

网络出版时间:2022-8-16 15:44 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220816.0832.008.html

羊毛固醇合成酶杂合敲除小鼠全脑转录组学分析

李艳玲,李昱昊,孙晓梅,张 军,张素梅,张胜权

摘要 目的 探讨羊毛固醇合成酶(LSS)基因功能异常及胆固醇水平变化对大脑功能分子水平的影响。方法 通过RNA-Seq分析LSS(+/-)小鼠及野生型(WT)C57BL/6小鼠基因的表达,KEGG富集分析差异基因涉及的信号通路。用实时定量PCR以及Western blot法检测差异基因的表达。结果 通过RNA-Seq分析,LSS(+/-)杂合敲除导致小鼠大脑中320个基因表达出现变化,其中上调基因145个,下调175个,KEGG富集分析差异基因涉及神经活化的受体与配体通路、河马信号途径及谷氨酸能突触途径。实时定量PCR分析结果显示CCKBR与Htr5b分别出现上调。Western blot结果显示CCKBR基因在LSS(+/-)小鼠全脑组织总蛋白中明显高表达。结论 LSS(+/-)杂合敲除会影响小鼠大脑功能及行为。

关键词 羊毛固醇合成酶;基因敲除小鼠;RNA-Seq;富集分析

中图分类号 R 34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1389-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.009

胆固醇是哺乳动物细胞中重要的脂质分子,可以调节生物膜的流动性^[1]。胆固醇在体内可以转化成类固醇激素、胆汁酸和氧化固醇调控机体的生长发育等生理过程。胆固醇代谢异常参与了动脉粥样硬化、癌症、阿尔茨海默病和其他神经退行性疾病的发生发展。羊毛固醇合成酶(lanosterol synthase, LSS)催化(S)-2,3-氧化噻烯环化合成羊毛固醇形成甾醇核的反应^[2]。Mori et al^[3]证实LSS基因的错义突变可导致先天性白内障。羊毛固醇转化为胆固醇有两种途径:Bloch途径和Kandutsch Russell途径。在小鼠中,Bloch途径介导了睾丸、脾脏和肾上腺中90%或更多的胆固醇生物合成,而大脑70%以上的胆固醇生物合成来自脑星型胶质细胞^[4]。该研究

通过LSS(+/-)小鼠与野生型(wide type, WT)小鼠全脑基因表达谱分析,经过数据筛选和基因表达谱的聚类分析,找出差异表达基因,为进一步研究胆固醇代谢对动物行为学的影响及在神经系统疾病中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 委托南京生物医药研究所构建LSS(+/-)小鼠,回交繁殖,取8周龄LSS(+/-)雌鼠及WT雌鼠全脑组织委托华大基因公司进行RNA-Seq分析($n=3$),同时取全脑组织进行实时定量荧光PCR及Western blot分析。动物实验方案符合安徽医科大学动物伦理委员会相关规定。

1.2 试剂 裂解液RIPA、SDS-PAGE(5×)、Trizol、蛋白预染Mark购自美国Thermo Fisher Scientific公司;Tris、甘氨酸、SDS购自上海生物工程有限公司;Tween-20购自美国Sigma公司;抗体稀释液购自美国TOYOBO公司;10×Loading Buffer、DL2000 DNA Ladder购自美国TAKARA公司;蛋白胨、琼脂粉、蛋白胨购自美国OXOID公司;EB购自赛百盛基因技术有限公司;鼠尾基因鉴定试剂盒购自上海碧云天生物有限公司。

1.3 小鼠基因组DNA提取 剪取小鼠尾尖3~5 mm放入1.5 ml EP管中,实验试剂按照比例将DNA Extraction Solution和Enzyme Mix充分混匀,取0.5 ml消化液加入EP管中,55℃,3~5 h。15 000 r/min离心,10 min。取上清液0.4 ml,加入异丙醇,上下颠倒10次,4℃,15 000 r/min离心,5 min。去上清,滤纸吸干,加入70%乙醇溶液,将管底沉淀弹起,洗涤。离心,去上清液,空气干燥5~10 min,加入1×TE约100 μl,震荡30 min,于4℃保存。具体方法按试剂盒说明书操作。

1.4 PCR扩增反应 PCR是以单链DNA为模板,4种dNTP为底物,在有引物存在的条件下,进行互补链的延伸,反复的循环能使模板DNA得到极大的扩增。于离心管中,加入Premix Taq(TaKaRaTaq Version 2.0 Plus dye) 15 μl、R引物1 μl、DNA模板1 μl、F引物1 μl、加入双蒸水补足至30 μl。在

