

脂蛋白脂酶缺失症基因治疗载体的构建及功能验证

王恺龙¹ 郑李彬¹ 张帆¹ 沈良才¹ Libby Andrew² 李旭丽³ 张瑾^{1*}

(¹河北科技师范学院生命科技学院, 秦皇岛 066004; ²Division of Endocrinology, University of Colorado, Colorado 80045, USA; ³秦皇岛市第三医院, 秦皇岛 066000)

摘要 脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)是甘油三酯分解的限速酶, *LPL*基因缺失会引起高脂血症, 虽然发病率低, 但到目前为止, 尚无有效治疗手段。该文构建了用于纠正*LPL*缺失基因型的逆转录病毒载体MSCV-hLPL, 结果表明, MSCV-hLPL可以高效侵染体外培养的细胞系C2C12、HEK293和3T3-L1, 并且都可以产生具有活性的脂蛋白脂酶。利用MSCV-hLPL侵染后的C2C12、HEK293和3T3-L1, 分别注射到裸鼠皮下组织, 发现C2C12和3T3-L1可以分泌脂蛋白脂酶到临近的肌肉组织中, 显著提高LPL活性。以上工作证明, 基因治疗载体可以纠正脂蛋白脂酶缺失的基因型, 而脂肪细胞和肌肉细胞移植入裸鼠体内后, 均可以作为生物反应器产生具有活性的LPL。这是该领域的一次开拓性尝试, 为脂蛋白脂酶缺失症治疗方法的开发打下了坚实的基础。

关键词 脂蛋白脂酶; 缺失症; 诱导多能干细胞; 基因治疗

Construction and Verification of Gene Therapy Vector for Lipoprotein Lipase Deficiency Disease

Wang Kailong¹, Zheng Libin¹, Zhang Fan¹, Shen Liangcai¹, Libby Andrew², Li Xuli³, Zhang Jin^{1*}

(¹College of Life science and Biotechnology, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao 066004, China; ²Division of Endocrinology, University of Colorado, Colorado 80045, USA; ³The Third Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000, China)

Abstract Lipoprotein lipase (LPL) is the rate limiting enzyme for triglycerides hydrolysis, which catalyses the hydrolysis of the triacylglycerol component of chylomicrons and very low density lipoproteins, thereby providing fatty acids and monoacylglycerol for tissue utilization. *LPL* gene mutation or deletion may affect the activity of LPL, and result in lipid metabolism disorder. Although the LPL deficiency disease is rare, no cure method is developed till now. In this study, the gene therapy construct MSCV-hLPL was made, which could infect muscle cell line (C₂C₁₂), kidney cell line (HEK293T) and pre-adipocyte cell line (3T3-L1) with over 80% efficiency. Nevertheless, active LPL could be detected at the surface of all these three kinds of cells. Then, three types of cells were injected into nude mice, LPL activity increased significantly in the muscle tissues under the injection sites of the 3T3-L1 line. Our results show that MSCV-hLPL could correct the *LPL*^{-/-} genotype and the adipose tissue may be the best tissue for transplantation in the future. This is a ground-breaking test in LPL deficiency treatment field, which lays a good foundation for using iPSC to correct the LPL deficiency.

Key words lipoprotein lipase; deficiency; induced pluripotent stem cell; gene therapy

收稿日期: 2013-01-30 接受日期: 2013-03-29

国家自然科学基金(批准号: 31072004)、河北省自然科学基金(批准号: C2009000871)和河北科技师范学院科研创新团队(批准号: CXTD2012-06)资助的课题

*通讯作者。Tel/Fax: 0335-2039033, E-mail: zhangjin7688@163.com

Received: January 30, 2013 Accepted: March 29, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31072004), the Natural Science Foundation of Hebei Province (Grant No.C2009000871) and the Foundation for Innovative Research Groups of Hebei Normal University of S. & T. (Grant No.CXTD2012-06)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-335-2039033, E-mail: zhangjin7688@163.com

