

[文章编号] 1007-3949(2007)15-11-0801-04

• 实验研究 •

树鼯脂蛋白脂肪酶的 cDNA 克隆、组织分布及活性测定

周冰, 曾武威, 孙国涛, 刘惠荣, 吴钢, 薛红, 陈保生

(中国医学科学院基础医学研究所, 中国协和医科大学基础医学院, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京市 100005)

[关键词] 分子生物学; 脂蛋白脂肪酶; 组织分布; 酶活性; 甘油三酯; 树鼯

[摘要] 目的 了解不易感动脉粥样硬化动物树鼯的脂蛋白脂肪酶的结构和活性特点, 并与其它种属比较, 探讨脂蛋白脂肪酶在树鼯独特脂代谢中的作用。方法 以树鼯脂肪细胞 mRNA 反转录获得的 cDNA 一链为模板, 应用 SMART-RACE 技术获得树鼯脂蛋白脂肪酶的 cDNA 序列并推导出其氨基酸序列; 实时定量 PCR 方法检测树鼯脂蛋白脂肪酶 mRNA 在各组织中的分布; 真核表达树鼯和人脂蛋白脂肪酶蛋白, 放射性同位素法测定二者的活性并比较。结果 树鼯脂蛋白脂肪酶 cDNA 序列全长为 3 293 bp, 其中编码区 1 437 bp, 编码 20 个氨基酸的信号肽和 458 个氨基酸的成熟蛋白, 该成熟蛋白 N-端比人脂蛋白脂肪酶多 10 个氨基酸。树鼯脂蛋白脂肪酶与其它哺乳类动物的氨基酸序列同源性大于 90%, 功能域高度保守。树鼯脂蛋白脂肪酶的组织表达谱比较广泛, 在心肌和脂肪组织中大量表达, 但在骨骼肌中未检测到, 却在肝脏中有中低水平表达, 与人脂蛋白脂肪酶在这两种组织中的表达相反。活性测定结果显示, 树鼯脂蛋白脂肪酶活性显著高于人(7.67 倍), 这与测定的树鼯血浆低甘油三酯水平相符。结论 树鼯的高活性脂蛋白脂肪酶可能是其血浆低水平甘油三酯的主要原因。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

cDNA Cloning, Tissue Distribution and Activity Comparison of Lipoprotein Lipase From Tree Shrew

ZHOU Bing, ZENG Wu-Wei, SUN Guo-Tao, LIU Hui-Rong, WU Gang, XUE Hong, and CHEN Bao-Sheng

(Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

[KEY WORDS] Lipoprotein Lipase; Tissue Distribution; Enzyme Activity; Triglyceride; Tree Shrew

[ABSTRACT] **Aim** To understand the features of lipoprotein lipase (LPL) and its role in the distinctive lipid metabolism in tree shrew, which is considered to be an animal protected from atherosclerosis. **Methods** cDNA clones of tree shrew lipoprotein lipase were isolated from adipose tissue mRNA, benefiting from SMART-RACE technique. The tissue distribution of lipoprotein lipase in tree shrew was identified by Real-Time PCR. The activities of lipoprotein lipase from tree shrew and human expressed in eukaryocytes were measured by Radioactive Substrate Emulsion method, respectively. **Results** The nucleotide sequence of tree shrew LPL covered 3 293 bp, including a 1 437 bp coding region, which encoded a 20 residues predicted signal peptide and a 458 residues mature protein that was ten residues longer than that of human at N-terminus. The homology of amino acid sequences of lipoprotein lipase from tree shrew and other mammalian species was more than 90%, highly conserved in functional domains. LPL was expressed in many tissues in tree shrew, highly in cardiac muscle and adipose tissue. In despite of no expression in skeletal muscle, there was less-medium expression in liver, distinctly different from human LPL which was expressed in the contrary way in these two tissues. The tree shrew LPL activity was remarkably higher (7.67 times) than that of human LPL, consistent with lower triglyceride concentration in tree shrew plasma compared with human. **Conclusion** The higher LPL activity in tree shrew should greatly attribute to its lower plasma triglyceride levels.

脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)是体内甘油三酯(triglyceride, TG)水解的限速酶,在富含TG的脂蛋白如乳糜微粒和极低密度脂蛋白的代谢中起关键作用。LPL功能缺陷将导致高TG血症,此外,

与动脉粥样硬化、胰岛素抵抗及糖尿病、肥胖和恶病质等疾病的发生也密切相关^[1]。

树鼯血浆中含有高水平的高密度脂蛋白,喂饲高脂高胆固醇饮食数周后,它们体内高密度脂蛋白胆固醇的比例增高,而低密度脂蛋白胆固醇在总胆固醇中的比例下降,病理检查其主动脉等部位的内膜无明显粥样斑块病变形。因此,树鼯被认为是具有特殊脂质代谢机制的不易感动脉粥样硬化动物^[2]。为深入探讨该动物的脂代谢特点及其可能的不易感动脉粥样硬化机制,本实验室对树鼯LPL的

[收稿日期] 2007-04-16 [修回日期] 2007-10-12

[基金项目] 国家自然科学基金(NSFC 30100068);“973”项目(No. 2006CB503801)

[作者简介] 周冰,博士研究生,研究方向为脂质代谢及其与心血管疾病关系,联系电话为010-65296413。通讯作者曾武威,硕士,助理研究员,研究方向为脂质代谢及其与心血管疾病关系,联系电话为010-65296413。陈保生,硕士,教授,博士研究生导师,研究方向为脂质代谢及其与心血管疾病关系,联系电话为010-65296413。

cDNA 及氨基酸序列、组织分布特点及活性进行了比较分析, 现予报告。

1 材料与方法

1.1 材料

10 只成年雄性树鼩购自解放军 302 医院动物中心。Trizol 和 Mmlv 逆转录酶 SuperscriptII 购自 GIBCO BRL 公司; mRNA 纯化试剂盒和 DNA 连接试剂盒购自 Promega 公司; SMART-RACE 试剂盒购自 Clontech 公司; 引物为上海生工公司合成。

1.2 树鼩血浆甘油三酯水平的测定

应用甘油三酯测定试剂盒 (BioSino 生物技术公司) 测定了树鼩的血浆甘油三酯浓度。

1.3 树鼩脂蛋白脂肪酶 cDNA 的扩增、克隆及序列测定

应用 Trizol 试剂按一步法快速提取树鼩脂肪组织 (1.0 g) 总 RNA, 经 Oligo (dT) 分离纯化得到 mRNA。以 2 μ g mRNA 为模板, 以改进的 CDS ④为 3' 端引物, 以 SMART II 为 5' 端引物, 用 MMLV 逆转录酶 Superscript ⑤ 200 u 于 42 °C 作用 1.5 h, 逆转录得到 cDNA 一链。特异引物的设计是以人 LPL cDNA 序列为主要参照, 在已知哺乳动物如大鼠、小鼠等 LPL cDNA 序列的高度保守区内确定合适的位置, 首先设计出用来扩增树鼩 LPL cDNA 编码区的两对特异引物以及两对检测引物。再根据扩增片段的测序结果, 并参考其它种属 LPL cDNA 序列, 分别设计出相应的引物。将目的片段回收, 与 pGEM-T easy vector 连接, 转化 DH 5 α 感受态细胞, 筛选鉴定阳性克隆, 并进行双脱氧末端中止法自动荧光测序, 测序结果提交 Genbank 进行 Blast 同源性比较。

1.4 cDNA 序列的比较及鉴定

根据重叠原理, 将获得的三个片段序列进行拼接, 最后得到完整的树鼩 LPL cDNA 序列。进而通过 Genbank 数据库进行同源性分析, 以确定是否与人及其它已知种属的 LPL cDNA 有高度同源性。

