

LDLR^{-/-}小鼠中脂代谢相关基因的表达

欧海龙¹, 严忠海², 雷霆雯¹

(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)

[关键词] LDLR^{-/-}小鼠; 脂代谢; 基因表达

[摘要] **目的** 分析 LDLR 基因敲除小鼠体内脂代谢相关基因 ApoB100、PPAR α 、LXR α 以及 ABCA1 与野生型相比表达水平的差异情况。**方法** 应用多重 PCR 的方法对 LDLR^{-/-}小鼠基因型进行鉴定;接着分别对 LDLR^{-/-}小鼠和野生型小鼠脂代谢相关基因的 mRNA 相对丰度以及蛋白表达水平进行 qRT-PCR、ELISA 分析。**结果** 与野生型相比,LDLR^{-/-}小鼠中 ApoB100、PPAR α 的 mRNA 及蛋白表达均上调($P < 0.05$);ABCA1 的表达水平下降($P < 0.01$),蛋白水平上的下降幅度更为明显;而 LXR α 不管在 mRNA 或蛋白水平上均检测不到差异表达。**结论**

LDLR 基因功能的缺失对不同的脂类代谢相关基因的表达产生不同的影响。本研究有助于人们进一步了解家族性高胆固醇血症的发病机制,同时也为药物设计中靶位点的选择提供参考价值。

[中图分类号] R394

[文献标识码] A

The Expression of Lipid Metabolism-Related Genes in LDLR^{-/-} Mouse

OU Hai-Long¹, YAN Zhong-Hai², and LEI Ting-Wen¹

(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)

[KEY WORDS] LDLR^{-/-} Mouse; Lipid Metabolism; Gene Expression

[ABSTRACT] **Aim** To analyze the different expression of lipid metabolism-related genes such as ApoB100, PPAR α , LXR α and ABCA1 in wild type and LDLR^{-/-} mouse. **Methods** qRT-PCR and ELISA were used respectively to measure the mRNA abundances and protein expression after LDLR^{-/-} mouse genotype detecting by multiple PCR. **Results** The expression of ApoB100, PPAR α were up-regulated both in mRNA and protein level ($P < 0.05$) in LDLR^{-/-} mouse comparing to wild type; The ABCA1 expression was down ($P < 0.01$), and the drop in protein was more striking than in mRNA level. However, there was no significant difference in mRNA and protein expression for LXR α gene between wild type and LDLR^{-/-} mouse. **Conclusion** The impaired function of the low density lipoprotein receptor (LDLR) could result in the different effects on individual genes expression which were involved in lipid metabolism. This study would further our understanding on the mechanism of familial hypercholesterolemia (FH), and would help us choose target genes in drug design for FH therapy.

低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 是一类单链糖蛋白膜受体, 主要功能是介导血浆中富含胆固醇酯的低密度脂蛋白 (LDL) 进入胞内代谢分解, 清除血管中的多余脂质, LDLR 功能异常将导致体内脂代谢紊乱。家族性高胆固醇血症 (familial hypercholesterolemia, FH) 又称 II a 型高脂蛋白血症, 是由 LDLR 基因突变引起的一种

常染色体显性遗传代谢性疾病, 在临床上表现为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^[1, 2]。

LDLR 基因敲除的 C57BL/6J 纯系小鼠 (LDL-

[收稿日期] 2012-01-04

[基金项目] 贵州省科学技术基金资助项目 (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。通讯作者雷霆雯, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为氧化酶类生物化学, E-mail 为 Leitw@sina.com。

