



肿瘤对小鼠肾上腺皮质细胞胆固醇 稳态分子表达的影响

潘志强, 方肇勤, 卢文丽, 刘小美, 张园园

(上海中医药大学基础医学院, 上海 201203)

【摘要】 目的 探讨肝癌状态下肿瘤大小对肾上腺皮质细胞内胆固醇稳态分子表达的影响。方法 在220只KM小鼠右腋下接种H22肝癌腹水细胞,复制肝癌荷瘤小鼠模型,在接种第11天依据肿瘤体积排序,筛选瘤体大组和瘤体小组各18只,并设立18只正常小鼠为对照组。采用生化方法检测血脂含量;应用实时荧光定量PCR检测各组小鼠肾上腺组织 *Srb1*、*Ldlr*、*Npc1*、*Npc2*、*Stard3*、*Hmgcr*、*Lipe*、*Acat1*、*Abca1*、*Abcg1*、*Srebp-1c*、*Lxra*、*Lxrβ*、*Rxra*、*Apoa1*、*ApoE* 基因 mRNA 表达,并以 *Gapdh* 和 β -actin 两个基因作内参照;应用 Western blot 方法检测 SRB1 和 ApoA1 蛋白表达。结果 瘤体大组小鼠肿瘤质量明显大于瘤体小组 ($P < 0.05$);与正常组比较,两组肝癌小鼠血浆 HDL-C 显著下降 ($P < 0.05$);瘤体大组肝癌小鼠,肾上腺皮质细胞胆固醇摄取相关分子 *Srb1*、*Ldlr*、*Apoa1* 基因表达显著升高 ($P < 0.05$),且 SRB1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$),而 ApoA1 蛋白表达在肿瘤大组明显高于肿瘤小组 ($P < 0.05$);调节胆固醇酯化及其分解酶 *Acat1* 与 *Lipe* 基因表达在瘤体大组显著低于肿瘤小组 ($P < 0.05$);调节胆固醇逆向流出胞外的 *Abca1* 和 *Abcg1* 基因表达在瘤体大组也显著下降 ($P < 0.05$);而调控细胞胆固醇稳态的核受体 *Srebp-1c*、*Lxra* 与 *Rxra* 基因表达无明显变化,但肿瘤小组 *Srebp-1c*、*Lxrβ* 与 *Rxra* 基因表达显著升高 ($P < 0.05$)。内质网合成胆固醇的酶 *Hmgcr* 与载脂蛋白 *ApoE* 在各组间均无显著差异。结论 在肝癌状态下,小鼠为适应肿瘤慢性反复的应激,肾上腺皮质细胞能有效利用胆固醇合成皮质激素。

【关键词】 肾上腺皮质;胆固醇;皮质激素;肝癌;高密度脂蛋白受体;载脂蛋白 A1;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)03-0239-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.004

Effect of tumor size on the expression of adrenal cholesterol homeostasis molecules in H22 hepatoma-bearing mice

PAN Zhi-qiang, FANG Zhao-qin, LU Wen-li, LIU Xiao-mei, ZHANG Yuan-yuan

(Basic Medical School of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203 China)

【Abstract】 Objective To study the effect of tumor size on the expression of adrenal cholesterol homeostasis molecules in H22 hepatoma-bearing mice. **Methods** Two hundred and twenty mice were injected with H22 hepatoma cells to their right armpit. On the 11th day after injection, the mice were sorted according to the tumor size. 18 mice with large tumor (large tumor group) and 18 mice with small tumor (small tumor group) were sacrificed, and the tumors were weighed. A control group consisting of 18 normal Kunming mice was also included in this study. The plasma TC, TG and HDL-C were detected using total cholesterol, triglycerides or HDL-C assay kits, respectively. The mRNA expressions of *Srb1*, *Ldlr*, *Npc1*, *Npc2*, *Stard3*, *Hmgcr*, *Lipe*, *Acat1*, *Abca1*, *Abcg1*, *Srebp-1c*, *Lxra*, *Lxrβ*, *Rxra*, *Apoa1* and *ApoE* were tested by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR), and *Gapdh* and β -actin were used for normalization. SRB1 and ApoA1 proteins were analyzed by Western blot. **Results** The tumor weight was significantly higher in the large tumor group than that in the small tumor group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the plasma HDL-C was significantly decreased in the two hepatoma groups ($P < 0.05$). The expression levels of *Srb1*, *Ldlr*, *Apoa1* mRNA and SRB1 protein

