

# 小鼠 CTSK 敲降重组腺相关病毒的构建及其功能研究

何静, 嵇鑫喆, 邹欣雨, 王梦凡, 王秀云

**摘要** 目的 构建小鼠组织蛋白酶 K (CTSK) 基因的敲降重组腺相关病毒 (AAV-shCTSK), 检测 AAV-shCTSK 在小鼠体内的敲降效率, 及其对脂肪组织脂质储存的影响。方法 设计阴性对照组 (NC) 及 CTSK 的 shRNA 引物, 退火后插入到骨架载体中, 挑选克隆并测序鉴定, 重组质粒经纯化后, 利用转染试剂 PEI 将构建好的腺相关病毒载体、包装质粒和辅助质粒共转染到 293T 细胞中, 进行腺相关病毒包装与扩增, 得到 AAV-shNC 以及 AAV-shCTSK。利用脂肪组织原位注射将 AAV 病毒注射入小鼠附睾脂肪组织, 2 周后免疫印迹实验检测小鼠脂肪组织中 CTSK 蛋白的表达量及 HE 染色检测脂肪组织中脂滴大小。结果 成功获得 AAV-shNC 以及 AAV-shCTSK 腺相关病毒。原位注射 AAV-shCTSK 的小鼠脂肪组织中 CTSK 成功敲降, 脂肪组织中白色脂肪细胞显著变小。结论 小鼠 CTSK 的敲降腺相关病毒构建成功, 脂肪组织 CTSK 敲降引起脂肪组织中脂质含量减少。

**关键词** CTSK; 腺相关病毒; 脂肪组织原位注射

**中图分类号** Q 782

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)06-1001-05  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.014.

截至 2020 年, 我国成人 ( $\geq 18$  岁) 的超重率为 34.3%, 肥胖率为 16.4%, 超重/肥胖成年人已过半, 中国已经成为全世界肥胖人群最多的国家<sup>[1]</sup>。肥胖的发生是由于脂肪组织过度堆积引起的<sup>[2]</sup>, 研究<sup>[3]</sup>表明脂肪组织的脂质堆积与高血压、高甘油三酯血症、高胆固醇血症等代谢综合征有密切联系。

组织蛋白酶 K (cathepsin K, CTSK) 蛋白是一种溶酶体半胱氨酸蛋白酶。其基因位于人类 1 号染色体的中心区域, 全长约 12.1 kb, 由 8 个外显子和 7 个内含子组成<sup>[4]</sup>。近年研究<sup>[5]</sup>表明, 组织蛋白酶与

肝脏脂质代谢密切相关。血组织蛋白酶 D (cathepsin D, CTSD) 含量与 NASH 疾病进展密切相关<sup>[6]</sup>, 动物实验表明腹腔或皮下注射 CTSD 抑制剂缓解了小鼠肝脏脂质堆积<sup>[7-8]</sup>, 提示组织蛋白酶与肝脏脂质堆积密切相关, 但具体作用机制仍不清楚。该研究中, CTSK 在脂肪组织中高表达, 并且可以被分泌到血清中作用于其他组织, 为探究 CTSK 在肥胖中的作用, 该研究构建了脂肪组织特异性表达的腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV), 并利用其探究 CTSK 在脂肪组织中的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验试剂、抗体及细胞** AAV-U6-shRNA (Gene)-CMV-EGFP-SV40 质粒载体、AAV 包装质粒及辅助质粒购于 NTCC (北京); 质粒转染所需感受态细胞 BJ5183 为实验室自制; siRNA 购于吉玛公司 (苏州); DNA 引物购于擎科生物 (北京); 限制性内切酶 AgeI 和 EcoRI 购于 NEB 公司 (北京), Benzonase 和碘克沙醇购于 Sigma (美国); opti-DMEM 及 DMEM 均购于 Thermo (美国); FBS 购于维森特公司 (南京); SVF 细胞获赠于章华兵教授实验室。CTSK 抗体购于 Abcam (英国); calnexin 抗体购于 Stress (加拿大)。

