/Cas9 technology and fed either a high-fat diet (HFD) or regular chow (CHOW). The model was validated by genotyping. Hepatic steatosis was assessed by H&E and Oil Red O staining. Immunohistochemistry was used to detect the localization and expression of NPC1L1 and CD36 proteins in the intestine. Western blot analysis was performed to measure JNK phosphorylation and TLR4 protein levels in intestinal tissues. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was employed to examine the mRNA expression of TLR4 and IL-6. **Results** LSS^{+/-} mice were successfully validated by genotyping and reduced intestinal LSS protein expression. H&E and Oil Red O staining of liver sections showed that, compared with WT mice fed a CHOW diet, WT mice fed a HFD exhibited a marked increase in hepatic lipid vacuoles. In contrast, compared with HFD-fed WT mice, HFD-fed LSS^{+/-} mice displayed significantly attenuated hepatic lipid deposition and reduced serum ALT levels ($P < 0.05$). Immunohistochemical analysis revealed that, compared with WT mice, the expression of the cholesterol absorption protein NPC1L1 in the intestinal villi of LSS^{+/-} mice was downregulated under both CHOW and HFD conditions ($P < 0.001$ for HFD group). Conversely, the expression of the fatty acid transporter CD36 was upregulated in the intestines of LSS^{+/-} mice ($P < 0.05$ for CHOW group, $P < 0.01$ for HFD group). Western blot analysis demonstrated that, compared with WT mice, TLR4 protein expression in the intestines of LSS^{+/-} mice significantly increased under both CHOW and HFD conditions ($P < 0.05$ for CHOW group, $P < 0.05$ for HFD group). JNK phosphorylation level was significantly elevated in LSS^{+/-} mice under CHOW condition ($P < 0.05$). Under HFD condition, total JNK protein expression increased, but its phosphorylation level showed no significant change. qPCR analysis showed that, compared with

WT mice, the mRNA levels of TLR4 ($P<0.01$ for CHOW group, $P<0.0001$ for HFD group) and IL-6 ($P<0.001$ for CHOW group, $P<0.01$ for HFD group) were significantly upregulated in the intestines of LSS^{+/-} mice. **Conclusion** LSS deficiency counteracts hepatic lipid deposition by orchestrating a synergistic reprogramming involving restricted intestinal cholesterol absorption, enhanced fatty acid utilization, and activation of immune pathways, suggesting intestinal LSS as a potential therapeutic target of MASLD.

Key words MASLD; LSS; gut-liver axis; cholesterol absorption; gut immunity; fatty liver model

Fund program Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2108085MH266)

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

羊毛甾醇合酶 (lanosterol synthase, LSS) 是内源性胆固醇合成的关键酶之一, 其作用主要是将 (S)-2,3-环氧鲨烯催化转变为羊毛甾醇, 后者是胆固醇合成的关键上游原材料。胆固醇是机体不可或缺的成分, 它不仅作为在细胞膜中提供磷脂双分层的流动性, 还在胆汁酸、类固醇激素以及维生素 D₃ 的合成中发挥重要作用^[1], 而胆固醇的缺失还会引起高免疫球蛋白血症 D 综合症、脱发、智力障碍、畸形等一系列症状^[2-3]。

肠道不仅作为吸收外源性胆固醇和脂肪酸的重要场所, 其肠黏膜还作为免疫屏障抵御外来病原微生物, 此外, 肠道菌群的组成也直接影响着 MASLD 的发生发展^[4]。因此, 肠-肝轴在脂肪肝的研究中广受关注。该研究利用建立 LSS 杂合性敲除的 C57BL/6 小鼠并喂养高脂饲料建立高脂模型, 通过小鼠模型探索 LSS 功能缺失后肠道在外源性胆固醇摄取和肠黏膜免疫屏障的变化, 从而探究对肝脏中脂肪累积的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 周龄 C57BL/6 品系野生型 (Wild-type, WT) 小鼠, 购自安徽省实验动物中心。8 周龄 C57BL/6 品系 LSS 杂合敲除型 (LSS heterozygous knockout, LSS^{+/-}) 小鼠, 购自南京生物医药研究所。实验动物许可证号: SCXK (苏) 2015-0001。所有小鼠均在安徽医科大学实验动物中心 SPF 级环境下饲养 (温度 23 °C ± 2 °C, 湿度 55% ± 5%, 12 h/12 h 明暗周期) 并自由饮水和进食, 小鼠饲养和实验过程严格按照安徽省实验动物中心饲养管理条例, 考虑到雌性小鼠发情周期的影响, 实验鼠均使用雄性 C57BL/6 小鼠。本实验获得安徽医科大学动物伦理委员会批准 (编号: LLSC20221208)。