R^{-/-})自成功开发以来,被广泛运用于生物医学相关各领域的研究^[3-5],该品系小鼠中 LDLR 基因的第 4 号外显子已用同源重组的方式被剔除^[6],其血清 TC 含量平均为 2.5 g/L,这虽不足以使小鼠产生病变,但当给予高脂肪饮食时,TC 可高达 4~15 g/L 之间(正常小鼠为 0.8~10 g/L),其动脉可发生范围较大的粥样硬化病变,病程也与人类的由泡沫细胞、脂质条纹向增生阶段发展过程相似,是目前进行 FH 基因治疗研究以及脂肪代谢相关疾病病理机制研究常用的模型小鼠^[7,8]。本文以诱导病变之后的 LDLR^{-/-}小鼠为材料,检测体内参与脂肪代谢相关基因如载脂蛋白 B100(ApoB100)、过氧化体增殖物激活型受体 α (PPAR α)、肝 X 受体(LXR α)以及 ATP 结合盒转运体 A1(ABCA1)的表达水平,并分析其与野生型小鼠相比的变化情况,该研究结果可为 FH 的治疗提供更多的靶分子,也会对我们更深入了解 FH 的发病机制有所帮助。

1 材料与方法

1.1 试剂

DNA/RNA 提取试剂盒为 Qiagen 公司的 AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Catalog no. 80204);cDNA 构建的 kit 为 Invitrogen 公司 SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Catalog no. 18080-051);荧光定量 PCR 检测采用 ABApplied 公司 Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System 平台,iTaqTM Fast SYBR[®] Green Supermix With ROX 试剂盒 (Catalog no. 172-5100);DNA 回收试剂盒、TRIzol 试剂购自北京天根生物公司;ExTaq 聚合酶、末端转移酶 TdT、各种限制性内切酶和 Klenow 购自 TaKaRa 公司。鼠 PPAR α ELISA 试剂盒、鼠 ApoB100 ELISA 试剂盒、ABCA1 抗体、LXR 抗体分别购自 GenScript 公司和 Santa Cruz 公司。所有涉及 RNA 实验用水均经 DEPC 处理;逆转录及基因表达检测涉及的所有特异性引物由南京金斯瑞生物公司合成。

1.2 实验动物

LDLR^{-/-}小鼠由浙江大学郭航远教授提供,该品系小鼠引种自美国 Jackson 实验室;C57BL/6J 纯系小鼠购自重庆医科大学实验动物中心,小鼠均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℃,相对湿度 40%~70%。对 6 周龄左右的 C57BL/6J 纯系雄性小鼠($n=4$)及相同遗传背景的 LDLR^{-/-}雄性小鼠($n=4$)进行高脂肪饲料喂养(21%脂肪和 0.15%胆固醇),喂食 8 周之后,体

重为 25~30 g 的两组小鼠分别进行解剖并抽取静脉血用于下一步实验。

1.3 多重 PCR

分别剪取成年正常小鼠和 LDLR^{-/-}小鼠尾巴 0.5~1.0 cm,通过鼠尾裂解法抽取基因组 DNA,参照 Jackson 实验室提供的相关信息进行引物设计和 PCR 检测。分别在小鼠基因组上、敲除片段的两端设计一对引物 Pw: 5'-GCGATGGATACACTCACTGC-3'; Pc: 5'-CCATATGCATCCCCAGTCTT-3',同时在插入的打靶载体片段上设计一条正向引物 Pm: 5'-AATCCATCTTGTTCATGGCCGATC-3'。各小鼠分别取 1 μ L 基因组 DNA,用引物 Pw、Pc 和 Pm 进行多重 PCR 扩增反应。反应条件为:94℃ 5 min;(94℃ 30 s,61℃ 45 s,72℃ 45 s) \times 35 个循环;72℃ 10 min。最后,取 6 μ L PCR 扩增产物电泳。

