

重组腺病毒对小鼠肝脏能量代谢的影响

李文丽,林燕蝶,陈浩,李皓*

(南京医科大学病理生理学系,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**探讨重组腺病毒感染小鼠肝脏后,对肝脏的能量代谢和氧化应激水平的影响。**方法:**将 Balb/c 小鼠随机分为正常组及重组腺病毒感染组,通过小鼠尾静脉注射含编码绿色荧光蛋白(GFP)外源基因的重组腺病毒,利用荧光显微镜观察 GFP 在肝脏的表达水平;检测血浆中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、葡萄糖、胆固醇、甘油三酯、 β -羟丁酸(β -HB)、成纤维细胞生长因子(FGF-21)、丙二醛(MDA)等水平;测定肝脏糖原含量;检测肝脏组织中参与糖异生、脂质合成、脂肪酸氧化等基因的表达水平。**结果:**重组腺病毒主要在小鼠肝脏表达,并于注射后第 5 天表达最高。与对照组小鼠比较,重组腺病毒感染小鼠的血浆中 ALT、AST 明显升高, β -HB 和 FGF-21 呈升高趋势。Real-time PCR 检测发现,重组腺病毒感染小鼠的肝脏组织中,参与糖异生及脂质合成的基因 mRNA 水平明显降低,而脂肪酸氧化相关基因的 mRNA 水平明显升高。此外,重组腺病毒感染后,小鼠血浆 MDA 及肝脏中氧自由基产生基因的表达水平明显增高。**结论:**小鼠肝脏在感染重组腺病毒后,糖异生及脂质合成能力下降,而脂肪酸氧化增强。这种能量代谢的改变可能与重组腺病毒感染引起的氧化应激有关。

[关键词] 重组腺病毒;氧化应激;糖异生;脂肪酸氧化

[中图分类号] R373.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)04-445-05

doi:10.7655/NYDXBNS20150402

Hepatic energy metabolism of mouse infected by recombinant adenovirus

Li Wenli, Lin Yandie, Chen Hao, Li Hao*

(Department of Pathophysiology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the alterations of energy metabolism and oxidative stress in mouse liver after infection of recombinant adenovirus. **Methods:** Seven-week-old male Balb/c mice were randomly assigned to control and adenovirus infection groups. Recombinant adenovirus encoding green fluorescent protein(GFP) or phosphate-buffered saline(PBS) was delivered by tail vein injection. Tissue distribution of GFP was determined by fluorescence microscopy. The levels of alanine transaminase(ALT), aspartate amino transferase(AST), glucose, cholesterol, triglyceride, β -hydroxybutyrate(β -HB), fibroblast growth factor-21(FGF-21) and malondialdehyde(MDA) in plasma as well as hepatic glucogen contents were detected 5 days after injection. Hepatic expressions of genes involved in gluconeogenesis, lipogenesis and fatty acid oxidation were examined by quantitative real-time PCR. To determine the oxidative stress levels in mice, MDA in blood and hepatic mRNA expression levels of reactive oxygen species(ROS)-generating or antioxidant genes were also examined. **Results:** The expression of GFP delivered by tail vein injection was mainly in the liver of mice, with the highest levels at 5 days after injection. Compared with the control mice, adenovirus infection led to an obvious increase of ALT and AST in plasma of mice in the adenovirus infection group. The levels of β -HB and FGF-21 were also elevated. Analysis of the liver transcripts indicated that genes implicated in fatty acid oxidation were increased while those involved in lipogenesis and gluconeogenesis pathways were suppressed by adenovirus infection. Besides, hepatic levels of ROS were also increased. **Conclusion:** Our findings indicate that adenovirus infection improved fatty acid oxidation and inhibited gluconeogenesis and lipogenesis. The alterations of energy metabolism may be mediated by the increased oxidative stress in liver after adenovirus infection.