1.1.2 主要材料

油红 O 染料（北京索莱宝科技有限公司，货号：G1260）；HE 染色试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司，货号：C0105S）；尼曼-匹克 C1 型类似蛋白 1（Niemann-Pick type C1-like 1 protein 1, NPC1L1）抗体（上海赛默飞世尔公司，货号：PA1-16800）；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）；Beta-Actin 抗体[赛信通（上海）生物试剂有限公司，货号：#4970]；（磷酸化）c-Jun 氨基蛋白激酶 c-Jun 氨基蛋白激酶[（Phospho-）c-Jun N-terminal kinase,（p-）JNK]抗体（江苏亲科生物研究中心有限公司，货号：#AF6318、#AF3318）；Toll 样受体 4（Toll-like receptor 4, TLR4）抗体（江苏亲科生物研究中心有限公司，货号：#AF7017）；蛋白 Marker[生工生物工程（上海）股份有限公司货号：C520010]；RIPA 裂解液（上海碧云天生物技术股份有限公司，货号：P0013B）；SYBR Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit（艾科瑞生物工程有限公司，货号：AG11701）。

1.1.3 主要仪器

酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司，型号：A51119700DPC)；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）；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：80-i)。

1.2 方法

1.2.1 C57BL/6 小鼠高脂模型的构建

各选 20 只 SPF 级的雄性 8 周龄野生型 C57BL/6 小鼠与 20 只 SPF 级的雄性 8 周龄 LSS 杂合敲除小鼠，体质量(24±2) g，随机分为正常饮食组（chow, CHOW）和高脂饮食组（High fat diet, HFD）共 4 组，即正常饮食喂养的野生型小鼠（chow-fed wild-type mice, CHOW-WT），正常饮食喂养的 LSS^{+/-}型小鼠（chow-fed LSS^{+/-} mice, CHOW- LSS^{+/-}），高脂饮食喂养的野生型小鼠（high fat diet-fed wild-type mice, HFD-WT），高脂饮食喂养的 LSS^{+/-}型小鼠（high fat diet-fed LSS^{+/-} mice, HFD- LSS^{+/-}），每组各 10 只，并连续喂养 28 周。

1.2.2 肝组织 H/E 染色

脱蜡：将肝脏组织石蜡包埋并切片好的样本在二甲苯脱蜡 2 次，每次 10 min；水化：将切片按顺序放入 100%、95%、85%、75%乙醇中各 5 min；蒸馏水浸洗 5 min；将切片放于苏木精染液 2 min 并用蒸馏水浸洗 5 min，然后水洗 8 min 反蓝；放入伊红染色液 3 s 并立即用流水洗；干燥切片后用中性树脂封片；正置显微镜观察切片结果并保存。

1.2.3 肝组织油红 O 染色

组织油红 O 染色：冷冻切片复温 20 min，水汽晾干。蒸馏水浸洗 2 s，洗掉包埋剂。浸没于 60% 异丙醇同化 2 s；油红染色 10~15 min，60% 异丙醇分化 2 s，蒸馏水漂洗 1~5 s；苏木精复染 1 min 并温水洗 10 min 反蓝；蒸馏水洗 2 s 后用水性封片剂封片；镜下观察并拍照；细胞油红 O 染色：首先将细胞爬片用 PBS 洗 3 次并加入 4% 多聚甲醛固定 1 h，用 PBS 洗 2 次每次 1 min，60% 异丙醇同化 3~5 min，弃去 60% 异丙醇加入油红工作液 10~15 min，PBS 洗 2 次，苏木精复染 30 s 并用 PBS 洗去，封片镜检拍照。