**1.1.2 实验动物** 10 只 4 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 体质量 18~25 g, 购于集萃药康公司 (南京), 并于 12 h 光照/12 h 无光照条件下, 控制饲养温度为 25 °C。对小鼠饲养的高脂饮食购买自鼠三生物 (常州), 高脂饮食喂养小鼠 12 周后进行脂肪组织原位注射。

### 1.2 方法

**1.2.1 质粒载体构建** shRNA 上下游引物浓度稀释到 20  $\mu\text{mol/L}$ , 各取 5  $\mu\text{l}$ , 加入 10  $\times$  buffer G 5  $\mu\text{l}$ , 最后用 ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu\text{l}$ , 置于 PCR 仪中, 设置程序: 95 °C、5 min, 25 °C、2 min, 4 °C 保持。使用限制性内切酶 AgeI 与 EcoRI 双酶切骨架载体, 分别加入 10  $\times$  rCutSmart™ Buffer 5  $\mu\text{l}$ , 骨架载体 1  $\mu\text{l}$  (1 mg/ml), AgeI 与 EcoRI 各 1  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu\text{l}$  后置

2023-04-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (编号: 82300659); 安徽省自然科学基金青年项目 (编号: 2308085QH247); 安徽医科大学校科研基金青年项目 (编号: 2021xkj006); 安徽高校自然科学基金项目重点项目 (编号: KJ2021A0220)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 何静, 女, 硕士研究生;

王秀云, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wangxiuyun@ahmu.edu.cn

于 37 °C、1 h。随后使用 DNA 胶回收试剂盒将酶切后的骨架载体回收。使用 DNA ligase 将骨架载体与退火后的 shRNA 连接后转染进入 BJ5183 感受态细胞中,筛选阳性菌株进行测序。

**1.2.2 质粒扩增** 构建好的 AAV 骨架载体、包装质粒和辅助质粒分别转染入 BJ5183 感受态细胞后挑取阳性菌落接种于 250 ml 液体 LB 培养基中,37 °C 过夜摇菌。质粒的大量去内毒素抽提使用 Qiagen 大抽试剂盒。大量抽提后质粒浓度大于 1 μg/μl, A260/280 在 1.7 ~ 1.8 之间方可用以包装病毒。

**1.2.3 细胞培养** 293T 细胞使用 10% FBS、1% 双抗的 DMEM 培养基进行培养。种板之前使用 0.25% 的胰酶消化 1 ~ 2 min 后,镜下观察细胞变圆,细胞间隙增大时,去除胰酶,加入新鲜培养基吹打混匀,移入离心管中。将 293T 细胞种板到 15 cm 皿。

**1.2.4 病毒包装与纯化** 细胞生长到 60% ~ 70% 融合度后,每个 15 cm 皿分别取辅助质粒 7 μg、包装质粒 20 μg、骨架载体质粒 7 μg 加入到 4.8 ml 的 opti-DMEM 溶液中,混合均匀后加入 136 μl 聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, PEI)转染试剂定容至 10 ml,室温孵育 15 min 后滴加入 293T 细胞培养皿中,转染 16 h 后换液。细胞转染 60 h 以后,收集细胞,室温下 2 000 r/min 离心 10 min;使用 15 ml 裂解液(150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris pH8.0,配好后过滤,4 °C 保存)重悬细胞,并置于液氮与 37 °C 中充分反复冻融裂解细胞。加入 MgCl<sub>2</sub> 溶液(终浓度 1 mmol/L),混匀后加入 250 U/ml Benzonase,37 °C 孵育 10 ~ 15 min 后于 5 500 r/min 低温离心 20 min,收集上清液。将病毒上清液加入碘克沙醇梯度管内,50 000 r/min,16 °C 离心 90 min,离心结束后取 40% 碘克沙醇层,使用超滤膜离心管与 PBS 3 500 r/min,4 °C 离心 5 min 清洗并收集病毒溶液。

