

氚示踪法评估 RNAi 介导 Mfn2 基因沉默 对小鼠体内物质代谢的影响

陈小琳¹, 徐焱成², 雷幼蓉¹

(1. 武汉大学人民医院 内分泌科, 湖北 武汉 430060;

2. 武汉大学中南医院 内分泌科, 湖北 武汉 430070)

摘要: 采用同位素示踪技术研究 RNAi 介导线粒体融合素基因-2(Mfn2)沉默小鼠体内物质代谢变化。构建了含 Mfn2 短发卡 RNA(short hair RNA, shRNA)干扰质粒和阴性对照质粒。24 只 BALB/c 小鼠分为转染组和阴性对照组,每组各 12 只,转染组经尾静脉注射 Mfn2 干扰质粒,对照组注入阴性对照质粒。质粒注入 5 d 后,将氚水(³H₂O)或氚标记葡萄糖(3-³H-Glucose)经腹腔或尾静脉注射到小鼠体内,留取血标本和组织标本,用液体闪烁计数器测定标本放射性浓度,计算小鼠组织脂肪酸合成率和肝脏葡萄糖生成率,两组间均数比较采用 *t* 检验。结果显示,Mfn2 基因转染组小鼠肝脏葡萄糖生成率为 49.43 ± 16.31 ,明显高于阴性对照组的 24.91 ± 4.07 ($P < 0.05$),肝脏、肌肉、心脏、脂肪组织的脂肪酸合成率分别为 0.10 ± 0.00 、 9.12 ± 1.90 、 1.18 ± 0.28 、 11.11 ± 1.31 ,显著低于阴性对照组 0.79 ± 0.07 、 70.52 ± 13.95 、 53.88 ± 9.90 、 45.43 ± 5.91 。以上结果表明,Mfn2 基因在体内葡萄糖和脂肪酸代谢中起重要作用。

关键词: 氚示踪;线粒体融合素基因-2(Mfn2);基因沉默;物质代谢

中图分类号: R817.1; Q591 文献标志码: A 文章编号: 1000-7512(2009)04-0213-05

Evaluation of Substance Metabolism in Mfn2 Gene Silencing Mice Mediated by RNA Interference With ³H Tracing

CHEN Xiao-lin¹, XU Yan-cheng², LEI You-rong¹

(1. Department of Endocrinology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China;

2. Department of Endocrinology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to investigate the function of Mfn2, isotopic tracer technique was used to measure the changes of fatty acid synthesis and hepatic glucose production in Mfn2 gene silencing mice mediated by RNA interference. Mfn2 shRNA and negative control plasmid were constructed by using shRNA target finder program. Twenty-four mice were randomly divided into transfection and control group. In transfection group, mice were injected with Mfn2 shRNA plasmid by vena caudalis; and in control group, mice were injected with nega-

tive control plasmid by vena caudalis. 5 days after injection, all mice were administered ^3H -labeled glucose or $^3\text{H}_2\text{O}$ by vena caudalis or intraperitoneal injection. Then blood and tissue samples were taken at specific times. Radioactivity was measured in all samples with liquid scintillation counter. The rates of hepatic glucose production and fatty acid synthesis in vivo were calculated. The rate of hepatic glucose production was significantly elevated in Mfn2 gene silencing mice (49.43 ± 16.31), compared with negative control mice (24.91 ± 4.07), $P < 0.05$. The rates of fatty acid synthesis in liver, muscle, heart, and adipose tissue (0.10 ± 0.00 , 9.12 ± 1.90 , 1.18 ± 0.28 and 11.11 ± 1.31 , respectively) in transfection group, were significantly lower than that in control group (0.79 ± 0.07 , 70.52 ± 13.95 , 53.88 ± 9.90 and 45.43 ± 5.91). ^3H tracer study confirms that Mfn2 gene plays an important role in maintaining glucose and lipid homeostasis in vivo.

