

β -klotho 的时钟节律性研究

许媛媛¹, 钱近春², 刘 畅², 吴剑卿^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院老年医学科, 江苏 南京 210029; ²南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 目的:探讨 β -klotho 基因的生物震荡模式及核心生物钟基因 BMAL1 的调控作用。方法:采用实时定量 PCR 方法检测细胞水平及正常小鼠肝脏组织 β -klotho 生物振荡情况;构建表达 BMAL1 及 CLOCK 的质粒,转染到 HepG2 细胞中,检测 β -klotho 表达量的变化;同时在 BMAL1 敲除鼠中检测 β -klotho 表达量的变化。结果:体内和体外实验均证实 β -klotho 的表达呈现震荡性;分子水平上,核心生物钟元件 BMAL1 和 CLOCK 对 β -klotho 有协同激活作用。结论: β -klotho 是一个新的钟控基因。

[关键词] β -klotho;生物钟;肝脏

[中图分类号] R333.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)02-148-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140205

The circadian rhythm of β -klotho

Xu Yuanyuan¹, Qian Jinchun², Liu Chang², Wu Jianqing^{1*}

(¹Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To explore circadian pattern of β -klotho and regulation function of core circadian gene BMAL1. **Methods:** The circadian expression patterns of β -klotho in cell level and liver tissue of mouse were detected by Real-time PCR. Plasmids expressed BMAL1 and CLOCK were prepared, then transfected into HepG2 cells to analyze β -klotho expression level by RT-PCR method. Furthermore, the expression level of β -klotho in the BMAL1 knockout mice was also detected. **Results:** β -klotho displays a robust circadian expression pattern. At the molecular level, core clock elements BMAL1 and CLOCK coordinately activate β -klotho transcription. **Conclusion:** β -klotho is a new clock-controlled gene.

[Key words] β -klotho; circadian clock; liver

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(02): 148-152]

生物钟系统参与调控睡眠觉醒周期、体温、心血管系统、内分泌系统及糖脂代谢等节律活动^[1-3]。在哺乳动物中,调控昼夜节律的生物钟振荡器存在于下丘脑视交叉上核区,光线是最主要的授时因素^[4]。除了这个中枢振荡器,外周组织中也存在着相似的生物钟,如肝脏、白色脂肪组织及心脏等^[5]。中枢生物钟和外周生物钟同步协调有序作用才能保持机体内部生物钟的正常运转。这个庞大的生物钟系统由一系列的转录翻译正负反馈通路组成。在这些通路内,CLOCK 和 BMAL1 作为正调节因子发挥作用。在细胞核内,二者形成异二聚体结合于其靶基因(如

PER 和 CRY) 的 E-box 区来激活生物钟节律的转录。而 PER 和 CRY 则作为负调节因子来发挥作用。当两者合成量足够时,就会转移回核内,抑制介导的 CLOCK/BMAL1 转录。除了 PER 和 CRY,许多转录因子如 REV-ERB 和 ROR 也参与维持这个反馈通路的正常运行。REV-ERB 通过组蛋白去乙酰化酶(HDAC)来负调节 BMAL1 的转录;而 ROR 则可以激活 BMAL1 的转录。生物钟系统内各个成员协调作用,有序调节下游的钟控基因,为许多生理信号的活动提供时钟信息,使全身各系统有序运行^[1-6]。

研究发现,在整个基因组中 10%~20% 的基因呈现出昼夜节律性表达^[7-8]。 α -Klotho 作为抗衰老基因在 1997 年被首次发现^[9], α -Klotho 敲除小鼠表现为早衰症状。目前已发现 α -Klotho 是 FGF23 的共受

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81272602);江苏省高校优势学科建设工程(JX10231801)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jwuny@njmu.edu.cn

体,在维持钙磷代谢平衡方面起重要作用^[10-12]。而其同家族基因 β -klotho 则在 2000 年被首次发现,其主要在肝脏、白色脂肪、骨骼肌内表达^[11]。现在已经证实, β -klotho 作为 FGF-15 和 FGF21 的共受体发挥作用^[10,12]。FGF15 在胆汁的合成代谢中发挥着重要作用。在 β -klotho 敲除小鼠中, *CYP7A1* 基因的合成增加,相应的胆汁酸合成也增加^[13]。而 FGF21 作为一种功能广泛的内分泌因子,参与许多与能量代谢有关的过程,如糖摄取、白色脂肪组织中脂类的分解、肝酮体的生成^[14-15]。大量研究也证实生物节律与糖脂代谢有着密切的联系^[3,6,16-17]。这些研究提示 β -klotho 与生物钟之间或许存在着某些相互联系。

