

米传靓,付彬,李思迪,等. Adra1a 调节 LPS 诱导的 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞炎症反应 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 84-91.
Mi CL, Fu B, Li SD, et al. Adra1a regulates LPS-induced inflammation in primary hepatocytes of *Lbp*^{-/-} mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 84-91.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.009

Adra1a 调节 LPS 诱导的 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞炎症反应

米传靓¹, 付彬^{1*}, 李思迪^{1,2}, 陈志达¹, 郭中坤¹, 王可洲^{1*}

(1. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)实验动物学院(省实验动物中心), 济南 250117;
2. 济南朋悦实验动物繁育有限公司, 济南 250000)

【摘要】目的 探究 Adra1a 调节 LPS 诱导的 LBP 敲除小鼠(*Lbp*^{-/-})原代肝细胞炎症反应。方法 利用二步灌注法提取 WT 型、*Lbp*^{-/-} 型小鼠原代肝细胞, 构建由 LPS 诱发的原代肝细胞原发炎症模型; 采用加入抑制剂哌唑嗪、转染 siRNA 来下调 LBP 敲除小鼠原代肝细胞 Adra1a 的表达; 抑制剂法将原代肝细胞分为 3 组分别是对照组 A、LPS 组 A、抑制剂哌唑嗪组, 转染 siRNA 主要是对原代肝细胞进行分组, 包括对照组 B、LPS 组 B、si-NC 组、si-Adra1a 组; 将 WT 型小鼠的原代肝细胞分为两组分别为对照组(空白对照)、LPS 组(LPS 刺激 12 h)。本研究以 WT 型、*Lbp*^{-/-} 型小鼠原代肝细胞为研究对象利用 Western blot 方法验证 Adra1a 在 LPS 刺激下的变化情况, 采用 CCK-8、qRT-PCR、Western blot 等实验方法验证哌唑嗪及 si-Adra1a 对 *Lbp*^{-/-} 小鼠的原代肝细胞的炎症及存活率的改善情况。结果 在 LPS 刺激下 *Lbp*^{-/-} 小鼠的原代肝细胞 Adra1a 蛋白表达显著升高($P<0.01$), 而野生型没有显著变化; 抑制剂哌唑嗪组及干扰组的细胞存活率显著升高($P<0.01$, $P<0.05$); 抑制剂哌唑嗪组及 si-Adra1a 组的 TNF- α 、IL-1 β 炎症因子表达情况显著降低($P<0.01$), 与细胞损伤及炎症相关的蛋白 p-p38、p-ERK、p-JNK 的表达量也显著降低($P<0.01$)。结论 LPS 刺激 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞后 Adra1a 表达上调、炎症信号因子上调, 使用哌唑嗪与 si-Adra1a 特异性降低 Adra1a 表达后使 LPS 相关的 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞炎症因子明显下降, 可验证敲除 LBP 导致 Adra1a 在 LPS 诱导的炎症调节中参与反应。

【关键词】肾上腺素受体 α 1A 型受体; *Lbp*^{-/-} 小鼠; 原代肝细胞; 哌唑嗪; 干扰 RNA; MAPK 信号通路

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856 (2024) 05-0084-08

Adra1a regulates LPS-induced inflammation in primary hepatocytes of *Lbp*^{-/-} mice

MI Chuanliang¹, FU Bin^{1*}, LI Sidi^{1,2}, CHEN Zhida¹, GUO Zhongkun¹, WANG Kezhou^{1*}

(1. School of Laboratory Animal & Shandong Laboratory Animal Center, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250117, China. 2. Jinan Pengyue Experimental Animal Breeding Co., Ltd, Jinan 250000)

[基金项目] 山东省医学科学院医药卫生科技创新工程; 济南市科技局“高校 20 条”(2021GXRC011); 山东省医药卫生科技发展计划(2019WS177); 山东省生猪产业技术体系(SDAIT-08-17)。

[作者简介] 米传靓(2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 免疫药理学。E-mail: 2085411485@qq.com

[通信作者] 王可洲(1974—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 药理毒理学研究。E-mail: wangkezhou_cn@163.com

付彬(1991—), 男, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 基因工程模式动物研究。E-mail: fubin@sdfmu.edu.cn

