

## 胰岛 $\beta$ 细胞中 PP2AC $\alpha$ 基因失活小鼠模型的建立及初步表型分析

孙 进<sup>1</sup>, 李凤飞<sup>1</sup>, 朱红红<sup>1</sup>, 李建民<sup>2</sup>, 马建华<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属南京医院内分泌科, 江苏 南京 210006; <sup>2</sup>南京医科大学江苏省医药动物实验基地, 江苏 南京 211166)

**[摘要]** 目的: 建立胰岛  $\beta$  细胞特异性失活 PP2AC $\alpha$  基因小鼠模型, 对其表型进行初步观察。方法: 通过 Ins2-Cre 小鼠与 PP2AC $\alpha^{\text{fllox/fllox}}$  小鼠交配, 获得胰岛  $\beta$  细胞特异性失活 PP2AC $\alpha$  基因小鼠 (PP2AC $\alpha^{\text{fllox/fllox}}$ ; Ins2-Cre)。PCR 和 Western blot 鉴定 PP2AC $\alpha$  基因第二外显子敲除小鼠 (KO)。4 月龄时行腹腔注射葡萄糖耐量试验 (IPGTT), 以 PP2AC $\alpha^{\text{fllox/fllox}}$  小鼠为对照。结果: ①PP2AC $\alpha$  转录本在 KO 小鼠短于对照小鼠; ②KO 小鼠胰岛中 PP2AC 蛋白水平较对照小鼠显著下降 ( $P < 0.05$ ); ③IPGTT 结果显示: 4 月龄 KO 小鼠 30、60、120 min 时血糖明显高于对照小鼠 ( $P < 0.05$ )。结论: 成功建立胰岛  $\beta$  细胞特异性失活 PP2AC $\alpha$  基因小鼠模型, 4 月龄 PP2AC $\alpha^{\text{fllox/fllox}}$ ; Ins2-Cre 小鼠糖耐量受损。

**[关键词]** PP2AC $\alpha$ ; 小鼠模型; 糖耐量

**[中图分类号]** Q786

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)04-416-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160407

### Establishment and preliminary phenotypic analysis of mouse model of PP2AC specific inactivation in pancreatic-cells

Sun Jin<sup>1</sup>, Li Fengfei<sup>1</sup>, Zhu Honghong<sup>1</sup>, Li Jianmin<sup>2</sup>, Ma Jianhua<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Endocrinology, Nanjing Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing, 210009; <sup>2</sup>Jiangsu Animal Experimental Center of Medical and Pharmaceutical Research, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish mouse model of PP2AC gene specific inactivation in pancreatic cells and investigate preliminary animal phenotype. **Methods:** The Ins-2 transgenic mice in which Cre enzyme was exclusively detected in pancreatic-cells bred with PP2AC $\alpha^{\text{fllox/fllox}}$  mice to obtain PP2AC $\alpha^{\text{fllox/+}}$ ; Ins-2 mice, then bred with the PP2AC $\alpha^{\text{fllox/fllox}}$  mice again to obtain PP2AC $\alpha^{\text{fllox/fllox}}$ ; Ins-2 mice (KO mice). We identified the 2nd exon of PP2AC $\alpha$  knockdown by PCR and Western Blot. Interperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) was performed in transgenic mice at 4 months, and PP2AC $\alpha^{\text{fllox/fllox}}$  mice were employed with control. **Results:** PP2AC $\alpha$  transcripts were shorter in KO mice than those in control mice. The protein level of PP2AC expression in KO mice was significantly lower than that of control mice ( $P < 0.05$ ). The results of IPGTT indicated that the blood glucose levels at 30 min, 60 min and 120 min were significantly higher than those of controls ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Specific inactivation of PP2AC in pancreatic  $\beta$ -cells mouse model is successfully established, and glucose tolerance impairs at 4 months in PP2AC $\alpha^{\text{fllox/fllox}}$ ; Ins2-Cre mice.

