

禁食状态下 MED1 肝脏特异性敲除鼠呈现高脂血症

白亮^{1,2}, 付涛², 贾玉枝², Jayme Borensztajn², Janardan K. Reddy², 杨公社¹

1 西北农林科技大学动物科技学院 动物脂肪沉积与肌肉发育实验室, 杨凌 712100

2 Department of Pathology, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago IL 60611, USA

摘要: 为研究 MED1 如何影响血浆脂质代谢, 以 MED1 肝脏特异性敲除鼠 (MED1^{ΔLiv}) 为动物模型, 禁食 0、24、48、72 h, 通过 H&E 染色切片观察了 MED1^{ΔLiv} 鼠肝脏的形态学变化, 运用甘油三酯和胆固醇酶试剂盒及 FPLC 方法分析了 MED1^{ΔLiv} 和对照鼠 (MED1^{fl/fl}) 血浆甘油三酯和胆固醇的水平以及脂蛋白的分布情况。研究结果显示, 禁食 72 h, 与 MED1^{fl/fl} 和 PPARα^{-/-} 对照鼠相比, MED1^{ΔLiv} 鼠肝脏无脂肪沉积。禁食 24、48、72 h, 与 MED1^{fl/fl} 鼠相比, MED1^{ΔLiv} 鼠血浆甘油三酯显著升高。禁食 48 h 和 72 h, 与 MED1^{fl/fl} 鼠相比, MED1^{ΔLiv} 鼠血浆胆固醇显著升高。此外, 饲喂条件下, MED1^{ΔLiv} 和 MED1^{fl/fl} 鼠血浆脂蛋白分布无明显差异。然而, 禁食 24 h, MED1^{ΔLiv} 鼠中富含甘油三酯的极低密度脂蛋白高度积聚, 表明 MED1^{ΔLiv} 鼠呈现的高脂血症是由于极低密度脂蛋白的积聚引起, 提示转录辅激活子 MED1 在富含甘油三酯的脂蛋白代谢中起关键调控作用。

关键词: MED1, 甘油三酯, 胆固醇, 极低密度脂蛋白

Hyperlipidemia in hepatic MED1 deficient mice in response to fasting

Liang Bai^{1,2}, Tao Fu², Yuzhi Jia², Jayme Borensztajn², Janardan K. Reddy², and Gongshe Yang¹

1 Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development, College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

2 Department of Pathology, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago IL 60611, USA

Abstract: MED1 is a key transcription co-activator subunit of the Mediator complex that is essential for RNA polymerase II-dependent transcription. MED1 functions as a co-activator for PPARs and other nuclear receptors and transcription factors, and plays an important role in lipid metabolism. To examine how MED1 might affect plasma lipids, plasma triglyceride, cholesterol levels, and lipoprotein profiles, were measured in MED1^{ΔLiv} mice fasted for 24, 48 and 72 hours. Histological changes in liver sections from MED1^{ΔLiv} mice after 72 hours of fasting were also examined using H&E staining. There was no fat accumulation in livers of MED1^{ΔLiv} mice compared to MED1^{fl/fl} and PPARα^{-/-} control mice after 72 hours of fasting. Compared with MED1^{fl/fl}

Received: March 11, 2011; **Accepted:** April 22, 2011

Supported by: National Institutes of Health Grants (Nos. GM23750, DK083163), Major Projects for Genetically Modified Organisms Breeding (No. 2009ZX08009-157B).

Corresponding author: Gongshe Yang. Tel/Fax: +86-29-87092430; E-mail: gsyang999@hotmail.com

美国国立卫生研究院基金 (Nos. GM23750, DK083163), 转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2009ZX08009-157B) 资助。

mice, plasma triglycerides in MED1^{ΔLiv} mice were significantly increased after 24, 48 and 72 hours of fasting, and plasma cholesterol was significantly increased after 48 and 72 hours of fasting. Lipoprotein profiles were similar in fed MED1^{fl/fl} and MED1^{ΔLiv} mice. However, very low density lipoprotein (VLDL) was significantly increased in MED1^{ΔLiv} mice after 24 hours of fasting. We conclude that, hyperlipidemia in MED1^{ΔLiv} mice in response to fasting is due to the accumulation of VLDL, which suggests that MED1 plays a pivotal role in the regulation of plasma triglyceride and cholesterol levels.

Keywords: MED1, triglyceride, cholesterol, very low density lipoprotein

高脂血症是血浆中胆固醇和/或甘油三酯代谢异常的一类疾病^[1]。近年来,随着人类生活水平的提高,高脂血症在全球的发病率越来越高,进而导致动脉粥样硬化和心血管疾病等代谢综合症的发生,严重威胁人类健康^[2-3]。因而,研究其复杂的病理生物学过程成为当今科研工作的一个热点问题。研究表明,许多核受体或转录因子参与脂质代谢的网路调控^[4-5]。其中,过氧化物酶体增殖子激活受体(PPARs)及其辅激活子 MED1 是调控脂质代谢的关键因子^[5-7]。

