

# 利用 RNA 干扰技术抑制小鼠羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶基因的表达

欧海龙<sup>1</sup>, 严忠海<sup>2</sup>, 焦飞<sup>3</sup>

(1. 贵阳医学院生物化学与分子生物学教研室, 贵州省贵阳市 550004; 2. Department of Medicine, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York, New York 10032; 3. 滨州医学院生物化学与分子生物学教研室, 山东省烟台市 264003)

[关键词] 羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶; RNA 干扰; 胆固醇; 家族性高胆固醇血症; 基因治疗

[摘要] **目的** 为了探寻一种更有效的家族性高胆固醇血症(FH)基因治疗新途径,通过慢病毒介导 RNA 干扰的方法在 H22 细胞系及 C57BL/6J 纯系小鼠中抑制内源性羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(HMG-CoAR)基因表达进行研究。**方法** 从 HMG-CoAR 基因序列中选择三段作为靶序列(T1、T2 和 T3),并构建重组慢病毒 RNAi 载体;经体外包装后,分别感染 H22 细胞系及注射小鼠。通过 qRT-PCR 检测 HMG-CoAR mRNA 丰度;利用 Western Blot、ELISA 方法分析 HMG-CoAR 的表达水平。**结果** 与空载体对照相比,三个实验组中稳定转染细胞的 HMG-CoAR 表达水平显著降低( $P < 0.05$ ),同时感染 5 天后小鼠的肝脏 HMG-CoAR mRNA 水平、蛋白含量以及血浆中 HMG-CoAR 表达均显著降低( $P < 0.05$ ),其中 T3 位点的抑制效率最高,是空质粒对照的 1/3。另外,对三个载体的持续性抑制能力分析显示,在处理后的至少 50 天内,三个实验组小鼠中 HMG-CoAR 表达量均有效地被抑制,其中 T1 靶点的抑制效果最为稳定,而 T3 靶点的波动最大,但抑制效率一直最高。**结论** 三个重组慢病毒 RNAi 载体均可显著抑制内源性 HMG-CoAR 表达,可为下一步试图通过下调 HMG-CoAR 表达的方式,降低 FH 患者体内胆固醇水平的 FH 基因治疗奠定基础。

[中图分类号] R394

[文献标识码] A

## Inhibition of Hydroxymethylglutaryl CoA Reductase Gene Expression by RNA Interference in Mouse

OU Hai-Long<sup>1</sup>, YAN Zhong-Hai<sup>2</sup>, and JIAO Fei<sup>3</sup>

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guiyang Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 2. Department of Medicine, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York, New York 10032, USA; 3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Binzhou Medical University, Yantai, Shandong 264003, China)

[KEY WORDS] Hydroxymethylglutaryl CoA Reductase; RNA Interference; Cholesterol; Familial Hypercholesterolemia; Gene Therapy

[ABSTRACT] **Aim** To develop novel strategies to treat familial hypercholesterolemia (FH), we explored knocking down the endogenous hydroxymethylglutaryl CoA reductase (HMG-CoAR) expression in C57BL/6J mouse by lentivirus mediated RNAi approach in this study. **Methods** Three lentiviral RNAi vectors targeting sites (T1, T2 and T3) in HMG-CoA reductase gene were subject to infect H22 cell line and tail vein injection to C57BL/6J mouse after viral packaging. HMG-CoAR mRNA abundance was measured by qRT-PCR; Western Blot and ELISA assay were used to detect the HMG-CoAR protein expression in infected mouse liver or plasma. **Results** The expression of HMG-CoAR in stably transfected H22 cells of three experimental groups was dramatically reduced in comparison to control ( $P < 0.05$ ). Significantly lowering HMG-CoAR was detected in mouse liver and plasma 5 days after infection ( $P < 0.05$ ). Among the three target sites, T3 was proved to be the most effective, in which the HMG-CoAR level was only 1/3 of control group. Moreo-

