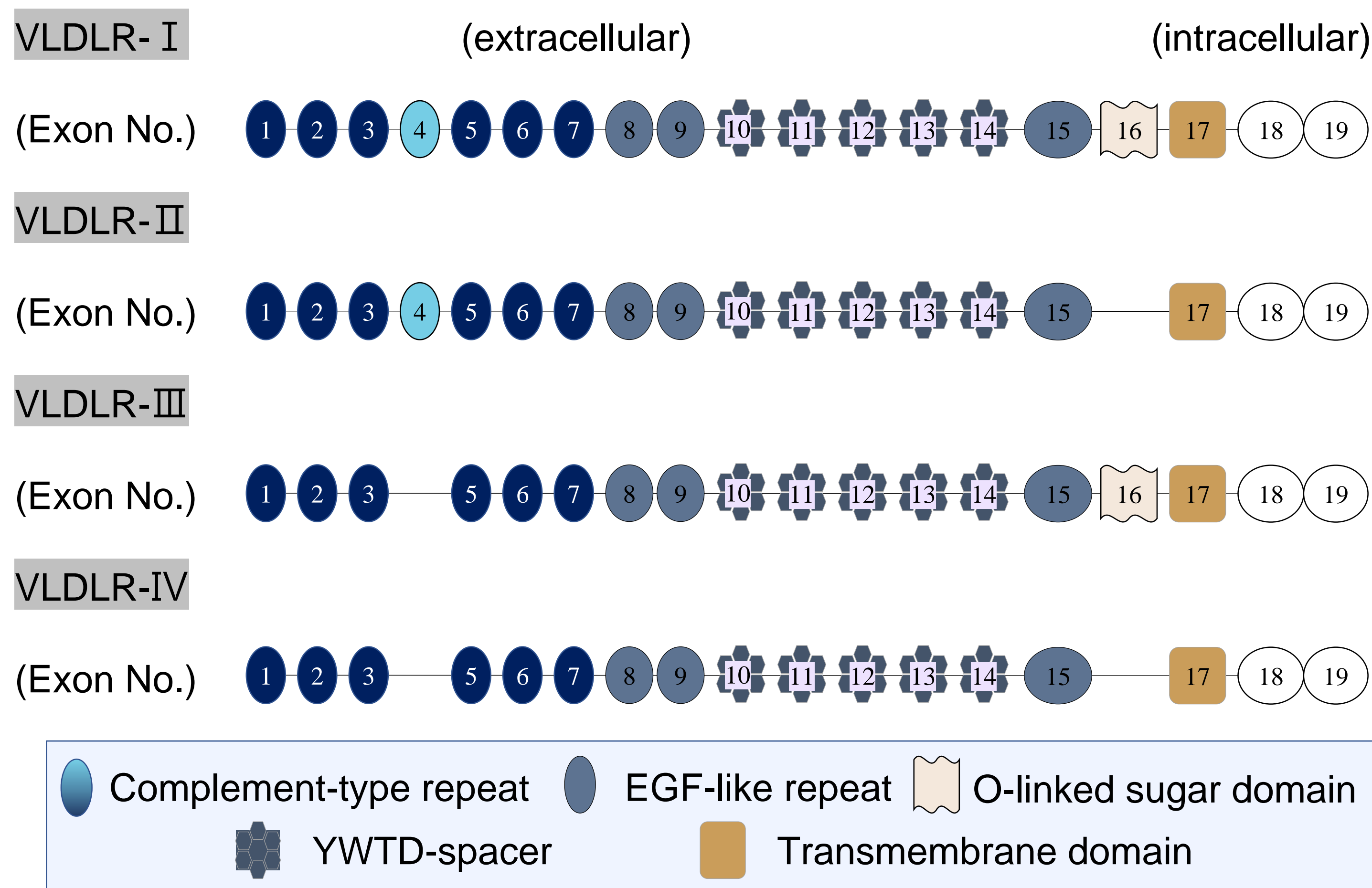


極低密度脂蛋白接受器之剪接變異型調控—— 脂蛋白和高糖對心肌細胞之影響

高雄醫學大學醫學院脂質科學暨老化研究中心 (Lipid Science and Aging Research Center, LASRC) 李香君副教授 親自指導