网络出版时间: 2013-06-26 10:27

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130626.1027.001.html>

脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)是脂肪细胞、心肌细胞和骨骼肌细胞合成并分泌的一种糖蛋白^[1-2]。LPL以2个相同的亚基以非共价键结合形成二聚体才表现出活性^[3], LPL二聚体的肝素结合位点与毛细血管内皮细胞表面的硫酸乙酰肝素糖蛋白(sulfuric acid heparan glycoprotein, HSPG)结合, 锚定于毛细血管内皮细胞表面^[4-5], 并使其伸展进入血浆之中, 水解血液中乳糜微粒(chylomicron, CM)和极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)中的甘油三酯(triglyceride, TG), 供给机体脂肪酸和单酰甘油^[6-7]。所以, LPL是脂类代谢的关键酶^[2]。当LPL脂解功能缺陷时, 会引起极度高甘油三酯血症(血浆中甘油三酯含量为11 mmol/L, 正常人低于1.7 mmol/L), 其血浆呈牛奶样乳白色, 甘油三酯含量是正常人的近10倍^[8]。正常饮食条件下, 患者可表现反复发作腹痛、肝脾大、急性胰腺炎、脂性视网膜炎、皮肤疹性黄瘤和空腹乳糜微粒血症, 通常童年时期即发病, 病人需严格控制饮食, 生活质量低下^[9-10]。

LPL基因的遗传缺陷是血浆LPL活性下降(丧失)的最主要原因^[2], 这是一种常染色体隐性遗传病, 至今没有治愈方法^[11]。本课题组与美国科罗拉多大学丹佛分校合作, 拟开发诱导多能干细胞技术治疗LPL缺失症的技术, 首先利用小鼠模型验证这个思路的可行性, 流程如下: 从LPL缺失的小鼠模型体内分离成纤维细胞, 利用诱导多能干细胞技术(通过导入2-4种转录因子, 使其重新程序化)获得LPL缺失型干细胞, 然后利用携带LPL基因的基因治疗载体纠正干细胞的LPL基因型, 接下来把此干细胞分化成能高效产生具有活性LPL的组织, 移植回原小鼠体内, 期望能够治愈LPL缺失症, 且避免了异体移植带来的免疫排斥问题, 具有很好的临床应用前景。目前, 将成纤维细胞重新程序化, 变成诱导多能干细胞的技术已经日趋成熟^[12]。所以本项目的关键点有两个: 第一, 需要构建纠正干细胞LPL缺失基因型的基因治疗载体; 第二, 筛选能够高效分泌重组LPL的靶组织, 作为干细胞分化的目标组织。本文成功构建了逆转录病毒载体MSCV-hLPL, 可以高效感染多种类型的细胞并能分泌有活性的LPL, 此外, 还确定了脂肪组织和肌肉组织可以携带外源LPL基因, 移植后可以在小鼠体内稳定分泌LPL到临近组织中。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、受体菌及实验小鼠 逆转录病毒载体MSCV-IRES-GFP(<http://www.addgene.org/20672/>)及其病毒包装辅助质粒pCL-Eco(<http://www.addgene.org/12371/>)由科罗拉多大学丹佛分校Dennis Roop教授惠赠, 带有人源LPL的cDNA序列的载体pSK-hLPL由科罗拉多大学丹佛分校Robert Eckel教授惠赠。受体菌*E.coli* Top10购自Invitrogen公司。小鼠前脂肪细胞系3T3-L1、小鼠成肌细胞系C2C12和人源胚胎的肾细胞系HEK293由本实验室保存。*Foxn1*^{-/-}裸鼠购自杰克逊实验室(Jackson Laboratory)。

1.1.2 酶和主要生化试剂 高保真DNA聚合酶phusion及所有限制性内切酶均购自New England Biotechnology公司, 氨苄青霉素、胎牛血清、DMEM培养基购自Sigma公司, T4 DNA连接酶购自Invitrogen公司, DNA回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒及大量提取试剂盒购自Qiagen公司。