2021-11-25 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:2108085MH266、KJ2020A0143、KJ2020A0197)

作者单位:安徽医科大学基础医学院生化教研室,合肥 230032

作者简介:李艳玲,女,硕士研究生;

张胜权,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:zhangshengquan@ahmu.edu.cn

Taq DNA 聚合酶的催化下,以 dNTP 为原料,引物沿 5'→3' 方向延伸,形成新的 DNA 片段,如此重复改变温度,使目的基因得以迅速扩增。引物是由南京大学南京生物医药研究所设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,LSS 基因引物分别是 ACCTGGGCGGAGTCTAAGGAAG (上游) 和 AAG-GCTCTCCACTGTTTCAGAGCT(下游)。

1.5 琼脂糖凝胶电泳和基因型结果判断 取 0.24 g 琼脂糖加入 25 ml 1 × TAE 电泳缓冲液中,加热至完全溶解,稍冷却至不烫手,加入 2 μl EB,上样 DNA 样本 5 μl,电泳电压 90 V,时间 90 min,于化学发光凝胶成像系统中拍照观察。扩增产物长度为 328 bp 左右条带为 WT 小鼠;扩增产物有 282 bp 和 328 bp 两条电泳条带则为杂合敲除小鼠 LSS (+/-)。

1.6 RNA-Seq 分析 取 8 周龄 LSS 敲除 (+/-) 小鼠与 WT C57BL/6 雌鼠各 3 只,水合氯醛麻醉处死,取全脑,提取总 RNA,委托华大基因公司进行 RNA-Seq 分析。

1.7 实时定量荧光 PCR 分析 取小鼠尾部组织,提取和反转录 RNA,PCR 扩增。配置 PCR 反应液,冰上操作。考虑到加样误差,PCR 反应液应比实际需要多配置一些体积。将配完的反应液分装至反应板或微量离心管中。盖上管盖,确保封严。为避免干扰 PCR 仪读取荧光信号,应谨慎选择在反应板或离心管上标记的位置,使用离心机高速离心。将反应板放入实时定量荧光 PCR 扩增仪中。根据说明书设定反应程序。反应结束后确认扩增曲线和融解曲线。导出、拷贝数据,计算、统计结果。结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。

1.8 Western blot 检测脑组织中 LSS 蛋白的表达

取全脑组织置于离心管中,加入裂解液和蛋白酶抑制剂,匀浆机破碎组织,提取全脑组织总蛋白。用蛋白浓度测定试剂(BCA 法)进行蛋白定量,取蛋白样品加入上样缓冲液,煮沸。保存于 -20 °C 冰箱。配置 10% 聚丙烯酰胺凝胶,蛋白样品上样,电泳 1 h 后转膜,转膜后牛奶封闭,一抗(1:1 000) 4 °C 过夜,次日用 1 × TBS-T 洗膜 3 次,加二抗室温 2 h,1 × TBS-T 洗膜 3 次。ECL 化学发光试剂进行显影,软件测定吸光度值以计算蛋白表达。

1.9 基因表达谱分析技术 以 biotinylated oligo (dT) 为引物反转录合成 cDNA,用限制性内切酶酶切。通过链霉抗生物素蛋白珠收集 cDNA 3' 端部分。对每一个 mRNA 只收集其 polyA 尾与最近的酶

切位点之间的片段。将 cDNA 等分为 A 和 B 两部分,分别连接接头 A 或接头 B。接头的结构为引物 A/B 序列 + 标签酶识别位点 + 锚定酶识别位点。用标签酶酶切产生连有接头的短 cDNA 片段(约 9 ~ 10 碱基),混合并连接两个 cDNA 池的短 cDNA 片段,构成双标签后,用引物 A 和 B 扩增。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 24.0 软件以及 R 软件对数据进行统计分析、制图,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 C57BL/6 小鼠基因型鉴定 LSS 敲除 (+/-) 小鼠回交繁殖的子代 8 周龄雌鼠,剪尾提取基因组 DNA、PCR 及琼脂糖电泳分析结果见图 1。LSS 敲除 (+/-) 小鼠的 PCR 扩增产物为两条带,大小分别为 282 bp 和 328 bp,而 WT 小鼠仅一条带为 328 bp。图 1 中 3、4、7、10 号为 LSS (+/-) 小鼠,而 2、6、8 及 11 ~ 18 号为 WT 小鼠;1、5、9 号小鼠需重新鉴定。