1.4 实时荧光定量 RT-PCR

LDLR^{-/-}小鼠及野生型 C57BL/6J 纯系小鼠断颈处死,分别获取肝组织,TRIzol 裂解法抽提总 RNA。运用 iTaqTM Fast SYBR[®] Green Supermix With ROX 试剂盒,检测 LDLR^{-/-}小鼠体内与脂代谢相关的基因如 ApoB100、PPAR α 、LXR α 以及 ABCA1 的表达水平,并分析其与野生型相比的差异情况。引物设计均横跨内含子(表 1)。利用数据分析软件对每个样品的荧光定量 PCR 反应结果进行分析并自动计算出 Ct 值,采用相对 Ct 值(Δ Ct)的方法对目的基因的表达水平进行定量,用表达相对稳定的看家基因 GAPDH 作为扩增的内对照,以校正实验带来的加样和测定误差。最后做融合曲线,确定反应产物单一性;并将不同浓度定量的模板的对数和相应的 Ct 值作图,绘制标准曲线。根据标准曲线计算样品 cDNA 的浓度。所有的基因均单独重复检测 3 次,最后用 Bio-Rad iQ5 软件对定量结果进行分析处理,阴性对照以双蒸馏水代替。

1.5 ELISA 检测

收集小鼠静脉血样,加肝素抗凝血,1000 g 低温离心 15 min,对上清液根据相关操作说明对 ApoB100 进行检测。同时取小鼠肝组织,提取总蛋白后分别进行 PPAR α 、LXR α 、ABCA1 的 ELISA 检测,最后每孔加 50 μ L 终止反应液,终止反应后,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。

1.6 统计学处理

基因表达定量分析每组实验均重复 3 次,所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 软件处理,两个样本均数间的比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

表 1. qRT-PCR 检测体内脂代谢相关基因的差异性表达的引物设计

Table 1. Primers for qRT-PCR amplification of genes involved in lipid metabolism

基 因	NCBI 编号	cDNA(bp)	qRT-PCR 引物	引物长度 (bp)	Tm	位置(bp)	扩增片段 长度 (bp)
ApoB100	NM_009693	13518	5'-GCTCAACTCAGGTTACCGTGA-3'	21	61.7	557-577	118
			5'-AGAGGGCTGACACTTGTACTG-3'	21	61.1	674-654	
PPARα	NM_011144	1407	5'-AACATCGAGTGTGCAATATGTGG-3'	23	60.4	295-317	59
			5'-GCGTGAAGTCCGTAGTGGT-3'	19	61.6	353-335	
LXRα(Nr1h3)	NM_013839	1338	5'-GTCAACTGGGGTTGCTTTAGG-3'	21	60.8	138-158	98
			5'-GACGAAGCTCTGTCCGCTC-3'	19	62.4	235-217	
ABCA1	NM_013454	6786	5'-AACAACCCCTGCTTCCGTTAT-3'	21	61.7	232-252	82
			5'-GGCGAGACACGATGGACTTG-3'	20	62.9	313-294	
GAPDH	NM_008084	1254	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'	21	60.9	152-132	95
			5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'	19	62.6	102-84	

2 结 果

2.1 LDLR^{-/-}小鼠基因型鉴定

小鼠基因组提取后,用多重 PCR 方法对其基因型进行鉴定。我们检测出 3 种不同类型的小鼠(图 1)。野生型小鼠由于 LDLR 基因的 4 号外显子没有被破坏,扩增出正常的 167 bp 片段(引物 Pw 和 Pc);在 LDLR^{-/-}纯合小鼠中,4 号外显子部份序列被剔除,并插入打靶载体的部份序列,包括 neo 基因,所以可扩增出 350 bp 片段(引物 Pm 和 Pc);在基因型为杂合的 LDLR^{+/-}小鼠中,由于两条染色体分别是野生型的和基因敲除的,所以可同时扩增出 167 bp 和 350 bp 的片段。鉴定出的 LDLR 基因缺失纯合小鼠用于下一步实验。

