



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106362166 B

(45)授权公告日 2019.12.10

(21)申请号 201610955411.5

(22)申请日 2016.10.27

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106362166 A

(43)申请公布日 2017.02.01

(73)专利权人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山
武汉大学

(72)发明人 李红良 张志仁

(74)专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 42222

代理人 张火春

(51)Int.Cl.

A61K 49/00(2006.01)

A61K 45/00(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

(56)对比文件

CN 102413817 A, 2012.04.11,

Soond SM et al..TRUSS,a novel tumor
necrosis factor receptor 1 scaffolding
protein that mediates activation of the
transcription factor NF-kappaB.《Mol Cell
Biol》.2003,第23卷(第22期),8334-8344.

CHANG-JIANG YU ET AL..TRUSS
EXACERBATES NAFLD DEVELOPMENT BY
PROMOTING Ikb α DEGRADATION IN MICE.
《HEPATOLOGY》.2018,第68卷(第5期),1769-
1785.

冯文焕 等.艾塞那肽对非酒精性脂肪肝大
鼠肝脏NF- κ B、TNF- α 、TGF- β _1表达的影响.
《中国糖尿病杂志》.2012,第20卷(第10期),771-
774.

李新胜.脂联素与2型糖尿病及炎症反应.
《中国全科医学》.2005,第8卷(第20期),1728-
1729.

审查员 彭海航

权利要求书1页 说明书8页
序列表3页 附图2页

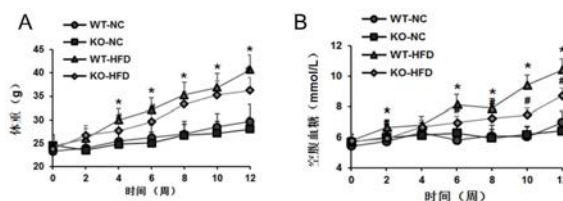
(54)发明名称

肿瘤坏死因子受体相关泛支架和信号蛋白
在治疗脂肪肝和II型糖尿病中的功能和应用

(57)摘要

本发明公开一种TRUSS基因在脂肪肝糖尿病
疾病中的功能和应用。以TRUSS基因敲除小鼠和
野生型C57小鼠为实验对象,通过高脂饮食诱导
的肥胖小鼠模型,结果表明与野生型C57小鼠对
比,TRUSS基因敲除小鼠体重减轻,空腹血糖水平
低于对照组WT小鼠。通过腹腔注射葡萄糖耐量实
验发现TRUSS基因敲除小鼠对葡萄糖的耐受能力
明显增强。从小鼠肝脏重量及肝脏/体重比以及
脂质成分、糖原含量病理染色结果等说明高脂饮
食的TRUSS-KO小鼠脂肪肝病明显减轻,脂质蓄
积显著减少,肝损伤程度明显减轻。因此,TRUSS
可作为筛选治疗脂肪肝和/或II型糖尿病的药物
靶标,其抑制剂可用于制备治疗脂肪肝和/或II

型糖尿病的药物。



1. TRUSS基因作为药物靶标在筛选预防、缓解和/或治疗脂肪肝、II型糖尿病的药物中的应用,其特征在于:所述的药物是抑制TRUSS基因表达的药物;所述的应用是非诊断和非治疗的。

肿瘤坏死因子受体相关泛支架和信号蛋白在治疗脂肪肝和Ⅱ型糖尿病中的功能和应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因的功能与应用领域,特别涉及一种肿瘤坏死因子受体相关泛支架和信号蛋白基因(Tumor necrosis factor receptor-associated ubiquitous scaffolding and signaling protein,TRUSS)作为药物靶标在筛选预防、缓解和/或治疗脂肪肝和/或Ⅱ型糖尿病的药物中应用。

背景技术

[0002] 随着人类生活水平的提高,生活方式的改变,糖尿病的发病率在不断上升并且呈现全球化和低龄化的特征。据统计,全球糖尿病患者已超过3亿人,其中Ⅱ型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)占90%以上,到2030年,患病人数将超过4亿。值得注意的是,当前儿童、青少年以及青年人群中T2DM前期发病率剧增,这也意味着在未来的糖尿病的发病人群将扩大,防治难度将会大大增加。当前已有许多药物靶点被发现并被应用于糖尿病治疗领域,但由于靶点机制问题,很多传统的抗T2DM药物存在低血糖、心血管事件、体重增加等副作用,这限制了他们的使用。近几年,针对DPP-4、GLP-1R以及SGLT2等靶点的抗糖尿病新药显示出相对低的副作用风险和良好的降糖效果,但这些药物仍然不能从根本上治疗糖尿病。因此,人们一直在寻求治疗效果更好、患者顺应性更高的抗糖尿病药物。

[0003] 非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种无过量酒精摄入,以肝实质细胞脂肪变性和脂肪贮积为特征的临床病理综合征。单纯性脂肪肝并不是静止不变的,如果不采取任何措施任其发展,其可以进展为非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纤维化、肝硬化,甚至肝癌,发展为肝硬化或肝癌的比例分别为5%~10%和1%~2%。此外,脂肪肝还可损害消化系统功能,降低人体免疫力、减弱解毒功能,影响激素代谢,严重影响了人们的身体健康和生活质量,也给社会带来沉重负担。由于NAFLD的发病机制尚未完全明确,且目前尚缺乏有效的治疗手段,主要以预防为主。