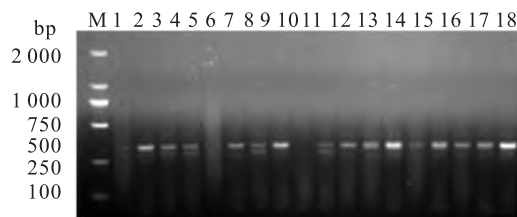


图 1 小鼠基因型鉴定 PCR 扩增产物琼脂糖电泳结果

M:DNA 标准分子量;1~18:18 只小鼠基因组 DNA PCR 扩增产物琼脂糖电泳

2.2 RNA-Seq 分析结果 选取 8 周龄 LSS 敲除 (+/-) 小鼠及 C57BL/6 小鼠各 3 只,取全脑提取总 RNA 进行 RNA-Seq 分析。结果发现两组间存在 320 个差异基因 ($P < 0.05$),见图 2,其中上调基因 145 个,下调 175 个。使用 R 软件中的 phyper 函数进行富集分析,计算 *P* 值,然后对 *P* 值进行 FDR 校正得到 *Q* 值, $Q \leq 0.05$ 的功能视为显著富集。KEGG 通路富集及网络互作分析发现,差异基因表达与神经活化的受体与配体通路(16 个基因)、河马信号途径(7 个基因)及谷氨酸能突触途径(9 个基因)有关,见图 3、4。

2.3 实时定量荧光 PCR 技术分析 LSS (+/-) 及 WT 小鼠全脑 RNA-Seq 为了进一步验证 RNA-Seq 分析的结果,本实验通过实时定量荧光 PCR 技

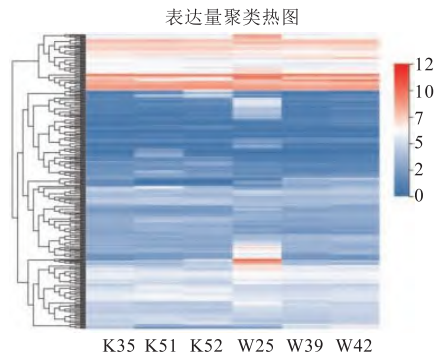


图2 LSS 敲除 (+/-) 小鼠及 C57BL/6 小鼠差异表达基因热图

纵轴为样本的 $\log_2$ (表达量值 + 1), 横轴为基因; 色块的颜色越红表达量越高, 颜色越蓝, 表达量越低; WT 小鼠: W25、W39、W42; LSS (+/-) 小鼠: K35、K51、K52

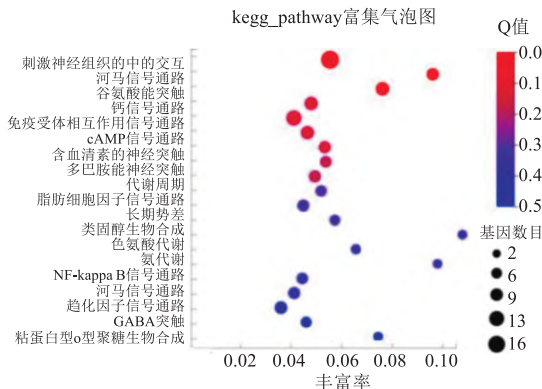


图3 差异基因 KEGG 富集结果

横轴为富集比例; 纵轴为 KEGG Pathway; 气泡的大小表示注释到某个 KEGG Pathway 上的基因数目, 颜色代表富集显著性

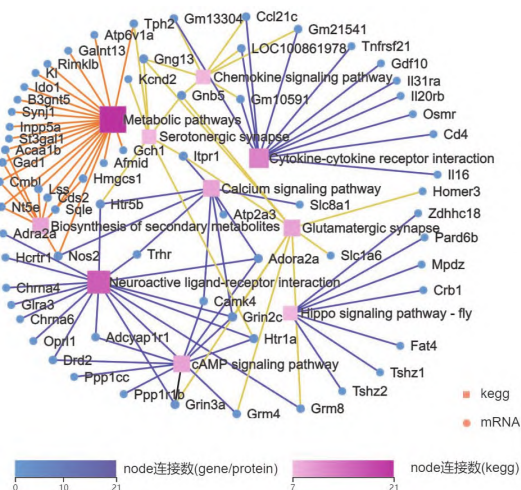


图4 差异表达基因网络互作图

不同形状表示不同的内容 (节点, node), 方块表示 KEGG Pathway, 圆形表示 mRNA; 颜色和大小都表示与该节点连接的基因或转录本数; 颜色越深、方块越大, 表示与该节点连接的基因或转录本越多

