

ELOVL4 基因过表达对 n3 和 n6 超长链多不饱和脂肪酸生物合成效率的影响

余曼, 林伟, 陈波, 吴峥峥

作者单位: (610072) 中国四川省成都市, 四川省医学科学院·四川省人民医院眼科

作者简介: 余曼, 博士, 主治医师, 研究方向: 青光眼、视网膜疾病。

通讯作者: 吴峥峥, 硕士, 主任医师, 研究方向: 白内障、视网膜疾病。wuzz_ophthalmol@126.com

收稿日期: 2014-03-26 修回日期: 2014-07-09

Effects of *ELOVL4* gene overexpress on the synthesis efficiency of n3 and n6 very long chain polyunsaturated fatty acids

Man Yu, Wei Lin, Bo Chen, Zheng-Zheng Wu

Department of Ophthalmology, Sichuan Academy of Medical Sciences, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan Province, China

Correspondence to: Zheng - Zheng Wu. Department of Ophthalmology, Sichuan Academy of Medical Sciences, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan Province, China. wuzz_ophthalmol@126.com

Received: 2014-03-26 Accepted: 2014-07-09

Abstract

• **AIM:** To compare the synthesis efficiency of n3 and n6 very long chain polyunsaturated fatty acid (VLC-PUFA) by overexpressing *ELOVL4* protein, providing guidance for treating Stargardt-like macular dystrophy (STGD3).

• **METHODS:** To establish recombinant adenovirus with the *ELOVL4* protein and green fluorescent protein, transferred into cultured PC12 cells. The cells were divided into 3 groups: PC12, PC12 + Ad - GFP and PC12 + Ad - *ELOVL4*, former two groups serve as controls. *ELOVL4* gene expression was quantified by qRT-PCRs. *ELOVL4* protein was analyzed by Western - Blot (WB). The transduced cells were treated with both EPA and AA (1:1). After 48h of incubation, cells were collected, total lipids extracted and fatty acid methyl esters prepared and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

• **RESULTS:** When supplemented together, 20:5n3 (EPA) and 20:4n6 (AA) were efficiently taken up at almost the same amounts in the PC12 cells regardless of *ELOVL4* expression. The *ELOVL4*-expressing cells elongated both EPA and AA to a series of n3 and n6 VLC-PUFAs. From 20:5n3/EPA, 34:5n3 and 36:5n3 account for 0.71% and 1.6%, respectively. From 20:4n6/DHA, 34:4n6 and 36:4n6 were only 0.46% and 0.61%, respectively. The total relative mol% of n3 VLC-PUFAs synthesized from EPA

was almost two times that of n6 VLC-PUFAs synthesized from AA.

• **CONCLUSION:** *ELOVL4* protein preferentially elongates n3 PUFA to VLC-PUFAs over n6 PUFA. Dietary supplementation of appropriate n3/n6 PUFAs may provide STGD3 patients with some therapeutic benefits.

• **KEYWORDS:** eicosapentaenoic acid; arachidonic acid; *ELOVL4* gene; Stargardt's disease; very long chain polyunsaturated fatty acid

Citation: Yu M, Lin W, Chen B, *et al.* Effects of *ELOVL4* gene overexpress on the synthesis efficiency of n3 and n6 very long chain polyunsaturated fatty acids. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014; 14(8):1386-1390

摘要

目的: *ELOVL4* 是常染色体显性 Stargardt 氏黄斑变性的致病基因, *ELOVL4* 蛋白酶参与 n3 和 n6 超长链多不饱和脂肪酸(very long chain polyunsaturated fatty acid, VLC-PUFA)的合成, 比较两者的生物合成效率, 对治疗 Stargardt 氏黄斑变性有指导意义。

方法: 构建携带 *ELOVL4* 基因和绿色荧光蛋白的重组腺病毒, 转入培养的 PC12 细胞, 将细胞分成三组: PC12、PC12 + Ad-GFP 和 PC12 + Ad-*ELOVL4*, 前两组为对照组, 通过 qRT-PCR 定量分析 *ELOVL4* 基因的表达量, Western Blot 检测 *ELOVL4* 蛋白的表达; 等浓度 (1:1) 加入 EPA (n3 PUFA) 和 AA (n6 PUFA), 孵育 48h 之后进行脂肪酸提取, 通过气相色谱-质谱法 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 分析超长链脂肪酸的成分。

结果: GC-MS 检测到分别用 EPA 和 AA 处理后的 PC12 + Ad-*ELOVL4* 的细胞中有 n3 VLC-PUFA 的表达, 34:5n3 和 36:5n3 是 20:5n3/EPA 的主要产物, 分别为 0.71% 和 1.6%; 34:4n6 和 36:4n6 是 20:4n6/AA 的主要产物, 分别为 0.46% 和 0.61%; EPA 所产生的 n3 VLC-PUFAs 总和是 AA 所产生的 n6 VLC-PUFAs 总和的 2 倍。