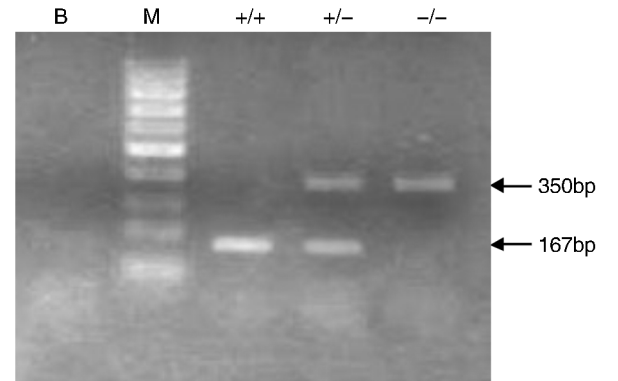


图 1. 小鼠基因型 PCR 鉴定结果 野生型小鼠 LDLR^{+/+} 为 167 bp;基因敲除小鼠 LDLR^{-/-} 为 350 bp;杂合型 LDLR^{+/-} 为 167 bp 和 350 bp;B 为空白对照组;M 为 Mark。

Figure 1. Result of PCR for detecting genotype

2.2 脂代谢相关基因转录水平上的差异

实时定量 RT-PCR 的方法检测了野生型小鼠、LDLR^{-/-}小鼠中与脂代谢通路相关因子 mRNA 的相对丰度值,与野生型小鼠相比 LDLR^{-/-}小鼠的 ApoB100、PPARα 的 mRNA 水平有不同程度的上调,PPARα 上调幅度更大;ABCA1 的 mRNA 丰度则相对下降,而 LXRα mRNA 的表达量稍有增加但并不明显(图 2)。结果显示 ApoB100 mRNA 两组间的比值有显著差异($P < 0.05$);PPARα 和 ABCA1 的差异更为明显($P < 0.01$),而 LXRα 则在正常小鼠和基因敲除小鼠中没有统计学上的差异。

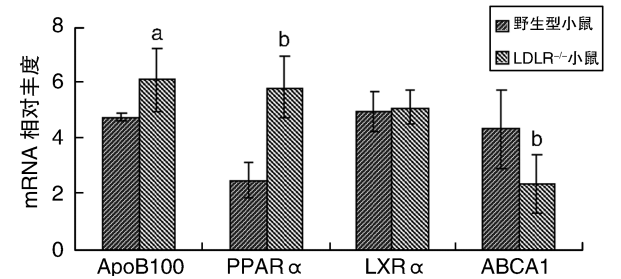


图 2. 野生型小鼠以及 LDLR^{-/-}小鼠中脂肪代谢相关基因 mRNA 丰度的差异 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与野生型小鼠比较($n = 3$)。

Figure 2. Different mRNA abundances of lipid metabolism related genes in wild type and LDLR^{-/-} mouse

2.3 蛋白表达水平分析

通过 ELISA 的方法,进一步对 LDLR^{-/-}小鼠的脂代谢相关基因蛋白表达水平进行检测。结果表明 ApoB100、PPARα 的表达水平均比野生型小鼠

高,具有显著差异($P < 0.05$),但 PPAR α 蛋白的增加幅度并不像转录水平的那样大。LXR α 的表达与野生型的相比相对较为一致,仍然没有显著变化;而 ABCA1 的表达水平则明显下降,高达 3 倍多(P

< 0.01 ;表 2)。这些结果进一步说明不同的脂代谢相关基因的蛋白表达,不同程度地受 LDLR 基因功能缺失的影响。

表 2. 脂肪代谢相关基因在野生型小鼠以及 LDLR^{-/-}小鼠中蛋白的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2. The Expression of lipid metabolism related genes in wild type and LDLR^{-/-} mouse ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分 组	ApoB100 (mg/L)	PPAR α (μ g/L)	LXR α (μ g/L)	ABCA1 (μ g/L)
野生型小鼠	2. 261 \pm 0. 114	0. 081 \pm 0. 003	0. 210 \pm 0. 023	0. 974 \pm 0. 019
LDLR ^{-/-} 小鼠	4. 611 \pm 1. 261 ^a	0. 146 \pm 0. 254 ^a	0. 191 \pm 1. 004	0. 310 \pm 0. 042 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与野生型小鼠比较。