术分析 LSS (+/-) 小鼠及 WT C57BL/6 小鼠全脑 mRNA, 结果提示, 与 WT 小鼠比较, LSS (+/-) 小鼠中 CCKBR 与 Htr5b 的表达分别上调约 8 倍及 6 倍, 而 Gri2c、Drd2、Grm4 及 Adora2d 表达均下调, 这些基因中大部分与情绪相关, 提示其可能影响小鼠的情绪, 见图 5。

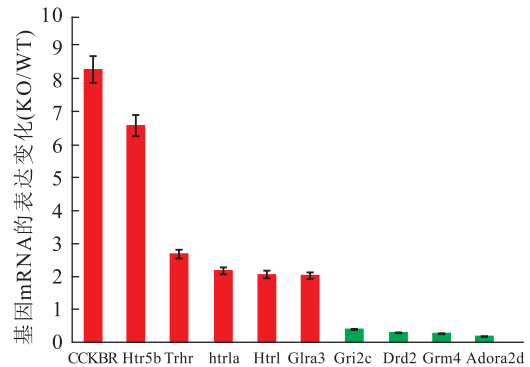


图5 实时荧光定量 PCR 分析结果
红色代表上调的基因, 绿色代表下调的基因

2.4 CCKBR 基因在 LSS (+/-) 小鼠脑中高表达

选取 8 周龄 WT C57BL/6 小鼠及 LSS 敲除 (+/-) 小鼠各 3 只, 分别提取小鼠全脑组织总蛋白, CCKBR 基因在 LSS (+/-) 小鼠中明显高表达, 见图 6。总 ERK 无变化, p-ERK 在 LSS (+/-) 组表达较高, 总 AKT 在 LSS (+/-) 组表达较低。

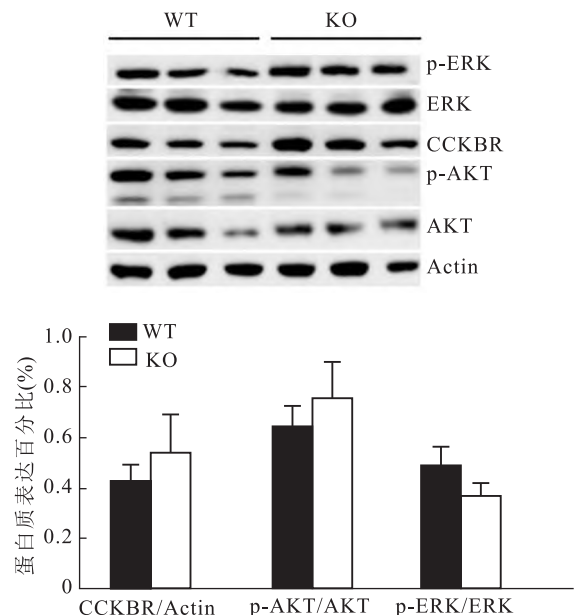


图6 小鼠全脑组织 Western blot 分析结果
KO: LSS 敲除 (+/-) 小鼠; WT: 野生小鼠

3 讨论

胆固醇代谢对大脑功能影响十分重要,胆固醇合成的 LSS,其催化环氧鲨烯环化成第 1 个固醇类化合物——羊毛固醇,因此,LSS 是胆固醇合成过程中的关键酶之一^[5]。通过 RNA-Seq 分析 LSS 敲除 (+/-)小鼠及 WT C57BL/6 小鼠差异表达基因提示:LSS 杂合敲除,导致了小鼠大脑中 320 个基因表达发生改变,其中上调基因 145 个,下调 175 个,这些差异基因涉及了神经活化的受体与配体通路、河马信号通路及谷氨酸能突触相关通路,提示 LSS 杂合敲除可能影响小鼠大脑功能及行为。

