

## PTG 重组腺病毒过表达载体的构建

王晨玺, 邓 霞, 赵志聪, 蔡珍生, 张盼盼, 李 莲, 李昊翔, 赵 丽, 王 东, 杨 玲, 袁国跃

**摘要** 目的 构建及鉴定携带小鼠 PTG 基因( NM\_016854) 的过表达重组腺病毒载体, 为深入研究 PTG 的功能奠定基础。方法 化学合成小鼠 PTG 基因的编码序列, 经聚合酶链式反应(PCR) 扩增、酶切, 后插入 GV314 载体( CMV-MCS-3FLAG-SV40-EGFP), 得到重组穿梭质粒 pGV314-PTG; 进一步 BamH I /Age I 双酶切, 产物交换入线性化表达载体 pDC315, 构建重组腺病毒 Ad-PTG, 将其转染 HEK293T 细胞包装成重组病毒颗粒, 经在 HEK293T 细胞反复扩增数代后, 进行纯化及滴度检测, 最后利用 PCR、Western blot 及测序验证重组腺病毒。结果 经 PCR、Western blot 及测序后, 结果显示成功构建 pGV314-CMV-MCS-3FLAG-SV40-EGFP-PTG 过表达腺病毒载体( Ad-PTG), 终点稀释法测得病毒滴度为  $4 \times 10^{10}$  PFU/ml, Western blot 和荧光定量 PCR 显示 PTG 的蛋白和 mRNA 表达水平显著升高。结论 成功构建携带小鼠 PTG 基因的重组过表达腺病毒载体, 且能有效上调肝细胞中 PTG 基因的表达。

**关键词** PTG; 重组腺病毒载体; 同源重组; 2 型糖尿病

**中图分类号** Q 78; R 589.9

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2022)04-0558-06

**doi:** 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.010

PTG 隶属于蛋白质磷酸酶 1 (protein phosphatase 1, PPI) 家族, 编码调节亚单位 3C。PPI 全酶由一个催化亚基和一个调节亚基组成<sup>[1]</sup>, 通过催化已经磷酸化的蛋白质分子去磷酸化而发挥作用<sup>[2]</sup>。GenBank 显示, PTG 在人类和小鼠中分别定位于 10 号及 19 号染色体, cDNA 全长 1 499 bp, 编码 285 个氨基酸残基。PTG 在小鼠多种组织器官中均有表达, 参与宫颈癌、肾细胞癌和前列腺癌<sup>[3-5]</sup> 等肿瘤的发生与发展, 并能够在肝细胞中显著增加糖原的合成与储存<sup>[6]</sup>, 参与全身能量代谢调控<sup>[7]</sup>。Lu et al<sup>[8]</sup> 研究发现, PTG 沉默可降低空腹血糖和胰岛素水平,

改善胰岛素敏感性, 在糖原和脂质能量平衡中起桥梁作用。该研究旨在构建并鉴定小鼠 PTG 基因重组过表达腺病毒载体, 为深入研究 PTG 的功能及其在糖脂代谢中作用的具体机制提供实验基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 细胞及菌株** 本实验所用的 HEK293T 细胞系由上海交通大学附属瑞金医院内分泌科实验室同仁惠赠。

**1.1.2 工具酶及主要试剂** 本课题组从上海吉凯基因化学技术有限公司购入质粒载体 pDC315、GV314 载体体系、pCDNA3.1 及 BamH I /Age I 内切酶。本实验中所用到的其他限制性内切酶从 NEB 公司购买; 1 kp DNA 标准参照物从 Fermentas 公司购买; 250 bp DNA 标准参照物从捷瑞公司购买; In-Fusion<sup>TM</sup> PCR 克隆试剂盒由 Clontech 公司提供; Taq 聚合酶由 Sino Bio 公司提供; dNTP 购自 TaKaRa 公司。本实验中所用的质粒抽提试剂盒由 Promega 公司提供, 上海捷瑞生物工程公司合成及提供本实验所用全部引物。质粒的测序工作由美季生物技术公司完成, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒由北京天根生化公司提供。TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒以及荧光定量试剂盒购自诺唯赞公司。RIPA、蛋白酶抑制剂以及 BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天公司。DMEM 及谷氨酰胺购自 Gibco 公司, 胎牛血清及含有 Flag 标签的一抗购自 Sigma 公司, 二抗购自 Santa Cruz 公司。

#### 1.2 方法

**1.2.1 含有小鼠 PTG 基因质粒的构建** 首先, 从 293T 细胞中提取总 RNA, 按照反转录试剂盒说明书对总 RNA 进行反转录反应, 得到 cDNA。根据基因库中公布的小鼠 PTG 基因( NM\_016854) 全长的 mRNA 序列, 运用 Primer premier 5.0 软件设计 PTG 克隆引物, 交由生工生物工程有限公司合成, 将该引物含有的目的基因 5' 端部分序列用于 PCR 扩增目的基因, 上游序列: 5'-AGGTCGACTCTAGAGGATC-CCGCCACCATGAGCTGCACCAGAATG-3'; 下游序

