

人胚肝脂代谢相关基因的表达谱

唐震, 李晓宇, 何龙, 陈秀英, 范乐明, 陈琪

(南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 江苏省南京市 210029)

[关键词] 病理生理学; 人胚肝基因表达谱; cDNA 微阵列杂交; 脂代谢相关基因; cDNA 微阵列

[摘要] 运用 cDNA 微阵列结合荧光半定量聚合酶链反应技术, 首次大规模分析人胚发育过程中肝脏脂代谢相关基因的表达情况, 比较孕早、晚期人胚肝脂代谢相关基因的表达谱。抽提孕早、晚期胎儿肝脏组织总 RNA, 取等量 mRNA 逆转录标记 33P, 制成 cDNA 探针后与人类全基因 cDNA 微阵列芯片杂交, 用相应软件分析杂交信号扫描结果。有差异表达的基因再用实时荧光半定量 PCR 方法进一步确认。在进入研究的可信基因中, 与脂代谢相关的基因共有 135 条, 其中 28 条有差异表达(2 倍以上), 随胎龄增长, 脂肪酸分解的相关基因呈现上调趋势, 脂肪酸和胆固醇合成的相关基因呈现下调趋势, 差异范围从 0.43~8.3 倍。检测 15 例胚肝组织的脂质含量, 发现胆固醇和甘油三酯水平随胎龄增长而逐渐下降。人类胚胎肝脏的胆固醇和甘油三酯的合成率及含量可能随着发育成熟呈现下降趋势。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expression Profile of Lipid Metabolism-Related Genes in Human Fetus Liver

TANG Zhen, LI Xiao Yu, HE Long, CHEN Xiu Ying, FANG Le-Ming, and CHEN Qi

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

[KEY WORDS] Liver; Lipid Metabolism-Related Genes; Gene Expression Profile; cDNA Microarray

[ABSTRACT] **Aim** To analyze the expression profile of lipid metabolism-related genes in human fetus liver by cDNA microarray and fluorescent semi-quantitative PCR. **Methods** 33P-labeled cDNA probes were prepared by RT-PCR using mRNA from human fetus livers of the first and the third trimester of the gestation. The probes were hybridized with human gene chip containing 16 363 clones. The hybridizing signals were scanned by ELA-300 Plate/Fluorescent Image Analyzer. The differential expressed genes were confirmed by fluorescent semi-quantitative PCR. **Results** The expression of fatty acid decomposition-related genes increased and the expression of genes associated with fatty acid and cholesterol synthesis decreased with the increase of the gestation, among 28 differential expressed genes (at least 2 fold). Measurement of lipids levels in 15 fetus livers showed that the contents of total cholesterol and triglycerides decreased with the increase of the gestation. **Conclusion** The synthesis of cholesterol and triglycerides and their levels in fetus livers would decrease as the fetus develops.

脂质是生物体内的一类重要物质, 不仅参与能量的利用和储存, 也是细胞膜的主要结构成分, 同时还在体温的维持、神经冲动的传导等方面发挥重要的作用。体内的脂质和其他分子一样, 处于活跃的代谢过程中, 尤其在生命过程的特殊阶段——胚胎的发育过程中, 脂质对胎儿的正常发育更加重要。为了维持旺盛的生长速率, 胎儿需要比成人更多的脂质^[1,2]。然而, 对于胚胎期脂质代谢的情况所知甚少, 一般用母体血液或脐血中的一些生化指标作为评价标准^[3,4], 这些指标不仅间接而且单一, 不能全

面、直接的反映胎儿脂代谢方面的情况。本研究以人胚肝脏为研究材料, 用表达谱芯片结合荧光半定量 PCR 的方法, 研究人类胚胎发育过程中肝脏脂代谢相关基因的表达谱, 以此探讨人类胚胎发育过程中的脂代谢变化特点。