**[Key words]** PP2AC; mouse model; glucose tolerance

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(04):416-419]

蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatases 2A, PP2A) 是一种丝氨酸/苏氨酸残基蛋白磷酸酶, 参与调节细胞代谢、细胞分化及凋亡、信号转导、细胞骨架及肿瘤发生等生理病理过程<sup>[1]</sup>。PP2A 全酶通常由一个结构亚基 A、一个催化亚基 C 和一个调节亚基 B 构

成。A 亚基和 C 亚基各有  $\alpha$  和  $\beta$  两种异构体 ( $A\alpha/\beta$  和  $C\alpha/\beta$ ), 调节亚基 B 由众多结构功能各异的成员组成, 至少包括 16 个成员<sup>[2]</sup>。有研究表明, PP2AC 亚基在胚胎发育以及阿尔茨海默病、肿瘤、糖尿病的发病中起到重要的作用, 例如 PP2AC 亚基的全身敲除导致小鼠胚胎致死, 阿尔茨海默病及肿瘤患者组织中有 PP2A 的表达明显减少, 胰岛素信号通路中 PP2A 去磷酸化 AKT 而导致胰岛素抵抗等<sup>[3-6]</sup>。有研

**[基金项目]** 中国博士后科学基金资助(2015M581829)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: majianhua@china.com

究发现,体外胰岛  $\beta$  细胞 PP2AC 基因敲除导致葡萄糖刺激的胰岛素分泌减少,表明该基因在胰岛素的分泌过程中起到重要作用<sup>[7]</sup>。但目前尚未有动物体内胰岛  $\beta$  细胞 PP2AC 基因敲除的在体研究,而在心脏心肌组织的研究表明,该基因的特异性敲除会导致心肌结构和功能异常<sup>[8-9]</sup>。因此本研究利用 Cre/LoxP 系统,通过 PP2AC $\alpha^{flox/flox}$  小鼠和 Ins2-Cre 转基因小鼠交配获得基因型为 PP2AC $\alpha^{flox/flox};Ins2-Cre$  的基因敲除小鼠模型,在小鼠胰岛  $\beta$  细胞中特异性失活 PP2AC $\alpha$  基因后,腹腔注射葡萄糖耐量试验(IPGTT)动态观察小鼠糖代谢。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

PP2AC $\alpha^{flox/flox}$  小鼠购自江苏省医药动物实验基地,该小鼠的 PP2AC $\alpha$  基因序列第二外显子前后分别被插入 LoxP 序列。Ins2-Cre 小鼠购自南京大学动物模式中心,品系全称 B6.Cg-Tg(Ins2-Cre)25Mgn/JNju,编号:J003573。小鼠均在 SPF 饲养条件下饲养在江苏省医药动物实验基地。

#### 1.1.2 主要试剂

蛋白酶 K(Merck 公司,德国),PCR 体系(Promega 公司,美国),琼脂糖(BIOWEST 公司,美国);RIPA 蛋白裂解液、Protease Inhibitor Cocktail(Roche 公司,美国),TRIzol 试剂(Invitrogen 公司,美国);反转录试剂盒(TaKaRa 公司,日本);PP2AC 抗体(Cell Signaling 公司,美国);GAPDH、IgG-HRP 抗体、胶原酶 V(Sigma 公司,美国);乙醇、二甲苯、三氯甲烷(南京化学试剂有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 获得胰岛 $\beta$ 细胞 PP2AC $\alpha$ 基因敲除小鼠的交配路线

Ins2-Cre 小鼠与 PP2AC $\alpha^{flox/flox}$  小鼠交配后,对 F1 代小鼠进行基因型鉴定,获得基因型为 PP2AC $\alpha^{flox/+};Ins2-Cre$  小鼠,将基因型为 PP2AC $\alpha^{flox/+};Ins2-Cre$  的雌雄小鼠合笼继续繁殖,F2 代中基因型为 PP2AC $\alpha^{flox/flox};Ins2-Cre$  的小鼠,即研究所需要的 PP2AC $\alpha$  基因敲除小鼠(PP2AC $\alpha$  KO 小鼠)。

#### 1.2.2 抽提并鉴定小鼠 DNA

剪取出生 10 d 左右的小鼠脚趾,提取 DNA 并鉴定 Ins2-Cre。设计引物如下:上游引物 Cre-F:5'-TTGCCTGCATTACCGGTCGATGC-3',下游引物 Cre-R:5'-TTGCACGTTACCGGCATCAACG-3';鉴定小

鼠是否还有 PP2AC $\alpha$ (flox/flox),设计引物如下:上游引物 PP2AC $\alpha$ -loxP-F:5'-TACTTCAGTGTTACTGACACAGACTC-3',下游引物 PP2AC $\alpha$ -loxP-R:5'-GTGAAAACAGGTCATTCATCCAT-3'。反应条件均为:95℃ 变性 5 min;之后,95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 30 个循环;循环结束后 72℃ 延伸 10 min。2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