2022-03-07 接收

**基金项目:** 国家自然科学基金( 编号: 81870548); 江苏省自然科学基金( 编号: BK20191222)

**作者单位:** 江苏大学附属医院内分泌科, 镇江 212001

**作者简介:** 王晨玺, 女, 硕士研究生;

袁国跃, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yuanguoyue@ujs.edu.cn

列: 5'-TCCTTGCTAGTCCATACCTCGATAGGAGGTCAAGTTC-3'。进行 PCR 扩增后得到目的基因片段, BamH I /Age I 酶切后, 将其连接至质粒载体 pCDNA3.1(-)。反应条件: 5  $\mu$ l 10 $\times$  缓冲液, 0.5  $\mu$ l 100 $\times$  BSA, 2  $\mu$ l 纯化的 DNA 质粒(浓度为 1 g/L), 1  $\mu$ l BamH I (浓度为 20 U/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l Age I (浓度为 20 U/ $\mu$ l), 最后加双蒸水 40.5  $\mu$ l 将总体系补足至 50  $\mu$ l。此后将按以上步骤混合得到的反应物放置于 37  $^{\circ}$ C 环境中, 时间为 2 h。

**1.2.2 重组穿梭质粒 pGV314-PTG 的构建** 将酶切后的产物交换入线性化表达载体 GV314 中得到重组穿梭质粒 pGV314-PTG。BamH I /Age I 酶切载体 GV314 进行线性化, 之后将酶切得到的产物与目的基因产物片段进行交换, 反应体系如下: 2  $\mu$ l 线性化载体 DNA(浓度为 100 mg/L), 2  $\mu$ l 目的基因产物(浓度为 100 mg/L), 0.5  $\mu$ l In-Fusion 交换酶, 2  $\mu$ l 10 $\times$  交换酶缓冲液, 13.5  $\mu$ l 双蒸水。于 25  $^{\circ}$ C 条件下反应 30 min, 42  $^{\circ}$ C 条件下反应 15 min。转化细菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 随后将其转移到含有相应抗生素的 LB 琼脂平板上倒置培养, 培养条件为 37  $^{\circ}$ C, 计时 16 h。对长出的菌落用 PCR 法进行鉴定, 将空载设置为阴性对照组, 将纯化的 GAPDH 基因的 PCR 产物设置为阳性对照组。GV314 载体 PCR 引物序列如下, 上游序列为 5'-AGCTTT-GAGAAGAAGGTTTCAGG-3', 下游序列为 5'-CCT-TATAGTCCTTATCATCGTC-3'。反应体系: 1  $\mu$ l 模板, 上游和下游引物(浓度为 10  $\mu$ mol/L) 各 0.4  $\mu$ l, 4  $\mu$ l 5 $\times$  Taq 缓冲液, 1.6  $\mu$ l d NTPs(浓度为 2.5 mmol/L), 0.2  $\mu$ l Taq 聚合酶, 12.4  $\mu$ l 双蒸水。反应条件: 在 94  $^{\circ}$ C 条件下预变性 3 min, 94  $^{\circ}$ C 条件下变性 30 s, 60  $^{\circ}$ C 条件下退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 条件下延长 40 s, 再次稳定延伸 5 min, 将此过程循环 30 次。随后将 PCR 后得到的产物进行琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物约为 481 bp, 之后进行阳性菌接种, 放置于 37  $^{\circ}$ C 的环境中培养 16 h。随后利用甘油菌对其进行保存, 并分装 200  $\mu$ l 以待进行后续的测序和比对分析。

**1.2.3 腺病毒质粒同源重组及鉴定** 用含有 EDTA 的 0.25% 胰酶消化处于对数生长期的 HEK293T 细胞, 以得到细胞悬液, 接种于 24 孔培养板中, 细胞数为  $4 \times 10^5$  个/孔。置于培养箱中常规培养, 培养条件为 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>。待细胞的融合度达到 50%~60% 时, 利用 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染试剂将 pGV314-PTG 与辅助包装质粒 pDC315 共转染至