Key words: ^3H tracing; Mitofusin-2 gene; gene silencing; substance metabolism

线粒体融合素基因-2 (Mitofusin-2, Mfn2) 参加线粒体膜融合过程,在线粒体形态和功能维持中起重要作用^[1]。最近的研究发现^[2],其在组织中的表达状况与代谢性疾病如肥胖以及胰岛素抵抗密切相关。物质代谢在机体内是处于不断更新的动态平衡中,其在机体内相互转化,是生命活动的重要本质内容。放射性同位素示踪技术作为一个简便、灵敏的定量分析方法已广泛应用^[3-4,7]。基因沉默(RNAi)技术是一项高效的特异性基因剔除技术,是研究特定基因功能的有效工具,已广泛用于研究基因功能。流体力学法是一种快速大容量质粒溶液的注射方法,已有研究^[5-6]证实该方法是活体内基因转染的有效方法之一。本研究拟采用氘水($^3\text{H}_2\text{O}$)和氚标记葡萄糖(^3H -Glucose)示踪法,利用流体力学转染法,研究 Mfn2 基因沉默小鼠体内物质的代谢变化,进一步明确 Mfn2 与物质代谢之间的关系。

1 实验材料

1.1 仪器和试剂

2000CA 液体闪烁仪;美国 Parkard 公司产品; ^3H -Glucose(8.5 kBq)和 $^3\text{H}_2\text{O}$ (5.55 MBq);购于 Perkin Elmer 公司(Boston, MA 02118 USA);Omega 质粒大量提取试剂盒;Omega Biotek Inc USA;载体 pGenesil-1.2 和感受态大肠杆菌 DH-5a;购自武汉市晶赛生物工程技术有限公司。

1.2 实验动物

24 只 SPF 级 6~8 周龄 BALB/c 雄性小鼠,体重 16~19 g,清洁级,由中国科学院实验动物中心提供。

2 实验方法

2.1 Mfn2 短发卡 RNA(short hair RNA, shRNA)干扰质粒和阴性对照质粒的构建和鉴定

从基因文库中选定目的基因 Mfn2 基因序列(NM_014874),按照 shRNA 的设计原则^[5],挑选出 2 条目标基因序列(Mfn2-1、Mfn2-2)并设计 1 条非特异性目标基因序列做为阴性对照。Mfn2-1 是位于 402-421 bp 5'-CCCCACTTA-AGCACTTTGT-3', Mfn2-2 位于 645-664 bp 5'-GGAAGAGCACCGTGATCAA-3', 阴性对照序列为 5'-GACTTCATAAGGCGCATGC-3'。设计并合成编码 shRNA 序列的 DNA 单链,经退火后与线性化质粒载体 pGenesil-1.2 连接,用含卡那霉素抗性的 LB 液体培养基平板筛选,小提质粒后行酶切鉴定、测序和有效性鉴定,验证 5'-GGAAGAGCACCGTGATCAA-3' 序列的有效性,大量提取质粒备用,该质粒可表达绿色荧光蛋白(GFP)。

2.2 实验动物处理

小鼠在室温(约 25 °C)下,12 h 开灯照明,自由进食和饮水,适应性饲养 1 周。按照统计学随机数据表随机分为转染组和阴性对照组,各 12 只,每组中取 6 只进行肝脏葡萄糖生成测定,另 6 只进行脂肪酸合成测定。实验前,小鼠禁食 12~14 h 后,固定小鼠。转染组每只在约 5 s 内将 1.5 mL 含 75 μg Mfn2 干扰质粒的 PBS 溶液经尾静脉快速注入;对照组每只注入 1.5 mL 含 75 μg 阴性对照质粒的 PBS 溶液。尾静脉注射 48 h 后,选取 1 只小鼠快速分离肝脏、心脏、肌肉、肾脏组织冰冻切片,荧光显微镜下观察荧光蛋白表达情况。

2.3 肝脏葡萄糖生成的测定

质粒注射 5 d 后,空腹 12~14 h,将 100 μL 含 185 kBq $3\text{-}^3\text{H-Glucose}$ 的 PBS 经尾静脉注入每只小鼠,分别在 5、15 和 30 min 时以罗氏血糖仪采用电化学方法测定鼠尾末端葡萄糖浓度。取 10 μL 全血以 200 μL 20% 三氯乙酸稀释,去蛋白、离心,上清液在 65 $^{\circ}\text{C}$ 过夜蒸发干燥,残渣加入 5 mL 闪烁液,用液体闪烁计数器计数。根据计数,参考文献[5]计算肝脏葡萄糖生成效率,稳定状态方程为 $R_t = M \times M_0^* / M^* \times dt$ 。其中, R_t 为葡萄糖生成率, M 为标记物质子数, M^* 为任何时间示踪剂质子数, M_0^* 为初始时间示踪剂质子数, dt 为时间段。

