

## •实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2005)13-02-0138-05

## 利用爪蟾卵母细胞建立人类低密度脂蛋白受体基因表达系统

沃兴德<sup>1</sup>, 范春雷<sup>1</sup>, 罗艳<sup>2</sup>, 钱颖<sup>1</sup>, 卢德赵<sup>1</sup>, 唐利华<sup>1</sup>

(1. 浙江中医学院生命科学系, 浙江省杭州市 310053; 2. 杭州师范学院生物化学教研室, 浙江省杭州市 310008)

[关键词] 细胞生物学; 低密度脂蛋白受体基因表达系统; 细胞核显微注射; 爪蟾卵母细胞; 低密度脂蛋白; 动脉粥样硬化; 质粒构建

[摘要] 目的 在爪蟾卵母细胞中建立人类低密度脂蛋白受体基因的表达系统, 此系统可被用于降血脂和抗动脉粥样硬化的研究。方法和结果 冰块麻醉爪蟾, 切取卵巢, 获得 V、VI 期卵母细胞, 经用 1 g/L 胶原酶孵育过夜除去卵母细胞外层的卵膜和滤泡膜, 培养 3 天后存活率仍可达 95% 以上。用 DiI 标记的低密度脂蛋白荧光配体测定膜上结合荧光, 发现 V、VI 期卵母细胞膜上未见有内源性低密度脂蛋白受体, 如将人低密度脂蛋白受体的表达质粒 p3.7 低密度脂蛋白导入爪蟾卵母细胞核中, 培养后用 DiI 标记的低密度脂蛋白配体测定可见膜上发出红色荧光, 用抗低密度脂蛋白受体的抗体经免疫荧光检测法测定可见膜上有绿色荧光, 免疫胶体金标记透射电镜检测可见膜上有内吞的胶体金颗粒。结论 外源性的人类低密度脂蛋白受体基因能在爪蟾 V、VI 期卵母细胞中表达, 此低密度脂蛋白受体基因表达系统可用于中药降血脂抗动脉粥样硬化机理的研究。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

## Establishing the Expressive System of Human Low Density Lipoprotein Receptor Gene in the Oocyte of the *Xenopus Laevis*

WO Xing-De<sup>1</sup>, FAN Chun-Lei<sup>1</sup>, LUO Yan<sup>2</sup>, QIAN Ying<sup>1</sup>, LU De-Zhao<sup>1</sup>, and TANG Li-Hua

(1. Molecular Medical Institute of Zhejiang Traditional Chinese Medical College, Hangzhou 310053; 2. Department of Biochemistry of Hangzhou Teacher's College, Hangzhou 310008; China)

[KEY WORDS] Oocyte of *Xenopus Laevis*; Low Density Lipoprotein; Atherosclerosis; Plasmid Construction; LDL Receptor Gene; Lowering-Lipids

[ABSTRACT] **Aim** The expressive system of low density lipoprotein (LDL) receptor gene was established in the oocyte of the *Xenopus laevis* and the system is applied to investigation of lowering-lipids and anti-atherosclerosis. **Methods** The fluorescence on the membrane with DiI-LDL were determined by culturing the oocytes in the period V and VI so as to judge whether the endogenous LDL receptor in oocyte of *xenopus laevis* existed. After then the p3.7LDL (an expression plasmid which contain human LDL receptor gene) was transmit to the nucleus of oocyte and the immunofluorescence and immunity colloid golden in the cell membrane were observed under microscope. **Results** The experiments proved there was no endogenous LDL receptor on the membrane of oocytes in the period V and VI. The exogenous LDL receptor can be expressed after the p3.7LDL was transmitted to the nucleus of oocyte. **Conclusion** Human LDL receptor gene can be expressed in Oocyte of *Xenopus laevis* and the system can be used in the investigation of lowering-lipids and anti-atherosclerosis.

