

# 不同重复序列缺失的极低密度脂蛋白受体基因转染的中国仓鼠卵巢细胞与 $\beta$ -极低密度脂蛋白的结合效应

郭红亮<sup>1</sup>, 刘志国<sup>2</sup>, 田俊<sup>3</sup>, 冯宁<sup>3</sup>, 屈伸<sup>3</sup>

(1. 武警湖北总队医院检验科, 湖北省武汉市 430061; 2. 武汉工业学院生物化学工程系, 湖北省武汉市 430023;  
3. 华中科技大学同济医学院生物化学教研室, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 脂蛋白, 极低密度; 受体, 脂蛋白; 中国仓鼠卵巢细胞; 基因缺失

[摘要] 为了探索极低密度脂蛋白受体配体结合域中 8 个重复序列在结合脂蛋白中的作用, 利用基因缺失突变的方法, 构建了不同重复序列缺失的极低密度脂蛋白受体缺失突变真核表达载体, 并将各重组体转移至体外培养的中国仓鼠卵巢细胞。通过逆转录-聚合酶链反应检测到外源基因的表达。转染细胞与 DiI 标记的 $\beta$ -极低密度脂蛋白结合实验发现: 重复序列 1, 2 缺失的极低密度脂蛋白受体结合 $\beta$ -极低密度脂蛋白的能力明显降低。为进一步研究极低密度脂蛋白受体结构与功能的关系奠定了基础。

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

## Binding Effects of Chinese Hamster Ovary Cells Transfected with Very LDL Receptor and Its Mutants Deleted Different Repeats with $\beta$ -Very LDL

GUO Hong-Liang<sup>1</sup>, LIU Zhi-Guo<sup>2</sup>, TIAN Jun<sup>3</sup>, FENG Ning<sup>3</sup>, and QU Shen<sup>3</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, Hubei Provincial Corps Hospital, Chinese Peoples Armed Police Forces, Wuhan 430061; 2. Department of Biochemistry, Wuhan Polytechnic College, Wuhan 430023; 3. Department of Biochemistry, Tongji Medical College, Wuhan 430030, China)

[MeSH] Lipoproteins, VLDL; Receptors, LDL; Cells, Chinese Hamster Ovary; Gene Mutagenesis

[ABSTRACT] **Aim** To dissect the contribution of each repeat of the ligand binding domain of the VLDL receptor to ligand binding. **Methods** Several VLDLR recombinants lacking different repeat(s) were constructed by the method of oligonucleotide directed mutagenesis and then introduced into CHO cells by transfection. The ability of the mutant receptor to bind with  $\beta$ -VLDL was measured. **Results** The result of the binding experiments showed that repeat 1 and 2 are the most important repeats required for  $\beta$ -VLDL binding. **Conclusion** These results lay the foundation of VLDLR structure and function study.

极低密度脂蛋白受体(very low density lipoprotein receptor, VLDLR)由 846 个氨基酸残基组成, 其蛋白质结构与 LDLR 极为相似, 主要差别在于: LDLR 的配体结合域由 7 个富含半胱氨酸的重复序列组成, 而 VLDLR 的配体结合域由 8 个重复序列组成。相应地, VLDLR 与 LDLR 在结合配体的功能上也有差异: LDLR 能结合含载脂蛋白 B100 和 E 的脂蛋白, 而 VLDLR 只能识别含载脂蛋白 E 的脂蛋白, 如 VLDL 及 $\beta$ -VLDL 对 LDL 的亲和力非常低<sup>[1]</sup>。本文对 VLDLR 配体结合域的结构与受体结合脂蛋白功能的关系进行了研究。

## 1 材料与方法

[收稿日期] 2001-07-05 [修回日期] 2001-11-25

[基金项目] 国家自然科学基金(39670162)资助。

[作者简介] 郭红亮, 男, 1967 年出生, 主治医师。屈伸, 男, 1953 年出生, 教授, 博士研究生导师。刘志国, 男, 1963 年出生, 副教授。