胆固醇对脑功能的影响至今在动物模型及人类临床研究中没有取得一致的结果,有研究^[6]提示高胆固醇饮食损害动物及人的学习记忆能力,而有研究^[7]却取得了相反的结果。由于血脑屏障的关系,血液中的胆固醇并不能进入大脑,大脑中的胆固醇主要由脑星型胶质细胞合成^[8-9]。本研究建立的 LSS 杂合敲除小鼠模型,理论上会导致大脑胆固醇合成的减少,有助于探讨胆固醇对大脑功能的影响,但 LSS 杂合敲除理论上还导致了羊毛固醇及其下游产物的减少,而这些中间产物对大脑的功能也有一定影响,因此,LSS 杂合敲除对脑功能的影响可能不仅仅能用胆固醇的减少来解释,这是本模型在研究胆固醇对大脑功能影响的不足之处。研究^[10-11]表明人类 LSS 基因突变导致白内障、少毛症等疾病,通常伴有智力障碍,提示 LSS 基因突变影响大脑功能。本研究发现 LSS 杂合敲除导致了大脑中 320 个表达差异基因,这些基因与大脑的神经信号通路有关。荧光定量 PCR 验证发现与情绪有关基因表达显著升高。其中 CCKBR 表达显著上调,该受体活化参与调节多种神经生物学过程,包括:焦虑、痛觉、突触传递等活动^[12],同时全脑中 AKT 与 ERK 活化成相反趋势,研究表明 ERK 活化促进神经元的分化,而 AKT 活化诱导神经元祖细胞增长和存活,提示这两条信号途径对神经细胞生理功能均具有重要作用^[13],但 CCKBR 上调与 AKT 及 ERK 信号通路的关系等分子机制有待进一步研究。

本研究仅分析了 LSS 杂合敲除导致小鼠大脑差异表达基因及其通路分析,给出了 LSS 基因功能异常及胆固醇水平变化可能影响大脑功能的分子水平

的初步证据,下一步需要重点探讨其中一些重要的基因对小鼠行为学的影响,并阐明 LSS 杂合敲除及胆固醇水平变化对大脑功能影响的分子机制,为人类疾病如阿尔茨海默病等发病机制的研究提供帮助。

参考文献

- [1] Yamauchi Y, Rogers M A. Sterol metabolism and transport in atherosclerosis and cancer[J]. *Front Endocrinol*, 2018, 19(9): 509 - 16.
- [2] Chen X D, Liu L. Congenital cataract with lss gene mutations: a new case report [J]. *J Pediatr Endocrinol Met*, 2017, 30(11): 1231 - 5.
- [3] Mori M, Li G X. Lanosterol synthase mutations cause cholesterol deficiency-associated cataracts in the shumiya cataract rat [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(2): 395 - 404.
- [4] Shrivastava S, Paila Y D, Dutta A, et al. Differential effects of cholesterol and its immediate biosynthetic precursors on membrane organization [J]. *Biochemistry*, 2008, 47(20): 5668 - 77.
- [5] Huff M W, Telford D E. Lord of the rings the mechanism for oxidosqualene:lanosterol cyclase becomes crystal clear [J]. *Trends Pharmacol*, 2005, 26(7): 335 - 40.
- [6] Schreurs B G. The effects of cholesterol on learning and memory [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2010, 34(8): 1366 - 79.
- [7] Jeong W, Lee H, Cho S, et al. ApoE4-induced cholesterol dysregulation and its brain cell type-specific implications in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Mol Cells*, 2019, 42(11): 739 - 46.
- [8] Dai L J, Zou L, Meng L X. Cholesterol metabolism in neurodegenerative diseases: molecular mechanisms and therapeutic targets [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(5): 2183 - 201.
- [9] Ang M J, Lee S, Wada M, et al. SREBP-1c deficiency affects hippocampal micromorphometry and hippocampus-dependent memory ability in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 6103 - 12.
- [10] Zhou H, Yang Z X. Lanosterol disrupts the aggregation of amyloid-beta peptides [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(9): 4051 - 60.
- [11] Besnard T, Sloboda N, Goldenberg A, et al. Biallelic pathogenic variants in the lanosterol synthase gene LSS involved in the cholesterol biosynthesis cause alopecia with intellectual disability, a rare recessive neuroectodermal syndrome [J]. *Genet Med*, 2019, 21(9): 2025 - 35.
- [12] Leal G, Comprido D, Duarte C. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 76(1): 639 - 56.
- [13] Chen X, Li X, Wong Y T, et al. Cholecystokinin release triggered by NMDA receptors produces LTP and sound-sound associative memory [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(13): 6397 - 406.

