

(10) 国际公布号
WO 2014/114184 A1

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则 4.17(iii))

[见续页]

(54) 发明名称：一种 MG53 突变体及其突变方法和应用

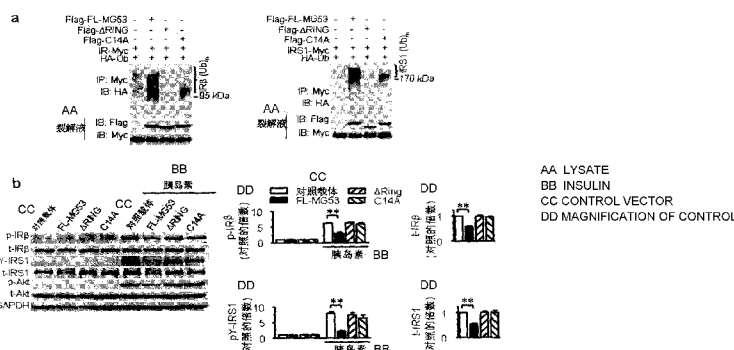


图 7 / FIG. 7

(57) Abstract: Disclosed in the present invention is a MG53 mutant, wherein any one or two or more of 7 cysteines in the RING domain at the N-terminal of MG53 are mutated into mutations of non-polar amino acids. The MG53 mutant has preventive / therapeutic effects and uses in the protection of the heart, and the treatment of heart diseases caused by cell death, while avoiding the side effects caused by MG53 such as insulin resistance, obesity, and diabetes etc.

(57) 摘要: 本发明公开了一种 MG53 突变体, 其为 MG53 的 N 端的 RING 结构域 7 个半胱氨酸中的任一个或两个或两个以上突变为非极性氨基酸的突变体。该 MG53 突变体在保护心脏、治疗细胞死亡导致的心脏疾病方面具有预防/治疗的效果和应用, 同时避免了 MG53 所带来的胰岛素抵抗、肥胖和糖尿病等副作用。

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

一种 MG53 突变体及其突变方法和应用

技术领域

5 本发明涉及一种 MG53 突变体（也可称为 MG53 蛋白突变体），以及该 MG53 突变体在保护心脏、治疗细胞死亡导致的心脏疾病方面的应用，尤其是 MG53 突变体在保护心脏的同时，避免了同样具有心脏保护功效的 MG53 所带来的同时伴有的胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病和代谢综合征等副作用。

背景技术

10 MG53 是骨骼肌特异性蛋白 mitsugumin53，简称 MG53；或 TRIM72。mitsugumin53（MG53），是一种肌肉特异性 tripartite motif family (TRIM) 家族蛋白（该家族蛋白常含三个特定模序结构，分别称为 RING，B-BOX，和卷曲结构域。它们共同作用结合在细胞不再需要的蛋白质上，将这些蛋白带上泛素标记以便降解），MG53 也是一种细胞膜修复机制的重要组成部分。

15 在医学应用方面，MG53 治疗由细胞凋亡引起的心脏疾病的功效已被接受并成为业内前沿领域的公知。MG53 能够对心脏产生保护作用，也就是说可以通过增加 MG53 的含量保护心脏损伤。但是，MG53 同时存在着不可忽视并被视为一大危害的负面效果，MG53 含量的增加在保护心脏的同时，会引起胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病和代谢综合征。也就是说 MG53 在保护心脏的同时，伴有胰岛素抵抗、肥胖和糖尿病等副作用。这是业内所关心的且不希望其正负面作用共存的一个问题，至今没有解决渠道。

发明内容

25 本发明提供一种 MG53 的突变体，为 MG53 蛋白在其 N 端的 RING 结构域 7 个半胱氨酸中的任一个或两个或两个以上的半胱氨酸突变为非极性氨基酸（例如丙氨酸）的 MG53 蛋白突变体。该 MG53 蛋白突变体在保护心脏的同时，避免了同样具有心脏保护功效的 MG53 所带来的同时伴有的胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病和代谢综合征等副作用。

MG53 能够对心脏产生保护作用，也就是说可以通过增加 MG53 的含量保护心脏损伤。但之后发现，MG53 含量的增加在保护心脏的同时，会引起胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病和代

谢综合征。也就是说 MG53 在保护心脏的同时,伴有胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病和代谢综合征等副作用。为促进 MG53 蛋白在保护心脏方面能进一步去劣存优,本申请进行大量的科研工作,最主要目的是对 MG53 蛋白进一步突变,希望能在不引起胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病和代谢综合征等副作用等前提下,使突变体保留行使心脏保护功能,但不伴随相应的副作用。

5 本发明提供了一种 MG53 突变体,该 MG53 突变体为 MG53 的 N 端的 RING 结构域 7 个半胱氨酸中的任一个或两个或两个以上的半胱氨酸突变为非极性氨基酸的突变体;该 7 个半胱氨酸分别是在 RING 结构域的第 14 位点、第 17 位点、第 29 位点、第 34 位点、第 37 位点、第 53 位点、第 56 位点。