[0004] 由于近年来NAFLD的发病率迅速增长且呈低龄化趋势,其受到了广泛关注。随着人们生活水平的提高和生活方式的改变,T2DM合并NAFLD的患病率正逐年增加。研究结果显示,在糖尿病人群中,NAFLD患病率可高达80%^[1]。在有些患者中肝脏脂肪沉积可能是影响其T2DM发展的主要因素^[2]。另一方面,如果T2DM控制不佳或充分发展,不仅促进脂肪肝生成,而且使肝损伤加重,甚至形成非酒精性脂肪性肝炎、肝纤维变性、肝硬化及肝细胞癌^[3]。T2DM合并NAFLD的患者控制血糖的能力不及T2DM不合并NAFLD的患者^[4]。T2DM合并NAFLD将大大增加由于肝硬化、肝细胞癌和心血管并发症导致的死亡风险^[5]。目前,虽然控制高脂血症在T2DM伴NAFLD患者中的治疗作用仍有待探究,但是NAFLD的治疗主要包括针对糖尿病和心血管风险因子的积极控制。研究表明,在合并T2DM和NAFLD的患者中,只有噻唑烷二酮类药物吡格列酮显示出肝脏组织学的明显改善。因此,我们对于NAFLD的诊断治疗仍存在极大挑战。未来我们应该制定特异的筛选标准以及治疗方案以期应用于临床T2DM和NAFLD患者,

尤其是T2DM和NAFLD合并的患者。

[0005] 肿瘤坏死因子受体相关蛋白 (TRUSS) 是一个新近报道的分子量约为91kDa的TNF-R1结合蛋白,表达广泛,但富集在心脏、肝脏和睾丸组织。序列分析显示TRUSS的包含残基440-797的C-末端区域是一个亮氨酸高度富集的区域,并且包含多种假定的双亮氨酸和酸性簇内化模式。另外,TRUSS包含五个(P/S/A/T) x (Q/E) E或者STRUSSE一致序列和TRAF-2结合模式,其中四个位于TRUSS的N-末端,一个位于C-末端。研究表明TRUSS可以通过募集一种DDB1 (damage-specific DNA-binding protein 1) -CUL4 (Cullin 4) E3泛素化连接酶复合体,调节原癌基因Myc的降解,在癌症发生过程中发挥一定作用^[6];另外,TRUSS可与细胞周期S相特异的E3连接酶Skp2结合,导致TRUSS的泛素化和接下来蛋白酶体介导的降解^[7]。虽然对于TRUSS的分子功能有了一定的了解,但是其在生理病理状态下的作用尚无报道,TRUSS在脂肪肝、糖尿病中的作用更是有待探索。

[0006] 参考文献:

[0007] 1.Fan JG,Farrell GC.Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in china.J Hepatol.2009;50:204-210

[0008] 2.Loria P,Lonardo A,Anania F.Liver and diabetes.A vicious circle.Hepatol Res.2013;43:51-64

[0009] 3.Smith BW,Adams LA.Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus:Pathogenesis and treatment.Nat Rev Endocrinol.2011;7:456-465

[0010] 4.Williamson RM,Price JF,Glancy S,Perry E,Nee LD,Hayes PC,Frier BM, Van Look LA,Johnston GI,Reynolds RM,Strachan MW.Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis and nonalcoholic fatty liver disease in people with type 2 diabetes:The edinburgh type 2 diabetes study.Diabetes Care.2011; 34:1139-1144

[0011] 5.Cusi K.Treatment of patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease:Current approaches and future directions.Diabetologia.2016;59:1112-1120

[0012] 6.Choi SH,Wright JB,Gerber SA,Cole MD.Myc protein is stabilized by suppression of a novel e3 ligase complex in cancer cells.Genes Dev.2010;24: 1236-1241

[0013] 7.Jamal A,Swarnalatha M,Sultana S,Joshi P,Panda SK,Kumar V.The g1 phase e3 ubiquitin ligase truss that gets deregulated in human cancers is a novel substrate of the s-phase e3 ubiquitin ligase skp2.Cell Cycle.2015;14: 2688-2700

发明内容

[0014] 为解决上述现有技术的缺陷和不足,本发明的目的在于提供一种TRUSS基因的表达与脂肪肝、II型糖尿病之间的相互关系,提供一个用于治疗脂肪肝、II型糖尿病的靶基因TRUSS的新用途,进而把TRUSS基因应用于脂肪肝、II型糖尿病的治疗。

[0015] 本发明的目的通过以下技术方案实现:

[0016] 本发明以野生型C57小鼠与TRUSS基因敲除小鼠为实验对象,通过高脂饮食诱导的肥胖小鼠模型(diet induced obesity,DIO)研究TRUSS基因的功能,结果发现与野生型WT小鼠对比,TRUSS基因敲除小鼠的体重明显低于同种饲料饲养的WT小鼠,表象为较轻的肥胖状态,并且TRUSS基因敲除小鼠的空腹血糖水平也低于对照组WT小鼠。进一步通过腹腔注射葡萄糖耐量实验发现TRUSS基因敲除小鼠对葡萄糖的耐受能力明显增强。从小鼠肝脏重量及肝脏/体重比以及脂质成分、糖原含量病理染色结果等均说明HFD组(High fat diet,高脂饮食)的TRUSS-KO小鼠脂肪肝病变明显减轻,脂质蓄积显著减少,肝损伤程度明显减轻。这表明TRUSS基因敲除会延缓脂肪肝、II型糖尿病的发生,TRUSS基因能够促进脂肪肝、II型糖尿病的发生。