网络出版时间:2022-8-16 13:18 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220816.0832.007.html

不同暴露方式下利奈唑胺联合磷霉素 对金黄色葡萄球菌抗菌效应研究

张贵军¹, 黄 宏¹, 沈陈林¹, 刘艳艳², 谢 娜¹, 江丽芳¹, 李家斌², 黄晓晖¹

摘要 目的 体外以金黄色葡萄球菌为受试菌,研究利奈唑胺联合磷霉素在不同暴露顺序、间隔下对抗菌后效应(PAE)和24 h杀菌的影响。方法 测定利奈唑胺和磷霉素单独或同时暴露于金黄色葡萄球菌1 h的PAE。分别在利奈唑胺诱导PAE的起始期(Tb)、中间期(Tm)和结束期(Te)给予磷霉素暴露1 h测定PAE;调整给药顺序,即先暴露磷霉素后利奈唑胺,重复上述操作测定PAE。24 h杀菌实验分3种暴露方式,即同时暴露、先暴露利奈唑胺1 h后联合磷霉素以及先暴露磷霉素1 h后联合利奈唑胺绘制杀菌曲线。结果 相较于单药PAE[利奈唑胺(1.2 ± 0.1) h,磷霉素(1.6 ± 0.1) h],两药同时暴露PAE为(2.9 ± 0.1) h,二者联合为

相加效应。利奈唑胺PAE相下,磷霉素的PAE明显减小甚至消失(Tb时-0.3 h、Tm时0 h、Te时0.9 h),提示产生了拮抗作用,并且越是在利奈唑胺PAE早期拮抗作用越明显;磷霉素PAE相下,利奈唑胺的PAE均无明显变化(Tb时1.2 h、Tm时1.4 h、Te时1.3 h),二者仍然表现为非时间依赖型的相加效应。24 h杀菌实验中,给药4 h出现抗菌效应的分化,持续到24 h,先暴露磷霉素的抗菌效应明显强于(相差1 log10)先暴露利奈唑胺和同时暴露方式,而后二者的抗菌效应相似。结论 利奈唑胺联合磷霉素对金黄色葡萄球菌的药效学行为受到药物暴露方式的影响,先暴露磷霉素的方式而不是同时暴露可能是更优的给药方案。因此,暴露方式可能是该抗菌联合在临床实践中不可忽视的重要因素之一。

关键词 暴露方式;利奈唑胺;磷霉素;金黄色葡萄球菌;抗菌联合

中图分类号 R 969.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1393-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.010

2021-12-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81173133)

作者单位:¹ 安徽医科大学药学院基础与临床药理学研究室,合肥 230032

² 安徽医科大学第一附属医院感染病科,合肥 230022

作者简介:张贵军,男,硕士研究生;

黄晓晖,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:math2088@163.com

抗菌药物联合体外研究中绝大部分在实验设计时通常是以药物同时暴露于受试菌的方式进

Whole-brain transcriptome analysis of wool sterol synthase heterozygous knockout mice

Li Yanling, Li Yuhao, Sun Xiaomei, Zhang Jun, Zhang Sumei, Zhang Shengquan

(Dept of Biochemistry, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract **Objective** To investigate the molecular changes of lanosterol synthase (LSS) gene dysfunction and cholesterol levels that may affect brain function. **Methods** The differentially expressed genes in LSS knockout (+/-) mice and WT C57BL/6 mice were analyzed by RNA-SEQ, and the signal pathways involved in the differentially expressed genes were analyzed by KEGG enrichment. The differential genes were detected by real-time quantitative PCR and the protein expression of differential genes was detected by Western blot. **Results** By RNA-SEQ analysis, LSS (+/-) heterozygous knockout resulted in the difference of 320 genes in the mouse brain, including 145 up-regulated genes and 175 down-regulated genes. KEGG enrichment analysis showed that these differentially expressed genes involved in neural-activated receptor and ligand pathways, hippocampal signaling pathways and glutamate synaptic pathways. Real-time quantitative PCR showed that CCKBR and Htr5b were up-regulated, respectively. Western blot results showed that CCKBR gene was highly expressed in the total protein of all brain tissues of LSS knockout (+/-) mice. **Conclusion** LSS heterozygous knockout may affect brain function and animal behavior.

Key words lanosterol synthase; gene knockout mice; RNA-Seq; enrichment analysis