1 材料和方法

1.1 材料

Trizol RNA 抽提试剂(美国 Gibco BRL 公司), Oligotex mRNA mid kit (德国 Qiagen 公司), 鼠白血病病毒逆转录酶 MMLV (美国 Promega 公司), RNA Marster Syber Green I kit (瑞士 Roche 公司), Lightcycler Instrument 实时定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司), 脂质检测试剂盒(北京中生公司)。

收集不同孕周引产的正常胎儿肝脏 9 例(中国人民解放军第 81 医院和南京医科大学附属第二医

[收稿日期] 2002-12-30 [修回日期] 2003-04-12

[基金项目] 国家重大基础研究资金(TG2000056910)资助

[作者简介] 唐震, 女, 1976 年出生, 江苏省南京市人, 医学硕士, 研究方向为脂代谢的分子机制。李晓宇, 女, 1975 年出生, 江苏省海安市人, 医学博士, 讲师, 主要从事动脉粥样硬化性疾病的分子机制的研究。陈琪, 男, 1958 年出生, 江苏省南通市人, 医学博士, 教授, 博士研究生导师, 本文通讯作者, 主要从事脂代谢及动脉粥样硬化性疾病分子机制的研究, 联系电话为 025-6662610, E-mail 为 qichen@njmu.edu.cn。

院妇产科提供),液氮速冻, -80°C 保存以备 RNA 抽提。同时保存病理切片。用冷抽提法抽提胎儿冰冻肝脏组织中的脂质成分,并用脂质测定试剂盒测量总胆固醇和甘油三酯的含量。

1.2 肝脏 RNA 的提取与纯化

取孕 13 周(孕早期)、孕 29 周(孕晚期)肝脏各 1 例,采用 Trizol 试剂抽提组织总 RNA,经紫外分光光度仪和 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA。取等量总 RNA,用 Oligotex mRNA Mini Kit 进一步分离纯化 mRNA。

1.3 mRNA 的逆转录同位素标记

取等量 mRNA,加入 Random Primer、RNase-free 水, 70°C 水浴 3 min,冰上骤冷;按以下顺序加入各试剂, $5\times$ RT Buffer, RNA 酶抑制剂, dNTP (无 dATP),充分混匀;加 MMLV 酶和 ^{33}P -dATP 混匀; 37°C 水浴 30 min,再 42°C 90 min;加入 10 mol/L 的 NaOH,煮沸 5~7 min,冰上骤冷;依次加入冰醋酸、醋酸钠、无水乙醇,混匀后 15 000 r/min 离心 10 min。取上清至另一新的 EP 管中,分别测沉淀管和上清管的 Counts。计算掺入率=沉淀管 Counts/上清管 Counts。加入 40 μL RNase-free 水溶解沉淀作为探针待用。

1.4 芯片杂交和洗涤

制备好的 cDNA 杂交探针,与事先点好含有 16 363 个 cDNA 克隆的 cDNA 微阵列芯片杂交,人类全基因 cDNA 微阵列芯片(尼龙膜)由中科院生物化学与细胞生物学研究所提供^[5]。杂交后芯片经洗涤、烘干,压磷屏过夜,放射自显影。

1.5 检测与分析

使用 ELA-300 Plate/Fluorescent Image Analyzer 扫描仪扫描磷屏上的杂交信号,并采用 ArrayGauge v1.0 软件(日本 FujiFilm 公司)作定量分析。根据两张芯片所有克隆的表达丰度将杂交结果进行均一化,获得阵列中基因在两个不同时期同一组织中表达强度的比值,找出差异表达基因。

1.6 实时荧光半定量 PCR 验证芯片杂交结果

选取表达差异较明显的基因在转录水平上进行半定量,验证芯片结果。取各组织总 RNA 约 500 ng,在预冷的毛细管中依次加入总 RNA、Tth DNA 聚合酶(该酶为热启动酶,在 61°C 发挥逆转录效应,同时在 PCR 过程中发挥 DNA 聚合作用)、 Mn^{2+} 及 Sybr Green I 检测染料等,充分混匀,在 Lightcycler 仪器上进行一步法 RT-PCR。 61°C 逆转录 20 min; 95°C 预变性 2 min;然后进入循环, 95°C 变性 5 s, 58°C 退火 5 min, 72°C 延伸 13 s, 30 个循环;结束时逐渐降温至 30°C 。在每个循环末进行实时荧光检测。