HEK293T 细胞中。在转染之前的 2 h 换液, 将原先的旧培养基更换为不含血清的培养基, 细胞换液 2 h 后开始转染。将 DNA 溶液与不含血清的培养基混合均匀, 二者混合液总体积为 50  $\mu$ l, 其中 DNA 溶液包含 5  $\mu$ g 穿梭质粒及 5  $\mu$ g 辅助质粒, 混合后置于室温条件下温育 5 min。将上述混合后的 50  $\mu$ l 培养基与 10  $\mu$ l Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 混合, 再次置于室温条件下温育 5 min。将前述稀释后得到的 DNA 溶液与 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 混合均匀, 注意动作轻柔, 避免振荡, 随后放置于室温条件下温育 20 min, 以便形成 DNA/Lipofectamine 2000<sup>TM</sup> 转染复合物。在 HEK293T 细胞培养液中缓慢滴加前述转染复合物并将其混合均匀, 随后放置于细胞培养箱中培养, 培养条件为 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>。于培养箱中培养 6 h 后将含有转染混和物的原有旧培养基弃去, 向其中加入 PBS 溶液 2 ml, 轻柔晃动, 洗去残余的转染混合物后将溶液倒弃, 再向其中缓慢加入 5 ml 含有 10% 血清的细胞培养基, 放置于细胞培养箱中继续培养, 培养条件为 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>, 注意每天定期观察转染后细胞的生长状况, 如果发现有培养基明显发黄的情况, 需酌情向其中补加适量的新鲜培养液。最后, 利用 Cre/Lox P 重组酶系统的作用以产生重组过表达腺病毒, 并将该重组过表达腺病毒命名为 Ad-PTG。成功转染之后 24 h 可通过荧光显微镜观察到细胞内增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的表达情况, 转染之后 36 h 收集细胞并用相应试剂提取总蛋白, 以待后续进行 Western blot 检测。

**1.2.4 重组过表达腺病毒的包装、扩增与纯化** 用 Pac I 酶切线性化 Ad-PTG 质粒, 并进行抽提以及乙醇沉淀回收等步骤后测定其含量与纯度, 将其转染至 HEK293T 细胞中, 放置于细胞培养箱中常规培养, 培养条件为 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>, 此后每日观察转染后细胞的状态及生长情况。持续观察约 10~15 d, 待大部分细胞出现肿胀、变圆、坏死等典型的细胞病变效应(cytopathic effect, CPE), 且有约 50% 的细胞脱壁现象出现时, 提示腺病毒包装成功。用低速离心方法收集细胞, 吸取 2 ml 的 DMEM 并将收集的细胞重悬于其中, 在液氮和 37  $^{\circ}$ C 水浴的条件下将此制成的细胞悬液反复冻融 4 次后, 于 4  $^{\circ}$ C 以 7 900 r/min 低温离心 5 min, 离心后产物有明显的分层, 收集离心后的病毒上清液, 将其放置于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中保存。用上述方法反复感染和收集之后, 取病毒上清液再一次感染 HEK293T 细胞, 从而可以实现数轮扩增的目的。

用 Adeno-XTM 病毒纯化试剂盒按照步骤将最终收集到的 PBS 重悬病毒上清液纯化重组过表达腺病毒,分装已纯化的重组过表达腺病毒,放置于  $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存以备后续使用。

**1.2.5 终点稀释法测定腺病毒滴度** 对已获得的纯化重组过表达腺病毒进行滴度测定,具体采用的方法为终点稀释法,在实验开始前 24 h 于 96 孔板中接种 HEK293T 细胞(细胞数每孔约  $1 \times 10^3$  个)。倍比稀释重组过表达腺病毒液至  $10^{-6} \sim 10^{-13}$ ,并用其感染 HEK293T 细胞,随后将细胞放入培养箱中常规培养。培养期间持续观察细胞 CPE 病变的情况,并对细胞 CPE 病变孔进行计数,计算出每一行的阳性率。用 Spearman-Kärber Method 计算所测样本的病毒颗粒滴度,公式如下:病毒样品的滴度 =  $10(x + 0.8)$  (PFU/ml),其中  $x$  为  $10^{-1} \sim 10^{-13}$  中所有稀释度下细胞 CPE 病变阳性率的总和。

**1.2.6 荧光定量 PCR** 将成功构建的 Ad-PTG 转染 HEK293T 细胞 48 h 后,收集细胞,并使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,后使用逆转录试剂盒对 RNA 进行逆转录反应得到相应 cDNA 并进行荧光定量 PCR 实验。用 GraphPad 8.0.1 分析结果。

