

• 研究简报 •

# 人卵磷脂胆固醇酰基转移酶基因在肌源细胞中的表达

范乐明 朱宇 王南 蔡海江

(南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 南京 210029)

## The Expression of Human Lecithin Cholesterol Acyltransferase in Myogenic Cells

FAN Le-Ming, ZHU Yu, WANG Nan and CAI Hai-Jiang

(Atherosclerosis Research Center, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

**ABSTRACT** To study the possibility of expression of human lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) in skeletal muscles. Construction of a plasmid vector containing the human LCAT cDNA; transfer the vector into myogenic cell line C2, and detection of LCAT activity in the culture medium. A expression vector of human LCAT driven by CMV E/P, PCMV-LCAT was constructed, which successfully expressed in C2 cells. The LCAT activity was detected in the culture medium. It seems possible to change plasma LCAT level by transfer of LCAT gene into skeletal muscle.

**KEY WORDS** Lecithin cholesterol acyltransferase; Gene transfer; Skeletal muscle cell

**摘要** 为探索人卵磷脂-胆固醇酰基转移酶在骨骼肌细胞表达的可能性,构建了一个由人巨细胞病毒早期增强子和促进子驱动的卵磷脂-胆固醇酰基转移酶 cDNA 表达质粒。以阳离子介导其转染小鼠肌源性细胞株 C2,获得成功表达,并在细胞培养液内测得有生物活性的卵磷脂胆固醇酰基转移酶。提示有可能通过将卵磷脂胆固醇酰基转移酶基因转移至骨骼肌细胞的方法来提人体内卵磷脂胆固醇酰基转移酶水平。

**关键词** 卵磷脂胆固醇酰基转移酶; 基因转移; 骨骼肌细胞

聚是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生发展的重要原因之一,而卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (lecithin cholesterol acyltransferase, LCAT)在促进胆固醇从外周组织返回肝脏的逆转运途径中起关键作用<sup>[1]</sup>。我们由此设想通过基因转移技术提高高胆固醇血症患者体内 LCAT 水平,有可能减少或防止其动脉壁内胆固醇的过量积聚,从而达到防治 As 发生发展的目的。作为第一步,本文首先构建 LCAT 表达质粒,并转染小鼠肌源性细胞,观察表达效果,探讨骨骼肌细胞表达 LCAT 的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

质粒 pUCLCAT 和 pCMV $\beta$ , 大肠杆菌 JM109 以及肌母细胞株 C2 均由英国伦敦大学 Dickson G 教授提供。限制性内切酶、Rapid DNA Ligation Kit 为 Boehringer 产品, Plasmid Midi Kit, QIAEXII Gel Extraction Kit 为 Qiagen 产品, Lipofectamin 为 Gibco BRL 产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 表达载体的构建** pUCLCAT 系由 LCAT cDNA(全长 1 744 bp,包括信号肽序列和 poly A 信号)插入 pUC19 的多克隆位点而构成,具有复制原点和 Amp 抗性基因,可供在 JM109 中扩增和筛选。以此为母体,在插入的 LCAT cDNA 上游再插入人巨细胞病毒即刻早期增强子和促进子 (human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter, hCMV E/P)和 SV40 的内含子剪切供体和受体 (SV40 Intron),构成真核细胞表达载体 pCMV-LCAT。

**1.2.2 C2 细胞转染** C2 细胞以 DMEM+10% 胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) 培养,转染前 30 min 开始改用无血清培养液培养。转染采用阳离子脂质体 Lipofectamin 介导,具体方法按 Gibco ERL 产品说明书

高胆固醇血症所致过量胆固醇在动脉壁积

进行,转染时间为6 h。

1.2.3 表达产物检测 分别于转染后24 h和48 h检测细胞培养液中的LCAT活性。参照Chen等<sup>[2]</sup>方法制备人工脂质体 Proteoliposome 作为底物,并按Verdery<sup>■</sup>等<sup>[3]</sup>方法测定细胞培养液内的LCAT活性(以150  $\mu$ l/h受测液中胆固醇的百分酯化率表示)。