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81102533, 81473562)。

[作者简介] 潘志强(1977-),男,副教授,博士。研究方向:中医证候实验研究与类固醇激素研究。E-mail: pzq527@163.com

were significantly increased in the large tumor group ($P < 0.05$ for all). The ApoA1 protein level was significantly higher in the large tumor group than that in the small tumor group ($P < 0.05$). The expressions of *Acat1*, *Lipe*, *Abca1* and *Abcg1* mRNA were significantly lower in the large tumor group than those in the small tumor group ($P < 0.05$ for all). However, the expressions of *Srebp-1c*, *Lxr α* and *Rxr α* mRNA were not significantly changed, then, *Srebp-1c*, *Lxr β* and *Rxr α* mRNA expressions were significantly up-regulated in the small tumor group ($P < 0.05$). The expressions of *Hmgcr* and *ApoE* mRNA were not significantly different in the two groups. **Conclusions** In hepatoma-bearing mice, due to the adaptation to tumor-induced chronic stress response, the adrenal cortical cells can effectively utilize intracellular cholesterol to synthesize cortical hormones.

【Key words】 Adrenal cortex; Cholesterol; Liver cancer; *Srb1*; *Apoa1*; Cortical hormones, synthesis; Mice

细胞内胆固醇稳态机制在肝脏、主动脉研究很深入^[1,2],而胆固醇作为类固醇激素合成的前体物质,如何被肾上腺细胞用于合成皮质激素以适应各种应激尚缺乏深入研究。现有研究表明^[3],肾上腺皮质细胞通过 3 种方式获得类固醇激素合成的原料:①摄取血液胆固醇(人主要是低密度脂蛋白胆固醇,啮齿类动物主要是高密度脂蛋白胆固醇),②在内质网中从头合成胆固醇,③将脂滴中酯化胆固醇酶解为游离胆固醇。一旦细胞内胆固醇积聚过量,则通过细胞膜上三磷酸腺苷结合盒转运蛋白体 A1 和 G1 将胆固醇逆转运至细胞外。此外,肝 X 受体、固醇调节元件结合蛋白、过氧化物酶体增殖物激活受体等信号分子还参与细胞内胆固醇进出与转运调节^[4,5],肾上腺皮质细胞正是通过这一精密调控机制以确保胞内胆固醇的稳态。

然而,在肿瘤状态下,机体为适应肿瘤的慢性应激,肾上腺分泌皮质激素以抵御应激反应,那么,肿瘤大小是否对肾上腺皮质细胞胆固醇稳态有影响,尚未发现相关研究报道。本文在课题组对 H22 肝癌小鼠肾上腺皮质酮合成与分泌的研究基础上^[6],重点比较了不同肿瘤大小的肝癌小鼠肾上腺皮质细胞内胆固醇稳态分子的表达差异,发现肿瘤越大者,小鼠肾上腺皮质细胞对胆固醇需求越高,用于皮质激素的合成以抵御肿瘤的慢性应激。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 KM 雄性小鼠 250 只,7 周龄,体重(21 ± 1)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2007-0005】;实验在上海中医药大学动物实验中心设施内进行【SYXK(沪)2009-0069】。

1.1.2 试剂

乙二胺四乙酸二钾盐(EDTA-2K)抗凝剂购自

国药集团;总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。Trizol 购自 Invitrogen,反转录试剂盒 PrimeScript[®] RT Reagent Kit 和 PCR 试剂盒 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus) II 购自 TaKaRa 公司。SRB1、ApoA1、GAPDH 抗体购自 Abcam 公司,BCA 蛋白质定量检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,免疫印迹化学发光试剂 ECL 试剂盒购自 Pierce 公司。