**1.2.7 Western blot 实验** 将成功构建的 Ad-PTG 转染 HEK293T 细胞 48 h 后收集细胞,提取蛋白并测定其浓度。配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,将之前所提取的蛋白样品及蛋白标准参照物按照实验设计的顺序依次在相应泳道上样。首先设定电压为 90 V,20 ~ 25 min 待样品跑至下层胶后,调整电压至 120 V,继续恒定电压电泳 1 h 左右待样品跑至底部。将 PVDF 膜置于甲醇中激活约 1 min,随后把 PVDF 膜、滤纸和电泳后的凝胶按照装配要求组装成三明治结构,固定放置于转膜装置内,并于  $4^{\circ}\text{C}$  恒定电流 120 mA 转膜 4 h。转膜后的 PVDF 膜完全浸没于 5% 脱脂奶粉封闭液中,在摇床上于室温条件下低速封闭 1 h。封闭结束后裁剪至合适大小,浸没于一抗(1 : 1 000)稀释液中,于  $4^{\circ}\text{C}$  环境中摇床低速孵育过夜。一抗孵育结束后用  $1 \times$  TBST 缓冲液洗涤,将 PVDF 膜浸没于二抗(1 : 5 000)稀释液中摇床室温下孵育 1 h。 $1 \times$  TBST 缓冲液中洗涤后用 ECL 发光液曝光以待后续分析。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 25.0 及 GraphPad 8.0.1 统计分析软件对实验数据进行单因素方差分析,两组间比较采用  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 PCR 扩增 PTG 目的片段** 酶切连接目的基因的 p CDNA3.1 质粒,PCR 扩增并进行琼脂糖凝胶电泳(图 1),结果显示:在 995 bp 附近处有亮带,与目的基因片段长度一致,表明带有 PTG 基因的 p CDNA3.1 质粒构建成功。

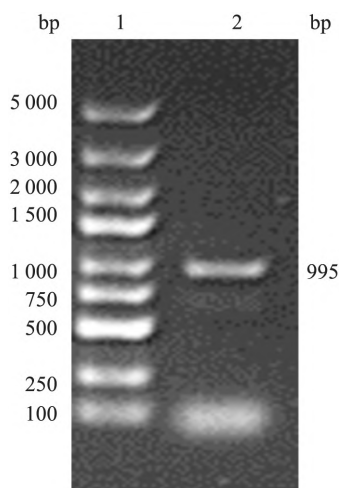


图 1 PTG 目的片段电泳图

1: DNA 标准参照物; 2: PCR 产物

**2.2 重组穿梭质粒 p GV314-PTG 的 PCR 鉴定** 运用 In-Fusion 克隆技术得到 p GV314-PTG 的重组穿梭质粒,采用随机的方法从中挑选出 8 个阳性单克隆菌,并用菌斑 PCR 技术对其进行鉴定及验证(图 2)。

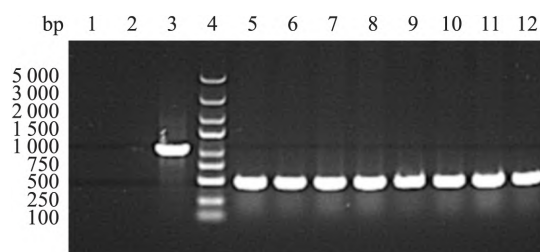


图 2 PCR 鉴定 p GV 314-PTG 重组穿梭质粒 8 个阳性克隆

1: 阴性对照(双蒸水); 2: 阴性对照(空载自连对照组); 3: GAP-DH; 4: DNA 标准参照物; 5 ~ 12: 1 ~ 8 号转化子

**2.3 重组质粒 Ad-PTG 的测序鉴定** 将鉴定出的阳性克隆转化子接种于 LB 液体培养基中,放于  $37^{\circ}\text{C}$  培养箱常规培养 12 ~ 16 h,取适量菌液送至上海生工生物工程有限公司,由其进行测序鉴定,经比对后证实与 GenBank 上的目标序列完全一致(图 3)。



