

# 家兔新基因 Gnas 的鉴定及其在高脂血症中的功能

李晓宇, 郭冬平, 蒋莉, 白小明, 何龙, 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] 病理学与病理生理学; 高胆固醇血症; 动脉粥样硬化; 新基因 Gnas; 实验动物, 家兔

[摘要] 目的 探讨家兔新基因 Gnas 在高脂血症中的功能。方法 用高脂饲料复制家兔高胆固醇血症模型, 分别用胆固醇、25-羟胆固醇、低密度脂蛋白刺激 HepG2 细胞, 采用荧光半定量逆转录聚合酶链反应技术检测 GenBank 中登录号为 AY248719 的家兔新基因表达情况。结果 高胆固醇兔动物模型复制成功, 该组血浆和肝脏的总胆固醇及肝脏甘油三酯水平增加均超过 10 倍, 血浆甘油三酯也显著增高。高脂组 Gnas 基因表达水平明显高于对照组。胆固醇、25-羟胆固醇刺激 HepG2 细胞后 Gnas 表达无明显改变, 400 mg/L 低密度脂蛋白刺激 HepG2 细胞后 Gnas 表达增强 2.15 倍。结论 对家兔新基因 Gnas 的研究有助于进一步揭示高脂血症的分子机理。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Study of Function and Identification of Gnas, a Novel Gene Involved in Rabbits with Hyperlipidemia

LI Xiao-Yu, GUO Dong-Ping, JIANG Li, BAI Xiao-Ming, HE Long, FAN Le-Ming, and CHEN Qi

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

[KEY WORDS] Hyperlipidemia; Atherosclerosis; Gene; Rabbits

[ABSTRACT] **Aim** To study the role of a novel rabbits gene named Gnas during the hyperlipidemia. **Methods** The hyperlipidemia rabbits were obtained after feeding atherogenic diet for 150 d. The differentially expressed gene was identified by fluorescent semi-quantitative PCR. The different nucleic acid expression level of Gnas in HepG2 cell line induced by cholesterol, 25-hydroxycholesterol, and human low density lipoprotein was analyzed by semi-quantitative RT-PCR. **Results** The hyperlipidemia rabbits model has been successfully prepared. The total cholesterol levels in plasma and liver, triglyceride level in liver of hypercholesterolemia rabbits increased more than 10 folds, triglyceride level in plasma also significantly increased compared with those in control group. mRNA expression enhanced in the liver of hyperlipidemia rabbits. 400ug/ml LDL induced Gnas expression increased 2.15 folds in HepG2 cell, though the same induced effects were not observed in cholesterol or 25-hydroxycholesterol. **Conclusions** These results will contribute to reveal the molecular mechanism of the hyperlipidemia.

我们利用抑制性差减杂交<sup>[1]</sup>联合基因芯片对高胆固醇血症造型敏感组和不敏感组家兔肝脏差异表达基因进行了研究, 经基因芯片验证 EST F68 在造型敏感组高表达。利用快速扩增 cDNA 末端法克隆其全长序列, 已经被 GenBank 收录接受号为 AY248719。经同源性比较, 与人的 G 蛋白  $\alpha$  亚基同源。本研究进一步应用荧光定量 PCR 法验证其在高脂血症和正常组之间的表达。并用不同因素刺激

HepG2 细胞, 观察该基因的表达情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物高脂血症模型的复制及脂质的测定

新西兰白兔 12 只, 雄性, 体重  $2.0 \pm 0.5$  kg, 由江苏省农科院实验动物中心提供。随机分成两组, 分别喂饲普通饲料和 1% 高胆固醇饲料 20 周, 每 4 周耳缘静脉采血测血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)。处死后分别取肝脏和胸主动脉, 液氮速冻, 一部分  $-80^{\circ}\text{C}$  保存, 一部分福尔马林固定后 HE 染色。用 TC 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 测定试剂盒 (北京中生生物高科技公司) 测血浆 TC 和 TG 含量。肝脏脂质含量用冷抽提法提取后同法测定。

### 1.2 荧光实时定量逆转录聚合酶链反应验证

用 Tripure (美国 Promega 公司) 分别提取两组动物肝组织总 RNA, 甲醛变性胶电泳、A260/A280 紫外分光光度计定量后行一步法荧光定量逆转录聚合酶

[收稿日期] 2006-02-10 [修回日期] 2006-11-30

[基金项目] 江苏省普通等学高校自然科学研究计划资助项目 (03KJB310078, 00KJB310006)

[作者简介] 李晓宇, 博士, 讲师, 现为美国宾夕法尼亚大学医学院博士后, 主要从事高脂血症和动脉粥样硬化性疾病的分子机制研究, E-mail 为 uyaoxili@yahoo.com.cn。郭冬平, 博士研究生, 主要从事动脉粥样硬化性疾病的分子机制和基因治疗研究, E-mail 为 guodongping@163.com。通讯作者陈琪, 博士, 教授, 博士研究生导师, 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 025-86862610, E-mail 为 qichen@njmu.edu.cn。