[Key words] recombinant adenovirus; oxidative stress; gluconeogenesis; fatty acid oxidation

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(04): 445-449, 474]

[基金项目] 国家自然科学基金(81070678)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: haoli@njmu.edu.cn

重组腺病毒是一种具有易于制备和高效表达的病毒载体,在生物医学研究中得到了广泛的应用。通过小鼠尾静脉注射重组腺病毒,实现目的基因在小鼠肝脏的高表达,是在体研究外源性基因对肝脏功能影响的常用方法^[1]。但是,由于重组腺病毒的免疫原性较强,可引起机体的免疫反应,且重组腺病毒本身具有细胞毒性作用^[1],因此,重组腺病毒感染小鼠肝脏后常引起肝脏的损伤和炎症反应。肝脏是重要的代谢器官,在葡萄糖和脂肪酸的有氧氧化、糖异生、脂质合成等方面具有重要作用。研究表明,不同病因导致肝脏受损时,肝脏的能量代谢状态也会发生改变。重组腺病毒感染对小鼠肝脏能量代谢的影响目前尚无报道。本研究主要探讨了重组腺病毒感染后小鼠肝脏在糖、脂代谢和氧化应激等方面的变化,为全面了解重组腺病毒的生物学功能,评价重组腺病毒介导的外源基因对肝脏能量代谢的作用研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级健康雄性 Balb/c 小鼠,7 周龄,体重 20~25 g,由南京医科大学实验动物中心提供。DMEM 培养基(Gibco 公司,美国),胎牛血清(杭州四季青生物公司),免疫组化试剂苏木素及伊红染液、PAS 染色试剂盒、转氨酶检测试剂盒、胆固醇及甘油三酯检测试剂盒、 β -羟丁酸(β -HB)检测试剂盒(南京建成有限公司),成纤维细胞生长因子(FGF21)酶联免疫吸附测定试剂盒(武汉 Elabscience 有限公司),人胚肾细胞 293A(南京 KeyGEN 公司)。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒的包装、扩增和滴度测定

以 GFP 表达质粒为模板,将腺病毒载体 pAd/CMV/V5-DEST 线性化后,用 BP 和 LR 重组系统构建重组腺病毒质粒。用该质粒转染 293A 细胞,24~48 h 后观察细胞生长状态,待细胞出现明显的病毒斑,大量细胞崩解脱落,收集细胞并反复冻融,离心收集上清即为重组腺病毒液。用此病毒液感染 293A 细胞进行扩增,并采用 Adeno-X™ Virus Purification Kit (BD Biosciences, Clontech 公司,美国)系统进行纯化。以上步骤由上海吉凯基因公司完成。病毒的滴度测定采用 50%组织培养感染剂量法(TCID₅₀法),即将病毒从 1×10^{-3} 稀释至 1×10^{-12} ,接种生长于 96 孔培养皿的 293A 细胞,每个滴度接种 10 孔,37℃培养 10 d,显微镜观察细胞,计数每排出

现细胞病变效应的孔数,计算出腺病毒的滴度。

1.2.2 实验分组及尾静脉注射

将 Balb/c 小鼠分为两组,一组通过尾静脉注射 2×10^9 PFU/ml 的腺病毒,另一组小鼠尾静脉注射等量生理盐水作为对照组。分别在注射后 3、5、10 d 处死小鼠,取肝、心、肺、肾等组织进行冰冻切片,观察绿色荧光表达情况。收集血浆和肝组织用于后续实验。

1.2.3 血浆生化检测

取小鼠全血,以 5 000 r/min 离心 15 min,取上清,按试剂盒说明书的步骤,用比色法检测血浆丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、胆固醇、甘油三酯、 β -HB 及丙二醛(MDA)含量。

1.2.4 酶联免疫吸附法检测血浆 FGF-21

取小鼠全血,以 5 000 r/min 离心 15 min,取上清,每孔加入 100 μ l,37℃孵育 90 min,弃去液体,每孔加入生物素抗体 100 μ l,37℃孵育 60 min,弃去液体,甩干,洗板,每孔加入酶结合物工作液 100 μ l,37℃温育 30 min,弃去液体,甩干,洗板,加底物溶液 15 min 后加终止液显色,于 450 nm 波长测吸光度值。

1.2.5 Real-time PCR 检测

TRIzol 法提取肝组织总 RNA,用 TaqMan 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,引物(序列见表 1)由上海英俊生物有限公司合成。Real-time PCR 应用 SYBR Premix ExTaq™ (TaKaRa 公司,日本),反应体系:SYBY Premix ExTaq™ 10 μ l,模板 5 μ l,引物 2.5 μ l,灭菌蒸馏水 2.5 μ l。反应条件:95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃ 30 s,循环 40 次。用 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 进行检测,分析扩增曲线和分离曲线,处理数据,得出结果。