### 1.1 试剂与仪器

DiI 为 Molecular Probes 公司提供(USA), F12 培养基与胎牛血清为 Gibco(USA) 公司提供, Lipofectin 和 T4 DNA 连接酶为 Gibco(USA) 公司提供, 聚合酶链反应引物由 GIBCO BRL 公司合成, Expend<sup>TM</sup> 长模板 DNA 聚合酶购自 Boehringer Mannheim 公司, pCD-VR(携全长 VLDLR cDNA 的真核表达载体)及 pBLacZ(含半乳糖苷酶基因)由冯宁等<sup>[2]</sup>和屈伸等<sup>[3]</sup>构建, 限制性内切酶购自 Promega 公司, Lowry 试剂购自 Sigma 公司, 中国仓鼠卵巢(chinese hamster ovary, (CHD)-K1 细胞株购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。主要仪器有黑马 G-480 型聚合酶链反应仪、Shell lab2300 型 CO<sub>2</sub> 培养箱、Beckman L8-80 型超速离心机、Hitachi M-850 型荧光分光光度计和荧光显微镜(Bx60, Olympus, Japan)等。

### 1.2 缺失突变极低密度脂蛋白受体 cDNA 构建<sup>[4]</sup>

运用重叠延伸聚合酶链反应构建缺失突变极低

密度脂蛋白受体 cDNA。根据 Yamamoto 等报道人 VLDLR cDNA 序列设计引物(P1、P<sub>X,2</sub>、P<sub>X,3</sub>、P4)如下:

P1: 5'-GGGATCCCCATCCAGCGGGCACCATG-3'  
 P4: 5'-ACTGGGACAGGAACAGGTAT-3'  
 P1. 2: 3'-TCTCGCCGCGGTGGCCTTGGCATTTCCTGACACGACT-5'  
 P1. 3: 5'-AGAGCGGCCACCGGAACCGTAAAGAAGACGTGTGCTGA-3'  
 P2. 2: 3'-CGTCACTACTTTTCTTGACAGTATACTCTTGTACGGCGTA-5'  
 P2. 3: 5'-GCAGTGATGAAAAGAACTGTCATATGAGAACATGCCCAT-3'  
 P3. 2: 3'-TACTTTGGGTCTTGTACGCGCTTATATTGTACATCAGG-5'  
 P3. 3: 5'-ATGAAAGCCCAGAACAGTGCAGCAATATAACATGTAGTCC-3'  
 P4. 2: 3'-CTCTTCTACTTCTTTGACACGGGGCGGTTGGACACCGCG-5'  
 P4. 3: 5'-GAGAAGATGAAGAAAAGTGTGCCCGCCAACCTGTGGCGG-3'  
 P5. 2: 3'-CGTCACTACTCGACCTGACATATGTGTGGTTCACAGGTCG-5'  
 P5. 3: 5'-GCAGTGATGAGCTGACTGTATACACACCAAGTGTCCAGG-3'  
 P6. 2: 3'-TCACACCGCAGTCCGTCAGGGGAGAGCTTGAACGGCTGG-5'  
 P6. 3: 5'-AGTGTGGCCGTCAGCCAGTCCCTCTCGAACCTGCGCGACG-3'  
 P45. 2: 3'-CTCTTCTACTTCTTTGACATATGTGTGGTTCACAGGTCG-5'  
 P45. 3: 5'-GAGAAGATGAAGAAAAGTGTATACACACCAAGTGTCCAGG-5'  
 P56. 2: 3'-CGTCACTACTCGACCTGACAGGGGAGCTTGAACGGCTGG-5'  
 P56. 3: 5'-GCAGTGATGAGCTGACTGTCCCTCTCGAACCTGCGCGACG-3'  
 Pn1: 5'-GCCACTCTAGTCAACAACCT-3'  
 Pn2: 5'-GAAGTCCCTTTTGGGGGAAG-3'

