

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 CL, Fu B, Li SD, et al. Agtr1a regulates LPS-induced inflammation in primary hepatocytes of $Lbp^{-/-}$ mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(8): 1021–1027.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.08.007

Agtr1a 调节 LPS 诱导的 $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞炎症

米传靓¹, 付彬^{1*}, 李思迪^{1,2}, 陈志达¹, 郭中坤¹, 张振宇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 基于 LBP 敲除小鼠($Lbp^{-/-}$)原代肝细胞探讨 LBP 缺失后 Agtr1a 调节 LPS 诱导炎症的作用。**方法** 通过两步灌注法提取 WT 组、 $Lbp^{-/-}$ 组小鼠原代肝细胞, 构建 LPS 诱导的原代肝细胞炎症模型; 分别采取加入抑制剂氯沙坦、转染 siRNA 两种方法抑制 $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞 Agtr1a 表达; 抑制剂法将细胞分为对照组 A(空白对照)、LPS 组 A(LPS 刺激)、抑制剂氯沙坦组(氯沙坦干预 3 h 后加入 LPS 刺激), 转染 siRNA 法将细胞分为对照组 B(空白对照)、LPS 组 B(LPS 刺激)、阴性对照组(si-NC 干扰 12 h 后加入 LPS 刺激)、干扰组(si-agtr1a 干扰 12 h 后加入 LPS 刺激); WT 组小鼠原代肝细胞则分为对照组(空白对照)、LPS 组(LPS 刺激)。本研究利用 Western Blot 验证 $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞中 LBP 蛋白敲除情况, 从 WT 组、 $Lbp^{-/-}$ 组小鼠原代肝细胞的 Western Blot 方面验证 Agtr1a 在 LPS 刺激下的变化情况, 使用 CCK8、qPCR、Western Blot 等方法探讨抑制剂氯沙坦及 si-agtr1a 对 $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞炎症的抑制情况。**结果** $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞中 LBP 蛋白已敲除完全; 与 WT 组相比, 在 LPS 诱导下 $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞 Agtr1a 表达显著升高($P < 0.001$); 抑制剂组细胞存活率显著升高($P < 0.01$); 抑制剂组以及干扰组的炎症因子表达显著降低($P < 0.01$), 同时与炎症相关蛋白 p-ERK 的表达也显著降低($P < 0.01$)。**结论** LPS 刺激 $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞后 Agtr1a 表达上调能够代偿脂多糖结合蛋白(LBP)的作用来促进炎症的发生, 抑制 Agtr1a 表达能显著降低 LPS 诱导的 $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞炎症反应。

【关键词】 血管紧张素受体 1a; $Lbp^{-/-}$ 小鼠; 原代肝细胞; 抑制剂; 干扰 RNA; 细胞外信号调节激酶/磷酸化细胞外信号调节激酶

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 08-1021-07

Agtr1a regulates LPS-induced inflammation in primary hepatocytes of $Lbp^{-/-}$ mice

MI Chuanliang¹, FU Bin^{1*}, LI Sidi^{1,2}, CHEN Zhida¹, GUO Zhongkun¹, ZHANG Zhenyu¹, 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)

Corresponding author: WANG Kezhou. E-mail: wangkezhou_cn@163.com; FU Bin; E-mail: fubin@sdfmu.edu.cn

【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)。

Funded by the Innovation Project of Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan Science and Technology Bureau “20 Colleges and Universities” (2021GXRC011), Shandong Medical and Health Science and Technology Development Plan (2019WS177), Shandong Province Pig Industry Technology System (SDAIT-08-17).

【作者简介】 米传靓(2000—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 免疫药理学。Email: 2085411485@qq.com

【通信作者】 王可洲(1974—), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 药理毒理学研究。Email: wangkezhou_cn@163.com;

