

SOCS3 基因重组腺病毒的构建及其在猪脂肪细胞中的表达

杨双娟, 徐成权, 吴江维, 杨公社

西北农林科技大学 动物脂肪沉积与肌肉发育实验室, 杨凌 712100

摘要: 本研究旨在构建细胞因子信号转导抑制因子 3 (Suppressor of cytokine signaling 3, *SOCS3*) 的重组腺病毒表达载体, 获得有感染性的病毒颗粒。以 pcDNA3-SOCS3 质粒为模板扩增 *SOCS3* 基因, 将其亚克隆至腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV, 经测序验证后, 重组的穿梭质粒用 *Pme* I 酶切线性化后转化到 BJ5183 感受态细菌中与其内的骨架载体 pAdEasy-1 进行同源重组, 获得的重组质粒 pAd-SOCS3, 经 *Pac* I 线性化后转染至 HEK293 细胞中进行包装和扩增, 纯化后用 TCID₅₀ 法测定病毒滴度。以重组的病毒感染原代培养的猪脂肪细胞后, 荧光显微镜下观察报告基因 *GFP* 的表达, RT-PCR 和 Western blotting 检测细胞内 *SOCS3* mRNA 和蛋白的表达。重组腺病毒载体 pAd-SOCS3 经酶切及 PCR 鉴定正确, 病毒滴度为 1.2×10^9 PFU/mL; 感染原代培养的猪脂肪细胞后, 荧光显微镜观察可见报告基因 *GFP* 的表达; RT-PCR 和 Western blotting 检测到细胞中 *SOCS3* mRNA 和蛋白的表达显著提高。本研究成功构建了 *SOCS3* 基因的重组腺病毒, 感染原代培养的猪脂肪细胞可稳定表达 *SOCS3* 蛋白, 为深入研究 *SOCS3* 的功能奠定了基础。

关键词: *SOCS3*, 重组腺病毒, 猪脂肪细胞

Construction of *SOCS3* recombinant adenovirus and its expression in porcine primary adipocytes

Shuangjuan Yang, Chengquan Xu, Jiangwei Wu, and Gongshe Yang

Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

Abstract: In order to construct recombinant adenovirus vector expressing Suppressor of cytokine signaling 3 (*SOCS3*) and obtain infectious adenoviral particles, *SOCS3* gene was amplified from plasmid pcDNA3-SOCS3 and subcloned into the adenovirus shuttle plasmid pAdTrack-CMV. After sequence confirmation, the recombinant shuttle plasmid pAdTrack-CMV-SOCS3 was linearized by *Pme* I, and then transformed into BJ5183 competent cell, the recombinant plasmid pAd-SOCS3 was obtained by homologous recombination between pAdTrack-CMV-SOCS3 and the adenoviral backbone plasmid pAdEasy-1 in BJ5183. The pAd-SOCS3 was linearized by *Pac* I and transfected into HEK293 cells via liposome. The recombinant adenovirus was packaged and amplified in HEK293 cells. After purifying, virus titer was determined by tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀). Using the recombinant adenoviruses to infect porcine primary adipocytes, the expression of green fluorescent protein (GFP) was observed by fluorescent microscopy, and *SOCS3* gene was identified by RT-PCR and Western blotting. Restriction enzyme and PCR analysis demonstrated that the recombinant adenovirus vector was constructed correctly, and the virus titer reached 1.2×10^9 PFU/mL. The result of RT-PCR

Received: November 20, 2009; **Accepted:** February 22, 2010

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA10Z138).

Corresponding author: Gongshe Yang. Tel/Fax: +86-29-87092430; E-mail: gsyang999@hotmail.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA10Z138) 资助。

and Western blotting showed that *SOCS3* mRNA and protein expression was remarkably increased in porcine primary adipocytes infected with recombinant adenovirus. In conclusion, this study successfully constructed the recombinant adenovirus containing *SOCS3* gene, and can be helpful for further research on the function of *SOCS3*.

Keywords: *SOCS3*, recombinant adenovirus, porcine primary adipocytes

SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3) 是 1997 年发现的细胞因子信号转导抑制因子 (Suppressor of cytokine signaling, *SOCS*) 家族成员之一, 最初被认为是 JAK/STAT 信号通路的负反馈调节因子^[1-3]。后来许多研究已证实 *SOCS3* 主要参与负调控生长激素 (GH)、白细胞介素-1 (IL-1)、IL-2、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ) 和瘦素 (Leptin) 等细胞因子的信号转导^[4-7]。近年来, 随着对 *SOCS3* 研究的深入, 人们发现 *SOCS3* 参与并抑制了胰岛素信号的转导, 在胰岛素抵抗中发挥重要作用^[8-10]。胰岛素抵抗不仅是许多临床疾病的共同基础, 而且还是诱发高血压、II 型糖尿病、肥胖症、脂代谢紊乱等综合征的核心原因。目前, 胰岛素抵抗已成为全世界生命科学的研究热点和难点。因此, 明确 *SOCS3* 在胰岛素信号通路中的分子机理, 可为治疗胰岛素抵抗提供新的研究靶点。