结论: 在 *ELOVL4* 蛋白作用下, EPA 合成 VLC-PUFAs 的效率高于 AA, 饮食中给予适当比例的 n3/n6 PUFAs, 可能是治疗 STGD3 疾病的方式之一。

关键词: 二十碳五烯酸; 花生四烯酸; *ELOVL4* 基因; Stargardt 病; 超长链多不饱和脂肪酸

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2014.08.05

引用: 余曼, 林伟, 陈波, 等. *ELOVL4* 基因过表达对 n3 和 n6 超长链多不饱和脂肪酸生物合成效率的影响. 国际眼科杂志 2014; 14(8):1386-1390

0 引言

多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 按照第一个双键的位置被分为 3 类: n3 PUFAs, 即从甲基端数第 1 个双键的位置在第 3 碳位的多不饱和脂肪酸, 如二十二碳六烯酸 (22:6n3, DHA) 和二十碳五烯酸 (20:5n3, EPA); n6 PUFAs, 指第一个双键的位置在从甲基端数的第 6 碳位, 如花生四烯酸 (20:4 n6, AA) 和 γ -亚麻酸 (18:3n6, GLA); 另外还有第 1 个双键的位置在第 9 碳位的 n9 类 PUFAs。我们日常摄入的脂肪主要是动物油脂和植物油。其中, 动物油脂中的脂肪酸以饱和脂肪酸为主; 植物油主要包含 n6 类的不饱和脂肪酸 (如葵花籽油、玉米油和豆油等), 而 n3 类的不饱和脂肪酸含量甚微, 主要来源于海水鱼油。在过去的 30 年中, 大量的研究证明 n3 PUFAs 对具有抗心血管疾病^[1]、抗癌^[2,3]等作用, 此外, 在哺乳动物神经系统中, n3 PUFAs 不但是重要的结构组分, 而且是重要的神经营养因子^[4]。

近年来的研究发现, *ELOVL4* 基因第 VI 外显子上三种不同类型的突变导致了人类的常染色体显性遗传 Stargardt 病 III 型 (Stargardt-like macular dystrophy, STGD3) 的发病^[5-8], 该病是一种发生于青少年时期的遗传性黄斑营养不良, 目前尚无有效的治疗方法。*ELOVL4* 属于超长链脂肪酸延伸酶 (elongase of ELongation of very long chain fatty acids, ELOVL) 家族, 是哺乳动物中一类编码超长链脂肪酸延伸酶的基因家族, *ELOVL4* 蛋白酶已被证实参与 n3 和 n6 超长链多不饱和脂肪酸 (very long chain PUFA, VLC-PUFA) 的 C28-C38 碳链延长的合成过程, 而这类 PUFAs 的减少可能是 STGD3 的致病原因^[9,10]。n6 PUFAs (AA) 和 n3 PUFAs (EPA, DHA) 是最重要的目前最受关注的脂肪酸, 适当比率 n3/n6 PUFAs 营养食物供给也随之成为了许多疾病治疗研究的热点。基于上述研究, 比较 *ELOVL4* 蛋白酶催化合成 n3 和 n6 VLC-PUFAs 的效率, 可能对 STGD3 有潜在的治疗意义。

本研究中, 我们将转基因 *ELOVL4* 在 PC12 细胞中过量表达, 等浓度 (1:1) 加入 EPA 和 AA, 通过气相色谱-质谱法 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 定量分析前体脂肪酸 EPA 和 AA 合成 VLC-PUFAs 的效率。在该实验中, 我们并没有选择 DHA, 是因为在前期实验中, 我们发现 DHA 转化成 VLC-PUFAs 的效率很低, 这与 Suh 等^[11] 玻璃体腔内注射 [³H] EPA 和 [³H] DHA 入大鼠的眼内的实验结果一致, 他们发现有 90% 的 EPA 转化为 VLC-PUFA, 而没有检测到 DHA 被有效转化。需要说明的是, 我们在最初的实验中纳入了肝实质细胞 (Hep2G), PC12 细胞、鼠视网膜视锥细胞起源的 661W 细胞以及视网膜神经胶质瘤细胞 Y-79, 尽管这几种细胞都能合成 VLC-PUFA, 但是由于内源性的 *ELOVL4* 蛋白在 Hep2G、661W 和 Y-79 三种细胞中含量相对比较高, 对实验影响较大, 因此在进一步的实验中被排除。此外, PC12 细胞和感光细胞均是神经元起源的细胞系, 容易进行病毒质粒的转染实验, 所以在本实验中我们选择了 PC12 细胞。