1.2.4 小肠组织免疫组化

脱蜡：将肝脏组织石蜡包埋并切片好的样本在二甲苯脱蜡 2 次，每次 10 min；水化：将切片按顺序放入 100%、95%、85%、75% 乙醇中各 5 min；蒸馏水浸洗 5 min；抗原修复：使用枸橼酸钠抗原修复液微波加热 10~15 min，冷却至室温。滴加内源性过氧化物酶阻断液，室温孵育 10 min，PBS 缓冲液清洗 3 次，每次 5 min。封闭：滴加封闭血清，37 °C 孵育 30 min，甩去多余血清；一抗孵育：滴加稀释后的一抗，4 °C 过夜孵育或 37 °C 湿盒孵育 2 h，PBS 缓冲液清洗 3 次，每次 5 min。二抗孵育：滴加 HRP 标记的二抗，37 °C 孵育 30 min，PBS 缓冲液清洗 3 次，每次 5 min；显色：配置 DAB 显色液（1 mL B 液 + 1 滴 A 液），滴加至组织上；复染：滴加苏木精染色 30 s，蒸馏水清洗，返蓝液浸泡 1 min，水洗后烘干；脱水透明封片：用中性树胶封片，显微镜下观察并拍照。

1.2.5 小肠组织 Western blot 分析

称取各组小鼠小肠放入管中，并按照每 20 mg 加入 200 μ L 的比例 RIPA 裂解液并在 4 °C 中充分研磨裂解。然后 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min，取上清液。通过 BCA 法测量样品蛋白浓度并调整至统一浓度，然后加入 5 \times 蛋白上样缓冲液并放入沸水 10 min 使蛋白变性。将样品蛋白加入 12% 交联度的 SDS-PAGE 胶的孔道中电泳，利用湿转法将胶中分离的蛋白转印到 PVDF 膜上。依次使用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h；TBST 清洗 3 次，每次 10 min；加入一抗，4 °C 孵育过夜；TBST 清洗 3 次，每次 10 min；加入二抗，室温孵育 2 h；TBST 清洗 3 次，每次 10 min，最后使用 HRP 底物化学发光液在 Western blot 显影机中显影拍照，通过 ImageJ 软件将结果数据化并使用 GraphPad 软件分析数据。

1.2.6 小肠组织实时荧光定量聚合酶链式反应（Real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR）分析

将小鼠小肠通过氯仿-苯酚法提取 RNA 并反转录成同等浓度的 cDNA，然后将等量的 cDNA 加入 SYBR Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit 中，并加入对应引物。实验操作严格遵

循试剂盒说明书进行。引物序列如下：白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、Toll 样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)、 β -肌动蛋白 (Beta-actin, β -ACTIN)。

表 1 qPCR 引物序列

Tab.1 qPCR primer sequences

Gene	Primer Sequence (5'—3')
IL-1 β	F: CCACCTTTTGACAGTGATGA
	R: TAGTGCAGTTGTCTAATGGG
IL-6	F: AGGATACCACTCCCAACAGACCT
	R: CAAGTGCATCATCGTTGTTTCATAC
TNF- α	F: CATCTCCCTCCAGAAAAGAC
	R: ACTTGGTGGTTTGTGAGTGT
TLR4	F: GATCAGAAACTCAGCAAAGTC
	R: AGTTTGAGAGGTGGTGTAAG
β -ACTIN	F: CCAGCCTTCCTTCTTGGGTAT
	R: GGGTGTAACGCAGCTCAG

1.3 统计学处理

使用 GraphPad Prism 9.0 对实验数据进行统计学分析和数据处理。实验结果均重复 3 次，实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ ，两组之间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因型鉴定及其小肠 LSS 蛋白水平检测 使用基因型鉴定试剂盒提取小鼠尾部 DNA 并采用 PCR 技术扩增 LSS 基因，通过成像技术可以看出对应的基因型。结果显示 (图 1A)，部分老鼠由于 LSS 的杂合敲除导致出现两条大小不一的 DNA 链，证明小鼠 LSS 杂合敲除成功。此外，通过 Western blot 检测小肠 LSS 表达情况，可以看到 (图 1B)，与 WT 小鼠相比，普通饲料与高脂喂养的 LSS^{+/-}小鼠，其 LSS 表达量较于 WT 明显下调 ($t_{CHOW}=3.758$, $P=0.0198$; $t_{HFD}=3.986$, $P=0.0163$)。