1.5 树鼩脂蛋白脂肪酶蛋白质结构的分析和比较

应用分子生物学软件 DNAMAN, 从树鼩 LPL cDNA 序列推导出其对应的氨基酸序列, 并对该蛋白的一级、二级结构进行分析、预测和比较。

1.6 树鼩脂蛋白脂肪酶 mRNA 的组织分布

以 1.3 中的方法分别提取 3 只树鼩的不同器官和组织来源的总 RNA, 包括心肌、骨骼肌、脂肪组织、脑、肺、肝脏、胆囊、肾脏、脾、小肠和睾丸。以 β -actin 作为内对照, 应用以 SyBr-Green 为荧光物质的

实时 PCR 技术, 分别检测 LPL mRNA 在 3 只树鼩中的不同组织器官中的相对表达量 (用公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (CT)-sample(CT) 计算靶器官的相对表达量)。应用 Microsoft Excel 计算均数和标准差。

1.7 树鼩脂蛋白脂肪酶与人脂蛋白脂肪酶活性的测定及比较

分别扩增树鼩 LPL 和人 LPL cDNA 的编码区序列片段, 引物中引入 XhoI 和 EcoRI 酶切位点, 双酶切处理后与 pcDNA3.1(+) 载体连接, 分别构建树鼩 LPL 和人 LPL 的真核表达载体。将筛选鉴定的阳性克隆进行测序以确定序列中无突变。分别用野生型树鼩 LPL 和人 LPL 真核表达质粒转染 COS7 细胞, 24 h 后向培养基中加入 5 U/L 肝素, 孵育 12 h。收集肝素化后的细胞培养基, 采用放射性同位素标记法^[3]测定总 LPL 活性。实验重复 3 次。

1.8 统计学处理

将测定结果用 SPSS 软件进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 树鼩血浆甘油三酯水平

10 只成年雄性树鼩的血浆甘油三酯浓度范围为 0.27~ 0.47 g/L, 平均 0.38 ± 0.08 g/L, 低于人血浆甘油三酯水平 ($P < 0.05$)。

2.2 树鼩脂蛋白脂肪酶 cDNA 序列及分析

应用 RT-PCR 和 SMART-RACE-PCR 方法共扩增获得 3 个 DNA 片段: 一个约 1.4 kb 的片段包含了树鼩 LPL cDNA 的大部分编码区, 另外两个约 1.1 kb 和 1.5 kb 的片段分别包含了树鼩 LPL cDNA 的剩余部分编码区以及 5' 端和 3' 端非编码区, 经证实为新的 LPL cDNA 序列。将 3 个树鼩 LPL cDNA 片段序列进行拼接, 最后获得完整的树鼩 LPL cDNA 序列 (GenBank accession number EF546781)。该 cDNA 序列全长为 3 293 bp, 其中 5' 端非翻译区 129 bp, 编码区 1 437 bp, 3' 端非翻译区 1 727 bp, 其末端 Poly(A) 尾上游 23 bp 处具典型的加尾信号 AATAAA。该编码区在 221~ 229 位比人 LPL 长 9 bp, 而 3' 非编码区长度比人 LPL 短 1 kb, 但与牛、大鼠和小鼠 LPL 的 3' 非编码区长度相近。

2.3 树鼩脂蛋白脂肪酶蛋白质序列的分析及比较

树鼩 LPL cDNA 序列中出现的第一个 ATG 的-3 位和+ 4 位碱基均为 G, 符合 Kozak 序列, 满足真核基因转录起始的要求, 可以作为有效的起始密码子。此外, 与其它种属 LPL 序列的比较也证实了这个起

始密码子的正确性。应用欧洲分子生物学实验室的 Prediction 软件对二级结构的分析表明, 该蛋白的各种构象的比例为: Helix 占 19.25%, Extended sheet 占 20.50%, Loop 占 60.25%, 树鼯 LPL 的这种构象分布比例与人 LPL 大体一致。氨基酸的同源性分析结果表明, 树鼯 LPL 与其它种属高度同源, 其与人、狒狒、美国貂、大鼠和小鼠 LPL 的同源性分别为 93%、94%、94%、93% 和 92% (图 1)。

