

文章编号:1007-4287(2023)12-1469-05

APOC3 表达抑制剂筛选模型的构建及意义

刘思辰¹, 郑丽华², 柯超^{1*}

(1. 中山大学肿瘤医院 神经外科, 广东 广州 510060;

2. 东北师范大学 药物基因和蛋白筛选国家工程实验室, 吉林 长春 130117)

摘要:目的 构建 APOC3 表达抑制剂筛选模型, 并从中药单体化合物中筛选 APOC3 表达抑制剂。方法 利用 PCR 方法扩增 APOC3 基因启动子, 利用基因重组技术构建启动子驱动的荧光素酶报告载体; 通过荧光素酶活性检测筛选 APOC3 表达抑制剂; 利用 RT-qPCR 方法检测 APOC3 的 mRNA 表达水平, 利用 Western blot 方法检测 APOC3 的蛋白表达水平; 利用 oxLDL 诱导肝细胞中的脂质沉积, 之后利用油红 O 染色法检测细胞内的脂质沉积情况。结果 APOC3 表达抑制剂筛选模型构建成功, 用该筛选模型筛选中药单体化合物, 发现千层纸素 A 可抑制 APOC3 基因启动子活性, 并进而抑制 APOC3 mRNA 和蛋白的表达水平。进一步的研究显示, 千层纸素 A 可抑制 oxLDL 诱导的肝细胞中的脂质沉积。结论 本研究构建的筛选模型可用于 APOC3 表达抑制剂的筛选, 且筛选到的化合物千层纸素 A 可抑制脂质沉积。

关键词:载脂蛋白 C3; 筛选模型构建; 化合物筛选

中图分类号: R392.1

文献标识码: A

Construction of screening model for inhibitors of APOC3 expression and significance LIU Sichen¹, ZHENG Lihua², KE Chao^{1*}. (1. Department of Neurosurgery, Sun Yat-Sen University Cancer Hospital, Guangzhou 510060, China; 2. National Engineering Laboratory of Drug Gene and Protein Screening, Northeast Normal University, Changchun 130117, China)

* Corresponding author

Abstract: **Objective** To establish a screening model for inhibitors of APOC3 expression, and to screen inhibitors of APOC3 expression from monomeric compounds of traditional Chinese medicine. **Methods** The promoter of APOC3 gene was amplified by PCR, and the promoter-driven luciferase reporter vector was constructed by gene recombination technology. Inhibitors of APOC3 expression were screened by luciferase activity detection. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression level of APOC3, and Western blot was used to detect the protein expression level of APOC3. ox-LDL was used to induce lipid deposition in hepatocytes, and then the intracellular lipid deposition was detected by oil red O staining. **Results** The screening model for inhibitors of APOC3 expression was successfully established. The model was used to screen traditional Chinese medicine monomer compounds, and it was found that Oroxylin A could inhibit the promoter activity of APOC3 gene, and further inhibit the expression levels of APOC3 mRNA and protein. Further studies showed that Oroxylin A inhibited oxLDL-induced lipid deposition in hepatocytes. **Conclusion** The screening model established in this study can be used for screening inhibitors of APOC3 expression, and the screened compound Oroxylin A can inhibit lipid deposition.

Key words: apolipoprotein C3; screening model construction; compound screening

(Chin J Lab Diagn, 2023, 27: 1469)

人载脂蛋白 C3 (Apolipoprotein C3, APOC3) 是富含甘油三酯 (TG) 的脂蛋白 (Triglyceride rich lipoproteins, TRLs) 及高密度脂蛋白的主要成分, 在调节血浆甘油三酯水平中起重要作用, 与血浆 TG 水平呈正相关, 含有 APOC3 的高密度脂蛋白与颈动脉斑块的形成、缺血性脑卒中和脑梗死、痴呆和大脑中 β -淀粉样蛋白沉积等的发生风险密切相关^[1-3]。

研究显示, APOC3 可直接促进单核细胞向血管内皮细胞的黏附, 引起炎症反应, 进而促进脂代谢相关疾病——动脉粥样硬化的发生^[4]。以上研究提示, 下调 APOC3 的表达可能是治疗脂代谢异常疾病的有效途径之一。因此, 本研究钩取了 APOC3 的启动子, 构建了 APOC3 表达抑制剂筛选模型, 并从中药单体化合物中筛选 APOC3 表达抑制剂, 之后鉴定了化合物对 APOC3 表达的抑制作用, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要材料

