

文章编号 1006-8147(2020)03-0193-06

论 著

KLF9 基因腺病毒载体的构建及其脂肪酸氧化功能

黄金灿, 张磊, 常永生

(天津医科大学基础医学院生理与病理生理学系, 天津 300070)

摘要 目的: 构建 Krüppel 样转录因子 9(KLF9) 过表达的腺病毒, 初步探讨 KLF9 在肝脏脂肪酸氧化中的功能。方法: 根据分子克隆的原理, 构建融合表达 3×Flag 的 KLF9 过表达的腺病毒, 并在 293A 细胞中验证 KLF9 腺病毒感染效率。将融合表达 3×Flag 的 KLF9 过表达的腺病毒分别感染肝原代细胞、正常饮食小鼠以及高脂小鼠, 通过 Q-PCR 检测过氧化物酶体增殖物活化受体- γ 协同刺激因子 PGC1- α 等脂肪酸氧化相关基因的表达情况。结果: Q-PCR 以及 Western blot 结果证明融合表达 3×Flag 的 KLF9 过表达腺病毒载体包装成功, 通过荧光显微镜观察到感染效率达 90% 以上。经 Q-PCR 检测, 感染 Ad-KLF9 的肝原代细胞和肝脏组织中, PGC1- α 等脂肪酸氧化相关基因表达明显高于对照组。结论: 初步认定 KLF9 可促进脂肪酸氧化, 改善高脂诱导的非酒精性脂肪肝。

关键词 KLF9; 脂肪酸氧化; PGC1- α ; 腺病毒; 肝脏

中图分类号 R363

文献标志码 A

KLF9 adenoviral vector construction and its function in fatty acid oxidation

HUANG Jin-can, ZHANG Lei, CHANG Yong-sheng

(Department of Pathology and Physiology, School of Basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To construct Krüppel-like transcription factor 9(KLF9) overexpressed adenovirus and explore the role of KLF9 in liver fatty acid oxidation. **Methods:** KLF9 fusion with 3×Flag overexpressed adenovirus was constructed, according to the principle of molecular cloning, and the infection efficiency of adenovirus was tested in 293A cells. The Ad-KLF9 was infected into primary liver cells, chow and high-fat diet induced mice respectively, and the expression of fatty acid oxidation related genes such as PGC1- α were detected by Q-PCR. **Results:** Q-PCR and Western blot results showed that KLF9 fusion with 3×Flag overexpressed adenovirus was successfully packaged, and more than 90% of the infection efficiency was observed by fluorescence microscopy. The expression of fatty acid oxidation related genes such as PGC1- α in primary liver cells and liver tissues infected with Ad-KLF9 were significantly higher than those in the control group by Q-PCR. **Conclusion:** It is preliminarily determined that KLF9 can promote fatty acid oxidation and improve the non-alcoholic fatty liver disease.

Key words KLF9; fatty acid oxidation; PGC1- α ; adenovirus; liver

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种常见的代谢紊乱疾病,随着饮食结构、生活习惯的改变,患病率正呈现快速增长的趋势。其主要特征为循环中葡萄糖、脂质和炎症因子的增加,脂肪酸氧化异常等,脂肪酸氧化的减少,使得细胞内的脂质积累,严重时会导致肝脏脂肪变性^[1]。

Krüppel 样转录因子 9(KLF9)属于 KLFs 家族中的一员,又称基础转录元件结合蛋白 1(basic transcription element-binding protein-1, BTEB1),是一种锌指蛋白,初期是从大鼠肝脏 cDNA 文库中克隆获得,参与调节真核细胞的基因转录^[2]。其中 KLF9 在肾、肺、肝脏、脑、胸腺、睾丸及脾脏中均有表达,但其表达量在脑组织中相对较高^[3-5]。KLF9 与 C/EBP α

直接相互作用并结合到过氧化物酶体增殖物活化受体 PPAR- γ 的启动子激活元件上促进其转录,从而调节脂肪细胞的发育分化^[6]。在肝癌细胞系 HepG2 细胞中, KLF9 通过激活 PPAR- γ 的表达,促进脂合成,从而导致脂滴的异位储存影响脂肪变性^[7]。有最新研究报道,地塞米松可促进 KLF9 表达,增加肝脏糖异生,最终导致高血糖现象^[8]。但是有关 KLF9 在脂肪酸氧化的研究鲜有文章报道。本研究通过构建及验证 KLF9 基因过表达的腺病毒,进一步在肝原代细胞和小鼠体内过表达 KLF9,初步探究 KLF9 在肝脏脂肪酸氧化方面的功能。

1 材料与方法

1.1 材料 KLF9 扩增序列引物(TSINGKE),扩增序列: 5'-TTGGCGCGCC AAGCCACCATGTCCGCGGCC GCCTACAT-3'(正向); 5'-CGACGCGTCGTCACCTTGTC ATCGTCATCCTTGTAGTCGATGTCATGATCTTTATA ATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCCAAGGGGCTGG

基金项目 国家自然科学基金资助项目(817300024)

作者简介 黄金灿(1994-),女,硕士在读,研究方向:医学生理学;通信作者:常永生, E-mail: changy@ibms.pumc.cn。

CAAGAGCCT-3' (反向); 两端分别添加 *PmeI* 和 *PacI* 酶切位点, C 端加 3×Flag 标签。*PmeI* 和 *PacI* 酶、primer star DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、dNTPs (Takara 公司); T-easy 质粒、实时定量 PCR MIX、Trizol (Invitrogen); 细胞培养基 DMEM 和胎牛血清 (Sigma), Lipofectamine2000。pAdTrack-CMV, pAdTrack-U6, *E.coli*. BJ5183, DH5 α 感受态细菌, HepG2 细胞系, PPAR- γ 协同刺激因子 PGC 1- α 启动子以及人胚肾细胞系 293A 由本实验室保存。pGL3-Basic, pRL-TK 载体购自 Promega 公司, pcDNA3.1 购自 Invitrogen 公司, Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega); 逆转录试剂盒 (ABI 公司); 青霉素、链霉素、胰酶 (Solarbio); 明胶和胶原酶 (Sigma 公司)。anti-KLF9 抗体 (abcam, ab227920), anti-PGC1- α 抗体 (abcam, ab54481), anti-flag 抗体 (Sigma, F7425)。雄性, 6 周龄, 体质量 22~25 g 的 12 只 C57BL/6J 小鼠购自北京斯贝福生物技术有限公司, 小鼠饲养和管理按照天津医科大学动物饲养标准执行。

1.2 KLF9 腺病毒的构建

1.2.1 KLF9 重组质粒的构建及腺病毒包装 将测序正确的连接在 T-easy 质粒上 KLF9 酶切下来, 定向连入穿梭载体 pAdTrack-CMV 后提质粒。取 8 μ g 质粒, 经 *PmeI* 酶切 7 h 充分线性化, 用酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀后溶于 20 μ L 去离子水中。取 100~500 ng 酶切质粒, 转化到 *E.coli*. BJ5183 感受态细菌。以 200 μ L LB 培养基重悬细菌, 涂于卡那霉素抗性的 LB 平板, 置于 37℃ 孵箱内培养 15~20 h。挑克隆, 置于 5 mL 有卡那霉素抗性的 LB 培养基, 37℃ 摇床过夜后提质粒, 通过 *PacI* 酶切可得 3.0 和 4.5 kb 两条带, 即为阳性克隆。将阳性克隆的质粒转化到大肠杆菌 DH5 α , 涂板挑菌培养提取质粒。取 14 μ g 所得的重组质粒用 *PacI* 酶切 7~9 h, 经酚/氯仿抽提, 溶于 20 μ L 去离子水。将重组质粒以转染密度 50%~80% 接种于 10 cm 培养皿的 293A 细胞中, 孵箱中培养 10~15 d, 不用换培养基, 隔天补 500 μ L DMEM 完全培养基。一般转染 5~7 d 后可以通过荧光显微镜观察到 GFP 斑。

1.2.2 KLF9 腺病毒的扩增 将构建好的 KLF9 腺病毒转染进 293A 细胞, 48 h 后将细胞收到 50 mL 离心管中。离心去上清后, 在液氮和 37℃ 反复冻融 4 次, 4℃ 12 000 r/min 离心, 收集上清, 即病毒裂解液。第 2 轮扩增, 加病毒裂解液到 6 个 15 cm 培养皿 (接种 293A 细胞, 汇合度 90%), 细胞全部呈绿色且 30%~50% 细胞悬浮时, 收集细胞, 离心去上清, 在液氮和 37℃ 反复冻融 4 次, 收集病毒裂解液。第 3 轮

扩增, 步骤同第 2 轮扩增。

1.2.3 KLF9 腺病毒的纯化 先在 50 mL 离心管中缓慢加入 1.4 g/mL 氯化铯 8 mL, 再缓慢加入 1.2 g/mL 氯化铯 6 mL, 在不连续梯度顶部加入 20 mL DMEM 5% 病毒保存液。4℃, 100 000 \times g, 离心 90 min。抽吸病毒带至无菌 15 mL 离心管中, 加入 1×TE 把溶液浓度降低到 1.2 g/mL 以下。用连续密度发生器将 12 mL 1.4 g/mL 和 14 mL 1.29 g/mL 氯化铯连续密度梯度加入, 在密度梯度顶部加入 8~10 mL 上述稀释的病毒悬液, 4℃, 100 000 \times g 离心 16~20 h。抽吸蓝色病毒带透析后, 即为纯化的腺病毒, 可用于下一步尾静脉注射老鼠。