2.4 树鼯脂蛋白脂肪酶 mRNA 的组织分布

树鼯 LPL mRNA 的表达在不同组织之间相差很大: 高表达 LPL 的两种组织分别是心肌和脂肪组织; 中低水平表达的组织包括肾脏、脑和肝脏; 极少表达的组织有肺、脾、胆囊和睾丸; 而在骨骼肌和小肠中

未检测到树鼯 LPL 的表达(表 1)。表 1. 树鼯脂蛋白脂肪酶 mRNA 的组织分布

组织	相对表达量
心肌	3.739 ± 3.407
脂肪组织	2.080 ± 1.310
肾脏	0.546 ± 0.812
肝脏	0.269 ± 0.193
大脑	0.198 ± 0.195
肺脏	0.083 ± 0.029
脾脏	0.066 ± 0.062
睾丸	0.027 ± 0.008
胆囊	0.026 ± 0.011
小肠	0.016 ± 0.005
骨骼肌	0.006 ± 0.003

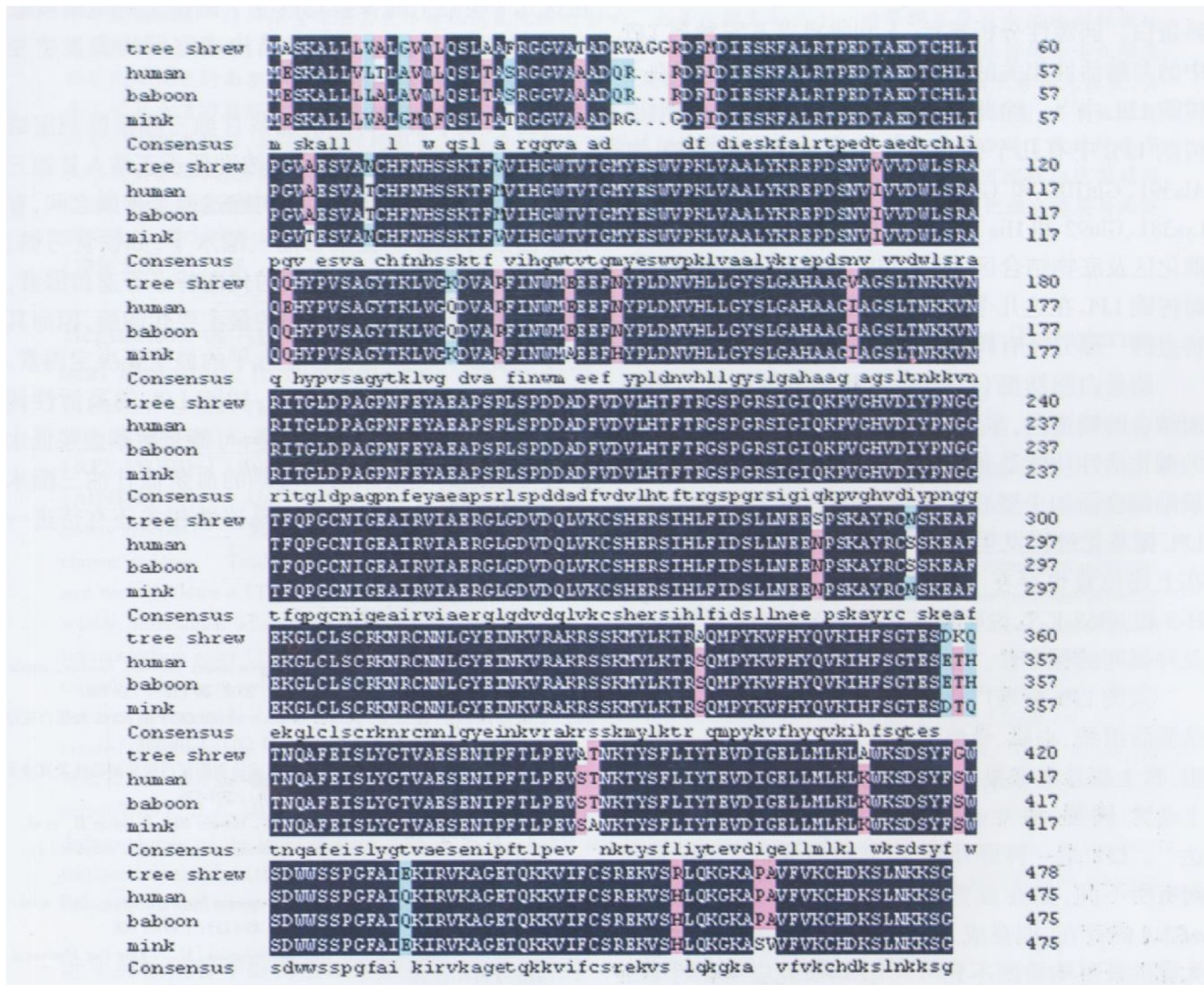


图 1. 树鼯脂蛋白脂肪酶与人、狒狒、美国貂脂蛋白脂肪酶的氨基酸序列同源性比较

2.5 野生型树鼯脂蛋白脂肪酶与人脂蛋白脂肪酶的活性比较

野生型树鼯 LPL 活性的 3 次测定结果分别为 19.86 mU、19.77 mU 和 19.71 mU, 平均值 19.78 mU;

而野生型人 LPL 的活性分别为 2.37 mU、3.27 mU 和 2.10 mU, 平均值 2.58 mU。二者的活性比较显示, 野生型树鼯 LPL 比野生型人 LPL 的活性高 7.67 倍 ($P < 0.05$; 表 2)。

表 2. 野生型树鼩脂蛋白脂肪酶和人脂蛋白脂肪酶的活性比较

转染的细胞	酶活性(mU)
COS7 细胞	0
pcDNA3.1 载体	0
人脂蛋白脂肪酶	2.58 ± 0.61
树鼩脂蛋白脂肪酶	19.78 ± 0.08

a 为 $P < 0.05$, 与人脂蛋白脂肪酶比较。

3 讨论