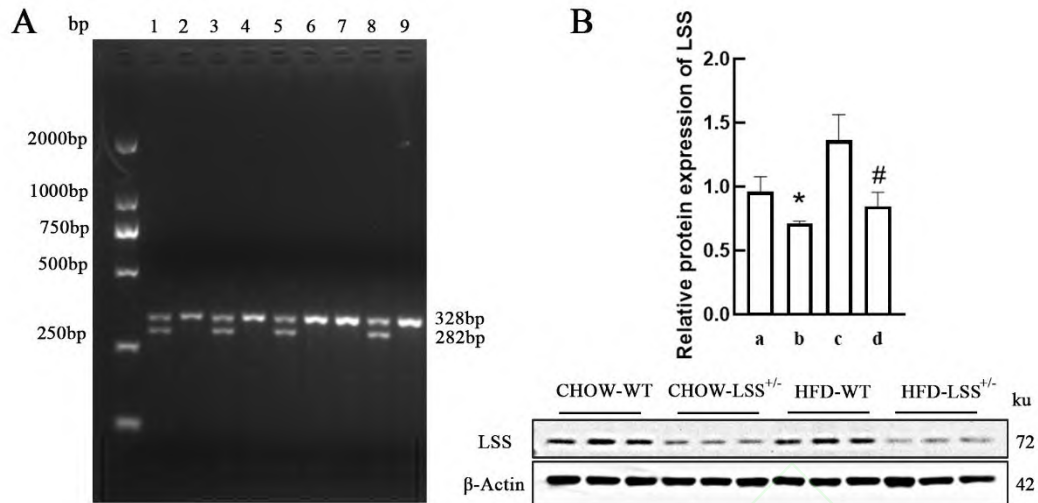


图1 小鼠基因型及其肠道表达量的验证

Fig.1 Validation of mouse genotypes and their intestinal expression levels

注：A: Mouse Genotype Identification Results (M:DNA marker; 1,3,5,8:LSS^{+/-}-type mice; 2,4,6,7,9: wild-type mice); B: The expression levels of LSS protein in the intestines of mice in the four groups; a: CHOW-WT group; b: CHOW-LSS^{+/-} group; c: HFD-WT group; d: HFD-LSS^{+/-} group; **P*<0.05 vs CHOW-WT group; #*P*<0.05 vs HFD-WT group.

2.2 高脂模型肝脏组织的H&E染色和油红染色

使用HE染色和油红O染色观察高脂模型小鼠的造模情况,结果显示(图2A),在CHOW饮食的2组小鼠中,LSS^{+/-}组肝脏的HE染色结果没有明显的脂质空泡,而与CHOW-LSS^{+/-}相比,CHOW-WT组的肝脏的脂质空泡明显增多,油红O染色无明显差异。在HFD饮食的两组小鼠中,HFD-WT脂质空泡较CHOW饲养的WT更严重,而HF-LSS^{+/-}肝脏有明显缓解,并且从油红O染色结果可以看到,HFD-LSS^{+/-}肝脏的脂质沉积有所改善。此外,通过血清中丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferase, ALT)含量变化可以看到,高脂饲料喂养的小鼠肝脏有不同程度的肝损伤,而HF-LSS^{+/-}肝脏有明显缓解($t=3.026, P=0.0376$),这与病理结果相一致(图2B)。提示高脂模型造模成功且LSS的杂合性敲除可以改善肝脏的脂质沉积和肝损伤。

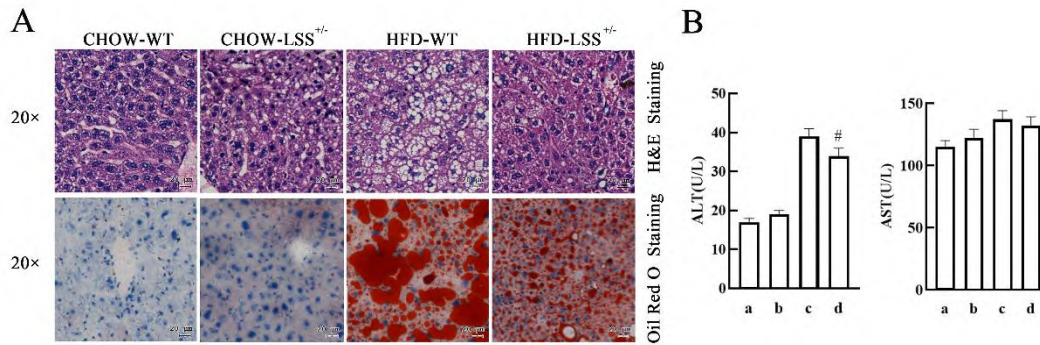


图2 模型小鼠的肝脏染色及其血液指标

Fig.2 Liver staining and its blood indices in model mice

注：A: HE-stained and Oil Red O-stained mouse liver sections $\times 20$; B: The levels of ALT and Aspartate aminotransferase (AST) in the blood of mice in the four groups; a: CHOW-WT group; b: CHOW-LSS^{+/-} group; c: HFD-WT group; d: HFD-LSS^{+/-} group; [#] $P < 0.05$ vs HFD-WT group.