1.2.6 冰冻切片和荧光检测

取组织于 4%多聚甲醛固定,蔗糖梯度脱水,OCT 包埋。将组织标本用冰冻切片机制成 5 μ m 厚切片,在荧光显微镜下观察。

1.2.7 糖原染色

石蜡切片脱蜡至水,蒸馏水洗,过碘酸酒精作用 10 min,自来水冲洗 10 min,Schiff 氏液 10 min,流水冲洗 5 min,苏木素染核 3 min,流水冲洗 5 min,封片观察。

1.2.8 HE 染色

取各组肝组织标本制成 5 μ m 厚的石蜡切片,

二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,苏木素染色 5 min,流水冲洗 10 min,1%盐酸脱色,流水冲洗 10 min,伊红染色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。在普通光学显微镜下观察各组小鼠肝组织病理变化。

1.3 统计学方法

每组实验都独立重复 3 次。采用 SPSS13.0 统计软件,分析结果以均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示,两组间比较采用 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

表 1 实时定量 PCR 引物名称及序列

Table 1 Name and sequence of real-time RT-PCR primers

名称(鼠源)	序列(5'→3')	产物长度(bp)
Gpx-1(glutathione peroxidase-1)	F:CCAGGAGAATGGCAAGAATGA R:TCTCACCATTCACTTCGCACTT	91
Sod2(superoxide dismutase2)	F:TCCCAGACCTGCCTTACGACTAT R:GGTGGCGTTGAGATTGTTCA	113
Nrf2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2)	F:TAGATGACCATGAGTCGCTTGC R:GCCAAACTTGCTCCATGTCC	53
Nox2(NADPH oxidase 2)	F:GAAAACTCCTTGGGTCAGCACT R:ATTTTCGACACACTGGCAGCA	95
FAS(fatty acid synthase)	F:CTGCGGAAACTTCAGGAAATG R:GGTTCGGAATGCTATCCAGG	287
CD36(cluster of differentiation 36)	F:GAACCACTGCTTTCAAAAAGCTGG R:TGCTGTTCTTTGCCACGTCA	102
UCP-2(uncoupling protein-2)	F:ATGGTTGGTTTCAAGGCCACA R:TTGGCGGTATCCAGAGGGAA	83
FGF-21(fibroblast growth factor-21)	F:AAGACACTGAAGCCCACCTG R:CTGCAGGCCTCAGGATCAAAA	181
PCK-1(phosphoenolpyruvate carboxykinase-1)	F:CTGCATAACGGTCTGGACTTC R:GCCTTCCACGAACCTCCTCAC	65
PGC-1a(PPAR coactivator protein-1 a)	F:CGGAAATCATATCCAACCAG R:TGAGGACCGCTAGCAAGTTTG	93
SCD-1(stearoyl-CoA desaturase-1)	F:TTCTTGCGATACTCTGGTGC R:CGGGATTGAATGTTCTTGTCTGT	164
PDK-4(pyruvate dehydrogenase kinase-4)	F:CCGCTTAGTGAACACTCCTTC R:TGACCAGCGTGTCTACAAACT	136

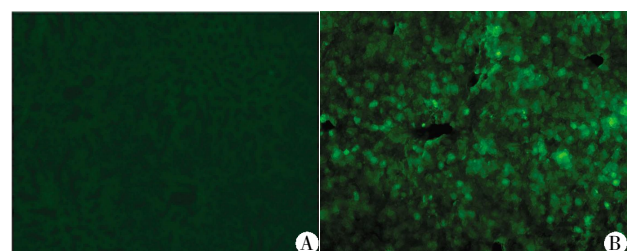
2 结果

2.1 重组腺病毒的表达特点

经小鼠尾静脉注射表达 GFP 的腺病毒(Ad-GFP)后,分别在注射后 3、5、10 d 取肝、心、肺、肾等组织进行冰冻切片,观察绿色荧光表达情况。发现, GFP 在肝脏有显著表达,而心、肺、肾等组织几乎无明显荧光,与文献报道相一致。在肝脏组织,注射后 3 d 即可观察到 GFP 的表达,5 d 时荧光强度最大,10 d 后 GFP 表达明显下降(图 1)。在后续实验中,取注射 5 d 后的肝脏组织以及血浆进行相关检测。