1.1.3 仪器

Elx800 型酶标仪(美国 Bio-TEK 公司),Elx50 型自动洗板机(美国 Bio-TEK 公司)。5417R 型冷冻台式离心机(德国 Eppendorf 公司),Eco-Illumina 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Illumina 公司),GBOX CheMI 凝胶扫描与分析系统。

1.2 方法

1.2.1 H22 肝癌小鼠模型建立

随机取 30 只小鼠作正常对照组,另 220 只小鼠腋下接种 H22 肝癌腹水癌细胞(课题组前期采用并保种冻存于 -196°C 液氮中),每只 0.2 mL(细胞浓度 1×10^7 个/mL)。

1.2.2 小鼠分组、处死、取材与组织湿重

采用游标卡尺精确测量小鼠腋下肿瘤最长直径(a)和最短横径(b),通过肿瘤体积预测公式 $V = 0.5ab^2$,估算肿瘤大小,按照肿瘤体积大小排序,选择瘤体最大者 18 只,瘤体最小者 18 只,同时选择体重居中的 18 只正常小鼠作为正常对照组,于接种肿瘤细胞后第 11 天处死瘤体大组、瘤体小组和正常组小鼠,摘眼球取血,常规分离血浆,剥离肿瘤并称重,多余小鼠用于后续实验。

1.2.3 血脂含量检测

按照试剂盒及所提供的方法进行操作,检测血浆总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇含量。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测基因表达

上下游引物序列采用 Primer3 (v. 0. 4. 0) 在线软件合成(参见表 1), 委托 Life Technologies 公司上海合成部完成。按照 Trizol 试剂盒说明书抽提肾上腺总 RNA; 逆转录反应体系 20 μ L, 反应条件为 37 $^{\circ}$ C \times 15 min, 85 $^{\circ}$ C \times 5 s, 4 $^{\circ}$ C (逆转录反应程序结束, 可以取出, 也可以过任意时间后取出); PCR 扩增反应体系为 20 μ L, 反应程序为 95 $^{\circ}$ C \times 3 min,

95 $^{\circ}$ C \times 30 s, 60 $^{\circ}$ C \times 30 s, 40 cycles。基因相对表达量分析方法: 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析^[7], 以正常组作为对照组, 以 GAPDH 和 β -actin 基因 Ct 均值作为内参组, $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因}$ (其中, Ct 值为扩增 n 个循环基因的荧光数值), $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{肿瘤组} - \Delta Ct_{对照组}$, 目的基因相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