猪在心血管解剖结构和功能、脂蛋白分布和大小、肥胖倾向性及种类习性方面, 其表现型与人类很相似, 而且, 它与人类在遗传学上也具有高度的相似性, 特别是遗传决定的代谢相似性^[11]。这使得猪成为了研究人类肥胖、糖尿病及其并发症等疾病的最佳模式动物, 在未来的医学研究中发挥不可忽视的作用。本研究利用含双启动子的腺病毒表达系统构建了 *SOCS3* 基因的重组腺病毒载体, 转染原代培养的猪脂肪细胞后获得了 *SOCS3* 基因的稳定表达, 为进一步研究 *SOCS3* 在猪脂肪细胞胰岛素信号通路中的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物、细胞株、菌种与载体

实验动物为 3 日龄健康长白仔猪 (3 头), 体重 1.5~2.5 kg, 取样前用 0.5% 的新洁尔灭清洗 0.5 h, 电击处死。*Escherichia coli* DH5 α 感受态细菌购自天根生化科技有限公司。HEK293 细胞株、BJ5183 感受态细

菌、pcDNA3-*SOCS3* 质粒、腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV 及骨架载体 pAdEasy-1 均为本实验室保存。

1.1.2 工具酶和其他试剂

内切酶 *Kpn* I、*Xho* I、T4 DNA 连接酶、*Taq* 聚合酶、DNA Marker 及 RNA 提取试剂 (Trizol) 均购自 TaKaRa 公司; 限制性内切酶 *Pme* I 与 *Pac* I 购自美国 New England Biolabs 公司; 质粒抽提和 DNA 片段凝胶快速回收试剂盒购自 BioFlux 公司; LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司; DMEM (低糖)、F12 干粉, I 型胶原酶与胎牛血清购自 Gibco 公司; 牛血清白蛋白购自 Amersco 公司; 胰蛋白酶、HEPES、DMSO 购自 Merck 公司; RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司; *SOCS3* 鼠源性单克隆抗体购自美国 Millipore 公司; 羊抗鼠二抗购自 Santa Cruz 公司; 蛋白 Marker 购自南京金斯瑞生物科技有限公司; 其余试剂均为进口或国产分析纯; 引物合成及 DNA 测序由上海生工生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 质粒 pcDNA3-*SOCS3* 扩增 *SOCS3* 基因

根据质粒 pcDNA3-*SOCS3* 上的人 *SOCS3* 基因序列设计合成一对引物, 上游引物 *SOCS3*-F: 5'-CGG GGTACCGAGCTCGGATCCACTAG-3'; 下游引物 *SOCS3*-R: 5'-CCGCTCGAGTTAAAGCGGGGCATC GTAC-3'。在上下游引物的 5'端分别引入内切酶 *Kpn* I 与 *Xho* I 的识别序列 (即下划线部分), 并加入保护碱基。

以质粒 pcDNA3-*SOCS3* 为模板, 由上下游引物经 PCR 反应得到人 *SOCS3* 基因片段, 电泳后回收目的片段。反应参数: 5 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 56 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。预期 PCR 产物长度应为 750 bp。

1.2.2 重组病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV-*SOCS3* 的构建与鉴定

将回收的 *SOCS3* 基因片段和腺病毒穿梭质粒

pAdTrack-CMV 用内切酶 *Kpn* I、*Xho* I 进行双酶切后,电泳并回收片段。回收产物 (SOCS3 片段和切开的 pAdTrack-CMV) 在 T4 DNA 连接酶作用下于 16°C 连接过夜。连接产物氯化钙法转化 *E. coli* DH5 α 感受态细菌,转化的菌液均匀涂布于含 100 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上进行筛选,挑取单克隆摇菌,提取质粒,经 *Kpn* I、*Xho* I 双酶切和 PCR 鉴定后,将获得的阳性克隆质粒 (命名为 pAdTrack-CMV-SOCS3) 进行测序。利用 NCBI 的 BLAST 比对将测序结果与 GenBank 中公布的人 SOCS3 基因序列进行同源性比较分析。

1.2.3 重组病毒质粒 pAd-SOCS3 的构建与鉴定

先将腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 转化到 BJ5183 细菌中,转化的菌液均匀涂布于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板上进行筛选,挑取单克隆摇菌,制备成含有 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态细菌。再将重组的质粒 pAdTrack-CMV-SOCS3 用 *Pme* I 酶切线性化后转化到含有 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态细菌中,与其内的 pAdEasy-1 进行同源重组,并于含 100 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上进行筛选,挑取单克隆摇菌,抽提质粒,进行 *Pac* I 酶切和 PCR 鉴定,并将正确的重组质粒命名为 pAd-SOCS3。

