

猪 *lipasin* 基因的克隆及其对肝细胞 *LPL* 基因转录的影响

李曼曼, 温丙言, 朱河水, 钟 凯, 杨国宇, 王月影*

(河南农业大学农业部动物生化与营养重点开放实验室, 郑州 450002)

摘 要: 旨在克隆猪 *lipasin* 基因, 并检测其对肝细胞 *LPL* 基因转录的影响。本试验利用同源电子克隆技术克隆猪 *lipasin* 基因, 构建其真核表达载体转入肝细胞, 探讨其对 *LPL* 基因转录的影响。结果表明, 成功克隆了猪 *lipasin* 基因, 目的片段大小为 615 bp, 上传至 GenBank(登录号: KF017598), 开放阅读框为 594 bp, 编码 197 个氨基酸, *lipasin* 蛋白的分子量和等电点分别为 21.99 ku 和 6.79; 成功构建了真核表达载体 PB-EGFP-*lipasin*, 实现 *lipasin* 基因在肝细胞中的过表达, 与对照组相比, PB-EGFP-*lipasin* 转染的细胞中 *LPL* 基因的转录水平显著下降。结果显示, 猪 *lipasin* 可能通过抑制肝细胞 *LPL* 的转录影响脂代谢。

关键词: *lipasin*; 猪; 克隆; 肝细胞; *LPL*

中图分类号: S828; S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)02-0411-06

Cloning of Porcine *lipasin* Gene and Its Effect on *LPL* Gene Transcription in Liver Cell

LI Man-man, WEN Bing-yan, ZHU He-shui, ZHONG Kai, YANG Guo-yu, WANG Yue-ying*

(Key Laboratory of Animal Biochemistry and Nutrition of Ministry of Agriculture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The study aimed to clone the *lipasin* gene and investigate its effects on *LPL* gene transcription in liver cell in pig. The porcine *lipasin* gene was obtained by using homologous electronic cloning techniques and the eukaryotic expression vector was constructed and transfected into hepatocytes, and further to identify its effect on the transcription level of *LPL* gene. The results showed that *lipasin* gene was successfully cloned, the segment size was 615 bp, it was deposited to GenBank with the accession number KF017598. The size of open reading frame (ORF) of *lipasin* was 594 bp and it encoded 197 amino acids. The weight of lipasin molecular and theoretical isoelectric point were 21.99 ku and 6.79, respectively. The recombinant eukaryotic expression vector PB-EGFP-*lipasin* was successfully constructed and transfected into hepatocyte, realizing the overexpression of *lipasin* gene. Compared with the control group, the transcription level of *LPL* mRNA decreased significantly in PB-EGFP-*lipasin* transfected hepatocyte. These results suggest that *lipasin* may affect lipid metabolism by inhibiting the *LPL* gene transcription in hepatocyte.

Key words: *lipasin*; porcine; clone; hepatocyte; *LPL*

血管生成素样蛋白 (Angiopoietin-like proteins, ANGPTLs) 家族包括 7 个成员, 分别为 AN-

GPTL1~ANGPTL7, 由 7 种不同的基因编码产生^[1]。ANGPTLs 结构包含氨基端分泌蛋白的信号肽、卷曲螺旋结构域和羧基端纤维蛋白原样结构

收稿日期: 2015-03-18

基金项目: 农业部“948”重点计划(2011-G35); 农业部转基因重大专项(2014ZX0801015B); 河南省重点科技攻关项目(112102310705)

作者简介: 李曼曼(1989-), 女, 河南许昌人, 硕士生, 主要从事动物生物技术方面的研究, E-mail: 1065857330@qq.com

* 通信作者: 王月影, 副教授, 硕士生导师, E-mail: wangyueying2008@126.com

域^[1], ANGPTLs 的氨基端和羧基端结构域有不同的功能, ANGPTL3 的氨基端卷曲螺旋结构域和羧基端纤维蛋白原样结构域分别参与脂代谢调节^[2]和血管再生^[3]。

脂蛋白脂酶(Lipoprotein lipase, LPL)是脂肪细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞、乳腺细胞以及巨噬细胞等合成和分泌的一种糖蛋白,以同源二聚体形式保持 LPL 的活性。LPL 可以将乳糜微粒和极低密度脂蛋白中的甘油三酯分解,为脂肪、肌肉和心等组织提供游离脂肪酸。LPL 还参与极低密度脂蛋白和高密度脂蛋白间的载脂蛋白和磷脂的转换,载脂蛋白 C II 的 C 端第 61~79 位氨基酸具有激活 LPL 的作用。LPL 基因表达变化直接影响 LPL 功能, LPL 基因表达异常能导致脂质代谢紊乱,影响机体正常的生命活动。