Pn1 和 Pn2 用于检测转染细胞 mRNA 的表达, 其扩增片段位于 O-连接糖链域。引物编号 P<sub>X,2</sub> 或 P<sub>X,3</sub> 中的 X(如 1、2 和 45 等)代表某个或连续的某 2 个重复序列的序号, P<sub>X,2</sub> 代表拟缺失重复序列上游片段的 3' 端引物, P<sub>X,3</sub> 代表拟缺失重复序列下游片段的 5' 端引物。引物 P<sub>X,2</sub> 与 P<sub>X,3</sub> 长度均为 40 bp, 具有完全互补的特点。

以质粒 pCD-VR 为模板, 以 P1 与 P<sub>X,2</sub> 为引物可扩增出缺失序列的上游片段, 以 P<sub>X,3</sub> 与 P4 为引物可扩增出缺失序列的下游片段。聚合酶链反应产物经低熔点琼脂糖凝胶电泳回收后, 将第一次聚合酶链反应扩增出的上下游片段加入同一反应体系中作为模板, 以 P1 与 P4 为引物进行第 2 次聚合酶链反应扩增, 可得到缺失配体结合域某个或连续的某几个重复序列的 VLDLR cDNA 片段(图 1, Figure 1)。聚合酶链反应循环条件为: 94 °C 变性 4 min 后, 94 °C 30 s → 58 °C 45 s → 72 °C 3 min。5 次循环后改变循环条件为: 94 °C 30 s → 62 °C 45 s → 72 °C 3 min, 进行 30 次循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。

### 1.3 重组真核表达载体的构建与鉴定

载体质粒 pCD-VR 与经纯化的第 2 次聚合酶链反应产物均用 BamHiv 和 Nheiv 双酶切, 载体片段与目的基因片段经分离回收纯化后进行连接。连接产物转化感受态细菌 HB101, 利用 AMP 抗性筛选阳性菌落。碱变性法小量提取质粒。LiCl 离心法大量制备及纯化质粒。得到的重组体被命名为: pCD-VRΔ1(缺失重复序列 1, 余类推)、pCD-VRΔ2、pCD-VRΔ3、pCD-VRΔ4、pCD-VRΔ5、pCD-VRΔ6、pCD-VRΔ4-5 和

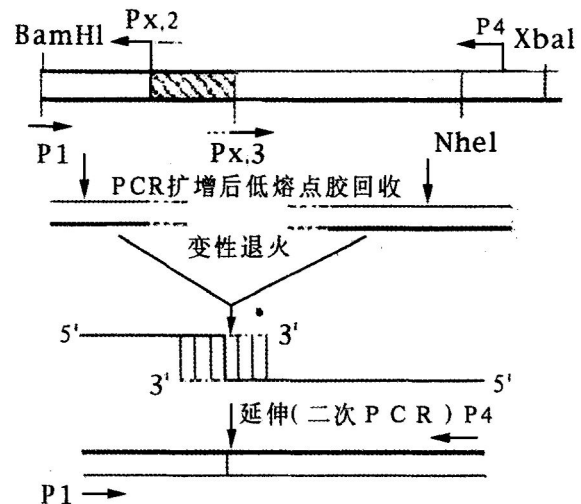


图 1. 基因缺失诱变策略图。

Figure 1. Schematic presentation of oligonucleotide directed mutagenesis.

