

中国人极低密度脂蛋白受体基因的克隆及其在中国仓鼠卵巢细胞中的表达

屈 伸, 王剑波, 刘志国, 邓耀祖, 冯宗忱

(同济医科大学生物化学教研室, 湖北省 武汉市 430030)

[关键词] 脂蛋白, 低密度; 基因; 中国仓鼠卵巢细胞; 动脉粥样硬化

[摘要] 为了研究极低密度脂蛋白受体结构与功能的关系, 本文利用反转录聚合酶链反应技术从中国人心肌组织中克隆出极低密度脂蛋白受体的全长 cDNA 后, 将其插入真核表达载体 pCDNA3 获得重组体 pCD- VR。测序结果发现, 这一源于中国人的极低密度脂蛋白受体基因 cDNA 的碱基序列与文献报道基本相符。反转录聚合酶链反应检测证实, 转染 pCD- VR 的中国仓鼠卵巢细胞可有效表达极低密度脂蛋白受体 mRNA。脂蛋白结合实验结果发现, 转染的中国仓鼠卵巢细胞结合极低密度脂蛋白的能力明显增高。

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

The Cloning and Expression on Chinese Hamster Ovary Cells of Chinese Very Low Density Lipoprotein Receptor Gene

QU Shen, WANG Jian- Bo, LIU Zhi- Guo, DENG Yao- Zu, and FENG Zong- Chen

(Department of Biochemistry, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

MeSH Lipoprotein, LDL; Genes; CHO Cells; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** To study the relationship of very low density lipoprotein receptor (VLDLR) structure and its function.

Methods The present paper reported the cloning of VLDLR gene cDNA from a chinese heart tissue by RT- PCR technology.

A recombinant named pCD- VR was constructed in which the VLDLR cDNA was inserted a vector pcDNA3. **Results** Sequencing result confirmed that the chinese oriented VLDLR gene cDNA was in line with previously one. Then, the pCD- VR was transfected into CHO cells. Lipoprotein combination test and mRNA detection confirmed that this human VLDLR gene could express effectively in the CHO cells. **Conclusion** It was provided a new idea about the roles of VLDLR in atherosclerosis.

极低密度脂蛋白受体(very low density lipoprotein receptor, VLDLR)属低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)家族^[1], 由 846 个氨基酸组成, 其蛋白质结构与 LDLR 非常相似, 不同之处在于 LDLR 的配体结合域有 7 个重复序列, 而 VLDLR 有 8 个重复序列, 相应地其基因结构比 LDLR 多一个外显子。在功能上, LDLR 主要与含有载脂蛋白 B100 和载脂蛋白 E 的脂蛋白结合; 而 VLDLR 主要与富含载脂蛋白 E 的脂蛋白结合。LDLR 活性受胆固醇下调, 而 VLDLR 活性不受胆固醇下调。由此看来, VLDLR 与 LDLR 在功能和调控方面的差异与受体结合域的结构差异存在必然联系。本文进行了中国人 VLDLR 基因的克隆、序列分析及在中国仓鼠卵巢

(chinese hamster ovary, CHO) 细胞中表达的检测, 探讨 VLDLR 结合域中 8 个重复序列在执行结合脂蛋白功能中的作用及中国人较易罹患高甘油三酯血症的机理。

1 材料与方法

1.1 组织与细胞

心肌组织从施行心脏手术患者近心耳处采集。CHO- K₁ 细胞株购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。

1.2 试剂与仪器

DiI(Molecular probes, USA), F12 培养基与胎牛血清(Gibco, USA), Lipofectin(Gibco, USA), ExpendTM 长模板 DNA 聚合酶(BOEHRINGER MANNHEIM 公司), PCR 引物由 GIBCO BRL 公司合成。SuperScriptTM Preamplification System 购自 GIBCO BRL 公司, 限制性

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(项目编号 39670162)