[0017] 因此,TRUSS基因可作为药物靶点,构建TRUSS基因过表达的体外细胞模型或动物模型,用于筛选预防、缓解和/或治疗脂肪肝和/或II型糖尿病的药物;TRUSS基因也可作为基因治疗中的靶基因,设计并制备预防、缓解和/或治疗脂肪肝和/或II型糖尿病的药物和/或生物学试剂,通过基因工程技术达到预防、缓解和/或治疗脂肪肝和/或II型糖尿病的目的。例如以TRUSS为靶基因,设计可干扰TRUSS表达的双链siRNA,通过化学方法合成以后,注射入人体通过RNA干扰的方法使TRUSS基因沉默来治疗脂肪肝和/或II型糖尿病;还可以设计并构建TRUSS的突变体,注射后进入细胞,竞争TRUSS原形的作用底物,从而抑制TRUSS的功能,起到治疗目的;此外,还可以以TRUSS为靶点设计小分子化合物抑制剂,利用TRUSS基因过表达的体外细胞模型或动物模型,通过筛选,发现其中能够特异性抑制TRUSS的分子,从而为脂肪肝和/或II型糖尿病的治疗提供新的治疗性分子。

[0018] 针对TRUSS的上述功能,提供TRUSS作为药物靶标在筛选保护神肝脏及糖代谢的药物中的应用。

[0019] 针对TRUSS的上述功能,提供TRUSS作为药物靶标在筛选预防、缓解和/或治疗脂肪肝和/或II型糖尿病的药物中的应用。

[0020] 针对TRUSS的上述功能,提供TRUSS的抑制剂在制备预防、缓解和/或治疗脂肪肝和/或II型糖尿病的药物中的应用。

[0021] 一种预防、缓解和/或治疗脂肪肝和/或II型糖尿病的药物,包含TRUSS的抑制剂。

[0022] 所述的TRUSS的抑制剂优选为TRUSS基因的siRNA、TRUSS基因的RNA干扰载体,TRUSS的抗体及其他能够抑制TRUSS表达的抑制剂。

[0023] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0024] (1) 本发明发现TRUSS的新功能,即TRUSS具有恶化脂肪肝和II型糖尿病的作用。

[0025] (2) 基于TRUSS在恶化脂肪肝和II型糖尿病疾病中的功能,其为研制预防、缓解和/或治疗脂肪肝和/或II型糖尿病的药物提供靶标。

[0026] (3) TRUSS的抑制剂可用于制备预防、缓解和/或治疗脂肪肝和/或II型糖尿病的药物。

附图说明

[0027] 图1是TRUSS肝脏特异性基因敲除小鼠构建策略图。

[0028] 图2是WT和TRUSS-KO小鼠的体重、空腹血糖结果图;

[0029] A为小鼠体重结果图,B为空腹血糖水平统计图(*:p<0.05vs WT NC组,#:p<

0.05vs WT HFD组)。

[0030] 图3是WT和TRUSS-KO小鼠通过腹腔注射葡萄糖耐量结果图;

[0031] A为通过腹腔注射葡萄糖后不同时间点小鼠血糖水平统计图,B为各组小鼠糖耐量曲线下面积(area under the curve,AUC)比较图(*:p<0.05vs WT NC组,#:p<0.05vs WT HFD组)。

[0032] 图4是TRUSS-KO和WT小鼠的肝脏重量、肝脏重量与小鼠本身体重比值统计柱状图(#:p<0.05vs WT HFD组)。

[0033] 图5是WT和TRUSS-KO和WT小鼠的油红O和糖原染色图。

具体实施方式

[0034] 通过以下详细说明结合附图可以进一步理解本发明的特点和优点。所提供的实施例仅是对本发明方法的说明,而不以任何方式限制本发明揭示的其余内容。

[0035] 实验用动物及饲养:

[0036] 实验动物种属,性别,周龄及来源:C57BL/6 (WT) 小鼠和TRUSS肝脏特异性基因敲除(TRUSS-KO) 小鼠,雄性,8周龄。C57BL/6小鼠购自北京华阜康生物科技有限公司,TRUSS肝脏特异性基因敲除小鼠(TRUSS-KO)由TRUSS-floxed小鼠与受蛋白启动子控制、肝细胞特异性表达的Cre转基因小鼠Albumin-Cre(购自The Jackson Laboratory,货号003574)杂交得到,构建策略见图1。

[0037] 肝脏特异性TRUSS基因敲除小鼠的构建:

[0038] 根据基因信息,利用CRISPR Design(网址:<http://crispr.mit.edu/>) 分别在内含子3和4中各设计一个CRISPR的打靶位点。靶序列分别为