1.3 细胞实验

1.3.1 腺病毒感染细胞及 Trizol 法提取 RNA 用经典的灌流-胶原酶消化法获得小鼠肝脏原代细胞, 铺至 6 孔板中, 用 1640 (10% 的血清, 100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素) 培养, 感染病毒前换新鲜的培养基。每个孔加 120 pfu 的病毒。采用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 293A 细胞, 培养基中添加 100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素, 细胞在 37℃、5% CO₂ 的孵箱中培养, 实验时取对数生长期细胞。感染病毒前换新鲜的培养基。每个孔加 120 pfu 的病毒, Trizol 法提取 293A 细胞和肝脏原代细胞总 RNA, 超微量分光光度计定量, 取 2 μ g 总 RNA, 加入 Random primer 用 Thermofisher 逆转录酶逆转录成 cDNA。以 100 ng cDNA 为模板, 在罗氏 LightCycler 96 仪器上进行扩增反应, 条件为: 95℃ 10 min、95℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 30 s (捕捉荧光值), 循环 55 次, 并作熔解曲线。各基因的 Q-PCR 引物序列见表 1。样本结果以目的基因与 36B4 的比值做相对定量分析, 数据分析采用比较 CT 法, 重复样本 ($n=3$) 取平均值。

表 1 实时荧光定量 PCR 的引物序列

Tab 1 The primer sequence of real-time quantitative PCR

基因	引物序列
Mouse KLF9	forward 5'-GCACAAGTCCCCCTACAGT-3' reverse 5'-TGTATGCACTCTCTAATGGGCTTT-3'
Mouse PGC1- α	forward 5'-CCGAGAATTCATGGAGCAAT-3' reverse 5'-TTTCTGTGGCTTTGGTGTGA-3'
Mouse Cpt1a	forward 5'-CTGAGCCATGAAGCCCTCAA-3' reverse 5'-CACACCCACCCACACGATAA-3'
Mouse Cyp4a10	forward 5'-ACAGGAAATTGTGTCGTGCAT-3' reverse 5'-AGCAAACCATACCCATTAGCCT-3'
Mouse Cyp4a14	forward 5'-TTCTGGCCAAACCCAAAGGT-3' reverse 5'-AATTCAAAGCGAGCAGGGT-3'
Mouse Acdam	forward 5'-ACCGAAGAGTTGGCGTATGG-3' reverse 5'-ATCATTTGGCTGCTCCGTCAT-3'
Mouse Ppar- α	forward 5'-TGAGGAAGCCGTCTCTGTGAC-3' reverse 5'-GTTTAGAAGGCCAGGCCGAT-3'
Mouse 36B4	forward 5'-GAGGAATCAGATGAGGATATGGGA-3' reverse 5'-AAGCAGGCTGACTTGGTTGC-3'

1.3.2 双荧光素酶报告试剂盒测定 PGC1- α 基因启动子活性 将 HepG2 细胞接种至 24 孔板,待细胞达到 80%融合时进行转染。用 50 μ L 无血清 DMEM 分别稀释 3.2 μ L 转染试剂 Lipofectamine2000 (1 mg/mL)和 0.8 μ g 质粒(表达质粒:报告质粒:TK 质粒=30:30:1),轻轻混匀后室温静置 5 min,其中质粒(μ g):Lipofectamine 2000(μ L)=1:4 将稀释后的转染试剂逐滴加入 DNA 混悬液中室温静置 15 min。将 DNA 和转染试剂的混悬液逐滴加入 24 孔板细胞中,混匀后放回细胞培养箱继续培养。转染 48 h 后弃去培养基,用 100 μ L 1 \times passive lysis buffer 裂解细胞 20 min,取 10 μ L 转移至 96 孔荧光检测板中。将荧光素酶底物反应液混匀备用。按照 Promega 公司的双荧光素酶报告试剂盒说明,在荧光检测仪 Turner Modulus 上对每孔细胞 Firefly 和 Renilla 荧光素酶活性进行检测。

1.3.3 ChIP 实验 通过经典的灌流-胶原酶消化法获得小鼠肝原代细胞并在室温下用 1%甲醛处理 10 min,然后用 ChIP 细胞裂解缓冲液(10 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 10 mmol/L NaCl, 3 mmol/L MgCl₂, 0.5%NP-40 和蛋白酶抑制剂混合物)和 ChIP 核裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.05 mmol/L EDTA, 1%SDS 和蛋白酶抑制剂混合物)处理细胞。通过超声处理细胞裂解液以剪切染色质,并用对 KLF9 特异的抗体和非特异性 IgG 进行免疫沉淀。使用蛋白 A/G-琼脂糖珠(Invitrogen)分离免疫沉淀物,将其洗涤,并用 0.1%NaHCO₃ 洗脱。在 65 $^{\circ}$ C 孵育过夜并使用蛋白酶 K 解交联后,通过酚氯仿抽提免疫沉淀 DNA 片段和 Input 的 DNA 片段。纯化的 DNA 用于扩增小鼠 PGC1- α 启动子。PGC1- α 的引物设计见表 2。