2.4 肝脏、肌肉、心肌及脂肪组织脂肪酸合成的测定

小鼠正常进食,上午 9 时每只腹腔注射 150 μL 555 MBq $^3\text{H}_2\text{O}$ 。2 h 后,从鼠尾静脉取血标本 20 μL ,3 000 g 离心 10 min,取 1 μL 血浆,加入 5 mL 闪烁液,测定血浆 $^3\text{H}_2\text{O}$ 比活度。分别取 100 mg 以上组织在 30% KOH 中 70 $^{\circ}\text{C}$ 皂化 15 min,加入 1 mL 95% 乙醇,70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 h,冷却后再加 1 mL 9 mol/L H_2SO_4 酸化,在 3 mL 石油醚中摇动萃取脂质 3 次。在通风处过夜干燥,加 5 mL 闪烁液,在液体闪烁计数器上计数。根据所测计数 (min^{-1}) 计算每克组织每小时脂肪酸合成率。计算公式为 $R_a = (N_b + N_t) / (N_0 \times w \times dt)$ 。其中, R_a 为脂肪酸合成率, N_b 为所测血浆标记物质子数, N_t 为所测组织示踪剂质子数, N_0 为初始时间示踪剂质子数, w 为组织质量, dt 为时间段[6]。

2.5 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 测定 Mfn2 mRNA 的表达

取 30 mg 冻存肝脏组织,以 1 mL Trizol 提取总 RNA,分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度,反转录合成 cDNA,以相应引物进行 PCR 反应。Mfn2 上游引物为 5'-GCTGGGACAGT-GATGGTCT T-3',下游引物为 5'-CAGATA-CAGGCTCTCCCTGG-3',263 bp; β -actin 上游引物为 5'-TCCCTGGAGAAGAGCTA CGA-3',下游引物为 5'-TCGTCATACTCCTGCT-TGCT-3',389 bp。94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,30 个循环。PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。凝胶电泳后的 PCR 产物采用美国 Amer-

sham Biosciences 公司的凝胶成像仪照相后进行光密度定量分析。

2.6 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件处理结果,组间比较采用 t 检验。

3 结果与讨论

3.1 质粒酶切鉴定、基因测序及有效性鉴定

质粒酶切和基因测序与设计完全符合,通过目的基因与干扰序列共转染及流式细胞筛选,验证出针对目的基因 Mfn2 的有效干扰序列为 5'-GGAAGAGCACCGTG ATCAA-3'。

所构建质粒为有效干扰质粒载体[7],可进一步用于以下 RNA 干扰实验。

3.2 小鼠肝脏、心脏、肌肉组织绿色荧光蛋白的表达

组织冰冻切片荧光蛋白显示,小鼠肝脏、心脏、肌肉可见大量绿色荧光蛋白表达。表明通过流体力学法已将带有 GFP 基因的质粒导入上述组织细胞中,并合成了绿色荧光蛋白。

3.3 流体力学转染对肝脏 Mfn2 mRNA 表达的影响

流体力学转染 5 d 后,RT-PCR 结果示于图 1。RT-PCR 结果显示,转染组小鼠肝脏组织 Mfn2 mRNA 表达明显下降 ($P < 0.05$),与对照组比较,下降约 30%。

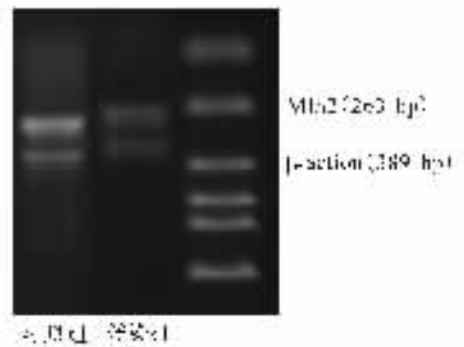


图 1 流体力学转染 Mfn2 干扰质粒对小鼠肝脏 Mfn2 mRNA 表达的影响

3.4 肝脏葡萄糖生成

Mfn2 基因沉默对小鼠血浆葡萄糖浓度及放射性活度的影响列于表 1。由表 1 可知,经鼠尾静脉注入 $3\text{-}^3\text{H-Glucose}$ 后,转染组小鼠血浆葡萄糖浓度在 5、15、30 min 各时间点均比对照