1.2 方法

1.2.1 基因治疗载体MSCV-hLPL的构建 以pSK-hLPL为模板, 设计带有*Xho* I和*Eco*R I酶切位点的克隆引物(带有终止子)F1和R1(表1), PCR扩增后, 产物经过纯化后过夜双酶切, 琼脂糖凝胶电泳后, 利用凝胶DNA回收试剂盒回收, 利用*Xho* I和*Eco*R I酶对逆转录病毒载体MSCV过夜双酶切, 琼脂糖凝胶电泳后, 利用凝胶DNA回收试剂盒回收, 插入片段(hLPL)与酶切后载体(MSCV)摩尔比3:1混合, 利用T4DNA连接酶16 °C过夜连接, 热激法转化Top10 *E.coli*感受态细胞, 在MSCV多克隆位点上游和下游分别设计引物F2和R2(表1), 作为菌落PCR鉴定引物和测序引物, 筛选得阳性克隆, 提取质粒后送测序。

1.2.2 病毒的包装和侵染 利用phenix-ECO细胞

表1 本实验所用引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')
Primer name	Primer sequence(5'→3')
hLPL-F1	ATC CGC <u>TCG AGA</u> TGG AGA GCA AAG CCC TGC
hLPL-R1	CCG <u>GAA TTC</u> TCA GCC TGA CTT CTT ATT CAG AGA C
MSCV-F2	CCC TTG AAC CTC CTC GTT CGA CC
MSCV-R2	CAT ATA GAC AAA CGC ACA CCG GC

下划线碱基是添加的*Xho* I和*Eco*R I限制性酶切位点。

The underlines indicate the restriction sites of *Xho* I and *Eco*R I.

系,通过氯化钙法制备病毒悬液(http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html 2012-04-21)。3T3-L1、C2C12和HEK293细胞系均采用10% FBS的DMEM培养基,当细胞生长至培养皿70%时,向培养液添加千分之一体积的1% polyborane溶液,以培养液与病毒悬液5:1的比例添加病毒悬液,轻轻晃动混匀,8 h后换液;次日再次以相同比例添加病毒悬液,8 h后换液。培养48 h,收获细胞。采用放射性同位素法分析了LPL活性,以MSCV空载体侵染为对照。

1.2.3 体外培养细胞LPL活性分析 细胞表面的LPL活性分析: 吸出培养液,加入预冷的0.4 mL肝素盐溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)和0.6 mL DMEM培养液,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置10 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,上清用于测量;细胞内LPL活性分析: 用含2 mg/mL胶原酶的PBS洗下上述培养皿中感染后24 h的细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心。细胞沉淀重悬于0.6 mL抽提液(8 g/L Triton X-100、0.4 mg/L SDS、32.5 $\mu\text{g/L}$ 肝素、5 mmol/L EDTA于pH7.4的50 mmol/L磷酸盐缓冲液)中,反复吹打混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,取上清液,采用放射性同位素标记法测定LPL活性分析^[13-14]。方法如下: 取0.5 mL待测样,加入100 $\mu\text{g/mL}$ 肝素0.1 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴震荡45 min,做平行样。取出100 μL 后,加入100 μL ^{14}C 标记的三油酸甘油酯作为底物,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴45 min,通过测定 ^{14}C 标记的自由脂肪酸含量(^{14}C 标记的油酸作为提取率的内标)^[15],用自由脂肪酸的nmol/min表示该细胞培养物的总LPL的活性。在细胞总数接近的情况下,将总LPL活性计为LPL相对活性,用于不同细胞间LPL活性对比分析。