1.2.4 重组病毒的包装、扩增及纯化

将 pAd-SOCS3 转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细菌中,大量扩繁后提取质粒,经 *Pac* I 酶切、乙醇沉淀后收集 pAd-SOCS3 质粒,将线性化的 pAd-SOCS3 用 LipofectaminTM 2000 转染至 HEK293 细胞中进行包装,观察细胞内报告基因 *GFP* 的表达及细胞病变 (Cytopathic effect, CPE) 情况。转染后 7 d 收集上清作为病毒原液,然后用病毒原液再次感染 HEK293 细胞,扩增病毒。感染多次后,将收集的病毒经 CsCl 密度梯度离心法进行纯化。纯化后的病毒命名为 Ad-SOCS3,并于 -80°C 保存。

1.2.5 重组病毒的滴度测定

采用重复性较高的半数组织培养感染剂量 (Tissue culture infectious dose 50, TCID₅₀) 法测定重组病毒 Ad-SOCS3 的滴度。以 1×10^4 个/孔接种 HEK293 细胞于 96 孔板;倍比稀释病毒,分别以不同稀释浓度 ($10^{-3} \sim 10^{-10}$) 病毒溶液感染细胞;每个

稀释度的病毒溶液以 100 μ L/孔分别感染 10 孔细胞,还有 2 孔细胞作为阴性对照 (不加病毒)。以含 4% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养细胞,10 d 后观察每一稀释度出现 CPE 的孔数,并计算 CPE 阳性比率之和 (稀释度为 10^{-1} 与 10^{-2} 的阳性比率计算在内,其值均为 1)。根据 Karbers 公式计算病毒滴度: $T = 10 \times 10^{1+d(s-0.5)}$ TCID₅₀/mL。其中 $d = \log_{10}$ 稀释度 = 1 (对于 10 倍的稀释度而言); s = 阳性比率之和 (从第一个 10 倍比稀释度算起)。并根据以下公式,换算成 PFU/mL 单位: $T = 1 \times 10^x$ TCID₅₀/mL = $1 \times 10^{x-0.7}$ PFU/mL。

1.2.6 猪脂肪细胞的原代培养

无菌状态下取仔猪颈部、肩胛及背部皮下脂肪,用含双抗的 PBS 缓冲液浸泡、冲洗 2 次。分离去除脂肪组织中可见的纤维及血管,剪成约 1 mm³ 的组织块,向剪碎的组织块中加入 1 mg/L 的 I 型胶原酶消化液,置 37°C 振荡摇床内温育 60~80 min 后取出,200 目细胞筛过滤,滤液以 2000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀物用无血清培养液重悬,1000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉积的细胞团块用基础培养液制成细胞悬液后以 5.0×10^4 个/cm² 密度接种至培养板中,置于 37°C、5% CO₂ 培养箱内培养,1 d 后换液,之后每 2 天换液 1 次。直到细胞出现生长抑制。

1.2.7 感染重组病毒的猪脂肪细胞的形态学及 GFP 表达的观察

将接种于六孔板中的原代脂肪细胞移去培养液后,每孔加入 500 μ L 新鲜培养基,1 孔为对照,其余每孔分别加入 2、5、10、25 和 50 μ L 病毒液,缓慢摇晃培养板后置于培养箱内培养 3 h,再加入 1.5 mL 培养基培养 72 h,观察每孔细胞是否出现 CPE。若感染后 3 d 细胞完全出现 CPE 的病毒的感染复数 (MOI) 值即为 10。用 60 mm 培养皿培养猪脂肪细胞,待细胞铺满时以筛选的最佳 MOI 量的病毒感染 4 皿细胞,感染 72 h 后在显微镜下观察细胞的形态变化及细胞内报告基因 *GFP* 的表达情况。

1.2.8 感染重组病毒的猪脂肪细胞中 SOCS3 mRNA 和蛋白表达的检测

分别以不同 MOI (10, 20, 30) 的重组病毒感染

原代培养的脂肪细胞,感染 48 h 后提取细胞总 RNA, RT-PCR 检测 *SOCS3* 基因的表达情况,感染 72 h 后提取细胞的总蛋白, Western blotting 检测 *SOCS3* 蛋白的表达情况。RT-PCR 检测时,根据 GenBank 中公布的猪 *SOCS3* 基因序列设计一对引物,上游引物 *SOCS3*-F(5'-3'): GTGCGCCATGGTCACCCAC; 下游引物 *SOCS3*-R(5'-3'): GTCCAGGA ACTCCCGAAT。

1.3 统计分析

采用 SPSS 11.5 统计软件 One-way ANOVA 进行方差分析与显著性检验。实验数据以平均值±标准误差表示。

2 结果

2.1 质粒 pcDNA3-SOCS3 扩增产物的鉴定

以质粒 pcDNA3-SOCS3 为模板,PCR 扩增后的产物为单一条带,大小约为 750 bp (图 1)。

2.2 重组质粒 pAdTrack-CMV-SOCS3 的鉴定

构建好的重组质粒 pAdTrack-CMV-SOCS3 经 *Kpn* I、*Xho* I 双酶切电泳后可见 2 个条带,大片段为切开的 pAdTrack-CMV,大小约 9.2 kb,小片段为 *SOCS3*,大小约 750 bp (图 2A),与预期的结果相一致。以 pAdTrack-CMV-SOCS3 为模板,进行 PCR 鉴定,结果可见大小约为 750 bp 的条带 (图 2B),与图 A 中的小片段相符。将回收的小片段测序后,片段大小为 735 bp,与 GenBank 中公布的人 *SOCS3* 基因序列 (GenBank Accession No. NM-003955) 进行同源性比较分析,核苷酸序列同源性为 99%,其中第 183 位碱基发生了同义突变,由 T→C,对应氨基酸序列同源性为 100%,证明 pAdTrack-CMV 中插入的人 *SOCS3* 基因正确。