1 材料和方法

1.1 材料 PC12 细胞是大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株由我院人类分子生物学与遗传研究中心实验动物中心引入, 所有细胞培养中所用的试剂均购自 Invitrogen (Carlsbad, CA); 质粒提取采用 NucleoBond plasmid isolation 试剂盒 (Clontech Laboratories, Inc.; Mountain View, CA), 采用

PureLink Micro to Midi 总 RNA 提取试剂盒 (Invitrogen Life Sciences, Carlsbad, CA); EPA 和 AA 的钠盐购自 Nu-Chek Prep, Inc. (Elysian, MN); 兔抗人 *ELOVL4* 多克隆抗 (抗体编号 ab14922, 英国 Abcam 公司), 辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗 (Alexa Fluor 488 标记, 抗体编号 ab150077, 英国 Abcam 公司); 硅胶层析板上 (EM Science, Gibbstown, NJ); 所有脂肪酸提取中用的化学试剂和衍生物均购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒载体的构建 携带鼠 *ELOVL4* 基因和绿色荧光蛋白 (GFP 作为对照) 的重组腺病毒构建系统采用 Adeno X 腺病毒表达系统 2 和 Creator 技术^[9]。将重组病毒质粒转染 HEK293 细胞, 在转染 36h 后开始收集、纯化培养液中的病毒。用流式细胞仪测定滴度。

1.2.2 细胞培养和病毒转导 PC12 细胞培养于含体积分数为 10% 马血清、体积分数 5% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 体积分数 5% CO₂ 条件下培养。次日, 进行病毒转导, 即将 Ad-GFP (对照) 和 Ad-*ELOVL4* 病毒质粒按 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ pfu/(mL) 浓度滴度加入含有 2% (v/v) FBS 的细胞培养液中。转导 24h 后, 观察并纪录 GFP 表达情况和细胞形态变化。

1.2.3 RT-PCR; RNA 提取和 cDNA 合成 提取 PC12、PC12+Ad-GFP 和 PC12+Ad-*ELOVL4* 三组细胞的 RNA, *ELOVL4* 基因引物 Forward: 5'-TCCAGAAATATCTTTGGTG G-3'; Reverse: 5'-GTTAAG-GCCCAGTTC AATT-3'。构建 25 μ L 反应体系, 上样扩增。琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察并照相, 扫描各条带灰度值, 定量分析, *RPL19* 为管家基因, 基因引物 Forward: 5'-TCACAGCCT-GTACCTGAAGG-3'; Reverse: 5'-TCGTGCTTCCTTGGTCTTAG-3'。

1.2.4 蛋白质印迹 将一定量细胞裂解液与样本缓冲液混合, 煮沸处理后用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳。通过转移电泳将蛋白原位转印至硝酸纤维素膜。膜用封闭液处理, 然后与第一抗体反应, 膜经漂洗后再与偶有辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶的第二抗体反应, 加入生色底物显示目的蛋白的位置。蛋白印迹用扫描密度测定法定量, 数字图像的密度测定采用 Bio-Rad 软件处理系统。

1.2.5 供给 EPA 和 AA 于 PC12 细胞 首先, 制备牛血清白蛋白 BSA 共轭 EPA 和 AA, 每种钠盐溶于 BSA, 制备成 BSA 共轭 EPA 和 AA 制备, 储存于 -80°C 备用。当外源基因 *ELOVL4* 在 PC12 细胞中转染成功, 细胞培养 24h 后, 培养液被替换为含有 EPA 和 AA (1:1) 的培养液, 两种 PUFA 的浓度控制在 15 ~ 20 μ g/mL 之间, 以防浓度过高导致的细胞死亡。在孵育 48h 之后, 用含有 50 μ M BSA 的 PBS 溶液清洗细胞一次, 然后用不含 BSA 的 PBS 溶液清洗细胞两次, 收集细胞, 储存于 -80°C 备用。

1.2.6 脂肪酸提取 从至少 2mg 的细胞蛋白中提取总脂质, 参照 Bligh-Dyer 法提取总脂质^[12,13], 将收集的细胞溶于氯仿: 甲醇: 水 (1:1:1) 的溶液中 (脂质溶液氯仿, 甲醇 H+ 置换使脂肪酸钠盐中的钠离子), 溶液将分为两层, 由于脂质溶于氯仿, 吸管吸取下层的氯仿层; 剩下的水溶液中还有少量的脂质, 因此重复上述过程 3 次, 收集所有获得的氯仿溶液, 加入氯仿: 甲醇: 水 (3:48:47), 以获得更加纯化的脂质, 同样溶液分为两层, 弃去上层的水溶液, 将含有脂质的氯仿溶液储存在 -20°C 中备用。加入 50nmol/L 的 15:0, 17:0, 23:0 和 4nmol/L 的 30:3n6 的作为参考物, 也就