由于 Gurdon 等<sup>[1]</sup>的贡献以及继后 Barnard 等<sup>[2]</sup>的工作证明在爪蟾卵母细胞中外源 mRNA 和 cDNA 能够被表达, 产生具有功能性的蛋白质, 至今有许多真核细胞膜蛋白的 mRNA 和 cDNA 被注入到爪蟾卵母细胞, 其编码的膜蛋白能够整合到卵母细胞膜上并显示天然的功能活性, 尤其引人注目的是卵母细胞作为“宿主”已被广泛地用于进行外源膜蛋白结

构与功能关系的研究<sup>[3,4]</sup>。

我们利用爪蟾卵母细胞具有转录、修饰和胞内运输等功能, 根据细胞体积大和细胞膜表面积也大, 适用于在同一个细胞上进行多种新技术的联合分析等优点, 通过建立爪蟾卵母细胞人低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 受体基因的表达系统, 借此作为调脂中药高效筛选的方法和对中药降血脂抗动脉粥样硬化作用机理研究的平台。

[收稿日期] 2004-05-08

[修回日期] 2004-11-15

[基金项目] 国家自然科学基金(30070932)资助

[作者简介] 沃兴德, 教授(研究员), 博士研究生导师, 主要从事中医药降血脂抗动脉粥样硬化研究、脂与脂蛋白代谢研究和中医不同证型与蛋白质组相关性研究, E-mail 为 woxtcm@21cn.com。范春雷, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中医药降血脂抗动脉粥样硬化研究。罗艳, 硕士, 讲师, 主要从事中医药降血脂抗动脉粥样硬化研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

成年雌性非洲爪蟾, 购自中国科学院上海细胞研究所, 由本室饲养, 可供常年使用。人 LDL 受体基

因 p3.7LDL 质粒由 Estonia Tartu 大学分子生物学和细胞生物学研究所惠赠。胶原酶、胰蛋白酶和透明质酸酶由 Sigma 公司提供, DiI 由美国 Biotium 公司提供, 超级新生牛血清由杭州四季青生物工程材料研究所提供, 1640 培养基购自美国 GIBCOBRL 公司, 羊抗兔 IgG-HRP 和羊抗兔 IgG-FITC 购自华美生物工程公司, 兔抗牛 LDL 受体抗体由本室制备。

## 1.2 爪蟾卵母细胞的培养

冰块麻醉爪蟾, 下腹部用酒精消毒后作 1 cm 左右切口, 取出卵母细胞放入培养皿中, 用 MBS 培养液(A 液配制为 NaCl 1.76 mol/L, KCl 20 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 47 mmol/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 16.4 mmol/L, MOPS 100 mmol/L; B 液配制为 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 6.6 mmol/L, CaCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 mmol/L。A 液、B 液各稀释 10 倍后以 1:1 混合, 用 Tris 调节 pH 至 7.4, 每 1 000 mL 加庆大霉素 70 mg) 清洗 5 次, 加入 1 g/L 胶原酶, 置 20℃生化培养箱微微震荡, 消化过夜后倒去酶解液, 用无钙 MBS 培养液清洗 3 次以去除细胞之间的粘连, 再用 MBS 培养液清洗 5 次, 此后加入 MBS 培养液在 20℃生化培养箱中培养 1 h 左右, 挑选 V、VI 期正常发育的爪蟾卵母细胞。每 12 h 更换一次 MBS 培养液, 连续培养 3 天。通过孕酮成熟实验以产生核成熟发生泡破裂 (geminal vesicle breakdown, GVBD)<sup>[4]</sup>来判别细胞是否存活<sup>[5]</sup>。

## 1.3 爪蟾卵母细胞核显微注射

爪蟾 V、VI 期卵母细胞置有凹槽的培养皿中, 显微镜下在卵母细胞动物极顶端注射 20 nL 台盼蓝染色液, 注射后用 5% 三氯甲烷固定 10 min, 切开卵母细胞, 观察是否注射在细胞核内, 并计算成功注射百分率。