表 2 ChIP 的引物序列

Tab 2 The primer sequence of ChIP

基因	引物序列
PGC1- α -proximal region	forward 5'-AAGACAGGTGCCTTCAGTTC-3' reverse 5'-CCAGGAATCATTGCATCTGA-3'
PGC1- α -distal region	forward 5'-AAGTGCTGAGAGTTGGTTATGTC-3' reverse 5'-CAAGAATGTCCAGGAATGAAG-3'

1.4 小鼠分组和处理 从北京斯贝福生物科技有限公司购买 C57BL/6J 小鼠 12 只,随机选择 6 只小鼠用脂肪含量 10%普通饲料适应性喂养 7 d,另外 6 只用脂肪含量 60%高脂饲料喂养 90 d,小鼠自由饮食饮水,饲养在温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C、湿度(55 \pm 10)%、12 h 照明/非照明循环房间。将普通饲料喂养的小鼠随机分为 2 组:(1)对照组 3 只:尾静脉注射纯化过的腺病毒空载体(Ad-GFP),注射量为 100 μ L/只;

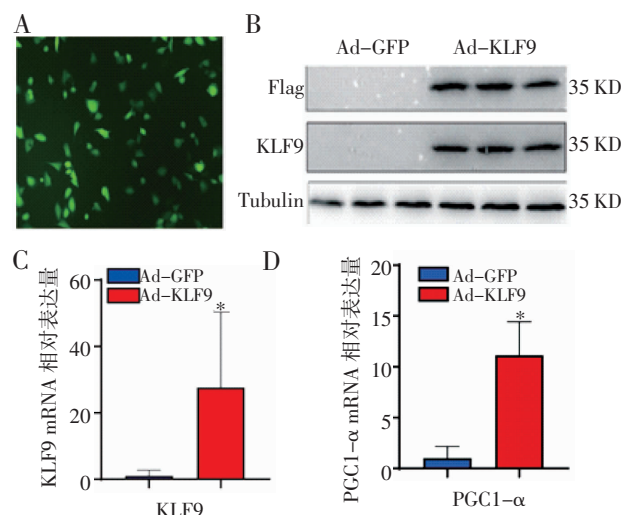
(2)实验组 3 只:尾静脉注射纯化过的 Ad-KLF9,注射量为 100 μ L/只。腺病毒注射 10 d 后处死小鼠,取肝脏组织,提取组织总蛋白和 RNA,检测 KLF9、PGC1- α 、Cpt1a、Cyp4a10、Cyp4a14、Acad、PPAR- α 以及内参基因 36B4。高脂饮食小鼠的处理同上。

1.5 Western blot 蛋白样品以 SDS-PAGE (分离胶浓度为 10%)分离;电泳结束后将凝胶中的蛋白样品电转至 PVDF 膜上,电转 2 h,5%牛奶室温封闭 PVDF 膜 1 h;PVDF 膜置于一抗溶液中,4 $^{\circ}$ C 摇床过夜;TBST 洗 PVDF 膜 3 次,每次 15 min;PVDF 膜与辣根过氧化物酶标记的二抗(用 TBST 配制的 5%牛奶以 1:5 000 稀释)室温作用 1 h;TBST 洗 PVDF 膜 5 次,每次 10 min;将 ECL 化学发光试剂 A 液和 B 液以 1:1 的比例混匀,滴加在 PVDF 膜上,室温反应 3 min 后在化学发光凝胶成像仪中曝光。

1.6 统计学方法 采用 GraphPad Prism8 统计软件进行统计学分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ad-KLF9 在 293A 细胞中过表达 使用融合表达 3 \times Flag 的 KLF9 过表达腺病毒转染 293A 细胞,48 h 后通过荧光显微镜可见明显的绿色荧光,感染效率达 90%以上(图 1A)。收集细胞并提取总细胞蛋白和 RNA,通过 Western 印迹检测后,发现在分子量 35 KD 处有一条特异性的条带,而感染 Ad-GFP 的对照组则没有条带(图 1B)。通过 Q-PCR 检测,发现与感染 Ad-GFP 组相比,感染 Ad-KLF9 组 293A 细胞中 KLF9 的表达量上调约 20 倍(图 1C,1D)。



注:A.通过荧光显微镜观察感染 Ad-KLF9 48 h 的 293A 细胞($\times 20$);B. Western blot 检测 Ad-GFP 和 Ad-KLF9 感染的 293A 细胞中 Flag 和 KLF9 的蛋白水平;C 和 D. Q-PCR 检测感染 Ad-GFP 和 Ad-KLF9 感染的 293A 细胞中 KLF9 和 PGC1- α 表达(* $P < 0.05$)