上述这 7 个半胱氨酸都是 MG53 的 RING 手指区的重要位点,而 RING 手指区是其行使 E3 连接酶活性、降解其底物、以及引起胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病和代谢综合征等副作用所必需的,因此发明人选择了这 7 个半胱氨酸作为研究对象。

实验和事实证明,该 7 个半胱氨酸的任意一个或者两个或两个以上的组合突变为非极性氨基酸都能达到本发明的预期目的和有益效果。

本发明提供的上述 MG53 蛋白突变体在保护心脏的同时,能够避免 MG53 所带来的同时伴有的胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病和代谢综合征等副作用,且心脏保护作用却不受任何影响。

上述的 MG53 突变体中,所述的非极性氨基酸为丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、或蛋氨酸。优选地,非极性氨基酸为丙氨酸、甘氨酸、亮氨酸、脯氨酸、缬氨酸和异亮氨酸。最优选地,该非极性氨基酸为丙氨酸。

当上述 MG53 突变体中非极性氨基酸为丙氨酸时,所述的 MG53 突变体选自 MG53C14A、MG53C17A、MG53C29A、MG53C34A、MG53C37A、MG53C53A、MG53C56A 中的任一。

本发明所述的 MG53 突变体,其序列的属种包括灵长类动物、大鼠和小鼠。

其中本试验选用原始野生序列为小鼠 MG53(TRIM72)mRNA 的 NCBI 编号: NM_001079932.3。其他序列可选自,

人类: mRNA: NM_001008274.3 相应氨基酸序列: NP_001008275.2;

25 大鼠: mRNA: NM_001077675.1 相应氨基酸序列: NP_001071143.1;

猴子: mRNA: XM_001112866.2 相应氨基酸序列: XP_001112866.1;

且不应局限于所列举的有限序列,包含所涉及物种的所有 MG53 相应序列。以如上序列为基础得到的 MG53 突变体。

在优选实施例中,本发明提供的 MG53 突变体,其为 MG53 蛋白突变体,该突变体的 N 端的 RING 手指区域的第 14 位是丙氨酸,即, MG53 蛋白的 N 端的 RING 手指区域的第一个

半胱氨酸被丙氨酸替代后突变成为本发明的 MG53 突变体, 由于 MG53 蛋白中该半胱氨酸位于第 14 位, 取而代之的丙氨酸也在 14 位, 也就是说, 本发明的 MG53 突变体为 MG53C14A。

通过大量实验研究, 发明人惊喜地发现, MG53 蛋白第 14 位点的 C(半胱氨酸), 是 MG53 引起胰岛素抵抗、肥胖和糖尿病所必需的, 即, 第 14 位 C 突变的 MG53 (MG53C14A) 不能引起胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病和代谢综合征。而 MG53C14A 却仍然能够保护心肌细胞的损伤 (科研实验过程中有可靠的实验数据能够支持这一发明点), 也就是说 MG53C14A 能够在不引起胰岛素抵抗、肥胖和糖尿病等副作用等前提下, 行使心脏保护功能。这正是发明人希望得到的出乎意料的有益效果。若有需要, 这些证明效果的药理实验将在本发明随后部分予以奉上, 以提供本论点也是本发明的创造性的实验数据的具体支持。

以下部分, 本发明以丙氨酸为例, 来阐述 MG53 突变体, 需要说明的是: 本发明中半胱氨酸突变可选的不仅仅是 A (丙氨酸), 还可以是 8 种非极性氨基酸中的任意一种, 例如甘氨酸、亮氨酸、脯氨酸、缬氨酸或异亮氨酸, 同样可起到 MG53 突变后不引起胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病和代谢综合征等副作用等前提下, 行使心脏保护功能的效果。由于篇幅所限, 仅以 A 做最优选实施例, 其他非极性氨基酸的突变方法与丙氨酸相同, 在此不再赘述。

MG53 是 TRIM 家族 (The superfamily of tripartite motif-containing proteins) 中新发现的一个蛋白质, 与其他家族成员不同, 它只在骨骼肌和心肌表达。初期的研究表明, 在骨骼肌和心肌中 MG53 能够作为一种结构蛋白促进细胞膜损伤的修复, 同时也能够调节细胞内小泡的转运和骨骼肌细胞再生; 另外在心肌中, MG53 还通过介导 Caveolin-3 与 PI3K 的结合, 激活再灌注损伤救援通路 (reperfusion injury salvage kinase pathway, RISK pathway), 进而在心脏缺血预处理中发挥重要保护功能。本发明人通过实验证明, 蛋白质免疫印迹实验可以得出这样的结论, 骨骼肌 MG53 在多种胰岛素抵抗的动物模型中表达量显著上调, 提示 MG53 很可能参与骨骼肌胰岛素抵抗的发生发展过程。