2.3 LSS^{+/-}对小鼠肠绒毛中NPC1L1蛋白表达的影响 NPC1L1是一种跨膜蛋白，它作为甾醇转运蛋白，在肠道中主要负责胆固醇的吸收及维持肠-肝轴的胆固醇水平。通过免疫组化检测四组小鼠肠绒毛中NPC1L1的表达量情况，结果显示，在CHOW组和HFD组中LSS^{+/-}小鼠与相应组WT小鼠比较下，LSS^{+/-}小鼠肠绒毛中NPC1L1的表达均下调，且在HFD饮食下更为显著 ($t=11.12, P < 0.0004$)。结果说明LSS的敲低可以通过下调NPC1L1蛋白的表达，来降低肠道对胆固醇的吸收。见图3。

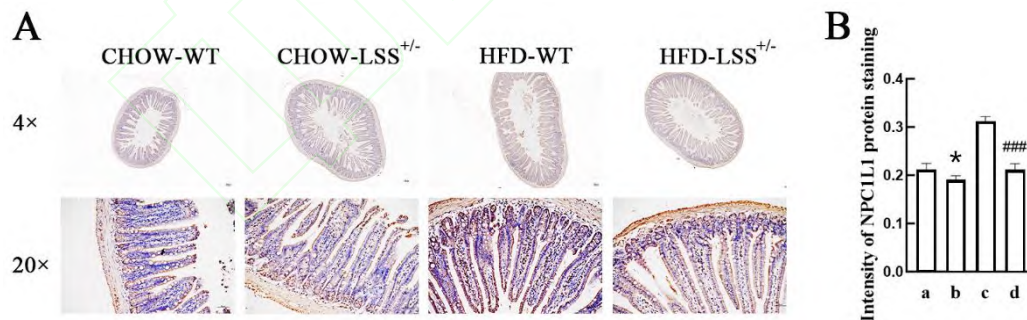


图3 小鼠肠道中NPC1L1的免疫组化结果

Fig.3 Immunohistochemical results showing NPC1L1 expression in mouse intestine

注：A: The first row showed a $4\times$ field of view of mouse intestine. The second row showed a field of view of mouse intestine $\times 20$; B: Intestinal NPC1L1 protein expression analyzed by immunohistochemistry; a: CHOW-WT group; b: CHOW-LSS^{+/-} group; c: HFD-WT group; d: HFD-LSS^{+/-} group; ^{*} $P < 0.05$ vs CHOW-WT group; ^{###} $P < 0.001$ vs HFD-WT group.

2.4 LSS^{+/-}对小鼠肠绒毛中 CD36 蛋白表达的影响 CD36 作为脂肪酸转运蛋白，在小肠摄取长链游离脂肪酸中发挥重要的作用。此外，CD36 除了维持小肠脂肪酸的平衡外，它还是 TLR4 的辅助受体并调节肠道的炎症反应。通过免疫组化发现（图 4A），WT 小鼠较 LSS^{+/-} 小鼠肠道的 CD36 均有明显的上调（ $t_{\text{CHOW}}=3.788, P=0.0193$; $t_{\text{HFD}}=5.075, P=0.0071$ ），本实验结果表明，这种上调主要参与了肠道的免疫反应。

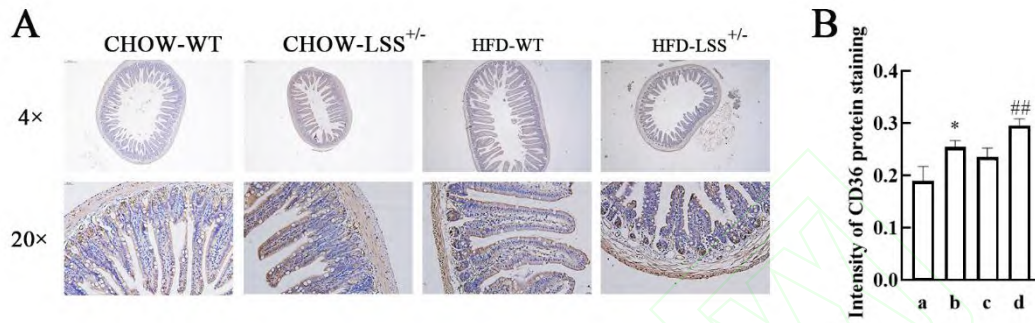


图 4 小鼠肠道中 CD36 的免疫组化结果

Fig.4 Immunohistochemical results showing CD36 expression in mouse intestine

注：A: The first row showed a 4× field of view of mouse intestine. The second row showed a 20× field of view of mouse intestine. B: Intestinal CD36 protein expression analyzed by immunohistochemistry; a: CHOW-WT group; b: CHOW-LSS^{+/-} group; c: HFD-WT group; d: HFD-LSS^{+/-} group; * $P<0.05$ vs CHOW-WT group; ## $P<0.01$ vs HFD-WT group.