2 结果

2.1 芯片杂交结果

肝脏组织病理切片证实各标本均为正常胎儿肝脏。总 RNA 抽提结果发现,两例样本吸光度(A260/A280)均 > 1.8 。变性凝胶电泳条带清晰, 28S 与 18S 比值约为 2:1,且无明显降解。从芯片杂交的可信基因中筛选出表达差异达 2 倍以上的基因共 869 条,其中 3 倍以上有 237 条,5 倍以上有 47 条,10 倍以上有 4 条。在 869 条基因中,未知功能的基因和 EST 片段有 303 条,已知功能的基因有 566 条。分别归类于发育、细胞周期、能量代谢、信号转导、炎症等。本文将脂代谢相关基因并为一类作专门研究,其他类别基因的表达差异情况留待进一步研究。cDNA 微阵列芯片杂交结果如图 1(Figure 1)所示。

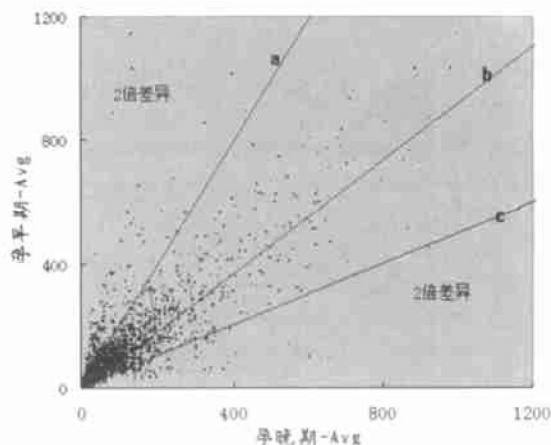


图 1. 杂交信号散点图 图中每一点代表一个基因,直线 a 和 b 以外的点代表表达差异在 2 倍以上的基因。直线 c 表示两个样本的差异性,用 R2 值表示。R2 值越接近 1 表示两样本差异越小。R2=0.7707。

Figure 1. Expression profiling of 16363 clones between human fetal liver at the first and the last trimester of gestation

2.2 脂代谢相关基因表达谱

在进入研究的可信基因中,确定与脂代谢相关的基因共有 135 条。随着胚胎的发育进程,差异表达 2 倍以上的基因共有 28 条(20.7%);其中有 8 条基因(5.9%)随胎龄增长呈现上调趋势,有 20 条基因(14.8%)呈现下调趋势。这些基因分别归类于胆固醇代谢、脂肪酸代谢、调控通路、增殖等。2 倍以上差异表达的脂代谢相关基因的功能分类见表 1 (Table 1)。