研究背景

- VLDLR (very-low-density lipoprotein receptor, 極低密度脂蛋白接受器) 經過 alternative splicing 會產生四種剪接變異型 (isoforms) (圖一)。第一型 VLDLR (VLDLR-I) 為全長具全部的外顯子 (exons 1到19)，第二型 (VLDLR-II) 缺少 exon 16，第三型 (VLDLR-III) 缺少 exon 4，第四型 (VLDLR-IV) 則缺少 exon 16 及 exon 4。VLDLR 辨識含有 ApoE 的脂蛋白，包括 VLDL、IDL、chylomicron 等，而將富含三酸油脂的脂蛋白帶入細胞內提供代謝。
- VLDLR 剪接變異型的表達與其功能有關。但心肌細胞之極低密度脂蛋白接受器之剪接變異型如何被調控，尚未被探討清楚。



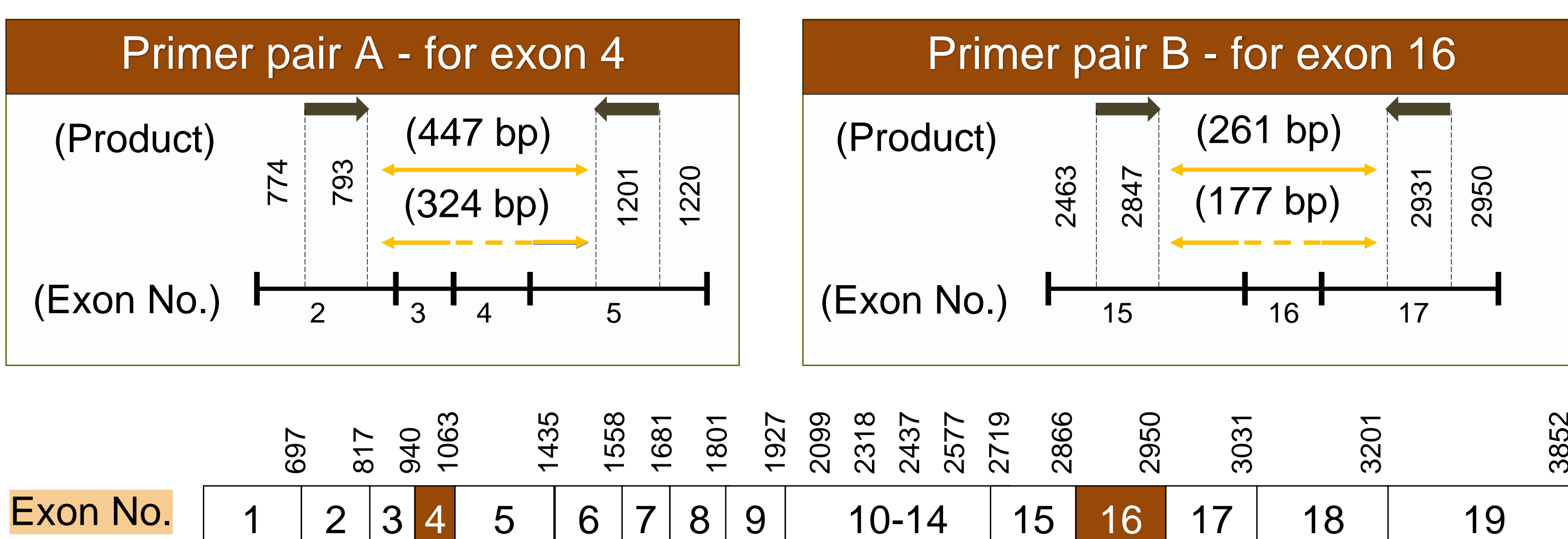
(圖一) VLDLR 四種選擇性剪接。VLDLR-I 為全長具全部的外顯子 (exon number 1 to 19)。VLDLR 會透過選擇性剪接產生缺少 exon 16 (VLDLR-II) 或 exon 4 (VLDLR-III) 的 VLDLR。VLDLR-IV 則缺少 exon 4 和 exon 16。