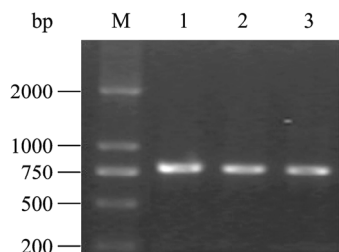


图 1 pcDNA3-SOCS3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of pcDNA3-SOCS3 PCR product. M: DNA marker; 1-3: PCR product of pcDNA3-SOCS3.

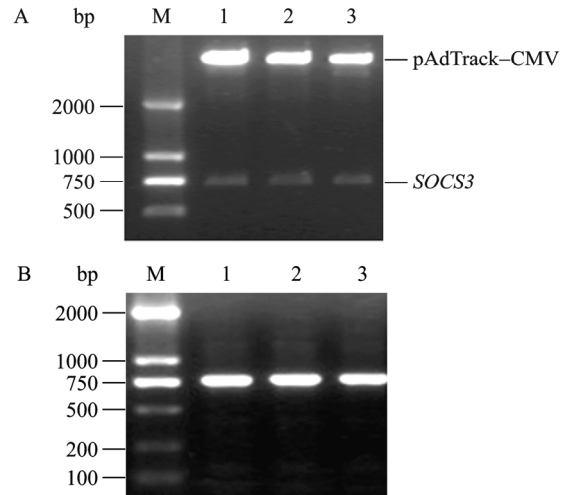


图 2 pAdTrack-CMV-SOCS3 的鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant pAdTrack-CMV-SOCS3. (A) pAdTrack-CMV-SOCS3 was identified by restriction enzyme digestion (*Kpn* I and *Xho* I). M: DNA marker; 1-3: pAdTrack-CMV (9.2 kb) and *SOCS3* fragment (735 bp). (B) PCR analysis of recombinant pAdTrack-CMV-SOCS3. M: DNA marker; 1-3: PCR product of pAdTrack-CMV-SOCS3.

2.3 重组质粒 pAd-SOCS3 的鉴定

线性化的 pAdTrack-CMV-SOCS3 与 BJ5183 中的 pAdEasy-1 同源重组后,筛选时挑取的 3 个单克隆质粒经 *Pac* I 酶切后均释放出一个大小为 4.5 kb 的小片段 (图 3A),分别以这 3 个质粒为模板,进行 PCR 鉴定,结果均可得到大小为 735 bp 左右的片段 (图 3B),与预期结果相符。证明这 3 个单克隆都为阳性克隆,均为正确的重组质粒 pAd-SOCS3。

2.4 重组病毒的包装、扩增、纯化及病毒滴度测定

pAd-SOCS3 转染 HEK293 细胞 48 h 后 GFP 开始表达,此时在荧光显微镜下观察可见零星、散在的荧光 (图 4B),转染 3 d 后 GFP 的表达急剧升高,荧光数量显著增加 (图 4C)。转染 4 d 后细胞开始出现典型的 CPE,光镜下可见原本紧密生长的细胞出现肿胀、变圆、皱缩等明显细胞病变 (图 4D)。转染 5 d 后由于包装好的腺病毒释放到上清中,并感染周围的细胞,在荧光显微镜下可见荧光大量增加,并聚集在一起 (图 4E)。随着时间的延长,整个视野荧光数量逐渐增多。转染 7 d 后,95% 以上的细胞出现了 CPE 变化 (图 4F),而未转染 pAd-SOCS3 的 HEK293 细胞生长正常,仍呈梭形或三角形 (图 4A)。包装好的重组腺病毒 Ad-SOCS3 经扩增和纯化后,用 TCID₅₀ 法测定病毒滴度,滴度达到 1.2×10^9 PFU/mL。

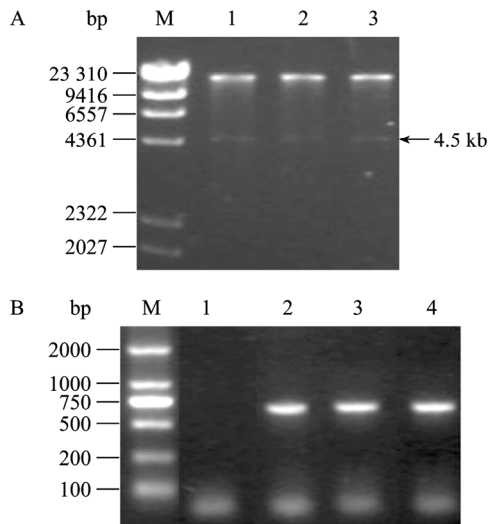


图3 pAd-SOCS3的鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant pAd-SOCS3. (A) pAd-SOCS3 digested with *Pac* I. M: λ DNA/*Hind* III marker; 1-3: three clones of pAd-SOCS3, all of them released a 4.5 kb fragment after *Pac* I digestion. (B) PCR analysis of recombinant pAd-SOCS3. M: DNA marker; 1: PCR product of empty vector, as control; 2-4: PCR product of three clones of pAd-SOCS3 in Fig. 3A.