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (20220204015YY)

* 通信作者

用于筛选的中药小分子化合物购自中国食品药品检定研究院,纯度均在98%以上,用DMSO溶液配成10 mg/mL的母液,储存于-20℃冰箱中备用。进行筛选时,用DMSO稀释成5 μg/mL的工作液进行使用。抗APOC3(ab21032)抗体购自英国Abcam公司,抗GAPDH抗体购自上海康成生物有限公司,HRP标记的羊抗鼠IgG、兔IgG均购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。人氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)购自广州奕源生物技术公司,油红O购自Sigma-Aldrich公司。

人胚肾细胞 HEK 293T、人正常肝细胞 L02 购自 ATCC 细胞库,由本实验室保留和冻存。DNA 提取试剂盒购自常州百代生物科技股份有限公司。

1.2 pAPOC3-luc 质粒的构建

收集培养好的 L02 细胞用 PBS 洗涤后,按厂家提供的说明书提取基因组 DNA,之后以 L02 细胞基因组 DNA 为模板,用特异性引物对 APOC3 启动子(-1 451~+39 bp)片段进行 PCR 扩增,引物序列如下:上游:5'-GGGGTACCGAGGAATTC-CAAGTCTC-3',下游:5'-CCCAAGCTTGGGCAT-TACCTGGAGCAG-3'。回收 PCR 片段,将该片段和 pGL2-Basic 载体分别用 Kpn I 和 Hind III 限制性内切酶酶切,之后分别回收片段和载体,用 T4 DNA 连接酶进行连接。用连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5α,之后涂布于 Amp+LB 营养琼脂平板上,次日挑取单菌落接种到 LB 培养基中培养细菌,之后提取质粒,电泳鉴定后送去测序公司测序。

1.3 细胞培养

人正常肝细胞系 L02 和人胚肾细胞 HEK 293T 培养于含 10% 新生牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 完全培养基中,置于恒温 37℃,5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

1.4 细胞转染

准备 2 支 1.5 mL 离心管,其中 1 管加入 100 μL CaCl₂ 溶液,同时将 2.5 μg 质粒 DNA 加入并混匀。另 1 管加入 100 μL BBS 溶液,将混好质粒的 CaCl₂ 溶液分数次加入 BBS 溶液中,边加边吹打混匀。室温静置 20 min,随后将混合液加入到待转细胞孔中,轻摇培养板混匀。培养 4 h 后,弃去原细胞培养液,加入完全培养基。

1.5 APOC3 表达抑制剂的筛选

取对数生长期的 HEK 293T 细胞,用磷酸钙法转染 pAPOC3-luc 质粒,4 h 后,消化细胞,以 2×10⁴ 个/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板中。转染 24 h

后,弃去培养液,加入终浓度为 5 μg/mL 的中药单体化合物(用完全培养基稀释),对照为等体积的 DMSO 稀释液(用完全培养基稀释),对照组和实验组均设置 3 个复孔。24 h 后进行荧光素酶活性检测,筛选可明显抑制 APOC3 启动子活性的单体化合物。

1.6 荧光素酶活性检测

以 24 孔板培养的细胞为例,将各孔细胞分别收集到 1.5 mL 离心管中,离心,弃上清。每管加入 500 μL 预冷的 PBS 重悬细胞,4℃ 离心,弃上清。每管加入 100 μL 细胞裂解液,-20℃ 静置 20 min,取出后室温溶解,4℃ 离心,上清即为细胞裂解液。在 96 孔荧光素检测白板中加入 5 μL 荧光素酶活性分析缓冲液,并加入 45 μL 细胞裂解液,混匀,随后加入 100 μL 荧光素反应液,立即放入 BMG 荧光化学发光检测仪中,启动程序检测活性。