2.2 重组腺病毒感染导致肝脏损伤

与对照组相比,重组腺病毒感染组小鼠血浆 ALT 及 AST 水平显著升高(图 2A)。将肝组织切片进行 HE 染色,可见腺病毒感染后 5 d,小鼠的肝细胞发



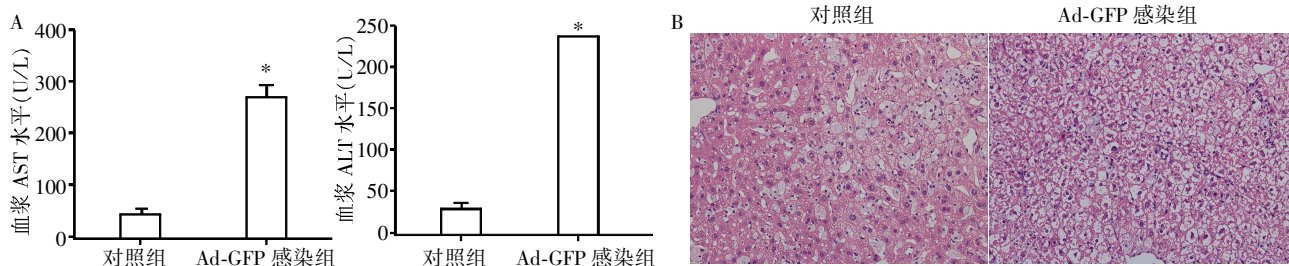
A: 在尾静脉注射 5 d 后,取小鼠肝脏组织进行冰冻切片,在荧光显微镜下观察,对照组小鼠肝脏组织无 GFP 表达;B: 重组腺病毒感染组小鼠肝脏组织的冰冻切片,可观察到明显的绿色荧光($\times 100$)。

图 1 重组腺病毒 Ad-GFP 表达蛋白的荧光鉴定

Figure 1 Expression of GFP in mice livers infected with recombinant adenovirus was confirmed by fluorescence microscope

生肿胀和空泡化,肝索排列发生紊乱(图 2B)。上述结果表明,重组腺病毒感染对小鼠的肝脏有损伤作用。

2.3 重组腺病毒感染对肝脏能量代谢的影响



A: 与对照组相比,重组腺病毒感染组小鼠血浆 ALT 及 AST 水平显著升高,与对照组相比, * $P < 0.01$ ($n=4$); B: 将肝组织进行 HE 染色显示,重组腺病毒感染 5 d 后,小鼠的肝细胞发生肿胀和空泡化,结构发生紊乱($\times 200$)。

图 2 重组腺病毒感染导致小鼠肝脏损伤

Figure 2 Adenoviral delivery of GFP to mouse liver caused an obvious liver injury

尾静脉注射后 5 d, 两组小鼠的体重没有差异, 血浆的葡萄糖、胆固醇和甘油三酯水平无明显差异, β -HB 含量升高, 提示脂肪酸氧化增强(表 2)。为明确腺病毒感染后肝脏能量代谢的特点, 提取小鼠肝脏组织 mRNA, 检测了糖、脂代谢相关基因的表达水平。结果显示, 与对照组小鼠相比, 重组腺病毒感染后, 肝脏中参与糖异生的基因 PCK-1 和 PGC-1a 明显下降, 与脂质合成相关的基因 FAS 和 SCD-1 显著减少, 而与脂肪酸转运和氧化相关的基因 PDK-4、UCP-2、CD36 等表达明显上升(图 3A)。肝组织糖原含量检测和 PAS 染色均显示, 重组腺病毒感染后, 肝糖原含量明显减少, 与基因表达的改变相一致(图 3B、C)。文献报道, 肝脏分泌的 FGF-21 在脂肪酸氧化和酮体生成中有重要作用^[2]。检测了小鼠血浆 FGF-21 水平, 发现重组腺病毒感染组小鼠血浆 FGF-21 呈升高趋势(表 2), 肝组织中 FGF-21 mRNA 较对照组明显增加(图 3A), 提示重组腺病毒感染引起的脂肪酸氧化增强可能与 FGF-21 表达上调有关。

2.4 重组腺病毒感染导致氧化应激增强

文献报道, FGF-21 的表达增加与细胞的应激状

表 2 对照组和 GFP 组小鼠体重及血浆中代谢指标的比较
Table 2 Body weight and serum measurement of the control and Ad-GFP mice