调节子亚单位 1 (Mediator subunit 1, MED1), 是利用酵母双杂交技术以 Gal4-PPAR γ 为诱饵从小鼠肝脏 cDNA 文库克隆获得^[8]。研究证实,它可以与许多核受体 (PPAR α 、PPAR γ 和 RXR 等) 以及转录因子 (p53、GATA 和 C/EBP β 等) 结合,从而在细胞增殖、分化和代谢等过程中发挥重要调控作用^[8-12]。MED1 周身敲除后,由于胎盘脉管系统发育不全,小鼠在胚胎期 11.5 d 死亡^[13]。为研究 MED1 的组织特异性功能,本实验室建立了 MED1 肝脏特异性敲除鼠 (MED1^{ΔLiv}) 模型^[14]。研究发现, MED1 在 PPAR α 和 PPAR γ 信号通路中起关键作用^[14-16]。MED1 肝脏缺失可以模拟 PPAR α 敲除,其缺失的肝细胞对 PPAR α 配体诱导的过氧化物增殖无反应,也不能表达 PPAR α 的下游调控基因^[14]。在 PPAR γ 诱导下, MED1^{-/-} 胚胎成纤维细胞 (MEFs) 不能生成脂肪^[16]。而且, MED1 肝脏特异性敲除鼠也不能生成脂肪肝^[15]。目前,有关 MED1 在脂蛋白代谢中的调控作用尚不清楚。

本研究证实,禁食条件下, MED1 肝脏特异性缺失鼠的血浆甘油三酯和胆固醇水平显著增高,且

这种代谢异常是由于血浆极低密度脂蛋白的积聚所致。本研究首次揭示 MED1 基因特异性敲除与禁食后的血浆极低密度脂蛋白含量变化密切相关,为高脂血症的预防和治疗提供了新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

实验动物: 4~5 周龄 MED1 肝脏特异性敲除鼠 (MED1^{ΔLiv})、对照鼠 (MED1^{fl/fl})^[14] 和 PPAR α 周身敲除鼠 (PPAR α ^{-/-})^[17]。本实验使用雌性和雄性小鼠,自由饮水,给予脂肪含量为 11.4% 的标准鼠粮 (Teklad #7904; Harlan-Teklad, 印第安纳波利斯, 印第安纳州) 或禁食 0、24、48、72 h。根据国际实验动物保护协会规定,实验用小鼠被饲养在 12 h 光照和 12 h 黑暗的无菌动物房。所有动物处理程序均符合美国西北大学动物保护协会的要求。为了测定血浆中甘油三酯和胆固醇的含量以及分离脂蛋白,运用肝素化的毛细管采集血样, 200~300 μ L 血样采自小鼠尾部。

1.2 主要试剂

MED1 抗体 (编号: sc-5334) 购自 Santa Cruz 生物技术公司。普通 Taq DNA 聚合酶购于 Invitrogen 公司。测定甘油三酯和胆固醇的酶试剂盒购自 Sigma 公司。Superose 6 FPLC 柱子购自 Akta (GE Healthcare)。

1.3 基因型鉴定

1.3.1 基因组 DNA 的提取

用剪刀剪一小段小鼠尾巴,放入 1.5 mL 管中,加入 0.5 mL 组织裂解液,置于 55 $^{\circ}$ C 水浴锅中过夜消化。第 2 天取出,混匀,13 000 r/min 离心 10 min,

将上清移至另一管中,加入 600 μL 酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1, V/V/V),在摇床上摇动 10 min。13 000 r/min 离心 10 min,小心将含有 DNA 的上清移至另一管中,加入 1 mL 100%乙醇沉淀 DNA,静置 5 min,13 000 r/min 离心 10 min。去掉上清,加入 1 mL 70%乙醇洗涤,13 000 r/min 离心 5 min。小心弃掉上清,放置 10 min,然后加入 100~200 μL 蒸馏水,室温放置 2~3 h 备用。

1.3.2 PCR 鉴定基因型

20 μL PCR 反应体系:灭菌的双蒸水 15.0 μL 、PCR 缓冲液 2.0 μL 、2.5 mmol/L dNTPs 0.4 μL 、25 mmol/L MgCl_2 0.8 μL 、基因组 DNA 0.8 μL 、25 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物 0.4 μL 、25 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物 0.4 μL 、5 U/ μL *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL 。引物序列见表 1。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 基因型鉴定所用 PCR 引物

Table 1 PCR primers used in genotype identification

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Loxp Forward	TCCATCTGACCTGCTGGATGATAA
Loxp Reverse	GGGTGTGACCCCATTAATT
Cre Forward	AGGTGTAGAGAAGGCACTCAGC
Cre Reverse	CTAATCGCCATCTTCCAGCAGG

1.4 免疫组化

石蜡切片在 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烤 15 min 脱蜡,冷却后,置于二甲苯 20 min,100%乙醇 3 min,3.3%过氧化氢 (甲醇配制) 1 h。然后,置于 100%乙醇 3 min,90%乙醇 3 min,80%乙醇 3 min,蒸馏水冲洗 3 次 (3 min/次),PBS 溶液 (0.01%,pH 7.4) 冲洗 3 次 (3 min/次)。之后,切片用 2%马血清 (1% BSA 配制) 封闭 4 h,MED1 抗体 (1:200 稀释) 孵育过夜。第 2 天,用 PBS 冲洗,加二抗孵育 1 h。此时,准备 Vectastain ABC 试剂 (5 mL PBS 中各加入 1 滴 A 液和 B 液)。用 PBS 冲洗,加入 ABC 试剂孵育 1 h。PBS 冲洗,然后,用 DAB 试剂 (2.25 mL 蒸馏水,