1.7 千层纸素 A(Oroxylia A,OA)对 APOC3 mRNA 表达的影响

在 6 孔细胞培养板中接种 5×10⁵ 个/孔的 L02 细胞,培养 24 h 后,加入 15 μg/mL 的 OA,对照组用等体积的 DMSO 处理,24 h 后,弃去培养基。用 TRIzol 法提取总 RNA。使用逆转录试剂盒,按照说明书操作将 mRNA 逆转录为 cDNA。使用 LightCycler 480 SYBR Green I Master,按照产品说明书操作。用 PikoReal SW-software version 2.0 (Thermo Fisher Scientific)分析结果。每个样品进行至少 3 次重复实验,以 β-actin 为内参,进行数据归一化处理。PCR 引物如下,APOC3-F:5'-AG-GAGTCCCAGGTGGCCAGCAG-3',APOC3-R:5'-CACGGCTGAAGTTGGTCTGACCTCA-3';β-actin-F:5'-CTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3',β-actin-R:5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'。

1.8 OA 对 APOC3 蛋白表达的影响

在 6 孔板中培养 L02 细胞,实验组加入 15 μg/mL 的 OA,对照组用等体积的 DMSO 稀释液代替,作用细胞 24 h 后,提取蛋白,并按比例加入 4×蛋白上样缓冲液,于 100℃ 孵育 10 min。制备聚丙烯酰胺凝胶(12% 分离胶和 5% 压缩胶),在每个上样孔中加入 10 μL 制备好的蛋白样品,上层胶 80 V 恒压电泳 30 min,下层胶 120 V 恒压电泳 1 h。电泳结束后将聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白转到 PVDF 膜上,恒压 100 V 转印 2 h。取出 PVDF 膜,洗涤后放入封闭液中,摇床上室温振荡封闭 1 h。弃去封闭液,洗涤后将 PVDF 膜放入已预先加入对应抗体的稀释

液中,4℃摇床孵育过夜。次日洗涤后将膜用二抗室温摇床孵育 1 h。最后使用 ECL 显影,凝胶成像仪成像。

1.9 油红 O 染色法检测细胞脂质沉积

将处于对数期生长的 L02 细胞消化成单细胞悬液,以 1×10^5 个/孔的密度接种于 24 孔细胞培养板中的盖玻片上,培养 24 h 后,建模组加入 80 mg/mL oxLDL 溶液,化合物组加入 80 mg/mL oxLDL 溶液的同时加入 15 μ g/mL 的 OA,对照组用等体积的 DMSO 稀释液代替。24 h 后洗涤盖玻片,加 4% 细胞固定液固定细胞 30 min,加入油红 O 染色液(加的体积覆盖住板底即可),室温放置 10 min,用真空泵吸去染色液,用 60% 异丙醇漂洗脱色,除去多余的染料,迅速用真空泵吸去,甘油封片,于显微镜下观察拍照。

1.10 统计学分析

本研究实验结果均重复 3 次以上。对实验数据分析的统计学检验方法为两组比较用双尾 *t*-Test 法,3 组以上比较用 one way ANOVA; $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 pAPOC3-luc 荧光素酶报告质粒的构建

以 L02 细胞的基因组 DNA 为模板,用特异性引物对 APOC3 启动子区域(-1 451~+39 bp)进行 PCR 扩增,并将扩增片段用 1% 琼脂糖凝胶电泳

进行分析。结果如图 1 所示,1 号泳道 1 500 bp 左右的位置可以看到一条清晰的条带,与设计钓取的 APOC3 启动子片段大小基本一致。

随后根据预先设计的引物中加入的酶切位点 Kpn I 和 Hind III 对钓取的片段和目的载体 pGL2-Basic 进行双酶切。随后回收酶切片段进行连接,并转化入 DH5 α 菌株。挑取单克隆菌落,过夜培养扩增转化菌,并提取重组质粒,进行琼脂糖凝胶电泳分析。结果如图 2 所示,与 pGL2-basic 质粒条带位置相比,重组质粒的条带位置明显滞后,疑似已连接入目的片段。之后送上海生工测序,结果显示,重组质粒构建成功。

2.2 pAPOC3-luc 中的启动子活性分析

为了检测所钓取的启动子是否具有活性,在 HEK 293T 细胞中分别转入 pGL2-basic 或 pAPOC3-luc 质粒,48 h 后检测细胞中的荧光素酶活性。结果如图 3 所示,转入 pAPOC3-luc 的细胞其荧光强度明显高于转入 pGL2-basic 的细胞。

2.3 抑制 APOC3 表达的中药单体化合物的筛选

将前面所构建的 pAPOC3-luc 转染入 HEK 293T 细胞中,24 h 后分别加入中药单体化合物继续培养 24 h,收集细胞进行荧光素酶活性检测。结果如图 4 所示,化合物 OA 对 APOC3 基因的启动子活性有明显的抑制效果。