研究目的

- 探討高、低濃度的 VLDL、fructose、glucose 培養條件下，心肌細胞中 VLDLR 之剪接變異型調控的分布情形。

研究方法

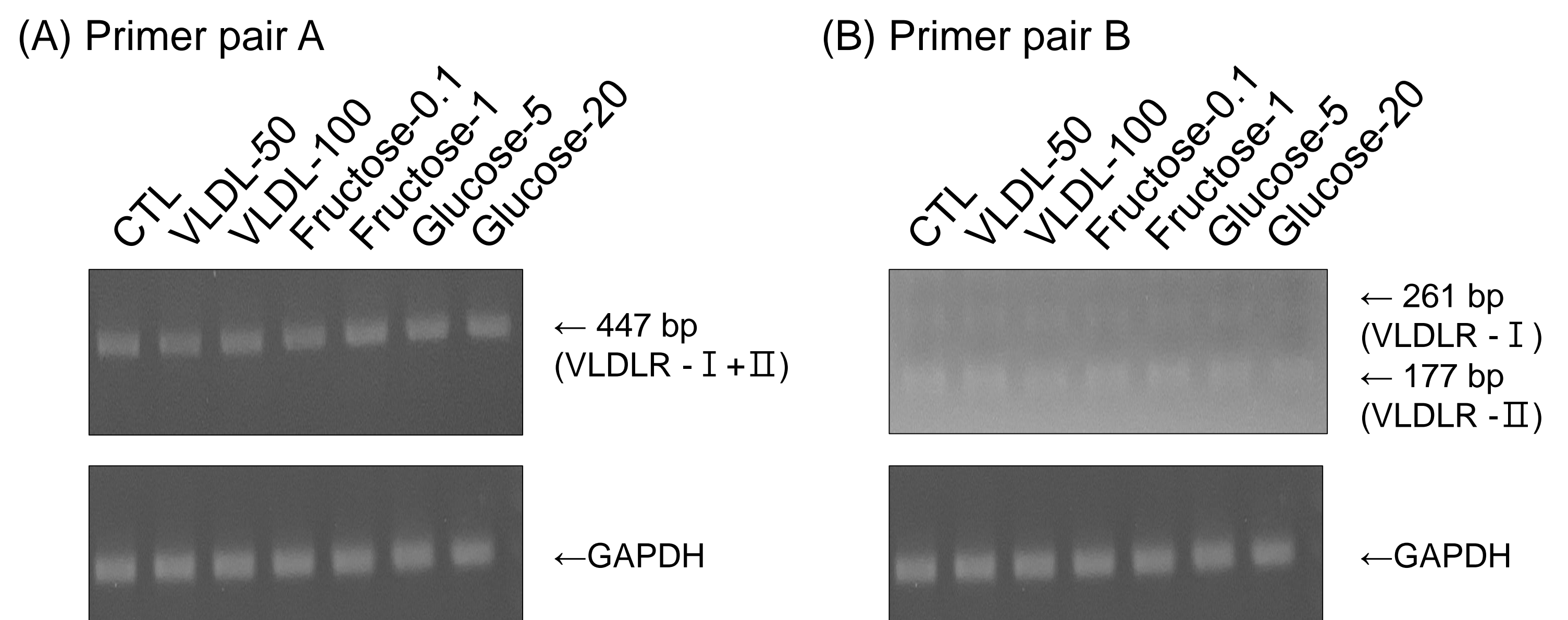
- 細胞實驗選擇 HL-1 細胞，是一種能在生物體外連續分裂和自發收縮，並保持分化心臟表型的小鼠心房心肌細胞。
- 本實驗共設計六組實驗組加上一個控制組，在 HL-1 細胞中，分別加入 VLDL (50/100 μ M)、fructose (1/0.1 μ M)、glucose (5/20 μ M) 進行細胞培養，並且在第 72 小時收取細胞檢體，實驗共進行五重複。
- 以反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse-transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) 反應 VLDLR-I-IV 基因表達量。
- 設計兩組引子對，分別區分 VLDLR exon 4 及 exon 16 之有無 (圖二)。
- 將收集的細胞抽取 RNA，轉錄成 cDNA，進行 RT-PCR，以 GAPDH 作為 housekeeping 基因。
- RT-PCR product 分別以 ImageJ 軟體定量 (densitometry method)。
- 比較不同條件下，VLDLR exon 4 及 exon 16 的表現差異，並且分析 VLDLR 之剪接變異型比例。
- 結果以 One-way ANOVA 統計方法進行分析比較各組差異。



(圖二) VLDLR RT-PCR 實驗 Primer pairs 的設計位置、預期產物大小。左列以 447 bp 代表 VLDLR-I + VLDLR-II 的 PCR 產物，以 324 bp 代表 VLDLR-III + VLDLR-IV 的預期產物。右列以 261 bp 代表 VLDLR-I + VLDLR-III 的 PCR 產物，以 177 bp 代表 VLDLR-II + VLDLR-IV 的預期產物。