2.5 原代猪脂肪细胞的形态学观察

经胶原酶消化后培养的原代猪脂肪细胞 6 h 开始有少量成纤维细胞样细胞散在贴壁，未贴壁细胞为球形。培养 24 h，换液除去未贴壁细胞后，贴壁

细胞大部分为短梭形或不规则的三角形 (图 5A)。培养 4 d 后，部分细胞开始分化，细胞内出现松散的小脂滴，脂滴大小不一、数量不等，细胞形态也不一致 (图 5B)。随着培养时间的延长，细胞体积增加，胞内脂滴逐渐增大并融合在一起，8 d 左右，整个细胞充满脂滴，折光性较强，细胞核被脂滴挤到了边缘 (图 5C)。分化的脂肪细胞经油红 O 染色后，光镜下可见脂滴被染成红色，而未分化的细胞则没有着色 (图 5D)。

2.6 感染重组病毒的猪脂肪细胞的形态学及 GFP 表达的观察

重组病毒感染原代培养的猪脂肪细胞 72 h 后，置光学显微镜下观察时发现与正常细胞和感染只表达 GFP 空载病毒的细胞 (图 6A, B) 相比，感染重组病毒后的未分化的脂肪细胞体积减小，整个细胞变瘦拉长，细胞与细胞间的间隙加大，而分化的细胞体积变化不明显，胞内的脂滴大小几乎不变 (图 6C)。在荧光显微镜下观察时发现约 80% 的细胞都能表达 GFP，其中未分化的前体脂肪细胞荧光较弱，而分化的细胞荧光较强 (图 6D)。另外，分化的细胞中脂滴内无 GFP 的表达，GFP 只定位于脂滴周围的胞质中 (图 6D，箭头所示)。

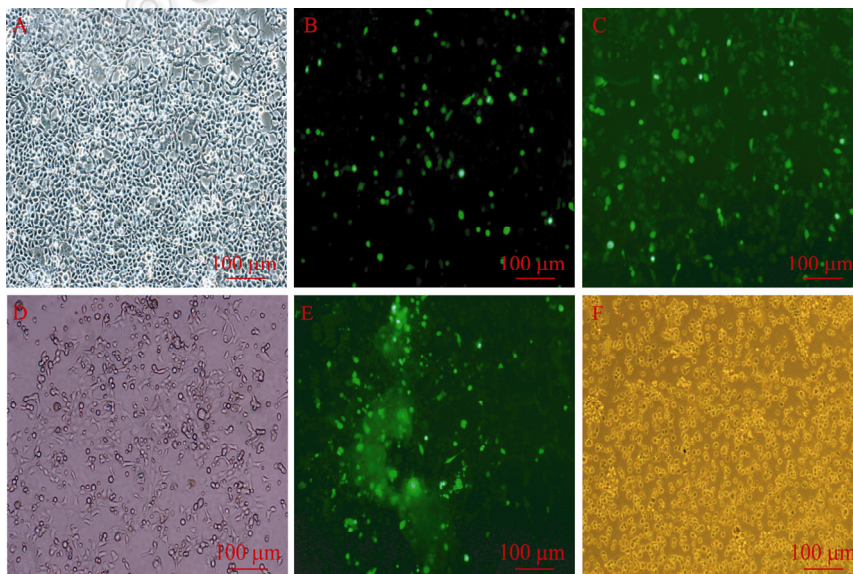


图4 重组腺病毒 pAd-SOCS3 转染 HEK 293 细胞的观察

Fig. 4 Observation of HEK 293 cells transfected by pAd-SOCS3. (A) Normal HEK 293, as control. (B) HEK 293 cells transfected by pAd-SOCS3 for 48 h, the GFP began to express. (C) HEK 293 cells transfected by pAd-SOCS3 for 3 days, the GFP expression increased rapidly. (D) HEK 293 cells transfected by pAd-SOCS3 for 4 days, cells began to appear CPE. (E) HEK 293 cells transfected by pAd-SOCS3 for 5 days, the fluorescence of GFP togetherd. (F) HEK 293 cells transfected by pAd-SOCS3 for 7 days, above 95% cells appeared CPE.