| Score          | Expect                                                        | Identities    | Gaps      | Strand    |
|----------------|---------------------------------------------------------------|---------------|-----------|-----------|
| 1757 bits(951) | 0.0                                                           | 951/951(100%) | 0/951(0%) | Plus/Plus |
| Query 104      | ATGAGCTGCACCAAGATGATCCATGTGCTAGATCCACGTCCTTTGACAAAGTTCCTCATG  | 163           |           |           |
| Sbjct 1        | ATGAGCTGCACCAAGATGATCCATGTGCTAGATCCACGTCCTTTGACAAAGTTCCTCATG  | 60            |           |           |
| Query 164      | CCCGTGGACATGCCCATGAGGATTTGCTTGGCTATTCCACACTCTGAAGAGTTTCTCTG   | 223           |           |           |
| Sbjct 61       | CCCGTGGACATGCCCATGAGGATTTGCTTGGCTATTCCACACTCTGAAGAGTTTCTCTG   | 120           |           |           |
| Query 224      | GGTCCTTACAATGGTTTTCACGAAGAAATTTGTGAATAAATGAAACCTTTGAAACCA     | 283           |           |           |
| Sbjct 121      | GGTCCTTACAATGGTTTTCACGAAGAAATTTGTGAATAAATGAAACCTTTGAAACCA     | 180           |           |           |
| Query 284      | TGTCTCAGTGTCAAGCAGGAAGCAAAATCCGAGAGTGAGTGAAGAGCCACACAAACCA    | 343           |           |           |
| Sbjct 181      | TGTCTCAGTGTCAAGCAGGAAGCAAAATCCGAGAGTGAGTGAAGAGCCACACAAACCA    | 240           |           |           |
| Query 344      | GCCAAAGAACGGGCTGCTGTTTCCGGAGTCCAAAGGGCTGTCACTCACTGCTATCCATGTC | 403           |           |           |
| Sbjct 241      | GCCAAAGAACGGGCTGCTGTTTCCGGAGTCCAAAGGGCTGTCACTCACTGCTATCCATGTC | 300           |           |           |
| Query 404      | TTCTCCGACTTCCAGAAAGAACCGCTGGGAGCTGCAGTTTGTCTTGGACCTTAAC       | 463           |           |           |
| Sbjct 301      | TTCTCCGACTTCCAGAAAGAACCGCTGGGAGCTGCAGTTTGTCTTGGACCTTAAC       | 360           |           |           |
| Query 464      | GATATCTCTCCAGCTTAAAATCTCACGAGGAGAAAAATTTGGTTTTGATTTTCCCCAG    | 523           |           |           |
| Sbjct 361      | GATATCTCTCCAGCTTAAAATCTCACGAGGAGAAAAATTTGGTTTTGATTTTCCCCAG    | 420           |           |           |
| Query 524      | CCCTCAACGACTACTTAAGTTTCCGGAGCCGCTTTCAGAAAGACTTTGTCTGCTCCAG    | 583           |           |           |
| Sbjct 421      | CCCTCAACGACTACTTAAGTTTCCGGAGCCGCTTTCAGAAAGACTTTGTCTGCTCCAG    | 480           |           |           |
| Query 584      | AAGTCTCTTTGCAAGATCGGACGCTGACCCGGACAGTGAAGTGAAGATGTGAGCTTT     | 643           |           |           |
| Sbjct 481      | AAGTCTCTTTGCAAGATCGGACGCTGACCCGGACAGTGAAGTGAAGATGTGAGCTTT     | 540           |           |           |
| Query 644      | GAGAAGAAAGTTTCCAGGTCGGGATCAGCTTTGACACTGGAAGAACTACACAGATGTGAC  | 703           |           |           |
| Sbjct 541      | GAGAAGAAAGTTTCCAGGTCGGGATCAGCTTTGACACTGGAAGAACTACACAGATGTGAC  | 600           |           |           |
| Query 704      | TGTGTCTACATGAAGAATGTTTACAGCAGCTCAGACGACGACCTTCTCTTGGCATC      | 763           |           |           |
| Sbjct 601      | TGTGTCTACATGAAGAATGTTTACAGCAGCTCAGACGACGACCTTCTCTTGGCATC      | 660           |           |           |
| Query 764      | GACTTGCCCGGTGCTATTCCAACTGAGGAGAAATTTGAGTTCTGCAATTTCTATCACGCT  | 823           |           |           |
| Sbjct 661      | GACTTGCCCGGTGCTATTCCAACTGAGGAGAAATTTGAGTTCTGCAATTTCTATCACGCT  | 720           |           |           |
| Query 824      | AATGGGAGGATCTTCTGGGACAAATAGAGGCTCAGAAATACAGAAATGTCCATGTGCA    | 883           |           |           |
| Sbjct 721      | AATGGGAGGATCTTCTGGGACAAATAGAGGCTCAGAAATACAGAAATGTCCATGTGCA    | 780           |           |           |
| Query 884      | TGGAACCTGACGGAGTGCAGTCACTGAGTGGCAGCCAAAGACTGTGCAATTCACAGGGG   | 943           |           |           |
| Sbjct 781      | TGGAACCTGACGGAGTGCAGTCACTGAGTGGCAGCCAAAGACTGTGCAATTCACAGGGG   | 840           |           |           |
| Query 944      | CCCCCTAAGACTGAGATAGAGCCACAGCTTTGGCAGTCCAAAGCTTGTGAGCGGCTC     | 1003          |           |           |
| Sbjct 841      | CCCCCTAAGACTGAGATAGAGCCACAGCTTTGGCAGTCCAAAGCTTGTGAGCGGCTC     | 900           |           |           |
| Query 1004     | TTCCCAGAGTGGCAGCTGGGGAGAGTGGAGAACTTGACCTCTATCGA               | 1054          |           |           |
| Sbjct 901      | TTCCCAGAGTGGCAGCTGGGGAGAGTGGAGAACTTGACCTCTATCGA               | 951           |           |           |

图3 部分重组穿梭质粒序列对比结果

**2.4 重组质粒 Ad-PTG 的蛋白表达** 将 p GV314-PTG 与质粒 p DC315 转染 HEK293T 细胞,转染 24 h 后出现 EGFP 表达(图4),转染 36 h 后用 Western blot 法检测到在 37 ku 处有特征性条带(图5)。其大小与目的蛋白大小一致,说明重组蛋白融合表达正确。