[0039] TRUSS-sRNA1:ggCTGAGTGTCTCTACGCAACTA AGG

[0040] TRUSS-sRNA2:ggCTTGACCCCGCCTCCGTTTTCT TGG

[0041] 此外还设计了一个用于同源修复的供体质粒(Donor Vector),它包括两侧同源臂、中间的外显子4、以及两个同向的loxP序列。

[0042] ①打靶载体的构建:分别将sgRNA1和sgRNA2对应的两条引物融合成双链DNA,然后用T4DNA连接酶连入经过限制性内切酶BsaI处理过的pUC57-sgRNA载体中。该载体上游有一个T7启动子,可以用于后续的体外转录实验。

[0043] ②条件性敲除骨架载体pBluescript SK(+)-2loxP的构建:

[0044] 分别合成4条寡聚单链核苷酸序列:

[0045] loxP1-F:

[0046] AGCTTGACGTCATAACTTCGTATAGCATACATTATAGCAATTTATACCGGTGAT,

[0047] loxP1-R:

[0048] ATCACCGGTATAAATTGCTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGACGTCA;

[0049] loxP2-F:

[0050] GATCCCTTAAGATAACTTCGTATAGCATACATTATAGCAATTTATACGCGTA,

[0051] loxP2-R:

[0052] CTAGTACGCGTATAAATTGCTATAATGTATGCTATACGAAGTTATCTTAAGG;

[0053] 上述寡核苷酸序列退火后形成loxP1和loxP2两条双链。将pBluescript IISK(+)

载体用HindIII (NEB,R0104L) 和EcoRV (NEB,R0195L) 双酶切后连接入loxp1退火双链,再将测序正确的载体用BamHI (NEB,R0136L) 和SpeI (NEB,R0133L) 双酶切,连接入loxp2退火双链,得到条件性敲除骨架载体,命名为pBluescript SK(+)-2loxp。

[0054] ③供体载体 (Donor Vector) 的构建:根据引物设计原则,设计如下引物(表1)用于扩增供体载体的左右同源臂(LA和RA)以及中间的外显子部分(M)。扩增得到的产物经表1中所示限制性内切酶酶切后得到3个片段,将其分别连入条件性敲除骨架载体pBluescript SK(+)-2loxp中,得到Donor Vector。

[0055] 表1构建供体载体所需引物序列及对应酶切位点

[0056]

引物名称	引物序列	酶切位点
TRUSS LA-F	CCGCTCGAGGCTCAGACTCCAGTTGAACATTTA	XhoI
TRUSS LA-R	ATGGACGTCCTAAGGAGCATCTCTGAAGAATCT	AatII
TRUSS M-F	TCTACCGGTTTGCCTAGAGACACTCAGGGAT	AgeI
TRUSS M-R	CGGGATCCAAACGGAGGCGGGGTCAA	BamHI
TRUSS RA-F	CGACGCGTTCTTGGGAGGTTTTATGCTG	MluI
TRUSS RA-R	ATAAGAATGCGGCCGCGCCTGTCTGAGGAATGTGGT	NotI

[0057] ④打靶载体的转录:对CRIPR/Cas9系统包含的两个部分(负责切割作用的Cas9蛋白和引导Cas9蛋白定位到靶位点的gRNA)分别进行转录。对于Cas9蛋白,将其表达载体(pST1374-Cas9)用PmeI进行酶切,以纯化后回收线性化质粒为转录模板,用T7mMESSAGE mACHINE试剂盒(AM1345,Ambion)进行体外转录,获得加帽的mRNA产物。并用Poly(A) Tailing试剂盒(Ambion)对上述产物加尾,获得成熟的mRNA产物;对于sgRNA,使用MEGashortscript™ Kit(AM1354,Ambion公司)进行体外转录。将转录得到的Cas9和sgRNA的mRNA使用miRNeasy Micro Kit(Qiagen,217084)进行纯化。

[0058] ⑤TRUSS-floxed条件性敲除小鼠的制作

[0059] 将上述成熟的mRNA产物与供体质粒一同注入小鼠受精卵中,移植到代孕母鼠体内进行培育。得到的小鼠进行鉴定。取出生一周后的小鼠脚趾或尾部组织,提取基因组,并通过PCR方法筛选阳性首建鼠。从确定发生同源重组的小鼠中随机挑选一只作为F0代进行后续的繁殖,最终获得TRUSS-floxed纯合小鼠。

[0060] ⑥肝脏特异性TRUSS基因敲除小鼠的制作

[0061] 将上述TRUSS-floxed小鼠与肝脏特异性Albumin-Cre转基因小鼠交配,筛选得到TRUSS^{floxed/floxed}/Albumin-Cre小鼠,待该小鼠长至6周龄左右后,腹腔注射Tamoxifen,诱导Cre酶的表达,Cre酶特异性的识别两个同向的loxp,并切除两者之间的序列及其中的一个loxp,最后得到肝脏细胞特异性TRUSS基因敲除小鼠。

[0062] 实验动物饲料配方:高脂饲料(HFD)(购自北京华阜康生物科技有限公司,货号D12942):热量百分比:蛋白质:20%;碳水化合物:20%;脂肪:60%,总的热量质量比:5.24kcal/g。低脂饲料(NC)(购自北京华阜康生物科技有限公司,货号D12450B):热量百分比:蛋白质:20%;碳水化合物:70%;脂肪:10%,总的热量质量比:3.85kcal/g。