3 讨 论

尽管 FH 遗传基础相对清楚,但是从 LDLR 基因缺陷到患儿表现出相应的临床症状如胆固醇升高、动脉粥样硬化等的过程却是多基因参与、经过多步骤形成的,比较复杂。ApoB100 合成之后在微粒体甘油三酯转移蛋白的作用下与低密度脂蛋白(LDL)结合,也是 LDL 主要的载脂蛋白。LDLR 特异识别并结合 ApoB100,并在 LDLR 的介导下,LDL 进入细胞,在溶酶体内降解。本研究发现在 LDLR 基因缺失时,ApoB100 的表达上调,这可能有两个原因,一是由于 LDLR 的功能缺陷,LDL 及其载脂蛋白 ApoB100 在细胞间积累而无法进入胞降解,使 ApoB100 的量不断上升;另外,与大多数其它类肝细胞合成的分泌型的蛋白不太一样,ApoB100 是组成型表达,量也比较恒定,对 ApoB100 分泌水平的调控主要是在转录时或转录后进行的^[9],而且本研究的结果显示 ApoB100 表达量的增加相对于 mRNA 的上调幅度要大,所以还有一种可能是 LDLR 基因缺失后所引起的代谢紊乱效应,影响 ApoB100 蛋白转录时或转录后的调控。根据 LDLR^{-/-}小鼠中 ApoB100 增加的现象,我们可将 ApoB100 作为检测血脂的一个指标,应用于 FH 及动脉粥样硬化等脂代谢异常和心血管疾病的临床诊断^[10,11]。

核内受体超家族是一类由配体激活的转录因子,参与发育、生殖、炎症反应以及体内代谢等各生物学过程。其成员 PPAR α 和 LXR α 在脂肪代谢、动脉硬化过程中起着关键的调节作用^[12]。PPAR α 主要分布在肝、肾以及其它的脂肪组织中,是临床上常用的贝特类药物的靶点。PPAR α 与各种脂肪酸等配体结合后,通过作用于下游的脂肪酸转运蛋白(FATP)等相关的靶基因促进过氧化物酶体及线粒

体中脂肪酸的氧化、脂质的分解代谢。我们发现在 LDLR^{-/-}小鼠中 PPAR α 的表达水平反而稍微有点上调,这可能由于 LDL 的反馈调控有关,即 LDL 的积累,促进 PPAR α 的表达,以达到加快氧化降解脂蛋白的作用。研究发现一些药物如厄贝沙坦等可活化 PPAR α 以及激活其下游的靶基因表达,进而起到降脂作用^[13]。据此,我们可以尝试通过体内过表达 PPAR α 基因的方式进行 FH 及动脉粥样硬化等相关疾病的治疗研究。

膜整合蛋白 ABCA1 在脂代谢中主要参与胆固醇的逆向转运过程中起着重要的作用,首先在 ABCA1 的介导下磷脂及胆固醇流出细胞外,与 ApoA I 结合形成前 β -HDL,其在卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)的作用下,转变成富含胆固醇酯的球状的成熟 HDL。成熟的 HDL 被运回肝脏内,合成胆汁酸并排出体外。通过胆固醇的逆向转运系统,清除外周组织中大量过剩的脂质,降低脂质在单核细胞/巨噬细胞和血管平滑肌细胞内的蓄积,阻止泡沫细胞的形成,进而避免发生动脉粥样硬化病变。对于 ABCA1 在动脉粥样硬化病人及 LDLR 基因功能缺陷的病人中表达水平的研究不少,但结果却不尽相同^[14-17]。Soumian 等对 16 个动脉硬化病人的 ABCA1 mRNA 进行表达检测,发现 ABCA1 mRNA 的水平显著提高^[14]。同样 Albrecht 等^[15]对硬化斑块组织进行 ABCA1 基因 qRT-PCR 分析,结果也显示 ABCA1 mRNA 比正常情况的水平要高,然而 ABCA1 基因蛋白水平上的表达却明显下降。同样是在 mRNA 水平上,另一个研究组也得到相反的结果即 ABCA1 mRNA 在家族性高胆固醇血症病人中的表达下调^[17]。在本研究中,我们检测到 LDLR^{-/-}小鼠的 ABCA1 mRNA 的水平降低,蛋白水平下降更为显著。ABCA1 基因的表达受核内多种因子如 PPAR α 、