[收稿日期] 2012-05-31

[基金项目] 贵州省科学技术基金资助(2012GZ8178)

[作者简介] 欧海龙,博士,副教授,研究方向为脂代谢相关基因的分子遗传,E-mail 为 ouhailong@hotmail.com。严忠海,博士,助理研究员,研究方向为表观遗传学,E-mail 为 zy2167@columbia.edu。焦飞,博士,副教授,研究方向为表观遗传学与肿瘤,E-mail 为 slytjiaofei@yahoo.com.cn。

ver, the result of time course analysis of the inhibition effects showed that the HMG-CoAR expression was suppressed at least up to 50 days in all three groups. T1 site exhibited most stable inhibition effect, yet T3 site showed more fluctuating though it was more effective than others. **Conclusion** Three RNAi targeted vectors were demonstrated to be able to inhibit endogenous HMG-CoAR expression in cell line and mouse. The results pave the way for lowering serum lipid in FH treatment by knocking down HMG-CoAR level.

家族性高胆固醇血症 (familial hypercholesterolemia, FH) 又称Ⅱa 型高脂蛋白血症, 是由于细胞膜上的低密度脂蛋白受体 (low-density lipoprotein receptor, LDLR) 功能缺陷导致体内脂质代谢异常而引起的一种遗传代谢性疾病。当 LDLR 基因发生突变时, 细胞膜表面的低密度脂蛋白受体数量或结构发生异常, 使 LDL 代谢分解障碍, 并在血管壁不断沉积, 导致儿童期血浆总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDLC) 显著升高、皮肤多部位肌腱黄色瘤和早发动脉粥样硬化等, 是诱发各类心血管疾病的高危因素<sup>[1]</sup>。在体内脂质代谢过程中, 胆固醇水平除了受 LDLR 代谢途径影响外, 还与其它多种调控途径有关, 其中之一是受羟甲基戊二酸单酰辅酶 A (hydroxymethylglutaryl CoA, HMG-CoA) 还原酶 (HMG-CoA reductase, HMG-CoAR) 活性的调节。HMG-CoAR 是胆固醇合成的限速酶, 其活性受体内胆固醇水平、激素以及饮食状况等各种因素的影响。他汀类药物如洛伐他汀、辛伐他汀、佛伐他汀等是 HMG-CoAR 的抑制剂, 具有显著的降脂效果, 是临床上降低体内脂肪的首选药物<sup>[2]</sup>。它们通过竞争性抑制 HMG-CoAR 活性, 减少内源性胆固醇合成, 实现降低血清中 TC、LDLC 水平。本文以 HMG-CoAR 为靶基因, 通过慢病毒介导 RNA 干扰 (RNAi) 的方法在 C57BL/6J 纯系小鼠中抑制内源性 HMG-CoAR 基因表达, 为我们下一步通过下调 HMG-CoAR 基因表达, 从而进一步降低体内总胆固醇水平的方法进行 FH 基因治疗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

大肠杆菌 TPO10 感受态细菌、293T 细胞、pLKO.1 载体以及相关包装载体以及人逆转录病毒包装细胞株 HEK293T 细胞均为本实验室保存; 聚凝胺 (Polybrene) (Sigma-Aldrich); 小鼠 HMG-CoAR 酶联免疫分析试剂盒购自 Mybiosource 公司 (Catalog NO: MBS705517); HMG-CoAR 抗体购自 BioVision 公司 (Catalog NO: 3952-100); 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒及 TRIzol 试剂 (北京天根生物公司); 各种

限制性内切酶、T4 连接酶、Taq 酶 (Takara 公司); 胎牛血清、RPMI 1640 培养基及 DMEM 培养基 (Hyclone 公司); 逆转录酶 (Promega 公司); DNA Marker (北京全式金生物公司); 其它各种试剂为国产分析纯; PCR 引物由南京金斯瑞生物有限公司合成。