[作者简介] 屈伸, 男, 1954 年 8 月出生, 河南人, 教授, 副院长。现从事生物化学与分子生物学专业, 主要研究方向为基因诊断与基因治疗。

核酸内切酶及 T₄DNA 连接酶购自 Bio-Lab 公司, Sephadex G-25 购自 Pharmacia。

1.3 总 RNA 提取

取少量心肌组织匀浆,用异硫氰酸胍一步法^[2]提取细胞总 RNA,再通过紫外分光测定含量及纯度,甲醛凝胶变性电泳检测其完整性。

1.4 反转录反应

按 SuperScript™ Preamplification System 操作指南进行。取总 RNA 5 μg, Oligo(dT) 12~18 1 μL, 补 DE-PC 处理水至 12 μL, 混匀, 70℃ 10 min 后冰上冷却, 加入反应混合液(10×buffer 2 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μL, 10 mmol/L dNTPs 1 μL, 0.1 mmol/L DTT 2 μL) 混匀, 42℃ 预热 5 min, 加入 1 μL 反转录酶, 42℃ 反应 50 min, 70℃ 灭活反转录酶 15 min, -20℃ 保存。

1.5 扩增反应

根据 Yamamoto 等报道的人 VLDLR cDNA 序列设计了一对引物(P1、P2)。在 P1 5' 末端设计了一 Bam HI 酶切位点, P2 5' 末端设计了一 Xba I 酶切位点。P1(sense) 5' - GGGATCCCCATCCAGGCGGGCAC CATG- 3' (-24~3), P2(antisense) (2862~2890) 5' - CGGATCCGGCCAGAGGTGGCAATACTGTC- 3', P3 5' - ACTGGGACAGGAACAGGTAT- 3' (2194~2214)。PCR 反应总体积为 50 μL: 引物各 20 μmol, dNTPs 各 10 mmol, Mg²⁺ 75 mmol, Expend™ 长模板 DNA 聚合酶 2.5 u, cDNA 模板 2 μL。反应条件为: 94℃ 4 min, 然后 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 68℃ 3 min, 循环 5 次, 更换循环条件为 94℃ 45 s, 62℃ 5 s, 68℃ 3 min, 循环 35 次, 最后 68℃ 延伸 10 min。

1.6 重组体的构建和鉴定

将扩增的 cDNA 片段经琼脂糖凝胶电泳后采用透析袋挡板法回收, 经酚、氯仿抽提, 无水乙醇沉淀^[3]。载体 pcDNA3 与 RT-PCR 扩增的目的基因片段均用 Xba I 和 Bam HI 进行酶切, 电泳回收纯化后, 按摩尔比 1:3 连接(总 DNA 200 ng, 1 μL 10×T₄DNA 连接酶缓冲液, 1 单位 T₄DNA 连接酶, 加水至 10 μL, 15℃ 反应 16 h)。取连接液转化感受态细菌后, 在 LB 固体培养皿上取氨苄抗性菌落培养扩增, 用碱变性法制备重组质粒。重组质粒经 Bam HI、Nhe I、Hind Ⅲ、Apa I 酶切电泳鉴定。重组质粒经氯化铯离心^[4]纯化后测序。

1.7 细胞培养与基因转移

CHO-K₁ 细胞用含 10% 胎牛血清的 F12 在 37℃、5% CO₂ 的条件下培养。基因转染用 Lipofectin 介导的方法进行。转染后 48 h 检测外源基因的表达。基因转染的 CHO 细胞用含 G418(800 mg/L) 的

F12 持续筛选至稳定表达 VLDLR 的 CHO 细胞。

1.8 极低密度脂蛋白受体表达

以反转录产物为模板, 以 P1、P3 为引物, 利用 Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 同时进行 β-actin 基因扩增作为内参。循环条件为: 94℃ 变性 4 min, 94℃ 30 s, 55℃ 45 s, 72℃ 3 min, 循环 35 次, 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.9 脂蛋白分离