1.2.4 注射裸鼠及重组hLPL活性分析 分别收获MSCV-hLPL侵染后的3T3-L1、C2C12和HEK293细胞于PBS中,调整细胞浓度在 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 之间,皮下注射裸鼠臀部,每只裸鼠注射左右两点,每注射点0.25 mL细胞。MSCV空载体侵染的细胞注射作为空白治疗组(blank treatment group)。注射后12~20 d,分批处死裸鼠采样。处死前禁食4 h,麻醉小鼠(2,2,2-tribromoethanol, 250 mg/kg),立刻解剖取样,每只裸鼠以自身未注射部位(前腿背部)的皮肤和肌肉作为对照,分析注射部位与对照部位LPL活性差异。利用放射性同位素标记法分析注射部位皮肤和肌肉中LPL活性,流程如下: 组织样在KRPD缓冲液(130 mmol/L NaCl、5 mmol/L KCl、1.27 mmol/L MgSO_4 、0.95 mmol/L CaCl_2 、5 mmol/L glucose、10 mmol/L

$\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH7.4)中剪成约2~4 mm^3 的小块,称取40~70 mg放于0.4 mL KDRP缓冲液中,加入15 $\mu\text{g/mL}$ 肝素,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴震荡45 min,做平行样,测量方法同上。用自由脂肪酸的纳摩尔数/分钟表示LPL的活性,以每10 mg样本中的LPL总活性代表相对活性,对比不同类型注射后分泌LPL的情况。

2 结果

2.1 成功构建了基因治疗载体MSCV-hLPL

以载体pSK-hLPL为模板,PCR扩增后,产物经琼脂糖凝胶电泳检测可见一条约1.4 Kb大小的单一一条带,与预计扩增的hLPL编码区大小相符(图1)。将该产物回收后,通过EcoR I和Xho I酶切位点克隆入MSCV载体,利用菌落PCR筛选阳性克隆,获得基因治疗载体MSCV-hLPL。

2.2 肌肉细胞系C2C12、肾脏细胞系HEK293和前脂肪细胞系3T3-L1在体外可以高效产生LPL

利用病毒包装体系phoenix-Eco,通过氯化钙转染法包装病毒MSCV-hLPL,获得病毒悬液。经过优化实验发现,病毒悬液与细胞培养液1:5(V/V)可以高效侵染各种类型细胞。

目前认为,动物体内LPL主要是由脂肪细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞产生的^[2],但本课题组研究发现,小鼠皮肤和肾脏也能够表达LPL。基于这些信息,本研究选择了体外培养的肌肉细胞(C2C12细胞系)、肾脏细胞(HEK293)和前脂肪细胞(3T3-L1)进行了病毒侵染实验,筛选能够高效分泌LPL的组织类型。

在病毒侵染后第4天,各种细胞内均表达了绿色荧光蛋白,说明三种细胞都可以被高效侵染(图

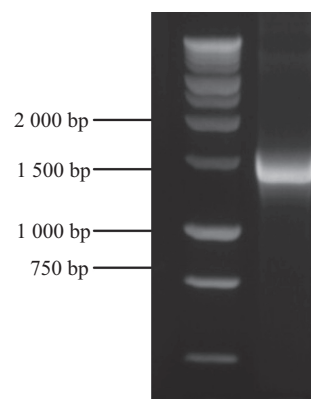
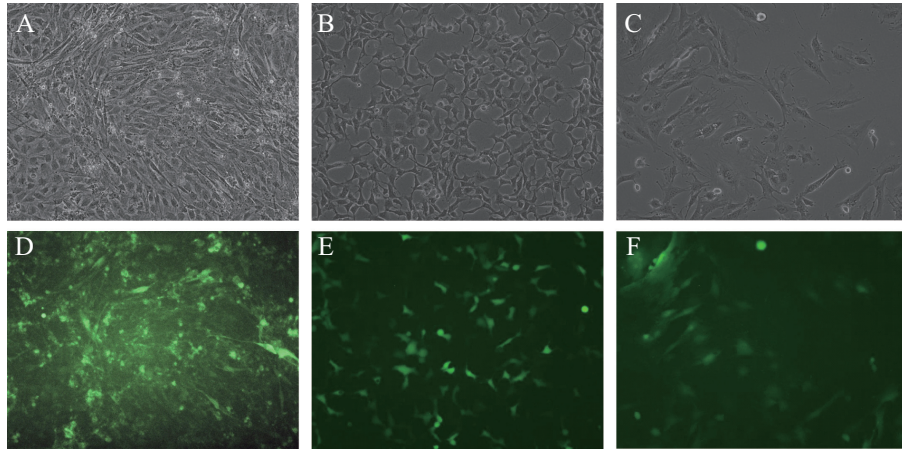