本实验旨在研究 β -klotho 与生物钟的关系,并初步探讨核心生物钟元件对于 β -klotho 的调节作用,为更深入研究 β -klotho 基因的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

C57BL6 小鼠购自于南京青龙山动物繁殖场, *Bmal1* 敲除小鼠购自南京大学模式动物中心。

DMEM 高糖培养基 (Life technologies 公司, 美国); 反转录试剂盒和 SYBR Premix EX Taq (TaKaRa 公司, 日本); 抗 β -klotho 抗体 (R&D 公司, 美国); 抗 GAPDH 抗体 (Santa Cruz 公司, 美国); HRP 标记的二抗 (Santa Cruz, 美国); Trizol 和 Lipofectamine™ 2000 (Gibco-Invitrogen 公司, 美国); pcDNA3-CLOCK 和 pcDNA3-BMAL1 质粒及人肝癌细胞株 HepG2 由南京师范大学生命科学院刘畅教授提供; RT-PCR 仪 (Eppendorf, 德国); 蛋白电泳仪 (R10-RAD 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备及分组

选取置于标准环境中饲养的(自由取食, 恒温恒湿 12 h 光/暗周期环境中) 2~3 个月龄的 C57/BL6J 小鼠。从给予光照 1 h (ZT1) 开始每隔 4 h 拉颈处死一批(每批 ≥ 5 只小鼠), 收集组织样本, 共持续 24 h。

1.2.2 质粒转染

将处于对数生长期的 HepG₂ 细胞用胰酶消化, 接种于 6 孔板中培养至密度达 60%, 转染方法按说明书, 培养 36 h 后, 收集细胞, 提取总 RNA。

1.2.3 血清休克实验

细胞水平上的生物钟研究采取通用的血清休克法^[18]。HepG₂ 细胞用含 50% 马血清培养基培养刺激

2 h 后, 更换无血清培养基继续培养, 每 4 h 收集 1 次, 提取总 RNA。

1.2.4 实时定量 PCR

应用 TRIzol 提取总 RNA 后, 用 TaKaRa 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 进行实时定量 PCR, 所需引物序列为: 人 β -klotho 上游: 5'-AATGGCAGGATGCTTACACC-3', 下游: 5'-ATTCAGTGACACCCAGGAG-3'; 人 BMAL1 上游: 5'-GTAACCTCAGCTGCCTCGTC-3', 下游: 5'-TAGCTGTTGCCCTCTGGTCT-3'; 人 β -actin (内参) 上游: 5'-CA-CC-CACACTGTGCCCATCTACGA-3', 下游: 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'; 鼠 β -klotho 上游: 5'-GCCTTTGACGCTACAGGAAG-3', 下游: 5'-CATGCATACCTGTGCCAAAC-3'; 鼠 ARPPPO (内参) 上游: 5'-GAAACTGCTGCCTCAAG-3', 下游: 5'-GCTGGCACAGTGACCTCACACG-3'; 鼠 BMAL1: 上游: 5'-AGTAGGTCAGGGACGGAGGT-3', 下游: 5'-TGAAGTCGCTGATGGTTAG-3'。实时定量 PCR 程序设计为: 94°C, 1 min; 94°C, 15 s; 60°C, 5 s; 72°C, 10 s。循环 40 次。

1.2.5 蛋白质提取及免疫印迹

小鼠肝脏蛋白提取及电泳方法如参考文献 [19-20], 抗 β -klotho 抗体以 1:500 浓度稀释, 4°C 反应过夜, 二抗室温反应 1 h, 化学发光后曝光显影。

1.3 统计学方法

所有实验结果均重复 3 次。统计学分析数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS13.0 软件分析处理, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