LXR α 的调控以及固醇调节元件结合蛋白 (SREBPs) 信号的调控, 这些不同的研究结果, 可能正好反应出 ABCA1 基因表达调控的多样性以及脂肪代谢调节机制特别是胆固醇逆向转运过程中调节机制的复杂性。

[参考文献]

- [1] Fahed AC, Nemer GM. Familial hypercholesterolemia: the lipids or the genes? [J]. Nutr Metab, 2011, 22, 8 (1): 23.
- [2] 李萍, 吴延庆, 程晓曙, 等. 家族性高胆固醇血症青少年早发冠心病 3 例 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19 (11): 949-951.
- [3] 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, 2011, 89 (6): 555-567.
- [4] 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.
- [5] Forrest LM, Boudyguina E, Wilson MD, et al. Echium oil reduces atherosclerosis in ApoB100-only LDLrKO mice [J]. Atherosclerosis, 2012, 220(1): 118-121.
- [6] Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery [J]. J Clin Invest, 1993, 92 (2): 883-893.
- [7] Jawień J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis [J]. J Physiol Pharmacol, 2004, 55 (3): 503-517.
- [8] 杨永宗. 动脉粥样硬化实验研究模型百年回溯 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16 (12): 925-927.
- [9] Twisk J, Gillian-Daniel DL, Tebon A, et al. The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion [J]. J Clin Invest, 2000, 105(4): 521-532.
- [10] Kostapanos MS, Christogiannis LG, Bika E, et al. Apolipoprotein B-to-A1 ratio as a predictor of acute ischemic nonembolic stroke in elderly subjects [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2010, 19 (6): 497-502.
- [11] Savas Erdevi S, Simsek E, Dallar Y, et al. Utility of ApoB/ApoA1 ratio for the prediction of cardiovascular risk in children with metabolic syndrome [J]. Indian J Pediatr, 2010, 77 (11): 1 261-265.
- [12] 廖端芳, 唐朝克. 胆固醇逆向转运基础与临床 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 288-295.
- [13] Rong X, Li Y, Ebihara K, et al. Irbesartan treatment up-regulates hepatic expression of PPARalpha and its target genes in obese Koletsky (fa(k)/fa(k)) rats: a link to amelioration of hypertriglyceridaemia [J]. Br J Pharmacol, 2010, 160(7): 1 796-807.
- [14] Soumian S, Gibbs R, Davies A, et al. mRNA expression of genes involved in lipid efflux and matrix degradation in occlusive and ectatic atherosclerotic disease [J]. J Clin Pathol, 2005, 58(12): 1 255-260.
- [15] Albrecht C, Soumian S, Amey JS, et al. ABCA1 expression in carotid atherosclerotic plaques [J]. Stroke, 2004, 35(12): 2 801-806.
- [16] Zhou X, He W, Huang Z, et al. Genetic deletion of low density lipoprotein receptor impairs sterol-induced mouse macrophage ABCA1 expression. A new SREBP1-dependent mechanism [J]. J Biol Chem, 2008, 283 (4): 2 129-138.
- [17] Mosig S, Rennert K, Büttner P, et al. Monocytes of patients with familial hypercholesterolemia show alterations in cholesterol metabolism [J]. BMC Med Genomics, 2008, 1: 60.

(此文编辑 李玲玲)