研究表明, ANGPTL3 和 ANGPTL4 在脂代谢调节中发挥重要作用^[4-6]。其作用机制为释放 N 端功能区,以可逆或不可逆的方式干扰 LPL 二聚体的形成,进而抑制 LPL 的活性。lipasin 蛋白的结构与血管生成素蛋白家族相似,其结构中包含氨基端卷曲螺旋结构域和羧基端纤维蛋白原样结构域^[7],属于 ANGPTLs 中的一员。将 lipasin 与 7 种 ANGPTL 蛋白的氨基端结构域进行进化分析,发现 lipasin 与 ANGPTL3 亲缘关系最近^[8]。ANGPTL3 能抑制 LPL 酶活性在脂代谢调节中发挥作用,提示 lipasin 可能在脂代谢中发挥重要作用。研究表明, lipasin 能抑制 LPL 的酶活性,从而降低体内甘油三酯的分解,升高血清中甘油三酯的含量^[9-10]。lipasin 是新发现的一个脂代谢调节关键因子^[11],有关猪 lipasin 基因的研究报道较少。本试验根据 GenBank 已公布的人和鼠的 lipasin 序列,应用同源电子克隆技术克隆猪 lipasin 基因,构建其真核表达载体转入肝细胞,探讨其对 LPL 基因转录的影响,为进一步研究猪 lipasin 基因在脂代谢调节中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

猪肝组织来自河南省开封市永康猪场, L-02 肝细胞购自上海博谷生物有限公司。

1.2 试剂与仪器

PB 转座子载体质粒 PB-CMV-Puro-EGFP (SBI 公司);限制性内切酶(*Pst* I、*Nhe* I、*Eco*R I)、T4 DNA 连接酶(NEB 公司);质粒提取试剂盒、LA

Taq 酶、2×SYBR Master Mix、反转录试剂盒和 SYBR Premix Ex TaqTM(TaKaRa 公司);转染试剂 Turbofect(Thermo 公司);DMEM 培养基(Hyclone 公司)、胎牛血清 FBS(Gibco 公司);嘌呤霉素(Sigma 公司);*E. coli* DH5a 感受态细胞(TaKaRa 公司);温度梯度 PCR 分析仪(Biometra 公司)、荧光定量 PCR 仪(Eppendorf 公司)。

1.3 方法

1.3.1 *lipasin* 基因的克隆与鉴定 根据 GenBank 公布的人和鼠的 *lipasin* 序列,应用同源电子克隆技术获得猪 *lipasin* 序列,利用软件 Primer 5.0 设计特异性引物,上游引物:5'-CCATGTCCACGCTCATGCTG-3';下游引物:5'-TTCTGCCCAAGCAGGCTCAG-3',预期目的片段为 615 bp,引物由 TaKaRa 公司合成。提取猪肝组织 RNA,反转录合成 cDNA,用 LA Taq 聚合酶扩增 *lipasin* 基因。反应条件:95 °C 5 min;95 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 40 s,30 个循环;72 °C 10 min;4 °C 保存。1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增目的片段并回收,将目的片段与 pMD19-T 载体连接,重组质粒命名为 pMD19-lipasin,转化 DH5α,进行蓝白斑筛选,挑选白色菌落进行扩大培养,提取质粒用 *Pst* I 进行酶切鉴定(片段为 192、304 和 2 812 bp),将阳性结果送至上海生物工程有限公司进行测序。

1.3.2 PB-EGFP-Lipasin 真核表达载体的构建与鉴定 设计带有酶切位点的引物,上游引物:5'-ACTGTCAGCATGTCCACGCTCATGCTGTG-3',下游引物:5'-ACTGAATTCGGCCGGGAGTGCTGCCATG-3'(下划线分别为 *Nhe* I、*Eco*R I 酶切位点和保护碱基);以测序正确的质粒 pMD19-lipasin 为模板,用 LA Taq 聚合酶扩增带有酶切位点的 *lipasin* 基因。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收目的片段。