[0063] 饲养环境及条件:SPF级实验动物中心,室温在22-24℃之间,湿度在40-70%之间,明暗交替照明时间为12h,自由饮水摄食。

[0064] 【实施例1】小鼠脂肪肝、II型糖尿病模型(diet induced obesity,DIO)获得

[0065] (1)实验动物分组:选用8周龄,雄性,WT小鼠和TRUSS-KO小鼠,分别给与两种特殊饲料D12942高脂饲料(High fat diet,HFD)和D12450B低脂饲料(Normal chow,NC)饲养,即WT NC组,KO NC组,WT HFD组,KO HFD组共4个组别。

[0066] (2)模型通过高脂饲料诱导操作流程:

[0067] 采用WT和KO小鼠,建立DIO模型,进行表型相关分析,明确TRUSS基因对脂肪肝、II型糖尿病发挥的作用。选用8周龄,雄性,WT小鼠和TRUSS-KO小鼠,分别给与两种特殊饲料D12942高脂饲料(Highfat diet,HFD)和D12450B低脂饲料(Normal chow,NC)饲养,即WT NC组,KO NC组,WT HFD组,KO HFD组共4个组别。每周均详细记录小鼠摄食量,小鼠空腹体重和空腹血糖每隔2周检测1次。实验第10周,进行腹腔注射葡萄糖实验(IPGTT),以评价小鼠机体对葡萄糖耐受能力。第12周终末取材,取出小鼠肝脏称重,然后一部分置于甲醛溶液中固定或O.C.T冰冻切片包埋剂(Tissue Freezing Medium)包埋作为病理分析用。

[0068] 【实施例2】小鼠体重、血糖水平测定

[0069] (1)小鼠空腹体重,食量检测

[0070] 1)体重检测。

[0071] ①禁食:上午8:00将待实验小鼠禁食(不禁水),下午2:00开始实验操作。

[0072] ②称重:分别在第0周、2周、4周、6周、8周、10周和12周称重,将一塑料小桶放在动态电子天平上,抓起小鼠,放入称量小桶中,测量体重记录数据。饲料量检测:待称体重操作完成后,给小鼠加饲料,并在动态电子天平上记录小鼠的饲料量。

[0073] (2)空腹血糖水平检测实验

[0074] 将所有待实验的小鼠从上午8:00至下午2:00间禁食(不禁水),即禁食6小时后开始实验操作。

[0075] ①血糖仪准备:检查血糖仪(美国强生公司,ONETOUCH)电池,按右侧开关,将试纸正确放入左侧插槽,屏幕显示与血糖试纸条相应代码的数字,随后显示滴血图案,提示血糖仪进入待测状态。

[0076] ②固定小鼠:右手抓鼠尾,左手持一块毛巾,将毛巾对折,用拇指和食指捏住毛巾对折处,将鼠头部和身体包入手掌内的毛巾,拇指和食指在将鼠尾根部固定。

[0077] ③剪尾:眼科剪迅速在距鼠尾末端0.1-0.2cm处剪下鼠尾,待血滴自行流出。

[0078] ④血糖检测:将血糖仪试纸边缘轻触血滴,血液浸入试纸,血糖仪倒计时5秒显示读数。

[0079] II型糖尿病损伤严重程度的评估指标主要包括体重、血糖等水平,体重、血糖变化结果如图2所示,WT小鼠在给与HFD饲料饲养后,从第4周开始体重明显高于其NC饲料组,给与TRUSS-KO小鼠12周的HFD饲料和NC饲料饲养后,从第4周开始HFD组的TRUSS-KO小鼠体重明显低于HFD组的WT小鼠体重,一直持续到第12周(见图2A);经空腹血糖检测发现在HFD组的小鼠从第6周、8周、10周、12周的空腹血糖水平明显较相应NC对照组升高,HFD组的TRUSS-KO小鼠空腹血糖水平明显低于WT组小鼠空腹血糖水平(见图2B)。表明TRUSS基因敲除后显著影响了小鼠在HFD饲养状态下的糖代谢稳态,TRUSS基因能显著降低小鼠的糖代谢能力,TRUSS基因能促进高脂诱导引起的II型糖尿病的发生。

[0080] 【实施例3】葡萄糖耐量实验(intraperitoneal glucose tolerance test,IPGTT)

[0081] 实验第10周,进行腹腔注射葡萄糖实验(IPGTT),以评价小鼠机体对糖耐受能力。

[0082] (1)在测血糖之前,先测量小鼠的空腹体重,根据 $10\mu\text{L/g}$ 计算葡萄糖的注射体积。

[0083] (2)先检测葡萄糖注射前即0分钟时空腹血糖,在检测完毕后迅速经腹腔注射葡萄糖液。

[0084] (3)腹腔注射操作方法:①固定小鼠;抓起小鼠,左手的小指和无名指抓小鼠的尾巴,另三手指抓住小鼠的颈部,使小鼠的头部向下,将小鼠腹部充分暴露。②进针定位及注射:从腹部一侧进针右手持注射器,将尖端与小鼠腹部成 45° 的夹角,进针,回抽,注射时针头在腹部皮下穿行一小段距离,穿过腹中线后在腹部另一侧进入腹腔,注射完药物后,缓缓拔出针头,并轻微旋转针头,防止漏液。