进一步地, 通过氨基酸序列分析, 发明人发现 MG53 蛋白是由公认具有 E3 连接酶活性的 RING 结构域 (也可叫做 RING 手指区域)、B-box 结构域、Coiled-coil 结构域和 SPRY 结构域组成。从 MG53 氨基酸序列分析的结果来看, 只有 RING 结构域是公认的含有 E3 泛素连接酶活性的结构域, 因此, 发明人认定 MG53 的 E3 泛素连接酶活性就在 RING 中。RING 结构域内部锌指结构中第一个结合锌原子的半胱氨酸, 即野生型小鼠 MG53 氨基酸序列上第十四位的半胱氨酸, 是维持 RING 结构域 E3 泛素连接酶活性的关键所在。于是发明人构建了两个可能导致 MG53 的 E3 泛素连接酶失活的突变体, 一个是缺失 RING 结构域的 MG53 (Δ RING-MG53), 另一个是氨基酸序列第十四位突变为丙氨酸的 MG53 (C14A-MG53)。当

比较这两个突变体与正常的 MG53 对 IRS1 泛素化的影响时，发现只有正常的 MG53 能够有效地泛素化胰岛素受体（IR）和胰岛素受体底物 1（IRS1）， Δ RING 或 C14A 都不具备这一功能。这也完全证明 MG53 的 RING 结构域，特别是氨基酸序列上第十四位的半胱氨酸，对于 MG53 催化 IR 和 IRS1 泛素化是必需的。而与 C14A-MG53 相似， Δ RING-MG53 也能够保护缺氧引起的心肌细胞损伤， Δ RING-MG53 的心脏保护作用，我们是首次发现的。

上述这个重要发现引导着发明人对 MG53 在骨骼肌胰岛素抵抗中的潜在作用进行了深入研究。这样的科研思路 and 大量实验数据决定了本发明不是科学猜想或是科研臆断，而是一种真正可以产业化的科研成果，一种真正的发明创新。

为进一步探讨 MG53 致 IR 和 IRS1 降解在 MG53 负调控肌肉胰岛素信号通路中的作用及弄清被 MG53 泛素化的 IR 和 IRS1 的具体降解途径，发明人进行了研究。在 C2C12 肌管中分别过表达正常的 MG53 及它的两个突变体，比较它们对胰岛素信号的影响。结果发现，只有能降解 IR 和 IRS1 的正常 MG53 才能够抑制胰岛素信号通路，而失去 E3 泛素连接酶活性的两个突变体，尤其是 C14A，即使只有一个氨基酸突变，也不能行使其抑制胰岛素信号的功能。

也就是说，本发明的前期科研实验得到的结论是：第一，肌肉特异性蛋白 MG53 异常高表达是胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病和代谢综合征发生发展的重要原因；第二，第一次在整体水平和细胞水平证明了 MG53 是 IR 和 IRS1 的 E3 泛素连接酶，它通过泛素-蛋白酶体途径降解骨骼肌 IR 和 IRS1，是造成机体胰岛素抵抗状态所必需的，同时通过引起机体的胰岛素抵抗，进一步造成肥胖、糖尿病和代谢综合征的发生。第三，还可以再进一步做以关联构想。

E3 是参与蛋白质泛素化反应的唯一可控成分。按介导泛素与靶蛋白的结合方式不同，E3 可分为两大类：含 RING（really interesting new gene）结构域的 E3 和含 HECT（homologous to E6-associated protein C terminus）结构域的 E3。前者同时与装载泛素的 E2 和靶蛋白结合，将泛素直接转移到靶蛋白上；后者先将泛素从 E2 转移到 HECT 结构域的一个半胱氨酸活性位点上，再将硫脂化的泛素转移到靶蛋白上。泛素由 76 个氨基酸组成，其中散布着 7 个赖氨酸残基，即，本发明涉及的 7 个半胱氨酸，这些残基可以作为其他泛素共价结合的位点。经过几轮结合后，泛素链将会变得很长，这样有助于对“标记”的识别。一般认为，由 48 位赖氨酸介导结合的泛素链聚合体是介导靶标蛋白质经蛋白酶体降解的经典引导信号，由 63 位赖氨酸介导结合的泛素链聚合体将介导靶标蛋白质进行其他的非降解功能。然而，这一观点近来有被打破的趋势。泛素化的靶标蛋白质在泛素结合域（Ubiquitin-binding domains, UBDs）的作用下定位于 26S 蛋白酶体，经去泛素化和解折叠等程序，最终被水解。随着科学研究的不断深入，在大多数胰岛素靶器官中，人们已经基本认清胰岛素信号网络的大致骨架结构，即