树鼩虽然在外形上与松鼠类似,但在分类上属于攀兽目,在进化上一般被认为是灵长目的原始祖先。本研究获得的树鼩 LPL cDNA 序列全长为 3 293 bp,其中开放阅读框架 1 437 bp,编码 458 个氨基酸的成熟蛋白。同源性分析显示,人和狒狒等其它种属 LPL 中的与酶活性相关的区域也同样非常保守地存在于树鼩 LPL 中^[1]。除此高度保守性外,与人 LPL 相比,树鼩 LPL 中有几个氨基酸性质明显改变的替换,如 Ala391、Gln102 和 Gln340 分别替代了人 LPL 中的 Lys381、Glu92 和 His 330,这些位点由于靠近人 LPL 的催化区及底物结合区,对于 LPL 活性有一定影响^[4,5],而树鼩 LPL 在这几个位点上的替换能否成为其活性特点的一部分还有待深入的研究。

脂蛋白脂肪酶(LPL)是一种与毛细血管腔内表面结合的糖蛋白,多个研究已证明 N-糖基化对于 LPL 的催化活性功能是必需的^[6]。实际上,很多 LPL 功能缺陷综合征如 iv 型高甘油三酯血症,其主要原因就是 LPL 糖基化过程发生障碍^[7]。经预测,树鼩 LPL 蛋白在上述位置也存在 2 个潜在的糖基化位点,即 N53-H-S 和 N368-K-T,说明糖基化对于 LPL 功能的重要性及种属间的保守性。

人类 LPL 分布广泛,体内表达 LPL 的最主要场所是脂肪组织、心肌、骨骼肌和乳腺组织,其次在巨噬细胞、肾上腺素和卵巢中合成激素的细胞、神经细胞、胸主动脉、脾脏、睾丸、肺脏和肾脏中有较低水平的表达^[8]。LPL 是一种肝外酶,但其组织分布在不同种属间有所不同,如在成熟的小鼠肝脏可以检测到 LPL mRNA 的存在,而在成人的肝脏或 HepG2 细胞及成熟大鼠的肝脏均检测不到^[1,5,9]。本研究应用实时 PCR 方法获得的树鼩 LPL mRNA 组织分布结果表明,树鼩中只有心肌和脂肪组织高表达 LPL mRNA,在骨骼肌中未检测到 LPL 的表达,而在树鼩的肝脏中却有中低水平表达的 LPL。树鼩 LPL mRNA 的这种分布情况与已知的人、大鼠、小鼠、豚鼠存在一定的相似性,但在骨骼肌和肝脏中的分布情况差异很大。其它已