[0085] (4)分别于腹腔注射后15分、30分、60分、120分钟时间点剪尾测小鼠血糖值,并记录血糖数值和检测时间。

[0086] 进一步通过腹腔注射葡萄糖耐量实验(intraperitoneal glucose tolerancetests,IPGTT)来评估各组小鼠对葡萄糖的处理能力,在实验第10周,通过注射 1.0g/kg 体重的葡萄糖后,HFD组的WT小鼠和TRUSS-KO小鼠血糖水平在15分钟时间点剧增达到峰值,随着时间推移至注射后60分钟,两组小鼠血糖水平稍微下降,但仍处于高于空腹血糖水平(0分钟时血糖),在2小时时恢复至空腹血糖水平,且HFD组TRUSS-KO小鼠血糖水平从0分钟至2小时一直处于低于WT小鼠的血糖水平(图3A)。比较各组小鼠血糖曲线下面积(area under the curve,AUC),发现WT小鼠HFD组的AUC显著高于NC组,TRUSS-KO HFD组的AUC显著小于WT HFD组的AUC(图3B),表明TRUSS可抑制糖代谢的稳态。**【实施例4】**肝脏大体外观及肝脏组织脂质成分测定

[0087] (1)终末肝脏组织取材

[0088] 1)小鼠称重后,迅速脱颈处死。仰卧固定小鼠,用蒸馏水将小鼠胸部,腹部毛发润湿。

[0089] 2)用一镊子钳夹小鼠腹部正中皮肤,沿腹部正中向头部剪开皮肤至剑突下,向尾端剪开皮肤,逐层暴露皮下筋膜,肌肉等,打开腹腔,充分暴露各脏器。

[0090] 3)迅速找到并取下小鼠的肝脏,将取下的肝脏标本置于灭菌纱布上,拭干肝脏表面上残留血液,将肝脏置于无菌培养皿中,迅速称重。

[0091] 4)石蜡标本:切取部分肝脏置于10%中性福尔马林中固定。冰冻标本:切取部分肝脏,置于有OCT的锡纸模具中包埋,放在干冰上冰冻固定。

[0092] 2.肝脏组织处理及病理染色相关实验

[0093] 1)肝脏脱水,透明,浸蜡

[0094] 切取10%中性福尔马林中固定好的部分肝叶组织于标记的包埋框内,在小流量流水冲洗30分钟以上。按照以下流程在机器上设置以下程序,①脱水:75%酒精(45分钟)→75%酒精(45分钟)→85%酒精(45分钟)→85%酒精(45分钟)→95%酒精(45分钟)→95%酒精(45分钟)→无水酒精(1小时)→无水酒精(1小时);②透明:二甲苯(1小时)→二甲苯(1小时);③浸蜡(65°C):石蜡(1小时)→石蜡(1小时)。待组织冲洗完毕后,将包含组织的包埋框装进机器篮筐内,启动上述程序。上述程序完成后,取出组织包埋框送病理室包埋组织,同时清洗机器备用。

[0095] 2)肝脏组织切片

[0096] 使用切片机切片(切片厚度5 μ m)。

[0097] 3) 肝脏组织糖原染色

[0098] 将肝脏组织石蜡切片放入65℃烘箱(30分钟)→二甲苯中(5分钟×3次)→100%酒精(1分钟)→90%酒精(1分钟)→70%酒精(1分钟)→蒸馏水洗→高碘酸(10分钟)→自来水洗去切片上的浮色→雪夫试剂浸染(10-15分钟)→自来水洗数下→苏木素(1分钟)→蒸馏水洗去切片上的浮色→70%酒精一下→90%酒精一下→100%酒精(30秒×3次)→二甲苯(2分钟×3次)→在二甲苯未干时封片,拍照。

[0099] 4) 肝脏组织油红O染色

[0100] ①将冰冻肝脏组织切片在通风橱中风干30分钟,4%多聚甲醛固定10分钟。置于双蒸水中稍洗10分钟,以除去组织表明多聚甲醛。

[0101] ②以60%异丙醇处理1分钟。

[0102] ③用油红O(公司sigma,货号00625,浓度0.5克/100mL 100%异丙醇)染色30分钟。

[0103] ④之后以60%异丙醇漂洗1分钟×3次,直至背景干净。

[0104] ⑤用Mayer's苏木素染液(5滴)淡染细胞核。

[0105] ⑥水漂洗,稀碳酸锂水溶液中促蓝,充分水洗,水洗至细胞核蓝化。

[0106] ⑦用甘油明胶封片,拍照。

[0107] 肝脏重量及肝重体重比结果见图4所示,在HFD组的TRUSS-KO小鼠无论肝脏重量还是肝脏重量与小鼠本身体重比值均较HFD组的WT小鼠低(如图4)。进一步通过组织切片,进行油O和糖原染色,显微镜下观察各组小鼠肝脏组织在高脂饮食饲养条件下发生了显著的病理改变。通过肝脏油红O染色,可以观察到在HFD饲养条件下,WT小鼠和TRUSS-KO小鼠肝脏组织均有脂肪沉积,可以看到NC组小鼠的肝细胞发生脂肪变性、空泡化且融合连成片状,肝脏细胞形态已几乎完全破坏,而TRUSS-KO组小鼠的肝细胞形态变化较轻微(如图5上)。通过肝脏糖原染色来检测肝脏损伤程度,可以发现在HFD组的TRUSS-KO小鼠肝糖原的含量相比于WT组小鼠明显增多(如图5下),说明HFD组TRUSS-KO小鼠肝脏损伤程度较WT组轻。这些结果说明TRUSS基因敲除小鼠的脂肪肝明显被抑制。

