

转脂蛋白基因小鼠的研究进展

杨 和 平

(衡阳医学院分子生物学研究中心, 衡阳 421001)

摘要 动脉粥样硬化常出现脂蛋白异常。转脂蛋白基因小鼠模型的建立,可在活体水平上研究动脉粥样硬化的发病机理,给脂蛋白基因的表达和调控提供了新的研究途径。本文就转脂蛋白 E、载脂蛋白 A-I、载脂蛋白 C-Ⅱ、载脂蛋白(a)、胆固醇酯转运蛋白和低密度脂蛋白受体基因小鼠的研究新进展作一介绍。

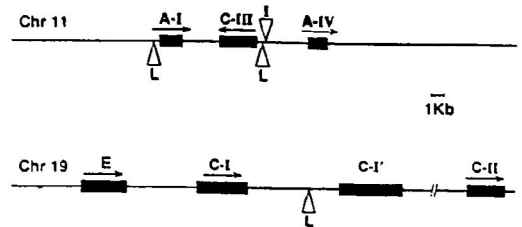
关键词 脂蛋白; 转基因; 小鼠

脂蛋白是一种复合颗粒,包括脂质和蛋白质,运输内源性和外源性脂质。有五种脂蛋白颗粒:从最小至最大依次为高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、中间密度脂蛋白(intermediate density lipoprotein, IDL)、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)和乳糜微粒。动脉粥样硬化常伴有脂蛋白水平的变化。近些年来,与血脂相互作用的蛋白质的基因已被克隆。有 17 种脂蛋白运输蛋白(lipoprotein transport proteins),包括载脂蛋白、脂蛋白加工蛋白(lipoprotein-processing proteins)和脂蛋白受体(附表)。脂蛋白运输基因(lipoprotein transport genes)已广泛应用于转基因动物^[1,2],而且对转基因动物体内脂蛋白运输基因的表达和调控以及对脂蛋白代谢的影响作了大量研究,取得了重要进展。

附表 17 种脂蛋白运输蛋白

载脂蛋白 A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E
脂蛋白加工蛋白
脂蛋白脂酶
肝脂酶
卵磷脂胆固醇乙酰转移酶
胆固醇酯转运蛋白
脂蛋白受体
低密度脂蛋白受体
乳糜微粒残粒受体
清道夫受体

脂蛋白运输基因分为二类:一类定位于染色体 11q²³,有 A-I、C-Ⅱ和 A-Ⅳ。C-Ⅱ基因与其他二种基因转录方向相反。A-I 和 C-Ⅱ主要在肝和小肠中表达,而 C-Ⅳ基因仅在小肠中表达。A-I 和 C-Ⅱ的肝调控区(liver control regions)直接位于其基因的 5'端,而 C-Ⅱ和 A-Ⅳ之间的区域调控这些基因在小肠中表达;第二类脂蛋白运输基因定位于染色体 19q¹³,由 E、C-I 和 C-Ⅱ组成,基因转录在同一方向,在 C-I 和 C-Ⅱ基因之间有一段假基因,上述三种基因主要在肝脏中表达,在 C-I 基因和 C-Ⅱ假基因之间的一段 150 bp 区域为上述基因在肝脏高表达所必需(图 1),通过转基因小鼠,明确了 A-I、C-Ⅱ、C-Ⅲ和 N 的小肠调控元件(intestinal control element)和 E、C-A、C-Ⅱ的肝调控元件(liver control element)。



附图: 载脂蛋白基因转录组织特异性调节^[2]。

染色体 11 中,肝调控区(L)位于编码载脂蛋白 A-I 和 C-Ⅱ基因的上游。另一区域用 I 表示,它调控 A-I、C-Ⅱ和 A-Ⅳ在小肠中表达。染色体 19 中, E、C-I 和 C-Ⅱ基因在肝脏表达的区域位于 C-I 和 C-I'假基因(C-I')之间。

2 转载脂蛋白 E 基因小鼠

载脂蛋白 E 为 LDL 和乳糜微粒受体的配体,在清除血浆脂蛋白颗粒方面起重要作用。起初有人用 E 基因 5'端序列(缺乏肝调控元件)转小鼠,发现 E 表达低,对脂蛋白水平没有明显的影响^[3,4]。将金属硫蛋白(metallothionein)启动子与鼠 E 基因连接,通过锌(Zn^{2+})诱导, E 增加 4 倍, VLDL 和 LDL 明显减低, VLDL 和 LDL 清除速度增加 7 倍,对饮食诱导的高胆