图1 PCR扩增带有终止子的人源LPL编码区

Fig.1 Human LPL coding sequence with stop codon was amplified by PCR



A,D: 小鼠肌肉细胞系C2C12; B,E: 小鼠前脂肪细胞系3T3-L1; C,F: 人胚肾细胞系 HEK293。

A,D: mouse myoblast cell line C2C12; B,E: mouse preadipocytes cell line 3T3-L1; C,F: human embryonic kidney cell line HEK293.

图2 MSVC-hLPL转染各种细胞后EGFP表达效果

Fig.2 Expression of EGFP in cells transfected with MSVC-hLPL

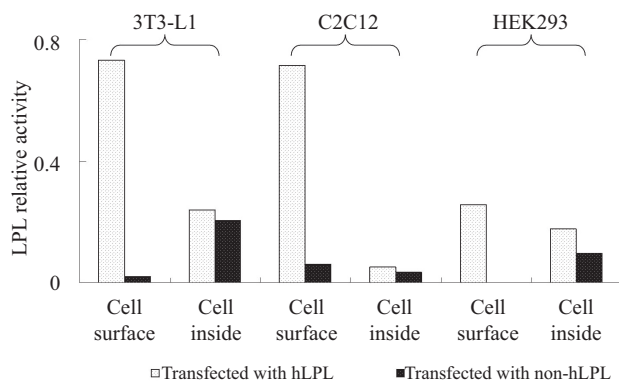
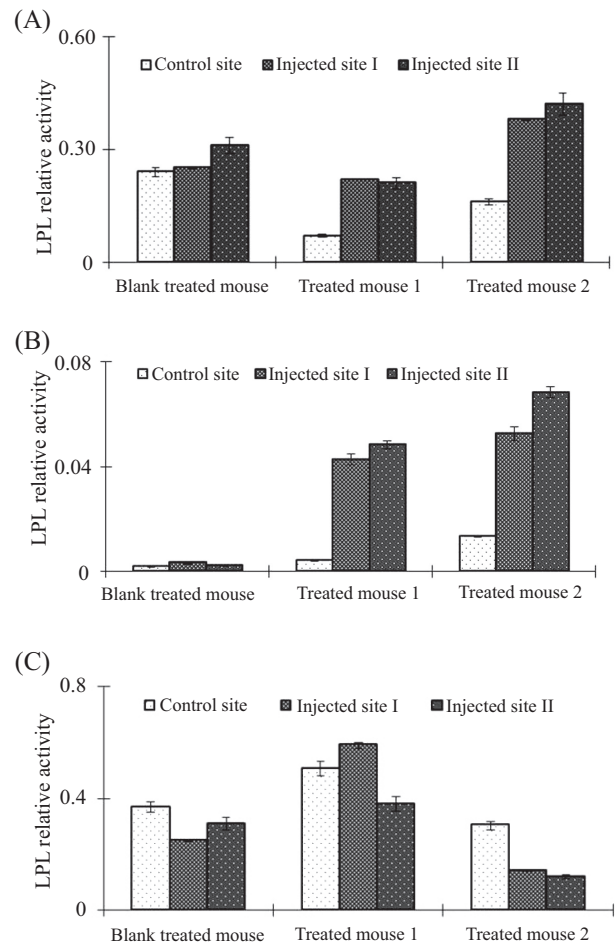


图3 三种类型细胞在MSCV-hLPL侵染4天细胞表面和细胞内部LPL活性变化分析

Fig.3 LPL activity assay of 3 cell lines(cell membrane and inside) transfected with MSCV-hLPL 4 days after infection