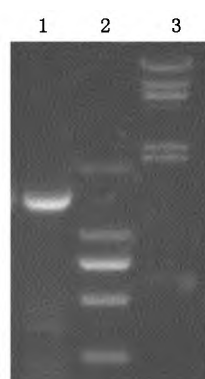


图 1 APOC3 启动子的 PCR 扩增

1. PCR 扩增产物;
2. DNA marker DL2000;
3. DNA marker λ DNA/Hind III

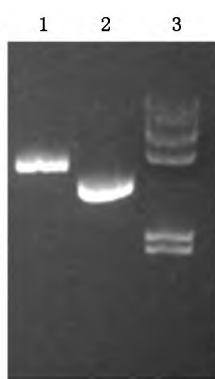


图 2 重组质粒的电泳鉴定

1. pAPOC3-luc 质粒;
2. pGL2-basic 质粒;
3. DNA marker λ DNA/Hind III

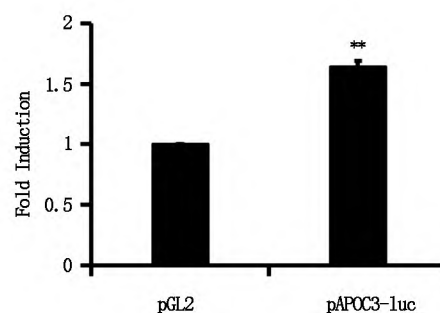


图 3 APOC3 启动子的活性分析

** 表示与对照组相比 $P < 0.01$

2.4 OA 对 APOC3 mRNA 和蛋白表达的影响

在 mRNA 水平和蛋白水平检测了 OA 对 L02 细胞中 APOC3 表达的影响。结果显示,经 15 μ g/mL OA 作用 24 h 后,L02 细胞中 APOC3 的 mRNA(图 5)和蛋白表达水平(图 6)均明显下降。

2.5 OA 对 oxLDL 诱导的肝细胞内脂质沉积的影响

用 80 mg/mL oxLDL 诱导 L02 细胞 24 h,发现 oxLDL 可以增加肝细胞中脂质的累积,而 OA 则对 oxLDL 诱导的脂质沉积有一定的抑制作用(见图 7)。

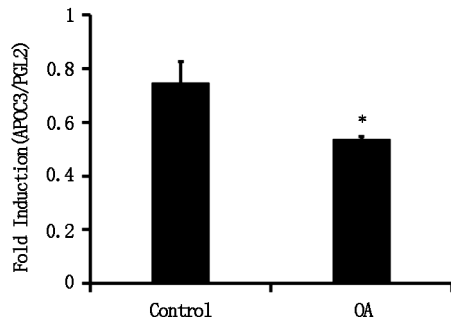


图4 OA对APOC3启动子活性的影响

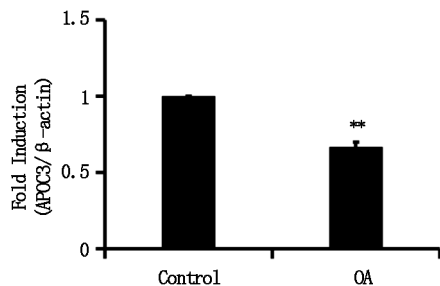
*表示与对照组相比 $P < 0.05$ 

图5 Real-time RT-PCR法检测OA对APOC3 mRNA表达的影响

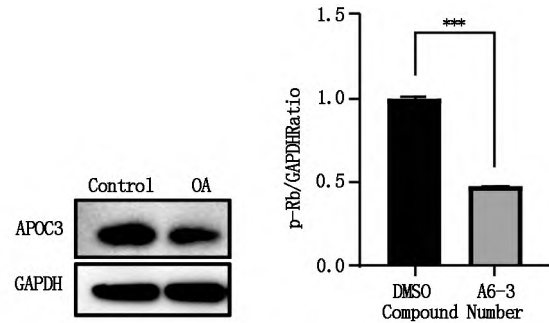
**表示与对照组相比 $P < 0.01$ 

图6 OA对APOC3蛋白表达的影响

***表示与对照组相比 $P < 0.001$

3 讨论

APOC3 作为脂蛋白脂酶 (Lipoprotein lipase, LPL) 抑制剂,可通过抑制脂肪酶、肝脂酶、胆固醇酯卵磷脂酰基转移酶的活性影响脂代谢,在调节脂代谢过程中具有十分重要的作用^[5-6]。APOC3 基因缺失,或 APOC3 基因靶向断裂,或 APOC3 对 LPL 的抑制作用降低,都可导致血浆甘油三酯降低,因为 LPL 是 TRLs 分解代谢的关键酶,所以减少对 LPL 的抑制,就会加强脂解作用,加速 TRLs 分解,对抗 HTG,从而对抗动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, As)^[7-8]。反