是标准脂肪酸,便于定量分析,这种标准脂肪酸的要求是人体内不存在的脂肪酸,15:0,17:0,23:0 作为短链脂肪酸的参照物,30:3n6 作为长链脂肪酸的参照物。之后,再加入 1mL 含 HCl 的甲醇溶液(HCl 的体积分数为 16.6%),在氮气下封好装有氯仿的试管口后,100℃ 加热过夜,第 2d 将试管在冰上冷却。

1.2.7 薄层色谱 将上述获得的溶液用毛细管在 10×20cm 硅胶层析板上,距离板底部约 1.5cm 的位置点若干下(次数根据样品浓度而定),并静置顷刻(或加热)以使溶剂完全蒸发。将少量合适的溶剂己烷:乙醚:冰醋酸(70:30:2.3)(流动相)倒于一个合适的玻璃器皿(展缸)中,让流动相高度不超过 1cm,并在上面放上表面皿使溶剂蒸气在展缸中饱和。然后将层析板置于展缸内(样品点不可触碰溶剂表面),盖上盖子让溶剂通过毛细现象缓慢爬升。溶剂遇到样品混合点时,会带着样品上升。当溶剂快到层析板顶端时,将板拿出,迅速记录溶剂到达的高度并晾干,不要让溶剂爬升到达板的顶部。分离的脂质是无色的,用二氯荧光黄使其显色,之后将脂质从层析板上刮除,分类收集到试管中,从而得到脂肪酸甲酯(fatty acid methyl ester, FAME),置入色谱质谱仪上分析。

1.2.8 气相色谱-质谱法分析脂肪酸 (1) FAME 定性分析:采用 Agilent Technologies 7890A 气相色谱和 5975C inert XL 质谱检测仪,样品用微量注射器(每个样品注射体积 1μL)由色谱仪进样口注入,采用无分流进样,入口温度为 280℃,经色谱柱分离后进入质谱仪离子源在离子源被电离成离子。离子经质量分析器,检测器之后即成为质谱仪号并输入计算机。样品由色谱柱不断地流入离子源,离子由离子源不断的进入分析器并不断的得到质谱,只要设定好分析器扫描的质量范围和扫描时间,计算机就可以采集到一个个的质谱。离子化的方式采用电子轰击离子化(electron impact ionization, EI),单电子检测模式(single ion monitoring, SIM),色谱柱为 Agilent Technologies DB-23 column (60m×0.32mm×0.25μm),其中氮气的流动速率为 1.9mL/min。孵箱的温度逐渐升高,变化如下:130℃ 1min→6.8℃/min 升高到 170℃ →2.9℃/min 提高到 215℃,维持 11.4min→42℃/min 提高到 230℃,维持 9.6min→10℃/min 至 290℃,维持 14.4min。(2) FAME 定量分析:采用 Agilent Technologies 6890N 气相色谱和火焰离子检测质谱检测仪(flame ionization detector, FID),得到的总离子色谱图或质量色谱图,其色谱峰面积与相应组分的含量成正比,若对某一组份进行定量测定,该研究中采用色谱分析法中的内标法等方法进行,即前面提到的 15:0,17:0,23:0 作为短链脂肪酸的参照物,30:3n6 作为长链脂肪酸的参照物。孵箱的温度逐渐升高,变化如下:130℃ 1min→8.2℃/min 升高到 170℃ →3.5℃/min 提高到 215℃,维持 9.5min→50℃/min 提高到 230℃,维持 8min→12℃/min 至 290℃,维持 12min。

统计学分析:运用 Statistica 2000 和 GraphPad Prism 5。每组样本数量 n=3,脂肪酸的定量单位为相对 mole% (±SD),统计方式采用多变量 ANOVA 方差分析和 Scheffe t 检验。P<0.05 表示统计学上有明显差异。

2 结果

2.1 PC12 细胞中 ELOVL4 基因的表达水平 用携带 ELOVL4 基因的 Ad 载体转导培养的 PC12 细胞,qRT-PCR 定量分析 ELOVL4 过量表达的水平,并且用 Ad-GFP 载体作对照。如图 1A 中显示,ELOVL4 基因在 PC12+Ad-ELOVL4