IR/IRSs-PI3K-Akt 通路；然而，对于影响此信号途径的具体分子机制，人们的研究目前却刚刚起步。正如本发明人在科研实验中发现的，在胰岛素信号的调控中，除去广泛的磷酸化修饰调控以外，蛋白质降解对于胰岛素信号传递的影响也是巨大的。早在胰岛素抵抗研究的初期，人们就在胰岛素抵抗的病人或动物模型中观察到，IR 和 IRS1 在酪氨酸磷酸化普遍受抑制的同时，存在其蛋白含量的下降。直到近些年，人们才对 IRSs 的蛋白质降解得到了一些认识，比如，SOCS1/3 作为 culling-RING 类泛素连接酶的底物识别分子，通过与 IRS1 和 IRS2 结合，介导了它们的泛素化降解。后来人们又发现 SOCSs 能在多种炎症因子的刺激下显著上调，结合大量临床和动物模型的证据，人们意识到肥胖和 II 型糖尿病实质上是一种炎症状态，而各种炎症因子在胰岛素抵抗的发生中起了重要作用。除此之外，也有证据表明在某些组织细胞中 Akt 及其下游分子也可能成为 UPS 的靶标，发生降解从而影响葡萄糖转运和糖异生。然而对于胰岛素抵抗中 IR 的降解机制，至今仍然有待进一步研究。

简而言之，本发明在诸多试验数据的支持下，得到了 MG53 蛋白突变体，其为 MG53 蛋白在其 N 端的 RING 结构域的 7 个半胱氨酸中的任一个或两个或两个以上的半胱氨酸被丙氨酸替代的突变体。该 MG53 蛋白突变体是 MG53C14A、MG53C17A、MG53C29A、MG53C34A、MG53C37A、MG53C53A、MG53C56A 中任一，本发明最优选的 MG53 突变体是 MG53C14A。

本发明提供了一种 MG53 蛋白突变体的突变方法，该方法在于，利用定点突变试剂盒对野生型 MG53 质粒的全长序列进行定点突变，得到所述的 MG53 突变体。该试剂盒是北京全式金公司的 Easy Mutagenesis System。

即，上述改造方法或突变方法是利用定点突变试剂盒（北京全式金公司的 Easy Mutagenesis System）对野生型 MG53 质粒的全长序列进行突变，得到第 14 位的半胱氨酸突变为非极性氨基酸的 MG53 突变体质粒；当该非极性氨基酸为丙氨酸时，即可得到第 14 位的半胱氨酸突变为丙氨酸的 MG53 蛋白突变体，该 MG53 蛋白突变体为 MG53C14A。

同样地，发明人也做了半胱氨酸突变为甘氨酸、亮氨酸、脯氨酸、缬氨酸和异亮氨酸等其他非极性氨基酸的实验，突变方法同上，同样得到了 MG53C14G、MG53C14L、MG53C14P、MG53C14V、MG53C14I。

在本发明的具体实施例中，所述的改造方法即定点突变的过程为：

（1）先设计突变引物，使上下游引物都带有突变位点，重叠区域为 18-27bp；

（2）以待突变质粒（野生型 MG53 质粒）作为模板，使用 DNA 聚合酶，用特异性突变引物进行 PCR 反应扩增，反应产物用琼脂糖凝胶电泳鉴定；

（3）利用 DpnI 进行酶切反应处理 PCR 产物；

(4) 转化大肠杆菌感受态细胞 TOP10，融解感受态 TOP10，加入处理后的 PCR 产物，冰上孵育，加入 LB，孵育，涂氨苄抗性 LB 平板，培养，挑取平板上的单菌落，DNA 测序检测得突变结果为阳性，得到 MG53 突变体质粒；

(5) 上述 MG53 突变体质粒通过利用 ScreenFectA 转染细胞方式获得 MG53 突变体。

5 ScreenFectA (Incella) 是商业试剂盒，一个试剂盒里面有该方法用到的所有试剂和方法。

上述试剂盒是 Incella 公司的 ScreenFect®A transfection reagent 和+ ScreenFect Dilution Buffer。

上述步骤 (1) 所述的重叠区域优选 20bp。

在另一优选实施例中，为了得到 Flag-C14A MG53 质粒，在 Flag-MG53 质粒的基础上，
10 利用 QuikChange II 点突变试剂盒，将 MG53 氨基酸序列的第十四位半胱氨酸突变成丙氨酸。

在本发明又一优选实施例中，上述突变过程是：

1、首先设计突变引物，使上下游引物都带有突变位点，并且重叠区域为 18~27bp。

2、以待突变质粒 200ng 作为模板，使用高保真 DNA 聚合酶，用特异性突变引物进行 PCR 反应扩增。反应产物用琼脂糖凝胶鉴定。

15 PCR 反应条件如下：

95°C 10min (分钟)

95°C 30sec (秒)

55°C 30sec (秒) 20 Cycles (即，20 个循环)