#### 1.2.3 小鼠胰岛的分离与纯化

小鼠断颈处死,75%酒精消毒皮肤,剪开腹部皮肤,暴露胆总管、肝门、十二指肠。在显微镜下从左右肝管连接处逆行穿刺进针,注入 3 mL 预冷 0.1% 胶原酶 V 溶液,摘除胰腺后置于含有预冷 2 mL 胶原酶溶液的 15 mL 离心管中,37℃ 水浴消化 15 min,加入预冷 D-Hanks 液中中止消化,涡旋离心管 10 s,1 000 r/min,4℃ 离心 2 min,吸除上清液,加入 10 mL 预冷 D-Hanks 液吹打均匀,然后将混悬液移入培养皿中。用移液器在体视显微镜下人工挑取胰岛至新的含有预冷 D-Hanks 液培养皿中,再重复人工挑取 1 遍,以达到纯化目的。

#### 1.2.4 PCR 及电泳法鉴定胰岛 $\beta$ 细胞 PP2AC $\alpha$ 基因敲除

应用 TRIzol 法抽提纯化小鼠胰岛 RNA,利用反转录试剂盒反转录成 cDNA,鉴定胰岛  $\beta$  细胞中 PP2AC $\alpha$  基因是否敲除。设计引物如下:上游引物:5'-GGTCAAGAGCCTCTGCGAGAA-3';下游引物:5'-CCGGTCATGGCACCAGTTAT-3'。PCR 反应条件同 1.2.2,扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

#### 1.2.5 免疫印迹(Western blot)检测 PP2AC 蛋白相对表达量

选取 KO 及对照小鼠各 3 只,分别提取小鼠胰岛总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后,应用 Western blot 法测定胰岛中 PP2AC 蛋白表达水平。全自动凝胶成像系统分析图像。

#### 1.2.6 小鼠 IPGTT 试验

选取 4 月龄大小的 KO 及对照小鼠各 8 只,过夜禁食 16 h 后,称重,70% 酒精消毒鼠尾,末端 0.5 cm 处剪尾,测定空腹血糖,随后按 1 g/kg 体重的量腹腔注射 20% 葡萄糖溶液,分别在 30、60、120 min 时测定血糖。

### 1.3 统计学方法

所有数据采用 Graphpad Prism 5.0 软件进行统计学分析,实验数据用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组比较用独立样本  $t$  检验, $P \leq 0.05$  为差异具有

统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 KO 小鼠及 PP2AC $\alpha$ 条件型基因敲除小鼠的基因鉴定

本实验使用 Ins2-Cre 工具鼠由  $\beta$  细胞中 insulin 启动 Cre 重组酶的表达,从而敲除  $\beta$  细胞的 PP2AC $\alpha$  基因 2 号外显子。基因型 PP2AC $\alpha^{flox/flox}$ ; Ins2-Cre 为胰岛  $\beta$  细胞 PP2AC $\alpha$  基因敲除小鼠,基因型 PP2AC $\alpha^{flox/flox}$  小鼠作为对照鼠。Flox 与 Cre 片段鉴定结果如图 1 所示。

### 2.2 KO 小鼠 PP2AC $\alpha$ 基因敲除鉴定

KO 组小鼠胰岛 cDNA 经 PCR 扩增后得到 465 bp 条带,而正常对照组为 675 bp 条带,证实了 KO 小鼠胰岛  $\beta$  细胞 PP2AC $\alpha$  基因 2 号外显子被敲除(图 2)。

### 2.3 KO 小鼠的胰岛 PP2AC 蛋白表达水平

用 Western blot 法检测 KO 组小鼠 PP2AC 蛋白水平较对照组小鼠显著下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 3)。

### 2.4 IPGTT 试验结果

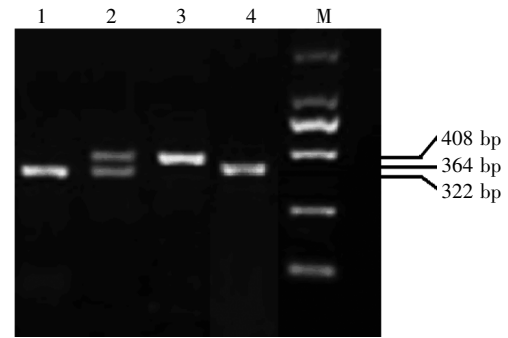
IPGTT 结果提示:KO 小鼠 0、30、60、120 min 血糖值分别为 ( $91 \pm 21$ )、( $449 \pm 83$ )、( $366 \pm 77$ )、( $185 \pm 41$ )mg/dL; 对照组 0、30、60、120 min 血糖值分别为( $86 \pm 22$ )、( $202 \pm 66$ )、( $153 \pm 42$ )、( $98 \pm 23$ )mg/dL。在 30、60、120 min 时 KO 组小鼠血糖较对照组小鼠明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 4)。