将带有酶切位点的 *lipasin* 片段和 PB-EGFP 质粒分别用 *Nhe* I、*Eco*R I 进行双酶切,并用 T4 DNA 连接酶连接,重组载体转化 DH5α,挑选克隆扩大培养,提质粒,命名为 PB-EGFP-lipasin,将 *Nhe*I、*Eco*R I 酶切鉴定(片段大小为 600 和 7 252 bp)正确的质粒送上海生物工程有限公司测序。

1.3.3 细胞转染与筛选 将冻存的 L-02 肝细胞复苏,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养。待细胞生长状态良好,按 1×10⁵ 个·mL⁻¹消化接种于 6 孔板,继续

培养至细胞融合度为 80%~90% 时,将 PB-EGFP-*lipasin* 和 PB-EGFP 质粒分别转染细胞,转染 24 h 后,用含 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 嘌呤霉素的培养基进行筛选,每 24 h 观察细胞的状态,筛选 4 d 后得到稳定表达的细胞株。将稳定表达 *lipasin*(试验组)和转 PB-EGFP 质粒的肝细胞(阴性对照组)以 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种 6 孔板,待细胞融合度为 80%~90% 收集细胞,每组 3 孔,重复 3 次。

1.3.4 *Lipasin* 和 *LPL* 基因转录水平检测 根据 GenBank 公布的猪甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、

LPL 的 mRNA 序列和本实验室提交 GenBank 的猪 *lipasin* 基因序列(登录号:KF017598),利用软件 Primer 5.0 设计引物,引物序列见表 1,由 TaKaRa 公司合成。利用 Trizol 法提取细胞总 RNA,按照 TaKaRa 公司反转录试剂盒的说明书进行 cDNA 合成,采用荧光定量 PCR 法测定细胞中 *GAPDH*、*lipasin* 和 *LPL* 基因的转录水平。反应体系:2.5 μL cDNA,10 μL 2 \times SYBR[®] Premix Ex Taq,上下游引物各 0.2 μL (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),加水补齐至 20 μL 。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s,共 40 个循环。

表 1 PCR 扩增反应的引物

Table 1 The primers used in PCR amplification reactions

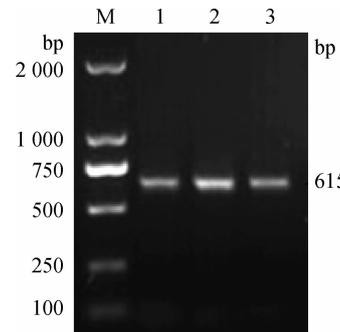
基因 Gene	引物(5'-3') Primer	片段大小/bp Size	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature
<i>GAPDH</i> (NM001256799)	F: TGACTTCAACAGCGACACCCA R: CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA	121	60
<i>lipasin</i> (KF017598)	F: TGACTCTGCTCTTCCATGGG R: AGGCTTACACGTAGCTCCTG	192	60
<i>LPL</i> (NM000237.2)	F: TATGCAGAAGCCCCGAGT R: ATGAAGAGATGAATGGAG	245	60

1.3.5 荧光定量 PCR 数据分析 以 *GAPDH* 基因作为内参基因,通过公式计算细胞中 *lipasin* 和 *LPL* 基因的转录水平: $\text{Ratio} = E_{\text{target}}^{\Delta\text{Ct}_{\text{target}}(\text{control-sample})} / E_{\text{reference}}^{\Delta\text{Ct}_{\text{ref}}(\text{control-sample})}$, 其中,Ratio 为 mRNA 相对转录水平; E_{target} 为目的基因扩增效率; $E_{\text{reference}}$ 为内参基因扩增效率, $\text{Ct}_{\text{control}}$ 为对照组的 Ct 值, $\text{Ct}_{\text{sample}}$ 为样品组的 Ct 值。对 mRNA 相对表达量采用 Prism 6.0 统计软件分析处理,组间采用学生 *t* 检验, * 代表 $P < 0.05$, 差异显著, ** 代表 $P < 0.01$, 差异极显著。

2 结果

2.1 *lipasin* 基因的克隆和鉴定

lipasin 基因扩增结果见图 1, 在约 615 bp 处出现目的条带,与预期片段大小相符;质粒酶切鉴定结果见图 2, 在 192、304 和 2 812 bp 处出现目的条带,与预期片段大小相符;将酶切鉴定正确的质粒测序结果与电子克隆序列进行比对,且上传至 GenBank (登录号:KF017598)。*lipasin* 基因的开放阅读框大小为 594 bp, 编码 197 个氨基酸, *lipasin* 蛋白的分子量和等电点分别为 21.99 ku 和 6.79。