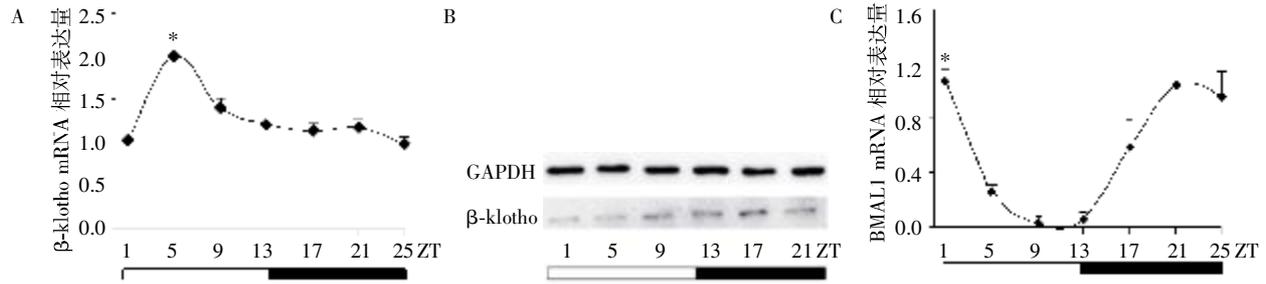
2.1 β -klotho 在小鼠肝脏中呈现节律性表达

小鼠肝脏 β -klotho 表达呈现明显的节律性, 表达的峰值和谷值分别在 ZT5 和 ZT25, 峰值大约是谷值的 2 倍 (图 1A)。 β -klotho 的蛋白表达同样呈现节律性 (图 1B)。小鼠肝脏 BMAL1 的表达也呈现节律性 (图 1C)。

2.2 β -klotho 在 HepG₂ 细胞中呈现节律性表达

HepG₂ 细胞进行血清休克后, 检测细胞水平 β -klotho 24 h mRNA 表达量。结果显示 β -klotho 呈现显著的振荡性表达, 峰值在血清刺激后 16 h, 谷值在 4 h, 峰值表达量是谷值的 4 倍 (图 2A)。细胞水平 BMAL1 也呈现节律性表达 (图 2B)。

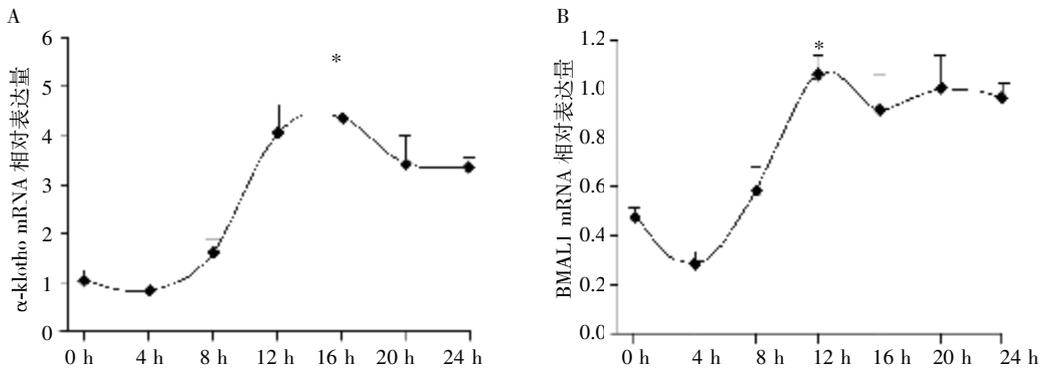
2.3 BMAL1 和 CLOCK 协同激活 β -klotho 的转录



A: Real-time PCR 检测小鼠肝脏 β -klotho 的节律性表达,与 ZT25 比较, $*P < 0.01$; B: 小鼠肝脏 β -klotho 蛋白的节律性表达; C: BMAL1 在小鼠肝脏中的节律性表达;与 ZT9 比较, $*P < 0.01$ 。

图 1 β -klotho 在小鼠肝脏中的节律性表达

Figure 1 β -klotho displays circadian expression in mouse liver



A: HepG₂ 细胞经血清休克, Real-time PCR 检测 β -klotho 不同时间点的表达量,与 0 h 比较, $*P < 0.01$; B: HepG₂ 细胞血清休克后, BMAL1 呈现节律表达;与 4 h 比较, $*P < 0.01$ 。