pCD-VRΔ5-6。重组体经 BamHiv 和 Apaiv 等限制性内切酶酶切鉴定及测序鉴定。

### 1.4 脂蛋白的分离与 DiI 标记<sup>[5,6]</sup>

家兔以高胆固醇饲料饲养 6 周后, 颈动脉插管取血, EDTA-Na<sub>2</sub> 抗凝, 8 000 r/min 离心 15 min 分离血浆。加入 PMSF (1 μmol/L)、NaN<sub>3</sub> (1 mmol/L) 及还原型谷胱甘肽后, 12 000 r/min, 离心 30 min, 除去上层乳糜微粒。脂蛋白用荧光物质 DiI 进行标记。取无乳糜微粒血浆 20 mL, 加入 DiI 浓度为 15 g/L 的 DM-SO 溶液 20 μL, 37 °C 避光标记 8~12 h。用 NaCl 将血浆密度调至 1.1, 装入 35.5 mL Beckman 离心管中, 再铺上密度 1.006 的梯度液, 55 000 r/min, 离心 3 h 后可分离出 DiI 标记的 β-VLDL, PBS 液透析 24 h 后即可使用。

### 1.5 细胞培养与基因转移

CHO-K1 细胞用含 10% 胎牛血清的 F12 培养基在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。基因转染用 Lipofectamine 介导的方法进行。转染效率用转染 pBLacZ 基因细胞的组织化学方法监测, 阳性转染细胞呈蓝色。计数蓝染细胞占总细胞数的百分率作为转染效率。转染后 48 h 用于检测外源基因在 CHO 细胞中的瞬时表达。

### 1.6 逆转录—聚合酶链反应检测极低密度脂蛋白受体基因的表达

异硫氰酸胍一步法<sup>[7]</sup>提取野生型 CHO 细胞和转基因 CHO 细胞总 RNA, 用逆转录—聚合酶链反应检测 VLDLR 基因的表达。

### 1.7 脂蛋白结合实验

瞬时表达正常及突变 VLDLR 的 CHO 细胞与 DiI 标记的  $\beta$ -VLDL 结合实验于转染后 48 h 进行。实验前 48 h 加 25-羟胆固醇和胆固醇于培养基中(终浓度分别为 1 和 10 mg/L), 以抑制 LDL 受体的表达。结合开始时, 弃细胞培养基, 用 PBS 洗细胞 2 次, 然后加入预冷的含有 10 mg/L DiI 标记的  $\beta$ -VLDL 无血清培养基。4℃ 孵育 3 h 后, 用预冷的含 0.2% 牛血清白蛋白 PBS 及 PBS 分别洗 2 次和 3 次, 以除去未结合的标记脂蛋白。然后每个 35 mm 培养皿中加入 1 mL 细胞裂解液(0.1 mol/L NaOH 和 1 g/L SDS) 裂解细胞, 测定裂解液的荧光强度( $\lambda_{\text{激发}} = 520 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{发射}} = 580 \text{ nm}$ ) 及细胞蛋白含量(Lowry 法), 以 DiI- $\beta$ -VLDL 蛋白量( $\mu\text{g}$ )/细胞蛋白量(mg) 表示细胞表面结合的标记  $\beta$ -VLDL 量。

### 1.8 统计学方法

实验结果均采用样品均数的  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 缺失突变极低密度脂蛋白受体表达载体的酶切鉴定

pCD-VR 经酶切后得到 3 个片段: 5 360 bp、1 907 bp 和 983 bp。pCD-VR $\Delta$ 1、pCD-VR $\Delta$ 2、pCD-VR $\Delta$ 3、pCD-VR $\Delta$ 4、pCD-VR $\Delta$ 5、pCD-VR $\Delta$ 6、pCD-VR $\Delta$ 4-5 和 pCD-VR $\Delta$ 5-6 也被切成 3 个片段, 2 个大片段与 pCD-VR 的片段相同, 小片段比 pCD-VR 的片段小 1 个或 2 个缺失区的长度, 分别为 863 bp、860 bp、866 bp、845 bp、866 bp、884 bp、728 bp 和 728 bp(图 2, Figure 2)。