## 1.4 爪蟾卵母细胞存活率测定

100 个爪蟾 V、VI 期卵母细胞平均分为 2 组, 实验组每卵注射 20 nL 无菌水, 在冰上放置 30 min, 加入 MBS 培养液, 在 20℃生化培养箱内培养 3 天, 每 12 h 更换一次培养液。对照组不注射液体, 培养条件同实验组。通过孕酮成熟实验以产生 GVBD 来确定细胞的存活个数, 存活率 = 存活的细胞个数 ÷ 细胞总数 × 100%。

## 1.5 低密度脂蛋白的分离纯化和 DiI 标记低密度脂蛋白的制备

取人血浆经序列超速离心后得到密度 1.019~1.060 部分, 进一步用 Sepharose 6B 凝胶柱纯化获得 LDL, 取 2 mg LDL 与 25 mg 不溶性马铃薯淀粉置试管中涡旋震荡, 然后迅速用液氮冷冻、经真空干燥器冷冻干燥后储存于 4℃ P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 中。用时加入 -20℃的正

庚烷 5 mL, -20℃孵育, 每 10 min 涡旋震荡一次。1.5 h 后 2 000 rpm、4℃离心 10 min, 弃沉淀。重复上述操作 1 次, 在上清液中加入 4.5 mg DiI, -20℃孵育 2 h 后加入 -20℃的正庚烷 0.4 mL, 在冰浴中用高纯氮气吹干。加入 10 mmol/L Tricine 和 0.01% 叠氮钠 1 mL, 4℃冰箱中孵育 41 h, 每隔一定时间取出混匀一次。4℃、2 000 rpm 离心 15 min, 取上清 12 000 rpm 离心 20 min, 重复 1 次, 所得的上清含 DiI-LDL, 于 4℃保存<sup>[6]</sup>, 用 Lowry 法测定蛋白质浓度。

## 1.6 人低密度脂蛋白受体基因表达

取 V、VI 期卵母细胞 100 个, 并分为 2 组, 实验组每卵注入 1 g/L p3.7LDL 质粒。对照组每卵注入 20 nL 无菌水。两组细胞放入 20℃生化培养箱培养, 每 12 h 更换一次 MBS 培养液。2 天后取卵细胞以 1 g/L 的透明质酸酶 20℃消化 10 min, 用 MBS 清洗 3 遍。设计以下三组实验: 取实验组和对照组各 20 个卵置 24 孔板, 每孔加 0.2 mL 含 0.5% 牛血清白蛋白的 MBS 培养液 1 h, MBS 清洗 3 遍。每孔加 1:500 稀释的兔抗牛 LDL 受体抗血清 0.2 mL, 37℃孵育 1 h, MBS 洗 3 遍, 用 4% 甲醛溶液固定 10 min, MBS 洗 3 遍, 每孔加 1:1 000 稀释的羊抗兔 IgG-FITC 0.2 mL, 37℃孵育 1.5 h。用 MBS 洗 3 遍后, 卵母细胞压碎涂片, 在荧光显微镜下观察。④取实验组和对照组各 20 个卵, 在 1 mL 含 20 mg/L DiI-LDL 的 MBS 培养液中 20℃生化培养箱孵育 5 h, 4% 甲醛固定 10 min, 用 MBS 洗 3 遍后将卵母细胞压碎涂片, 在荧光显微镜下观察。④取实验组和对照组各 10 个卵置 24 孔板, 每孔加 0.2 mL 含 0.5% 牛血清白蛋白的 MBS 培养液培养 1 h, MBS 清洗 3 遍, 每孔加 1:500 稀释的兔抗牛 LDL 受体抗血清 0.2 mL, 20℃孵育 2 h, MBS 洗 3 遍, 每孔加 1:1 000 稀释的胶体金标记羊抗兔 IgG, 20℃孵育 2 h, MBS 洗 3 遍后用 5% 戊二醛固定液固定, 用透射电镜检测。