0.25 mL DAB 底物缓冲液,2 滴 DAB,1 滴 H_2O_2) 孵育 15~30 s。待显色后,立即将切片放入水中终止反应。最后,80%乙醇 3 min,90%乙醇 3 min,100%乙醇 3 min,二甲苯 5~10 min;封片。

1.5 实时定量 PCR

运用 TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司) 从小鼠肝脏提取总 RNA。用 SuperScriptTM III 第一链 cDNA 合成系统 (Invitrogen 公司) 进行反转录。ABI 7300 (Applied Biosystem 公司) 设备运行 Q-PCR,每个样品设置 3 个重复,18 S rRNA 作为内参。实时定量 PCR 反应体系:2 \times SYBR Green Master Mix 7.5 μL ,上、下游引物 (100 pmol) 各 0.3 μL (特异性引物序列见表 2),cDNA 2.0 μL ,补 ddH₂O 至总体积 15 μL 。特异 PCR 产物由溶解曲线来分析,运用相对 C_t 值方法,即 $X=2^{-\Delta\Delta C_t}$ 来测定相对基因表达变化。

表 2 Q-PCR 特异性引物

Table 2 Specific primers for Q-PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')
MED1Forward	GAGACTCCGCCCCACTTACCTG
MED1Reverse	GGACACACTTCAAACCTGGAGG
18S Forward	AAACGGCTACCACATCCAAG
18S Reverse	CCTCCAATGGATCCTCGTTA

1.6 苏木素-伊红 (H&E) 染色法

取一小块肝脏组织,经 4%多聚甲醛固定 24 h 后,常规石蜡包埋,4 μm 切片。按以下方法脱蜡:二甲苯 (I) 5 min,二甲苯 (II) 5 min,二甲苯 (III) 5 min,100%乙醇 3 min,95 乙醇 3 min,80%乙醇 3 min,蒸馏水冲洗 3 min;苏木素染色 3 min,用流水冲洗 2~3 min;盐酸乙醇分化 10 s;自来水冲洗 3 min;0.2%氨水返蓝 10 s,自来水冲洗 3 min;伊红染色 30 s,之后进行脱水和透明,即 80%乙醇 3 min,95%乙醇 3 min,100%乙醇 (I) 3 min,100%乙醇 (II) 3 min,二甲苯 5 min,封片。

1.7 血浆甘油三酯和胆固醇的测定

为了测定血浆中甘油三酯和胆固醇的含量以及分离脂蛋白,应用肝素化的毛细管采集血样

(200~300 μL), 采集自小鼠尾部。2 000 r/min 离心 10 min, 用剪刀解掉毛细管的下部, 上部血清部分用吹吸管吹进 1.5 mL 管中。然后, 取出 5 μL 至另一管中, 加入 500 μL 生理盐水, 混匀。取 100 μL 至微量培养板中, 用酶试剂盒进行检测。

1.8 快速蛋白液相色谱 (FPLC) 分析

取 7 只小鼠的血清等量混在一起, 取 200 μL , 用 Superose 6 FPLC 柱子分离血浆脂蛋白。柱子用 200 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.4), 50 mmol/L 氯化钠, 0.03% 乙二醇四乙酸和 0.02% 叠氮钠以 0.4 mL/min 的流速洗脱。FPLC 洗脱的甘油三酯和胆固醇含量的测定参见 1.7。

1.9 统计学分析

实验数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS11.5 统计分析软件中的 One-way ANOVA 进行方差分析和显著性检验, 用最小显著差数法 (LSD) 检验不同处理之间的差异。

2 结果

2.1 MED1 肝脏特异性敲除鼠的鉴定

MED1 基因周身敲除致使胚胎死亡^[8]。为研究其组织特异性功能, 本实验室构建了 *MED1* 肝脏特异性敲除鼠模型。将构建好的靶载体导入胚胎干细胞, 筛选靶克隆, 注入 C57BL/6 小鼠胚胎产生嵌合体鼠, 与 C57BL/6 雌性鼠杂交, 产生的杂合子鼠与 EIIaCre 鼠杂交, 获得的 *MED1*^{fl/+} 鼠再与 AlbCre 鼠杂交, 即可产生 8~10 号外显子缺失的 *MED1* ^{ΔLiv} 鼠^[14]。此后, 用 *MED1*^{fl/fl} 鼠与 *MED1* ^{ΔLiv} 鼠杂交, 子代通常一半为 *MED1*^{fl/fl} 鼠, 一半为 *MED1* ^{ΔLiv} 鼠。以子代小鼠尾巴基因组 DNA 为模板, Cre 和 loxP 为引物, 进行 PCR 扩增, 分别得到 401 bp (图 1A) 和 1.8 kb (图 1B) 的片段。1.8 kb 片段代表筛选出的小鼠均带有 2 个 loxP 位点。401 bp 片段代表筛选出的小鼠是 Cre 阳性(+), *MED1* 基因已被敲除, 即 *MED1* ^{ΔLiv} 鼠 (图 1A, 2、4、5、9 和 10)。Cre 阴性(-) 作为对照组, 即 *MED1*^{fl/fl} 鼠 (图 1A, 1、3、6、7 和 8)。