* 共同通信作者

[Abstract] Objective To explore the role of *Adra1a* in regulating the LPS-induced inflammation response in primary hepatocytes of lipopolysaccharide-binding protein knockout (*Lbp*^{-/-}) mice. **Methods** Primary hepatocytes were extracted from WT and *Lbp*^{-/-} mice using a two-step perfusion method, and an inflammation model was established using LPS induction. Expression of *Adra1a* in primary hepatocytes of *Lbp*^{-/-} mice was suppressed by administering the inhibitor prazosin and transfection with si-*Adra1a*. The cells were divided into three groups under inhibitor conditions: control group A, LPS group A, and prazosin group. For siRNA transfection, cells were also divided into groups: control group B, LPS group B, si-NC group, and si-*Adra1a* group. WT primary hepatocytes were divided into two groups: control group (blank) and LPS group (12 h stimulation). Changes in the *Adra1a* response to LPS stimulation were verified by Western blot. Other method ologies, such as CCK-8, qRT-PCR, and Western blot assays, were used to confirm improvements in cell inflammation and the survival rate by prazosin and si-*Adra1a*. **Results** Significant elevation in *Adra1a* protein expression in *Lbp*^{-/-} primary hepatocytes was observed post-LPS stimulation ($P<0.01$), whereas no notable change was found in the wildtype. A remarkable increase in the cell survival rate was noted in prazosin and si-*Adra1a* groups ($P<0.01$, $P<0.05$). Furthermore, prazosin and si-*Adra1a* groups exhibited significantly reduced expression of proinflammatory factors TNF- α and IL-1 β ($P<0.01$), p-p38, p-ERK, and p-JNK ($P<0.01$), which are associated with cell damage and inflammation. **Conclusions** Following LPS stimulation, upregulation of *Adra1a* and proinflammatory cytokine expression was observed in *Lbp*^{-/-} primary hepatocytes. Specific downregulation of *Adra1a* expression using prazosin and si-*Adra1a* significantly decreased LPS-induced proinflammatory cytokines in *Lbp*^{-/-} primary hepatocytes. *Adra1a* is implicated in the regulation of the LPS-induced inflammation response in primary hepatocytes of *Lbp*^{-/-} mice.

[Keywords] *Adra1a*; *Lbp*^{-/-} mice; primary hepatocytes; prazosin; RNAi; MAPK signaling pathway

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性菌外膜的主要脂质成份^[1], 而脂多糖结合蛋白 (lipopolysaccharide-binding protein, LBP) 是在肝细胞中生成的 58 kDa 的糖基化蛋白, 其释放在急性期刺激状态下^[2]。当 LPS 进入宿主后, 首先被 LBP 识别生成复合物 LBP-LPS^[3], 复合物将 LPS 传递给 CD14, 接下来与细胞表面 Toll 样受体、骨髓分化因子 2 (myeloid differentiation protein-2, MD2) 结合^[4], 将信号传导至细胞内。有研究证明 LBP 的敲除可以有效改善由 LPS 刺激引起的肝细胞的损伤, 降低炎症因子的表达^[5]。先前研究表明, 在 *Lbp*^{-/-} 小鼠注射 LPS 后其肝的炎症在得到有效缓解的同时其炎症反应却出现了明显的迟缓现象^[6], 而后以 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞为研究对象时验证了血管紧张素 II 受体 1a 型 (Agtr1a angiotensin II receptor, type 1a, Agtr1a) 参与了 LPS 诱导的炎症传递, 使用抑制剂或 si-Agtr1a 特异性降低 Agtr1a 的表达时并未完全阻断 LPS 诱导的炎症反应, 其炎症及损伤的降低程度还有待提高^[7], 因此我们推测 LPS 刺激信号在 *Lbp*^{-/-} 敲除后还存在其它传递途径。由此, 本研究旨在寻 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞中其他 LPS 信号传导途径, 希望能为临床上治疗革兰氏阴性菌引发的机体严重免疫损伤提供一定参考。

肾上腺素受体 α 1A 型受体 (adrenoceptor alpha

1A, *Adra1a*) 为其中一种 G 蛋白偶联受体, 被激活后和 Gq 蛋白发生偶联反应, 随后引起下游相关细胞反应^[8]。 α 1A 肾上腺素受体被活化以后能够将细胞与组织里面的丝裂原活化蛋白 (mitogen activated protein kinases, MAPK) 激酶途径激活, 同时对细胞生长起到调节作用^[9], MAPK 信号家族的 C-Jun N-末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK)、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 与 p38 丝裂原活化蛋白 (p38 MAP kinase, p38MAPK) 激酶通路, 对细胞的重要信号, 如炎症、氧化应激、增殖和衰亡等均存在介导作用^[10], 有科学研究证实在动物实验中, α 1 肾上腺素受体的抑制剂哌唑嗪具有抑制肝纤维化、细胞外基质沉积、保护肝细胞功能作用^[11]。Si-*Adra1a* 作为干扰 RNA 是通过特定靶点来降低基因的表达, 起到抑制作用。因此本文通过抑制剂哌唑嗪法, si-RNA 法特异性降低 *Adra1a* 表达, 缓解了由 LPS 导致的 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞炎症反应。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选购置自济南朋悦实验动物繁育有限公司的 10 只等级为 SPF 的 *Lbp*^{-/-} 雌性 6 周龄体重为 20~22 g 的小鼠, 5 只等级为 SPF 的 C57BL/6J 雌性 6 周龄

体重为 20~22 g 的小鼠[SCXK(鲁)2019-0003],实验用鼠均在山东省实验动物中心,光照/黑暗循环 12 h/12 h、温度(22~25 ℃)、湿度(55%~60%)的标准条件下饲养[SYXK(鲁)2019-0007],此次研究在山东省实验动物中心伦理审批通过情况下进行(SYDW20220403-1),实验小鼠根据 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