知种属的骨骼肌是主要表达 LPL 的几种组织之一,LPL 水解甘油三酯释放的游离脂肪酸为肌肉组织提供能量。树鼩的骨骼肌中并不表达 LPL,那么应该有其它形式为树鼩的肌肉组织提供能量。此外,骨骼肌 LPL 的表达调控机制在树鼩和其它种属之间存在的差异也值得深入研究。

实验进一步分别测定了野生型人 LPL 和树鼩 LPL 的活性,发现树鼩 LPL 的活性显著高于人 LPL 的活性,是人 LPL 活性的 7.67 倍。除了转录水平、翻译水平和翻译后调控等因素外,树鼩 LPL 本身的序列特点可能也会影响酶活性,如 Ala391、Gln102 和 Gln340 分别替代了人 LPL 中的 Lys381、Glu92 和 His 330,这些位点对人 LPL 活性有一定影响,而树鼩 LPL 在这几个位点上的替换均改变了侧链上的电荷或酸碱碱性,这可能使蛋白的二级结构或空间构象发生变化,有可能最终影响其活性。

10 只成年雄性树鼩的血浆甘油三酯浓度测定结果显示,树鼩血浆甘油三酯的浓度低于正常人甘油三酯的浓度范围。尽管在人与树鼩这两个种属之间,有很多因素可以影响血浆甘油三酯水平,如饮食习惯、生活方式等环境因素和种属的代谢特点等遗传因素,但 LPL 仍然是甘油三酯水解的最主要代谢酶,因而其活性也就成为血浆甘油三酯水平的最主要决定因素。从本研究结果可以初步推测:树鼩 LPL 的高活性使其体内甘油三酯分解代谢旺盛,可能是树鼩血浆低水平甘油三酯的主要原因。树鼩的血浆低甘油三酯水平是否与其动脉粥样硬化不易感性相关还有待进一步更深入的研究。

[参考文献]

- [1] Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation and role in disease [J]. *J Mol Med*, 2002, **80** (12): 753-769.
- [2] 曾武威, 张坚, 陈保生, 吴钢, 薛红. 树鼩 CETP 的 cDNA 和蛋白质结构分析[J]. *中华医学杂志*, 2001, **81** (21): 1 316-320.
- [3] 张爱宏, 刘国庆. 放射性同位素标记法检测脂蛋白脂肪酶活性及其应用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (6): 573-576.
- [4] Rip J, Nieman MC, Ross CJ, Jukema JW, Hayden MR, Kastelein JJ, et al. Lipoprotein lipase S447X: a naturally occurring gain of function mutation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26** (6): 1 236-245.
- [5] Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation [J]. *J Lipid Res*, 2002, **43** (12): 1 997-2 006.
- [6] Tsutsumi K. Lipoprotein lipase and atherosclerosis [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2003, **1** (1): 11-17.
- [7] Boedeker JC, Doolittle MH, White AL. Differential effect of combined lipase deficiency (cld/cld) on human hepatic lipase and lipoprotein lipase secretion [J]. *J Lipid Res*, 2001, **42** (11): 1 858-864.
- [8] Enerback S, Gimble JM. Lipoprotein lipase gene expression: physiological regulates at the transcriptional and posttranscriptional level [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1993, **1169** (2): 107-125.
- [9] Mudrakova E, Kovar J. Ethanol consumption affects lipoprotein lipase gene expression in C57Bl/6 mice [J]. *Physiol Res*, 2007, **56** (4): 497-501.

(此文编辑 李小玲)