图 1 KLF9 基因腺病毒载体的包装验证

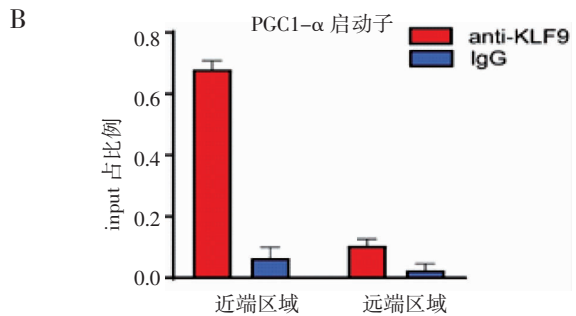
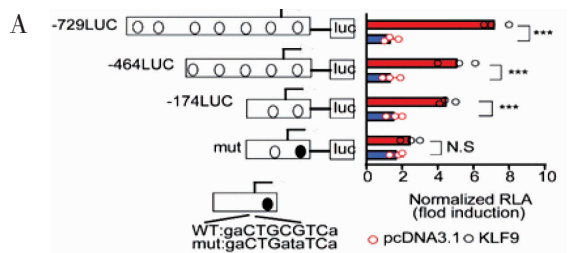
Fig 1 The identification of KLF9 adenoviral vector

2.2 KLF9 直接调控 PGC1- α 的转录 通过荧光素酶报告基因实验发现,PGC1- α 上存在 KLF9 能够结合的顺式作用元件,ChIP-Q-PCR 实验进一步证明 KLF9 能够直接结合到 PGC1- α 的启动子上,促进 PGC1- α 基因的表达(图 2)。

2.3 Ad-KLF9 促进小鼠肝原代细胞中脂肪酸氧化相关基因的表达 用经典的灌流-胶原酶消化法获取成活率为 90% 以上的 C57BL/6J 小鼠肝原代细胞,铺至 6 孔板中,分别感染 Ad-GFP 和 Ad-KLF9,48 h 后提取细胞总蛋白和 RNA。通过 Western blot 检测,发现感染 Ad-KLF9 与感染 Ad-GFP 的肝原代细胞相比,在分子量 100 KD 和 35 KD 处,靶基因 PGC1- α 和 KLF9 蛋白表达增强(图 3A)。经 Q-PCR 检测,发现脂肪酸氧化的基因表达(Cpt1a, Cyp4a10, Cyp4a14, Acdam, PPAR- α)呈上调趋势(图 3B,3C)。

2.4 KLF9 促进小鼠肝脏中脂肪酸氧化相关基因的表达 将纯化过的 Ad-GFP 和 Ad-KLF9 分别通过尾静脉注射到小鼠体内,10 d 后,取肝脏组织,提取组织总蛋白和 RNA。通过 Western blot 检测,与注射 Ad-GFP 相比,注射 Ad-KLF9 的小鼠肝脏中,在分子量分别为 100 KD 与 35 KD 处,PGC1- α 和 KLF9

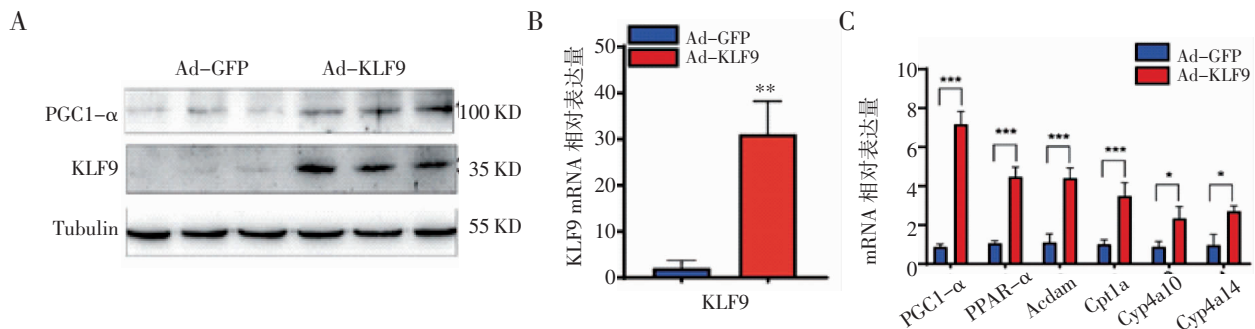
表达增强(图 4A)。经 Q-PCR 检测,KLF9 以及促进脂肪酸氧化相关基因(Cpt1a, Cyp4a10, Cyp4a14, Acdam, PPAR- α)的表达均明显上调(图 4B,4C)。



注:A. 通过一系列启动子截短以及突变的荧光素酶报告基因检测 KLF9 对 PGC1- α 的调控情况;B. ChIP-QPCR 实验检测 KLF9 结合 PGC1- α 启动子的能力(* P <0.05;*** P <0.005)