### 1.2 shRNA 的设计及 HMG-CoAR RNAi 慢病毒载体构建

通过软件计算 (Ambion 公司), 在小鼠 HMG-CoAR 基因 (GenBank: NM\_008255.2) 的保守结构域处分别选取 3 段靶序列 (T1: 316 bp ~ 336 bp; T2: 1351 bp ~ 1369 bp; T3: 2065 bp ~ 2075 bp), 并以 CTCGAG 为颈环结构, 合成可产生 shRNA 的相应寡核苷酸片段 (表 1), 分别取 1  $\mu$ L 正向和反向 siRNA 寡核苷酸片段于 95 $^{\circ}$ C 4 min、70 $^{\circ}$ C 10 min 处理并缓慢冷却至室温, 退火后与经 Age I 和 EcoR I 双酶切的慢病毒载体 pLKO.1 puro 相连, 并用慢病毒载体 pLKO.1 puro 插入片段的上下游设计一对引物 LKO5、LKO3 (表 2) 进行 PCR 初步鉴定, 将阳性克隆的质粒进一步测序确认。

### 1.3 慢病毒的制备

分别取纯化好的慢病毒干扰载体 1  $\mu$ g 与 900 ng pCMV-dR8.91 和 100 ng VSV-G/pMD2G 包装质粒, 对培养至对数生长期的 293T 细胞采用磷酸钙沉淀的方法进行共转染, 转染 6 h 后换成含 10% FBS 的 DMEM 完全培养液, 并在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下继续培养, 完成假病毒颗粒的包装。48 h 后收集含有病毒颗粒的细胞培养上清液, 并 15000 r/min 超速离心 0.5 h 弃上清, 收集病毒, 保存于 -70 $^{\circ}$ C 备用。

### 1.4 滴度测定及细胞感染

转染的前一天, 在 6 孔板中分别对每孔接种  $2 \times 10^5$  的 293T 细胞, 将所收集的病毒液按 1、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  及  $10^{-5}$  比例进行梯度稀释, 将 0.5 mL 稀释后的病毒液分别加入到相应的每个孔中, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 后, 更换含 10% 血清的 DMEM。48 ~ 72 h 后提取 DNA, 用引物 RRE1 及 RRE2 (表 2) 进行定量 PCR, 检测各重组慢病毒的拷贝数, 并根据拷贝数分别选出计量孔, 最后根据公式: TU/mL =  $(C \times N \times D \times 1000) / V$ , 计算出重组慢病毒滴度 (C 为平均每基因组整合的病毒拷贝数, N 为感染时细

胞的数目, D 为病毒载体的稀释倍数, V 为加入的稀释病毒的体积数)。

根据所测得的病毒滴度, 在小鼠 H22 肝细胞系中加入含有 5  $\mu$ L 病毒液、8 mg/L 聚凝胺的不含血

清培养液 DMEM, 2 h 后换成完全培养液, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下继续孵育、培养。当长至 80% ~ 90% 汇合度时, 用 900 mg/L 的嘌呤霉素进行筛选, 获得稳定的细胞克隆并扩增培养, 用于下一步的实验。

表 1. 针对靶序列和阴性对照序列分别设计的寡核苷酸对

Table 1. Oligonucleotides designed according to the target sequence and the negative control sequences

片段	干扰序列
1	正义链 5'-CCGGTactgtcgtgagcagcagcatcaCTCGAGtgatgtcgtcgtcagcagctTTTTTG-3'
	反义链 5'-AATTCAAAAAAtgatgtcgtcgtcagcagctCTCGAGacgtgctgagcagcagcatcaA-3'
2	正义链 5'-CCGGTaaaccattagtgtggaagcCTCGAGgctccaccactaatggtTTTTTG-3'
	反义链 5'-AATTCAAAAAgctccaccactaatggtCTCGAGaaccattagtgtggaagcA-3'
3	正义链 5'-CCGGTgacgcaacctctatatccgttCTCGAGaacggatagaggttgcctTTTTTG-3'
	反义链 5'-AATTCAAAAAaacggatagaggttgcctCTCGAGgacgcaacctctatatccgttA-3'