固醇血症有阻抗^[5]。之所以采取金属硫蛋白启动子来建立转基因动物,是因为它能在肝脏中表达并能被重金属和糖皮质激素等调节。某些启动子具有很严格的细胞特异性,只有在这些细胞内才能发挥功能。例如在胰腺中表达的弹性蛋白酶(elastase)和胰岛素基因的启动子,及在眼睛内表达的晶状体蛋白(crystallin)基因的启动子。转基因小鼠实验表明许多启动子以一种适当的组织性方式起作用。在某些实验中,采用其它哺乳动物而不是小鼠的启动子,却可使组织特异性表达保留在小鼠中。因此,在转载脂蛋白 E 基因小鼠中,使其在肝脏特异性表达,要选用适当的启动子。

基因表达与调控是一个非常复杂的生物学过程,其中很多细节问题难以在真核及原核细胞中进行研究,采用转基因小鼠进行基因表达与调控研究有两大优点:一是使目的基因的活动能够真实地表现。在高等生物中,任何一个基因的活动都是在一个复杂的四维系统中进行的。转基因小鼠能够将分子水平、细胞水平和整体水平的研究有机地连在一起,并能同时从空间(表达的位置)和时间(表达的时相)角度综合进行研究。二是使复杂的问题简单化。任何一种生命现象都是多因素共同作用的结果。通过转基因小鼠便可在活体水平上,在不破坏原有系统的前提下,对某一种或多种调节因素进行有效的研究,使复杂的问题简单化。Simonet 等^[6]用转载脂蛋白基因动物研究了基因的表达和调控。他们发现:仅 650 bp 的 5'端序列足以使其在睾丸和肾脏表达;载脂蛋白 E 和 C-I 基因是连锁的,两基因间存在着决定脑和皮肤特异表达的序列和抑制肾脏表达的序列。他们^[6]还发现:两基因在肝中表达需要顺式作用元件,即肝调控区,其长度为 2 kb,位于载脂蛋白 E 启动子下游约 8 kb, C-I 启动子下游 9 kb,将 2 kb 的肝调控区插入人载脂蛋白 E 基因邻近区域内,转基因在肝中表达高,肾脏表达其次,在分泌大量转人载脂蛋白 E(为正常血浆水平的 4~5 倍)至血浆中。

用缺基因小鼠(knockout mice)方法使载脂蛋白基因的两个拷贝均失活。这种小鼠血液胆固醇水平极度升高($4.34 \sim 4.95 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),野生型小鼠只有 $0.60 \sim 0.86 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;这是由于正常依赖载脂蛋白 E 受体介导的残粒脂蛋白清除机制受损所致。更有趣的是,载脂蛋白变异体小鼠失去了它们在正常情况下抗胆固醇的能力。当给予一种模拟正常美国人胆固醇和饱和脂肪摄入量饮食时,其血液胆固醇水平迅速增高至 $18.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,并在 3 个月内即可产生严重的动脉粥样硬化,甚至在饮食中不含胆固醇,也可观察轻度的动脉粥样硬化。一只食无脂肪饮食的该种小种,8 个月时冠状动脉腔出

现似乎完全堵塞。这些结果说明:鼠和其它啮齿动物,所以具有抗胆固醇诱导的动物粥样硬化的能力,是因为它们能有效地利用载脂蛋白 E 来清除血液中富含胆固醇的脂蛋白。当这种清除作用被阻断时,小鼠和人一样,就变得易患动脉粥样硬化。上述实验还提示:①如果通过交叉繁殖实验,将载脂蛋白 E 变异体小鼠的遗传缺陷引入纯种的近亲繁殖系小鼠;以鉴定出尽管载脂蛋白 E 缺陷,但对饮食胆固醇引起高胆固醇血症的反应性仍呈减弱的品系,那么就有可能通过连锁分析定位出降低胆固醇的保护基因;②将载脂蛋白 E 变异体小鼠与其它系小鼠交配,然后对那些虽具有高水平血浆胆固醇,但却不发生动脉粥样硬化的子代进行连锁分析,就能鉴定出动脉粥样硬化的易感基因。

载脂蛋白 E-leiden 和 E(cys-142)与人 III 型高脂蛋白血症显性传递(dominant transmission)有关。Fazia 等^[7]建立了转人载脂蛋白 E-leiden 和载脂蛋白 E(cys-142)缺陷突变体基因鼠。在转基因鼠中,人转基因产物载脂蛋白 E 仅产生于肾脏,而内源性鼠载脂蛋白 E 主要产生于肝脏,血浆中转基因蛋白的浓度为内源性载脂蛋白 E 的两倍。这种模型的建立,将有利于遗传因素和环境因素对 III 型高脂蛋白血症基因表达影响的研究。