2.3 实时荧光半定量 PCR 测定

选择经芯片检测有差异表达的部分脂代谢相关基因作实时荧光半定量 PCR 测定,其中参与脂肪酸

表 1. 脂代谢相关基因的功能分类表

Accession ID	基因名称	孕早期/孕晚期
脂肪酸代谢		
AA706930	脂肪酸结合蛋白, 肝	8.3
AC004770	脂肪酸去饱和酶 1	5.2
AC004770	脂肪酸去饱和酶 3	5.2
X07228	肝脂酶	2.5
U62317	肉碱棕榈酰基转移酶 I	0.43
胆固醇代谢		
AL022163	金合欢二磷酸合成酶	3.0
NM_012213	丙二酸单酰辅酶 A 脱羧酶	2.3
磷脂合成代谢		
U62317	类胆碱激酶	0.43
调控通路		
U50748	瘦素受体	7.8
AL022721	过氧化物酶体增殖激活受体 δ	2.3
AL050337	干扰素 γ 受体 1	2.1
AL022721	转录增强因子家族成员 3	2.3
M63904	鸟苷酸结合蛋白 $\alpha 15$	0.14
增殖		
M37435	集落刺激因子 1	3.1
AF022375	血管内皮生长因子	2.1
U62317	内皮细胞生长因子 1	0.43
炎症		
M15330	白细胞介素 1, β	0.34
其他		
AL117505	三磷酸腺苷酶	2.2
Y17392	层粘蛋白 1	2.0
U62317	芳基硫酸酯酶 A	0.43
AC004770	11 号染色体开放阅读框 9	5.2
AC004770	瓣结构特异性核酸内切酶 1	5.2
AL022721	核糖体蛋白 L10 ^a	2.3
AL050318	肌球蛋白调控轻链 2	2.0
AL050318	假设 Rab5 作用蛋白	2.0
AL050318	转化生长因子 β 诱导因子 2	2.0
U62317	有丝分裂原活化蛋白激酶 8 作用蛋白 2	0.43
U62317	智人染色体 mRNA 克隆 395461 片段	0.43

代谢的基因如脂肪酸结合蛋白 1(fatty acid binding protein 1, FABP1)、脂肪酸去饱和酶 1(fatty acid desaturase 1, FAD1)、脂肪酸去饱和酶 3(fatty acid desaturase 3, FAD3)、肝脂酶(hepatic lipase, HL)等,参与胆固醇代谢的基因如金合欢二磷酸合成酶(farnesyl diphosphate synthase, FDS)、丙二酸单酰辅酶 A 脱羧酶(malonyl-CoA decarboxylase)等,其差异结果与 cDNA 芯片结果吻合。以 FABP1 为例,实时荧光半定量 PCR 结果见图 2 (Figure 2)。由于 $CT_a < CT_b$, 以 β -actin 为内参,发现孕早期比率 $<$ 孕晚期比率,因此,在 mRNA 表达水平上,孕早期高于孕晚期,与芯片结果吻合。

2.4 肝脏中脂质成分

肝脏中胆固醇及甘油三酯的含量如图 3 (Figure

3) 所示,随着孕周的增加,胆固醇及甘油三酯的含量呈现下调趋势。

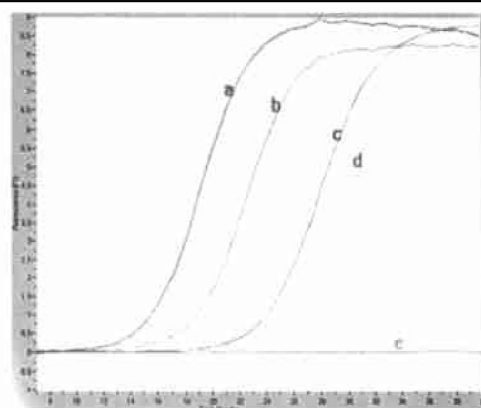


图 2. 荧光半定量 PCR 曲线图 a: 孕早期 FABP; b: 孕晚期 FABP; c: 孕早期 β -actin; d: 孕晚期 β -actin; e: 阴性对照。 $CT_a = 9.108$; $CT_b = 11.810$; $CT_c = 17.83$; $CT_d = 17.86$ 。孕早期比率 = $9.108/17.83 = 0.511$; 孕晚期比率 = $11.810/17.86 = 0.661$ 。孕早期比率 $<$ 孕晚期比率, mRNA 表达水平上,孕早期高于孕晚期。