2)。利用放射免疫法,分析病毒浸染后各种细胞表面和胞内LPL活性变化(图3)。三种细胞表面LPL活性均显著高于对照组,其中,3T3-L1增加倍数最高(36倍),而且相对活性也最高,达到0.73; C2C12增加了12倍,相对活性达到0.71;而HEK293对照组未检测到LPL活性,所以无法计算增加倍数,但转染后细胞LPL相对活性也达到0.26。三种细胞内部的LPL活性变化均不显著。以上结果说明,这三种细胞不仅可以高效产生重组脂蛋白脂酶,而且还能够分泌到细胞表面,这是脂蛋白脂酶发挥功能的必要条件,说明三种细胞均可以作为生物反应器来生产重组LPL。

2.3 前脂肪细胞系3T3-L1在体内可以作为LPL的反应器



A: 注射细胞系C2C12; B: 注射细胞系3T3-L1; C: 注射细胞系 HEK293。

A: injected with C2C12; B: injected with 3T3-L1; C: injected with HEK293.

图4 裸鼠注射部位组织LPL活性分析

Fig.4 LPL activity analysis of the injection sites of the nude mice

收集上述三种细胞, 分别注射到裸鼠皮下, 每点注射细胞量为 1×10^7 左右(通过血球计数板估算), 每只小鼠注射两个部位, 每种细胞注射三只裸鼠, 其中一只作为空白治疗组(blank treatment group), 即注射转染MSCV空载体的细胞, 另两只作为治疗组(treated mouse 1 & 2)。3~5 d采血一次, 12 d处死注射HEK293的小鼠, 16 d处死注射C2C12的小鼠, 20 d处死注射3T3-L1的小鼠。

解剖发现, 注射细胞在裸鼠体内已经形成了一个独立性很强的细胞团。通过对各小鼠注射点上方的皮肤和下方的肌肉中LPL活性分析, 发现注射点的皮肤组织LPL活性无规律性变化, 推断注射细胞不能分泌LPL至上方的皮肤组织中。注射点下方的肌肉组织LPL变化见图4, 其中, 图4A为注射C2C12细胞的小鼠, 结果表明空白治疗小鼠注射部位LPL活性与对照部位差异不显著, 而治疗小鼠注射点下方肌肉组织LPL活性升高3倍左右; 图4B为注射3T3-L1的小鼠, 空白治疗小鼠注射部位LPL活性与对照部位差异不显著, 而治疗小鼠注射点下方肌肉组织LPL活性升高超过5倍; 图4C为注射HEK293组, 治疗组和对照组差异不显著。以上结果表明, 脂肪细胞和肌肉细胞都可以在小鼠体内高效分泌重组LPL至邻近肌肉组织中, 可以用于移植来环节甚至治疗LPL缺失症。

3 讨论

2006年, 日本学者Yamanaka首次报到了诱导多能干细胞(iPSC)技术^[16]。近年来, 由于其在再生医学领域潜在的应用前景, 引起多国学者和商业集团的关注, 中国学者于2009年证明了小鼠iPSC具有全能性^[17-18], 在iPSC研究领域迈出了坚实的一步。虽然iPSC还存在诱导效率低、重新程序化不完全、病毒载体潜在生物安全等问题^[19], 但相信随着技术的进步, 这些问题都会迎刃而解。但如何将iPSC技术应用到临床医学, 是目前科研工作的需要认真思考的。最初, 人们期望通过iPSC在体外培育出组织器官, 然后进行器官移植, 但这个领域的研究进展缓慢。本项目拟利用iPSC技术对单基因遗传性疾病LPL缺失症的治疗进行研究, 虽然该病发病率仅为百万分之一^[2](患者数量并不多), 但对其进行研究具有双重意义, 首先这些患者的生活质量受到这种疾病的严重影响, 他们需要社会给予关爱和帮助; 另外, LPL缺