2.5 LSS^{+/-}通过 TLR4/JNK 通路激活小鼠肠道免疫屏障 为探究 LSS 功能缺失是否影响肠道免疫炎症反应，通过 Western blot 观察 TLR4/JNK 通路表达情况，结果显示（图 5A），与 WT 小鼠相比，TLR4 在 LSS^{+/-} 小鼠肠道组织中表达显著上调（ $t_{\text{CHOW}}=2.829, P=0.0474$; $t_{\text{HFD}}=2.849, P=0.0465$ ）（图 5B）。在 CHOW 喂养条件下，LSS^{+/-} 可明显促进 JNK 的磷酸化水平升高（ $t=3.037, P=0.0385$ ）（图 5B）；而在 HFD 喂养条件下，LSS^{+/-} 小鼠肠道中总 JNK 蛋白表达明显增加，但磷酸化 JNK（p-JNK）水平未呈现统计学上的显著变化，提示在高脂代谢压力下，LSS^{+/-} 可能主要通过调控 JNK 的总蛋白表达而非其磷酸化状态来影响下游信号。进一步通过 qPCR 检测发现（图 5C），与 WT 小鼠相比，炎症因子 IL-6 的 mRNA 水平在 LSS^{+/-} 小鼠肠道中显著上调（ $t_{\text{CHOW}}=12.82, P=0.0002$; $t_{\text{HFD}}=6.004, P=0.0039$ ），且 TLR4 的 mRNA 水平与蛋白水平趋势一致（ $t_{\text{CHOW}}=5.864, P=0.0042$; $t_{\text{HFD}}=20.48, P<0.0001$ ）。综合上述结果，我们认为 LSS^{+/-} 可通过 TLR4 依赖的途径调控 JNK 表达与活化，进而促进 IL-6 的上调，从而参与肠道免疫屏障的调节。在高脂饮食模型中，LSS^{+/-} 对 JNK 的调控可能更倾向于蛋白积累而非磷酸化激活，这反映了在不同代谢状态下该通路调控机制的差异性。