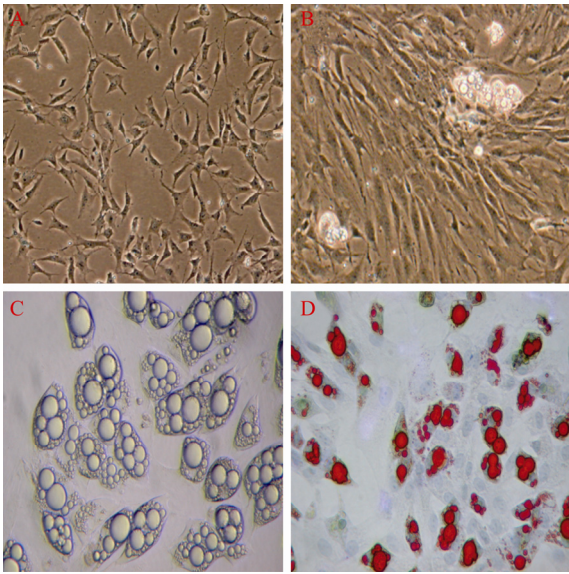


图 5 原代培养猪脂肪细胞的形态学观察

Fig. 5 Morphology observation of porcine primary adipocytes. (A) Adipocytes were cultured *in vitro* for 24 h. Showing stretched fibroblast-like or triangle cell phenotypes. (B) Adipocytes were cultured *in vitro* for 4 days. Showing small lipid droplet in cytoplasm. (C) Adipocytes were cultured *in vitro* for 8 days. Some small lipid droplets fusing in cytoplasm. (D) Differentiated adipocytes stained by Oil Red O. Lipid droplets were stained red by Oil Red O.

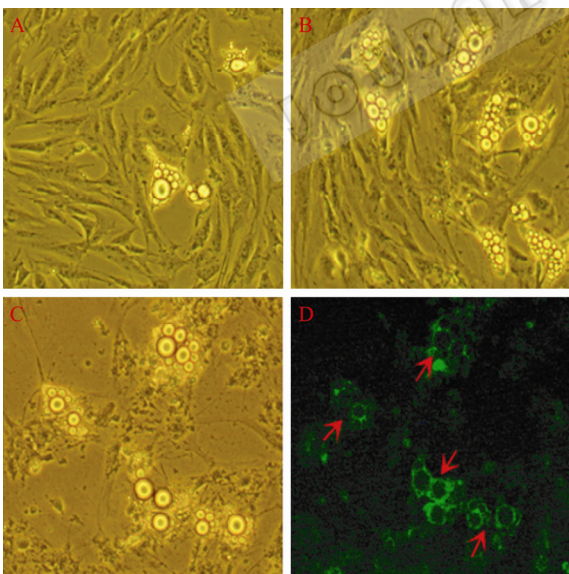


图 6 重组病毒 Ad-SOCS3 感染原代脂肪细胞的观察

Fig. 6 Observation of porcine primary adipocytes infected by Ad-SOCS3. (A) Normal porcine primary adipocytes. (B) Porcine primary adipocytes infected by Ad-GFP, as control. (C) Porcine primary adipocytes infected by Ad-SOCS3 for 72 h, the morphous of adipocytes were changed. (D) Porcine primary adipocytes infected by Ad-SOCS3 for 72 h, about 80% cells could express GFP. Arrow indicated the GFP localization of differentiated adipocytes.

2.7 感染重组病毒的猪脂肪细胞中 *SOCS3* mRNA 和蛋白表达的检测

以 MOI 为 10、20、30 的重组病毒感染原代培养的脂肪细胞 48 h 后提取总 RNA, RT-PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外凝胶成像仪下照像结果见图 7A。利用 Dolphin-DOC 凝胶成像系统软件测定电泳条带的 OD 值, 以 β -actin 基因为内参, 未感染病毒 (MOI=0) 的细胞为对照, 将 *SOCS3* 基因测定得到的 OD 值与 β -actin 基因测定的 OD 值相比, 所得数值利用 SPSS 软件进行 One-way ANOVA 方差分析与显著性检验。分析结果见图 7B。感染 72 h 后提取细胞的总蛋白, 以 β -actin 为内参, 未感染病