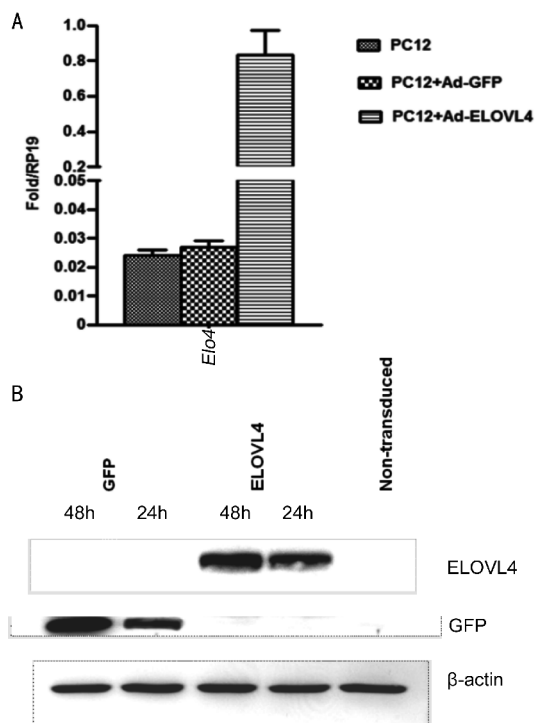


图 1 qRT-PCR 和 Western Blot 分析 PC12 细胞中 ELOVL4 的表达水平 A:qRT-PCR 定量分析 ELOVL4 在 PC12 细胞中的表达水平,纵轴显示目的基因/管家基因 RPL19 的矫正值(n=3, $\bar{x}\pm s$); B:Western Blot 显示在 Ad-ELOVL4 转导的 PC12 细胞组中 ELOVL4 蛋白表达量增加,Ad-GFP 转导的 PC12 细胞中 GFP 蛋白的表达亦增加, β -actin 蛋白表达量为对照。

组的细胞中的表达是对照组(PC12 和 PC12+Ad-GFP)的 40 倍(P<0.01),两个对照组之间的 ELOVL4 表达无明显差异(P>0.05),说明 PC12 细胞中内源性的 ELOVL4 基因的表达水平无显著差异。同样,蛋白质印迹的结果亦证实经过 Ad-ELOVL4 转导的 PC12 细胞中 ELOVL4 蛋白的有明显表达(图 1B),并且 48h 后的蛋白表达水平比 24h 后的表达水平增加。

2.2 未经 EPA 和 AA 处理的 PC12 细胞中 n3 和 n6 PUFA 的组成 对于 n3 PUFAs,PC12 细胞中本身具有相对高含量的内源性的 18:3n3,20:4n3,20:5n3,22:5n3,22:6n3 和 24:5n3,然而,与对照组相比(PC12 和 PC12+Ad-GFP),Ad-ELOVL4 转导的 PC12 细胞组中 20:4n3,22:5n3,22:6n3,和 24:5n3 的含量下降(图 2A),并在该组中检测到 C28-C36 PUFAs 的产物(图 2B),而对照组无 C28-C36 PUFAs 的合成。说明在 ELOVL4 蛋白酶的催化作用下,五烯酸 20:4n3,22:5n3,24:5n3 延长碳链合成 28:5n3,30:5n3,32:5n3,34:5n3 和 36:5n3,此外有少量的六烯酸产物 34:6n3 和 36:6n3 合成,可能是有 22:6n3(DHA)转化而来,也可能是内源性的 FADS2/ $\Delta 6$ desaturase(去饱和酶)的作用下将五烯酸转化成六烯酸。

然而,对于 n6 PUFAs,PC12 细胞中本身具有相对高含量的内源性的 18:2n6,20:3n6 和 20:4n6,但 Ad-ELOVL4 转导的 PC12 细胞与对照组相比(PC12 和 PC12+Ad-GFP)之间无明显的统计学差异(图 2C),并且没有检测到任何 VLC-PUFA 的产物。