**1.2.5 病毒滴度测定** 使用 qPCR 检测病毒滴度,首先制备标准样本,取 10 μl 标准品原液加入 90 μl ddH<sub>2</sub>O 中,将 1.0 × 10<sup>9</sup> copies/μl 稀释到 1.0 × 10<sup>8</sup> copies/μl,按照此方法,将其梯度稀释后获得一系列的浓度梯度的标准品包括:1.0 × 10<sup>8</sup>、1.0 × 10<sup>7</sup>、1.0 × 10<sup>6</sup>、1.0 × 10<sup>5</sup>、1.0 × 10<sup>4</sup>、1.0 × 10<sup>3</sup> copies/μl。待测样本制备过程:取 2 μl 病毒样品原液,加入 198 μl 灭菌的 ddH<sub>2</sub>O 稀释 100 倍得到 A 样;在 A 样中加入全能核酸酶 2 μl(1/100),37 °C 恒温水浴 1 h,处理完成后立即将样品放入 95 °C 金属浴 10 min,使酶失活。再继续加入 1.2 μl 蛋白酶 K 和 10 μl 10%

SDS 溶液,混匀离心后置于 55 °C 水浴锅中,恒温处理 1 h,处理完成后立即将样品放入 95 °C 金属浴 10 min,使酶失活。然后取 5 μl 处理后的 A 样加入 145 μl 灭菌的 ddH<sub>2</sub>O,得到稀释 30 倍的 B 样,混匀离心,再取 10 μl B 样加入 90 μl 灭菌的 ddH<sub>2</sub>O,得到稀释 300 倍的 C 样,混匀离心,样品处理完成。将以上样本使用针对于 ITR 设计的正向引物 ITR: 5'-CCGTTGTCAGGCAACGTG-3' 与反向引物 ITR: 5'-AGCTGACAGGTGGTGGCAAT-3'。进行 qPCR 反应,并计算病毒滴度。

**1.2.6 脂肪组织原位注射** 使用电烤灯在手术过程中维持小鼠体温,对小鼠进行麻醉,麻醉后的小鼠腹部进行脱毛以及碘伏消毒处理,用手术剪刀将腹腔皮肤及腹腔膜剪开,用镊子将脂肪组织取出,使用微量注射器将 10<sup>11</sup> pfu/ml 的 AAV-shCTSK 病毒 5 μl 注射到附睾脂肪组织(eWAT)中,共注射 10 个点。手术结束后缝合并涂抹碘伏及金霉素软膏防止感染,将小鼠放置在棉花上维持体温。

**1.2.7 脂肪切片 HE 染色** ① 固定与切片:组织样本用多聚甲醛固定后,用石蜡包埋并切片,切完用温水浸泡,使组织充分伸展后置于载玻片上并烘干。② 脱蜡与水化:在二甲苯中浸泡 10 min 后,依次放入 100%、95%、85%、70% 乙醇中各浸泡 5 min。③ 苏木精染色:用 PBS 溶液清洗 3 次,每次 5 min。再放入苏木精染色 10 min。④ 分化:洗去多余染液。用 1% 的盐酸乙醇进行分化并冲洗干净。⑤ 反蓝:使用弱碱性的促蓝液将细胞核染成蓝色。⑥ 伊红染色与脱水:用伊红染液染色 3 min,再使用浓度为 80%、95% 以及无水乙醇进行梯度脱水。⑦ 切片与封片:用二甲苯浸泡 2 次,每次 4 min,待风干后用中性树脂胶封片。

**1.3 统计学处理** 所有数据的处理均使用 Graph-Pad9.0 进行统计学分析。细胞实验重复 3 次,动物实验每组小鼠不少于 8 只。实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组之间比较采用独立样本 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 设计 CTSK 敲降 shRNA 引物** 设计 3 条小鼠 CTSK siRNA,并在脂肪前体细胞 SVF 细胞中进行效率验证,RT-qPCR 结果显示:与 siNC 组(1.00 ± 0.03)相比,siCTSK1(0.50 ± 0.01)和 siCTSK2(0.47 ± 0.02)敲降效率约为 50%,siCTSK3(0.32 ± 0.02)效率达到 70%,分析显示差异有统计学意义