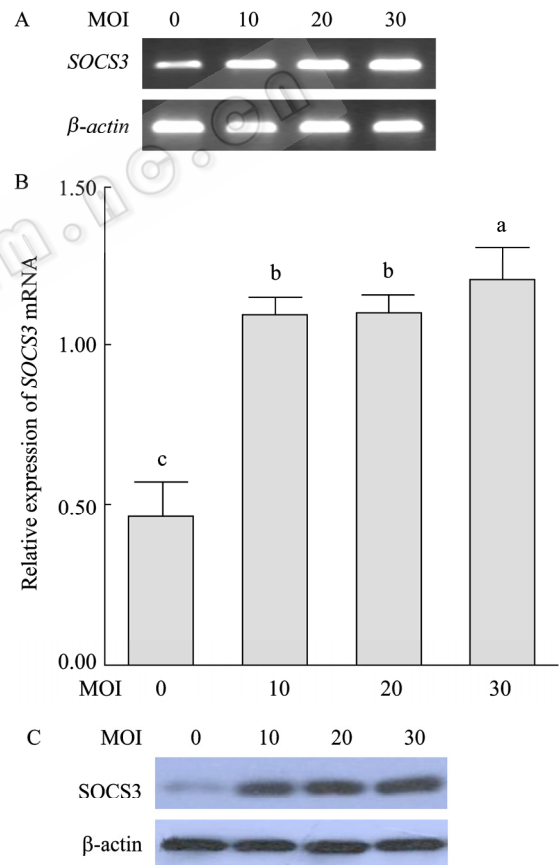


图 7 感染 Ad-SOCS3 的原代脂肪细胞中 *SOCS3* mRNA 和蛋白的表达

Fig. 7 Expression of *SOCS3* mRNA and protein in porcine primary adipocytes infected by Ad-SOCS3. (A) Electrophoresis result of *SOCS3* and β -actin PCR products in porcine primary adipocytes infected by Ad-SOCS3 (MOI=0, 10, 20, 30). (B) Quantitation analysis of *SOCS3* mRNA relative to β -actin from A. Different letters show significant difference ($P < 0.05$). (C) Western blotting analysis of *SOCS3* and β -actin protein expression in porcine primary adipocytes infected by Ad-SOCS3 (β -actin as internal control).

毒 (MOI=0) 的细胞为对照, Western blotting 检测 SOCS3 蛋白的表达, 结果见图 7C。由图 A、B 可知, 感染了重组病毒的细胞中 SOCS3 基因的表达显著高于未感染病毒的细胞 ($P<0.05$)。当 MOI 为 10 和 20 时, 二者 SOCS3 基因的表达差异不显著, 而当 MOI 为 30 时 SOCS3 基因的表达显著高于 MOI 为 10 和 20 的细胞。由 C 图可知, 基础状态下, SOCS3 蛋白的表达量很低, 但感染重组病毒后, SOCS3 蛋白的表达量显著提高。

3 讨论

胰岛素抵抗属于机体糖代谢紊乱的慢性病理过程, 是诱发高血压、II 型糖尿病和肥胖症等综合征的核心原因。胰岛素抵抗由许多因素引起, 而胰岛素信号传递受阻或减弱是导致胰岛素抵抗的主要原因之一。胰岛素是由胰腺 β 细胞分泌的激素类物质, 其主要通过作用于脂肪、肌肉及肝脏 3 大靶组织来影响机体的糖代谢和脂代谢。近年来, 国内外的许多研究表明, 胰岛素不仅能够诱导 SOCS3 的表达, 而且其诱导产生的 SOCS3 能够特异性地抑制胰岛素信号通路, 在胰岛素抵抗中发挥重要作用^[12-13]。因此, 明确 SOCS3 在胰岛素信号通路中的作用及机理能够为从根本上治疗 II 型糖尿病和肥胖症等代谢综合征提供重要的理论依据。

一直以来, 关于 SOCS3 在胰岛素信号通路中的研究主要集中在大鼠、小鼠等动物的肝脏及细胞系上, 而在脂肪组织及肌肉组织中的研究较少。近年, 猪作为最接近人类的模式动物, 已成为研究肥胖和糖尿病的理想模型^[11], 越来越多地受到研究者的青睐。但到目前为止, 有关原代培养的猪脂肪细胞中 SOCS3 对胰岛素信号通路的作用尚未见报道。本实验室长期开展有关体外培养猪脂肪细胞的发育及代谢方面的工作。最初, 本研究小组在研究猪脂肪细胞 SOCS3 的功能时, 用含有 SOCS3 基因的 pcDNA3-SOCS3 质粒转染原代培养的猪脂肪细胞, 经 G418 筛选后发现其转染效率极低, 几乎不超过 2%, 远远达不到实验的要求, 而转染 3T3-L1 脂肪细胞系后, 转染效率显著提高, 能达到 30%~40%。这说明普通质粒的转染对于细胞系是可取的, 但对于原

代培养的细胞而言, 并不是最佳的选择。

通常情况下, SOCS3 以低水平存在于未受刺激的细胞内, 为了能够在脂肪细胞中获得稳定表达的 SOCS3 蛋白, 进一步研究其在胰岛素信号通路中的作用, 本研究选择了构建 SOCS3 的重组腺病毒表达载体。与其他载体相比, 重组腺病毒载体具有靶细胞种类多, 导入效率高; 可插入大片段外源基因; 不整合到宿主基因组中, 不会引起插入突变; 容易得到高滴度病毒等优点, 是目前高效蛋白表达和基因治疗研究的首选载体^[14]。本研究采纳的利用 AdEasy 系统快速获得重组腺病毒的构建方法^[15], 与传统的重组腺病毒构建方法相比, 操作更为简单, 重组效率更高, 获得的病毒更纯, 不仅缩短了载体的构建时间, 而且能够实现外源基因在不同类型细胞中的高效表达。另外, 不同物种 SOCS3 基因的保守性极高, 人 SOCS3 基因与猪 SOCS3 基因核苷酸序列的同源性为 94%, 对应的氨基酸序列的同源性高达 97%。基于以上两方面的考虑, 本研究将外源的人 SOCS3 基因插入到腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV 中, 构建 SOCS3 的重组腺病毒表达载体, 并用其感染原代培养的猪脂肪细胞, 以实现 SOCS3 基因在脂肪细胞中的稳定表达。