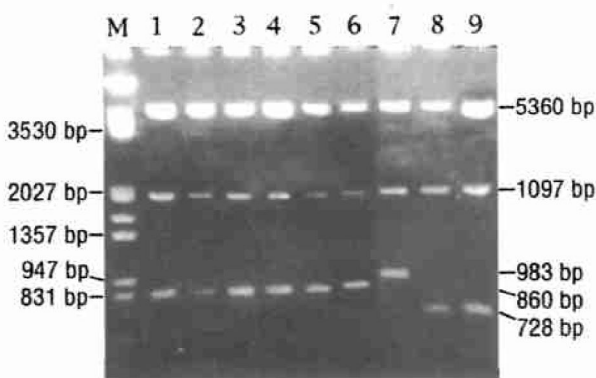


图 2. 重组体的酶切结果。

**Figure 2. The restriction map of the recombinants.** M:  $\lambda$ DNA/Hind III Marker, 1: pCD-VR $\Delta$ 1, 2: pCD-VR $\Delta$ 2, 3: pCD-VR $\Delta$ 3, 4: pCD-VR $\Delta$ 4, 5: pCD-VR $\Delta$ 5, 6: pCD-VR $\Delta$ 6, 7: pCD-VR, 8: pCD-VR $\Delta$ 4-5, 9: pCD-VR $\Delta$ 5-6.

### 2.2 极低密度脂蛋白受体缺失突变体 cDNA 的序列分析

重组质粒 pCD-VR $\Delta$ X(X 代表缺失的重复序列)测序结果表明, 对于不同的缺失体, 拟缺失的区域均得到了正确的缺失。

### 2.3 转染效率

阳性转染 CHO 细胞呈蓝色反应, 未导入基因的细胞不着色。结果显示, 转染效率在 90% 以上(图 3, Figure 3)。

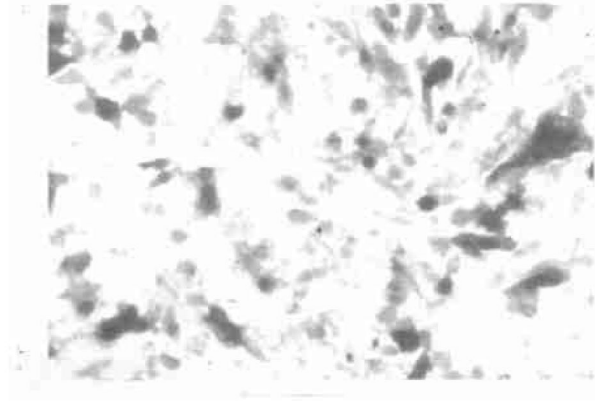


图 3. 转染 LacZ 基因的中国仓鼠卵巢细胞组织化学染色。

**Figure 3. X-gal histochemistry dyeing result of instantaneous transfected cells.**

### 2.4 极低密度脂蛋白受体基因的表达

琼脂糖凝胶电泳结果发现: 转染细胞均扩增出相应的片段, 提示外源 VLDLR 基因在 CHO 细胞得到了有效表达(图 4, Figure 4)。

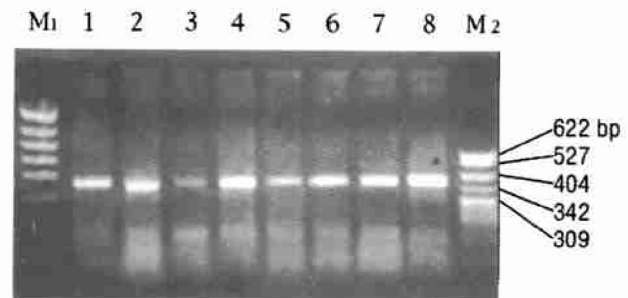


图 4. 逆转录-聚合酶链反应产物的凝胶电泳图谱。

**Figure 4. The gel electrophoresis photograph of the RT-PCR products.** M1: PCR Marker, 1: pCD-VR $\Delta$ 1, 2: pCD-VR $\Delta$ 2, 3: pCD-VR $\Delta$ 3, 4: pCD-VR $\Delta$ 4, 5: pCD-VR $\Delta$ 5, 6: pCD-VR $\Delta$ 6, 7: pCD-VR $\Delta$ 4-5, 8: pCD-VR $\Delta$ 5-6, M2: PBR322/MspI Marker.