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

* 共同通信作者

[Abstract] Objective To investigate the role of Agtr1a in regulating LPS-induced inflammation after LBP deletion in primary hepatocytes of LBP knockout (*Lbp*^{-/-}) mice. **Methods** Primary hepatocytes of WT and *Lbp*^{-/-} groups were isolated by a two-step perfusion method to establish an inflammation model induced by LPS. Agtr1a expression in *Lbp*^{-/-} mouse primary hepatocytes was inhibited by losartan and siRNA. Cells were divided into a control group A (blank control), LPS group A (LPS stimulation), and losartan group (LPS stimulation was applied after 3 h of losartan treatment). Cells were divided into a control group B (blank control), LPS group B (LPS stimulation), negative control group (LPS stimulation was applied after 12 h of si-NC transfection), and interference group (LPS was applied after 12 h of si-agtr1a transfection). Primary hepatocytes in the WT group were divided into a control group (blank control) and LPS group (LPS stimulated). Western Blot was used to confirm knockout of LBP protein in *Lbp*^{-/-} mouse primary hepatocytes. Changes in Agtr1a expression in primary hepatocytes of WT and *Lbp*^{-/-} mice under LPS stimulation were verified by Western Blot. CCK8 assays, qPCR, and Western Blot were used to investigate the inhibitory effects of losartan and si-agtr1a on inflammation in primary hepatocytes of *Lbp*^{-/-} mice. **Results** LBP protein was completely knocked out in primary liver cells of *Lbp*^{-/-} mice. Compared with the wildtype group, Agtr1a expression in primary hepatocytes of *Lbp*^{-/-} mice was significantly increased under LPS induction ($P < 0.001$). The cell survival rate of the inhibitor group was significantly increased ($P < 0.01$). Expression of proinflammatory factors in inhibitor and interference groups was significantly decreased ($P < 0.01$). Expression of inflammation-related protein p-ERK was also significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusions** Upregulation of Agtr1a expression in primary hepatocytes of *Lbp*^{-/-} mice after LPS stimulation compensates for the effect of lipopolysaccharide-binding protein to promote inflammation. Inhibition of Agtr1a expression significantly reduces the LPS-induced inflammatory response in primary hepatocytes of *Lbp*^{-/-} mice.

[Keywords] Agtr1a; *Lbp*^{-/-} mice; primary hepatocytes; inhibitors; RNAi; ERK/p-ERK

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

脂多糖结合蛋白 (lipopolysaccharide-binding protein, LBP) 作为分泌型 I 类急性期蛋白, 主要在肝细胞中产生, 并在先天免疫应答中发挥关键作用^[1]。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 也称为内毒素, 是革兰氏阴性菌的外膜结构, 同时也是免疫系统最有效的诱导剂之一^[2]。LBP 与 LPS 结合并调节炎症反应^[3]。有研究证明敲除 LBP 可以降低 LPS 诱导的大鼠炎症因子水平, 从而对机体起到保护作用^[4]。前期研究发现, *Lbp*^{-/-} 小鼠虽无法正常表达 LBP, 但仍会将 LPS 信号传递给靶细胞引起迟发炎症反应^[5], 表明 LPS 诱导信号传递可能存在代偿途径。因此, 以 *Lbp*^{-/-} 小鼠为背景研究 LPS 信号传递的代偿途径, 对解决由革兰氏阴性菌引起的炎症反应有重要意义。

血管紧张素受体 1a 型 (Agtr1a angiotensin II receptor, type 1a, Agtr1a) 作为 G 蛋白偶联受体 (GPCR), 含有信号转导所必需的七跨膜螺旋结构。活化的 Agtr1a 将激活细胞内信号传导并触发多种信号通道如细胞内蛋白激酶^[6] 如丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族、细胞外信号调节激酶 ERK、c-JunN-末端激酶 (JNK) 和 p38 MAPK^[7]。Agtr1a 的促炎效应是通过激活信号通路来表达促炎介质, 如细胞因子、趋化因子和粘附分子等。ERK1/2 途径

由多种细胞表面受体 (如生长因子、细胞因子受体、G 蛋白偶联受体等) 激活, 其被磷酸化激活后转位入核, 调节 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子的表达^[8]。本文旨在证明 Agtr1a 通过激活 MAPK/ERK 通路调节 LPS 诱导的 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞炎症反应; 氯沙坦是一种血管紧张素 II 受体拮抗剂, 主要用于选择性阻断 AT1 受体^[9], 而 RNAi 则是通过特定靶点来降低 Agtr1a 的表达, 抑制 Agtr1a 活性或降低 Agtr1a 表达均能有效地降低由 LPS 诱导的 *Lbp*^{-/-} 小鼠肝细胞炎症反应, 为 LPS 所致的炎症治疗探索新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级健康雌性 *Lbp*^{-/-} 小鼠 10 只, SPF 级健康雌性 C57BL/6J 小鼠 4 只, 周龄为 6 ~ 8 周, 体重 20 ~ 22 g, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司【SCXK(鲁)2019 0003】, 饲养于山东省实验动物中心【SYXK(鲁)2019-0007】, 并经⁶⁰Co 灭菌。昼夜各半并循环照明, 温度控制在 22 ~ 25℃, 湿度 60% $\pm$ 5%, 饲养期间自由进食、进水。实验动物使用遵循 3R 原则, 所有实验操作均经山东省实验动物中心伦理审批 (SYDW20220403-1)。