链反应。用 Roche 公司 LightCycler-RNA Master SYBR Green I 试剂盒, 反应体系为 RNA 1  $\mu$ L (约 500 ng), Mn(OAc)<sub>2</sub> (50 mmol/L) 1.3  $\mu$ L, Primer Mix (0.3  $\mu$ mol/L) 1.2  $\mu$ L, RNA Master SYBR Green I 7.5  $\mu$ L, 水 9.0  $\mu$ L。扩增条件: 61  $^{\circ}$ C 逆转录 20 min, 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后进入循环, 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s  $\rightarrow$  58  $^{\circ}$ C 退火 5 s  $\rightarrow$  72  $^{\circ}$ C 延伸 13 s, 45 个循环。在每个循环末进行实时荧光检测。目的基因序列为上游引物 5'-GTG AGA AGG CAA CCA AAG TGC AGG AC-3', 下游引物 5'-TCA GGC ACG TTC ATC ACA CTC AGG AT-3', 产物长 160 bp。 $\beta$ -actin 上游引物 5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A-3', 下游引物 5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3', 产物长 295 bp。

### 1.3 脂蛋白的分离与修饰

低密度脂蛋白 (LDL) 和无脂血清 (lipoprotein-depleted serum, LPDS) 的制备按序列超速离心法进行<sup>[2]</sup>。操作过程中, 以 0.05% EDTA 抗氧化, 以 80 mg/L 庆大霉素抗感染, 最终获得的 LDL 和 LPDS 经 pH7.4、10 mmol/L PBS4  $^{\circ}$ C 透析后, 微孔滤膜除菌, BCA 法测蛋白浓度, 4  $^{\circ}$ C 储存。LPDS 为超离副产物, 用时需恢复至原体积, 滤菌后加入细胞培养基中。

### 1.4 细胞培养

人肝细胞癌 HepG2 细胞株, 购自中国科学院上海生命科学院细胞生物研究所。细胞接种于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中, 加 100 ku/L 青霉素和链霉素, 于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的湿环境下培养。取对数生长期细胞在 10% LPDS 的 DMEM 中至少培养 6 h 后进行各种条件刺激, 即以 0、50、100、200 和 400  $\mu$ mol/L 胆固醇和 0、5、10、25 和 50  $\mu$ mol/L 25 羟胆固醇, 以及 0、50、100 和 150 mg/L LDL 孵育 24 h。

### 1.5 半定量逆转录聚合酶链反应

用 Tripure 抽提总 RNA, 紫外分光光度计定量, 每种细胞取 1  $\mu$ g 总 RNA 用 Advantage (tm) RT-for-PCR kit (美国 Clontech 公司) 进行逆转录聚合酶链反应。目的基因的特异性引物序列为上游 5'-GTG AGA AGG CAA CCA AAG TGC AGG AC-3'、下游 5'-TCA GGC ACG TTC ATC ACA CTC AGG AT-3', 产物长 160 bp。GAPDH 上游 5'-CAC CAT CTT CCA GGA GCG AG-3', 下游 5'-TCA CGC CAC AGT TTC CCG GA-3', 产物长 371 bp。反应的变性、退火、延伸条件分别为 94  $^{\circ}$ C 30 s  $\rightarrow$  65  $^{\circ}$ C 30 s  $\rightarrow$  72  $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 个循环; 扩增时以  $\beta$ -actin 为内参, 反应的变性、退火、延伸条件分别为 94  $^{\circ}$ C 30 s  $\rightarrow$  58  $^{\circ}$ C 30 s  $\rightarrow$  72  $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环。

## 2 结果

### 2.1 血浆和肝脏脂质水平比较

高脂组与对照组家兔血浆及肝脏脂质水平见表 1 (Table 1)。可见高脂组血浆和肝脏的 TC 和 TG 均高于对照组。

表 1. 家兔血浆和肝脏总胆固醇和甘油三酯水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

分 组	总胆固醇		甘油三酯	
	血浆 (mmol/L)	肝脏 (mg/g)	血浆 (mmol/L)	肝脏 (mg/g)
对照组	2.17 $\pm$ 0.53	4.99 $\pm$ 1.37	1.93 $\pm$ 0.41	2.2 $\pm$ 0.35
高脂组	31.9 $\pm$ 5.6 <sup>b</sup>	44.0 $\pm$ 38.4 <sup>b</sup>	8.79 $\pm$ 1.76 <sup>b</sup>	38.4 $\pm$ 16.9 <sup>b</sup>