图 2 β -klotho 在体外试验呈现节律性表达

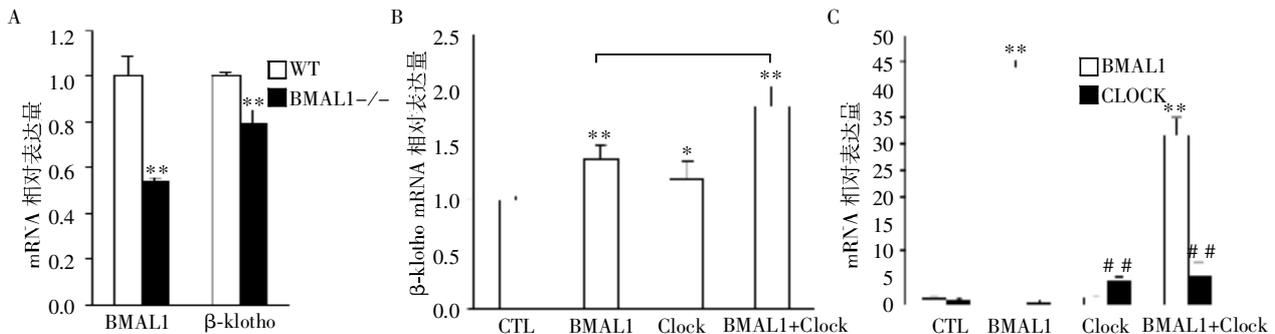
Figure 2 β -klotho shows circadian rhythmic expression in vitro

为探讨核心生物钟基因 BMAL1 和 CLOCK 与 β -klotho 的关系,本实验在 BMAL1 敲除小鼠的肝脏中检测 β -klotho 的表达量,与正常小鼠相比, β -klotho 的表达量在敲除小鼠中降低 (图 3A)。而在 HepG₂ 细胞中分别转染 BMAL1 和 CLOCKK 表达质粒, β -klotho 的表达量增加;且共同转染 BMAL1 和 CLOCK 的质粒后,与单独转染 BMAL1 质粒相比, β -

klotho 的表达量显著提高 (图 3B)。

2.4 β -klotho 的同家族基因及下游基因在小鼠肝脏组织中呈现节律表达

在小鼠肝脏组织中检测 β -klotho 同家族基因 α -klotho 及下游基因胆固醇 7 α -羟化酶 (CYP7A1) 24 h 的表达情况。结果显示, α -klotho 在小鼠肝脏组织中未能检测出其振荡表达节律性 (图 4A),但在大