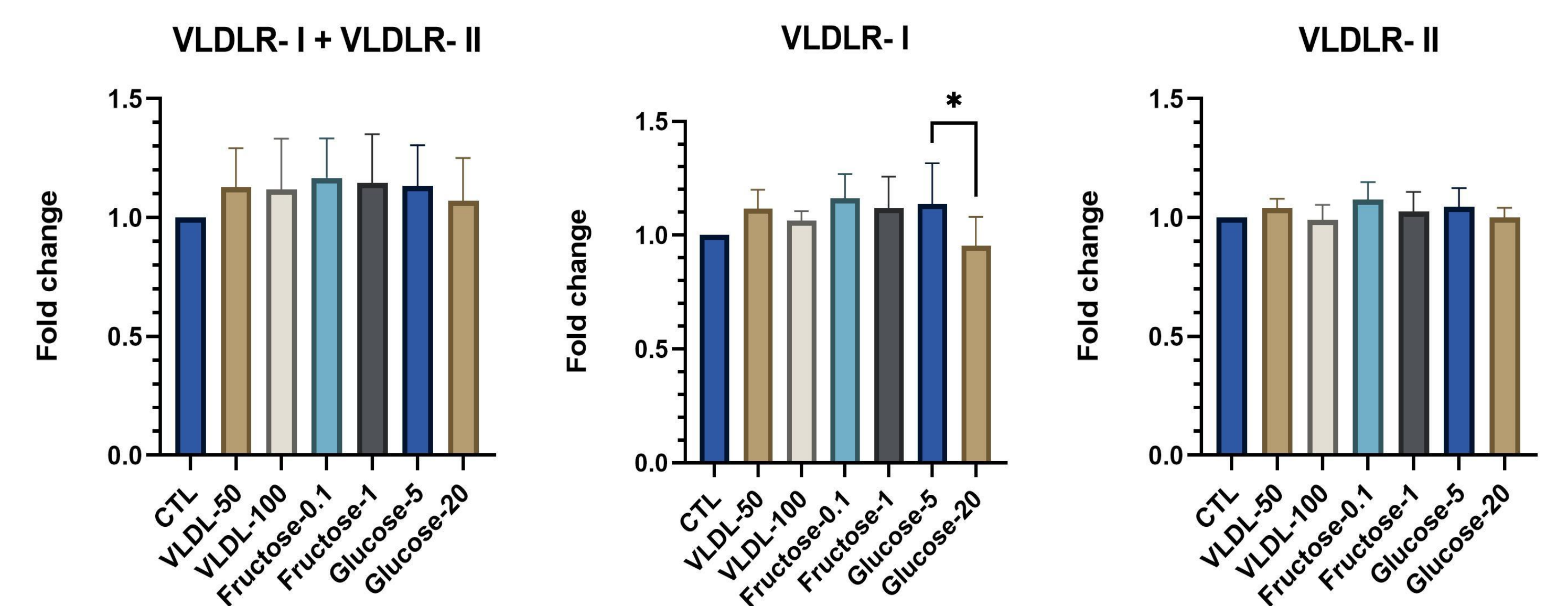
研究結果

- HL-1 細胞的 VLDLR 主要以 VLDLR-I 及 VLDLR-II 這兩型為主：藉由 RT-PCR 電泳結果，在 VLDLR exon 4 皆僅有全長表現 (圖三 (A)) 代表 HL-1 細胞主要是以 VLDLR-I 及 VLDLR-II 為主。也因此，若再藉由 Exon 16 的實驗，可以辨別 VLDLR 的四種剪接變異型調控。