图 2 KLF9 促进 PGC1- α 的表达

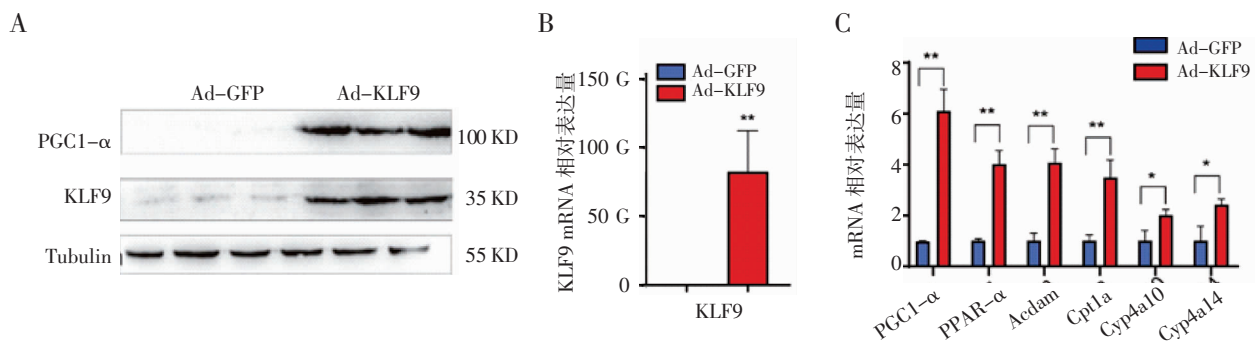
Fig 2 KLF9 promotes expression of PGC1- α



注:A. Western blot 检测感染 Ad-GFP 和 Ad-KLF9 的肝原代细胞中 PGC1- α 和 KLF9 的蛋白水平;B, C. Q-PCR 检测感染 Ad-GFP 和 Ad-KLF9 的肝原代细胞中 KLF9 脂肪酸氧化相关基因的表达水平(* P <0.05,** P <0.01,*** P <0.001)

图 3 KLF9 上调小鼠肝原代细胞脂肪酸氧化相关基因的表达

Fig 3 The expression of fatty acid oxidation genes in mouse primary hepatocytes infected with Ad-GFP and Ad-KLF9

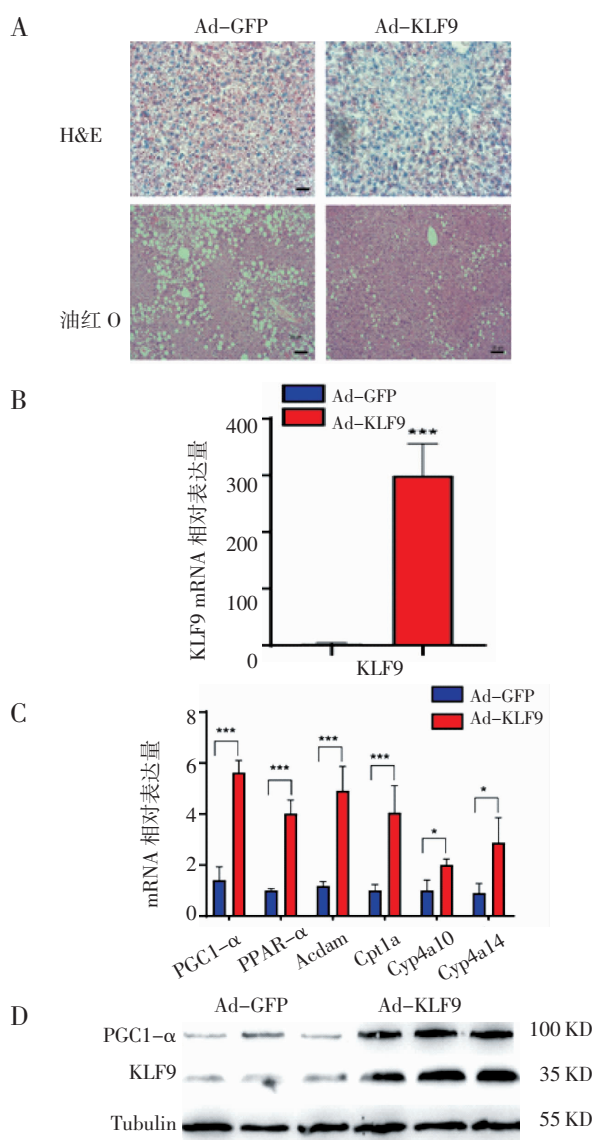


注:A. Western blot 检测注射 Ad-GFP 和 Ad-KLF9 的小鼠肝脏中 PGC1- α 和 KLF9 的蛋白水平;B,C. Q-PCR 检测注射 Ad-GFP 和 Ad-KLF9 的小鼠肝脏中 KLF9 和脂肪酸氧化相关基因的表达情况(* P <0.05,** P <0.01,*** P <0.001)