# 2 结果

## 2.1 爪蟾及爪蟾卵母细胞培养情况

本室饲养的非洲爪蟾生存良好, 无死亡, 5 次取卵, 每次取 200 个 V、VI 期卵母细胞体外培养 3 天, 以孕酮成熟实验观察卵母细胞, 平均存活率达 95% (图 1A 和 1B, Figure 1A and 1B)。

## 2.2 爪蟾卵母细胞核注射

图 2 (Figure 2) 显示台盼蓝被成功地注入细胞核, 图 3 (Figure 3) 显示台盼蓝未能成功地注入细胞核。实验中台盼蓝成功注入细胞核的卵母细胞为 96

个, 成功率为 96%。

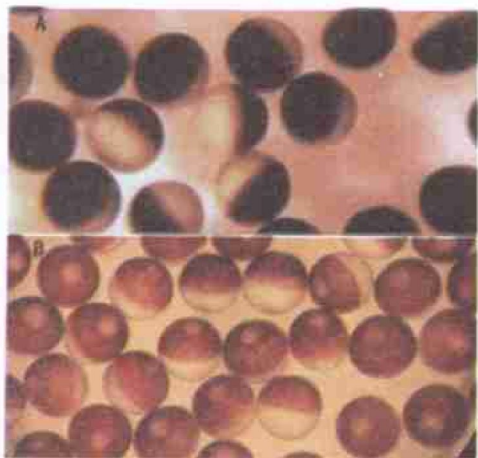


图 1. 培养液中的 V、VI 期卵母细胞      A 为不含孕酮, B 为含孕酮。

Figure 1. The oocytes of *Xenopus laevis* in the period V, VI in the culture fluid



图 2. 台盼蓝被成功地注入细胞核内

Figure 2. Trypan blue was injected into nucleolus successfully

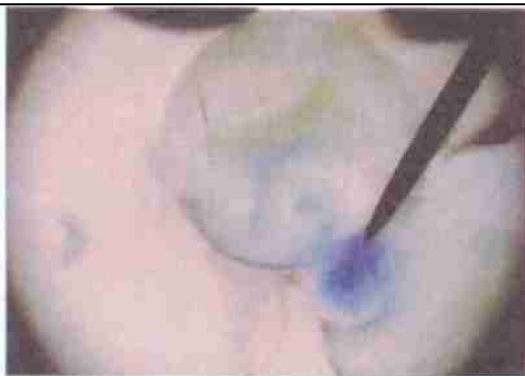


图 3. 台盼蓝未能成功地注入细胞核

Figure 3. Trypan blue was injected into nucleolus unsuccessfully

2.3 核注射后对卵母细胞存活率的影响

注射 20 nL 无菌水的卵母细胞存活率为 92%, 未注射液体的卵母细胞的存活率为 94%, 二者无显著性差异。说明卵母细胞对 20 nL 溶液核注射有良好的耐受力(表 1, Table 1)。

表 1. 核注射后对卵母细胞存活率的影响

Table 1. Effect of the injected  $H_2O$  into the nucleolus on the livability of the oocyte

| 分 组 | 细胞个数 | 存活个数 | 存活率 |
|-----|------|------|-----|
| 实验组 | 50   | 46   | 92% |
| 对照组 | 50   | 47   | 94% |

2.4 人低密度脂蛋白受体基因的表达

免疫荧光法检测可见细胞膜上有明显的 FITC 绿色荧光(图 4, Figure 4); 用 DiI-LDL 配体经荧光检测可见细胞膜上有明显的红色荧光(图 5, Figure 5); 免疫胶体金电镜检测可见细胞膜上有内吞的胶体金颗粒(图 6, Figure 6)。未经核注射的对照组卵母细胞则未见细胞膜上有 FITC 绿色荧光和 DiI 红色荧光; 免疫胶体金电镜也未检测到细胞膜上有内吞的胶体金颗粒。上述三个实验均证明爪蟾卵母细胞中没有内源性 LDL 受体, 而本实验所构建的人 LDL 受体基因表达质粒能在 V、VI 期爪蟾卵母细胞中表达。