1.1.2 主要试剂与仪器

LPS (sigma, L5418), 干扰 RNA (北京擎科生物科技公司合成), Losartan (Selleck, S1359), RNA 提取试剂盒 (Omega, R6934-02), Anti- β -actin (Cohension, CPA9100), Anti-ERK1/2 (Cohension, CPA1944), Anti-p-ERK (Cohension, CPA4924), Anti-AT1 (Cohension, CQA8011), Goat Anti-Rabbit IgG (Cohension, CSA1036), LipofectamineTM RNAiMAX 转染试剂 (Invitrogen, 13778-150)。显微镜 (ZEISS, 德国), 细胞培养箱 (Thermo, 德国), 酶标仪 (SpectraMax, 美国), 蛋白电泳和印迹系统 (Bio-Rad, 美国), 凝胶成像仪 (Bio-Rad, 美国) Nanodrop (Thermo, 德国), 荧光定量 PCR 仪 (Thermo, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 原代肝细胞的分离与提取

利用改良版两步灌注法提取 WT 型、*Lbp*^{-/-} 型小鼠原代肝细胞, 将小鼠麻醉后, 75% 乙醇皮肤消毒, 打开腹腔。用 37℃、pH = 7.4 的灌洗液 I (含有 0.375 g/L EGTA 的 D-Hanks 溶液) 按 20 mL/min 流速进行肝灌注约 30 mL, 灌入的同时剪开肝门静脉, 随后用灌洗液 II (含 0.5 g/L 胶原酶 IV 的高糖培养基) 灌注约 30 mL 至肝软塌出现破裂。剪下肝放置培养皿中, 加入 15 mL 完全培养基, 撕裂肝包膜, 形成肝细胞混悬液, 用 70 μ m 细胞网滤过, 收集滤液。600 r/min, 离心 3 min, 弃上清, 重复 3 次。加入新鲜细胞培养基混匀, 台盼蓝计数活细胞数 (活细胞数 > 80% 则用于后续实验)。接种细胞, 待细胞贴壁后更换培养液, 并进行后续实验。

1.2.2 细胞分组与 LPS 刺激炎症模型的构建

将 WT 型小鼠原代肝细胞分为对照组 (空白对照)、LPS 组 (LPS 刺激); *Lbp*^{-/-} 型小鼠原代肝细胞抑制剂法将细胞分为对照组 A (空白对照)、LPS 组 A (LPS 刺激)、抑制剂组 (氯沙坦干预 3 h 后加入 LPS 刺激); *Lbp*^{-/-} 型小鼠原代肝细胞 siRNA 转染法将细胞分为对照组 B (空白对照)、LPS 组 B (LPS 刺激)、阴性对照组 (si-NC 干扰 12 h 后加入 LPS 刺激)、干扰组 (si-agtr1a 干扰 12 h 后加入 LPS 刺激)。提取原代肝细胞后, 按照 70% 细胞满度铺于六孔板, 细胞贴壁过夜后, 各对照组不做处理, 其他组均加入 LPS 使其终浓度 10 μ g/mL, 刺激时间 12 h, 进行后续实验。

1.2.3 抑制剂处理原代肝细胞

提取 *Lbp*^{-/-} 型小鼠原代肝细胞, 按照 70% 细胞

满度铺于六孔板, 细胞培养贴壁过夜后, 于次日处理细胞, 对照组 A 不做处理, 抑制剂组中加入氯沙坦使其终浓度为 0.1 μ mol/L, 3 h 后于 LPS 组 A、抑制剂组中加入终浓度 10 μ g/mL LPS 刺激 12 h, 收集样品待用。

1.2.4 siRNA 转染细胞

提取 *Lbp*^{-/-} 型小鼠原代肝细胞, 按照 70% 细胞满度铺于六孔板, 细胞贴壁后将培养基更换成无双抗培养基, 过夜培养, 于次日进行细胞转染, 对照组 B 不做处理, 阴性对照组中加入终浓度为 50 nmol/L 的 si-NC, 干扰组中加入终浓度为 50 nmol/L 的 si-agtr1a, 6 ~ 8 h 后更换培养基, 转染 12 h 后 LPS 组 B、阴性对照组、干扰组中分别加入终浓度 10 μ g/mL LPS 处理 12 h, 收集样品待用。si-agtr1a 的靶向序列为: GCTTGGTGGTGATCGTCAT; 正义链为: 5'-GCUUGGUGGUGAUCGUCAU (dT) (dT) -3'; 反义链为: 5'-AUGACGAUACCACCAAGC (dT) (dT) -3'。

1.2.5 荧光定量 qPCR 检测相关基因表达

用 RNA 提取试剂盒提取各组细胞中 RNA, 逆转录法合成 cDNA, 用荧光定量 PCR 试剂盒进行 RT-qPCR 反应, 以 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算基因表达。Agtr1a 上游引物序列: 5'-CTAAGGCCATTCTACTTGGGGT-3', 下游引物序列: 5'-CGAGTGCAGATGCCGATGA-3'; β -actin 上游引物序列: 5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3', 下游引物序列: 5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'; IL-1 β 上游引物序列: 5'-GCAACTGTTCCTGAACTCAACT-3', 下游引物序列: 5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3'; TNF- α 上游引物序列: 5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3', 下游引物序列: 5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3'。