LPS(美国 Sigma-Aldrich 公司, L5418); 干扰 RNA(于北京擎科生物公司合成); 哌唑嗪(美国 Selleck 公司, S1424); 逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司, RR047A); RNA 提取试剂盒(美国 Omega 公司, R6934-02); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海生工生物工程有限公司, C503041); LipofectamineTM RNAiMAX 转染试剂(美国 Invitrogen 公司, 13778-150); β -肌动蛋白(β -actin)、ERK1/2、p-ERK、p38、p-p38、Adra1a、山羊抗兔二抗(中国 Cohension 公司, CPA9100、CPA1944、CPA4924、CPA7126、CPA5055、CPA7096、CSA1036); JNK、p-JNK(美国 CST 公司, #9252、#9251)。

高通量三通道读板仪(美国 SpectraMax 公司, 型号:i3x); 倒置显微镜(德国 ZEISS 公司, 型号:382011386); 超高灵敏度化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司, 型号:BR17952); 细胞培养箱(德国 Thermo 公司, 型号:i160); LightCycle 480 II 实时荧光定量 PCR 仪(德国 Thermo 公司, 型号:Light Cycle 480 II); 蛋白电泳印迹系统(美国 Bio-Rad 公司, 型号:Mini protean)。

1.3 实验方法

1.3.1 二步灌流法分离培养小鼠原代肝细胞及细胞分组

对小鼠实施麻醉后,使用 75%乙醇浸泡身体消毒并在操作台上固定,将腹腔打开,将留置针插入下腔静脉,将 15 mL 无钙灌流液以 20 mL/min 速度灌注小鼠体内,之后使用 0.5 g/L 的含钙胶原酶 IV 灌流液 II,当肝柔软塌陷、压力之处留痕则停止消化结束。分离肝并放入培养皿中用 PBS 清洗干净,加入 15 mL 新鲜 HDMEM 完全培养基,用镊子小心撕裂肝包膜,肝细胞自然流出形成肝细胞混悬液,用 200 目细胞网筛滤过,收集滤液。用 4 ℃ 50 r/min 转速离心肝细胞混悬液 3 min,弃上清,重复 3 次,随后用 40% percoll 进行密度梯度离心,4 ℃ 550 r/min 离心 10 min 以提高细胞活率,弃掉上清,加入

新鲜细胞培养基混匀,台盼蓝染色活细胞数,确定细胞存活率大于 80%后,进行后续实验。利用哌唑嗪法将细胞分为对照组 A(空白对照)、LPS 组 A(LPS 刺激 12 h)、哌唑嗪组(哌唑嗪干预 1 h 后加入 LPS 刺激 12 h),转染 siRNA 法将细胞分组,包括对照组 B(空白对照)、si-NC 组(si-NC 干扰 12 h 后再加入 LPS 刺激 12 h)、LPS 组 B(LPS 刺激 12 h)、si-Adra1a 组(si-Adra1a 干扰 12 h 后再加入 LPS 刺激 12 h);WT 型小鼠原代肝细胞则分为两组分别为对照组(空白对照)、LPS 组(LPS 刺激 12 h),分组方法参考文献^[7]。

1.3.2 LPS 刺激构建炎症模型

对小鼠原代肝细胞的各 LPS 组、哌唑嗪组、si-NC 组、si-Adra1a 组中加入 LPS 使其终浓度为 10 μ g/mL,刺激 12 h 后再做后续实验。

1.3.3 哌唑嗪处理原代肝细胞

取小鼠原代肝细胞,按 70%细胞满度铺于六孔板,对抑制剂哌唑嗪组中加入哌唑嗪使其终浓度是 0.05 μ mol/L,1 h 后将 LPS 加入,使浓度最终达到 10 μ g/mL,经过 12 h 刺激后,收集备用。

1.3.4 细胞转染

在原代肝细胞的 si-NC 组和 si-Adra1a 组加入干扰 RNA 使其终浓度为 50 nmol/L,经过 12 h 转染后,将 LPS 加入其中,使其达到 10 μ g/mL 的终浓度,对细胞进行收集,备用,si-Adra1a 的靶向序列为 CCTTCAAGATCAGCTACTA,正向为:5'-CCUUCA AGAUCAGCUACUA-3';反向为:5'-UAGUAGCU GAUCUUGAAGG-3'。

1.3.5 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测相关因子 mRNA 表达水平

实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)对 Adra1a、 β -actin、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达水平进行检测。使用 TRIzol 法提取到肝细胞总 RNA 并按照逆转录试剂盒,合成 cDNA,然后以 cDNA 为模板扩增目标基因的基因编码段,反应结束后分析溶解曲线,确定有无非特异性扩增,将 β -actin 作为内参照,通过相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析相对表达量。引物序列见表 1。

1.3.6 CCK-8 检测细胞存活率

在 96 孔板中接种细胞(每孔 1×10^4 个细胞),每组设复孔 4 个,置于含 5% CO₂ 的细胞培养箱中在 37 ℃ 条件下培养,抑制剂及干扰 RNA 处理完细胞后,使用 10 μ g/mL 的 LPS 对 LPS 组、哌唑嗪组、

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因 Gene	物种 Specie	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
Adra1a	Mice	CTAAGGCCATTTCTACTTGGGGT	CGAGTGCAGATGCCGATGA
β-actin	Mice	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
IL-1β	Mice	GCAACTGTTCTCTGAAGTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
TNF-α	Mice	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG

干扰组细胞进行 12 h 的刺激。向每孔加入 10 μL Cell Counting Kit-8,充分混合,继续于培养箱中培养 1~4 h,随后用酶标仪读取吸光度,设置标准曲线,计算细胞存活率。

1.3.7 Western blot 检测相关蛋白的表达情况

提取原代肝细胞总蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒检测吸光度,计算蛋白浓度。取约 25 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,利用半干转设置电流 0.2 A,电压 1.5 V,转膜时间 9 min。用封闭液在 37 ℃ 封闭 PVDF 膜 2 h;一抗 β-actin(1 : 500~1 : 1000)、Adra1a、ERK、p-ERK、p38、p-p38、JNK、p-JNK (1 : 500)置于 4 ℃ 条件下孵育过夜,1×TBST 进行 3 遍清洗,1 次 15 min;滴加兔抗二抗 (1 : 3000~1 : 5000),置于 37 ℃ 条件下进行 2 h 孵育,1×TBST 清洗 3 遍,1 次 15 min;滴加 ECL 发光液显色拍照,以 β-actin 作为内参蛋白,利用 Imagelab 分析蛋白条带,计算出每种蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

实验数据用平均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,并采用 Graphpad 8.4.2 软件进行统计学分析,数据统计组间两两比较采用 *t* 检验方法,认为 *P*<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LBP 蛋白的敲除情况

Western blot 实验结果显示,*Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞中的 LBP 蛋白不再有表达(图 1)。

2.2 Adra1a 蛋白表达变化情况

如图 2A,在野生型小鼠原代肝细胞中与对照组

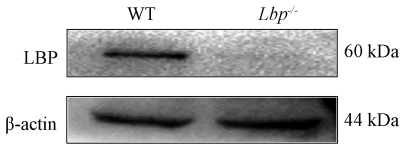
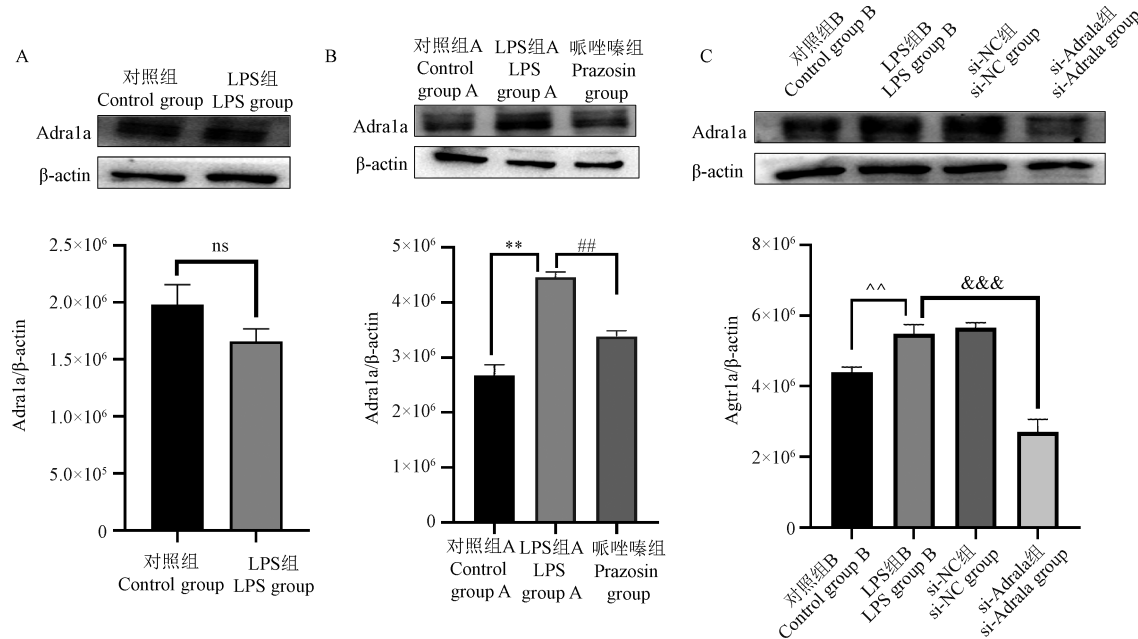


图 1 原代肝细胞中 LBP 蛋白的表达量

Figure 1 Expression of LBP protein in primary hepatocytes



注:与对照组 A 比较, ** *P*<0.01;与哌唑嗪组比较, ## *P*<0.01;与对照组 B 比较, ~ *P*<0.01;与 si-Adra1a 组比较, &&& *P*<0.001。

图 2 LPS 刺激及抑制和干扰后 Adra1a 蛋白的表达变化

Note. Compared with the control group A, ** *P*<0.01. Compared with the prazosin group, ## *P*<0.01. Compared with the control group B, ~ *P*<0.01. Compared with the si-Adra1a group, &&& *P*<0.001.