2.3 EPA(20:5n3) 和 AA(20:4n6) 转化成 VLC-PUFAs 的效率 为了比较 EPA 和 AA 在 ELOVL4 蛋白酶催化作用下合成 VLC-PUFAs 的效率,我们将 EPA 和 AA(1:1)处理

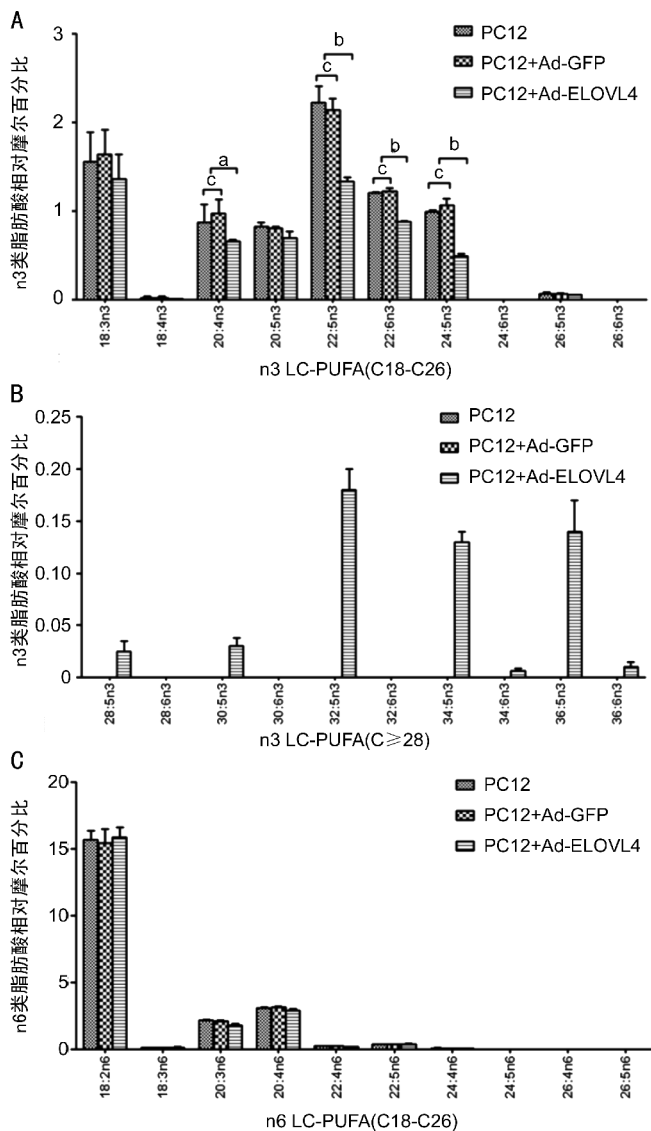


图2 未添加 EPA 和 AA 后的 PC12 细胞中的 n3 PUFA 的组成 A: PC12、PC12+Ad-GFP、PC12+Ad-ELOVL4 三组细胞中 C18-C26 n3 PUFA 的组成,与两组对照组相比,20:4n3, 22:5n3, 22:6n3 和 24:5n3 在 PC12+Ad-ELOVL4 中含量下降($^aP<0.05$; $^bP<0.01$, $^cP>0.05$); B: PC12+Ad-ELOVL4 组中有 C28-C36 n3 PUFAs 的成分, 对照组中未检测有 C28-C36 n3 PUFAs; C: PC12、PC12+Ad-GFP、PC12+Ad-ELOVL4 三组细胞中 C18-C26 n6 PUFA 的组成(每组 $n=3$, mole% \pm SD)。

PC12 细胞,如图 3A 中所示,发现有 EPA 和 AA 几乎等比例被 PC12 细胞所吸收(12% ~ 14%),添加脂肪酸 Ad-ELOVL4 转导的 PC12 细胞组中 20:5n3+22:5n3 的相对 mole% 为 12%,两组对照则为 15%,由于 20:5n3 大部分转化为 22:5n3,因此有必要在统计 20:5n3 被吸收的量时将 22:5n3。同理,添加脂肪酸 Ad-ELOVL4 转导的 PC12 细胞组中 20:4n6+22:4n6 的相对 mole% 为 14%,两组对照为 15% ~ 16%,在 Ad-ELOVL4 转导的 PC12 细胞组中,EPA 和 AA 均被有效转化为 n3 VLC-PUFAs。通过 GC-MS 定量分析它们在所有脂肪酸中的 mole%,对于 20:5n3/EPA, 34:5n3 和 36:5n3 是其主要产物,分别为 0.71% 和 1.6%; 而 34:4n6 和 36:4n6 作为 20:4n6/AA 的主要产物,则分别只有 0.46% 和 0.61%(图 3B ~ D)。此外,在 VLC-PUFAs 产物中,EPA 所产生的 n3 VLC-PUFA 总和 mole% 是 AA 所产生的 n6 PUFA 总和的 2 倍(图 3E),说明 EPA 转化成 VLC-PUFAs 的效率高于 AA。