表 2. 引物序列

Table 2. Primer sequence

引物名称	引物	产物长度(bp)
LK05	5'-TGACTATCATATGCTTACCCTAAC-3'	198
LK03	5'-GTATGTCTGTTGCTATTATGTCTA-3'	
RRE1	5'-GACGGTACAGGCCAGACAAT-3'	109
RRE2	5'-GATGCCCCAGACTGTGAGTT-3'	
H1	5'-GCTTGGCCTCCATTGAGAT-3'	75
H2	5'-ATGCATCCGAAAAAGTCTTG-3'	
GAPDH1	5'-AGTCCGGTGTGAACGGATTG-3'	95
GAPDH2	5'-GGGGTCTTGTATGGCAACA-3'	

1.5 动物实验

C57BL/6J 纯系小鼠在贵阳医学院实验动物中心饲养、繁殖, 环境条件为室温 20 ~ 25 $^{\circ}$ C, 相对湿度 40% ~ 70%。对 8 周龄左右、体重为 25 ~ 30 g 的 C57BL/6J 纯系雄性小鼠 (n = 4) 用 200  $\mu$ L 含重组慢病毒的 PBS 瞬间经尾静脉注射, 以空质粒为对照组。每组实验均重复 3 次。

1.6 荧光定量 RT-PCR 分析 HMG-CoAR mRNA 丰度

对注射后 5 天的各组小鼠断颈处死, 分别获取肝组织进行 TRIzol 裂解法抽提总 RNA。琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 紫外分光光度计定量和检测纯度。经 SuperScript<sup>®</sup> III Reverse Transcriptase (Cat. 18080-044, Invitrogen, CA) 逆转录成 cDNA 之后, 运用 Applied Biosystems 7500 定量 PCR 仪和 iQ<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Cat. 170-8880, Bio-Rad), 用引物 H1、H2 检测 HMG-CoAR mRNA 的相对丰度。以 GAPDH 作为扩增的内对照, 引物设计均横跨内含子 (引物 GAPDH1 和 GAPDH2)。利用 7500 software syste 对每个样品的荧光定量 PCR 反应结果进行分析

并获得 Ct 值。根据 Ct 值, 计算出  $\Delta\Delta Ct$  值, 以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示实验组与对照组目的基因表达的倍比关系, 分析不同靶点的干扰效果。每组均单独重复检测 3 次, 阴性对照以双蒸水代替。

1.7 Western Blot 检测 HMG-CoAR 表达

对注射后 5 天的小鼠肝组织提取总蛋白, 经浓缩后, 用 BCA 法定量, 取 20  $\mu$ g 进行 SDS-PAGE 电泳, 转至硝酸纤维素膜 (NC 膜), NC 膜经漂洗、封闭后用生物素标记的兔抗 HMG-CoAR 抗体 (一抗) (1:1000) 以及辣根过氧化物酶标记抗兔 IgG 抗体 (1:1000) (二抗) 进行免疫检测, 最后冲洗、显影并通过图像分析系统计算积分光密度值 (IOD)。

1.8 ELISA 定量分析 HMG-CoAR 表达水平

分别对对照组以及 3 个重组 RNAi 慢病毒感染的实验组, 在注射后的 10、20、30、40 和 50 天, 通过尾静脉采集血样, 对 HMG-CoAR 的表达水平进行检测。根据 ELISA 试剂盒说明书进行相关操作, 最后用酶联仪在 450 nm 波长依序测量各孔的光密度 (OD 值), 每样品重复 3 次。对于转染的细胞, 用 PBS 调整细胞浓度至 10<sup>11</sup>/L, 并两次冻融, 以裂解细胞, 经离心后, 取上清进行 ELISA 检测。

1.9 统计学分析

所有数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS10.0 软件处理, 两个样本均数间的比较采用 t 检验, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HMG-CoAR 基因干扰载体构建