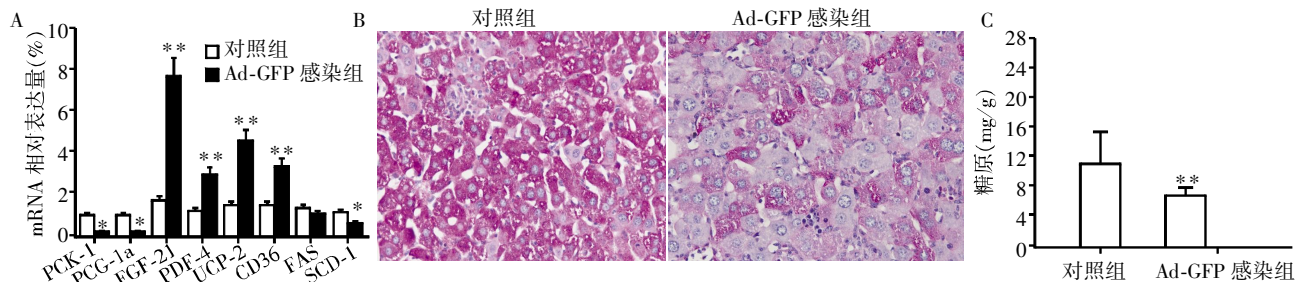
指标	对照组	Ad-GFP 感染组
体重(g)	24.3 \pm 0.5	24.1 \pm 0.3
血糖(mg/dl)	118.2 \pm 14.6	109.0 \pm 7.9
β -HB (μ mol/L)	128.1 \pm 13.2	263.0 \pm 22.9*
甘油三酯(mg/dl)	94.9 \pm 8.7	103.2 \pm 25.2
总胆固醇(mg/dl)	126.2 \pm 12.1	130.0 \pm 14.2
FGF-21(pg/ml)	35.1 \pm 0.4	56.5 \pm 0.5

与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

态有关^[3]。因此, 检测了血浆中脂质过氧化的产物丙二醛(MDA), 结果显示, 重组腺病毒感染组小鼠血浆 MDA 的水平明显升高(图 4A), 提示活性氧自由基的产生增多。通过对肝脏组织 mRNA 的 realtime PCR 检测发现, 与活性氧产生有关的 Nox2 基因 mRNA 水平增高, 抗氧化应激的基因 Gpx-1、Nrf2 表达下调(图 4B)。以上结果提示, 重组腺病毒感染导致的肝脏能量代谢变化可能与其引起的氧化应激增强有关。

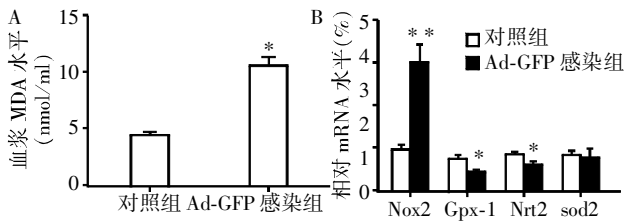
3 讨论

重组腺病毒是利用质粒间重组的方法对传统



A: 提取小鼠肝脏组织 mRNA 检测发现, 参与糖异生的基因 PCK-1、PGC-1a 及脂质合成的基因 FAS、SCD-1 mRNA 水平明显降低, 而脂肪酸氧化相关的 FGF-21、PDK-4、UCP-2、CD36 的 mRNA 水平明显升高; B: 肝组织 PAS 染色显示, 重组腺病毒感染后, 肝糖原含量明显减少($\times 200$); C: 糖原组织含量检测发现, 与对照组相比, 重组腺病毒感染组小鼠肝脏组织糖原明显减少。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=8$)。

图 3 重组腺病毒 Ad-GFP 感染下调糖异生及脂肪合成水平, 增强脂肪酸氧化的水平, 同时减少了肝脏组织中糖元的含量
Figure 3 Hepatic expression of Ad-GFP increased expression of genes in fatty acid oxidation pathways and reduction in lipid synthesis and gluconeogenesis pathways and led to a decrease of glycogen levels



A: 与对照组相比,重组腺病毒感染肝脏后小鼠血浆 MDA 的水平明显升高;B: 肝脏组织 mRNA 的 real-time PCR 检测发现,与活性氧产生有关的 Nox2 基因 mRNA 表达水平增多,抗氧化应激的基因 Gpx-1、Nrf2 表达下调。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=8$)。

图 4 感染重组腺病毒 ADV-GFP 小鼠肝脏中活性氧生成增多,抗氧化基因表达降低

Figure 4 Reactive oxygen species was significantly increased and expression of antioxidant genes were impaired with expression of ADV-GFP in mice livers