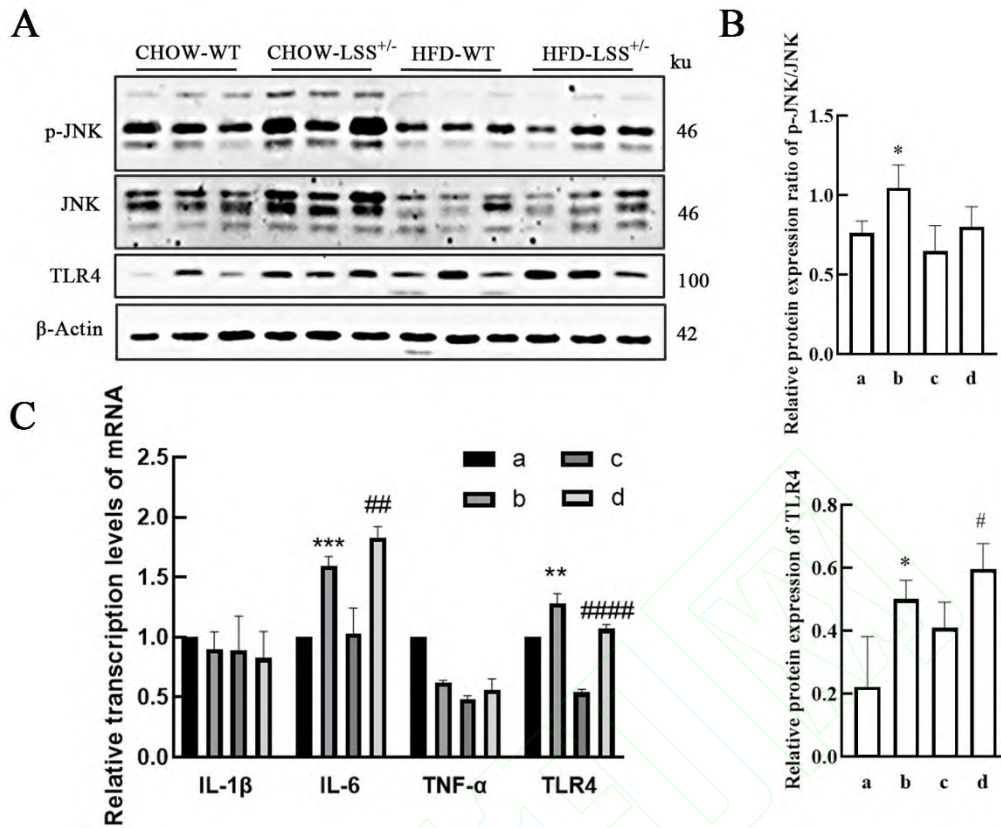


图5 小鼠肠道中炎症反应相关蛋白及 mRNA 水平情况

Fig.5 Inflammation-related proteins and their mRNA levels in mouse intestine

注：A: Protein expression of β-Actin, JNK, p-JNK, and TLR4 in mouse intestine; B: The expression levels of p-JNK/JNK and TLR4 proteins in the intestines of mice in the four groups; C: Intestinal mRNA expression levels of IL-1β, IL-6, TNF-α, and TLR4 in mice; a: CHOW-WT group; b: CHOW-LSS^{+/-} group; c: HFD-WT group; d: HFD- LSS^{+/-} group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs CHOW-wt group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, #### $P < 0.0001$ vs HFD-WT group.

3 讨论

MASLD已成为最常见的慢性肝病，研究表明^[5]，该疾病的全球患病率为 25%，是发生肝硬化和肝细胞癌的主要原因。此外，MASLD作为一种多系统疾病，也影响肝外器官和调节途径，例如增加 2 型糖尿病、心血管、心脏病和慢性肾脏疾病的风险^[6]。

LSS作为胆固醇内源性合成的关键酶，已经作为MASLD的治疗方向开始研究。在前期研究结果中发现，LSS的杂合性敲除可以直接通过内质网应激相关蛋白的表达变化来缓解非酒精性脂肪肝疾病^[7]。本研究是通过小鼠肠道LSS杂合敲除后通过肠-肝轴来缓解小鼠MASLD。研究显示，高脂饲料喂养后的LSS^{+/-}小鼠肠绒毛的NPC1L1 蛋白的表达明显下调。NPC1

L1 作为肠道胆固醇吸收的关键转运蛋白，在肠道吸收的胆固醇稳态中发挥重要作用^[8]，因此，LSS^{+/-}能够通过调节NPC1L1 的表达，从而减少胆固醇的吸收。与此同时，CD36 作为外源长链脂肪酸受体，在肠道的长链脂肪酸摄取扮演着重要角色^[9]。在研究中发现，LSS^{+/-}能够上调CD36 的蛋白表达，而CD36 除了外源性长链脂肪酸摄取外，它还在肠道的免疫屏障中起到关键作用。研究发现，CD36 不但能够作为免疫细胞的模式识别受体，还能够识别内源性的不同胚体，如ox-LDL等^[10]，这种多种识别的受体在免疫功能中能够调节不同的炎症反应。

TLR4 是一种膜蛋白，能够识别革兰阴性菌的脂多糖，并激活下游信号通路，从而引发免疫应答，TLR4 是肠道屏障功能的重要调节因子，其表达水平和功能状态直接影响肠道屏障的稳定性和微生物群的平衡^[11-12]。JNK信号通路是MAPK通路中一个重要的分支，在各种炎症性疾病中起到重要作用，有研究发现，JNK信号通路被激活后会入核形成AP-1，后者能够激发IL-6 等炎症因子^[13]。而在肠炎性疾病模型中，通过使用JNK抑制剂阻断JNK信号通路能够很好地缓解肠道炎症^[14]。本研究表明，在 LSS^{+/-}小鼠肠道中，TLR4 的mRNA和蛋白水平均显著上调。进一步分析显示，JNK的应答模式在高脂饮食与普通饲料喂养条件下有所不同：在普通饲料组中，LSS^{+/-}主要促进 JNK的磷酸化激活；而在高脂饮食组中，则主要表现为总JNK蛋白表达的升高，其磷酸化水平未见显著变化，提示在高脂代谢背景下LSS^{+/-}可能通过累积JNK蛋白而非增强其磷酸化来参与信号调控。上述差异反映了不同营养代谢状态下TLR4/JNK通路调控机制的适应性变化。最终，两种条件下均共同导致下游炎症因子IL-6 的mRNA水平显著上升，说明LSS^{+/-}可通过TLR4 依赖的途径激活JNK信号，进而上调IL-6，参与肠道免疫屏障的调节。