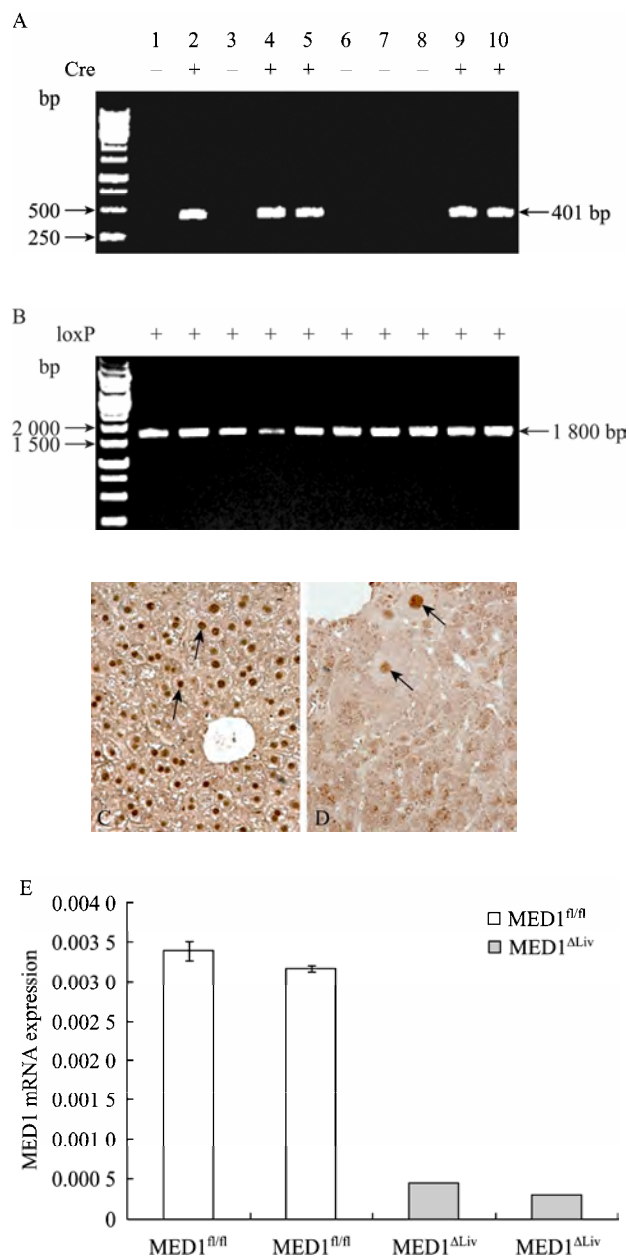


图 1 *MED1*^{fl/fl} 和 *MED1* ^{ΔLiv} 鼠的基因型鉴定

Fig. 1 Identification of *MED1*^{fl/fl} and *MED1* ^{ΔLiv} mice. (A) PCR Genotyping of *MED1*^{fl/fl} and *MED1* ^{ΔLiv} mice using Cre primer. (B) PCR Genotyping of *MED1*^{fl/fl} and *MED1* ^{ΔLiv} mice using loxP primer. (C) Immunohistochemical localization of MED1 in *MED1*^{fl/fl} mice. (D) Immunohistochemical localization of MED1 in *MED1* ^{ΔLiv} mice. Arrows in C point to MED1 positive cells. Arrows in D point to an occasional large MED1 positive residual hepatocytes that escaped Cre-mediated excision of MED1 floxed alleles. (E) Q-PCR analysis to confirm the expression of MED1. Total RNA was extracted from two individual of *MED1*^{fl/fl} or *MED1* ^{ΔLiv} mice. Data from three independent Q-PCR determinations are expressed as $\bar{x} \pm s$.

为了进一步评定 MED1 的敲除效率,进行了 MED1 免疫组织化学分析。在 MED1^{fl/fl} 鼠中, MED1 定位在肝细胞核中 (图 1C 箭头所示)。相反,在 MED1 肝脏特异性敲除鼠中,几乎没有 MED1 阳性染色 (图 1D)。残留的极少 MED1 阳性大细胞 (图 1D 箭头所示),可能是由于极少量肝细胞不能有效表达 albumin 启动子,从而不能启动 Cre 表达。此外,我们还检测了 MED1 的表达水平。实时定量 PCR 分析证实,与 MED1^{fl/fl} 鼠相比, MED1^{ΔLiv} 鼠中 MED1 mRNA 表达极低,证明 MED1 有效敲除 (图 1E)。以上实验结果表明,我们成功得到了 MED1^{ΔLiv} 和 MED1^{fl/fl} 鼠。

2.2 禁食状态下 MED1^{ΔLiv} 鼠血浆甘油三酯和胆固醇升高

2.2.1 形态学分析

禁食状态下, MED1^{fl/fl} 鼠肝脏中脂肪酸的氧化能力增强。而 PPARα^{-/-} 鼠在长期禁食情况下,由于脂肪酸氧化功能的下降会出现严重的脂肪肝^[18]。所以,我们比较了 PPARα^{-/-}、MED1^{fl/fl} 和 MED1^{ΔLiv} 鼠肝脏的形态变化。长期禁食 72 h, PPARα^{-/-} 鼠的肝脏变大,颜色发白,大量脂肪积聚在肝细胞中,呈现脂肪肝 (图 2A、2D)。相反, MED1^{fl/fl} 鼠肝脏