1.2.6 CCK-8 检测细胞存活率

将细胞以 1 $\times$ 10⁴ 个/孔接种于 96 孔板, 每组设 3 个复孔。10 μ g/mL LPS 刺激 12 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 继续培养, 3 h 后于酶标仪上测定 450 nm 波长处的吸光值。

1.2.7 Western Blot 法检测 LBP、Agtr1a、ERK、p-ERK 蛋白

取 3 组小鼠原代肝细胞, 加入 RIPA 裂解液 100 μ L 冰上充分裂解, 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min 取上清, 应用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度; 待测样本加入蛋白上样缓冲液, 100℃ 煮沸变性。取 25 μ g 蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳 (浓缩胶恒压 80 V

电 30 ~ 40 min, Marker 进入分离胶后 110 V 电泳至结束), 半干转法将蛋白转至 PVDF 膜(恒压 25 V, 电流 130 mA, 转膜 9 min)。5%脱脂奶粉 37℃ 封闭 2 h; 加入 LBP、Agtr1a、ERK、p-ERK 和 β -actin 一抗 (1 : 500 ~ 1 : 1000), 4℃ 孵育过夜, 1 × TBST 洗涤 3 次每次 15 min; 加入二抗 (1 : 3000 ~ 1 : 5000), 室温孵育 2 h, 1 × TBST 洗涤 3 次每次 15 min; 加入 ECL 化学发光液, 凝胶成像仪显影, 以 β -actin 为内参, 计算蛋白相对表达量。

1.3 统计学分析

实验数据采用 Graphpad 8. 4. 2 软件进行统计学分析, 结果用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较采用非配对 *t* 检验法进行差异分析, $P < 0. 05$ 为差异具有统计学意义; 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0. 05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞 LBP 蛋白表达量的鉴定

Western Blot 结果表明, $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞中 LBP 蛋白已敲除完全并不再表达, 见图 1。

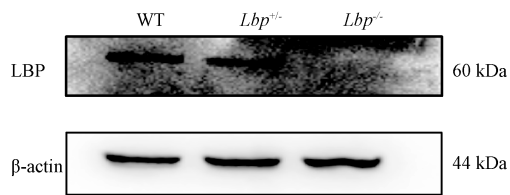


图 1 LBP 蛋白表达结果

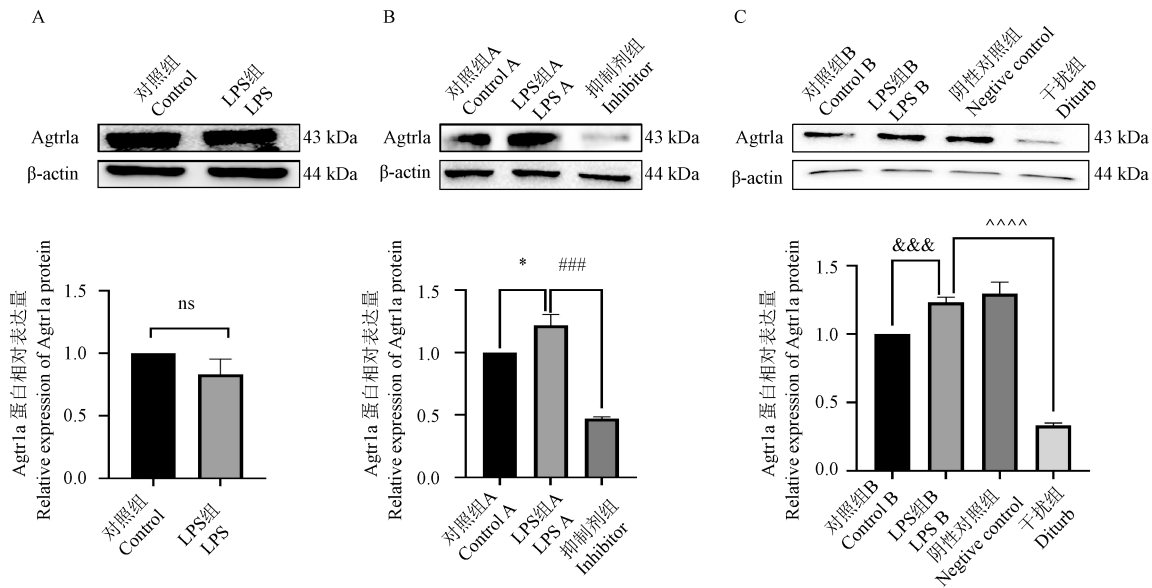
Figure 1 LBP protein expression result

2.2 LPS 刺激下 Agtr1a 表达的变化

Western Blot 结果表明, 野生型小鼠原代肝细胞在 LPS 刺激下 Agtr1a 蛋白表达量没有显著变化 ($P > 0. 05$), 如图 2A; $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞 LPS 刺激后 Agtr1a/ β -actin 的比值显著升高 ($P < 0. 05$), 加入抑制剂后其 Agtr1a 蛋白表达量显著降低 ($P < 0. 001$), 如图 2B; 加入干扰 RNA 后, Agtr1a 蛋白表达量显著降低 ($P < 0. 0001$), 如图 2C。