综上所述，LSS^{+/-}能够缓解在肝脏中的脂质沉积以及肝损伤，这种机制不仅限于在肝脏中的直接作用，还能通过肠-肝轴的胆固醇稳态以及肠道免疫屏障发挥作用。这种机制一方面表现为LSS^{+/-}作用NPC1L1 蛋白质水平的下调，另一方面，CD36 与TLR4 的相互作用使得JNK信号通路被打开，c-Jun作为AP-1 转录复合物的一种^[15]，能够激活IL-6 炎症因子，从而打开肠道免疫功能，改善肠道菌群，缓解MASLD的发生发展。

参考文献

- [1] Li X, Li M. Unlocking cholesterol metabolism in metabolic-associated steatotic liver disease: molecular targets and natural product interventions[J]. *Pharmaceuticals*, 2024, 17(8): 1073. doi:10.3390/ph17081073.
- [2] 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.

[3] Jira P. Cholesterol metabolism deficiency[M]//*Pediatric Neurology Part III*. Amsterdam: Elsevier, 2013: 1845-50. doi:10.1016/b978-0-444-59565-2.00054-x.

[4] Miura K. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(23): 7381. doi:10.3748/wjg.v20.i23.7381.

[5] Powell E E, Wong V W, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Lancet*, 2021, 397(10290): 2212-24. doi:10.1016/S0140-6736(20)32511-3.

[6] Byrne C D, Targher G. NAFLD: a multisystem disease[J]. *J Hepatol*, 2015, 62(1): S47-64. doi:10.1016/j.jhep.2014.12.012.

[7] 孙晓梅. 羊毛固醇合成酶(LSS)功能缺失对MCD诱导的C57 小鼠非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)的保护作用及其分子机制的研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2022.

Sun X M. The protective effect of loss of lanosterol synthase (LSS) function on MCD-induced nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in C57 mice mice and its molecular mechanism[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2022.

[8] Hu M, Yang F, Huang Y, et al. Structural insights into the mechanism of human NPC1L1-mediated cholesterol uptake[J]. *Sci Adv*, 2021, 7(29): eabg3188. doi:10.1126/sciadv.abg3188.

[9] Jay A G, Hamilton J A. The enigmatic membrane fatty acid transporter CD36: new insights into fatty acid binding and their effects on uptake of oxidized LDL[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*, 2018, 138: 64-70. doi:10.1016/j.plefa.2016.05.005.

[10] 杨晓茹, 陈宇浩, 郝慧芳. CD36 在炎症反应和脂质代谢中的作用[J]. *生命科学*, 2019, 31(11): 1192-9. doi:10.13376/j.cbbs/2019147.

Yang X R, Chen Y H, Hao H F. The role of CD36 in inflammatory response and lipid metabolism[J]. *Chin Bull Life Sci*, 2019, 31(11): 1192-9. doi:10.13376/j.cbbs/2019147.

[11] Liu Y, Yang M, Tang L, et al. TLR4 regulates ROR γ t⁺ regulatory T-cell responses and susceptibility to colon inflammation through interaction with *Akkermansia muciniphila*[J]. *Microbiome*, 2022, 10: 98. doi:10.1186/s40168-022-01296-x.

[12] Barr T, Brown S, Ryan G, et al. TLR-mediated stimulation of APC: distinct cytokine

responses of B cells and dendritic cells[J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37(11): 3040-53. doi:10.1002/eji.200636483.

[13] Ung T T, Nguyen T T, Lian S, et al. Nicotine stimulates IL-6 expression by activating the AP-1 and STAT-3 pathways in human endothelial EA.hy926 cells[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 5531-41. doi:10.1002/jcb.27837.

[14] Roy P K, Rashid F, Bragg J, et al. Role of the JNK signal transduction pathway in inflammatory bowel disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(2): 200. doi:10.3748/wjg.14.200.

[15] Dunn C, Wiltshire C, MacLaren A, et al. Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling *via* the c-Jun transcription factor[J]. *Cell Signal*, 2002, 14(7): 585-93. doi:10.1016/S0898-6568(01)00275-3.