M. DNA 相对分子质量标准;1~3. 猪肝组织 *lipasin* cDNA 扩增结果

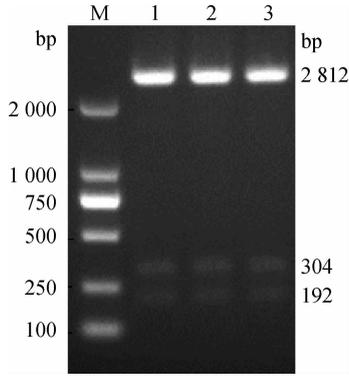
M. DNA marker; 1-3. The amplification result of pig *lipasin* cDNA in liver tissues

图 1 猪 *lipasin* cDNA 扩增结果

Fig. 1 Amplification results of porcine *lipasin* cDNA

2.2 真核表达载体 PB-EGFP-*lipasin* 的鉴定

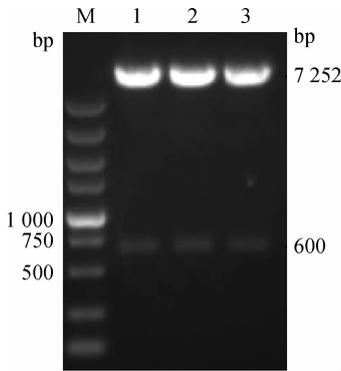
真核表达载体 PB-EGFP-*lipasin* 的鉴定结果见图 3。由图 3 可知, *Nhe* I、*Eco*R I 双酶切后分别得到约 600 bp 的目的片段和 7 252 bp 的载体片段,与预期结果一致,提示真核表达载体 PB-EGFP-*lipasin* 构建成功。



M. DNA 相对分子质量标准;1~3. pMD19-lipasin
M. DNA marker;1-3. pMD19-lipasin

图2 *Pst* I 酶切鉴定

Fig. 2 pMD19-lipasin digested by restriction enzyme *Pst* I



M. DNA 相对分子质量标准;1~3. PB-EGFP-lipasin
M. DNA marker;1-3. PB-EGFP-lipasin

图3 PB-EGFP-lipasin 双酶切(*Nhe* I、*EcoR* I)鉴定

Fig. 3 PB-EGFP-lipasin digested by restriction enzyme *Nhe* I and *EcoR* I

2.3 荧光定量 PCR 检测

荧光定量 PCR 检测结果见图 4。由图 4 可知,样品中 *LPL*、*lipasin*、*GAPDH* 基因的熔解曲线均较集中,有单一的熔解曲线峰,基本上无杂峰出现,

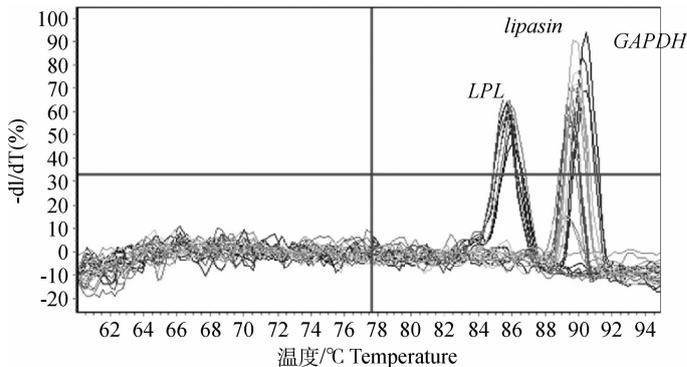


图4 荧光定量 PCR 检测各基因的熔解曲线(左)和扩增曲线(右)

Fig. 4 The melting(left) and amplification(right) curves of genes detected by quantitative fluorescence PCR