取正常人空腹血 400 mL, 加入 EDTA-Na₂ 抗凝, 8 000 r/min 离心 15 min, 分离血浆。加入 PMSF 1 μmol/L、NaN₃ 1 mmol/L 及谷胱甘肽, 12 000 r/min 离心 30 min, 除去顶层乳糜微粒。加入 NaCl 将血浆密度调至 1.1 kg/L, 55 000 r/min 10℃ 离心 5 h 后, 吸取上层 VLDL 及 LDL 混合物。在 35.5 mL Beckman 离心管中, 由上到下依次加入 1.006 kg/L、1.063 kg/L 梯度液及 VLDL 和 LDL 混合物, 55 000 r/min 离心 3 h, 分离 VLDL 及 LDL^[5]。

1.10 脂蛋白的 DiI 标记

分离的 VLDL 用 PBS 透析 12 h, 取出后用无菌的 PBS 将蛋白浓度稀释至 1 g/L。同样用无菌的 PBS 调节去脂血清至其蛋白浓度为 4 g/L。调好后的脂蛋白溶液与去脂血清溶液按 1:4 体积比混合后, 加 DiI 储液, 比例为 150 μg DiI: 1 mg 脂蛋白, 混匀, 过滤除菌(0.45 μm), 37℃ 避光孵育 8~12 h。用 NaCl 调密度至 1.1 kg/L, 超离(条件为: 4℃~10℃, 50 000 r/min, 2.5 h)后, 吸取上层 VLDL, 经 PBS 透析 8~12 h, 用 0.45 μm 滤膜过滤除菌。测定溶液荧光强度和蛋白浓度, 计算标记率。

1.11 脂蛋白结合实验

瞬时表达 pCD-VR 的 CHO 细胞与 DiI 标记的 VLDL 结合实验于转染后 8~72 h 进行。结合实验前 48 h 加 25-羟胆固醇和胆固醇于细胞培养基中(终浓度分别为 1 mg/L 和 10 mg/L), 以抑制 LDL 受体表达。结合开始时, 弃细胞培养液, 用 PBS 加入冰中预冷的含 DiI 标记脂蛋白的结合反应液, 4℃ 孵育 3 h, 用含 0.2% 牛血清白蛋白的冰冷的 PBS 洗三次, 以去除未结合的 DiI 标记的脂蛋白。然后每皿(35 mm) 加入 1 mL 细胞裂解液(1 g/L SDS、0.1 mol/L NaOH), 混匀, 此细胞裂解液可同时用于荧光强度和蛋白浓度的测定, 结果以 DiI 标记脂蛋白/细胞蛋白(mg/g), 即 DiI-VLDL/Cell protein(mg/g) 表示。

2 结果

2.1 总 RNA 的鉴定

1.38), 差异有显著性 ($P < 0.01$), 进一步证实人 VLDLR 基因可在 CHO 细胞中有效表达。

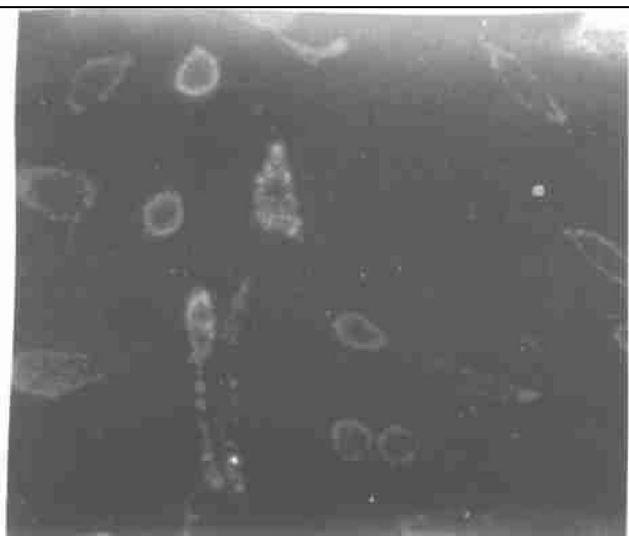


图4 荧光显微镜下中国仓鼠卵巢细胞结合 Dil 标记的极低密度脂蛋白结果

Figure 4 The result of CHO cells combining with Dil-labeled lipoprotein under fluorescence microscopy.