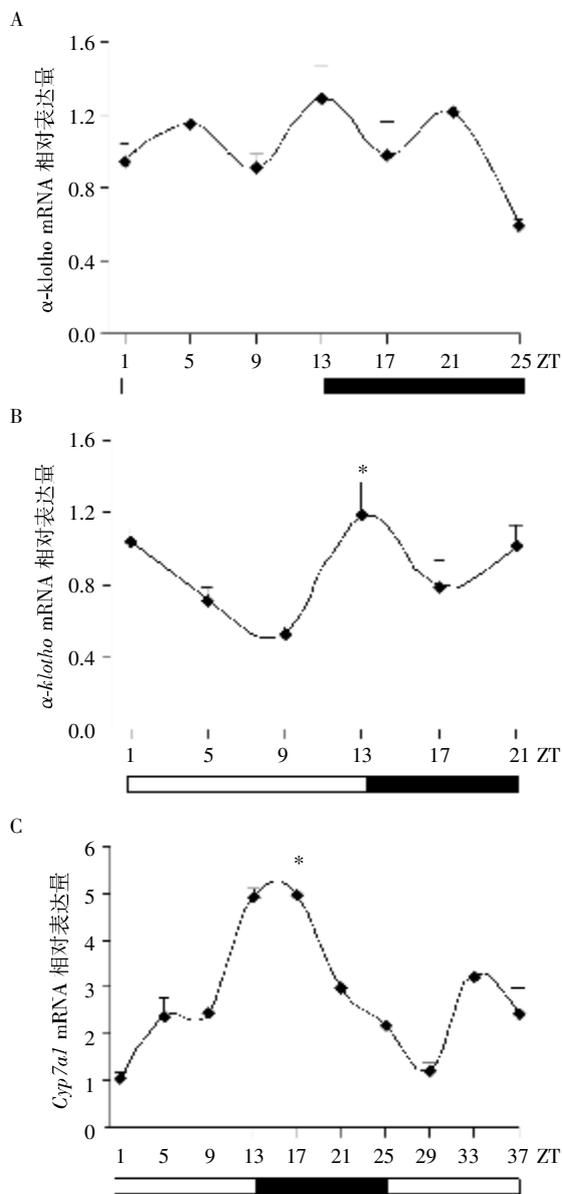


A: Real-time PCR 检测 BMAL1 敲除鼠肝脏 β -klotho 及 BMAL1 的表达量,与 WT 比较, $*P < 0.01$; B: BMAL1 和 CLOCK 协同激活 β -klotho 的转录; C: B 图中 4 组中 BMAL1 和 CLOCK 的转染效率。与 CTL 组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $##P < 0.01$ 。

图 3 BMAL1 和 CLOCK 协同激活 β -klotho 的转录

Figure 3 BMAL1 and CLOCK coordinately activate β -klotho transcription activity

鼠肝脏中则呈现明显节律性(图 4B);CYP7A1 呈现典型的节律性表达(图 4C)。



A:小鼠肝脏中 α -klotho 的节律性表达;B:大鼠肝脏中 α -klotho 的节律性表达;C:肝脏组织中 CYP7A1 的节律性表达。与 ZT1 比较, * $P < 0.01$ 。

图 4 β -klotho 同家族基因 α -klotho 及下游基因 CYP7A1 的振荡表达情况

Figure 4 The oscillation patterns of the family gene α -klotho and downstream gene CYP7A1 of β -klotho

3 讨论

目前,生物钟的重要作用受到了越来越多的关注。生物钟系统参与了几乎所有的生理活动和行为过程,如睡眠觉醒、饮食行为、代谢及内分泌活动等。研究发现 10%~20% 的基因的表达呈现节律性,受到生物钟基因的调控。本研究首次发现 β -klotho 也呈

周期性振荡表达,是一个新的钟控基因。在肝脏组织中, β -klotho 表达峰值和谷值分别为 ZT5 和 ZT25,且峰值的表达量是谷值的 2 倍。血清休克实验是诱导生物钟基因或生物钟调控基因呈现节律表达的经典实验。在肝癌细胞 HepG₂ 细胞中进行了血清休克实验,在细胞水平证实了 β -klotho 基因呈现出明显的节律表达。

BMAL1 和 CLOCK 作为核心生物钟基因,通过作用与靶基因的 E-box 区域来激活转录,参与对其下游靶基因基因的调节。本实验试图了解 BMAL1/CLOCK 对 β -klotho 表达的调控作用。在 HepG₂ 细胞中转染 BMAL1 和 CLOCK 质粒, β -klotho 的表达量显著增加,且与单独过表达 BMAL1 或 CLOCK 时相比,共转 BMAL1 及 CLOCK 的激活作用更明显。这一结果表明 BMAL1 或许可以激活 β -klotho 转录表达,且在 CLOCK 的协同作用下激活作用可以更显著。同时检测 BMAL1 敲除小鼠肝脏中 β -klotho 的表达情况,发现 β -klotho 的表达受到了一定的抑制。这些结果表明,BMAL1 和 CLOCK 对 β -klotho 的表达有正向调节作用。与之相应,人源 β -klotho 启动子区域存在着经典的 E-box 基因序列,提示 BMAL1 和 CLOCK 有可能形成异二聚体结合到 β -klotho 的启动子上来调节其表达。

同时,本研究对于 β -klotho 同家族基因 α -klotho 的表达也进行了初探。或许由于肝脏并不是 α -klotho 高表达组织,所以在小鼠的肝脏中 α -klotho 的表达并未出现明显的振荡节律性。但是值得注意的是,在大鼠的肝脏中, α -klotho 则表现出明显的周期振荡节律性,且其表达量明显高于小鼠的肝脏组织。出现这种现象的原因也许是由于种属的差异性造成的,但是具体的原因还有待于进一步研究。作为 β -klotho 的下游基因,CYP7A1 是促使胆固醇转化成胆酸的限速酶,对维持体内胆固醇代谢平衡起到关键作用。本实验对于 β -klotho 的下游基因 CYP7A1 的表达情况进行检测。发现 CYP7A1 表现出明显的振荡性,峰值表达量大约是谷值的 5 倍,且其峰值表达量在 ZT17,而其上游基因 β -klotho 的表达峰值在 ZT5,提前于 CYP7A1 12 h。这些结果提示, β -klotho 是一个受生物钟基因调控的基因,且其振荡模式与其生理作用密切相关。