说明 *LPL*、*lipasin*、*GAPDH* 基因的扩增产物特异性较好。各基因在每个样品中的 Ct 值均不相同,说明不同样品中各基因的起始模板数不同。

2.4 *lipasin* 基因的转录水平

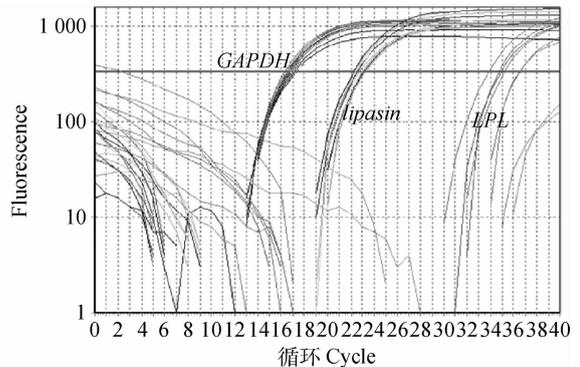
lipasin 基因的转录水平见图 5。由图 5 可知,空载体 PB-EGFP 转染细胞中未检测到 *lipasin* 基因的转录, PB-EGFP-lipasin 转染的细胞中有 *lipasin* 基因的转录;与空载体 PB-EGFP 转染细胞相比, PB-EGFP-lipasin 转染的细胞中 *lipasin* 基因的转录水平显著上升 ($P < 0.01$)。提示 *lipasin* 基因在肝细胞中实现了过表达。

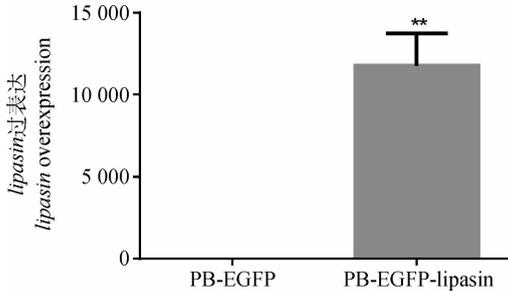
2.5 *lipasin* 对 *LPL* 基因转录水平的影响

lipasin 对 *LPL* 基因转录水平的影响见图 6。由图 6 可知,与空载体 PB-EGFP 转染细胞相比, PB-EGFP-lipasin 转染的细胞中 *LPL* 基因的转录水平显著下降 ($P < 0.05$),即 *lipasin* 过表达后能使 *LPL* 基因转录水平下降。提示 *lipasin* 可能抑制 *LPL* 基因的转录。

3 讨论

Lipasin 是 ANGPTL 家族中的一个新成员,由肝产生后进入血液,调节血浆甘油三酯的水平,其分泌严格受机体营养水平的调控,禁食时肝和脂肪组织中的 *lipasin* mRNA 水平及血浆中的蛋白水平明显降低^[12]。*lipasin* 与 ANGPTL3 亲缘关系最近^[8], ANGPTL3 能够抑制 LPL 的酶活性,进而在脂代谢调节中发挥作用,提示 *lipasin* 可能参与脂代谢的调节。*lipasin* 基因突变与人的低密度脂蛋白和高密度脂蛋白血症密切相关。脂肪生成时诱导 *lipasin* 蛋白高表达,禁食或寒冷条件下 *lipasin* 和 ANGPTL4 的表达变化相反。敲除小鼠 *lipasin* 基





** , $P < 0.01$

图 5 肝细胞中 *lipasin* 基因的转录水平

Fig. 5 The transcription level of *lipasin* gene in hepatocytes

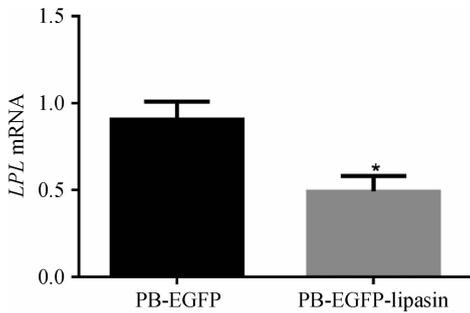


图 6 *Lipasin* 对 *LPL* 基因转录水平的影响

Fig. 6 Effects of *lipasin* on the transcription level of *LPL*

因,血浆甘油三酯含量较低,当 *lipasin* 基因过表达时,甘油三酯水平显著提高^[13]。推测 *lipasin* 在调控血浆甘油三酯水平和外周组织摄取脂肪酸方面发挥重要作用^[14-15]。

肝作为营养物质代谢的中心,也是脂代谢的重要器官。研究表明,人的 *lipasin* 主要存在于肝组织中,小鼠的肝和脂肪组织中 *lipasin* 比较丰富,尤其是棕色脂肪组织^[9]。有关猪 *lipasin* 基因的研究报道较少,本试验利用同源电子克隆技术获得猪 *lipasin* 基因序列,从肝组织中成功克隆 *lipasin* 基因,并且已上传至 GenBank(登录号:KF017598)。*lipasin* 基因开放阅读框大小为 594 bp,编码 197 个氨基酸, *lipasin* 蛋白的分子量和等电点分别为 21.99 ku 和 6.79。