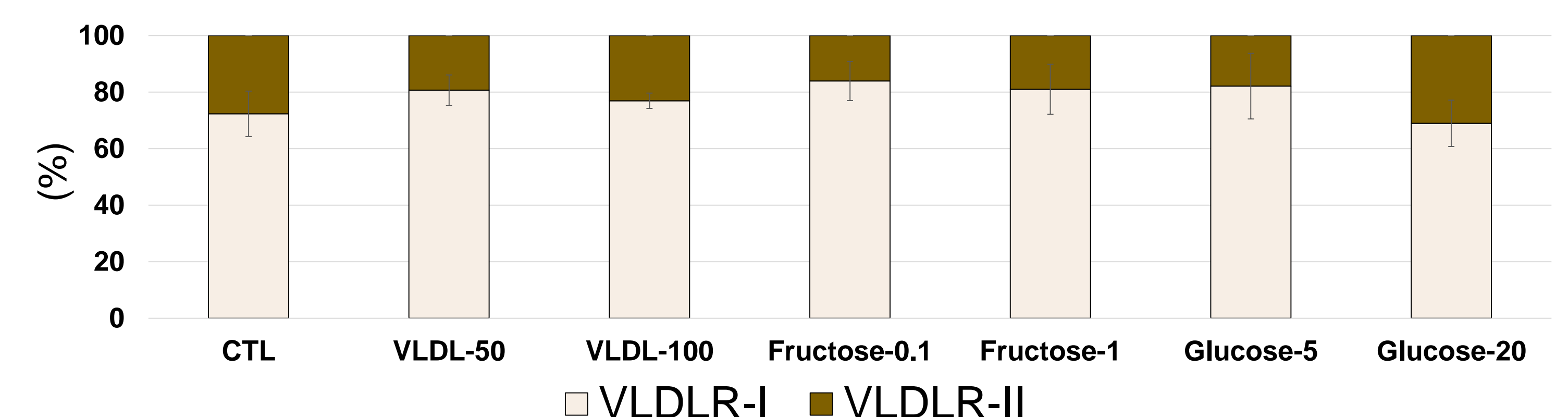
(圖三) HL-1 細胞 RT-PCR，分析 VLDLR 的 (A) exon 4 及 (B) exon 16 結果代表圖。

- VLDL 對 HL-1 細胞之 VLDLR 的剪接變異型調控：Exon 4、VLDLR-II 表現與控制組相當。而 VLDLR-I 表現在加入 50 μ M VLDL 組別中上升 12%、加入 100 μ M VLDL 則與控制組差異不大 (圖四)。
- Fructose 對 HL-1 細胞之 VLDLR 的剪接變異型調控：Exon 4、VLDLR-II 表現與控制組相當。而 VLDLR-I 表現在加入 0.1 μ M fructose 組別中上升 16%、加入 1 μ M fructose 上升 12% (圖四)。
- Glucose 對 HL-1 細胞之 VLDLR 的剪接變異型調控：Exon 4、VLDLR-II 表現與控制組相當。而 VLDLR-I 表現在加入 5 μ M glucose 組別中上升 14%、加入 20 μ M glucose 與控制組差異不大。根據 One-way ANOVA 的分析結果，在高劑量的 glucose 條件下，會有顯著下降 (圖四)。



(圖四) 各實驗組間 RT-PCR 的電泳量分析比較，結果顯示 VLDLR-I 在 Glucose-20 組別有顯著下降，並且在其他實驗組中有表現量上升的趨勢 (mean \pm SEM, n = 5, *P < 0.05)。

- HL-1 細胞的 VLDLR 之剪接變異型比例分析：比較在各條件下，心肌細胞的 VLDLR 之剪接變異型比例 (圖五)，發現 VLDLR-I 為主要變異型，約為 VLDLR-II 的三倍。分析後發現，VLDLR-II 的表達在各實驗組大多呈現下降趨勢。其中，加入 VLDL (50/100 μ M) 下降 30% 與 17%，加入 fructose (1/0.1 μ M) 下降 42% 與 31%，glucose 5 μ M 下降 35%。但在加入 glucose 20 μ M 的實驗組中，VLDLR-II 的表現卻上升了 12%。



(圖五) VLDLR-I 與 VLDLR-II 在各實驗組的表現相對占比 (mean \pm SEM, n = 5)。

結論

- HL-1 細胞中的 VLDLR，主要是 VLDLR-I 及 VLDLR-II 這兩型為主，並且以 VLDLR-I 為主要變異型。
- VLDL、fructose、glucose 會使 VLDLR-I 表現量有上升的趨勢。然而，在高劑量 glucose 培養條件下，VLDLR-I 表現則是下降。
- 在提高 VLDL、fructose、glucose 等培養條件下，HL-1 細胞的 VLDLR-II 在各實驗組的表達均呈現下降趨勢，但在高劑量的 glucose 培養條件下，VLDLR-II 的占比為提升。