( $P < 0.001$ ), 见图 1。因此选用此 siRNA 设计作为目的 siRNA。为了构建安全有效的 AAV, 选用 AAV-U6-shRNA (Gene)-CMV-EGFP-SV40 载体进行目的载体构建。对载体进行分析后, 选用 AgeI 和 EcoRI 作为酶切位点进行引物设计, 见表 1。

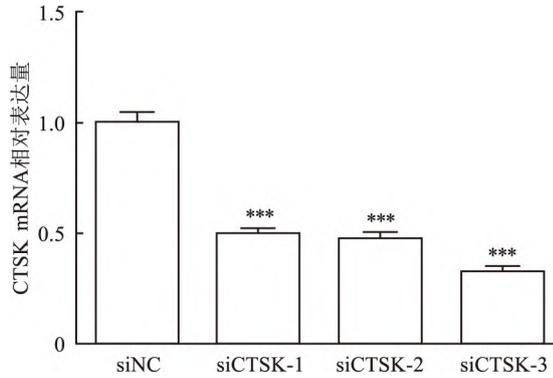


图 1 RT-qPCR 法检测转染 3 条 CTSK siRNA 后的 SVF 细胞中 CTSK 的 mRNA 水平与 siNC 组比较: \*\*\*  $P < 0.001$

表 1 设计的 shRNA 引物序列

名称	引物
siCTSK-F	ccggGAAGCAAGCACTGGATAATTTCAAGAGAATT ATCCAGTCTTGCTTCTCTTTT
siCTSK-R	aattAAAAAGAAGCAAGCACTGGATAATTTCTCTTGA AATTATCCAGTCTTGCTCTC

**2.2 骨架载体 AAV-U6-shRNA (Gene)-CMV-EGFP-SV40 的构建及鉴定** 引物退火之后进行双酶切, 并将其与酶切后的载体进行连接, 见图 2A。连接产物转化入 *E. coli* Stb13 BJ5183 感受态细胞后挑取阳性菌落后测序, 测序结果与引物序列进行比对后发现成功将 shRNA 构建进入骨架载体中, 见图 2B。

**2.3 重组 AAV 病毒的包装及纯化及滴度检测** 将准备好的 AAV 骨架载体质粒、包装质粒和辅助质粒共转染进 293T 细胞, 转染 60 h 后收集细胞, 按 1.2.4 最终得到 250  $\mu$ l 病毒溶液。首先通过 SDS-PAGE 和银染确定重组腺相关病毒的纯度, 见图 3, 图中的样品泳道中的 3 条蛋白条带大小与腺相关病毒外壳 VP1、VP2、VP3 蛋白大小一致且含量比例约为 1 : 1 : 10。样品泳道中除了 VP1、VP2、VP3 三条

明显的蛋白条带外, 无明显其他杂蛋白条带, 样品纯度达到 90% 以上。通过实时荧光 PCR 法, 设计特异性结合血清 2 型重组腺相关病毒 ITR 序列 (腺相关病毒基因组部分序列) 的引物, 见表 2, 检测 ITR 序列的拷贝数, 从而定量重组腺相关病毒基因组的拷贝数, 确定重组腺相关病毒的滴度, 见表 3。