Figure 2 Changes in the expression of Adra1a protein after LPS stimulation and inhibition and interference

相比,LPS 组 Adra1a 蛋白表达量无显著性差异($P>0.05$);而在 $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞中与对照组相比,LPS 组蛋白表达量显著升高($P<0.01$),加入哌唑嗪后其蛋白表达量显著降低($P<0.01$),如图 2B;加入 si-Adra1a 后蛋白表达量显著降低($P<0.001$),如图 2C。

2.3 下调 Adra1a 表达对细胞存活率的影响

由 CCK-8 结果可知,对比 LPS 组,哌唑嗪组细胞存活率显著上升($P<0.01$),如图 3A;si-Adra1a 组细胞存活率也有明显提高($P<0.05$),如图 3B。

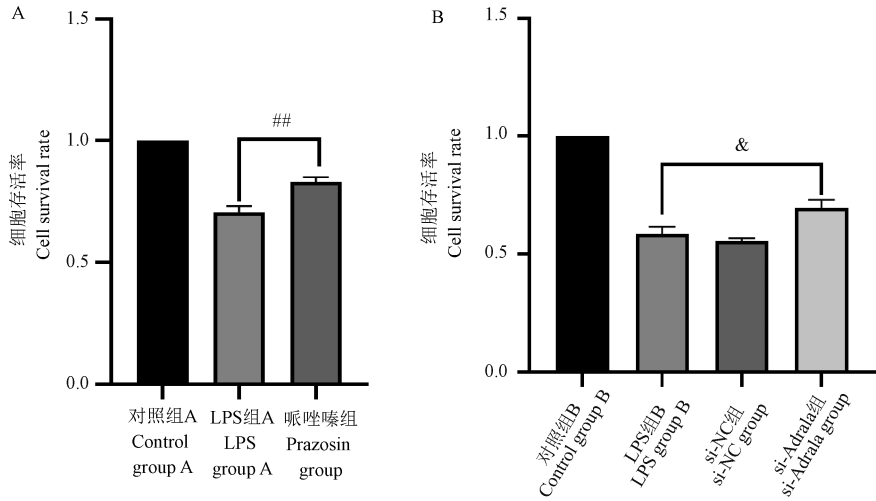
2.4 下调 Adra1a 表达对炎症因子 TNF-α、IL-1β 的影响

在 LPS 的刺激下, $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞炎症

因子表达量升高;而加入哌唑嗪后,TNF-α、IL-1β 的表达量均有显著下降($P<0.01$, $P<0.001$),如图 4A、4B。对 Adra1a 进行干扰后,TNF-α、IL-1β 表达显著性降低($P<0.001$, $P<0.01$),如图 4C、4D。

2.5 下调 Adra1a 表达对 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响

在 LPS 刺激下,ERK、JNK、p38 蛋白磷酸化会显著升高($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.001$),加入哌唑嗪抑制 Adra1a 表达后 JNK、ERK、p38 蛋白磷酸化显著性降低($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.001$),如图 5A~5C。而转染 si-Adra1a 下调 Adra1a 表达后,JNK、ERK、p38 蛋白磷酸化显著性降低($P<0.001$),如图 5D~5F。

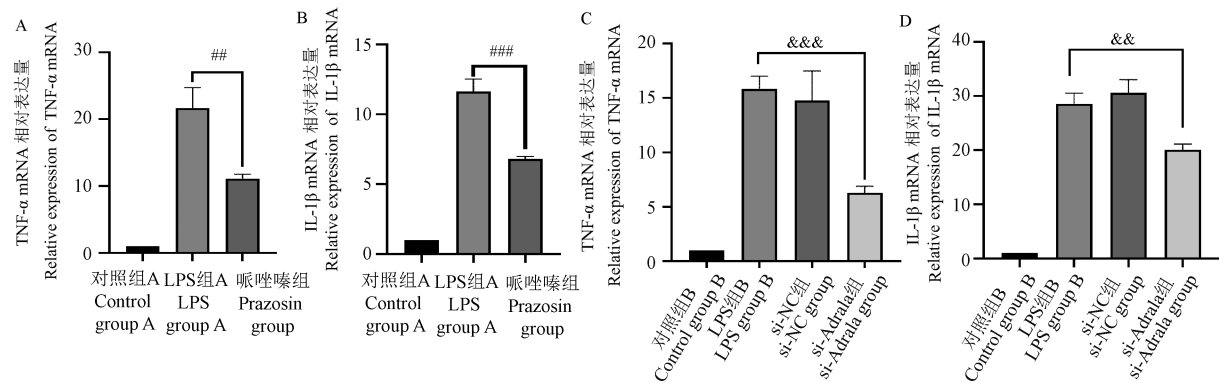


注:与哌唑嗪组比较,## $P<0.01$;与 si-Adra1a 组比较,& $P<0.05$ 。

图 3 抑制 Adra1a 表达对 $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞存活率的影响

Note. Compared with the prazosin group, ## $P<0.01$. Compared with the si-Adra1a group, & $P<0.05$.