## 3 讨论

本实验通过 Cre/Loxp 系统构建了胰岛  $\beta$  细胞 PP2AC $\alpha$  基因失活小鼠模型,进一步表型分析发现 4 月龄 PP2AC $\alpha^{flox/flox}; Ins2-Cre$  小鼠糖耐量受损。

条件性基因敲除是将某个基因的失活限定在特定组织或细胞发育的特定阶段,利用 Cre 重组酶介导的位点特异性重组技术,对小鼠特定基因的失活处在特定的时间和空间内<sup>[10-12]</sup>。借助这一基因打靶技术可以避免完全敲除关键基因所造成的胚胎致死以及发育缺陷等问题,从而实现对该基因功能进一步研究。

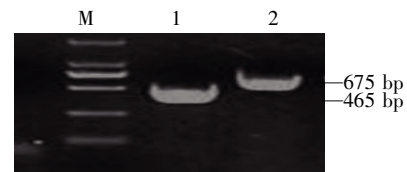
PP2A 是丝/苏氨酸磷酸酶家族中重要的成员,可对信号分子和激酶等多种细胞内蛋白质进行去磷酸化<sup>[13]</sup>。PP2AC 为 PP2A 的催化亚基,研究发现小鼠 PP2AC 基因全身敲除会胚胎致死<sup>[14]</sup>。PP2AC $\alpha$  基因全长约 33 kb,其中包含 7 个外显子,编码 23~



1: PP2AC $\alpha^{flox/flox}$ ; 2: PP2AC $\alpha^{flox/+}$ ; 3: 野生型; 4: Ins2-Cre; M: DNA Marker 2000。

图 1 Flox 和 Cre 鉴定

Figure 1 Identification of Flox and Cre



1: KO 小鼠; 2: 对照鼠; M: DNA Marker 2000。

图 2 PP2AC $\alpha$  基因敲除鉴定

Figure 2 Identification of PP2AC $\alpha$  deletion

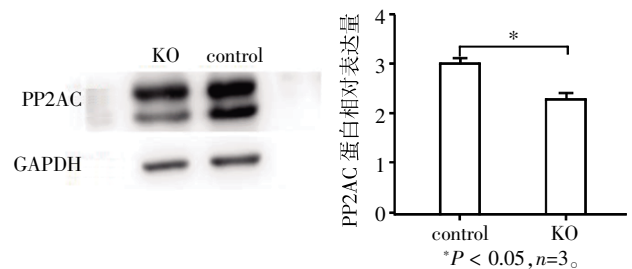
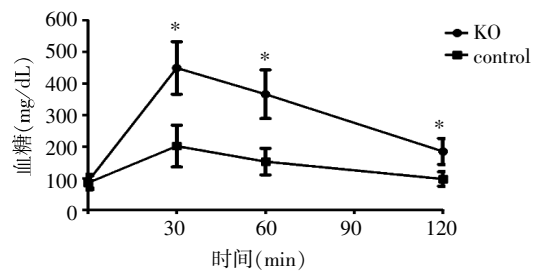


图 3 KO 小鼠与对照小鼠 PP2AC 蛋白表达水平

Figure 3 Protein level of PP2AC expression between KO mice and control mice



与对照组比较, \* $P < 0.05$ ,  $n=8$ 。

图 4 腹腔注射葡萄糖耐量试验 (IPGTT)

Figure 4 Interperitoneal glucose tolerance test (IPGTT)

293 位氨基酸序列,第二外显子编码 35~105 位氨基酸。睾丸中敲除 PP2AC $\alpha$  基因的 2 号外显子会导致雄性小鼠不育,提示 PP2AC $\alpha$  第 2 号外显子在维持 PP2AC $\alpha$  功能(促进小鼠精子发育、成熟)中起重要作用<sup>[15]</sup>。本实验中成功构建了胰岛  $\beta$  细胞 PP2AC $\alpha$  基因 2 号外显子敲除小鼠,进一步观察发现 4 月龄