3 讨论

脂蛋白代谢异常是动脉粥样硬化发病的重要因素。胆固醇升高已被确认为冠心病发病危险因子, 而甘油三酯及富含甘油三酯的脂蛋白, 如 VLDL 的致动脉粥样硬化作用日益受到重视。脂蛋白受体在血浆脂类的代谢中起关键作用。LDLR 能够与含载脂蛋白 B100 及载脂蛋白 E 的脂蛋白结合, 如 LDL、VLDL。成熟 LDLR 由五个功能域组成: N-端含七个重复序列的配体结合域、表皮生长因子前体同源域、O-连接糖蛋白域、跨膜域及胞浆域。研究表明, VLDLR 也由上述几个功能域组成, 结构与 LDLR 极为相近, 不同处在于 VLDLR 的 N-端配体结合域比 LDLR 多一重复序列。VLDLR 能够结合 VLDL、 β -VLDL 及 IDL, 但对 LDL 亲和力很低^[5]。在 LDLR 分子上, 结合 LDL 需重复序列 3~7, 结合 β -VLDL 需重复序列 5^[6,7], 故推测 VLDLR 多出的重复序列可能影响其与脂蛋白的结合功能。

为探讨 VLDLR 结构与功能的关系, 本实验从中国人心肌组织提取总 RNA, 利用 RT-PCR 技术, 克隆出了中国人 VLDLR cDNA。测序结果表明, 这一

源于中国人心肌的 VLDLR cDNA 序列与文献报道基本一致。将此全长受体基因导入体外培养的 CHO 细胞后, 用 RT-PCR 扩增后出现一条 2.2 kb 的清晰条带, PCR 反应中设计的人源性 VLDLR 基因特异引物的序列完全不同于鼠源性 VLDLR 的基因序列, 表明其在 CHO 细胞内可有效表达。脂蛋白结合实验证明, 该受体的全长基因的表达产物具有结合 VLDL 的功能。

我们拟在本文报道的结果基础之上, 将 VLDL 受体配体结合域一个或几个重复序列逐一缺失, 构建成缺失不同重复序列的 VLDLR 真核表达载体, 将其转入相应受体缺失细胞, 观察各种不同缺失表达载体转染细胞与脂蛋白结合功能, 从而阐明 VLDLR 各重复序列在结合脂蛋白过程中所起的作用, 为进一步了解 VLDLR 在动脉粥样硬化中所起作用提供新的认识。

参考文献

- [1] Mehta KD, Chen WJ, Goldstein JL, et al. The low density lipoprotein receptor in *Xenopus laevis*. I. Five domains that resemble the human receptor [J]. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 10 406-414
- [2] Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, et al. The human LDL receptor: A cysteine-rich protein with multiple *ala* sequences in its mRNA [J]. *Cell*, 1984, **39**: 27-38
- [3] Yamamoto T, Bishop RW, Brown MS, et al. Deletion in cysteine-rich region of LDL receptor impedes transport to cell surface in WHHL rabbit [J]. *Science*, 1986, **232**: 1 230-237
- [4] Lee LY, Mohler WA, Schafer BL, et al. Nucleotide sequence of the rat low density lipoprotein receptor cDNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 1989, **17**: 1 259-260
- [5] Takahashi S, Kawarabayashi Y, Nakai T, et al. Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor like protein with distinct ligand specificity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 9 252-256
- [6] Esser V, Limbird LE, Brown MS, et al. Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor [J]. *Biol Chem*, 1988, **263**: 13 283-290
- [7] Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins [J]. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 21 682-688

(此文 2000-01-13 收到, 2000-07-27 修回)

(此文编辑 文玉珊)