失症作为单基因遗传疾病, 具有重大的科学研究意义。如果利用iPSC技术治疗LPL缺失症取得成功, 其研究策略可以供其他单基因遗传疾病借鉴。

本项目构建了基因治疗载体MSCV-hLPL, 基因治疗载体需要具有较高的浸染效率, MSCV是经过改造的逆转录病毒载体(<http://www.addgene.org/18770/>), 与腺病毒载体相比, 此载体不仅可以浸染大多细胞系、原代细胞, 还能浸染干细胞, 而且不影响干细胞的分化。本项目计划纠正LPL基因缺失型的诱导多能干细胞, 然后令其分化为能高效分泌LPL的组织类型, 所以载体MSCV非常符合本项目的要求。虽然逆转录病毒载体具有潜在诱导癌变或引起细胞凋亡的风险, 但本项目首要任务是证明LPL基因缺失型的可治愈性, 所以并未对病毒载体潜在的风险进行评估。而且随着基因治疗研究的不断发展, 相信更安全、高效的载体很快就会问世。

LPL基因在动物体内多种类型的细胞中表达, 但真正供给体内LPL的组织是脂肪组织、骨骼肌组织和心肌组织, 但利用体外培养的细胞, 能否合成并分泌有活性的LPL, 此前未见报道。本研究首次证明体外培养的C2C12、3T3-L1和HEK293都能够合成并分泌有活性的重组LPL, 其中利用3T3-L1细胞分泌的LPL活性增加了36倍, 在三种类型细胞中居首。虽然利用逆转录病毒载体很难对目的基因的表达量进行调控, 但这对本项目没有任何影响。因为我们希望重组LPL表达量越高越好, 原因有二, 首先细胞移植到活体动物体内, 因为移植细胞量相对较少, 所以其产生的影响LPL对于动物体来说, 是比较小的(图4); 其次, 活体动物内对于LPL的活性, 有一系列的激活和调控, 所以单纯的表达量增高(或者说表达过量)对动物体不会产生负面影响。

最后, 利用裸鼠模型进行了细胞注射实验, 当解剖裸鼠注射部位时, 发现注射细胞在皮肤下已经形成一个独立性很强的组织团, 对组织团和其上方的皮肤组织及下方的肌肉组织进行LPL活性分析, 发现C2C12和3T3-L1都可以在体内分泌有活性的LPL到邻近肌肉组织中, 提高邻近组织中LPL活性, 而其上方的皮肤组织中LPL活性变化不显著。虽然对裸鼠血液分析, 并未发现治疗组与空白组存在显著差异, 这可能是因为裸鼠自身是能够生产LPL的, 通过注射细胞产生的重组LPL的量较少, 在裸鼠自身生产的LPL的背景下, 无法检测到。因此, 本研究

采用了双重对照的研究方法,即每只裸鼠注射点与自身未注射点进行比较,这样就排除了裸鼠个体差异对实验结果的影响,另外采用了空白治疗小组作为阴性对照,通过分析空白治疗小鼠注射部位LPL活性与未注射部位LPL活性,排除注射细胞对小鼠LPL分泌的影响。通过这样的双重对照设计,检测到了重组细胞分泌LPL到邻近肌肉组织中的现象。这样的结果足以证明通过细胞移植的方案,有可能改善甚至治愈LPL缺失症。

以上结果,利用小鼠模型,证明了基因治疗载体可以高效纠正脂蛋白脂酶缺失性状,而脂肪组织和肌肉组织都可以作为移植组织。将未分化的干细胞定向分化为肌肉细胞或脂肪细胞,都是比较成熟的技术^[20-21],而且肌肉细胞和脂肪细胞的移植难度小、易操作、患者痛苦小。以上工作是本领域中的一次开拓性尝试,为利用干细胞治疗脂蛋白脂酶缺失症的治疗方法的开发(目前没有治疗方法)打下了坚实的基础。

致谢

本项目是在河北省人力资源与社会保障厅和美国科罗拉多大学丹佛分校共同资助完成的,实验设计方案由科罗拉多大学丹佛分校Robert Eckel教授提出,MSCV载体由科罗拉多大学干细胞中心主任Dennis Roop教授赠送,在此一并表示感谢。

参考文献 (References)