3 转载脂蛋白 A-I 基因小鼠

A-I 构成总 HDL 蛋白 70%。在转基因小鼠和大鼠中, A-I 过量表达能选择性增加 HDL 胆固醇酯的水平^[8]。这与人类的研究结果相一致, HDL 胆固醇酯水平与 A-I 呈正相关。有人用高脂饮食喂养转人 A-I 基因小鼠,血浆中 HDL 胆固醇酯和 A-I 水平提高,主要代谢影响是增加 HDL 胆固醇酯和 A-I 的转运速率。而无 A-I mRNA 水平的增加;相反, probucol 能减少 HDL 胆固醇和 A-I 水平, HDL 胆固醇酯代谢速率增加,但 A-I 转运速度下降,也无 A-I mRNA 水平的变化。因此, A-I 水平的变化可能由转录后调节的。

O'Connell 等^[9]用转基因动物研究了载脂蛋白 A-I 和载脂蛋白 C-III 的转录调控。他们将 5'端 5 kb 至载脂蛋白 A-I 转录起始点 250 bp 上游的人载脂蛋白 A-I 基因导入小鼠,此外源基因仅在肝脏表达 mRNA,而不是在小肠表达;用显微注射法将载脂蛋白 A-I 和 C-III 基因(载脂蛋白 A-I 启动子-300 bp 至载脂蛋白 C-III 启动子上游-2.4 kb)注入小鼠和小肠产生 A-I 和 C-III mRNA。作者认为决定小肠表达的信号位于载脂蛋白 C-III 启动子下游 2.4 kb;在 1.4 至 2.3 kb 的载脂蛋白 C-III 启动子之间的 1 kb 区域为决定载脂蛋白 A-I 和 C-III 在小肠表达的序列。

在含人载脂蛋白 A-I 的转基因鼠血浆中,发现的 90% 载脂蛋白 A-I 是人的而非鼠的,通过非变性梯度凝胶电泳显示,对照鼠的血浆中 HDL 主要是由单一的直径为 10.2 nm 的颗粒组成,而转基因鼠则由 11.4、10.2 和 8.7 nm 三种颗粒组成,分别与人 HDL₁, HDL₂ 和 HDL₃ 相对应。另外采用 [³H]-胆固醇亚油酸酯和 [¹²⁵I]-载脂蛋白 A-I 进行体内转换研究,发现对照组中存在选择性摄取 HDL 胆固醇的途径,说明载脂蛋白 A-I 一级结构对 HDL 颗粒大小分布及代谢有重大影响^[15]。

Heyek 等^[10]将转入载脂蛋白 A-I 基因小鼠 (HuAITg) 与转入胆固醇酯转运蛋白 (cholesterol ester transfer protein, CETP) 基因小鼠 (HuCETPTg) 杂交得到一新品系 (HuAICETPTg),在缺锌时, HDL 胆固醇酯减少 40%,给 HuAICETPTg 补锌后,用 ³H 胆固醇标记 HDL 发现: HuCETPTg 鼠比 HuAITg 鼠的 HDL 胆固醇酯清除率加快,同时前者 CETP 与 HDL 的结合也增加。最近, A-I 缺基因小鼠已经建立,并发现其 HDL 胆固醇酯水平下降^[12]。转 A-I 基因和缺 A-I 基因小鼠模型的建立将有助于饮食或药物干预对 HDL 胆固醇酯和 A-I 水平影响的研究,有助于 A-I 基因表达调控的研究。

人们曾设想,含有载脂蛋白 A-I 和 A-II 的高密度脂蛋白与只含载脂蛋白 A-I 不含 A-II 的 HDL 有不同的生理特性,为了探明这些含有特异载脂蛋白的 HDL 在动脉粥样硬化发生中的作用,通过转基因的研究,分别产生人类的载脂蛋白 A-I 和 A-I/A-II 两种类型,结果发现这两组动物血清总 HDL 颗粒内和非 HDL 颗粒内胆固醇含量相似,转基因小鼠产生的 AI 及 AI/A-II 两种 HDL 颗粒中载脂蛋白的含量不同,造成 HDL 组成成分不同。由此分别建立了既含 A-I 又含 A-II 的脂蛋白及只含 A-I 不含 A-II 的脂蛋白两种转基因小鼠亚群的动物模型。给予诱发动脉粥样硬化性损伤的程度进行分析中发现,含有 A-I/A-II 的小鼠对膳食诱发动脉粥样硬化的易感性是只含 AI 小鼠的 15 倍,表明只 A-I 不含 A-II 的脂蛋白在防止小鼠动脉粥样硬化的发生上比既含 A-I 又含 A-II 的脂蛋白有更为显著的效应^[16]。