对不同干扰片段与载体连接的重组质粒进行

PCR 鉴定(图 1),分别获得比对照(以空载体为模板)约大 60 bp 左右的克隆,说明外源 siRNA 可能已连进慢病毒载体,将初步鉴定为阳性的质粒进行测序,测序结果与设计的一致。这样,成功构建了三个分别特异性靶向 HMG-CoAR 基因 T1、T2、T3 位置的 pHRi1、pHRi2、pHRi3 RNAi 载体。

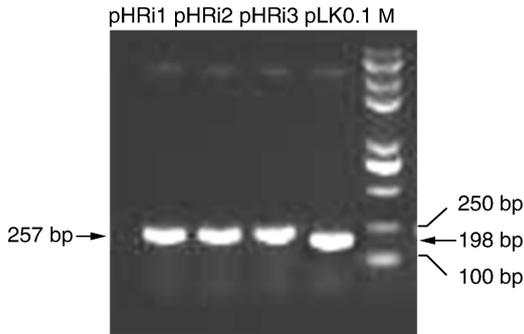


图 1. 插入片段的 PCR 鉴定结果

Figure 1. PCR result of insertion fragment

## 2.2 细胞中 HMG-CoAR 的表达

收获包装后的 pHRi1、pHRi2 及 pHRi3 及空载体对照的重组慢病毒,通过计算,分别获得约为  $8 \times 10^6$  TU/mL、 $2 \times 10^7$  TU/mL 和  $6 \times 10^7$  TU/mL 病毒滴度。接着用重组慢病毒感染小鼠肝来源的细胞系 H22,经嘌呤霉素抗性筛选后获得稳定转染的细胞克隆,扩大培养至足够数后收获细胞,并检测 HMG-CoAR 基因在细胞中的表达情况。结果显示三个实验组之间的表达水平比较一致,而与空载体对照相比,其水平显著降低( $P < 0.05$ ),说明三段靶序列在体外都可有效地抑制细胞内 HMG-CoAR 基因的表达(表 3)。

表 3. 稳定转染的细胞中 HMG-CoAR 表达水平( $\bar{x} \pm s$ ,  $\mu\text{g/L}$ ,  $n = 3$ )

Table 3. The expression of HMG-CoAR in stably transfected H22 cells

载体	HMG-CoAR 浓度
pLK0.1	$8.10 \pm 1.04$
pHRi1	$4.86 \pm 1.53^a$
pHRi2	$4.65 \pm 0.43^a$
pHRi3	$4.22 \pm 0.83^a$