- 1 Scanu A. Serum high-density lipoprotein: Effect of change in structure on activity of chicken adipose tissue lipase. *Science* 1966; 153(736): 640-1.
- 2 Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: From gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297(2): E271-88.
- 3 Osborne JC, Bengtsson-Olivecrona, Gin Lee NS, Olivecrona T. Studies on inactivation of lipoprotein lipase: Role of the dimer to monomer dissociation. *Biochemistry* 1985; 24(20): 5606-11.
- 4 Lookene A, Chevreuil O, Ostergaard P, Olivecrona G. Interaction of lipoprotein lipase with heparin fragments and with heparan sulfate: Stoichiometry, stabilization, and kinetics. *Biochemistry* 1996; 35(37): 12155-63.
- 5 Klinger MM, Margolis RU, Margolis RK. Isolation and characterization of heparin sulfate proteoglycans of brain: Use of affinity chromatography on lipoprotein lipase-agarose. *J Biol Chem* 1985; 260(7): 4082-90.
- 6 Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G, Osborne JC Jr, Kempner ES. Molecular size of bovine lipoprotein lipase as determined by radiation inactivation. *J Biol Chem* 1985; 260(11): 6888-91.
- 7 Yang R, Le G, Li A, Zheng J, Shi Y. Effect of antioxidant capacity on blood lipid metabolism and lipoprotein lipase activity of rats fed a high-fat diet. *Nutrition* 2006; 22(11/12): 1185-91.
- 8 Albalat A, Saera-Vila A, Capilla E, Gutiérrez J, Pérez-Sánchez J, Navarro I. Insulin regulation of lipoprotein lipase (LPL) activity and expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2007; 148(2): 151-9.
- 9 Augustus A, Yagyu H, Haemmerle G, Bensadoun A, Vikramadithyan RK, Park SY, *et al.* Cardiac-specific knock-out of lipoprotein lipase alters plasma lipoprotein triglyceride metabolism and cardiac gene expression. *J Biol Chem* 2004; 279(24): 25050-7.
- 10 Beigneux AP, Gin P, Davies BS, Weinstein MM, Bensadoun A, Ryan RO, *et al.* Glycosylation of Asn-76 in mouse GPIHBP1 is critical for its appearance on the cell surface and the binding of chylomicrons and lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 2008; 49(6): 1312-21.
- 11 Nampoothiri S, Radhakrishnan N, Schwentek A, Hoffmann MM. Lipoprotein lipase deficiency in an infant. *Indian Pediatr* 2011; 48(10): 805-6.
- 12 Gibson SA, Gao GD, McDonagh K, Shen S. Progress on stem cell research towards the treatment of Parkinson's disease. *Stem Cell Res Ther* 2012; 3(2): 11.
- 13 Basu D, Manjur J, Jin W. Determination of lipoprotein lipase activity using a novel fluorescent lipase assay. *J Lipid Res* 2011; 52(4): 826-32.
- 14 Hosseini M, Ehrhardt N, Weissglas-Volkov D, Lai CM, Mao HZ, Liao JL, *et al.* Transgenic expression and genetic variation of Lmfl affect LPL activity in mice and humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(5): 1204-10.
- 15 Belfrage P, Vaughn M. Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides. *J Lipid Res* 1969; 10: 341-4.
- 16 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
- 17 Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, *et al.* iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 2009; 461(7260): 86-90.
- 18 Wu T, Wang H, He J, Kang L, Jiang Y, Liu J, *et al.* Reprogramming of trophoblast stem cells into pluripotent stem cells by Oct4. *Stem Cells* 2011; 29(5): 755-63.
- 19 Bellin M, Marchetto MC, Gage FH, Mummery CL. Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13(11): 713-26.
- 20 Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, *et al.* Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes *in vitro*. *J Cell Sci* 1997; 110(Pt11): 1279-85.
- 21 Grabowska I, Archacka K, Czerwinska AM, Krupa M, Ciemerych MA. Mouse and human pluripotent stem cells and the means of their myogenic differentiation. *Results Probl Cell Differ* 2012; 55: 321-56.