Figure 2. The results of Fluorescent semi-quantitative RT-PCR

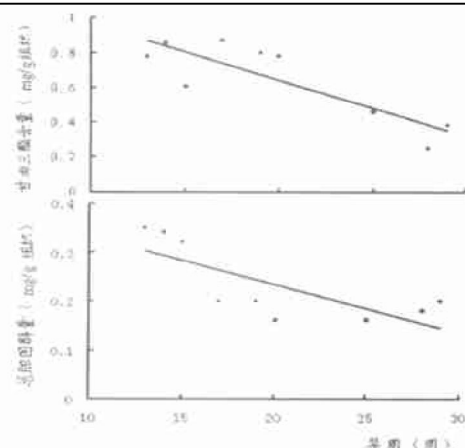


图 3. 胎肝组织中脂质成分图

Figure 3. Lipids levels in human fetal livers

3 讨论

脂代谢关系生长发育,与生命过程息息相关,其代谢紊乱不仅影响正常的生理过程,还会引起动脉粥样硬化和高血压等心脑血管疾病^[6],最近证明高胆固醇血症还与老年性痴呆的发病有关^[7]。肝脏在脂代谢中发挥关键作用,是外源性和内源性脂代谢途径的交汇点及调节中心。肝脏通过分泌载脂蛋白、脂蛋白和脂代谢酶,表达脂蛋白受体摄取脂质,调节血脂水平^[8]。因此,肝脏是研究机体脂代谢的合适靶器官,其脂代谢相关基因表达谱的变化可作为了解机体脂代谢情况的重要窗口。

Schiffman D 等^[9]报告,机体中与脂代谢相关的基因有 268 条,NCBI 美国国立生物技术信息中心

(截止 2002-10-02, 网址: www.ncbi.nlm.nih.gov) 所公布的与脂代谢相关的基因及片段(包括 ESTs, 未知功能或未命名的)有 749 条, 这些基因并非都能在肝脏中表达。本文收集 135 条脂代谢相关基因, 虽不能代表全部, 但其表达谱应能反映肝脏的脂代谢情况。为进一步验证表达谱芯片的结果, 我们对经芯片检查有差异表达的基因又作了实时荧光半定量 PCR 法测定^[10], 结果与芯片一致。不仅如此, 对芯片检测为阴性的部分基因也进行了半定量检测, 结果仍为无差异表达, 表明本研究所采用的表达谱芯片技术基本可靠^[5, 11, 12]。

比较不同胎龄的肝脏组织, 发现脂肪酸和胆固醇代谢相关基因的表达在孕早期和孕晚期有明显差异, 差异范围从 0.43~8.3 倍。参与脂肪酸合成代谢的基因如: 肝脂酶、脂肪酸去饱和酶 1、脂肪酸去饱和酶 3 等 mRNA 水平随胚胎进程呈下调趋势; 而参与脂肪酸分解代谢的基因如肉碱棕酰基转移酶 I 等呈现上调趋势。这些基因在转录水平上的改变, 使脂肪酸及其在代谢通路上的各类产物如: 酰基辅酶 A、前列腺素、凝血素、白三烯等的生成发生相应变化, 进而对脂质分布及能量代谢产生影响。在孕早期, 胎儿发育对脂肪酸及其产物的需求量可能高于孕晚期成熟胎儿, 因此在孕晚期通过降低脂肪酸合成、增强分解来减少过多的脂肪酸。

胆固醇是体内最丰富的固醇类物质, 既作为细胞生物膜的构成成分, 又是类固醇激素、胆汁酸及维生素 D 的前体物质^[13]。本文发现, 参与胆固醇合成代谢的基因如金合欢二磷酸合成酶和丙二酸单酰辅酶 A 脱羧酶的 mRNA 表达水平随胚胎发育呈下调趋势。说明孕早期胎儿肝脏的胆固醇合成代谢较高, 随着胚胎发育渐趋成熟, 胎儿对胆固醇的需求量降低。Haave 等^[14]在大鼠模型中发现, 胆固醇的合成率随着胚胎发育的进程呈现下降趋势。已知胆固醇在胚胎发育早期各器官的形成中起着巨大作用, 尤其对前脑的形成至关重要^[2]。本文结果提示胆固醇在胎肝的发育成熟中可能也发挥重要作用。脂质代谢在代谢通路上受到很多基因的调控, 如固醇反应元件结合蛋白(sterol regulatory element binding protein, SREBPs)、过氧化物酶体增殖激活受体家族(peroxisome proliferator activated receptor, PPAR)等^[15, 16]。本实验发现, 随着胚胎发育, 参与脂质调控的基因也发生了重大的变化, 如瘦素受体、PPAR δ 和血管紧张素受体 1 等。这些基因分别通过 STAT 和 PI-PLC 等途径对下游基因进行调控。虽然目前对具体的调控机制尚不明确^[1, 2], 但足以影响脂质的生