图 4 KLF9 上调小鼠肝脏组织中脂肪酸氧化相关基因的表达

Fig 4 The expression of fatty acid oxidation genes in mouse liver injected with Ad-GFP and Ad-KLF9 via the tail vein

2.5 KLF9 改善高脂小鼠非酒精性脂肪肝 将纯化的 Ad-GFP 和 Ad-KLF9 分别通过尾静脉注射到高脂小鼠体内,10 d 后,取肝脏组织做 HE 染色和油红 O 染色,同时提取组织总蛋白和 RNA。通过 HE 和油红 O 染色,可以观察到注射 Ad-KLF9 的高脂小鼠肝脏脂滴形态变小,数量明显减少,肝脏中脂肪堆积明显得到改善(图 5A)。通过 Western blot 和 Q-PCR 检测,发现与注射 Ad-GFP 相比,注射 Ad-KLF9 的高脂小鼠肝脏中,脂肪酸氧化相关基因(Cpt1a,Cyp4a10,Cyp4a14,Acad,PPAR- α)表达明显上调(图 5B,5C,5D)。由此说明 KLF9 可以促进脂肪酸氧化相关基因的表达,改善高脂小鼠脂肪肝。



注:A.对注射 Ad-GFP 和 Ad-KLF9 的高脂小鼠肝脏进行 HE 和油红 O 染色;B,C.Q-PCR 检测注射 Ad-GFP 和 Ad-KLF9 的高脂小鼠肝脏中 KLF9 和脂肪酸氧化相关基因的表达情况(* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$);D.Western blot 检测注射 Ad-GFP 和 Ad-KLF9 的小鼠肝脏中 PGC1- α 和 KLF9 的蛋白水平

图 5 KLF9 上调高脂小鼠肝脏组织中脂肪酸氧化相关基因的表达
Fig 5 The expression of fatty acid oxidation genes in liver of high-fat mice increased by KLF9

3 讨论

NAFLD 是世界范围内越来越常见的肝功能障碍疾病,影响着全球 30% 的人群,对人类健康产生巨大的威胁。其是肝脏脂质堆积引发的肝细胞损伤、炎症和纤维化,从而导致更严重的肝脏疾病,如肝硬化以及肝细胞癌等^[9-10]。研究表明肥胖和 2 型糖尿病都与 NAFLD 密切相关^[11]。肝脏作为机体内主要代谢器官,可以调节脂质代谢,包括脂肪酸氧化,脂肪生成以及高、低密度脂蛋白吸收。其中脂肪酸氧化异常和过量转移脂肪脂代谢异常相关疾病的风险因素^[12]。

有研究报道,KLF3 通过促进脂肪酸 β 氧化来调节脂质代谢^[13]。KLF5 可以调控糖尿病小鼠心肌细胞 PPAR- α 的表达进而调控脂质代谢^[14]。KLF11 过表达激活 PPAR- α 信号通路和脂肪酸氧化,进而改善 DIO 小鼠和 db/db 小鼠的脂肪肝表型,减少巨噬细胞浸润^[15]。由此,笔者对 KLF 家族中的另外一位成员 KLF9 与脂肪酸氧化之间的关系产生了兴趣。在调节肝脏脂代谢的众多因子中,转录因子 PGC1- α 和 PPAR- α 尤为重要。PGC1- α 是一种多功能的转录调节因子,可以募集转录因子或转录复合体到达下游靶基因启动子周围并与其相互作用,从而调节下游靶基因的转录。有研究报道,与野生型小鼠相比,PGC1- α 基因敲除小鼠表现出肝脏糖异生功能下降,脂肪酸氧化和线粒体能量代谢下降,并且编码脂肪酸氧化和三羧酸循环相关酶的基因表达都下降^[16]。转录因子 PPAR- α 一旦被配体激活,可以诱导与脂代谢平衡相关基因的表达。PPAR- α 基因缺陷小鼠在禁食状态下肝脏中将会积累大量的甘油三酯,并且会出现低酮体和低血糖症状^[17]。在众多被 PPAR- α 调节的基因中,编码肉毒碱棕榈酰转移酶 1a(Cpt1a)和中链乙酰辅酶 A 脱氢酶(MCAD)基因与线粒体的脂肪酸氧化有关;编码微粒体细胞色素 P450 酶(Cyp4a10 和 Cyp4a14)的基因与催化微粒体中的脂肪酸氧化相关^[15]。

本研究中首先通过双荧光素酶报告基因和 ChIP 实验得出,KLF9 可以结合到 PGC1- α 的启动子上,促进 PGC1- α 基因的表达。然后将过表达 KLF9 的腺病毒感染小鼠肝原代细胞,检测与脂肪酸氧化相关基因的表达,同时在蛋白水平验证 KLF9 和 PGC1- α 的表达情况。为了证实细胞实验的结果可靠性,进一步通过尾静脉注射过表达腺病毒和空载,同样在蛋白水平验证 KLF9 和 PGC1- α 的表达情况,进而检测脂肪酸氧化相关基因的表达情况。结果表明,在小鼠肝原代细胞或者在小鼠体内过表达 KLF9 都会增强 PGC1- α 、PPAR- α 及其下