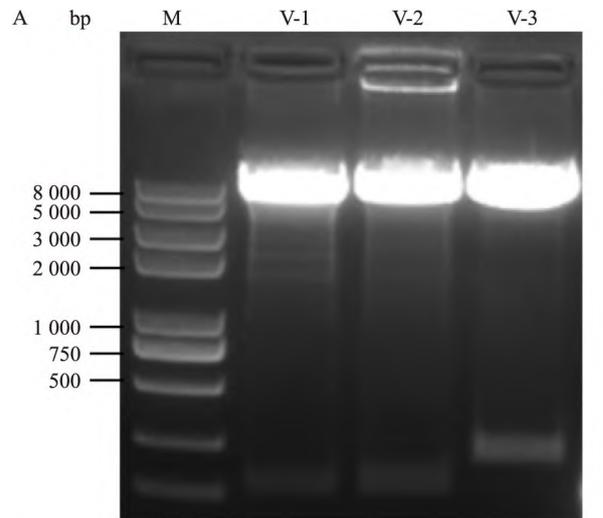


图 2 骨架载体 AAV-U6-shRNA (Gene)-CMV-EGFP-SV40 的构建及鉴定

A: 载体酶切后的琼脂糖凝胶电泳结果; B: 阳性克隆 DNA 测序结果与引物序列的比对结果; M: Marker; V-1、V-2、V-3: 构建的连接产物 1、2、3

表 2 检测病毒滴度时的 qPCR 引物

名称	引物
ITR-F	5'-CCGTTGTCAGGCAACGTG-3'
ITR-R	5'-AGCTGACAGGTGCTGGAAT-3'

**2.4 AAV-shCTSK 病毒敲降效率验证** AAV 血清型为 2/8, 此病毒可以特异性的在脂肪组织进行表达, 因此选取脂肪组织作为 AAV 病毒验证靶器官。通过脂肪组织原位注射技术, 将 AAV 注射入小鼠附睾脂肪组织中, 注射 4 周后, 对注射过病毒的脂肪组织内 CTSK mRNA 及蛋白表达量进行检测, RT-qPCR

表 3 根据 qPCR 结果计算的病毒滴度

样品名称	平均 Cq 值	SQ Mean (vg/ $\mu$ l)	稀释倍数	qPCR 滴度 (vg/ml)	校准后滴度 (vg/ml)	分装后滴度 (vg/ml)
AAV-shCTSK	16.36	$3.73 \times 10^6$	30 000	$2.26 \times 10^{14}$	$6.45 \times 10^{13}$	$5.86 \times 10^{12}$

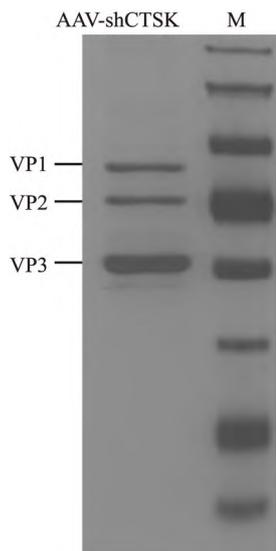


图3 纯化病毒颗粒进行 Western blot 检测后的银染结果

VP1、VP2、VP3:腺相关病毒外壳蛋白; AAV-shCTSK:构建的重组腺相关病毒蛋白;M:Marker

结果显示:与 AAV-shNC 组相比, AAV-shCTSK 组 CTSK mRNA 表达量显著下降,分析显示差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 4A;Western blot 也验证了这一结果,见图 4B。说明 AAV-shCTSK 可以显著降低附睾脂肪组织内 CTSK 的表达。

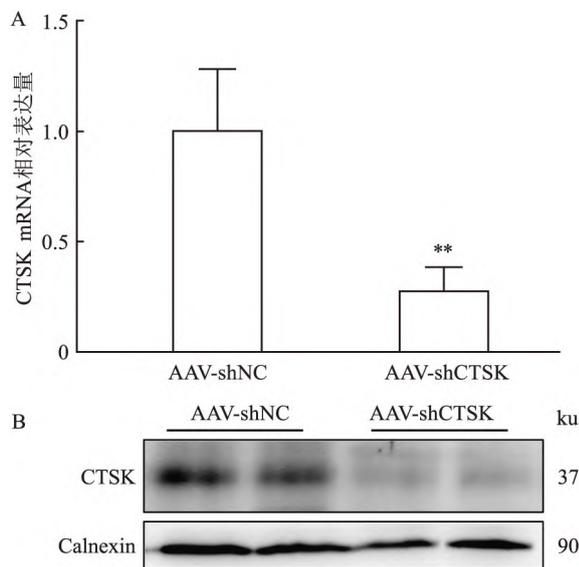


图4 AAV-shCTSK 病毒敲降效率验证

A:脂肪组织原位注射后,脂肪组织内 CTSK 的 mRNA 水平;B:脂肪组织原位注射后,脂肪组织内 CTSK 的蛋白水平;与 AAV-shNC 组比较:\*\*  $P < 0.01$