胰岛  $\beta$  细胞 PP2A $\alpha$  基因失活小鼠糖耐量受损。

PP2A 在胰岛功能中的作用尚有争议。有研究表明,冈田酸选择性抑制 PP2A 活性,可以增加  $\beta$  细胞钙离子内流,促使胰岛素分泌颗粒胞吐<sup>[16]</sup>。PP2A 在高糖环境下羧基末端甲基化,继而活化,活性增强的 PP2A 过度去磷酸化导致 Akt、Bcl2 失活和 FoxO1 激活,进而抑制大鼠胰岛和 INS-1 832/13 细胞葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)<sup>[17]</sup>。然而利用 siRNA 敲除 INS-1 832/13 细胞 PP2A 后却抑制了 GSIS<sup>[7]</sup>。本研究发现,特异性失活小鼠胰岛  $\beta$  细胞 PP2A $\alpha$  基因可导致糖耐量受损,提示 PP2A 在糖尿病发病机制中发挥了一定的作用,其相关分子和细胞机制正在探索中。

#### [参考文献]

- [1] Bononi A, Agnoletto C, De Marchi E, et al. Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate[J]. *Enzyme Res*, 2011, 2011: 329098
- [2] Shi Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure[J]. *Cell*, 2009, 139(3): 468-484
- [3] Sontag E, Hladik C, Montgomery L, et al. Downregulation of protein phosphatase 2A carboxyl methylation and methyltransferase May contribute to Alzheimer disease pathogenesis[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004, 63(10): 1080-1091
- [4] Xian L, Hou S, Huang Z, et al. Liver-specific deletion of Ppp2c $\alpha$  enhances glucose metabolism and insulin sensitivity[J]. *Aging(Albany NY)*, 2015, 7(4): 223-232
- [5] Perrotti D, Neviani P. Protein phosphatase 2A: a target for anticancer therapy[J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14(6): e229-e238
- [6] Sablina AA, Hahn WC. The role of PP2A A subunits in tumor suppression[J]. *Cell Adh Migr*, 2009, 1(3): 140-141
- [7] Jangati GR, Veluthakal R, Susick L, et al. Depletion of the catalytic subunit of protein phosphatase-2A (PP2Ac) markedly attenuates glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-cells[J]. *Endocrine*, 2007, 31(3): 248-253
- [8] Shi J, Gu P, Zhu Z, et al. Protein phosphatase 2A effectively modulates basal L-type Ca(2+) current by dephosphorylating Ca(v)1.2 at serine 1866 in mouse cardiac myocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 418(4): 792-798
- [9] Heijman J, Dewenter M, El-Armouche A, et al. Function and regulation of serine/threonine phosphatases in the healthy and diseased heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, 64: 90-98
- [10] Zhang J, Zhao J, Jiang WJ, et al. Conditional gene manipulation: Creating a new biological era[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2012, 13(7): 511-524
- [11] Kos CH. Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models[J]. *Nutr Rev*, 2004, 62(6 Pt 1): 243-246
- [12] Gu P, Qi X, Zhou Y, et al. Generation of Ppp2Ca and Ppp2Cb conditional null alleles in mouse[J]. *Genesis*, 2012, 50(5): 429-436
- [13] Matta C, Mobasher A, Gergely P, et al. Ser/Thr-phosphoprotein phosphatases in chondrogenesis: neglected components of a two-player game[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(10): 2175-2185
- [14] Götz J, Probst A, Ehler E, et al. Delayed embryonic lethality in mice lacking protein phosphatase 2A catalytic subunit Calpha [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(21): 12370-12375
- [15] Pan X, Chen X, Tong X, et al. Ppp2ca knockout in mice spermatogenesis[J]. *Reproduction*, 2015, 149(4): 385-391
- [16] Sjöholm A, Lehtihet M, Efanov AM, et al. Glucose metabolites inhibit protein phosphatases and directly promote insulin exocytosis in pancreatic beta-cells[J]. *Endocrinology*, 2002, 143(12): 4592-4598
- [17] Arora DK, Machhadieh B, Matti A, et al. High glucose exposure promotes activation of protein phosphatase 2A in rodent islets and INS-1 832/13  $\beta$ -cells by increasing the posttranslational carboxymethylation of its catalytic subunit[J]. *Endocrinology*, 2014, 155(2): 380-391

[收稿日期] 2015-08-04