b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

### 2.2 荧光实时定量逆转录聚合酶链反应验证

荧光实时定量逆转录聚合酶链反应结果 (图 1) 发现, 高脂组 Gnas 基因表达水平高于对照组。

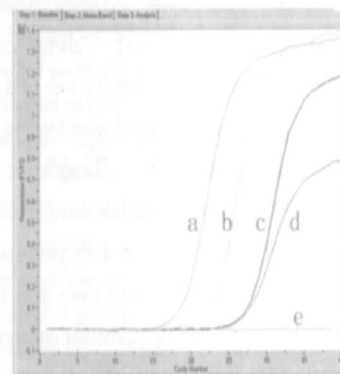


图 1. Gnas 荧光半定量 PCR 曲线图 a 为高脂组 Gnas 扩增曲线, b 为对照组 Gnas 扩增曲线, c 为高脂组  $\beta$ -actin 扩增曲线, d 为对照组  $\beta$ -actin 扩增曲线, e 为阴性对照。CT<sub>a</sub> = 15.49, CT<sub>b</sub> = 17.96, CT<sub>c</sub> = 23.48, CT<sub>d</sub> = 24.12。高脂组比率 = 23.48/15.49 = 1.52, 对照组比率 = 24.12/17.96 = 1.34。高脂组比率 > 对照组比率。mRNA 表达水平上, 高脂组高于对照组。

### 2.3 脂质刺激 HepG2 细胞后半定量逆转录聚合酶链反应检测 Gnas 基因表达

胆固醇和 25 羟胆固醇刺激 HepG2 细胞后 Gnas 表达无明显改变, 400 mg/L LDL 刺激 HepG2 细胞后 Gnas 表达增强 2.15 倍。

## 3 讨论

G 蛋白, 又称鸟苷酸调节蛋白 (guanine nucleotide regulatory protein), 是位于受体与效应底物分子之间的偶联蛋白<sup>[3]</sup>。它存在于各个组织和细胞中, 是联系外部信息 (如神经递质、细胞因子、激素、活性多肽等) 和胞内第二信使的中间环节, 参与细胞内外信息

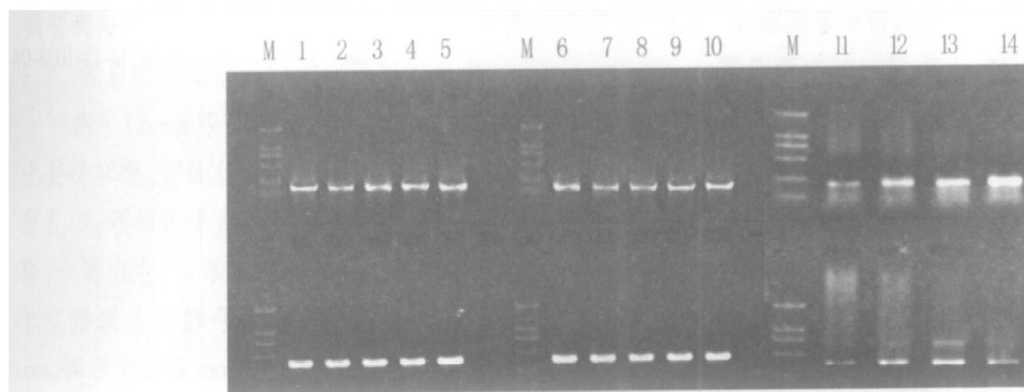


图 2. Gnas 半定量逆转录聚合酶链反应扩增图 M 为 DL2000, 从上至下依次为 2 000、1 000、750、500、250 和 100 bp; 1~ 5 分别为 HepG2 细胞加 0、50、100、200、400  $\mu\text{mol/L}$  胆固醇孵育 24 h; 6~ 10 分别为 HepG2 细胞加 0、5、10、25、50  $\mu\text{mol/L}$  25 羟胆固醇孵育 24 h; 11~ 14 分别为 HepG2 细胞加 0、100、200、400 mmol/L LDL 孵育 24 h。

的转导。自 70 年代早期发现 G 蛋白及 Ras 等 GTP 结合蛋白以来, G 蛋白与信号转导关系的研究已获得重大突破, 并因之获得 1994 年诺贝尔医学和生理学奖。G 蛋白的发现具有重要的医学意义, 使人们对很多疾病有了更深一层的理解。生理学家们发现 G 蛋白的结构和功能改变与心血管疾病、糖尿病、恶性肿瘤等很多重大疾病都密切相关。