**2.5 CTSK 在脂肪组织中的功能验证** CTSK 促进脂肪细胞 3T3-L1 分化。将注射 AAV-shCTSK 病毒的小鼠附睾脂肪组织进行组织 HE 染色,脂肪组织

内脂肪细胞显著变小,见图 5。说明 CTSK 蛋白降低脂肪组织内脂质含量。

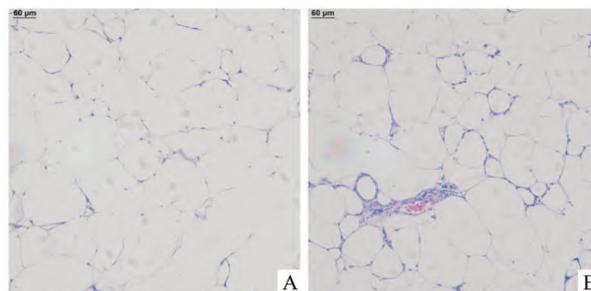


图5 CTSK 在脂肪组织中的功能验证 HE ×100

A:脂肪组织原位注射 AAV-shNC 组;B:脂肪组织原位注射 AAV-shCTSK 组

### 3 讨论

随着社会生活水平的提高,我国肥胖的发病率正在逐步增长。肥胖的产生会伴随着高血压、高血糖、高血脂及心血管疾病的产生。这一类的代谢综合征正在严重危害人们的健康<sup>[9]</sup>。对于肥胖的治疗,临床上通常采用优化饮食及运动的方案,并且配合使用针对并发症的药物进行治疗;对于严重肥胖的患者采用胃旁路手术的方式进行减肥<sup>[10]</sup>。但是治疗方案仍然存在很多需要优化的地方。因此对于肥胖的产生机制及治疗靶点的研究迫在眉睫。

组织蛋白发现于溶酶体,可以分泌到血液循环,被运输到全身各个组织发挥作用<sup>[11-12]</sup>。CTSK 蛋白在体内的主要作用为骨重建和质膜修复。也有研究<sup>[13-14]</sup>表明其参与了脂肪前体细胞 3T3-L1 的分化,促进脂肪组织脂质合成。但是 CTSK 蛋白是否随血液循环进入机体其他组织,又是如何发挥作用的仍旧未知。本研究中,CTSK 在脂肪组织表达量最高,但是其具体功能的研究需要工具的支持。AAV 病毒具有免疫原性低、长期表达且组织特异性高等优势,已成为基因治疗领域最重要的基因载体之一<sup>[15]</sup>。课题组利用 AAV 骨架载体将已经验证敲降水平的 siCTSK 设计为 shRNA 引物,并连接上骨架载体内的特异性酶切位点;构建了 AAV-shCTSK 病毒,利用碘克沙醇浓度梯度离心的方式纯化出足够浓度的病毒。随后采用国际先进的附睾脂肪组织原位注射手术,对小鼠进行了病毒的验证以及 CTSK 功能的初步探究,CTSK 在脂肪组织中的成功敲降可以显著减少脂肪组织细胞内的脂质含量,也为接下来探究循环中 CTSK 的功能打下了坚实的基础。