2.3 抑制 Agtr1a 对 $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞存活率的影响

CCK8 结果显示, 与 LPS 组相比, 抑制剂组细胞存活率显著上升 ($P < 0. 01$), 如图 3A; 干扰组细胞存活率虽有上升, 但无显著性变化, 如图 3B。



注: 与对照组 A 相比, * $P < 0. 05$; 与抑制剂组相比, ### $P < 0. 001$; 与对照组 B 相比, &&& $P < 0. 001$; 与干扰组相比, ~~~~ $P < 0. 0001$ 。

图 2 LPS 刺激条件下 Agtr1a 表达的变化

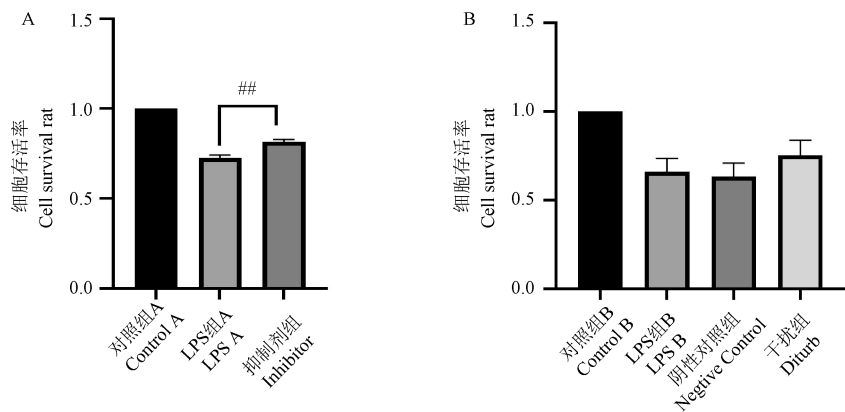
Note. Compared with the control group A, * $P < 0. 05$. Compared with the inhibitor group, ### $P < 0. 001$. Compared with the control group B, &&& $P < 0. 001$. Compared with the disturb group, ~~~~ $P < 0. 0001$.

Figure 2 Changes in Agtr1a expression under LPS stimulation

2.4 抑制 Agtr1a 蛋白表达对炎症因子的影响

荧光定量 PCR 结果显示, 加 LPS 刺激后, $Lbp^{-/-}$ 小鼠原代肝细胞炎症因子升高; 加入抑制剂氯沙坦后, 炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 表达量均显著降低 ($P <$

0. 0001; $P < 0. 01$), 即抑制剂抑制 Agtr1a 蛋白表达后, 能抑制炎症的发生, 如图 4A, 4B。同样, 将干扰 RNA 进行转染后, 炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 表达也会有显著性降低 ($P < 0. 01$), 如图 4C, 4D。

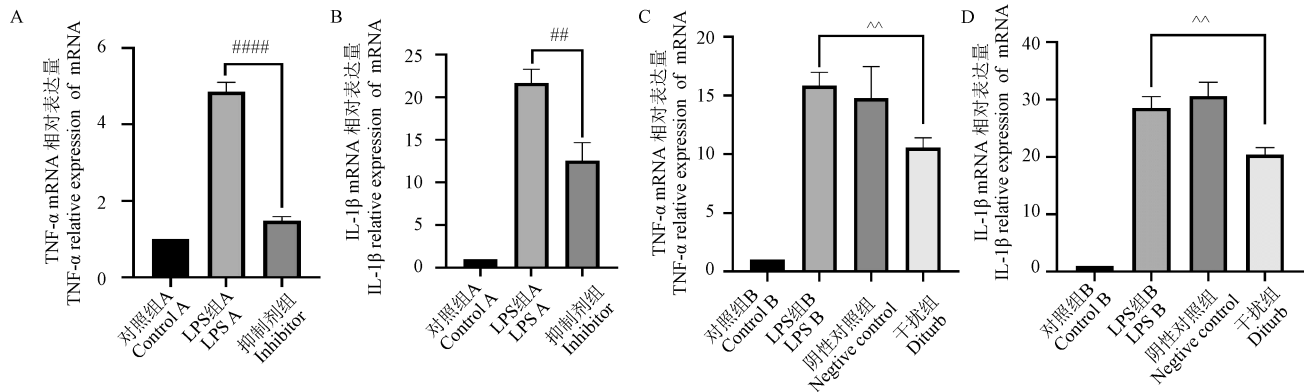


注: B: 加入干扰 RNA 后 CCK8 变化; 与抑制剂组相比, $^{##}P < 0.01$ 。(下图同)