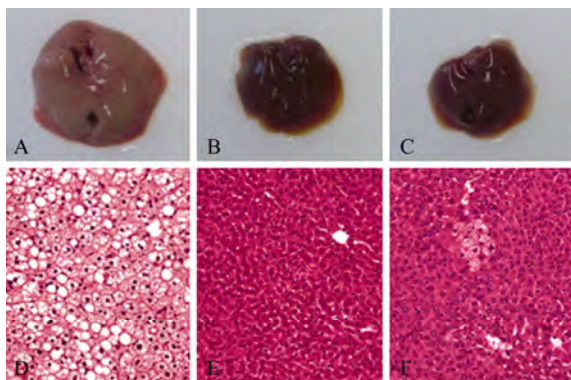


图 2 PPARα^{-/-}、MED1^{fl/fl} 和 MED1^{ΔLiv} 鼠肝脏的形态学变化

Fig. 2 Gross and histological change in liver of PPARα^{-/-}, MED1^{fl/fl} and MED1^{ΔLiv} mice after 72 hours of fasting. (A) Liver photograph of PPARα^{-/-} mouse. (B) Liver photograph of MED1^{fl/fl} mouse. (C) Liver photograph of MED1^{ΔLiv} mouse. (D) Liver sections stained with H&E from PPARα^{-/-} mouse. (E) Liver sections stained with H&E from MED1^{fl/fl} mouse. (F) Liver sections stained with H&E from MED1^{ΔLiv} mouse.

颜色红润,无脂肪沉积 (图 2B、2E)。MED1^{ΔLiv} 鼠肝脏形态与 MED1^{fl/fl} 鼠的相似, H&E 染色显示其肝细胞中几乎无脂肪堆积 (图 2C、2F)。

2.2.2 生物化学分析

为了测定血浆甘油三酯和胆固醇的含量,对 MED1^{fl/fl} 和 MED1^{ΔLiv} 鼠分别禁食 0、24、48、72 h,并尾部采血。分析结果显示,正常状态下, MED1^{fl/fl} 和 MED1^{ΔLiv} 鼠血浆甘油三酯和胆固醇水平无明显差异。但是,禁食 24、48、72 h 后,与 MED1^{fl/fl} 鼠相比, MED1^{ΔLiv} 鼠血浆中甘油三酯显著上升 (图 3A)。禁食 48、72 h 后, MED1^{ΔLiv} 鼠血浆胆固醇含量也明显上升 (图 3B)。

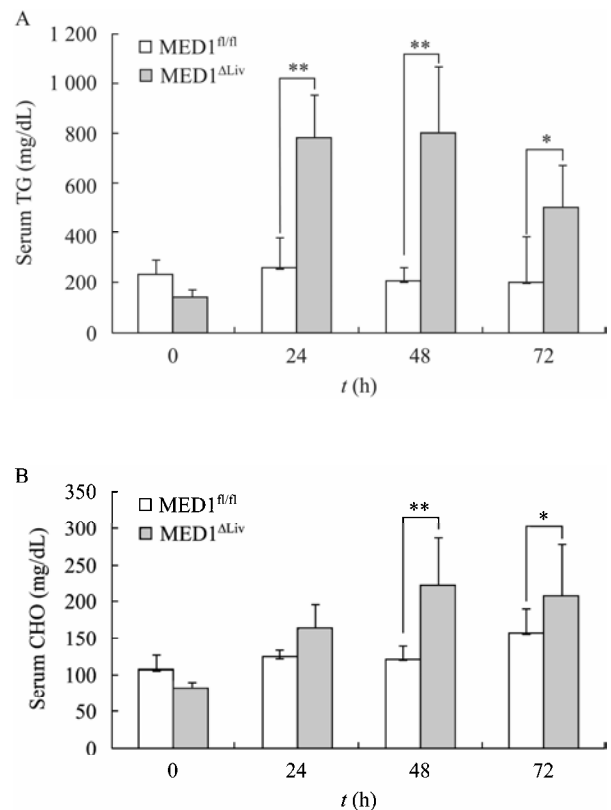


图 3 MED1^{ΔLiv} 鼠血浆甘油三酯和胆固醇显著升高

Fig. 3 Level of plasma triglyceride and cholesterol remarkably elevated in MED1^{ΔLiv} mouse after time-course fasting. (A) Level of triglyceride in MED1^{fl/fl} and MED1^{ΔLiv} mouse after 0, 24, 48, and 72 hours of fasting. (B) Level of cholesterol in MED1^{fl/fl} and MED1^{ΔLiv} mouse after 0, 24, 48, and 72 hours of fasting ($n=7$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$).

2.3 小鼠肝脏特异性缺失 MED1 导致极低密度脂蛋白积聚

为了进一步探讨高血脂和高胆固醇是由于哪部分脂蛋白代谢异常引起, 分别将正常和禁食状态的血清 ($n=7$) 汇聚到一起, 进行快速蛋白液相色谱分析。正常饲喂下, $MED1^{fl/fl}$ 和 $MED1^{\Delta Liv}$ 鼠表现出相似的脂蛋白峰, 富含甘油三酯 45%~65% 的脂蛋白主要是极低密度脂蛋白峰 (图 4A), 富含胆固醇 45%~50% 的脂蛋白主要是低密度脂蛋白峰 (图 5A)。然而, 禁食 24 h, $MED1^{fl/fl}$ 和 $MED1^{\Delta Liv}$ 鼠血浆富含甘油三酯的极低密度脂蛋白峰表现出显著的