### 2.5 转染全长或缺失突变的极低密度脂蛋白受体基因的 CHO 细胞与 $\beta$ -极低密度脂蛋白受体的结合

图 5(Figure 5) 显示: 分别转染 pCD-VR $\Delta$ 1、pCD-VR $\Delta$ 2 的 CHO 细胞结合  $\beta$ -VLDL 的能力比转染 pCD-VR 的 CHO 细胞显著降低( $P < 0.05$ ), 分别转染其它缺失体的 CHO 细胞结合  $\beta$ -VLDL 的能力与转染 pCD-

VR 的 CHO 细胞无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

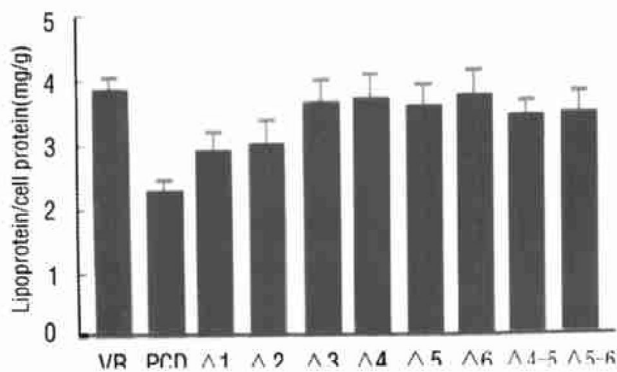


图 5.  $\beta$  极低密度脂蛋白与各缺失受体转染细胞的结合。

Figure 5. Effect of mutants of VLDLR on DiI- $\beta$ -VLDL binding activity.

### 3 讨论

近 20 年来, 尽管对 VLDLR 进行了大量的研究, 但其生物学功能尚未完全阐明。研究发现, VLDLR 在一些病理状态下有异常的表达, 与某些疾病关系密切<sup>[8-12]</sup>, 因此近年来对 VLDLR 的研究成为脂蛋白受体研究领域的一个热点。LDLR 是特征性阐述最详尽的脂蛋白受体, 它能够与含载脂蛋白 B100 及载脂蛋白 E 的脂蛋白结合, 如 LDL 和 VLDL; 而 VLDLR 主要结合 VLDL、 $\beta$ -VLDL (包括兔  $\beta$ -VLDL) 及 IDL, 但对 LDL 亲和力很低。结构上, VLDLR 与 LDLR 极为相似, 均由 5 个功能域组成, 两者关键的不同在于 VLDLR N-端配体结合域比 LDLR 多一个重复序列, 共有 8 个重复序列。在 LDLR 分子上, 结合 LDL 需重复序列 3~7, 结合  $\beta$ -VLDL 需重复序列 4、5<sup>[13]</sup>, 故有理由推测 VLDLR 比 LDLR 多出的这一重复序列可能影响其与脂蛋白的结合功能。为了探讨 VLDLR 配体结合域重复序列结构与受体结合脂蛋白功能的关系, 本研究对 VLDLR 配体结合域各重复序列进行了逐一或联合缺失并构建了不同的缺失重组体。采用脂质体介导的方法将重组体导入 CHO 细胞。pBLacZ 基因模拟转染及转基因细胞逆转录-聚合酶链反应结果表明: 转染效率很高且外源 VLDLR 得到了有效表达, 高效表达有利于表达产物的功能检测。用逆转录-聚合酶链反应方法未检测到 CHO 细胞内源性 VLDLR 的表达。我们前期的研究已经证明, 缺失配体结合域重复序列 1~5 的 VLDLR 基本丧失了结合  $\beta$ -VLDL 的功能可能 VLDL 受体结合  $\beta$ -VLDL 的部位在前 5 个重复序列, 也可能因为缺乏 5 个重复序列的 VLDL 受体配体结合域空间构象遭到严重破坏而丧