组高($t = -9.54, P < 0.001; t = -6.86, P < 0.001; t = -4.80, P < 0.05$); 转染组小鼠血清放射性活度在 5 min、15 min 明显低于对照组($t = 3.36, P < 0.05; t = 5.74, P < 0.001$), 转染组血清放射性活度在 30 min 时与对照组比较, 差异无显著性($P > 0.05$); Mfn2 基因沉默对小

鼠肝脏葡萄糖生成的影响示于图 2。由图 2 可知, 转染组小鼠葡萄糖生成率(49.43 ± 16.31)明显高于对照组($24.91 \pm 4.07, t = -2.92, P < 0.05$)。该结果表明, Mfn2 基因表达与小鼠体内肝脏葡萄糖代谢直接相关。

表 1 Mfn2 基因沉默对小鼠血浆葡萄糖浓度及放射性活度的影响

| 时间/min | 葡萄糖浓度/(mmol · L ⁻¹) | | <i>t</i> | <i>P</i> | 放射性活度/Bq | | <i>t</i> | <i>P</i> |
|--------|---------------------------------|-------------|----------|----------|--------------|--------------|----------|----------|
| | 对照组 | 转染组 | | | 对照组 | 转染组 | | |
| 5 | 2.50 ± 0.58 | 5.43 ± 0.21 | -9.54 | <0.001 | 71.04 ± 3.63 | 62.22 ± 3.79 | 3.36 | <0.05 |
| 15 | 2.85 ± 0.58 | 5.70 ± 0.59 | -6.86 | <0.001 | 57.26 ± 2.15 | 41.51 ± 5.05 | 5.74 | <0.001 |
| 30 | 3.05 ± 0.26 | 6.07 ± 1.23 | -4.80 | <0.05 | 21.50 ± 3.29 | 19.35 ± 2.54 | 1.03 | >0.05 |

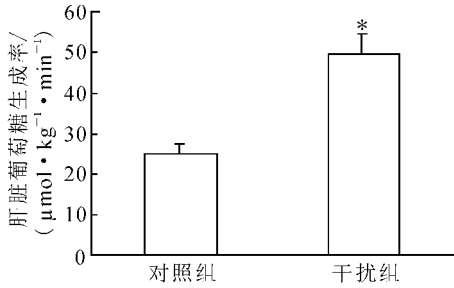


图 2 Mfn2 基因沉默对小鼠肝脏葡萄糖生成的影响($P < 0.05$)

3.5 脂肪酸合成率

小鼠血浆、组织放射活性及脂肪酸合成率列于表 2。由表 2 可知, 经腹腔注入³H₂O 2 h 后, 转染组小鼠各组织脂肪酸合成率较对照组($t = 20.79, P < 0.001; t = 8.73, P < 0.001; t = 10.63, P < 0.001; t = 10.62, P < 0.001$)显著下降。该结果显示, 小鼠 Mfn2 基因沉默后, 肝脏、肌肉、心肌及脂肪组织脂肪酸合成率明显减少, 表明 Mfn2 表达不仅与葡萄糖代谢有关, 而且同时参与了体内脂肪代谢。