图 3 抑制 Agtr1a 对 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞存活率的影响

Note. B. CCK8 changes after adding interfering RNA. Compared with the inhibitor group, $^{##}P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 3 Effect of inhibiting Agtr1a on survival rate of primary hepatocytes in *Lbp*^{-/-} mice



注: 与抑制剂组相比, $^{####}P < 0.0001$; 与干扰组相比, $^{~}P < 0.01$ 。

图 4 抑制 Agtr1a 蛋白表达对炎症因子的影响

Note. Compared with the inhibitor group, $^{####}P < 0.0001$. Compared with the disturb group, $^{~}P < 0.01$.

Figure 4 Effect of inhibitory Agtr1a protein expression on inflammatory cytokines

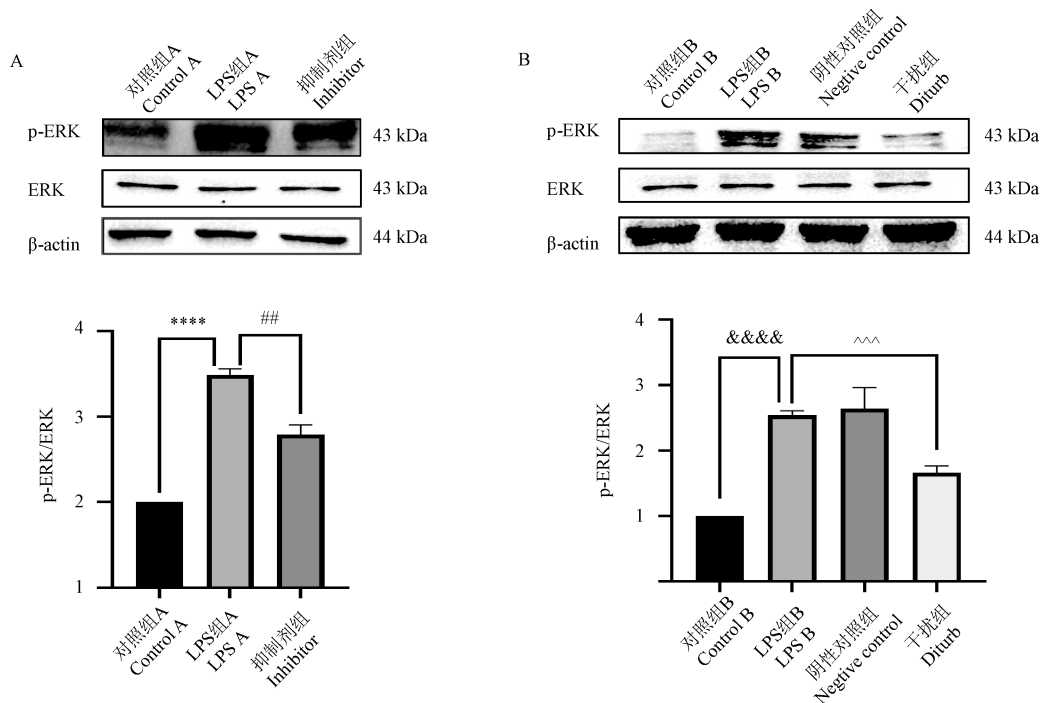
2.5 抑制 Agtr1a 蛋白表达对 p-ERK 蛋白表达的影响

在 LPS 刺激下, ERK 蛋白磷酸化显著升高 ($P < 0.0001$), 当加入抑制剂氯沙坦后 ERK 磷酸化显著性降低 ($P < 0.01$), 如图 5A。同样, 对原代肝细胞进行转染 si-agtr1a 后, ERK 磷酸化也显著性降低 ($P < 0.001$), 如图 5B。

3 讨论

LPS 是革兰氏阴性菌外膜的主要脂质成分, 也是细菌感染的先天免疫反应的主要启动物质^[10]。LBP 是一种由肝细胞产生的 60 kDa 急性期蛋白^[11]。分布细胞表面, 参与识别 LPS 的第一个蛋白质是 LBP。LBP-LPS 复合物被转移到 CD14 和 Toll 样受体 TLR4 簇, 以触发细胞炎症因子的释放, 即内