72°C 3.5sec (秒)

20 72°C 5min (分钟)

4°C Hold (维持)

3、利用 DpnI 进行酶切反应处理 PCR 产物，反应条件如下：10uL PCR 产物加入 1uL DpnI，37°C 处理过夜。

4、转化大肠杆菌感受态细胞 TOP10：融解感受态 TOP10，加入处理后的 PCR 产物，放
25 在冰上孵育 30 分钟，42°C 热刺激 60 秒，加入 LB，37°C 孵育 45 分钟。涂氨苄抗性 LB 平板。
37°C 过夜培养 16 小时。

5、挑取平板上的单菌落，DNA 测序检测突变结果。

参考：Stratagene 的 QuikChange Site-directed Mutagenesis kit。北京全式金公司 Easy Mutagenesis System，说明书可参见如下公开内容：<http://www.transgen.com.cn/uploadfile/201111/20111109161357731.pdf>。

30 本发明的 MG53 蛋白突变体的改造方法也可参见市售可得到的北京全式金公司的 Easy

Mutagenesis System（试剂盒）的说明书，其对突变改造方法和步骤均有详细的说明记载。

本发明还提供了上述的 MG53 突变体（即 MG53 蛋白突变体）在制备治疗心肌细胞损伤相关疾病的药物中的用途。

上述的 MG53 突变体的用途，其中所述的治疗心肌细胞损伤的药物还包括治疗/预防心脏
5 缺血、再灌注损伤所致疾病的药物；上述疾病进一步还包括心肌细胞缺损、心肌缺血、心脏缺血/再灌注损伤、心肌梗塞、心力衰竭、心律失常、心脏破裂等的药物。

本发明尤其提供了 MG53 突变体为 MG53C14A 时，即，MG53C14A 在制备治疗心脏损伤或心肌损伤的药物中的用途。

关于 MG53 在治疗心脏损伤/心肌损伤中的应用，以及其在治疗/预防心脏缺血、再灌注
10 损伤所致疾病中的用途，可参见 200910241451.3 公开的药学实验部分的实验方法和实验数据。

在心肌细胞中过表达 MG53 或 MG53C14A，都能对缺氧引起的心肌细胞损伤产生保护作用。

本申请中所提及的 MG53 突变体，是指 MG53 突变蛋白，或 MG53 突变体蛋白。

众所周知，胰岛素抵抗是肥胖、2 型糖尿病等多种代谢障碍疾病的根本致病因素之一。
虽然骨骼肌在胰岛素刺激引起的糖利用中占 70-90%，但是人们对肌肉胰岛素抵抗的具体机制
15 至今仍所知甚少。本发明以下实验部分先证实，在小鼠中，骨骼肌特异性蛋白 mitsugumin53（即本发明所述的 MG53）介导了胰岛素受体（IR）和胰岛素受体底物 1（IRS1）的降解。
当上调 MG53 时，引起以胰岛素抵抗、肥胖、高血压、脂代谢紊乱为表征的代谢综合征。在胰岛素抵抗动物模型中，MG53 表达水平显著升高；MG53 过表达可以导致肌肉胰岛素抵抗，
继而引发代谢综合征。相反，通过保护 IR 和 IRS1，保持胰岛素信号通路完整性，MG53 的
20 敲除成功阻止了饮食诱发的代谢综合征的发生。在机制上，MG53 作为 E3 连接酶，泛素化胰岛素受体（IR）和胰岛素受体底物 1（IRS1），导致二者通过泛素依赖的途径降解，构成骨骼
肌中控制胰岛素信号强度的主要机制。这些发现确切地证实 MG53 是一个治疗代谢紊乱和相
关心血管并发症的新靶点。

代谢综合征包含胰岛素抵抗、中心型肥胖，脂代谢紊乱和高血压等一系列的病征，其流
25 行病比率正在增加，已经成为人类健康的重大威胁之一。代谢综合征使心血管疾病发生几率
上调 2 倍，2 型糖尿病发生几率上调 5 倍。胰岛素抵抗是包括代谢综合征、肥胖、2 型糖尿病
在内的众多代谢紊乱疾病的根本病因。因为骨骼肌在胰岛素刺激引起的糖利用中占 70-90%
的比例，骨骼肌中胰岛素抵抗可能是代谢综合征和 2 型糖尿病的主要致病机理。确实，纵向研
究提供证据表明骨骼肌胰岛素抵抗是代谢综合征和 2 型糖尿病病理过程的最早期步骤。然而，
30 人们对骨骼肌胰岛素抵抗背后的机制所知甚少。