[0108] 表明TRUSS基因对促进II型糖尿病和脂肪肝的发生具有显著的作用。本发明结果说明TRUSS基因在脂肪肝、II型糖尿病疾病模型中有促进疾病恶化的作用。

[0109] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 武汉大学
- [0003] <120> 肿瘤坏死因子受体相关泛支架和信号蛋白在治疗脂肪肝和Ⅱ型糖尿病中的功
- [0004] 能和应用
- [0005] <160> 12
- [0006] <170> PatentIn version 3.3
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 26
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> TRUSS-sRNA1
- [0011] <400> 1
- [0012] ggctgagtgt ctctacgcaa ctaagg 26
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 27
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> TRUSS-sRNA2
- [0017] <400> 2
- [0018] ggcttgaccc cgcctccggtt ttcttgg 27
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 54
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> loxp1-F
- [0023] <400> 3
- [0024] agcttgacgt cataacttcg tatagcatac attatagcaa tttataccgg tgat 54
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 50
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> loxp1-R
- [0029] <400> 4
- [0030] atcaccggta taaattgcta taatgtatgc tatacgaagt tatgacgtca 50
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 52
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> loxp2-F
- [0035] <400> 5
- [0036] gatcccttaa gataacttcg tatagcatac attatagcaa tttatacgcg ta 52
- [0037] <210> 6

[0038]	<211> 52
[0039]	<212> DNA
[0040]	<213> loxp2-R
[0041]	<400> 6
[0042]	ctagtacgcg tataaattgc tataatgtat gctatacgaa gttatcttaa gg 52
[0043]	<210> 7
[0044]	<211> 33
[0045]	<212> DNA
[0046]	<213> TRUSS LA-F
[0047]	<400> 7
[0048]	ccgctcgagg ctcagactcc agttgaacat tta 33
[0049]	<210> 8
[0050]	<211> 33
[0051]	<212> DNA
[0052]	<213> TRUSS LA-R
[0053]	<400> 8
[0054]	atggacgtcc taaggagcat ctctgaagaa tct 33
[0055]	<210> 9
[0056]	<211> 31
[0057]	<212> DNA
[0058]	<213> TRUSS M-F
[0059]	<400> 9
[0060]	tctaccggtt tgcgtagaga cactcaggga t 31
[0061]	<210> 10
[0062]	<211> 26
[0063]	<212> DNA
[0064]	<213> TRUSS M-R
[0065]	<400> 10
[0066]	cgggatccaa acggaggcgg ggtcaa 26
[0067]	<210> 11
[0068]	<211> 29
[0069]	<212> DNA
[0070]	<213> TRUSS RA-F
[0071]	<400> 11
[0072]	cgacgcgttc ttgggaggtt tttatgctg 29
[0073]	<210> 12
[0074]	<211> 36
[0075]	<212> DNA
[0076]	<213> TRUSS RA-R