差异。与 $MED1^{fl/fl}$ 鼠相比, $MED1^{\Delta Liv}$ 鼠甘油三酯-极低密度脂蛋白峰明显升高 (图 4B)。禁食 24 h, $MED1^{fl/fl}$ 和 $MED1^{\Delta Liv}$ 鼠血浆富含胆固醇的低密度脂蛋白峰都升高。而且, 富含胆固醇 8%~12% 的极低密度脂蛋白峰表现出显著的差异。与 $MED1^{fl/fl}$ 鼠相比, $MED1^{\Delta Liv}$ 鼠胆固醇-极低密度脂蛋白峰异常升高 (图 5B)。该研究结果表明, 禁食情况下, $MED1^{\Delta Liv}$ 鼠极低密度脂蛋白的积聚导致血脂和胆固醇的代谢异常, 进而引起高脂血症 (图 6), 提示 *MED1* 基因可能调控极低密度脂蛋白。

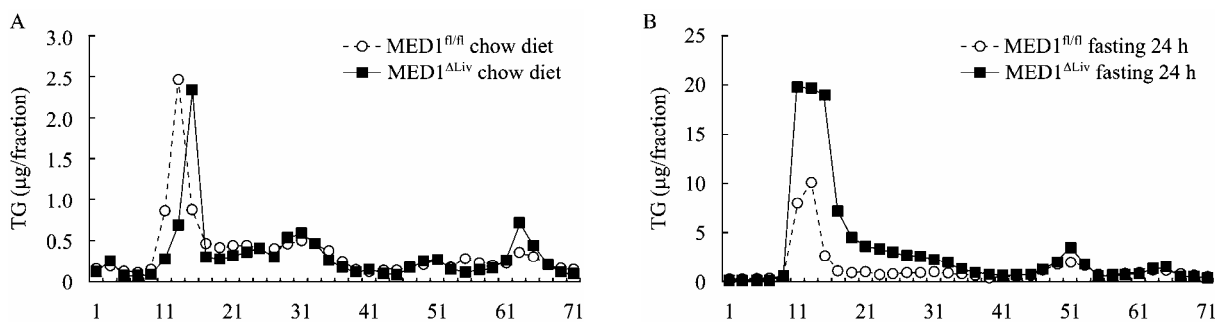


图 4 $MED1^{\Delta Liv}$ 鼠血浆甘油三酯-极低密度脂蛋白积聚

Fig. 4 Deficiency of hepatic MED1 causes accumulation of triglyceride associated VLDL. Lipoproteins were separated from 200 μ L of pooled mouse plasma samples ($n=7$ for each genotype) by FPLC. (A) the concentration of triglyceride in each eluted fraction is indicated on the y axis in $MED1^{fl/fl}$ and $MED1^{\Delta Liv}$ mouse under normal condition. (B) the concentration of triglyceride in each eluted fraction is indicated on the y axis in $MED1^{fl/fl}$ and $MED1^{\Delta Liv}$ mouse in response to 24 hours of fasting.

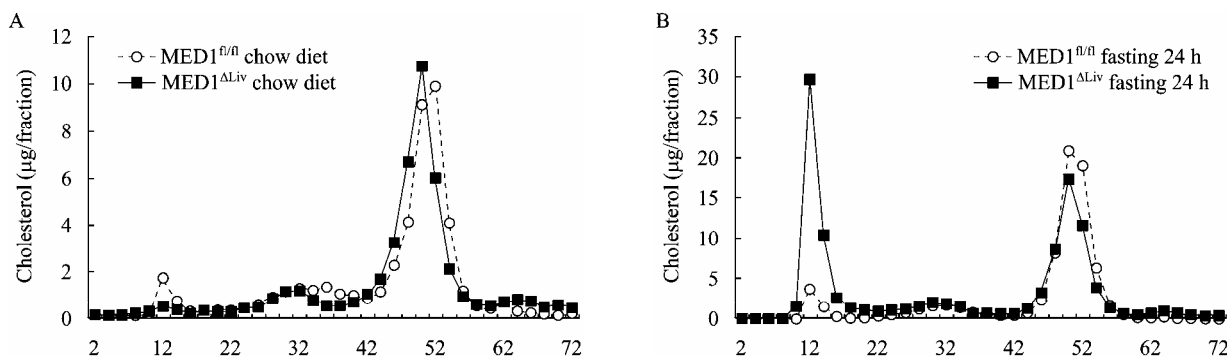


图 5 $MED1^{\Delta Liv}$ 鼠血浆胆固醇-极低密度脂蛋白积聚

Fig. 5 Deficiency of hepatic MED1 causes accumulation of cholesterol associated VLDL. Lipoproteins were separated from 200 μ L of pooled mouse plasma samples ($n=7$ for each genotype) by FPLC. (A) the concentration of cholesterol in each eluted fraction is indicated on the y axis in $MED1^{fl/fl}$ and $MED1^{\Delta Liv}$ mouse under normal condition. (B) the concentration of cholesterol in each eluted fraction is indicated on the y axis in $MED1^{fl/fl}$ and $MED1^{\Delta Liv}$ mouse in response to 24 hours of fasting.