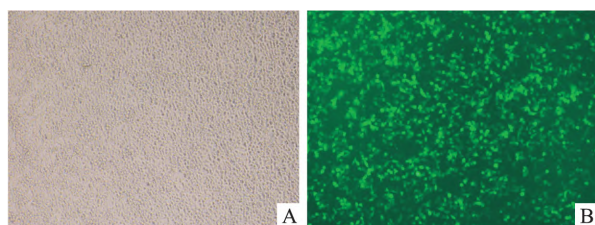


图4 重组质粒 Ad-PTG 转染 HEK293T 细胞 24 h 后 EGFP 的表达 ×200

A: 明场视野下的细胞状态; B: 荧光显微镜下观察到细胞出现 EGFP 荧光

**2.5 重组获得过表达腺病毒 Ad-PTG 及滴度测定** 重组过表达腺病毒质粒转染 HEK293T 细胞 10 ~

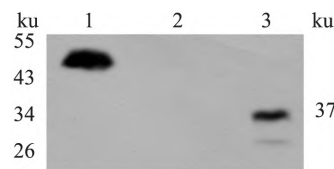
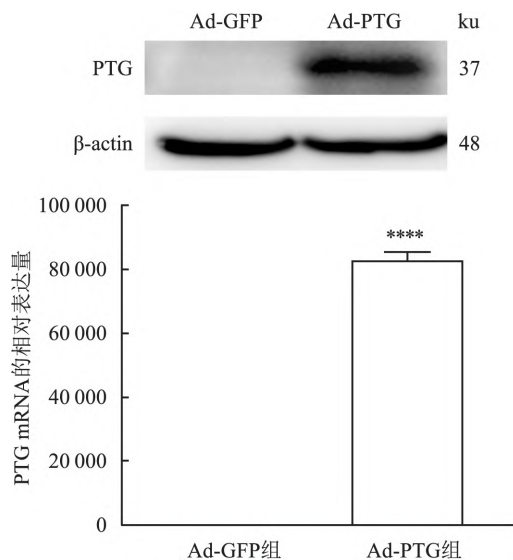


图5 蛋白质印迹鉴定重组质粒 Ad-PTG 转染 HEK293T 细胞 PTG 的表达

1: 阳性对照组; 2: SURVIVIN-3FLAG-GFP 蛋白表达组; 3: Ad-PTG 转染组

15 d 时,细胞部分出现 CPE 细胞病态反应,细胞病变范围渐渐增大,部分细胞逐渐从培养皿上脱落,提示已经成功包装重组过表达腺病毒。反复感染,收集细胞并冻融数次后,收集到大量的病毒上清液,纯化重组过表达腺病毒,经终点稀释法计算得到病毒滴度值为  $4 \times 10^{10}$  PFU / ml。

**2.6 重组过表达腺病毒上调肝细胞中 PTG 的表达** 将成功构建的 Ad-PTG 转染 HEK293T 细胞 48 h 后,收集细胞,荧光定量 PCR 和 Western blot 结果显示,与正常对照组相比,Ad-PTG 组 PTG 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ) (图6)。

图6 PTG 重组过表达腺病毒的验证 与 Ad-GFP 组比较: \*\*\*\*  $P < 0.0001$ 

### 3 讨论

糖尿病是一种由多种原因引起的慢性高血糖为特征的代谢性疾病,其中 90% 为 2 型糖尿病。迄今为止,2 型糖尿病已经发展成为以高血糖为主要特征的全球性公共卫生问题。肝脏胰岛素抵抗是 2 型糖尿病发病机制的主要环节<sup>[8]</sup>,胰岛素抵抗是指细

胞不能有效利用胰岛素,即施以正常剂量的胰岛素之后仅能产生低于正常生物学效应的一种异常生理状态,包括胰岛素的靶器官对胰岛素的敏感性和(或)反应性下降。胰岛素抵抗最明显的病理生理特点包括糖原分解功能、糖异生以及脂代谢环节发生紊乱,进而导致肝糖输出增多和肝脏脂肪的积聚。因此,有效地抑制肝脏葡萄糖的产生与输出以及减少肝脏脂肪的积聚,是治疗胰岛素抵抗与2型糖尿病的重要靶标之一,深入探求肝脏糖代谢与脂代谢调控的分子机制已成为当前的研究热点。