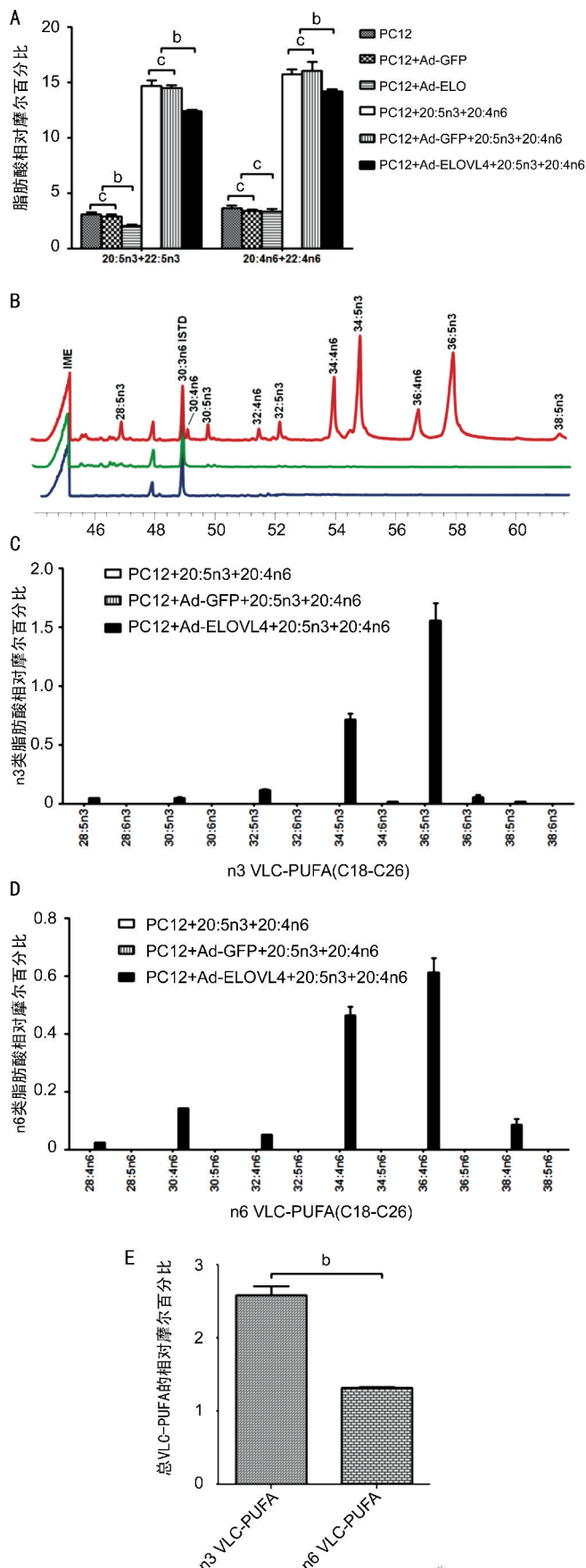


图3 添加 DHA 和 EPA 后 PC12 细胞中 n3 和 n6 PUFA 的组成 A: EPA/20:5n3 和 AA/20:4n6 几乎等比例被 PC12 细胞吸收($^bP<0.01$, $^cP>0.05$); B ~ D: n3 和 n6 VLC-PUFAs 只在 Ad-ELOVL4 转导的 PC 细胞组中呈现,对照组中无这类产物。C34 和 C36 PUFA 是主要的产物; E: n3 VLC-PUFAs 的相对摩尔百分比是 n6 PUFAs 的近 2 倍,说明 EPA 的转化效率高于 AA($^bP<0.01$)。

3 讨论

n3 和 n6 PUFAs 在生物体内都发挥了很重要的作用,很多情况下,这两族 PUFAs 在功能上相互协调制约,共同调节生物体的生命活动。n3 和 n6 PUFAs 共用相同的碳链延长酶(ELOVL1-5)、去饱和酶($\Delta 5$ 和 $\Delta 6$ desaturase),两者之间存在代谢竞争抑制,而各种酶对 n3 PUFAs 的亲合力更高^[14]。该实验结果中,我们在 PC12 细胞中过量表达 ELOVL4 蛋白,在未添加脂肪酸时,内源性的 C20-C24 n3 PUFAs 在 ELOVL4 蛋白酶作用下,合成了 C28-C36 n3 PUFAs;尽管内源性的 18:2n6 含量远高于其他 PUFAs,却没有被用于合成 n6 VLC-PUFAs,实际上该部分实验中已经说明 ELOVL4 蛋白对 n3 PUFAs 的亲合力高于 n6 VLC-PUFAs。为进一步证实,我们添加相同浓度的 EPA (n3 类)和 AA (n6 类),发现 EPA 合成 n3 VLC-PUFAs 的量几乎是 AA 合成 n6 VLC-PUFAs 的 2 倍,证明 ELOVL4 碳链延长酶对 n3 类脂肪酸 EPA 的亲合力高于 n6 类脂肪酸 AA。