人类的 Gs $\alpha$  亚基由位于 20q13.2-13.3 的 GNAs1 基因编码, 广泛表达于人体内大部分组织中<sup>[4]</sup>。人类、小鼠以及果蝇等一些低等模式生物的 Gs $\alpha$  亚基的 cDNA 序列已经知晓, 本实验室克隆出的家兔 Gs $\alpha$  基因 cDNA 序列与人类 GNAs1 基因同源性达 92%, 由该序列翻译而成的氨基酸序列与人类及小鼠 Gs $\alpha$  蛋白序列的同源性为 95%, 与果蝇、线虫的相应蛋白序列的同源性分别为 73%、68%。在不同种系的动物中有如此高的同源性, 提示 Gs $\alpha$  基因在生物进化过程中可能是一种极其保守的基因。人类 Gs $\alpha$  基因具有控制细胞生长的管家基因的许多特点, 如启动子区不含 TATA 盒及 CAAT 盒, 而包含 4 个 GC 盒, 5' 侧翼区存在三段原癌基因 c-Ki-ras2 相似序列等<sup>[4,5]</sup>, 但这些尚不足以说明 Gs $\alpha$  基因是管家基因。Liu 等<sup>[6,7]</sup>发现甲基化修饰是人类和小鼠 GNAs 基因印迹的重要方式, 而这一点与管家基因的一般特征不符<sup>[8]</sup>。因此 Gs $\alpha$  亚基基因虽然在家兔体内绝大多数组织中能同时广泛表达, 但此基因与管家基因的关系尚待进一步探讨。Chen 等<sup>[9]</sup>发现父系 G 蛋白  $\alpha$  亚基敲除小鼠脂质清除能力增强, 胰岛素敏感性增高, Gnas 基因产物可以抑制糖代谢和脂代谢<sup>[10]</sup>。在饮食所引起的高胆固醇血症家兔的肝脏中, Gs $\alpha$  基因表达水平与血胆固醇水平增高相一致, 其详细机制尚不清楚。Gs 蛋白腺苷酸环化酶信号转导系统是发现最早、研究最多的由 G 蛋白调节的系统之

一, 很可能在高胆固醇血症的形成过程中, 肝脏中该系统活性明显增强<sup>[11]</sup>。但这种增强反映具体作用于何种环节引起血浆胆固醇增高, 还需深入探索。体外实验发现低密度脂蛋白可引起肝细胞 Gnas 表达水平明显增高, 与高脂组家兔肝脏 Gnas 表达水平增高一致。本研究发现无论是胆固醇抑或 25-羟胆固醇都不能引起 HepG2 细胞的 Gnas 表达改变, 低密度脂蛋白水平较高时才引起肝细胞 Gnas 表达增加, 提示 Gnas 对脂质刺激并不敏感。然而这种差异只是表明家兔 Gs $\alpha$  亚基转录水平上的表达差异, 并不能说明翻译及翻译后水平的蛋白表达差异, 其蛋白质表达情况尚待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 彭瑾瑜, 朱 勋, 唐蔚青, 王 抒, 黎 健, 王 仁, 等. 胆固醇损伤内皮细胞差异表达基因的生物信息学分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (3): 259-262.
- [2] Schumaker VN, Pupione DL. Sequential flotation ultracentrifugation [J]. Meth Enzymol, 1986, 128: 155-170.
- [3] 李东宝, 华 琦, 皮 林, 许 骥. G 蛋白  $\beta\gamma$  亚单位基因 C825T 多态性与高血压患者的肥胖无关[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (1): 51-54.
- [4] Kozasa T, Itoh H, Tsukamoto T, Kaziro Y. Isolation and characterization of the human Gs  $\alpha$  gene [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 2 081-085.
- [5] Yang X, Lee FY, Wand GS. Increased expression of Gs ( $\alpha$ ) enhances activation of the adenylyl cyclase signal transduction cascade [J]. Mol Endocrinol, 1997, 11: 1 053-061.
- [6] Weinstein LS, Chen M, Liu J. Gs ( $\alpha$ ) mutations and imprinting defects in human disease [J]. Ann NY Acad Sci, 2002, 968: 173-197.
- [7] Liu J, Yu S, Litman D, Chen W, Weinstein LS. Identification of a methylation imprint mark within the mouse Gnas locus [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20: 5 808-817.
- [8] Ariel M. A PCR-based method for studying DNA methylation [J]. Meth Mol Biol, 2001, 181: 205-216.
- [9] Chen M, Gavrilova O, Liu J, Xie T, Deng C, Nguyen AT, et al. Alternative Gnas gene products have opposite effects on glucose and lipid metabolism [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 7 386-391.
- [10] Berberian PA, Myers W, Tytell M, Challa V, Bond MG. Immunohistochemical localization of heat shock protein 70 in normal-appearing and atherosclerotic specimens of human arteries [J]. Am J Pathol, 1990, 136 (1): 71-80.
- [11] Carel JC, Le Stunff C, Condamine L, Mallet E, Chaussain JL, Adnot P, et al. Resistance to the lipolytic action of epinephrine: a new feature of protein GS deficiency [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84: 4 127-131.

(此文编辑 胡必利)