表 1 小鼠上、下游引物序列

Tab. 1 Sequences of the mouse primers

基因 Genes	mRNA 序列号 mRNA_ID	引物序列 Forward primer; Reverse primer	Tm 值 Tm	产物/bp Product size
<i>Gapdh</i>	NM_008084	上游 5' -GATGACATCAAGAAGGTGGTGA-3'	59.97	199
		下游 5' -TGCTGTAGCCGTATTCATTGTC-3'	60.16	
β -actin	NM_007393	上游 5' -AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'	59.98	228
		下游 5' -CTCTCAGCTGTGGTGGTAA-3'	60.02	
<i>Srb1</i>	NM_001205083	上游 5' -AAGTGGTCAACCCAAACGAG-3'	60.01	121
		下游 5' -ACGGTGTCTGTCATTGAA-3'	60.01	
<i>Ldlr</i>	NM_010700	上游 5' -ATGAGTCCCCAGAGACATGC-3'	60.08	244
		下游 5' -GAGCCATCTAGGCAATCTCG-3'	59.94	
<i>Npc1</i>	NM_008720	上游 5' -ATGAGCGTCTTCAGGAGGAA-3'	59.95	214
		下游 5' -AACAGGCTCACAAAGCAGGT-3'	59.91	
<i>Npc2</i>	NM_023409	上游 5' -CACTCAGTCCCAGAACAGCA-3'	60.02	268
		下游 5' -CCAAGGAGCCTAGCTTGTGA-3'	60.53	
<i>Stard3</i>	NM_021547	上游 5' -TCCCCATTGTCTTTTCGTC-3'	60.05	284
		下游 5' -CACCCGAGTAGCTTCCTTTC-3'	60.02	
<i>Hmgcr</i>	NM_008255	上游 5' -TGGAGATCATGTGCTGCTTC-3'	59.95	248
		下游 5' -GCGACTATGAGCGTGAACAA-3'	60.02	
<i>Lipe</i>	NM_001039507	上游 5' -AGACACCAGCCAACGGATAC-3'	60.00	189
		下游 5' -GGGCATAGTAGCCATAGCA-3'	60.08	
<i>Acat1</i>	NM_144784	上游 5' -TATTTCCACTCCATGCACCA-3'	59.92	133
		下游 5' -ATTGGACATGCTCTCCATCC-3'	59.89	
<i>Abca1</i>	NM_013454	上游 5' -AGCCCTCTTTGGAGGAATA-3'	60.03	189
		下游 5' -TGCCTTGTAGCTGGTGTGTC-3'	59.90	
<i>Abcg1</i>	NM_009593	上游 5' -TCAACAGTGGAGAGCTGGTG-3'	60.02	261
		下游 5' -CTCGTCTGCCTTCATCCTTC-3'	59.95	
<i>Srebp-1c</i>	NM_011480	上游 5' -CCCTGTGTACTGGCCTTT-3'	60.03	292
		下游 5' -TTGCGATGTCTCCAGAAGTG-3'	59.98	
<i>Lxra</i>	NM_013839	上游 5' -GGATAGGGTTGGAGTCAGCA-3'	60.07	179
		下游 5' -GCTCAGCACGTTGTAATGGA-3'	59.87	
<i>Lxrβ</i>	NM_009473	上游 5' -CTTCGGGCTTCCACTACAAC-3'	59.73	221
		下游 5' -CTTCCGAATCTGCTCCTCAG-3'	60.09	
<i>Rxra</i>	NM_011305	上游 5' -GGCAGCTGCACTCTCCTATC-3'	60.13	166
		下游 5' -GGTTTCATGGGTGAATTGAG-3'	60.17	
<i>Apoa1</i>	NM_009692	上游 5' -CAGCTGAACCTGAATCTCCTG-3'	60.00	221
		下游 5' -AGCTCCACATCCTCTTCCAT-3'	60.09	
<i>ApoE</i>	NM_009696	上游 5' -CATTGCTGACAGGATGCCTA-3'	59.82	172
		下游 5' -TGTGTGACTTGGAGCTCTG-3'	60.02	

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达

采用 RIPA 裂解液裂解肾上腺组织,依据 BCA 蛋白质定量试剂方法进行蛋白定量,采用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,并进行 PVDF 转膜与 5% 脱脂奶粉封闭,加入一抗(SRB1 抗体 1:1000 稀释、ApoA1 抗体 1:2000 稀释、GAPDH 抗体 1:2000 稀释)4℃过夜,用 TBST 洗涤,再加入相应辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:2000 稀释)孵育, TBST 洗涤, ECL 化学发光显影,最后用 GBOX Chemi 凝胶扫描与分析系统进行半定量分析。

1.2.6 统计学方法

应用 SPSS 15.0 统计软件,两组比较采用 *t* 检验,三组比较采用单因素方差分析对实验指标进行统计。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠去瘤体重与肿瘤质量比较

与正常组比较,两组肝癌小鼠去瘤体重差异无显著性;与瘤体小组比较,瘤体大组小鼠肿瘤质量明显增大($P < 0.05$)(见表 2)。

2.2 血脂含量比较

与正常组比较,两组肝癌小鼠血浆 TC 和 TG 差异均无显著性,而 HDL-C 显著下降($P < 0.05$),提示肝癌小鼠胆固醇逆向转运至肝脏的代谢能力下降

表 3 各组小鼠血脂含量比较($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Tab.3 Comparison of blood TC, TG and HDL-C among the mice of all groups

组别 Groups	总胆固醇 TC	高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C	甘油三酯 TG
正常组 Control group	4.39 ± 0.61	1.18 ± 0.28	1.27 ± 0.35
瘤体大组 Large tumor group	3.52 ± 0.64	0.87 ± 0.13*	1.70 ± 0.39
瘤体小组 Small tumor group	3.49 ± 0.72	0.62 ± 0.18*	1.65 ± 0.45

注:与正常组比较,* $P < 0.05$ 。

Note. * $P < 0.05$ compared with the control group.