在 MG53 保护小鼠抵抗饮食诱导的代谢综合征的实验中, 用 western blots 检测骨骼肌中 MG53 含量平均值 (胰岛素紊乱和代谢疾病大鼠、非人灵长类模型, 与年龄性别对应的对照相比), 数据与 GAPDH 相比后标准化, 结果表明, 在高脂喂养诱导的肥胖小鼠、db/db 糖尿病模型小鼠、自发性高血压大鼠和非人灵长类代谢综合征模型中, MG53 丰度均上调。在肥胖人类个体中, MG53 水平上调也被实验证实 (图暂欠奉)。这些结果为未曾预料到的 MG53 和代谢疾病之间的联系提供了重要线索。

为了确定 MG53 在代谢综合征致病过程中的必要性, 从小鼠出生 3 周起, 发明人开始跟踪监测 MG53 敲除(MG53^{-/-})小鼠和对应的野生型同窝出生存在高脂饮食(60%热量来自脂肪)和普通饮食情况下的体重和代谢指标变化。在 3-38 周内, 正常饮食情况下, 与野生型小鼠相比, MG53 敲除小鼠体重、血压、血清胆固醇、甘油三酯, 都没有明显变化。然而, 在不改变血清胰岛素水平的情况下, MG53 敲除小鼠血糖含量明显减少 (在 38w 检测)。

在高脂喂养情况下, MG53 敲除小鼠和野生型小鼠有显著不同。经过 35 周的高脂喂养, 野生型小鼠 MG53 水平上调, 发生了以肥胖和高血压、高血糖、高胰岛素、脂代谢紊乱、肝脂肪化为特征的代谢综合征。值得注意的是 MG53 敲除小鼠不会发生高脂喂养引发的代谢紊乱。与正常饮食喂养的野生型和 MG53 敲除小鼠相比, 经过 35 周高脂喂养 MG53 敲除小鼠的血压、血糖、血清胰岛素、血脂 (胆固醇和甘油三酯) 水平相当。MG53 缺失也显著减弱了高脂喂养诱导的肥胖, 脂肪肝骨骼肌脂肪积聚, 脂肪细胞肥大, 白色和棕色脂肪含量上调。

为探究全身性胰岛素敏感性与代谢综合征发生之间的关系, 在饮食干预后的不同时间点进行了葡萄糖耐量试验 (GTTs) 和胰岛素耐量试验 (ITTs)。给予高脂饮食的野生型小鼠在 7 周时表现出葡萄糖不耐受和胰岛素抵抗, 即, 该现象早于 11 周时肥胖的发生。随着高脂饮食的继续喂养, 野生型小鼠的葡萄糖不耐受和胰岛素抵抗逐渐加剧。35 周后, 高脂饮食导致了胰岛的代偿性肥大、血清胰岛素水平较本底升高 7 倍, 致使葡萄糖刺激胰岛素分泌障碍。

但是, MG53 敲除小鼠在高脂饮食下没有表现出上述任一表型, 而是维持着正常的血糖和胰岛素水平, 即便在经过高脂饮食 30 周后, MG53 敲除的小鼠, 未出现野生型小鼠中的胰岛素抵抗 (糖耐量和胰岛素耐量)。MG53 敲除小鼠的胰腺形态变化和胰岛素分泌反应也明显改善。因此, MG53 的敲除可保护小鼠免于高脂饮食诱导的胰岛素抵抗和代谢紊乱, 以上表明, MG53 为高脂饮食诱导的胰岛素抵抗和代谢综合征发生所必需。

为进一步确定 MG53 的上调是否足以引发代谢紊乱, 发明人构建了过表达 MG53 的转基因小鼠 (MG53TG)。在 38 周龄时, 其 MG53 蛋白水平于骨骼肌中升高 2.6 ± 0.3 倍, 于心脏中升高 2.6 ± 0.7 倍。然而, 在 MG53 转基因小鼠的非肌肉组织 (肺、脑、下丘脑、肝、肠、

肾、内脏脂肪和睾丸), 并没有检测到 MG53, 这说明 MG53 的表达受到一种肌肉特异性方式的严格调控。即使在没有饮食干预的情况下, 38 周龄的 MG53 转基因小鼠出现肥胖和高血压, 并伴随着血脂异常、高胰岛素血症肥胖和禁食后血糖水平升高。与同窝出生的野生型小鼠相比, MG53 转基因小鼠的昼夜能量消耗明显降低, 但日摄食量不变。值得一提的是, 葡萄糖耐量试验和胰岛素耐量试验显示, MG53 转基因小鼠的糖代谢和胰岛素敏感性存在严重的损伤, 并伴随着胰岛肥大和葡萄糖刺激胰岛素分泌的障碍。解剖学和组织学数据进一步显示, MG53 转基因小鼠出现了中心性肥胖、脂肪肝、脂肪细胞肥大和骨骼肌内脂质沉积。这些数据表明, MG53 的上调对于引发胰岛素抵抗和进一步发展为代谢综合征既是必要的也是充分的。注: MG53 的敲除阻断了饮食诱导的全身胰岛素抵抗相关实验中, 野生型和 MG53 敲除小鼠, 给予正常饮食或高脂饮食后在指定时间点进行葡萄糖耐量试验和胰岛素耐量试验。胰腺用苏木精和伊红染色。葡萄糖(按 2 克每千克体重腹腔注射)刺激下血清胰岛素的浓度变化。野生型和 MG53 敲除小鼠均给予正常饮食或高脂饮食 35 周。所有数据均显示为平均值 $\pm$ 标准误。