载脂蛋白 A-I 转基因鼠已获表达,由于载脂蛋白 A-I 是血浆中 HDL 的主要蛋白成分,它可以活化卵磷脂-胆固醇酰基转移酶,在反向胆固醇运输中载脂蛋白 A-I 和 HDL 起重要作用,载脂蛋白 A-I 和 HDL 的水平与动脉粥样硬化呈负相关,因此,利用转基因动物进行基因调控研究将有利于该病阐明和防治。

4 转 C-III 基因小鼠

现已建立了几种转 C-III 基因小鼠的模型。转入 C-III 单拷贝基因后,小鼠血浆中 C-III 增加 30%~40%,甘油三酯增加二倍多。其脂蛋白特征是: VLDL 颗粒较正常大; VLDL 中富含甘油三酯,且有脂蛋白成分改变,即 C-III 增加, E 减少; 游离脂肪酸增加。生物化学代谢显示: VLDL 分解速率下降。因此有人推论高甘油三酯血症似乎是延长了 VLDL 代谢时间。上述结果还提示: 转 C-III 基因小鼠可能为原发性高甘油三酯血症理想的动物模型^[11]。

5 转载脂蛋白(a)基因小鼠

载脂蛋白(a)是一种大分子的糖蛋白,它以单个二硫键和载脂蛋白 B-100 共价结合形成脂蛋白(a)。Kratzin 等发现人载脂蛋白和纤维蛋白溶酶原(plasminogen, PG)的氨基酸顺序及其 DNA 结构高度相似。后来, Marry 等又证实人载脂蛋白(a)基因和 PG 基因共存于第 6 号染色体 q²-q^{2.7} 区。载脂蛋白(a)结构成分包括丝氨酸蛋白酶样结构区、kringle 样结构区(Kringle-like domains)和糖类成分。小鼠并不表达载脂蛋白(a),用人的 17 Kringle IV、Kringler-和编码蛋白酶区段与 transferrin 启动子连接,转入小鼠后发现: 载脂蛋白(a)仅在肝中表达。且载脂蛋白(a)无脂蛋白成分(lipoprotein-free fraction)^[12]。载脂蛋白(a)与动脉粥样硬化发生的关系比较密切,转载脂蛋白(a)基因小鼠的建立对阐明其发生机理有重要意义。

6 转胆固醇酯转运蛋白基因小鼠

Rehnborg 等于 1964 年首次报道血浆脂蛋白之间存在着胆固醇酯(cholesterol ester, CE)净转移现象。Zilversmit 于 1975 年首次发现血浆有一种特殊转运蛋白促进血浆脂蛋白之间的 CE 和甘油三酯转运和交换,称之为胆固醇酯转运蛋白(CETP)。小鼠血浆中缺乏 CETP 活性。将人 CETP 微基因(minigene)与鼠金属硫蛋白 I 启动子连接,转小鼠后血浆中有似人 CETP 活性;补锌后活性成倍增加, HDL 胆固醇酯和 A-I 分别减少 35%~24%。将转入 CETP 基因小鼠与转入 A-I 基因小鼠交配的子代与单独转入 A-I 基因比较发现: 补锌后,前者 HDL 胆固醇酯和 A-I 水平显著下降^[3]。因此 CETP 过量表达能减少 HDL 胆固醇酯的水平。

CETP 存在种系差别,大鼠、小鼠、豚鼠、狗、羊和牛等 CETP 活性低,而兔、猴和人具有高活性 CETP。因此,也有人用猴 CETP cDNA 与鼠的金属硫蛋白启动子连接,转小鼠后 CETP 表达水平显著增加,且 CETP 活性与 HDL 胆固醇酯和 A-I 水平呈明显反向关系。上述转 CETP 基因小鼠模型为胆固醇的逆向转

运和动脉粥样硬化的研究开辟新的途径。

7 转 LDL 受体基因小鼠

低密度脂蛋白受体位于细胞膜表面,以共价键和载脂蛋白 B 和 E 呈高度特异性结合,通过脂蛋白颗粒表面 B 和 E 识别,介导脂蛋白清除。将人 LDL 受体基因 cDNA 与小鼠金属硫蛋白 I 启动子连接导入转基因鼠中,通过重金属诱导后,清除 LDL 较对照组高 8~10 倍,且血浆中 LDL 受体配基 B 和 E 下降 90% 以上^[14]。有人用人的 LDL 微基因与 transferrin 启动子连接,转基因小鼠中 LDL 受体水平持续增加。用高脂和高胆固醇喂养转基因鼠,并不增加 IDL 或 LDL 水平, VLDL 水平仅有轻度增加,而对照组小鼠三种脂蛋白成分均增加。