表 2 小鼠血浆、组织放射活性及组织脂肪酸合成率

| 组织 | 放射性活度/Bq | | <i>t</i> | <i>P</i> | 脂肪酸合成率/(μmol · g ⁻¹ · h ⁻¹) | | <i>t</i> | <i>P</i> |
|----|-----------------|---------------|----------|----------|--|--------------|----------|----------|
| | 对照组 | 转染组 | | | 对照组 | 转染组 | | |
| 血浆 | 99.11 ± 10.78 | 1.12 ± 0.32 | 18.2 | <0.001 | — | — | | |
| 肝脏 | 12.14 ± 1.48 | 12.67 ± 0.37 | -0.7 | >0.05 | 0.79 ± 0.07 | 0.10 ± 0.00 | 20.79 | <0.001 |
| 肌肉 | 422.75 ± 102.77 | 66.34 ± 14.24 | 6.9 | <0.001 | 70.52 ± 13.95 | 9.12 ± 1.90 | 8.73 | <0.001 |
| 心脏 | 299.58 ± 70.26 | 7.62 ± 1.77 | 8.3 | <0.001 | 53.88 ± 9.90 | 1.18 ± 0.28 | 10.63 | <0.001 |
| 脂肪 | 237.08 ± 47.01 | 81.09 ± 19.68 | 6.1 | <0.001 | 45.43 ± 5.91 | 11.11 ± 1.31 | 10.62 | <0.001 |

4 小结

通过体外构建 Mfn2 shRNA 质粒, 运用流体力学法经鼠尾静脉将表达 GFP 的 shRNA 质粒导入小鼠体内, 组织冰冻切片荧光显微镜下观察发现, 肝脏、心肌、肌肉组织均有荧光蛋白的表达, 证实通过流体力学法可以将构建质粒导入上述组织细胞。RT-PCR 结果显示, 转染组小鼠肝脏组织 Mfn2 mRNA 表达显著减少, 因此证实构建 Mfn2 shRNA 质粒载体是有效干扰基因序

列, 流体力学法是将质粒导入体内的一种有效基因转染方法, 通过此方法可以进行活体内基因沉默研究^[8-9]。

本研究采用尾静脉注射 3-³H-Glucose, 通过稳定状态方程计算发现, 小鼠 Mfn2 基因沉默后, 体内肝脏葡萄糖生成明显增加, 因此 Mfn2 基因表达与小鼠体内肝脏葡萄糖代谢直接相关。在探究 Mfn2 基因沉默与脂肪代谢间的关系时, 采用³H₂O 腹腔注入测定组织脂肪酸代谢率, 结果发现, 与阴性对照组比较, 小鼠 Mfn2 基因沉

默后, 肝脏、肌肉、心肌及脂肪组织脂肪酸合成率明显减少, 而组织脂肪酸合成增加是引起组织脂肪变性、导致胰岛素敏感组织下降的主要原因。该结果表明 Mfn2 表达不仅与葡萄糖代谢有关, 而且同时参与了体内脂肪代谢, 具体机制有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Honda S, Aihara T, Hontani M, et al. Mutation analysis of action of mitochondrial fusion factor mitofusin-2[J]. *Journal of Cell Science*, 2005, 118 (14): 3 153-3 161.
- [2] Soriano FX, Liesa B, et al. Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2 [J]. *Diabetes*, 2006, 55 (6): 1 783-1 791.
- [3] Liping Q, Paul SM, Hanning Y, et al. Knocking down liver ccaat/enhancer-binding protein by adenovirus-transduced silent interfering ribonucleic acid improves hepatic gluconeogenesis and lipid homeostasis in db/db Mice [J]. *Endocrinology*, 2006, 147(6): 3 060-3 069.
- [4] Renaud D, Fadila B, Isabelle H, et al. Liver-specific inhibition of chrebp improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice [J]. *Diabetes*, 2006, 55(8): 2 159-2 170.
- [5] Hetenyj GJ, Norwich KH. Validity of the rates of production and utilization of metabolites as determined by tracer methods in intact animals [J]. *Federation Proceeding*, 1974, 33: 1 841-1 846.
- [6] David S, Roger WB, Marco C, et al. Acute effects in vivo of anti-insulin serum on rates of fatty acid synthesis and activities of acetyl-Coenzyme a carboxylase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats[J]. *Biochem J*, 1976, 160: 413-416.
- [7] 陈小琳, 徐焱成, 蔡小莉, 等. Mfn2 基因 shRNA 质粒的构建及其流体力学转染技术的实验研究[J]. *生物医学工程研究*, 2009, 28(2): 112-115.
- [8] Tuschl T. Expanding small RNA interference [J]. *Nature Biotechnology*, 2002, 20: 446-448.
- [9] Erwei S, Sang KL, Jie W, et al. RNA interference targeting fas protects mice from fulminant hepatitis [J]. *Nature Medicine*, 2003, 9: 347-351.