总之, 本研究成功构建了 SOCS3 基因的重组腺病毒 Ad-SOCS3, 获得了有感染性的病毒颗粒。病毒滴度高达 1.2×10^9 PFU/mL, 感染原代培养的猪脂肪细胞后, 在荧光显微镜下观察可见 80% 的细胞表达报告基因 GFP。RT-PCR 和 Western blotting 分析结果证明在感染重组病毒的脂肪细胞中 SOCS3 mRNA 和蛋白的表达均显著提高, 即实现了 SOCS3 基因在原代脂肪细胞中的高效、稳定表达。这不仅克服了 pcDNA3-SOCS3 质粒在脂肪细胞中转染效率低的问题, 更为进一步研究 SOCS3 在猪脂肪细胞中胰岛素信号通路中的作用奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Starr R, Willson TA, Viney EM, *et al.* A family of cytokine inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 1997, **387**: 917-921.
- [2] Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, *et al.* A new protein

- containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, 1997, **387**: 921-924.
- [3] Naka T, Narazaki M, Hirata M, *et al.* Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 1997, **387**: 924-929.
- [4] Krebs DL, Hilton DJ. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci*, 2000, **113**: 2813-2819.
- [5] Krebs DL, Hilton DJ. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells*, 2001, **19**: 378-387.
- [6] Alexander WS. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2002, **2**: 410-416.
- [7] Ronn SG, Hansen JA, Lindberg K, *et al.* The effect of suppressor of cytokine signaling 3 on GH signaling in β -cells. *Mol Endocrinol*, 2002, **16**(9): 2124-2134
- [8] Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, *et al.* SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 15985-15991.
- [9] Krebs DL, Hilton DJ. A new role for SOCS in insulin action: suppressor of cytokine signaling. *Sci STKE*, 2003, **169**: 6.
- [10] Howard JK, Flier JS. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol Metab*, 2006, **17**: 365-371.
- [11] Yang GS, Zhang HW, Bai L, *et al.* Pig—a ideal study animal model of obesity and diabetes. *Prog Nat Sci*, 2008, **18**(5): 481-487.
杨公社, 张浩卫, 白亮, 等. 猪—研究肥胖和糖尿病的理想模式动物. 自然科学进展, 2008, **18**(5): 481-487.
- [12] Ronn SG, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T. Diabetes and suppressors of cytokine signaling proteins. *Diabetes*, 2007, **56**: 541-548.
- [13] Zhang HW, Wu JW, Wang B, *et al.* Regulation of SOCS-3, OB, GLUT4 and PPAR γ gene expression by insulin and dexamethasone in porcine primary adipocyte. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(8): 1354-1360.
张浩卫, 吴江维, 王博, 等. 地塞米松和胰岛素调节猪脂肪细胞 SOCS-3、OB、GLUT4 和 PPAR γ 基因的表达. 生物工程学报, 2008, **24**(8): 1354-1360.
- [14] Vorburger SA, Hunt KK. Adenoviral gene therapy. *Oncologist*, 2002, **7**(1): 46-59.
- [15] Luo JY, Deng ZL, Luo XJ, *et al.* A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc*, 2007, **2**: 1236-1247.

—————

快 讯

我科学家发现防治脂肪肝与糖尿病的分 子靶标

中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所刘勇研究组研究表明: 肝脏中的 ATP 柠檬酸裂合酶(ACL) 是防治脂肪肝与糖尿病的潜在分子靶标。

由于营养过剩、肝脏中长期过量储存脂肪所导致的非酒精性脂肪肝, 不仅与胰岛素抵抗和 2 型糖尿病密切相关, 而且在特定病理状况下会演变为脂肪性肝炎、甚至肝纤维化、肝硬化。由于非酒精性脂肪肝发生的分子基础及其与糖尿病的关联尚不清楚, 目前缺乏有效的药物靶标和临床干预手段用于防治非酒精性脂肪肝及其导致的相关病变。

研究人员经过 3 年多的研究发现, 肝脏脂肪合成通路上的 ATP-柠檬酸裂合酶(ACL), 是介导瘦素调节糖脂代谢平衡的关键效应基因之一。ACL 位于细胞质中, 是连接细胞内葡萄糖分解代谢与脂肪酸合成通路的重要代谢酶。研究结果显示, 通过腺病毒介导的基因沉默方法特异抑制肝脏中 ACL 的表达, 能够显著阻遏肥胖小鼠中脂肪肝的发生。而在生理学机制上, 抑制 ACL 能够进而抑制脂肪酸合成通路上一系列关键酶的整体表达程序。

来源: 光明日报