Figure 3 Effect of inhibition of Adra1a expression on primary hepatocytes viability in $Lbp^{-/-}$ mice

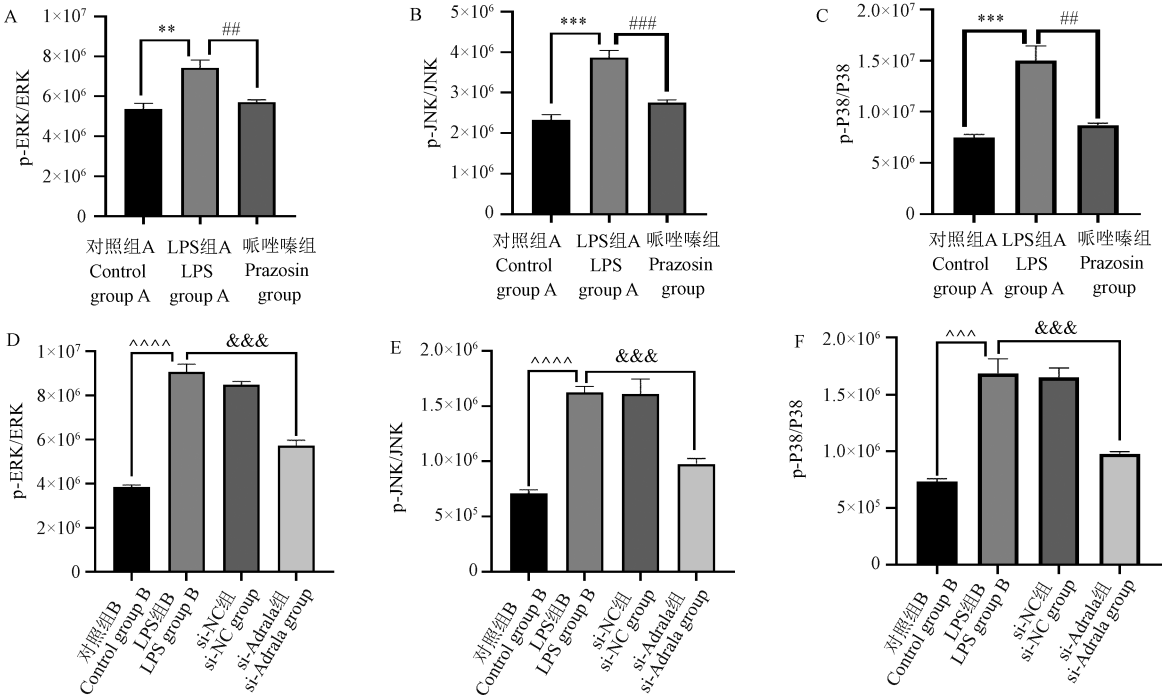
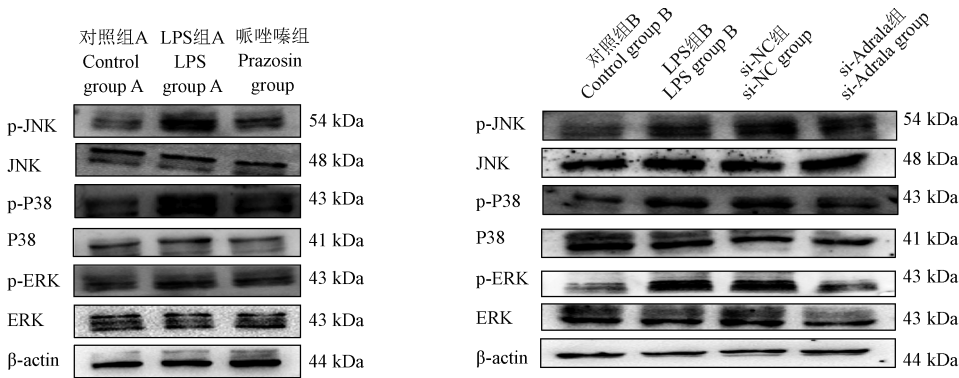


注:与哌唑嗪组比较,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与 si-Adra1a 组比较,&& $P<0.01$,&&& $P<0.001$ 。

图 4 抑制 Adra1a 表达对各组小鼠原代肝细胞 TNF-α 和 IL-1β 的影响

Note. Compared with the prazosin group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$. Compared with the si-Adra1a group, && $P<0.01$, &&& $P<0.001$.

Figure 4 Inhibition of Adra1a expression on TNF-α and IL-1β in primary hepatocytes of mice



注:与对照组 A 比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与哌唑嗪组比较, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$;与对照组 B 比较, ^^ $P<0.001$, ^^^ $P<0.0001$;与 si-Adra1a 组比较, &&& $P<0.001$ 。

图 5 抑制 Adra1a 表达对各组小鼠原代肝细胞 p-ERK、p-P38、p-JNK 蛋白表达的影响

Note. A, Compared with the control group A, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with the prazosin group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$. Compared with the control group B, ^^ $P<0.001$, ^^^ $P<0.0001$. Compared with the si-Adra1a group, &&& $P<0.001$.