综上所述, β -klotho 作为 FGF19 及 FGF21 的共受体,在糖脂代谢稳态中发挥着重要的作用。生物钟系统与糖脂代谢系统关系密切,相互影响。本实验初步证实 β -klotho 是一个钟控基因,生物钟核心元件

BMAL1 和 CLOCK 也对 β -klotho 有一定的调节作用。 β -klotho 或可为生物钟系统与糖脂代谢系统两者之间复杂关系的研究提供一个新的靶点,但与生物钟系统的关系还需进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Turek FW,Joshu C,Kohsaka A,et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian clock mutant mice[J]. Science,2005,308(5724):1043-1045
- [2] Bass J,Takahashi J S. Circadian integration of metabolism and energetics[J]. Science,2010,330(6009):1349-1354
- [3] Froy O. Metabolism and circadian rhythms--implications for obesity[J]. Endocrine Reviews,2010,31(1):1-24
- [4] Kwon I,Choe HK,Son GH,et al. Mammalian molecular clocks [J]. Experimental Neurobiology,2011,20(1):18-28
- [5] Reppert S M,Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals[J]. Nature,2002,418(6901):935-941
- [6] Huang WY,Ramsey KM,Marcheva B,et al. Circadian rhythms, sleep, and metabolism[J]. The Journal of Clinical Investigation,2011,121(6):2133-2141
- [7] Panda S,Hogenesch JB,Kay SA. Circadian rhythms from flies to human[J]. Nature,2002,417(6886):329-335
- [8] Durgan DJ,Young ME. Linking the cardiomyocyte circadian clock to myocardial metabolism [J]. Cardiovascular Drugs and Therapy,2008,22(2):115-124
- [9] Kuro-o M. klotho and β -klotho [J]. Adv Exp Med Biol,2012,728(1):25-40
- [10] Long YC,Kharitonov A. Hormone-like fibroblast growth factors and metabolic regulation[J]. Biochim Biophys Acta,2011,1812(7):791-795
- [11] Ito S,Kinoshita S,Shiraishi N,et al. Molecular cloning and expression analyses of mouse β -klotho,which encodes a novel Klotho family protein [J]. Mechanisms of Development,2000,98(1-2):115-119
- [12] Tomiyama K,Maeda R,et al. Relevant use of klotho in FGF19 subfamily signaling system in vivo [J]. PNAS,2010,107(4):1666-1671
- [13] Ito S,Fujimori T,Furuya A,et al. Impaired negative feedback suppression of bile acid synthesis in mice lacking β Klotho [J]. The Journal of Clinical Investigation,2005,115(8):2202-2208
- [14] Christodoulides C,Dyson P,Sprecher D,et al. Circulating fibroblast growth factor 21 is induced by peroxisome proliferator-activated receptor agonists but not ketosis in man [J]. J Clin Endocrinol Metab,2009,94(9):3594-3601
- [15] Holland WL,Adams AC,Broznick JT,et al. An FGF21-adiponectin-ceramide axis controls energy expenditure and insulin action in mice [J]. Cell Metabolism,2013,17(5):790-797
- [16] Chrościcki P,Usarek M,Bryla J,et al. The role of biological clock in glucose homeostasis [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2013,67:569-583
- [17] Kennaway DJ,Varcoe TJ,Voultios A,et al. Global loss of bmal1 expression alters adipose tissue hormones, gene expression and glucose metabolism [J]. 2013,8(6):e65255
- [18] Balsalobre A,Damiola F,Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells[J]. Cell,1998,93(6):929-937
- [19] Liu C,Li SM,Liu TC,et al. Transcriptional coactivator PGC-1 α integrates the mammalian clock and energy metabolism[J]. Nature,2007,447(7143):477-481
- [20] Rydén M,Jocken J,Harmelen VV,et al. Comparative studies of the role of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase in human fat cell lipolysis[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab,2007,292(6):E1847-E1855

[收稿日期] 2013-07-30