至今,VLC-PUFAs (无论是 n3 和 n6 类)在组织中的功能还没有明确的报道。实际上,VLC-PUFA 在 20 多年前就已经被发现,但是由于结构的不稳定性和组织中低表达的原因,使得分析的困难度加大,并且不易于大量生产^[15]。然而,由于 VLC-PUFA 近末端的结构与饱和脂肪酸相似,而远末端的结构与多不饱和脂肪酸相似,因此它们在生物系统中的功能作用是不能够被 C16-C18 或者是 C20-C22 的 PUFA 所代替的^[16]。Rotstein 等^[17]研究者在试验中发现 VLC-PUFA 对视锥细胞起源的 661W 的氧化应激损伤有保护作用,ELOVL4 基因突变造成 STGD3 的表现型,很可能与超长链脂肪酸的合成减少有关,目前 STGD3 无有效的治疗方式,AA 和 EPA 分别是人体可以通过饮食获取的、具有代表性的 n3 和 n6 PUFAs,并且能在有 ELOVL4 表达的组织 and 细胞中有效的转化为 VLC-PUFAs,假如通过饮食提供 AA 和 EPA 的方式,在内源性 ELOVL4 蛋白的作用下,体内合成 VLC-PUFAs 并输送到视网膜组织,可能是治疗 STGD3 患者的方式之一。

n3 和 n6 PUFAs 对高等动物都有必不可少的功能,在当今的饮食条件下,n6 PUFAs 一般是过量的,而 n3 PUFAs 严重不足,所以 n3/n6 PUFAs 比例的平衡成为最受关注的问题,比如 n3/n6 比例下降或 n6 PUFA 在血浆中的比例增高会增加心血管疾病的风险等研究正在如火如荼的进行^[18],然而学术界至今对二者合理的比值仍有争论。通过该研究,我们发现 C20 PUFAs 在 ELOVL4 蛋白的作用下,可以合成 C28-C38 PUFAs,而这类 VLC-PUFAs 可能对 STGD3 患者有治疗的作用,下一步的研究方向将针对 STGD3 动物模型进行体内实验,给予适当比例 n3/n6 PUFAs 的食物,探讨其是否有治疗作用。

参考文献

1 Muldoon MF, Erickson KI, Goodpaster BH, et al. Concurrent physical activity modifies the association between n3 long-chain fatty acids and cardiometabolic risk in midlife adults. *J Nutr* 2013;143(9):1414-1420

2 Djuric Z, Ren J, Brown PR, et al. Lifestyle factors associated with serum N-3 fatty acid levels in breast cancer patients. *Breast* 2012;21(4):608-611

3 Molinari R, D'Eliseo D, Manzi L, et al. The n3-polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid induces immunogenic cell death in human cancer cell lines via pre-apoptotic calreticulin exposure. *Cancer Immunol Immunother* 2011;60(10):1503-1507

4 Li F, Marchette LD, Brush RS, et al. High levels of retinal docosahexaenoic acid do not protect photoreceptor degeneration in VPP transgenic mice. *Mol Vis* 2010;16:1669-1679

5 Zhang K, Kniazeva M, Han M, et al. A 5-bp deletion in ELOVL4 is associated with two related forms of autosomal dominant macular dystrophy. *Nat Genet* 2001;27(1):89-93

6 Edwards AO, Donoso LA, Ritter R 3rd. A novel gene for autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy with homology to the SUR4 protein family. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(11):2652-2663

7 Grayson C, Molday RS. Dominant negative mechanism underlies autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy linked to mutations in ELOVL4. *J Biol Chem* 2005;280(37):32521-32530

8 Karan G, Lillo C, Yang Z, et al. Lipofuscin accumulation, abnormal electrophysiology, and photoreceptor degeneration in mutant ELOVL4 transgenic mice; a model for macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(11):4164-4169

9 Agbaga MP, Brush RS, Mandal MN, et al. Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(35):12843-12848

10 Agbaga MP, Mandal MN, Anderson RE. Retinal very long-chain PUFAs: new insights from studies on ELOVL4 protein. *J Lipid Res* 2010;51(7):1624-1642

11 Suh M, Clandinin MT. 20:5n-3 but not 22:6n-3 is a preferred substrate for synthesis of n-3 very-long-chain fatty acids (C24-C36) in retina. *Curr Eye Res* 2005;30(11):959-968

12 Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37(8):911-917

13 Martin RE, Elliott MH, Brush RS, et al. Detailed characterization of the lipid composition of detergent-resistant membranes from photoreceptor rod outer segment membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(4):1147-1154

14 Hartwich J, Malec MM, Partyka L, et al. The effect of the plasma n-3/n-6 polyunsaturated fatty acid ratio on the dietary LDL phenotype transformation - insights from the LIPGENE study. *Clin Nutr* 2009;28(5):510-515

15 Avelldano MI. A novel group of very long chain polyenoic fatty acids in dipolyunsaturated phosphatidylcholines from vertebrate retina. *J Biol Chem* 1987;262(3):1172-1179

16 Denic V, Weissman JS. A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. *Cell* 2007;130(4):663-677

17 Rotstein NP, Politi LE, German OL, et al. Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(5):2252-2259

18 Kaikkonen JE, Kresanov P, Ahotupa M, et al. High serum n6 fatty acid proportion is associated with lowered LDL oxidation and inflammation: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Free Radic Res* 2014;48(4):420-426