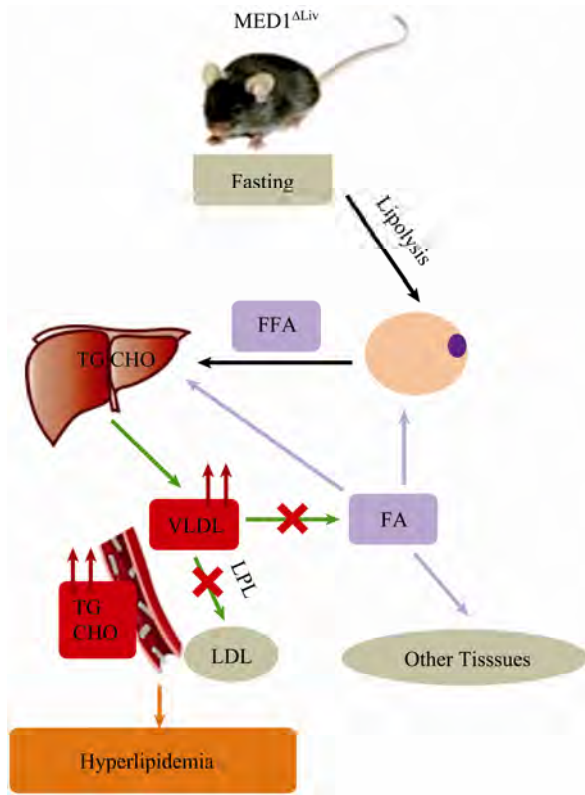


图 6 禁食状态下 $MED1^{\Delta Liv}$ 鼠发生高脂血症的模型图

Fig. 6 Model to illustrate the regulatory role of MED1 in hyperlipidemia under fasting. During fasting, triglycerides stored in adipose tissue are hydrolyzed to free fatty acids and mobilized into plasma to reach liver. Triglyceride and cholesterol are assembled into VLDL particles for secretion into blood. Triglyceride and cholesterol associated with VLDL are significantly elevated in hepatic deficient MED1 mice. Thus, hyperlipidemia is taken place in $MED1^{\Delta Liv}$ mice. However, reasons for accumulation of VLDL are still unclear.

3 讨论

高级动物在自由采食状态下,一般是消耗碳水化合物以产生 ATP,多余的能量转化为脂肪酸,以甘油三酯的形式储存在脂肪组织。而在禁食状态下,机体分解脂肪组织中的甘油三酯,产生大量的游离脂肪酸通过血液循环进入肝脏,代谢产生酮体,作为其他组织的能源^[18-20]。脂肪酸氧化代谢由线粒体 β 氧化、过氧化物酶体 β 氧化和微粒体 ω 氧化系统来完成^[21-22],氧化代谢关键酶主要受 $PPAR\alpha$ 调控^[18,23]。以往研究表明,长期禁食状态下,

$PPAR\alpha^{-/-}$ 鼠呈现严重的脂肪肝^[18]。本研究中, $PPAR\alpha^{-/-}$ 鼠作为阳性对照,禁食 72 h,肝脏出现脂肪变性^[18,23]。但是,作为 $PPAR\alpha$ 辅激活因子的 $MED1$ ^[8,14],其肝脏特异性敲除鼠几乎没有脂肪积聚,提示禁食状态下, $MED1$ 缺失,小鼠肝脏脂肪酸氧化能力下降,多余的脂肪酸合成甘油三酯和胆固醇,以极低密度脂蛋白形式进入血液循环,影响血浆脂蛋白的清除。此外, $MED1$ 在小鼠脂肪肝的形成中也发挥重要作用。高脂日粮和 $PPAR\gamma$ 诱导下, $MED1^{\Delta Liv}$ 鼠不能形成脂肪肝,且不能表达脂肪生成的标志基因^[15]。因而,我们初步推测,禁食状态下, $MED1$ 调控肝脏脂肪代谢可能是通过 $PPAR\alpha$ 和 $PPAR\gamma$ 通路共同发挥作用的。

血浆脂蛋白在脂质运输中发挥着关键作用,其主要分为 5 大类:乳糜微粒、极低密度脂蛋白 (VLDL)、中密度脂蛋白 (IDL)、低密度脂蛋白 (LDL) 和高密度脂蛋白 (HDL)^[24]。肝脏中合成的大量甘油三酯由极低密度脂蛋白携带进入血液中。如果脂蛋白酶活性低下,不能充分利用血浆脂蛋白中的甘油三酯,就可导致高脂血症^[25]。ob/ob 鼠中,肝脏特异性敲 $PPAR\gamma$ 后,禁食 24 h,血浆中甘油三酯和胆固醇显著升高,并且极低密度脂蛋白积聚^[26]。与此研究相似,本研究发现与 $MED1^{fl/fl}$ 鼠相比, $MED1^{\Delta Liv}$ 鼠极低密度脂蛋白高度积聚,导致血浆甘油三酯和胆固醇水平显著增加,出现高脂血症 (图 6)。血浆中极低密度脂蛋白的积聚表明, $MED1$ 肝脏特异性敲除鼠失去清除富含甘油三酯的脂蛋白的能力。因此我们推测肝脏 $MED1$ 的缺失可能间接导致脂蛋白酯酶 (LPL) 的活性降低。