游靶基因的表达,并且进一步改善肝脏脂肪变,笔者初步证实 KLF9 在脂肪酸氧化中存在调控作用。

参考文献:

- [1] Fucho R, Casals N, Serra D, et al. Ceramides and mitochondrial fatty acid oxidation in obesity[J]. FASEB J, 2017, 31(4):1263
- [2] Kang L, Lai M D. BTEB/KLF9 and its transcriptional regulation[J]. Hereditas, 2007, 29(5):515
- [3] Imataka H, Sogawa K, Yasumoto K, et al. Two regulatory proteins that bind to the basic transcription element (BTE), a GC box sequence in the promoter region of the rat P-4501A1 gene [J]. EMBO J, 1992, 11(10):3663
- [4] Imataka H N K, Hayami M. Cell-specific translational control of transcription factor BTEB expression. The role of an upstream AUG in the 5'-untranslated region[J]. J Biol Chem, 1994, 269(32):20668
- [5] Simmen Rc E R, Oh S P. Subfertility, uterine hypoplasia, and partial progesterone resistance in mice lacking the Kruppel-like factor 9/basic transcription element-binding protein-1 (Bteb1) gene [J]. J Biol Chem, 2004, 279(28):29286
- [6] Pei H Y Y, Wu J R. Kruppel-like factor KLF9 regulates PPARgamma transactivation at the middle stage of adipogenesis[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(2):315
- [7] Escalona-Nandez I G, Perez-Monter C. The activation of peroxisome proliferator activated receptor gamma is regulated by Kruppel-like transcription factors 6&9 under steatotic conditions [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 458(4):751
- [8] Cui A F, Fan H, Zhang Y L, et al. Dexamethasone-induced Kruppel-like factor 9 expression promotes hepatic gluconeogenesis and hyperglycemia[J]. J Clinical Invest, 2019, 129(6):2266
- [9] Diehl A M, Day C. Cause, pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis[J]. N Engl J Med, 2017, 377(21):2063
- [10] Machado M V, Diehl A M. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis [J]. Gastroenterology, 2016, 150(8):1769
- [11] Bettermann K, Hohensee T, Haybaeck J. Steatosis and steatohepatitis: complex disorders[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(6):9924
- [12] Gluchowski N L, Becuwe M, Walther T C. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(6):343
- [13] Zhang J, Hashmi S, Cheema F, et al. Regulation of lipoprotein assembly, secretion and fatty acid beta-oxidation by Kruppel-Like transcription factor, klf-3[J]. J Mol Biol, 2013, 425(15):2641
- [14] Pol C J, Pollak N M, Jurczak M J, et al. Cardiac myocyte KLF5 regulates body weight via alteration of cardiac FGF21[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(9):2125
- [15] Zhang H B, Chen Q, Yang M, et al. Mouse KLF11 regulates hepatic lipid metabolism[J]. J Hepatol, 2013, 58(4):763
- [16] Burgess S C, Leone T C, Wende A R, et al. Diminished hepatic gluconeogenesis via defects in tricarboxylic acid cycle flux in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha)-deficient mice[J]. J Biol Chem, 2006, 281(28):19000
- [17] Wu J, Srinivasan S V, Neumann J C, et al. The KLF2 transcription factor does not affect the formation of preadipocytes but inhibits their differentiation into adipocytes[J]. Biochemistry, 2005, 44(33):11098

(2019-09-24 收稿)

·读者·作者·编者·

《天津医科大学学报》对医学符号的使用说明

统计学符号不论用哪种字母,也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是英文 \bar{x} , 卡方的符号是希腊字母 χ^2 , 自由度的符号是希腊文“ ν ”, 样本的相关系数是英文“ r ”。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号,都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加“-”或“+”表示。例如 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 P^{3-} 等等,不采用 Ca^{++} 、 P^{--} 、 Al^{+3} 、 O^{-2} 表示。核素的核子素(质量数)应写在元素符号的左上角,例如 ^{131}I 、 ^{32}P 。表示激发状态的 m 写在右上角,例如: ^{99m}Tc 、 ^{133m}In 。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称,即不能写成 ^{131}I 碘、 ^{133}In 钢 ^{m} 等。

近几年分子生物学发展很快,并已渗透到许多学科,大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式,要对符号的来源及其内涵有深刻的了解,使用时不致发生错误,例如:RNA 有 rRNA(ribosomal RNA)、tRNA(transfer RNA)、mRNA(messenger RNA)3类。r、t、m 是表示类型的符号应小写,RNA 应大写。

本刊编辑部