表 4 各组小鼠肾上腺细胞胆固醇摄取与转运相关基因表达($\bar{x} \pm s$)

Tab.4 Comparison of the expression of cholesterol uptake and transport-related genes among all groups

组别 Groups	<i>Srb1</i>	<i>Ldlr</i>	<i>Npc1</i>	<i>Npc2</i>	<i>Stard3</i>
正常组 Control group	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.28
瘤体大组 Large tumor group	1.89 ± 0.24*	2.20 ± 0.47*▲	1.24 ± 0.11	0.83 ± 0.09	1.06 ± 0.08
瘤体小组 Small tumor group	1.35 ± 0.21	1.33 ± 0.15	1.16 ± 0.13	0.92 ± 0.06	1.29 ± 0.11

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与瘤体小组比较,▲ $P < 0.05$;*Stard3* 又名 *Mln64*,*Npc1* 又名 *Nmf164*。

Note. * $P < 0.05$, compared with the control group; ▲ $P < 0.05$, compared with the small tumor group. *Stard3* also known as *Mln64*. *Npc1* also known as *Nmf164*.

2.4 肾上腺皮质细胞胆固醇合成、转化与流出相关基因表达

与正常组比较,瘤体大组肝癌小鼠酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶(*Acat1*)与胆固醇逆向流出胞外的三磷酸腺苷结合盒转运蛋白体 G1(*Abcg1*)基因表

(见表 3)。

表 2 各组小鼠去瘤体重与肿瘤质量比较($\bar{x} \pm s$, $n = 18$)

Tab.2 Comparison of body weight and tumor weight among the mice of all groups

组别 Groups	去瘤体重/g Body weight	肿瘤/g Tumor weight
正常组 Control group	27.10 ± 1.44	-
瘤体大组 Large tumor group	29.45 ± 3.67	3.05 ± 0.64▲
瘤体小组 Small tumor group	28.47 ± 2.05	1.51 ± 0.43

注:与瘤体小组比较,▲ $P < 0.05$ 。

Note. ▲ $P < 0.05$ compared with the small tumor group.

2.3 肾上腺皮质细胞胆固醇摄取与转运相关基因表达

与正常组比较,瘤体大组肝癌小鼠肾上腺胆固醇摄取分子高密度脂蛋白受体(*Srb1*)和低密度脂蛋白受体(*Ldlr*)基因表达显著升高($P < 0.05$),且瘤体大组肝癌小鼠 *Ldlr* 基因表达显著高于瘤体小组($P < 0.05$)。*Ldlr* 通过质膜内吞进入胞内体,释放胆固醇并通过含 START 结合域蛋白 3(*Stard3*)、C 型尼曼-匹克病基因(*Npc1* 和 *Npc2*)等蛋白转运至内质网,然而这几个胆固醇转运分子基因表达在各组间差异无显著性(见表 4)。

达显著下降($P < 0.05$);与瘤体小组比较,瘤体大组肝癌小鼠酯化胆固醇的激素敏感脂肪酶(*Lipe*)、*Acat1*、*Abca1* 基因表达显著下调($P < 0.05$);然而,内质网胆固醇合成的 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(*Hmgcr*)各组间差异无显著性(见表 5)。

2.5 调节胆固醇稳态分子的基因表达

与正常组比较, 瘤体大组肝癌小鼠肝 X 受体 β (*Lxr β*) 与载脂蛋白 a1 (*Apoa1*) 基因表达显著升高 ($P < 0.05$), 瘤体小组肝癌小鼠固醇调节元件结合蛋白-1c (*Srebp-1c*)、*Lxr β* 基因表达明显升高 ($P < 0.05$), 而 *Apoa1* 表达显著下调 ($P < 0.05$); 与瘤体小组比较, 瘤体大组肝癌小鼠 *Srebp-1c* 和 *Apoa1* 显著升高 ($P < 0.05$), 而肝 X 受体 α (*Lxr α*) 与载脂蛋