8 技术方法与问题

转基因小鼠的技术方法如下:①分离编码某一目的产物的基因,或者分离对动物表型有作用的某一基因;②制备 DNA 重组物使其能在选定的组织内表达,从而绕过正常存在于动物机体的代谢控制;③将 DNA 重组物在体外转移至一个刚刚受精的单细胞卵中;④经处理的卵重新植入适当的受体中;⑤子代性状的分析。在转载脂蛋白基因的启动子的选择中,比较典型的是采用小鼠金属硫蛋白启动子。改进和扩展上述技术的工作正在加紧进行,如增加卵来源的方法、促进 DNA 重组物转移到卵内、在重新植入卵之前选择基因卵的方法建立加强选择基因的控制、特异性和表达水平等,这些都是目前活跃的研究项目。

1979 年首次将外源基因导入小鼠胚胎成功以来,转基因已渗透到动脉粥样硬化的领域,建立了大量的转载脂蛋白基因的动物模型,为基础理论探讨及其防治提供了新的途径。令人疑虑的是,一个 DNA 片段插入到动物的基因组后,确切的结果是未知的。可能发生有害的突变,尽管这种有害突变很少。由于有活性的生物化学物质的过度表达而使动物的生理发生变化,也是值得注意的问题。

参考文献

- 1 杨和平, et al. 转载脂蛋白基因研究进展. 国外医学, 生理、病理科学与临床分册, 1993, 14(2): 72
- 2 Breslow JL. Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 8 314
- 3 Simonet WS, et al. In the absence of a downstream element, the apolipoprotein E gene is expressed at high levels

- in kidneys of transgenic mice. *JBC*, 1990, 265(19): 10 809
- 4 Smith JD, et al. Accumulation of human apolipoprotein E in the plasma of transgenic mice. *JBC*, 1990, 265(25): 14 709
- 5 Shimano H, et al. Plasma lipoprotein metabolism in transgenic mice overexpressing apolipoprotein E. *J Clin Invest*, 1992, 90: 2 084
- 6 Simonet WS, et al. Liver-specific regulation of the human apolipoprotein E/C-I gene locus in transgenic mice. *Arterioscl Thromb*, 1991, 11: 1390a
- 7 Fazio S, et al. Expression of human apolipoprotein E variants in transgenic mice. *Arterioscl Thromb*, 1991, 11: 1390a
- 8 Walsh A, et al. Intestinal expression of the human apoA-I gene in transgenic mice is controlled by a DNA region 3' to apoC-III gene. *J Lipid Res*, 1993, 34: 617
- 9 O'Connell A, et al. Intestinal expression of human apo A-I and apo C-III in transgenic mice. *Circulation*, 1990, 82 (Suppl 1): 433
- 10 Hayek T, et al. Interaction of human apo A-I and CETP genes in transgenic mice results in a profound decrease in HDL cholesterol. *Arterioscl Thromb*, 1993, 11: 1 390
- 11 Aalto-Setälä K, et al. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) C-III transgenic mice. *J Clin Invest*, 1992, 90: 18 889
- 12 Chiesa G, et al. Reconstitution of lipoprotein(a) by infusion of human low density lipoprotein into transgenic mice expression human apolipoprotein (a). *JBC*, 1992, 267 (34): 24 369
- 13 Hayek T, et al. An interaction between the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and apolipoprotein A-I genes in transgenic mice results in a profound CETP-mediated depression of high density lipoprotein cholesterol levels. *J Clin Invest* 1992, 90: 505
- 14 Sande L, et al. Overexpression of low density lipoprotein (LDL) receptor eliminates LDL from plasma in transgenic mice. *Science*, 1988, 239: 1 277
- 15 郭中民, 陈保生. 载脂蛋白 A-I 基因表达及调控. 国外医学分子生物学分册, 1994, 16(3): 109
- 16 王惠珍节译, 刘德文审校. 人类载脂蛋白 A₁、A₂ 及 B 致转基因小鼠动脉粥样硬化特性的研究. 中国动脉硬化杂志, 1994, 2(1): 60

(本文 1994-01-04 收到, 1994-11-24 修回)