## 2 结果

### 2.1 表达载体的构建

质粒 pCMV $\beta$  以 EcoR I 和 Sma I 酶切,经琼脂糖凝胶电泳分离,并用 Gel Extraction Kit 回收 830 bp 小片段(含 hCMV E/P 和 SV40 Intron)。质粒 pUCLCAT 先用 XhoI 酶切再加入 dNTP 和 Klenow 酶补平 3' 凹端,再用 EcoRI 酶切,使在 pUCLCAT 质粒的 LCAT cDNA 上游获得一个 3' EcoRI 粘性末端和 5' 平末端的切口。最后用 Rapid DNA Ligation Kit 将带切口的 pUCLCAT 与上述 830 bp 片段连接,转化 JM109 宿主菌并筛选阳性克隆,获得 pCMV-LCAT 表达载体。

### 2.2 表达产物的检测

经 Lipofectamin 介导转化 C2 细胞后,分别于 24 h 和 48 h 检测细胞培养液中 LCAT 活性,同时以 pCMV  $\beta$  同样转化 C2 细胞,测定其培养液中的 LCAT 活性作为对照。附表 (Table) 显示 pCMV-LCAT 组的胆固醇酯化率明显高于 pCMV  $\beta$  组;转化后 48 h 的表达高于 24 h 的表达 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。

Table. LCAT activity in culture medium of C2 cells infected by pCMV-LCAT or pCMV  $\beta$  ( $\bar{x} \pm s$ ).

Groups	24 h	48 h
pCMV $\beta$	0.16 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.02
pCMV-LCAT	5.51 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	9.84 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>

a:  $P < 0.01$ , compared with pCMV  $\beta$ ; b:  $P < 0.05$ , compared with 24 h.

## 3 讨论

卵磷脂胆固醇酰基转移酶是催化游离胆固醇

酯化的关键酶,在胆固醇逆转运途径中起着重要作用。Vaisman 等<sup>[4]</sup>新近报道 LCAT 转基因小鼠过度表达 LCAT 可造成高密度脂蛋白血症,胆固醇逆转运也随之增强。Mehlum 等<sup>[5]</sup>证实在 LCAT 转基因小鼠中,LCAT 活性增加可使血浆甘油三酯、极低密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平明显下降而高密度脂蛋白胆固醇水平增加,肝甘油三酯脂肪酶活性也增加。提示 LCAT 具有明显的抗动脉粥样硬化作用,表明 LCAT 基因有可能成为动脉粥样硬化所致疾病的基因治疗中一个很有希望的目的基因。

由于骨骼肌细胞体积大、量多、血管丰富、位于体表和易于操作,因而被认为是表达外源基因的良好场所<sup>[7]</sup>,带有目的基因的质粒直接肌肉注射也较易为病人所接受。本研究结果表明 LCAT 也可在肌源性细胞表达并分泌至细胞外,提示有希望通过直接肌肉注射的方式,借助肌细胞的异位表达来提高体内 LCAT 水平,发挥其抗动脉粥样硬化作用。

### 参考文献

- 1 Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res*, 1984, 25: 1 017.
- 2 Chen CH, Albers JJ. Characterization of proteoliposomes containing apoAI: a new substrate for the measurement of LCAT. *J Lipid Res*, 1982, 23: 680.
- 3 Verdery<sup>■</sup> RB, Gatt S. Assay for LCAT. *Met Enzymol*, 1981, 72: 375.
- 4 Vaisman BL, Klein HG, Rouis M, et al. Overexpression of human lecithin cholesterol acyltransferase leads to hyperalphalipoproteinemia in transgenic mice. *J Biol Chem*, 1995, 270: 12 269.
- 5 Mehlum A, Staels B, Duverger N, et al. Tissue-specific expression of the human gene for LCAT in transgenic mice alters bloodlipids, lipoproteins and lipase towards a less atherogenic profile. *Eur J Biochem*, 1995, 230: 567.
- 6 Well DJ. Intramuscular injection of plasmid DNA. In: Dickon JG (ed). *Molecular and Cell Biology of Human Gene Therapeutics*. Chapman & Hall, 1995; 83~102.

(1997-01-06 收到)