a 为  $P < 0.05$ ,与 pLK0.1(空载体对照)相比。

## 2.3 小鼠体内 HMG-CoAR 基因的转录分析

对注射后 5 天的小鼠进行解剖获取肝脏组织 mRNA,通过定量 RT-PCR 比较小鼠体内不同实验组中 HMG-CoAR mRNA 丰度的相对差异情况,结果显

示 HMG-CoAR 的转录受到抑制,三个实验组的 mRNA 水平明显降低,差异有显著性( $P < 0.05$ ;表 4)。

## 2.4 小鼠体内 HMG-CoAR 的蛋白表达

对重组慢病毒注射 5 天后的小鼠,进一步分析不同实验组的 HMG-CoAR 在蛋白水平上的表达情况。Western Blot 结果显示,与空载体转染的小鼠相比,三个实验组中 HMG-CoAR 在肝脏中的表达都受到不同程度地干扰,其中 T3 为最有效靶点(图 2)。同时,对各组小鼠抽取血样,检测外周血中 HMG-CoAR 的表达量。结果与 Western Blot 结果相似,三个实验组中 HMG-CoAR 的表达水平与空载体对照相比差异有显著性( $P < 0.05$ ),但是与细胞水平又有所不同,三个实验组中的抑制效率也存在差异,其中, pHRi3 的抑制效果最为明显,可达到 3 倍多。而 pHRi1 和 pHRi2 中 HMG-CoAR 的表达水平较为相近,虽不及 pHRi3 的抑制效果,但也均显著低于空载体对照(pLK0.1)( $P < 0.05$ ;表 4)。为了进一步验证 RNAi 干扰载体的有效性,我们对用不同病毒载体处理后 5 天的小鼠血浆总胆固醇水平进行检测,尽管与 HMG-CoAR 蛋白受抑制的效果相比,不同处理组的总胆固醇水平变化波动更小,但与空载体对照相比依然差异有显著性( $P < 0.05$ ;表 4)。而且通过对小鼠血浆胆固醇水平的检测,也进一步证明 pHRi3 具有更有效的抑制效果( $P < 0.01$ )。

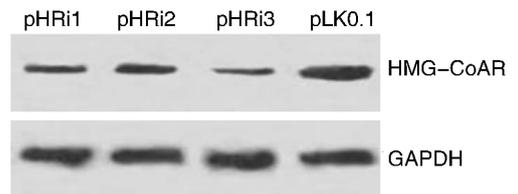


图 2. HMG-CoAR 的 Western Blot 检测结果

Figure 2. Results of Western Blot detection for HMG-CoAR

为了分析不同 RNAi 载体在小鼠体内的持续性抑制能力,接着对注射后 10、20、30、40 和 50 天小鼠血清中 HMG-CoAR 的表达水平进行检测。结果显示三个 RNAi 处理组中, HMG-CoAR 基因的表达均比空载体对照明显降低,说明 RNAi 的干扰效果可达 50 多天(图 3)。其中 pHRi1 抑制效果最为稳定;经 pHRi2 处理的小鼠中, HMG-CoAR 表达水平与 pHRi1 处理组较为接近,但抑制效果波动稍大些;而与 pHRi1 及 pHRi2 处理组相比, pHRi3 的效果最不稳定,但总的来说,在将近 2 个月的时间内 HMG-CoAR 表达水平一直都是最低,说明 T3 靶点的干扰效率最高(图 3)。

表 4. 小鼠肝脏中 HMG-CoAR 基因的表达及血浆中胆固醇检测( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Table 4. The expression of HMG-CoAR and the content of total cholesterol in serum ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

载体	肝组织 HMG-CoAR mRNA	肝组织 HMG-CoAR 蛋白	血浆 HMG-CoAR( $\mu\text{g/L}$ )	血浆 TC( $\text{mmol/L}$ )
pLK0.1	9.00 $\pm$ 1.24	0.94 $\pm$ 0.04	2.66 $\pm$ 0.34	2.47 $\pm$ 0.03
pHRi1	4.86 $\pm$ 0.77 <sup>a</sup>	0.56 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.51 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	2.00 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
pHRi2	5.42 $\pm$ 1.41 <sup>a</sup>	0.54 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.72 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.92 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
pHRi3	3.41 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>	0.42 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.87 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	1.66 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与 pLK0.1 (空载体对照) 相比。

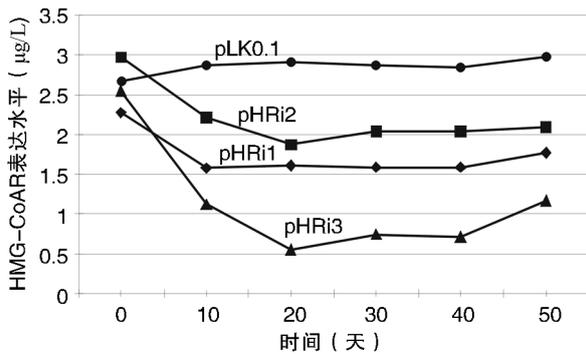


图 3. 在注射后不同时间点 ELISA 法检测小鼠体内 HMG-CoAR 的表达水平( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Figure 3. The expression of HMG-CoAR gene in mouse serum at days 10, 20, 30, 40 and 50 after injection with letivirous by ELISA