生理和病理状态下 *LPL* 活性与各器官组织的营养需要密切相关。小鼠和人的 *LPL* 功能异常会引起严重的高甘油三酯血症^[16]。研究表明, *lipasin* 能抑制 *LPL* 的酶活性,从而降低体内甘油三酯的分解,升高血清中甘油三酯的含量^[9-10],是新发现的一个脂代谢调节关键因子^[11]。推测 *lipasin* 可能直接抑制了 *LPL* 活性,也可能通过促进 *ANGPTL3* 的

剪切,暴露其 N 端结构域,进而抑制 *LPL* 的活性^[17]。研究发现, *lipasin* 和 *ANGPTL3* 共表达时,能使血浆中甘油三酯的含量提高 10 倍,提示二者可能存在协同作用^[13]。本试验将构建的真核表达载体 PB-EGFP-*lipasin* 转入肝细胞,检测 *lipasin* 过表达后 *LPL* 的转录水平。结果发现, *lipasin* 过表达能显著降低 *LPL* mRNA 水平,提示 *lipasin* 能抑制 *LPL* 的转录,为猪 *lipasin* 可能参与血浆甘油三酯的代谢调控提供了试验依据,真核表达载体 PB-EGFP-*lipasin* 的构建成功为进一步研究猪 *lipasin* 在脂代谢调控中的作用提供了技术支持和保障。

参考文献 (References):

- [1] MATTIJSEN F, KERSTEN S. Regulation of triglyceride metabolism by Angiotensin-like proteins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821(5):782-789.
- [2] ONO M, SHIMIZUGAWA T, SHIMAMURA M, et al. Protein region important for regulation of lipid metabolism in angiotensin-like 3 (ANGPTL3): ANGPTL3 is cleaved and activated *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(43):41804-41809.
- [3] CAMENISCH G, PISABARRO M T, SHERMAN D, et al. ANGPTL3 stimulates endothelial cell adhesion and migration via integrin alpha vbeta 3 and induces blood vessel formation *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(19):17281-17290.
- [4] KOISHI R, ANDO Y, ONO M, et al. Angptl3 regulates lipid metabolism in mice [J]. *Nat Genet*, 2002, 30(2):151-157.
- [5] LEE E C, DESAI U, GOLOLOBOV G, et al. Identification of a new functional domain in angiotensin-like 3 (ANGPTL3) and angiotensin-like 4 (ANGPTL4) involved in binding and inhibition of lipoprotein lipase (LPL) [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(20):13735-13745.
- [6] KOSTER A, CHAO Y B, MOSIOR M, et al. Transgenic angiotensin-like (angptl) 4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(11):4943-4950.
- [7] MIIDA T, HIRAYAMA S. Impacts of angiotensin-like proteins on lipoprotein metabolism and cardiovascular events [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2010, 21(1):70-75.
- [8] FU Z, YAO F, ABOU-SAMRA A B, et al. Lipasin, thermoregulated in brown fat, is a novel but atypical

- member of the angiopoietin-like protein family[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430(3): 1126-1131.
- [9] ZHANG R. Lipasin, a novel nutritionally-regulated liver-enriched factor that regulates serum triglyceride levels[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 424(4): 786-792.
- [10] REN G, KIM J Y, SMAS C M. Identification of RI-FL, a novel adipocyte-enriched insulin target gene with a role in lipid metabolism[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 303(3): E334-351.
- [11] TANG T, LI L, TANG J, et al. A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins[J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(7): 749-755.
- [12] ZHANG R, ABOUSAMRA A B. Emerging roles of Lipasin as a critical lipid regulator[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 432(3): 401-405.
- [13] QUAGLIARINI F, WANG Y, KOZLITINA J, et al. Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, 109(48): 19751-19756.
- [14] PATSCH J R, MIESENBOCK G, HOPFERWIESER T, et al. Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. Studies in the postprandial state[J]. *Arterioscler Thromb*, 1992, 12(11): 1336-1345.
- [15] KERSTEN S. Physiological regulation of lipoprotein lipase[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1841(7): 919-933.
- [16] COLEMAN T, SEIP R L, GIMBLE J M, et al. COOH-terminal disruption of lipoprotein lipase in mice is lethal in homozygotes, but heterozygotes have elevated triglycerides and impaired enzyme activity[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(21): 12518-12525.
- [17] ZHANG R, ABOU-SAMRA A B. A dual role of lipasin (betatrophin) in lipid metabolism and glucose homeostasis consensus and controversy[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2014, 13(1): 133-141.

(编辑 郭云雁)