腺病毒进行改造而产生的复制缺陷型腺病毒。与传统的腺病毒相比,重组腺病毒的免疫反应较弱,具有更好的安全性,在生物医学研究和基因相关疾病的治疗中应用非常广泛。但是,由于重组载体内存在一定量的病毒基因,所以感染后所引发的机体炎症反应和免疫反应无法从根本上消除。Zhou 等^[4]的报道早已指出,腺病毒载体在临床应用中会遇到由于腺病毒本身表达的病毒蛋白质引起宿主的炎症和免疫反应,导致感染细胞丢失、外源基因表达短暂等问题,但是对腺病毒载体在体内表达后对能量代谢的影响关注很少。

肝脏受到损伤后,其能量代谢状态也会发生改变。Xu 等^[5]研究发现,酒精引起急性肝损伤时,由于破坏了肝细胞线粒体的功能,减弱了线粒体的氧化呼吸作用,葡萄糖和脂肪酸的有氧氧化过程都明显受到抑制。对乙酰氨基酚(APAP)和四氯化碳(CCl_4)所致的急性肝损伤也表现出相似的代谢变化^[6-7]。Ambade 等^[8]的研究显示,酒精所致的肝损伤造成了肝脏脂肪堆积,脂肪酸的合成增多而氧化减少。与上述结果不同,本研究发现,重组腺病毒感染引起的肝损伤导致肝脏的糖异生和脂质合成的抑制,而脂肪酸氧化则显著增强,即肝脏减少了对糖的利用而更多地依靠脂肪氧化产生能量。本文推测,肝脏糖异生减少可能与重组腺病毒感染导致的肝细胞破坏有关,而脂肪酸氧化的增强则对糖利用的减少起到了代偿作用。

以往的研究显示,由肝细胞合成并分泌到血液中的 FGF-21 在调节脂肪酸氧化和酮体生成等方面有重要作用^[2]。例如,禁食引起的脂肪酸氧化和酮体生成的增多依赖于 FGF-21 的表达^[9]。本研究在重组

腺病毒感染小鼠的血浆和肝组织中均检测到 FGF-21 的水平增加,因此,本文推测,重组腺病毒感染后脂肪酸氧化的增强可能与 FGF-21 的表达增多有关,研究已证实,氧化应激可以上调 FGF-21 的表达^[3]。除此之外,重组腺病毒感染后增强肝脏的脂肪酸氧化也有可能和肝脏利用糖的能力减弱存在一定关系。本研究发现,重组腺病毒感染后肝脏的氧化应激增强,推测 FGF-21 表达的上调可能是氧化应激介导的。

研究表明,小鼠肝脏在感染重组腺病毒后,能量代谢发生改变,糖异生及脂质合成减少,脂肪酸氧化增强。这种能量代谢的改变可能与重组腺病毒感染引起氧化应激进而导致 FGF-21 的表达增多有关。本研究提示,在探讨由重组腺病毒介导的外源基因对肝脏能量代谢的影响时,对腺病毒载体感染本身引起的代谢变化应予以充分考虑和排除。

[参考文献]

- [1] Young LS, Mautner V. The promise and potential hazards of adenovirus gene therapy [J]. Gut, 2001, 48(5): 733-736
- [2] Coskun T, Bina HA, Schneider MA, et al. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice [J]. Endocrinology, 2008, 149 (12): 6018-6027
- [3] Ye D, Wang Y, Li H, et al. Fibroblast Growth factor 21 protects against acetaminophen-Induced hepatotoxicity by potentiating peroxisome proliferator-activated receptor coactivator protein-1 α -mediated antioxidant capacity in mice [J]. Hepatology, 2014, 60(3): 977-989
- [4] Zhou M, Osanai K, Kobayashi M, et al. Adenovector-mediated gene transfer of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 attenuates oleic Acid-induced acute lung injury in rats [J]. Crit Care Med, 2014, 42(11): 716-724
- [5] Xu T, Zheng L, Xu L, et al. Protective effects of dioscin against alcohol induced liver injury [J]. Arch Toxicol, 2014, 88(9): 739-753
- [6] Lu Y, Sun J, Petrova K, et al. Metabolomics evaluation of the effects of green tea extract on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 62 (7): 707-721
- [7] Li X, Zhang F, Wang D, et al. NMR-based metabolomic and quantitative real-time PCR in the Profiling of metabolic changes in carbon tetrachloride-induced rat liver injury [J]. J Pharma Biomed Anal, 2014, 89(8): 42-49
- [8] Ambade A, Catalano D, Lim A, et al. Inhibition of heat shock protein 90 alleviates steatosis and macrophage activation in murine alcoholic liver injury [J]. J Hepatol, 2014, 61(2): 303-312