白 e (*Apoe*) 基因表达各组间差异无显著性 (见表 6)。

2.6 肾上腺 SRB1 与 ApoA1 蛋白表达

与正常组比较, 瘤体大组肝癌小鼠肾上腺 SRB1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), 而瘤体小组 ApoA1 蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$); 且瘤体大组肝癌小鼠 ApoA1 蛋白表达显著高于瘤体小组 ($P < 0.05$) (见图 1A、B)。

表 5 各组小鼠肾上腺细胞胆固醇合成、转化、流出相关基因表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Comparison of expression of cholesterol synthesis, transform and efflux-related genes in all groups

组别 Groups	<i>Hmgcr</i>	<i>Lipe</i>	<i>Acat1</i>	<i>Abca1</i>	<i>Abcg1</i>
正常组 Control group	1.00 ± 0.33	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.37
瘤体大组 Large tumor group	1.03 ± 0.24	0.91 ± 0.15 [▲]	0.68 ± 0.05 ^{*▲}	0.76 ± 0.13 [▲]	0.54 ± 0.08 [*]
瘤体小组 Small tumor group	0.78 ± 0.01	1.36 ± 0.08	1.06 ± 0.06	1.19 ± 0.05	0.76 ± 0.09

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与瘤体小组比较, [▲] $P < 0.05$; *Lipe* 又名 *Hsl*。

Note. * $P < 0.05$, compared with the control group; [▲] $P < 0.05$, compared with the small tumor group. *Lipe* also known as *Hsl*.

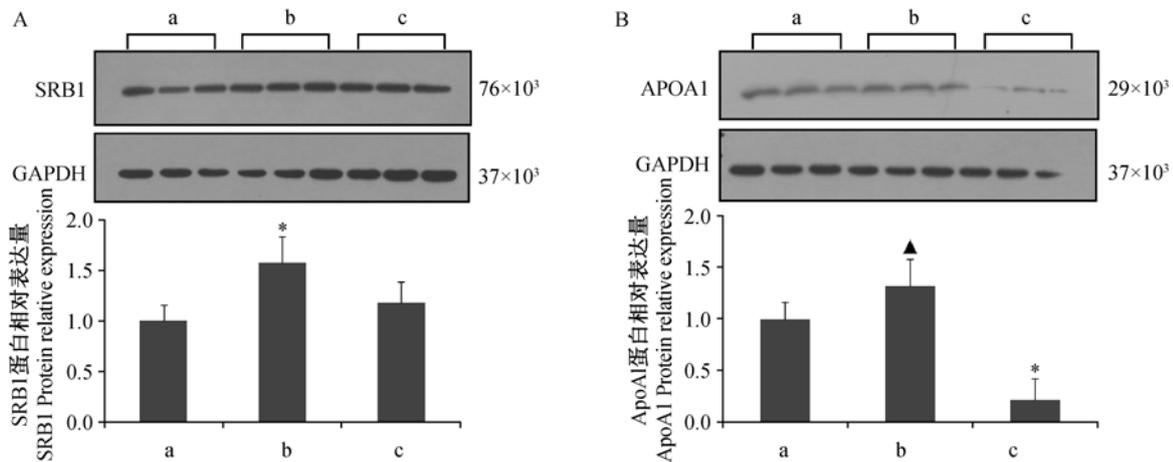
表 6 各组小鼠肾上腺细胞胆固醇稳态调节分子基因表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 6 Comparison of the expression of cholesterol homeostasis-related genes in the mice of all groups