在本课题组前期进行的芯片筛选中,PTG引起了本课题组的注意。众所周知,蛋白质磷酸化在调节肝脏糖异生中起着关键作用。PP1是在真核细胞中丰富表达的一种磷酸酶,其可通过催化已经磷酸化的蛋白质分子发生去磷酸化而发挥作用<sup>[1]</sup>。在调节糖原代谢中,催化亚基PP1C通过一组糖原靶向调节亚基(G亚基)锚定于糖原颗粒,通过PP1介导的去磷酸化调节糖原代谢酶的活性<sup>[1, 10-11]</sup>。根据GenBank数据库数据显示,有7个编码G亚基的基因,PTG基因是其中的一种,编码蛋白磷酸酶1调节亚单位3C,其在糖代谢与脂代谢中发挥重要的调控作用<sup>[1]</sup>。PTG不仅可将PP1定位于糖原颗粒,还可直接与糖原合酶和磷酸化酶结合,从而实现糖原代谢的有效调控<sup>[12]</sup>。进一步研究还发现,PTG基因杂合缺失的小鼠,这些小鼠的脂肪组织、肝脏、心脏和骨骼肌中的糖原储存减少,相应的糖原合酶活性以及糖原合成率降低<sup>[1]</sup>。此外,PTG沉默小鼠可以防止高脂诱导的肝糖原积聚,降低空腹血糖和胰岛素水平,从而改善胰岛素敏感性;而哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物1(mTORC1)及胆固醇调节元件结合蛋白1(SREBP1)可作用于PTG启动子,调节PTG的转录影响糖原的代谢,而糖原的积聚可通过反馈调节SREBP1,从而影响脂肪代谢,建立了肝脏糖代谢与脂代谢之间的相互对话,调节了能量的平衡。以上研究结果表明,PTG在糖代谢与脂代谢中起着关键作用,并且对于维持糖原和脂质之间燃料底物分配的代谢平衡是必要的<sup>[1]</sup>。

为了深入地探索PTG的功能及其参与糖代谢与脂代谢中具体的作用机制,本课题组成功构建出PTG的重组过表达腺病毒载体。采用能够表达较大的外源基因片段的腺病毒穿梭载体GV314,该载体具有广泛的宿主范围,分裂以及非分裂细胞均可被其感染。且该载体还具有病毒滴度高和方便浓缩储

存等优点,同时还具有较高的安全性,是将外源性基因导入宿主细胞时所采用的重要载体之一。本研究将携带腺病毒基因组与外源基因的腺病毒穿梭质粒的包装质粒共转染至HEK293T细胞,通过Cre/loxP重组酶系统得到重组过表达腺病毒,并进一步通过Western blot、荧光定量PCR以及测序等方法验证,表明PTG重组过表达腺病毒构建成功。

## 参考文献

- [1] Chown E, Wang P, Zhao X, et al. GYS1 or PPP1R3C deficiency rescues murine adult polyglucosan body disease [J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2020, 7(11): 2186-98.
- [2] Oleson B, Naatz A, Proudfoot S, et al. Role of protein phosphatase 1 and inhibitor of protein phosphatase 1 in nitric oxide-dependent inhibition of the DNA damage response in pancreatic  $\beta$ -cells [J]. *Diabetes*, 2018, 67(5): 898-910.
- [3] Dai F, Chen G, Wang Y, et al. Identification of candidate biomarkers correlated with the diagnosis and prognosis of cervical cancer via integrated bioinformatics analysis [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 4517-32.
- [4] Zhao Y, Ye G, Wang Y, et al. MiR-4461 inhibits tumorigenesis of renal cell carcinoma by targeting PPP1R3C [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2020, doi: 10.1089/cbr.2020.3846.
- [5] Wang Z, Liu Z, Yang Y, et al. Identification of biomarkers and pathways in hypertensive nephropathy based on the ceRNA regulatory network [J]. *BMC Nephrol*, 2020, 21(1): 476.
- [6] Ji X, Wang S, Tang H, et al. PPP1R3C mediates metformin-inhibited hepatic gluconeogenesis [J]. *Metabolism*, 2019, 98: 62-75.
- [7] Dang Y, Hao S, Zhou W, et al. The traditional Chinese formulae Ling-gui-zhu-gan decoction alleviated non-alcoholic fatty liver disease via inhibiting PPP1R3C mediated molecules [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 8.
- [8] Lu B, Bridges D, Yang Y, et al. Metabolic crosstalk: molecular links between glycogen and lipid metabolism in obesity [J]. *Diabetes*, 2014, 63(9): 2935-48.
- [9] 艾扎提古丽·卡的尔, 帕它木·莫合买提, 热比亚·努力, 等. 2型糖尿病患者糖化血红蛋白、血糖水平与微量元素关系研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(7): 1097-100.
- [10] Mehta M, Shewale S, Sequeira R, et al. Hepatic protein phosphatase 1 regulatory subunit 3B (Ppp1r3b) promotes hepatic glycogen synthesis and thereby regulates fasting energy homeostasis [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(25): 10444-54.
- [11] Agius L. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism [J]. *Mol Aspects Med*, 2015, 46: 34-45.
- [12] Printen J, Brady M, Saltiel A. PTG, a protein phosphatase 1-binding protein with a role in glycogen metabolism [J]. *Science*, 1997, 275(5305): 1475-8.