失结合  $\beta$ -VLDL 的能力。

本研究结果显示, 重复序列 1、2 分别缺失的 VLDLR 结合  $\beta$ -VLDL 的能力显著降低, 而重复序列 3、4、5、6 分别缺失及 4、5、5-6 联合缺失时, 对 VLDLR 结合  $\beta$ -VLDL 的能力没有显著影响, 因此, 从本实验研究的重复序列观察: 重复序列 1 和 2 含有与结合  $\beta$ -VLDL 的有关结构, 为进一步研究 VLDLR 配体结合域所有重复序列在与配体结合中的作用奠定了基础。VLDLR 的配体结合域比 LDLR 多一个重复序列, 所引起空间构象的改变可能是导致 LDLR 能识别而 VLDLR 不能识别 LDL 的原因。如果缺失某个重复序列的 VLDL 受体能结合 LDL, 则可进一步阐明 VLDL 受体结构与功能的关系。本实验室今后将对配体结合域不同重复序列缺失的 VLDLR 结合各种配体尤其是结合 LDL 的能力进行进一步研究, 为研究 VLDLR 在正常生理及病理条件下的功能意义奠定基础。

### [参考文献]

- [1] Jingami H, Yamamoto T. The VLDL receptor: wayward brother of the LDL receptor. *Curr Opin Lipid*, 1995, 6 (2): 104-108
- [2] 冯宁, 周华, 屈伸, 等. 全长及缺失 VLDL 受体基因转染的 CHO 细胞与  $\beta$ -VLDL 的结合效应. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, 16 (4): 478-482
- [3] 屈伸, 王建波, 刘志国, 等. 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. *中国动脉硬化杂志*, 2000, 8 (3): 189-192
- [4] Dieffenbach CW. *PCR Primer: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995: 271-278
- [5] Chunben W, Youmei F, Yiqiang Z. Rapid isolation of large amount of plasma VLDL and LDL by a tow step ultracentrifugation. *J Tongji Med Univ*, 1995, 15 (4): 198-200
- [6] Pitas RE, Innerarity TL, Weinstein JN, et al. Acetoacetylated lipoprotein used to distinguish fibroblasts from macrophages in vitro by fluorescence microscopy. *Arteriosclerosis*, 1981, 1: 177-185
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 196-205
- [8] Martensen PM, Oka K, Christensen L, et al. Breast carcinoma epithelial cells express a very low density lipoprotein receptor variant lacking the  $\alpha$ -linked glycosylation domain encoded by exon 16, but with full binding activity for serine proteinase/serpin complexes and Mr-4000 receptor-associated protein. *Eur J Biochem*, 1997, 248: 583-591
- [9] Christie RH, Chung H, Rebeck GW, et al. Expression of the very low density lipoprotein receptor (VLDLr), an apolipoprotein-E receptor in the central nervous system and in Alzheimer' disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1996, 55: 491-498
- [10] Masuzaki H, Jinguami H, Matsuoka N, et al. Regulation of very-low-density lipoprotein receptor in hypotrophic rat heart. *Circ Res*, 1996, 78 (1): 8-14
- [11] Liang K, Vaziri ND. Acquired VLDL receptor deficiency in experimental nephrosis. *Kidney Int*, 1997, 51: 1761-765
- [12] Hiltunen TP, Luoma J, Nikkari T, et al. Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein and scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lesions: marked induction of scavenger receptor and VLDL receptor expression during lesion development. *Circulation*, 1998, 97: 1079-086
- [13] Esser V, Limbird LE, Brow MS, et al. Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*, 1988, 263 (26): 13282-290

(此文编辑 朱雯霞)