组别 Groups	<i>Srebp-1c</i>	<i>Lxrα</i>	<i>Lxrβ</i>	<i>Rxrα</i>	<i>Apoa1</i>	<i>Apoe</i>
正常组 Control group	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.09
瘤体大组 Large tumor group	1.06 ± 0.19 [▲]	0.81 ± 0.13	1.52 ± 0.32 [*]	1.30 ± 0.28	1.79 ± 0.16 ^{*▲}	1.11 ± 0.08
瘤体小组 Small tumor group	1.88 ± 0.21 [*]	1.12 ± 0.12	1.40 ± 0.06 [*]	1.38 ± 0.06 [*]	0.18 ± 0.01 [*]	1.24 ± 0.03

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与瘤体小组比较, [▲] $P < 0.05$ 。

Note. * $P < 0.05$, compared with the control group; [▲] $P < 0.05$, compared with the small tumor group.



注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与瘤体小组比较, [▲] $P < 0.05$ 。a. 正常组; b. 瘤体大组; c. 瘤体小组。

图 1 SRB1 (A)、ApoA1 (B) 蛋白相对表达量

Note. * $P < 0.05$, compared with the control group; [▲] $P < 0.05$, compared with the small tumor group. a. control group, b. large tumor group, c. small tumor group.

Fig. 1 SRB1 (A) and ApoA1 (B) protein relative expression in the mice

3 讨论

胆固醇是肾上腺皮质细胞合成类固醇激素的重要前体物质, 在肝癌疾病状态下, 机体为适应肿瘤的慢性反复应激, 肾上腺皮质需合成糖皮质激素以抵御应激反应, 因此, 维持肾上腺皮质细胞充裕的胆固

醇是必需的。课题组对各组小鼠血浆激素检测结果表明^[6], 肿瘤形成后, 小鼠血浆皮质酮水平平均高于正常对照组, 且瘤体越大者, 血浆促肾上腺皮质激素含量显著升高, 并存在垂体-肾上腺皮质轴的负反馈机制。那么, 对于皮质激素合成前期过程而言, 与肝细胞、主动脉内皮细胞、巨噬细胞类似, 肾上腺皮质

细胞也存在一套精密的调控胆固醇稳态机制,既可通过质膜上高密度脂蛋白受体和低密度脂蛋白受体摄入血液中的胆固醇并储存于脂滴中备用,又可在内质网中从头合成胆固醇,此外,胞内过量的胆固醇还将通过三磷酸腺苷结合盒转运蛋白体相关蛋白逆向流出胞外,而且,肝 X 受体、固醇调节元件结合蛋白、过氧化物酶体增殖物激活受体等信号分子还参与细胞内胆固醇的维稳过程^[8,9]。因此,生理状态下,肾上腺皮质细胞能充分协调有效利用各种途径的胆固醇并转运至线粒体内合成类固醇激素,在肿瘤病理状态下,有报道显示胆固醇代谢、血清胆固醇水平及胆固醇合成抑制剂与结直肠癌的关系密切^[10],那么,在肿瘤慢性应激过程中,肾上腺皮质细胞对胆固醇的利用如何?我们以 H22 肝癌小鼠为观察对象,深入研究不同大小肝癌的小鼠肾上腺皮质细胞胆固醇摄入、运输、转化、合成、流出及其参与维稳的调控分子表达差异,以阐明肿瘤对肾上腺皮质激素合成前胆固醇利用与稳态的影响。