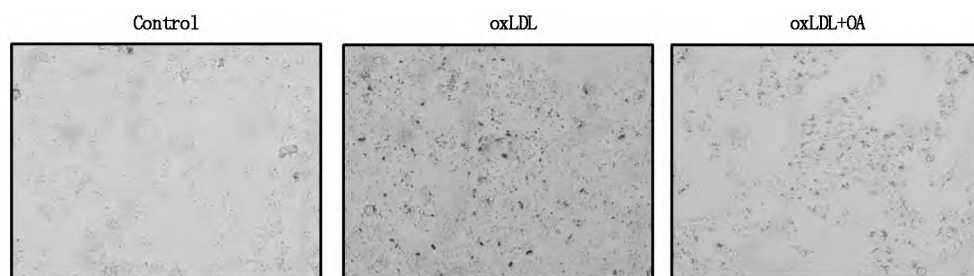


图7 OA对oxLDL诱导的L02细胞脂质累积的影响

之, APOC3 基因在实验鼠体内过表达,则明显促进 As 的形成和发展^[9]。

APOC3 作为载脂蛋白家族中的主要成员,其重要性已日益引起科学界的重视,随着对 APOC3 生物学活性及作用机制的深入研究,发现 APOC3 很可能会成为预防、治疗代谢综合征和动脉粥样硬化相关的心脑血管疾病等的新靶点^[10-11]。

本研究通过基因重组技术,将 APOC3 的启动子片段克隆到荧光素酶报告载体 pGL2-basic 上,构建了由 APOC3 启动子驱动的荧光素酶报告质粒。将此质粒转染入真核细胞,利用 APOC3 的启动子活性驱动下游荧光素酶的表达,通过荧光素酶活性的高低判断 APOC3 启动子的强弱。基于该原理对本实验室的 300 多种中药单体化合物进行筛选,最

后筛选到了 OA,发现它可以有效抑制 APOC3 的启动子活性,并进一步在 mRNA 和蛋白水平上确定其可以抑制 APOC3 的表达。

千层纸素 A 是从中药黄芩中提取的黄酮类化合物,其有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、神经保护、抗凝血、促进新生血管生成等多种生物学活性^[12]。本研究发现,其具有抑制 APOC3 表达的作用,并可抑制细胞中的脂质沉积。

参考文献:

- [1] SACKS F M, FURTADO J D, JENSEN M K. Protein-based HDL subspecies: rationale and association with cardiovascular disease, diabetes, stroke, and dementia[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2022, 1867(9): 159182.
- [2] JIANG Y T, LIU C H, ZHANG Y L, et al. Analysis of fecal microbiota in patients with hypertension complicated with ischemic