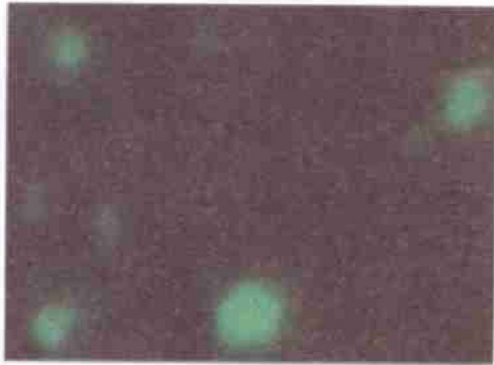


图 4. 用免疫荧光法测定低密度脂蛋白受体表达

Figure 4. Determined the expression of the LDL receptor with immunofluorescence



图 5. 用 DiI 低密度脂蛋白荧光配体标记法测定低密度脂蛋白受体表达

Figure 5. Determined the expression of the LDL receptor with DiI-LDL fluorescence

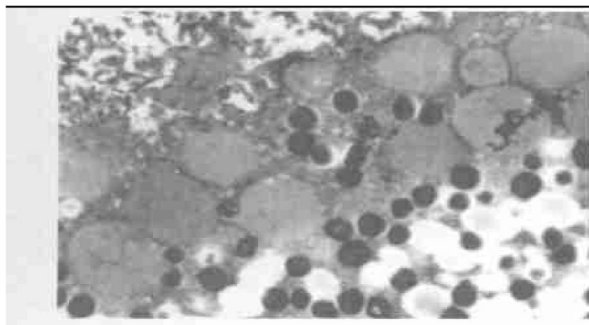


图 6. 用免疫胶体金标记法测定低密度脂蛋白受体表达

Figure 6. Determined the expression of the LDL receptor with immunity colloid golden

### 3 讨论

迄今为止,心脑血管病仍是重大的疾病之一,脂质代谢紊乱是引起心脑血管病的主要原因。原发性和继发性高脂血症均可导致和加重动脉粥样硬化的发生和发展。脂代谢紊乱与脂蛋白和载脂蛋白的类型和浓度、与脂代谢相关酶类和受体的数量和活性等有关。目前市售的具有降脂作用的他汀类和贝特类药就是通过调节脂代谢相关酶的活性起到降低血清胆固醇和甘油三酯的作用。我国学者从 70 年代开始进行了中药降血脂抗动脉粥样硬化的研究,实验表明许多药物具有降血脂的作用<sup>[7]</sup>。但对其作用机理,特别是对脂代谢相关酶类和受体的作用机理知之甚少,其主要原因是受到研究手段和方法学的限制。

非洲爪蟾是一种较易获得的实验材料,实验证明在爪蟾卵母细胞中外源的 mRNA 和 cDNA 能够被表达,产生具有功能性的蛋白质,许多真核细胞膜蛋白的 mRNA 和 cDNA 注入到爪蟾卵母细胞,其编码的膜蛋白能够被整合到卵母细胞膜上并显示天然的功能活性,因此被广泛地用于进行外源膜蛋白结构与功能关系的研究<sup>[3,4]</sup>。

爪蟾卵母细胞用于降脂药物作用机理的研究具有二大优点,一是卵母细胞中具备转录、修饰和胞内运输等必要的部件和功能,因此外源 mRNA 或 cDNA 能够被表达,产生具有功能性的蛋白质;二是卵母细胞具有较大的表面积,直径在 1.2 mm 左右,便于显微注射和对表达蛋白的检测等。我们利用爪蟾卵母细胞作为实验材料,通过注入外源性 LDL 受体质粒,建立爪蟾卵母细胞人 LDL 受体基因的表达系统,作为调脂药物高效筛选的方法和对降血脂抗动脉粥样