本研究结果提示, $MED1$ 在富含甘油三酯的脂蛋白代谢中具有重要的调控作用。而且,根据他人和本实验室的研究结果,我们推测 $MED1^{\Delta Liv}$ 鼠极低密度脂蛋白积聚的原因可能有以下几点: 1) 禁食状态下,脂肪组织发生脂肪分解,游离脂肪酸流入肝脏, $MED1$ 肝脏特异性缺失后不能有效启动脂肪酸氧化系统,进而使肝脏中富含甘油三酯的极低密度

脂蛋白包装和合成增加, 大量进入血液, 导致极低密度脂蛋白积聚。2) MED1 缺失, 导致脂蛋白酯酶活性下降, 从而不能有效清除富含甘油三酯的脂蛋白, 引起极低密度脂蛋白积聚。3) MED1 缺失状态下, 以上两种情况同时存在, 即进入血液的极低密度脂蛋白增加, 同时多余的极低密度脂蛋白不能有效清除, 从而导致其大量积聚。有关 MED1 肝脏特异性敲除鼠中甘油三酯和胆固醇的升高以及极低密度脂蛋白积聚的原因等分子机制尚不清楚, 有待于进一步研究和探讨。

综上所述, 本研究首次证实了 MED1 肝脏特异性敲除鼠血脂升高是由于极低密度脂蛋白的积聚, 提示 MED1 在脂蛋白代谢中具有重要的调控作用, 为高血症的发生发展及防治提供了一个新的调控机制和靶点。

REFERENCES

- [1] Teichmann W, Klemm G, Bettzieche H, et al. Gout & hyperlipoidemia. *Dtsch Z Verdau Stoffwechselkr*, 1958, 18(1/2): 35–48.
- [2] Grundy SM. Atherosclerosis imaging and the future of lipid management. *Circulation*, 2004, 110(23): 3509–3511.
- [3] Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(6): 2595–2600.
- [4] Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 2002, 109(9): 1125–1131.
- [5] Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*, 1999, 20(5): 649–688.
- [6] Takano H, Komuro I. Peroxisome proliferator-activated receptor γ and cardiovascular diseases. *Circ J*, 2009, 73(2): 214–220.
- [7] Barbier O, Torra IP, Duguay Y, et al. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(5): 717–726.
- [8] Zhu YJ, Qi C, Jain S, et al. Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem*, 1997, 272(41): 25500–25506.
- [9] Drané P, Barel M, Balbo M, et al. Identification of RB18A, a 205 kDa new p53 regulatory protein which shares antigenic and functional properties with p53. *Oncogene*, 1997, 15(25): 3013–3024.
- [10] Crawford SE, Qi C, Misra P, et al. Defects of the heart, eye, and megakaryocytes in peroxisome proliferator activator receptor-binding protein (PBP) null embryos implicate GATA family of transcription factors. *J Biol Chem*, 2002, 277(5): 3585–3592.
- [11] Li H, Gade P, Nallar SC, et al. The Med1 subunit of transcriptional mediator plays a central role in regulating CCAAT/enhancer-binding protein- β -driven transcription in response to interferon- γ . *J Biol Chem*, 2008, 283(19): 13077–13086.
- [12] Reddy JK, Guo DS, Jia YZ, et al. Nuclear receptor transcriptional coactivators in development and metabolism. *Adv Dev Biol*, 2006, 16: 389–420.
- [13] Zhu YZ, Qi C, Jia Y, et al. Deletion of PBP/PPARBP, the gene for nuclear receptor coactivator peroxisome proliferator-activated receptor-binding protein, results in embryonic lethality. *J Biol Chem*, 2000, 275(20): 14779–14782.
- [14] Jia Y, Qi C, Kashireddi P, et al. Transcription coactivator PBP, the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein, is required for PPAR α -regulated gene expression in liver. *J Biol Chem*, 2004, 279(23): 24427–24434.
- [15] Bai L, Jia YZ, Viswakarma N, et al. Transcription coactivator Mediator subunit MED1 is required for the development of fatty liver in the mouse. *Hepatology*, 2011, 53(4): 1164–1174.
- [16] Ge K, Guermah M, Yuan CX, et al. Transcription coactivator TRAP220 is required for PPAR γ 2-stimulated adipogenesis. *Nature*, 2002, 417(6888): 563–567.
- [17] Lee SS, Pineau T, Drago J, et al. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(6): 3012–3022.
- [18] Hashimoto T, Cook WS, Qi C, et al. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in

- response to fasting. *J Biol Chem*, 2000, 275(37): 28918–28928.
- [19] McCue MD. Starvation physiology: reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2010, 156(1): 1–18.
- [20] Seitz HJ, Muller MJ, Krone W, et al. Coordinate control of intermediary metabolism in rat liver by the insulin/glucagon ratio during starvation and after glucose refeeding: regulatory significance of long-chain acyl-CoA and cyclic AMP. *Arch Biochem Biophys*, 1977, 183(2): 647–663.
- [21] Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290(5): G852–858.
- [22] Huang J, Borensztajn J, Reddy JK. Hepatic lipid metabolism//*Molecular Pathology of Liver Diseases*. London: Springer, 2010: 133–147.
- [23] Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal β -oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor α : an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr*, 2001, 21: 193–230.
- [24] Hoofnagle AN, Heinecke JW. Lipoproteomics: using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structure, and function of lipoproteins. *J Lipid Res*, 2009, 50(10): 1967–1975.
- [25] Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, et al. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(7): 1225–1236.
- [26] Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, et al. Liver-specific disruption of PPAR γ in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest*, 2003, 111(5): 737–747.