- stroke[J]. J Mol Neurosci, 2023. doi: 10. 1007/s12031-023-02149-4. Online ahead of print.
- [3] YU Z, ZHANG L G, ZHANG G, et al. Lipids, apolipoproteins, statins, and intracerebral hemorrhage: a mendelian randomization study[J]. Ann Neurol, 2022, 92(3): 390.
- [4] KAWAKAMI A, AIKAWA M, LIBBY P, et al. Apolipoprotein C III in apolipoprotein B lipoproteins enhances the adhesion of human monocytic cells to endothelial cells[J]. Circulation, 2006, 113(5): 691.
- [5] GANGABADAGE C S, ZDUNEK J, TESSARI M, et al. Structure and dynamics of human apolipoprotein C III[J]. J Biol Chem, 2008, 283(25): 17416.
- [6] KOHAN A B. APOLIPOPROTEIN C-III: a potent modulator of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease[J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2015, 22(2): 119.
- [7] DUIVENVOORDEN I, TEUSINK B, RENSEN P C, et al. Apolipoprotein C3 deficiency results in diet-induced obesity and aggravated insulin resistance in mice[J]. Diabetes, 2005, 54(3): 664.
- [8] XU Y T, GUO J B, ZHANG L, et al. Targeting ApoC3 paradoxically aggravates atherosclerosis in hamsters with severe refractory hypercholesterolemia[J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 840358.
- [9] REAVEN G M, MONDON C E, CHEN Y D, et al. Hypertriglyceridemic mice transgenic for the human apolipoprotein C-III gene are neither insulin resistant nor hyperinsulinemic[J]. J Lipid Res, 1994, 35(5): 820.
- [10] GINSBERG H N, GOLDBERG I J. Broadening the scope of dyslipidemia therapy by targeting APOC3 (apolipoprotein C3) and ANGPTL3 (angiopoietin-like protein 3) [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2023, 43(3): 388.
- [11] KIM K, GINSBERG H N, CHOI S H. New, novel lipid-lowering agents for reducing cardiovascular risk: beyond statins[J]. Diabetes Metab J, 2022, 46(4): 517.
- [12] LU L, GUO Q L, ZHAO L. Overview of oroxylin A: a promising flavonoid compound[J]. Phytother Res, 2016, 30(11): 1765.

(收稿日期: 2023-01-19)

文章编号: 1007-4287(2023)12-1473-03

后纵隔髓外造血 1 例

李治岐¹, 孙宏斌¹, 卢万朋¹, 郑晓芳^{2*}, 辛 华^{1*}

(1. 吉林大学中日联谊医院 胸外科, 吉林 长春 130033;

2. 中国人民解放军联勤保障部队第九六四医院 胸外科, 吉林 长春 130000)

髓外造血 (extramedullary hematopoiesis, EMH) 是指在患有某种疾病或骨髓代偿功能不足的情况下, 肝、脾、淋巴结等非骨髓组织器官恢复了类似于胚胎时期造血功能的现象。髓外造血常见于肝、脾和淋巴结, 发生于后纵隔的髓外造血极为罕见。本文报道 1 例后纵隔髓外造血患者诊疗过程, 并结合相关文献分析其诊断及治疗特点。

1 临床资料

患者, 男性, 60 岁, 因冠心病就诊于吉林大学中日联谊医院。入院常规胸部 CT 检查, 发现后纵隔肿物。在冠心病病情稳定后, 转入胸外科进一步诊断和治疗。病程中患者无胸痛、四肢无力、发热、咳嗽、呼吸急促等不适症状。体格检查未见面色苍白, 皮肤及眼睑颜色无异常。否认既往高血压、糖尿病病史及血液系统病史。血常规: WBC $8.73 \times 10^9/L$; RBC $3.25 \times 10^{12}/L$; Hb 127 g/L; PLT $174 \times 10^9/L$ 。

心电图、心脏彩超正常。胸部 CT 示胸 9、10 椎体左侧可见团块状密度增高影, 界限尚清, 大小约为 $2.7 \text{ cm} \times 1.6 \text{ cm}$, CT 值约 24 Hu (见图 1a)。胸椎 MR 增强示胸 9~10 椎体左侧可见肿物, 大小为 $2.3 \text{ cm} \times 1.4 \text{ cm} \times 2.7 \text{ cm}$, 呈等 T1 或稍高长 T2 信号, 边界清, 邻近骨质未见明显异常 (见图 1b)。检查结果回报无手术禁忌, 行达芬奇机器人辅助胸腔镜下左后纵隔肿物切除术。术中探查发现左后下纵隔近胸 9~10 椎体旁见一囊实性肿物, 包膜完整, 分离过程中发现肿物血供丰富, 手术切除顺利。术后病理回报: (后纵隔肿物) EMH (见图 2)。免疫组化: Mum-1 (散在 +); Bcl-6 (部分 +); Bob-1 (散在 +); Ki67 (+); EMA (散在 +); CD3 (散在 +); CD20 (散在 +); TdT (散在 +); CD15 (部分 +); PAX-5 (散在 +); MPO (+); CD34 (-); CD117 (-); E-Cadherin (-); CD163 (部分 +); EBER (标本组织阴性; 对照组织阳性)。术后随访至今, 影像学检查和血液检查 (血常规等) 未见异常。

* 通信作者