基于 *Srb1* 与 *Apoa1* 协同作用是小鼠肾上腺皮质细胞摄取血浆胆固醇的主要方式,而 *Ldlr* 对胆固醇的内吞作用也很重要,结果表明肿瘤越大,肝癌小鼠肾上腺 *Srb1*、*Apoa1*、*Ldlr* 基因表达升高越显著 ($P < 0.05$),相应的蛋白表达检测显示肿瘤大组肾上腺 SRB1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)、而 ApoA1 蛋白表达在肿瘤大组明显高于肿瘤小组 ($P < 0.05$),提示肿瘤越大,肝癌小鼠为适应肿瘤慢性反复的应激,需要摄取更多的胆固醇用于合成皮质激素以抵御应激。*Lipe* 主要将脂滴中酯化胆固醇分解为游离胆固醇,而 *Acat1* 则是将摄入的胆固醇通过酯化形式储存于脂滴中,结果显示肿瘤大组肝癌小鼠肾上腺 *Lipe* 和 *Acat1* 基因表达显著低于肿瘤小组 ($P < 0.05$),提示肿瘤大的肝癌小鼠为适应肿瘤慢性反复的应激,随时启动 fight or flight response、相比脂滴中胆固醇的储备量减少。然而,*Abca1* 和 *Abcg1* 主要负责将胞内过量的胆固醇逆向转出胞外,结果显示肿瘤大组肝癌小鼠肾上腺 *Abca1* 和 *Abcg1* 基因表达显著低于肿瘤小组 ($P < 0.05$),提示肿瘤大的肝癌小鼠肾上腺皮质细胞内胆固醇流程减少,主要用于线粒体内合成皮质激素。然而内质网自身合成胆固醇的关键酶 *Hmgcr* 在各组间无显著性变化。

细胞主要通过调节胆固醇的胞内合成、胞外摄取、酯化及外流等途径之间的平衡以维持正常的胞内胆固醇浓度,其中,*Lxr* 和 *Srebps* 对维持细胞内胆固醇平衡发挥重要作用。结果显示肿瘤大组肝癌小鼠肾上腺 *Sreb-1c*、*Lxr α* 与 *Rxr α* 基因表达无明显变

化,而肿瘤小组 *Sreb-1c*、*Lxr β* 与 *Rxr α* 基因表达显著升高 ($P < 0.05$),提示肿瘤越大,因胆固醇更多用于运输至线粒体内合成皮质激素、流出胞外减少,相应地调节肾上腺皮质细胞内胆固醇稳态的能力减弱。

综上,本研究发现,在肝癌状态下,小鼠血浆 HDL-C 含量下降,提示肝脏胆固醇代谢能力减弱,为适应肿瘤慢性反复的应激,瘤体越大者,维持胞内胆固醇稳态能力越弱,即储存于脂滴和流出胞外的胆固醇减少,相反,肾上腺皮质细胞通过摄取血胆固醇并即刻转运至线粒体内合成糖皮质激素,而以适应机体的各种应激反应。结合课题组张园园等研究结果^[11],化疗药物局部介入治疗联合索拉非尼灌胃治疗对 H22 肝癌小鼠抑瘤作用好,且对中医气血阴阳证候有影响,本研究结果将有助于从内分泌角度拓展认识肿瘤对机体的影响。

参 考 文 献

- [1] Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, et al. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER [J]. Cell, 2002, 110:489-500.
- [2] Kalaany NY, Gauthier KC, Zavacki AM, et al. LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation [J]. Cell Metab, 2005, 1: 231-244.
- [3] Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders [J]. Endocr Rev, 2011, 32: 81-151.
- [4] Cummins CL, Mangelsdorf DJ. Liver X receptors and cholesterol homeostasis: spotlight on the adrenal gland [J]. Biochem Soc Trans, 2006, 34: 1110-1113.
- [5] Xia X, Jung D, Webb P, et al. Liver X receptor β and peroxisome proliferator-activated receptor δ regulate cholesterol transport in murine cholangiocytes [J]. Hepatology, 2012, 56: 2288-2296.
- [6] 潘志强,方肇勤,卢文丽,等.不同程度邪毒证 H22 肝癌小鼠血液激素含量动态变化分析 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32: 1361-1365.
- [7] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [8] Yang F, Vought BW, Satterlee JS, et al. An ARC/mediator subunit required for SREBP control of cholesterol and lipid homeostasis [J]. Nature, 2006, 442: 700-704.
- [9] Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, et al. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor [J]. Science, 2009, 325: 100-104.
- [10] 杨永涛,盛华,李志文,等.胆固醇代谢与结直肠癌的关系及其机制 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30(3): 254-257.
- [11] 张园园,方肇勤,王艳明.不同治疗方案对 H22 肝癌荷瘤小鼠的疗效比较 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 67-71, 77.

[收稿日期] 2014-12-09