### 3 讨论

由 LDLR 基因功能缺陷引起的 FH, 其体内脂代谢紊乱, 外周血胆固醇淤积, 并可导致早发动脉硬化等相关疾病。以前对于 FH 的基因治疗主要集中在体内补偿性表达 LDLR 基因, 希望借此能提高体内正常功能的 LDLR 水平, 并促进胞外的胆固醇进入细胞内代谢分解<sup>[3,4]</sup>。比如, Kankkonen 等<sup>[5,6]</sup> 首先用肝特异启动子如 TBG 等驱动外源 LDLR 基因, 实现其肝脏特异表达; 接着, 为了实现外源 LDLR 基因能在受体体内更接近于正常的生理调控, 人们用 LDLR 基因启动子区 10 kb 长, 含有各种调控元件的 DNA 片段启动外源 LDLR 基因表达<sup>[7,8]</sup>。这些有益的探索促进了 FH 基因治疗的研究。最近, 对 FH 的基因治疗, 人们把目光投向脂代谢中其他调控基因的干预上<sup>[9]</sup>。机体可通过胆固醇的逆向转运系统 (reverse cholesterol transportation, RCT), 将循环中的高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL) 运回肝脏内分解, 降低外周组织中大量过剩的脂质。载脂蛋白 A1 (ApoA1) 是 HDL 主要的载脂蛋白, 并作

为 HDL 主要的结构和功能蛋白, 在胆固醇的逆向转运中起重要作用, 提高体内的 HDL/ApoA1 水平可显著减少心血管疾病的发生机率。Van Craeyveld 等<sup>[10]</sup> 发现体内过表达 ApoA1 后, 不但有利于 HDL 胆固醇水平的提高, 而且也能增加硬化斑块的胶原蛋白。而过表达 ApoA1 与代常性表达 LDLR 基因具有累加效应, 当在 LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠中共表达 ApoA1 和 LDLR 时极大促进硬化斑块的稳定性, 甚至有的斑块还有消退的现象。可见, 联合干预脂代谢中相关基因的表达, 是提高 FH 基因治疗的有效手段。

HMG-CoAR 位于胞质内质网膜上, 为多次跨膜蛋白, 催化 HMG-CoA 生成甲羟戊酸 (MVA), 进而合成胆固醇。甲羟戊酸的生成是一个不可逆过程, 因此, HMG-CoAR 是 MVA 途径中的一个限速酶, 在胆固醇合成的生化过程中起着关键作用, 也是细胞质中其他萜类化合物代谢中的重要调控点。在哺乳动物细胞的正常代谢过程中, HMG-CoAR 的活性受胆固醇的反馈抑制, 当 HMG-CoAR 受竞争性抑制时, 体内胆固醇的合成水平降低。临床上常用的 HMG-CoAR 抑制剂如各种他汀类药物均可减低血清胆固醇的浓度, 起抗动脉硬化的效果。尽管他汀类药物属于临床上比较成熟的、常规的药物, 然而长期服用也会带来诸多副作用, 如横纹肌肉溶解、肝脏损伤等<sup>[11]</sup>。

HMG-CoAR 基因位于 13 号染色体长臂上 (q13.3-q14), 该基因在进化上保守, 其同源基因存在于包括酿酒酵母<sup>[12]</sup>、果蝇<sup>[13,14]</sup> 甚至拟南芥<sup>[15]</sup> 等多种物种中。在本研究中, 我们在小鼠 HMG-CoAR 基因的编码区选择三段作为靶序列, 通过慢病毒介导 RNAi 技术, 在体内下调 HMG-CoAR 基因的表达。发现与空载体对照相比, 三段靶序列均有显著的抑制效果。而在这三段靶序列中, 尽管在细胞水平上抑制作用并没有多大区别, 但是从小鼠体内的实验分析中可见, 第三段序列抑制效率最高, 另外, 我们还对三个实验组在不同时间对 HMG-CoAR 基因抑