胰岛素刺激时, 胰岛素受体的内在酪氨酸激酶活性可引起受体自身的酪氨酸 15 位自磷酸化。随后招募并磷酸化胰岛素受体底物如胰岛素受体底物 1(IRS1)、胰岛素受体底物 2(IRS2), 并激活下游的磷酸肌醇-3-激酶, 以调节骨骼肌的葡萄糖稳态。为探究 MG53 介导的胰岛素抵抗的分子机制, 发明人检测了 MG53 可能调控的位于胰岛素受体-IRS1-PI3K-Akt-GSK3 β 途径的信号分子。在胰岛素抵抗和代谢紊乱的 MG53 转基因小鼠模型中, 骨骼肌内由胰岛素刺激引起的胰岛素受体(β 亚基)和 IRS1 的酪氨酸磷酸化, 以及 Akt473 位丝氨酸的磷酸化均被阻断。同时, 这些小鼠骨骼肌中, 胰岛素受体和胰岛素受体底物 1 的蛋白表达水平显著减少, 但其 mRNA 水平保持不变。为区别 MG53 过表达的直接效应和代偿性反应, 同时采用腺病毒转染系统, 过表达 MG53 基因于培养的 C2C12 肌管细胞。MG53 升高表达了 3.5 ± 0.2 倍, 并显著降低了胰岛素受体和 IRS1 的蛋白水平, 但其 mRNA 水平不变。MG53 的过表达也阻断了胰岛素诱导的胰岛素受体、IRS1, Akt 和 GSK3 β 的活化, 这表明在细胞水平上调 MG53 成功模拟了 MG53 转基因小鼠的典型特征。因此, 发明人的体内和体外实验数据均证实 MG53 的上调表达足以同时降低胰岛素受体和胰岛素受体底物从而抑制胰岛素信号转导的这两个关键步骤。注: 在过表达 MG53 引发全身胰岛素抵抗和代谢综合征的试验中, 通过野生型和 MG53 转基因小鼠的体重、及 38 周龄的野生型和 MG53 转基因小鼠的收缩压和舒张压、血清胆固醇、甘油三酯、血清胰岛素及在禁食和进食状态的血糖水平, 及 30 周高脂饮食喂养的野生型和 MG53 敲除小鼠的葡萄糖耐量试验和胰岛素耐量试验、38 周龄的野生型和 MG53 转基

因小鼠胰腺、38 周龄的野生型和 MG53 转基因小鼠葡萄糖（按 2 克每千克体重腹腔注射）刺激下的血清胰岛素的浓度变化，或其相对于基线的变化百分比来做实验指标和数据进行统计。

高脂饮食喂养的野生型小鼠 MG53 表达量增高，和 MG53 过表达一样，骨骼肌胰岛素信号被严重抑制了，同时 IR 和 IRS1 蛋白水平降低，mRNA 水平不变。此外，伴随着 MG53 上调，IR 和 IRS1 后下调在各种用于研究的胰岛素抵抗啮齿类模型中是一个普遍的现象，就像肥胖或 2 型糖尿病动物模型和人一样。在其他实验中，还证明了即使在高脂饮食导致的代谢压力下，MG53 缺失可以使小鼠维持 IR 和 IRS1 的完整性以及全身的胰岛素敏感性。特别的，在 MG53 敲除小鼠中高脂饮食无法降低 IR 和 IRS1 的丰度。实际上，MG53 基因水平的缺失会使骨骼肌中 IR 和 IRS1 的显著积累，可能导致 MG53 敲除小鼠相对于其同窝野生型对照血糖水平降低。相对于野生型正常饮食小鼠，MG53 敲除小鼠因胰岛素引起的 IR、IRS1、Akt 和 GSK3 β 磷酸化会显著增加。因此，MG53 上调对于高脂饮食和代谢疾病引起的骨骼肌 IR 和 IRS1 下调看起来必不可少。