网络出版时间: 2022-04-01 11:07 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220330.1418.011.html>

## 过表达 miR-203a-3p 对脂多糖致大鼠急性肺损伤后肺纤维化的影响及其机制

任亦频<sup>1</sup>, 周厚荣<sup>2</sup>, 李亚骥<sup>1</sup>, 黄佳<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨过表达 miR-203a-3p 对脂多糖(LPS)致大鼠急性肺损伤后肺纤维化的影响及其机制。方法 采用多次小剂量注射 LPS 制备大鼠急性肺损伤后肺纤维化模型,并将造模成功的大鼠随机分成模型组(Model 组)、agomir 阴性对照组(agomir-NC 组)和 miR-203a-3p agomir 组(agomir 组),另设对照组(Control 组),每组 15 只。造模前 1 d 及造模开始后 1 周,给予尾静脉注射 miR-203a-3p agomir 干预。造模 2 周后,测定肺组织湿/干比重(W/D)及肺组织羟脯氨酸(Hyp)含量;HE 染色和 Masson 染色观察肺组织病理变化及肺纤维化程度;ELISA 法检测各组大鼠肺泡灌洗液(BALF)中白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平;qRT-PCR 检测大鼠肺组织中 miR-203a-3p 和卵泡抑素样蛋白 1(Fstl1) mRNA 表达水平;

Western blot 检测大鼠肺组织中 Fstl1 蛋白表达水平;双荧光素酶报告系统检测 miR-203a-3p 和 Fstl1 的靶向关系。结果 与 Control 组比较,Model 组大鼠肺损伤及肺纤维化程度较为严重,肺组织 W/D 值及 Hyp 含量增加( $P < 0.05$ ),BALF 中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平升高( $P < 0.05$ ),肺组织中 miR-203a-3p 表达水平降低( $P < 0.05$ ),而 Fstl1 mRNA 和蛋白表达水平升高( $P < 0.05$ )。与 Model 组比较,agomir 组大鼠肺损伤及纤维化得到改善,肺组织 W/D 值及 Hyp 含量降低( $P < 0.05$ ),BALF 中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平降低( $P < 0.05$ ),肺组织中 miR-203a-3p 表达水平升高( $P < 0.05$ ),而 Fstl1 mRNA 和蛋白表达水平降低( $P < 0.05$ )。荧光素酶报告基因实验证实,Fstl1 是 miR-203a-3p 靶基因。结论 miR-203a-3p 过表达可改善 LPS 诱导的急性肺损伤后肺纤维化,其机制可能与靶向下调 Fstl1 表达有关。

**关键词** miR-203a-3p; 急性肺损伤; 肺纤维化; 卵泡抑素样蛋白 1

**中图分类号** R 563.8

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2022)04-0563-06  
**doi:** 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.011

2022-03-07 接收

**基金项目:** 贵州省科技计划项目(编号:黔科合 LH 字 [2016] 7153 号)

**作者单位:** 贵州省人民医院<sup>1</sup> 急诊内科、<sup>2</sup> 全科医学,贵阳 550002

**作者简介:** 任亦频,女,副主任医师,责任作者,E-mail: 13985495366@126.com

## Construction of recombinant adenoviral vector overexpressing PTG

Wang Chenxi, Deng Xia, Zhao Zhicong, Cai Zhensheng, Zhang Panpan, Li Lian,

Li Haoxiang, Zhao Li, Wang Dong, Yang Ling, Yuan Guoyue

(Dept of Endocrinology, The Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001)

**Abstract Objective** To construct and identify an overexpression recombinant adenovirus vector carrying the mouse PTG gene (NM\_016854), and to lay a foundation for in-depth study of the function of PTG. **Methods** The coding sequence of the mouse PTG gene was chemically synthesized, amplified by polymerase chain reaction (PCR), digested with restriction enzymes, and inserted into the GV314 vector (CMV-MCS-3FLAG-SV40-EGFP) to obtain the recombinant shuttle plasmid pGV314-PTG. BamHI /AgeI double enzyme digestion was further carried out, and the product was transferred into linearized expression vector pDC315 to construct recombinant adenovirus Ad-PTG, which was transfected into HEK293T cells and packaged into recombinant virus particles. After repeated amplification of several generations of HEK293T cells, the recombinant adenovirus was purified and titer detected. Finally, PCR, Western blot and sequencing were used to verify the recombinant adenovirus. **Results** After PCR, Western blot and sequencing, the results showed that the pGV314-CMV-MCS-3FLAG-SV40-EGFP-PTG overexpression adenovirus vector (Ad-PTG) was successfully constructed, and the virus titer measured by end-point dilution method was  $4 \times 10^{10}$  PFU/ml, Western blot and RT-qPCR showed that the protein and mRNA expression levels of PTG increased significantly. **Conclusion** The recombinant adenovirus vector carrying mouse PTG gene is successfully constructed, and the expression of PTG gene in hepatocytes is effectively up regulated.

**Key words** PTG; recombinant adenovirus vector; homologous recombination; type 2 diabetes mellitus