制情况进行了分析,发现 T3 靶点虽然抑制效果最明显,但是比较不稳定,而 T1 靶点的效果最稳定。但不管怎样,都表现出对 HMG-CoAR 基因显著的抑制效果,而且抑制效力可达 50 多天。该研究结果可为 FH 基因治疗提供新的策略,为下一步在 LDLR<sup>-/-</sup> 的 FH 模型小鼠中,通过抑制 HMG-CoAR 基因表达或者联合代偿性表达 LDLR 的方法对 FH 的基因治疗研究奠定基础。

#### [参考文献]

- [1] Fahed AC, Nemer GM. Familial hypercholesterolemia: the lipids or the genes[J]. *Nutr Metab*, 2011, 8: 23.
- [2] 迟家敏. 实用血脂学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010; 392-393.
- [3] Al-Allaf FA, Coutelle C, Waddington SN, et al. LDLR-gene therapy for familial hypercholesterolaemia: problems, progress, and perspectives [J]. *Int Arch Med*, 2010, 3: 36.
- [4] Van Craeyveld E, Jacobs F, Gordts SC, et al. Gene therapy for familial hypercholesterolemia[J]. *Curr Pharm Des*, 2011, 17 (24): 2 575-591.
- [5] Kankkonen HM, Vähäkangas E, Marr RA, et al. Long-term lowering of plasma cholesterol levels in LDL-receptor-deficient WHHL rabbits by gene therapy [J]. *Mol Ther*, 2004, 9 (4): 548-556.
- [6] Leberherz C, Gao G, Louboutin JP, et al. Gene therapy with novel adeno-associated virus vectors substantially diminishes atherosclerosis in a murine model of familial hypercholesterolemia [J]. *J Gene Med*, 2004, 6(6): 663-672.
- [7] Hibbitt OC, Harbottle RP, Waddington SN, et al. Delivery and long-term expression of a 135 kb LDLR genomic DNA locus in vivo by hydrodynamic tail vein injection [J]. *J Gene Med*, 2007, 9 (6): 488-497.
- [8] Hibbitt OC, McNeil E, Lufino MM, et al. Long-term phys-

ologically regulated expression of the low-density lipoprotein receptor in vivo using genomic DNA mini-gene constructs [J]. *Mol Ther*, 2010, 18 (2): 317-326.

- [9] Hibbitt O, Agkatsev S, Owen C, et al. RNAi-mediated knockdown of HMG CoA reductase enhances gene expression from physiologically regulated low-density lipoprotein receptor therapeutic vectors in vivo [J]. *Gene Ther*, 2012, 19 (4): 463-467.
- [10] Van Craeyveld E, Gordts SC, Nefyodova E, et al. Regression and stabilization of advanced murine atherosclerotic lesions: a comparison of LDL lowering and HDL raising gene transfer strategies [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2011, 89 (6): 555-567.
- [11] 陈保生, 李德岭, 任渝棠. 越低越好, 越快越好? ——他汀类药物强化降脂利弊谈[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14(9): 737-740.
- [12] Garza RM, Tran PN, Hampton RY. Geranylgeranyl pyrophosphate is a potent regulator of HRD-dependent 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase degradation in yeast [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (51): 35 368-380.
- [13] Nguyen AD, Lee SH, DeBose-Boyd RA. Insig-mediated, sterol-accelerated degradation of the membrane domain of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in insect cells [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (39): 26 778-788.
- [14] Belgacem YH, Martin JR. Hmgcr in the corpus allatum controls sexual dimorphism of locomotor activity and body size via the insulin pathway in *Drosophila* [J]. *PLoS One*, 2007, 2(1): e187.
- [15] Leivar P, Antolín-Llovera M, Ferrero S, et al. Multilevel control of Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by protein phosphatase 2A [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(4): 1 494-511.

(此文编辑 许雪梅)