Figure 5 Inhibition of Adra1a expression on the protein expression of p-ERK, p-P38, p-JNK in primary hepatocytes of mice

3 讨论

LPS 是在大多数革兰氏阴性菌的外膜外小叶中发现的一种特征明确的病原体分子,它可以引发强烈的免疫反应,并作为细菌感染的早期预警信号^[12],而 LBP 为肝细胞产生的 I 类急性期蛋白^[13],LPS 刺激信号由 LBP 和 CD14 复合物呈递到 TLR4-MD-2 以触发炎症细胞因子的释放^[14],严重者可导致脓毒症。肝在脓毒症发生时发挥积极作用,通过分泌急性期蛋白、代谢调节机制等方式减少损伤;

但肝在脓毒症发生时受损较为严重,包括缺血和休克导致的缺氧性肝炎、药物毒性或严重炎症导致的肝细胞损伤^[15],在一项临床报道中将 LBP 作为早期标记物精准区分危重新生儿、儿童的非感染性全身性炎症和脓毒症,标明 LBP 可以作为一种生物标志物来诊断早期临床脓毒症^[16]。目前临床上对脓毒症的治疗大多数采用抗生素的方法,尽管目前医疗取得了迅速进展,由于滥用抗生素造成的耐药性,目前临床上脓毒症尚无安全有效治疗手段,致死率较高^[17]。由于 LBP 作为第一个传递 LPS 信号

的蛋白, Song 等^[5]建立了 LBP 敲除大鼠模型, 通过与正常大鼠对比, LPS 给药的 LBP 敲除大鼠, 其相关炎症因子表达降低, 并且肝炎性损伤较轻。但又有研究发现, LBP 敲除小鼠的血液缺乏免疫反应性 LBP, 基本上无法在体外将 LPS 转移到 CD14, 并且细胞无法对 LPS 做出炎症反应。而体内注射 LPS 的野生型和 LBP 缺陷小鼠血浆中 TNF- α 水平没有显著差异, 表明存在一种与 LBP 无关的脂多糖应答机制进行了炎症信号的传导^[18], 因此, LBP 敲除小鼠可为探究 LPS 其他代偿性信号应答机制提供研究基础。

Adra1a 是 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 之一^[19], 同时又作为肝细胞上主要的肾上腺素受体, 它特异性偶联于 Gq/11。应激状态下, 机体的交感神经系统与肾上腺髓质的激动与释放均会增加, 都可使得肝细胞上的 α_1 -AR 过度激活^[20], α_1 -AR 亚型可促进 ERK/ MAPK 磷酸化的激活, 从而导致细胞出现各种炎症效应等^[21]。同时, α_{1A} -AR 转染的 PC12 细胞在用去甲肾上腺素处理后, 将细胞外信号调节蛋白激酶、p38 丝裂原活化蛋白激酶与 c-Jun 末端激酶被激活, 造成细胞损伤^[22]。有研究表明, 利用化学交感神经切除术或使用 α 肾上腺受体抑制剂即哌唑嗪等都可以有效改善由 CCl4 诱导的肝脂质过氧化导致的氧化应激受损, 使炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的表达降低^[23]。因此, 以上实验表明, Adra1a 的激活可通过 MAPK 信号通路, 对肝造成损伤, 抑制其受体表达会改善损伤的发生和发展。

本次研究在对 Lbp 敲除小鼠进行 LPS 刺激时, 发现其 Adra1a 表达量明显增加, 而在野生型中却没有变化。随着 Adra1a 蛋白表达量的明显增加, 丝裂原活化蛋白激酶家族的 ERK、p38、JNK 蛋白磷酸化程度也显著增加, MAPKs 调节细胞各种生命活动, 包括增殖、凋亡、炎症和先天免疫反应^[24]。我们通过使用哌唑嗪以及转染干扰 RNA 的方法来抑制蛋白 Adra1a 的表达, 两种方法都能显著降低 Adra1a 蛋白的表达, 但相比较而言, 由于抑制剂哌唑嗪特异性不高, 因此干扰 RNA 的方法抑制效果要更好一些。Adra1a 蛋白的抑制, MAPKs 家族蛋白表达量显著降低, 其通路下游的炎症因子的表达量下降, 细胞存活率明显上升。因此我们猜想, Adra1a 蛋白激活了信号传导, 使 MAPKs 家族蛋白磷酸化, 造成了炎症因子的产生和细胞损伤的发生以及存活率的下降。目前实验室还发现 GPCR 家族其他蛋白, 存

在与 Adra1a 相似的作用, 因此后续希望通过联合抑制潜在代偿受体, 更高效地抑制 LPS 诱发的炎症反应。与此同时该实验对象是小鼠原代肝细胞, 后续将体外筛选到的有效治疗靶点应用到小鼠模型中做体内验证, 希望可以找到 LBP 敲除后传递 LPS 诱导信号的有效代偿途径。

参考文献:

[1] NAGY G, PÁL T. Lipopolysaccharide; a tool and target in enterobacterial vaccine development [J]. Biol Chem, 2008, 389 (5): 513-520.

[2] SCHUMANN R R, LATZ E. Lipopolysaccharide-binding protein [J]. Chem Immunol, 2000, 74: 42-60.

[3] PERI F, PIAZZA M, CALABRESE V, et al. Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules [J]. Biochem Soc Trans, 2010, 38(5): 1390-1395.

[4] ALARCÓN-VILA C, BAROJA-MAZO A, DE TORRE-MINGUELA C, et al. CD14 release induced by P2X7 receptor restricts inflammation and increases survival during sepsis [J]. Elife, 2020, 9: e60849.