硬化药物作用机理研究的平台。

爪蟾饲养所需实验设备简单,但对水质要求较高,在保证水质的前提下一般爪蟾生活状况良好,不易死亡,并且可常年获得质量稳定的可用于实验的 V、VI 期卵母细胞。在应用爪蟾卵母细胞的实验中,能否使卵母细胞经历数天的实验期是实验成败的首要条件,因此在去除外层的卵巢膜和滤泡膜过程中应尽量避免卵母细胞损伤,通常用二种办法,即手工方法剥离和用酶解的方法,由于手工方法剥离法费时费力,不易得到大量的卵母细胞,实验中通常采取酶解法,实验证明 1 g/L 低浓度酶解液孵育过夜对细胞的损伤要比高浓度短时间孵育小,并且能较好的去除卵母细胞外层的卵巢膜和滤泡膜,经体外培养 3 天后存活率达 95% 以上,能满足实验要求。

要建立卵母细胞 LDL 受体基因的表达系统,LDL 受体表达质粒能否成功地导入卵母细胞的细胞核中是实验成败的关键,为了证明能否成功地进行细胞核注射,我们向卵母细胞核注入染料,细胞经固定后进行解剖,观察细胞核注射的成功率。多次试验结果显示细胞核注射成功率达 96% 以上。接下来的问题是核注射后能否在 3 天内保持活性,为了达到这个要求,要注意二个问题,第一是注射方法,我们要求注射用针头不易过大,大针头虽然方便注射,但对细胞的损伤也大,它使细胞存活率明显下降;针头过小,虽然对细胞损伤小,但是容易造成堵针引起核注射失败。因此需要操作者根据经验,在实验中调整和掌握所用注射针头的大小。第二是细胞对注射所能承受的量,研究发现卵母细胞对 20 nL 以下的注射量耐受良好,注射量超过 20 nL 细胞存活率明显下降。经过调整针头大小和注射用量爪蟾卵母细胞存活率可达 92%,与未注射的卵母细胞无显著差异。

在进行 LDL 受体基因表达研究中,先要了解爪蟾卵母细胞膜上是否有内源性 LDL 受体,文献中未见有类似的报导,为了考察爪蟾卵母细胞膜上是否存在内源性的 LDL 受体。我们用 DiI 标记 LDL,制备 DiI-LDL 荧光配体,与爪蟾卵母细胞共孵育,在荧光显微镜下细胞膜上未观察到荧光。考虑到爪蟾卵母细胞上尚有透明带和质膜可能影响 LDL 与 LDL 受体的结合,因此用透明质酸酶对爪蟾卵母细胞上透明带进行消化,然后仍用 DiI-LDL 荧光配体法检测,其结果与上述实验一致,因此认为爪蟾 V、VI 期卵母细胞膜上确实不存在内源性 LDL 受体。这将给药物作用机理的研究带来方便,我们可以认为实验中所检测到的爪蟾卵母细胞上的 LDL 受体蛋白与实验所



导入的质粒表达的基因产物有关,而与卵母细胞本身无关。我们获得了由 Estonia Tartu 大学提供的人 LDL 受体基因表达质粒 p3.7LDL,文献报导该质粒导入 LDL 受体缺陷的中华大鼠卵巢 ldlA7 细胞后,能检测到 ldlA7 细胞膜上的 LDL 受体,证明 p3.7LDL 质粒中含有人 LDL 受体基因,并且能够被表达<sup>[8]</sup>。

我们将人类 LDL 受体表达质粒导入 V、VI 期爪蟾卵母细胞,培养 2 天后检测细胞膜上是否存在 LDL 受体,若不用透明质酸酶消化透明带检测不到 LDL 受体蛋白。用透明质酸酶消化了透明带后的细胞膜上可检测到由 DiI 标记的 LDL 配体所发出的红色荧光,用抗 LDL 受体的抗体经免疫荧光检测可发现膜上有绿色荧光,免疫胶体金标记透射电镜检测可见膜上有内吞胶体金颗粒,上述三个实验均证明外源性人 LDL 受体基因能在爪蟾 V、VI 期卵母细胞中表达。