毒素血症^[12]。肝作为主要的代谢部位, 成为 LPS 攻击的重要靶器官, 高水平的血清 LPS 可引起肝细胞坏死和胆汁淤积, 从而导致严重的肝损伤, 严重的内毒素血症可并发败血症, 导致感染性休克^[13]。血清 LBP 浓度升高可作为细菌感染的早期诊断标志。在重症监护室 (ICU) 收治的成年患者中, 血清 LBP 浓度升高与菌血症或严重败血症和脓毒症休克的发生相关^[14]。临床上通过抗生素治疗影响 Toll 样受体反应来调节宿主免疫, 从而控制炎症以及增加细菌清除, 此种治疗手段杀死细菌的同时会释放细菌来源的壁碎片, 这导致了促炎级联的启动, 可能会对服用这些抗感染药物的患者造成更严重的伤害^[15]。宋子晨^[16]通过敲除 LBP, 从源头阻断 LPS 的传播, 可显著减低大鼠炎症反应。另有研究表示在 LPS 刺激下, 激活循环单核细胞既不需要 LBP 也



注:与对照组 A 相比,**** $P < 0.0001$;与对照组 B 相比,&&&& $P < 0.0001$,与干扰组相比,~ $P < 0.001$ 。

图 5 抑制 Agtr1a 蛋白表达对 p-ERK 蛋白表达的影响

Note. A. Compared with the control group A, **** $P < 0.0001$. B. Compared with the control group B, &&&& $P < 0.0001$. Compared with the disturb group, ~ $P < 0.001$.

Figure 5 Effect of inhibiting the expression of Agtr1a protein on the expression of p-ERK protein

不需要 CD14。目前尚不清楚这些情况下,LPS 刺激信号是通过 TLRs 簇受体介导,还是通过另一种尚未识别的途径介导的^[17],同时 Minter 等^[18]也有相似的发现,也证明了 *Lbp*^{-/-}小鼠和 WT 小鼠对照体内循环细胞因子表达相当,在外源性 LPS 递送后,*Lbp*^{-/-}小鼠和 WT 小鼠分离的 Kupffer 细胞上,LPS 受体 TLR4、CD14 和 CD18 的细胞因子表达相当,尚不清楚这是否代表敲除小鼠产生了代偿机制。目前,在对 LBP 蛋白敲除的基础上研究 LPS 刺激的炎症反应鲜有报道,因此寻找 LBP 敲除后替代 LBP 传递 LPS 刺激信号的代偿途径,将有助于开发新的治疗方案用于由 LPS 诱导引起的内毒素血症。

Agtr1a 作为一种细胞表面的 GPCR 蛋白,可以触发 G 蛋白独立的第二信使信号,激活许多细胞内蛋白激酶,包括蛋白激酶 C(PKC)、丝裂原活化蛋白激酶 MAPKs,MAPK 是慢性损伤时被激活的细胞内信号蛋白^[19]。Agtr1a 缺陷小鼠实验中表明 AT1a 受体在受损肝中介导 MAPK 的激活,介导氧化应激的发展和 ERK、c-Jun 的磷酸化。目前的研究表明 AT1a 受体在肝纤维形成中起着重要作用,缺乏 AT1a 受体的小鼠对纤维化刺激后炎症和纤维化的

发展具有抗性^[20]。另有实验证明阻断 AT1 受体,即使用 AT1 siRNA 可明显抑制肝癌细胞增殖和炎症反应^[21],Zhao 等^[22]利用血管紧张素 II 受体抑制剂氯沙坦改善了由血管紧张素诱导的肝细胞 CRP 的表达,降低了肝炎症。以上实验均表明,Agtr1a 有介导肝损伤的作用,抑制其受体的表达均会对肝损伤有改善。

本研究对 *Lbp*^{-/-}小鼠原代肝细胞进行 LPS 刺激时,发现 Agtr1a 蛋白的表达量显著上升,在分别加入 Agtr1a 抑制剂氯沙坦、si-Agtr1a 后,Agtr1a 蛋白的表达量显著下降,ERK 磷酸化呈现显著性降低,同时与 ERK 相关的炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 也显著性下降,Agtr1a 在 *Lbp*^{-/-}小鼠原代肝细胞炎症的发生与发展中起着一定的作用,而对野生型小鼠原代肝细胞进行 LPS 刺激时,Agtr1a 的表达量并无显著性变化,由此猜想,Agtr1a 通过激活 ERK 蛋白的磷酸化从而促使了 *Lbp*^{-/-}小鼠原代肝细胞炎症的发生,Agtr1a 起到代偿 LBP 蛋白的作用。两种抑制方法相比较而言,利用 si-Agtr1a 有更好的炎症抑制效果,而使用抑制剂氯沙坦既可以抑制炎症也能提高细胞生存率,如 Chan 等^[23]在急性肝损伤中应用 AT1