但是循环中 CTSK 的具体作用机制仍不清楚,课题组正在对 CTSK 的作用机制做深入研究。

### 参考文献

- [1] Pan X F, Wang L, Pan A. Epidemiology and determinants of obesity in China[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2021, 9(6): 373–92.
- [2] Cohen P, Kajimura S. The cellular and functional complexity of thermogenic fat[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(6): 393–409.
- [3] Global BMI Mortality Collaboration, Di Angelantonio E, Bhupathiraju ShN, et al. Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents[J]. *Lancet*, 2016, 388(10046): 776–86.
- [4] Rood J A, Van Horn S, Drake F H, et al. Genomic organization and chromosome localization of the human cathepsin K gene (CTSK)[J]. *Genomics*, 1997, 41(2): 169–76.
- [5] Yadati T, Houben T, Bitorina A, et al. The ins and outs of cathepsins: physiological function and role in disease management [J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1679.
- [6] Walenbergh S M, Houben T, Rensen S S, et al. Plasma cathepsin D correlates with histological classifications of fatty liver disease in adults and responds to intervention [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38278.
- [7] Houben T, Oligschlaeger Y, Hendrikx T, et al. Cathepsin D regulates lipid metabolism in murine steatohepatitis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3494.
- [8] Yadati T, Houben T, Bitorina A, et al. Inhibition of extracellular cathepsin D reduces hepatic lipid accumulation and leads to mild changes in inflammation in NASH mice [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 675535.
- [9] 徐从云, 黄涛, 潘大庆, 等. 二甲双胍对于代谢综合征 SD 大鼠前列腺增生的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(5): 696–700.
- [10] Perdomo C M, Cohen R V, Sumithran P, et al. Contemporary medical, device, and surgical therapies for obesity in adults [J]. *Lancet*, 2023, 401(10382): 1116–30.
- [11] Turk V, Turk B, Turk D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities [J]. *EMBO J*, 2001, 20(17): 4629–33.
- [12] Brix K, Dunkhorst A, Mayer K, et al. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions [J]. *Biochimie*, 2008, 90(2): 194–207.
- [13] Han J, Wei L, Xu W, et al. CTSK inhibitor exert its anti-obesity effects through regulating adipocyte differentiation in high-fat diet induced obese mice [J]. *Endocr J*, 2015, 62(4): 309–17.
- [14] Yang M, Sun J, Zhang T, et al. Deficiency and inhibition of cathepsin K reduce body weight gain and increase glucose metabolism in mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(12): 2202–8.
- [15] Greig J A, Martins K M, Breton C, et al. Integrated vector genomes may contribute to long-term expression in primate liver after AAV administration [J]. *Nat Biotechnol*, 2023.

## Construction of mouse CTSK knockdown recombinant adeno-associated virus and its functional study

He Jing, Zhuo Xinzhe, Zou Xinyu, Wang Mengfan, Wang Xiuyun

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To construct a knockdown recombinant adeno-associated virus (AAV-shCTSK) targeting the mouse Cathepsin K (CTSK) gene and assess the knockdown efficiency of AAV-shCTSK in mice, and to investigate its impact on lipid storage within adipose tissue. **Methods** ShRNA primers specific to both the negative control (NC) and CTSK were designed, annealed, and integrated into the backbone vector. Following clone selection and sequencing for validation, recombinant plasmids were purified. Adeno-associated viral vectors, along with packaging and helper plasmids, were co-transfected into 293T cells using the transfection reagent PEI for adeno-associated viral packaging and amplification. The resultant AAV-shNC and AAV-shCTSK were injected into the epididymal adipose tissue of mice *via* in situ injection. Two weeks post-injection, the expression of CTSK protein was evaluated through immunoblotting assay and the size of intracellular lipid droplets in mouse adipose tissue was detected by HE staining. **Results** Successful acquisition of AAV-shNC and AAV-shCTSK adeno-associated viruses was achieved. In mice subjected to in situ injection of AAV-shCTSK, effective knockdown of CTSK in adipose tissue was confirmed, accompanied by a significant reduction in the size of white adipocytes. **Conclusion** A knockdown adeno-associated virus targeting CTSK in mice is successfully constructed, and CTSK knockdown in adipose tissue leads to a notable decrease in lipid content.

**Key words** CTSK; adeno-associated virus; adipose tissue in situ injection