上述实验证明爪蟾卵母细胞是一个很好的实验材料,容易饲养,常年可获得质量稳定的可用于实验的 V、VI 期卵母细胞,培养数天后的卵母细胞存活率可达 95%,细胞核显微注射成功率达 96%,核注射后成活率亦达 92%,卵母细胞膜上没有内源性 LDL 受体,经核注射人 LDL 受体表达质粒后可出现 LDL

受体表达,因此爪蟾卵母细胞可作为良好的实验平台,用于降血脂抗动脉粥样硬化的研究和用于降脂药物的高效筛选。

#### [参考文献]

- [1] Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*, 1971, **233**: 177-181
- [2] Barnard EA, Mileti R, Sumikawa K. Translation of exogenous messenger RNA-coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond*, 1982, **B215**: 241
- [3] Dejian Ren, Hall LM. Functional expression and characterization of skeletal muscle dihydropyridine receptors in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, 1997, **272** (36): 22 393-398
- [4] Dejian Beilelli, Helen Callachan, Claire Hill-Venning, Peters JA, Lambert JJ. Interaction of positive allosteric modulator with human and *Drosophila* recombinant GABA receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *British Journal Pharmacology*, 1996, **118**: 563-571
- [5] Kotani T, Yamashita M. Discrimination of the Roles of MPF and MAP kinase in morphological changes that occur during oocyte maturation. *Dev Biol*, 2002, **252** (2): 271-286
- [6] Barak LS, Webb WW. Fluorescent low density lipoprotein for observation of individual receptor complexes on cultured human fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, 1981, **90**: 595-604
- [7] 陈可翼. 中药抗动脉粥样硬化研究进展. *浙江中西医结合杂志*, 1994, **4** (1): 25-26
- [8] Jaana Tammur, Hiljar Sibul, Ene Ustav, Star MV, Andres Metspalu. A bovine papillomavirus-1 based vector restores the function of the low-density lipoprotein receptor in the receptor deficient CHO-ldlA7 cell line. *EMBO J*, 1996, **15** (1): 1-11

(此文编辑 文玉珊)

#### •会议信息•

[文章编号] 1007-3949(2005)13-02-0142-01

## 第 5 届国际老年性痴呆及相关疾病学术研讨会征文通知

由中国老年性痴呆协会及中国神经科学学会主办,上海第二医科大学附属瑞金医院、上海第二医科大学神经病学研究所承办的“第 5 届国际老年性痴呆学术研讨会”拟定于 2005 年 8 月下旬举办。会议特邀二十余位中外知名的神经病学专家学者到会作专题报告及学术论文交流。内容涉及阿尔茨海默病、血管性痴呆、轻度认知功能障碍、血管相关认知障碍及其他类型痴呆等。现将会议征文及有关事项通知如下:

1、征文通知:凡 2005 年 8 月以前未在国内杂志上公开发表的有关认知功能障碍的基础与临床研究新进展、经验总结等方面的论文均可参会。

2、征文要求:请寄 800 字左右的论文摘要并注明联系方式和电子邮件地址,以软盘(word 格式)寄至上海市瑞金二路 197 号(邮编:200025)上海第二医科大学附属瑞金医院神经内科主任办公室杜敏老师收,信封左下角务必注明“会议征文”字样;或电邮至 rjsn197@yahoo.com.cn。

3、征文截止日期:2005 年 7 月 31 日。

4、本次会议将从所有参会的论文中评选一、二、三等奖并进行大会交流。

5、本次会议将授予国家级继续教育 iv 类学分 10 分。

上海第二医科大学附属瑞金医院  
第 5 届国际老年性痴呆学术研讨会组委会  
2005 年 2 月 22 日