成。本文直接测定多个胚肝组织的脂质含量, 结果发现随孕周增加, 胆固醇和甘油三酯含量逐渐下降。蔡海江等^[17]早期研究结果表明: 随孕周的增加, 脐带血中胆固醇含量呈下降趋势, 胚肝 LDL 受体活性则逐渐增强。

结合本研究结果表明, 在胚胎发育早期, 胎儿对脂质的需求量较大, 因此通过自身合成获取脂质的能力比较强。随着胎龄的增长, 各组织器官发育逐渐成熟, 胎儿获取脂质的方式由内源性自身合成逐渐向通过受体摄取外源性脂质的方式转化。这种转变似乎提示: 随着胚胎的发育, 胎儿肝组织的脂质供给逐渐向经济、方便的方式转变。

[参考文献]

- [1] Woollett LA. The origins and roles of cholesterol and fatty acids in the fetus. *Curr Opin Lipidol*, 2001, **12** (3): 305-312
- [2] Woollett LA. Fetal lipid metabolism. *Front Biosci*, 2001, **6**: D536-545
- [3] Ushijima K, Kimura A, Inokuchi T, Yamato Y, Maeda K, Yamashita Y, et al. Placental transport of bile acids: analysis of bile acids in maternal serum and urine, umbilical cord blood, and amniotic fluid. *Kurume Med J*, 2001, **48** (2): 87-91
- [4] Bonkobara M, Boonrit T, Onda K, Matsuki N, Inaba M, Ono K. Effects of epidermal growth factor on maternal and fetal serum amino acid levels in rats. *J Vet Med Sci*, 1997, **59** (11): 1 053-056
- [5] Xu L, Hui L, Wang S, Gong J, Jin Y, Wang Y, et al. Expression profiling suggested a regulatory role of liver-enriched transcription factors in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2001, **61** (7): 3 176-181
- [6] Glass GK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell*, 2001, **104** (4): 503-516
- [7] Hartmann T. Cholesterol, A beta and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, 2001, **24** (Suppl): S45-48
- [8] Satoh H. Lipid metabolism and obstructive liver disease. *Nippon Rinsho*, 2001, **59** (Suppl): 186-189
- [9] Schiffman D, Mikita T, Tai JT, Wade DP, Porter Jg, Seilhamer JJ, et al. Large scale gene expression analysis of cholesterol-loaded macrophages. *J Biol Chem*, 2000, **275** (48): 37 324-332
- [10] Gentle A, Anastasopoulos F, McBrien NA. High-resolution semi-quantitative real-time PCR without the use of a standard curve. *Biotechniques*, 2001, **31** (3): 502, 504-506, 508
- [11] Liang CP, Tall AR. Transcriptional profiling reveals global defects in energy metabolism, lipoprotein, and bile acid synthesis and transport with reversal by leptin treatment in Ob/ob mouse liver. *J Biol Chem*, 2001, **276** (52): 49 066-076
- [12] Mody M, Cao Y, Cui Z, Tay KY, Shyong A, Shimizu E, et al. Genome-wide gene expression profilings of the developing mouse hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (15): 8 862-867
- [13] Allayee H, Laffitte BA, Lusis AJ. An absorbing study of cholesterol. *Science*, 2000, **290**: 1 709-711
- [14] Haave NC, Innis SM. Perinatal development of hepatic cholesterol synthesis in the rat. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1 085** (1): 35-44
- [15] Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 1997, **89** (3): 331-340
- [16] Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res*, 1996, **37** (5): 907-925
- [17] Cai HJ, Xie CL, Chen Q, Chen XY, Chen YH. The relationship between hepatic LDL receptor activity and serum CH level in human fetus. *Hepatology*, 1991, **13** (5): 852-857

(此文编辑 胡必利)