[5] SONG Z, MENG L, HE Z, et al. LBP protects hepatocyte mitochondrial function via the PPAR-CYP4A2 signaling pathway in a rat sepsis model [J]. Shock, 2021, 56(6): 1066-1079.

[6] 李思迪, 付彬, 郭中坤, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建脂多糖结合蛋白基因敲除小鼠 [J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(4): 294-300.

LI S D, FU B, GUO Z K, et al. Construction of lipopolysaccharide binding protein knockout mice using CRISPR/Cas9 technology [J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(4): 294-300.

[7] 米传靓, 付彬, 李思迪, 等. Agtr1a 调节 LPS 诱导的 Lbp^{-/-} 小鼠原代肝细胞炎症 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31 (8): 1021-1027.

MI C L, FU B, LI S D, et al. Agtr1a regulates LPS-induced inflammation in primary hepatocytes of Lbp^{-/-} mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(8): 1021-1027.

[8] 秦国东, 肖明朝. α_1 肾上腺素能受体与前列腺炎症研究进展 [J]. 重庆医学, 2013, 42(15): 1781-1783.

QIN G D, XIAO M C. Advances in the study of α_1 adrenergic receptors and prostatitis [J]. Chongqing Med, 2013, 42(15): 1781-1783.

[9] MILANO C A, DOLBER P C, ROCKMAN H A, et al. Myocardial expression of a constitutively active 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(21): 10109-10113.

[10] 董琳琳, 芦永良, 鄂维建, 等. MAPK 信号通路——肝棘球蚴病治疗新靶点 [J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 8(3): 714-718.

DONG L L, LU Y L, E W J, et al. The MAPK signaling pathway: a new target for the treatment of hepatic echinococcosis

- [J]. J Clin Hepatol, 2022, 8(3): 714–718.
- [11] 修爱媛, 王思宁, 丁茜, 等. α_1 肾上腺素能受体阻滞剂降低肝硬化门脉高压的实验研究 [J]. 中华消化病与影像杂志 (电子版), 2021, 7(3): 117–120.
XIU A Y, WANG S N, DING Q, et al. Experimental study of reducing cirrhotic portal hypertension by α_1 adrenergic receptor blocker [J]. Chin J Dig Med Imageology Electron Ed, 2021, 7(3): 117–120.
- [12] KIM Y J, LEE J O. Recognition of Lipopolysaccharides by TLR4 and its accessory proteins [J]. Bio Des, 2013, 45(12): 3–12.
- [13] HE Z, SONG Z, MENG L, et al. Lipopolysaccharide-induced transcriptional changes in LBP-deficient rat and its possible implications for liver dysregulation during sepsis [J]. J Immunol Res, 2021, 2021: 8356645.
- [14] QIU X, MISTRY A, AMMIRATI M J, et al. Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules [J]. Nat Struct Mol Biol, 2007, 14(2): 106–113.
- [15] STRNAD P, TACKE F, KOCH A, et al. Liver-guardian, modifier and target of sepsis [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(1): 55–66.
- [16] PAVCNIK-ARNOL M, HOJKE S, DERGAN M. Lipopolysaccharide-binding protein, lipopolysaccharide, and soluble CD14 in sepsis of critically ill neonates and children [J]. Intensive Care Med, 2007, 33(6): 1025–1032.
- [17] LEE S J, YOU J S, GHARBI A, et al. IOX1 activity as sepsis therapy and an antibiotic against multidrug-resistant bacteria [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 2942.
- [18] WURFEL M M, MONKS B G, INGALLS R R, et al. Targeted deletion of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein gene leads to profound suppression of LPS responses *ex vivo*, whereas *in vivo* responses remain intact [J]. J Exp Med, 1997, 186(12): 2051–2056.
- [19] DA SILVA S B, FEITOSA S G D, DE L ALVES S M, et al. A concise and useful guide to understand how Alpha₁ adrenoceptor antagonists work [J]. Mini Rev Med Chem, 2022, 22(18): 2383–2405.
- [20] 徐勇, 涂植光, 康格非. 哌唑嗪抑制脂多糖诱导的磷脂酶 A₂ 活性及肝细胞内钙离子超载 [J]. 中国危重病急救医学, 2001, 12(4): 216–219.
XU Y, TU Z G, KANG G F. Inhibitory effects of prazosin on lipopolysaccharide-induced phospholipase A₂ activity and hepatocytes calcium overload [J]. Chin Crit Care Med, 2001, 12(4): 216–219.
- [21] PEREZ-ASO M, SEGURA V, MONTÓ F, et al. The three α_1 -adrenoceptor subtypes show different spatio-temporal mechanisms of internalization and ERK1/2 phosphorylation [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833(10): 2322–2333.
- [22] CIVANTOS CALZADA B, ALEIXANDRE DE ARTIÑANO A. α -adrenoceptor subtypes [J]. Pharmacol Res, 2001, 44(3): 195–208.
- [23] LIN J C, PENG Y J, WANG S Y, et al. Sympathetic nervous system control of carbon tetrachloride-induced oxidative stress in liver through α -adrenergic signaling [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 3190617.
- [24] KIM E K, CHOI E J. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update [J]. Arch Toxicol, 2015, 89(6): 867–882.

[收稿日期] 2023–09–13