[0077] <400> 12

[0078] ataagaatgc ggccgcgcct gtctgaggaa tgtggt 36

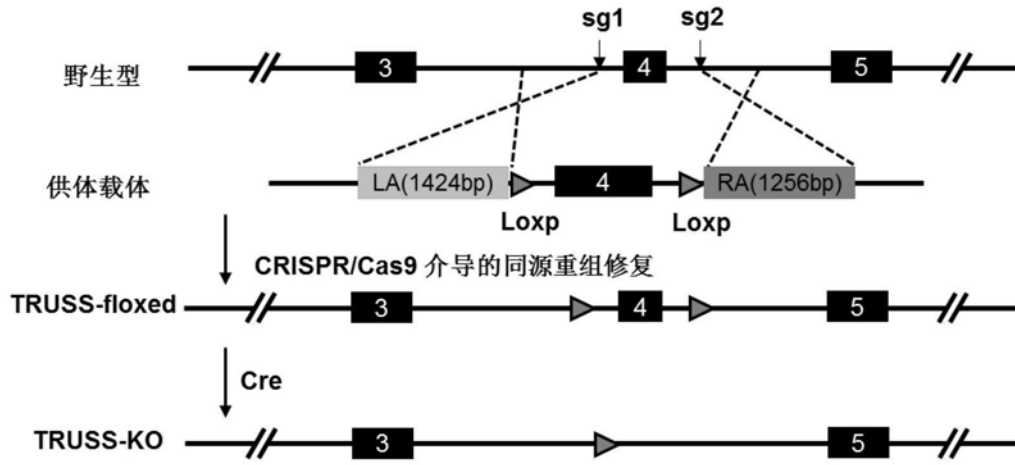


图1

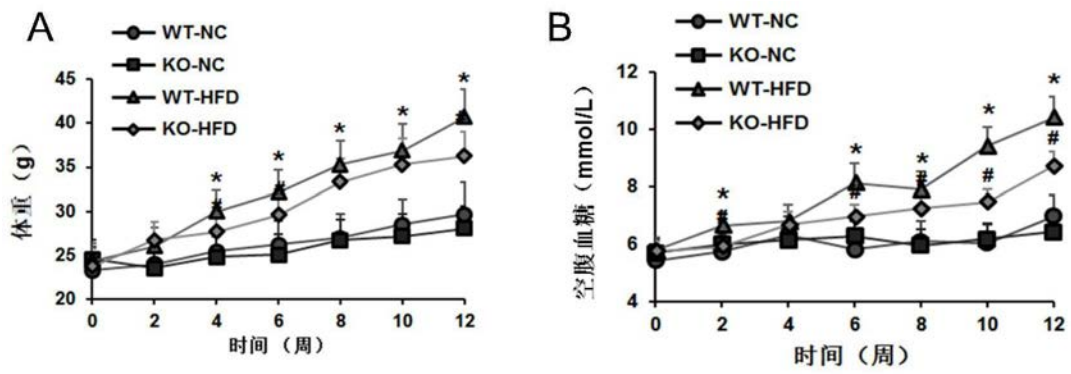


图2

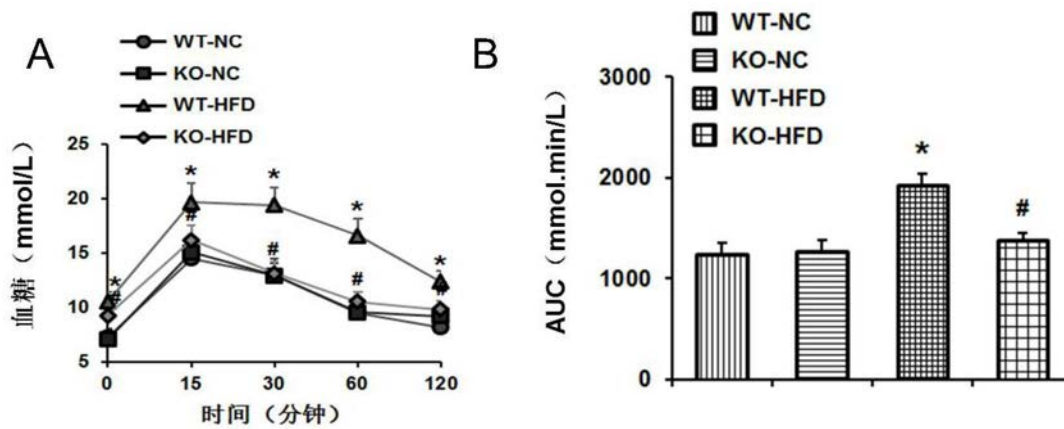


图3

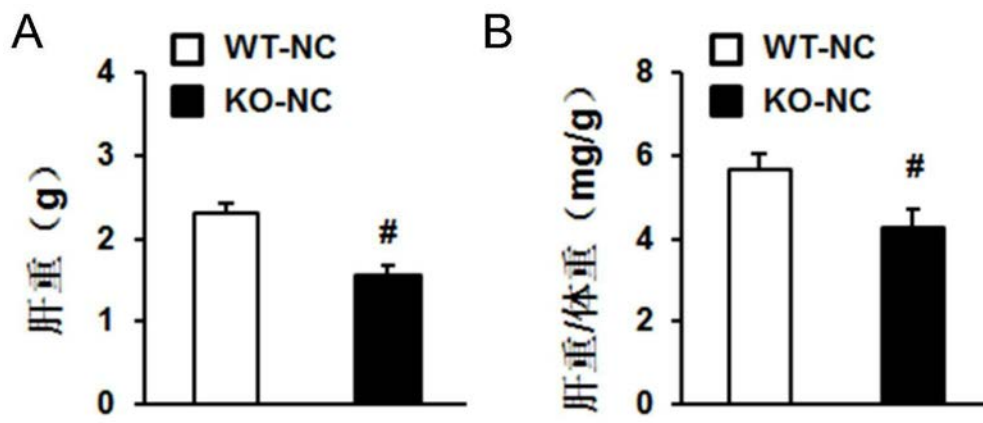


图4

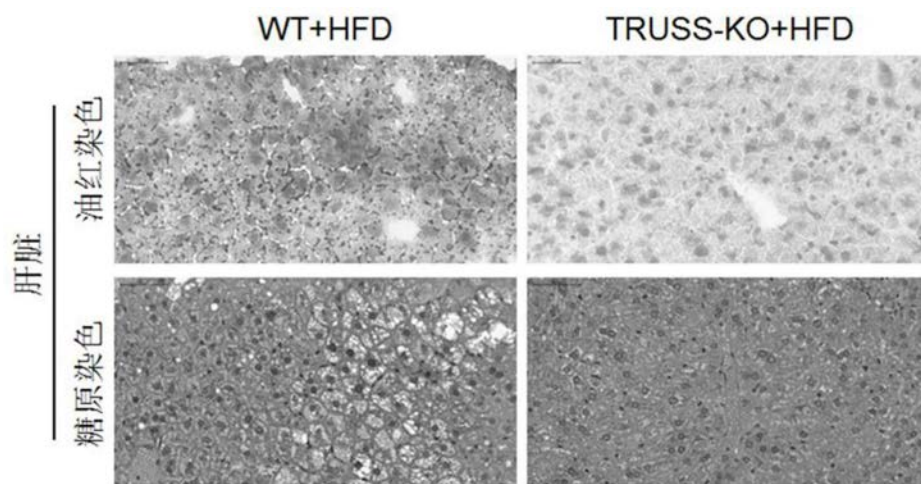


图5