受体抑制剂氯沙坦作为治疗方案,结果表明氯沙坦治疗可以防止急性肝损伤的进展并使得细胞存活率升高、肝酶的减少、肝组织学的得到改善,同时本实验也验证了使用抑制剂氯沙坦不仅可以降低肝细胞炎症,还能提高细胞的存活率,这也许是氯沙坦本身特性,其具体机制还有待探究。本研究对炎症的降低程度还有待提高,或许还有其他代偿途径需要进一步探索,也许可以通过联合用药的方式来使 LPS 诱导的炎症有更大程度的降低,为临床上治疗内毒素血症提供有效的参考。

参 考 文 献(References)

- [1] Meng L, Song Z, Liu A, et al. Effects of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) single nucleotide polymorphism (SNP) in infections, inflammatory diseases, metabolic disorders and cancers [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 681810.
- [2] Jerala R. Structural biology of the LPS recognition [J]. *Int J Med Microbiol*, 2007, 297(5): 353–363.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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 SD, Fu B, Guo ZK, et al. Construction of lipopolysaccharide binding protein knockout mice using CRISPR/Cas9 technology [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2022, 42(4): 294–300.
- [6] Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, et al. Angiotensin II signal transduction: an update on mechanisms of physiology and pathophysiology [J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(3): 1627–1738.
- [7] Czepiel M, Diviani D, Jazwa-Kusior A, et al. Angiotensin II receptor 1 controls profibrotic Wnt/ β -catenin signalling in experimental autoimmune myocarditis [J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(2): 573–584.
- [8] 尹嘉玉. 海参岩藻聚糖改善 LPS 诱导的 C57BL/6J 小鼠急性肝损伤的机制 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学; 2020.
Yin JY. The mechanism of the fucoidan from sea cucumber *Apostichopus japonicus* on attenuating lipopolysaccharide-challenged liver injury in C57BL/6J mice [D]. Harbin: Harbin University of Commerce; 2020.
- [9] Al-Majed AR, Assiri E, Khalil NY, et al. Losartan: comprehensive profile [J]. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*, 2015, 40: 159–194.
- [10] Wurfel MM, Monks BG, Ingalls RR, 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.
- [11] Su GL, Klein RD, Aminlari A, et al. Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats: role for lipopolysaccharide binding protein and toll-like receptor 4 [J]. *Hepatology*, 2000, 31(4): 932–936.
- [12] Mohammad S, Thiemermann C. Role of metabolic endotoxemia in systemic inflammation and potential interventions [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 594150.
- [13] Li T, Bai J, Du Y, et al. Thiamine pretreatment improves endotoxemia-related liver injury and cholestatic complications by regulating galactose metabolism and inhibiting macrophage activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 108: 108892.
- [14] Zweigner J, Schumann RR, Weber JR. The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response [J]. *Microbes Infect*, 2006, 8(3): 946–952.
- [15] Meade KG, O'Farrelly C. β -defensins: farming the microbiome for homeostasis and health [J]. *Front Immunol*, 2019, 9: 3072.
- [16] 宋子晨. LBP 通过 mTOR 信号通路抑制脓毒症大鼠肝细胞线粒体损伤 [D]. 合肥: 安徽医科大学; 2020.
Song ZC. Protected hepatic mitochondria from sepsis-induced damage via mTOR signaling pathway in rat sepsis model [D]. Hefei: Anhui Medical University; 2020.
- [17] Heumann D, Adachi Y, Le Roy D, et al. Role of plasma, lipopolysaccharide-binding protein, and CD14 in response of mouse peritoneal exudate macrophages to endotoxin [J]. *Infect Immun*, 2001, 69(1): 378–385.
- [18] Minter RM, Bi X, Ben-Josef G, et al. LPS-binding protein mediates LPS-induced liver injury and mortality in the setting of biliary obstruction [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 296(1): G45–G54.
- [19] Morrell NW, Upton PD, Kotecha S, et al. Angiotensin II activates MAPK and stimulates growth of human pulmonary artery smooth muscle via AT1 receptors [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(3): L440–L448.
- [20] Yang L, Bataller R, Dulyx J, et al. Attenuated hepatic inflammation and fibrosis in angiotensin type 1a receptor deficient mice [J]. *J Hepatol*, 2005, 43(2): 317–323.
- [21] Ji Y, Wang Z, Li Z, et al. Angiotensin II enhances proliferation and inflammation through AT1/PKC/NF- κ B signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(1): 13–32.
- [22] Zhao J, Liu J, Pang X, et al. Angiotensin II induces C-reactive protein expression via AT1-ROS-MAPK-NF- κ B signal pathway in hepatocytes [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(3): 569–580.
- [23] Chan H, Leung PS, Tam MSC. Effect of angiotensin AT1 receptor antagonist on d-galactosamine-induced acute liver injury [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007, 34(10): 985–991.