之后，寻找决定 MG53 介导的骨骼肌特异的胰岛素抵抗发展成为全身的代谢紊乱的原因。为了该目的，发明人跟踪了 MG53TG 小鼠和高脂饮食喂养的野生型小鼠多种器官代谢紊乱发生的不同时期。结果显示通过过表达 MG53 和高脂饮食诱导骨骼肌胰岛素抵抗远早于全身代谢紊乱的发展（包括肥胖和多器官胰岛素抵抗）。6 周龄的 MG53TG 体重和野生型对照类似，但是肌肉的胰岛素信号明显被损伤了，而肝脏和腹部脂肪的胰岛素信号却没有变化。同样的，高脂饮食喂养 1 周的野生型小鼠会导致 MG53 显著上调和骨骼肌胰岛素信号损害，这在高脂 7 周之后才出现的系统性葡萄糖胰岛素不耐受和 11 周出现明显的肥胖之前。这之后，正常饮食的 MG53TG 小鼠（38 周）和高脂饮食的野生型小鼠（高脂喂养 35 周）的肝脏和脂肪组织才发展为完全的胰岛素抵抗。这些数据 and MG53 缺失对于代谢紊乱重要的保护作用一起，强烈说明 MG53 介导的骨骼肌胰岛素抵抗在病理发生过程是一个重要的因素。与之前的发现一致的是，在人和动物模型上的研究也揭示了肌肉胰岛素信号降低在肥胖和葡萄糖不耐受病理过程中是一个重要的环节。注：MG53 调节的胰岛素信号的相关实验，用代表性的和平均 western blots 数据显示 38 周野生型和 MG53 转基因小鼠或正常饮食或高脂饮食喂养的 MG53 敲除小鼠和他们的野生型同窝小鼠胰岛素诱导的 IR- β 和 IRS1 的酪氨酸磷酸化，Akt 丝氨酸磷酸化和他们的总蛋白水平。磷酸化蛋白和总蛋白相对于 GAPDH 标准化，呈现为其相对于野生型本底的倍数。代表性的 western 印记和统计数据显示胰岛素引起 6 周、38 周野生型和 MG53 转基因小鼠骨骼肌、肝脏、腹脂的 Akt 的磷酸化。

因为 IRS1 是 IR 和胰岛素样生长因子-I 受体 (IGF-IR) 信号通路共同的节点，发明人还

研究了 MG53 对于肌肉除胰岛素信号之外 IGF-I 信号的影响。通过比较不同剂量胰岛素或 IGF-I 诱导的野生型和 MG53 缺陷小鼠骨骼肌 IRS1 酪氨酸磷酸化,发明人发现 MG53 优先把在胰岛素信号中的 IRS1 作为目标。特别地,尽管 MG53 缺失增加了胰岛素刺激的 IRS1 酪氨酸磷酸化的剂量效应,这加强了 IGF-I 在高浓度的效果,而不是低浓度的 IGF-I。如果 MG53 选择性的把胰岛素受体介导的 IRS1 信号作为目标,那么 MG53 调节 IGF-I 受体信号应该归功于胰岛素受体和 IGF-I 受体的异二聚化或高剂量 IGF-I 引起的胰岛素受体交叉激活。

由于 MG53 在氨基端包含一个经典的 E3 泛素化连接酶 RING finger 结构域(或称 RING 手指区域,或 RING 结构域),发明人提出 MG53 可能作为一个肌肉特异的 E3 泛素化连接酶作用胰岛素受体和 IRS1 进行泛素依赖的降解。多种证据支持这个假设。首先,免疫共沉淀揭示了内源性 MG53 和胰岛素受体、IRS1 之间有物理相互作用,在 HEK293 细胞外源性表达 MG53 和 IR、IRS1 也是如此。其二,在 MG53TG 小鼠骨骼肌中,过表达 MG53 可以提高 IR 和 IRS1 的泛素化。另外,高脂饮食增加了野生型小鼠骨骼肌胰岛素受体和 IRS1 的泛素化,而不是 MG53 敲除。现有的结果证明了 MG53 E3 泛素化连接酶促进了泛素依赖的骨骼肌 IR 和 IRS1 降解,尽管在(FBXO40 是肌肉特异性的)某些特定的细胞培养系统和组织其他一些 E3 连接酶和 IRS1 降解有关。相反的,无论是 MG53 过表达还是敲除,与血糖稳态有关骨骼肌 IRS2、GLUT1 或 GLUT4 的蛋白丰度却没有改变,说明他们不是 MG53 的底物。

根据以前对其他 RING 类型 E3 连接酶的了解,序列分析预测到 MG53 N 端的 RING 手指区域中的半胱氨酸丰富区,尤其是 7 个半胱氨酸,特别是第一个半胱氨酸(半胱氨酸 14,能与锌离子结合)可能是 MG53 作为 E3 连接酶功能的关键位点。的确,RING 手指区的删除或者半胱氨酸位点的丙氨酸突变替换能够彻底的去除或者明显地缓解 MG53 对 IR 和 IRS1 的泛素化程度。需要注意的是,与野生型 MG53 不同,这些 MG53 突变体既没有影响 IR 和 IRS1 的总蛋白量,也没有影响胰岛素促使的 IR-IRS1-AKT-GSK3 β 信号途径的激活。因此,在分子水平,RING finger 区是 MG53 实现 E3 连接酶功能所必需的。而且,利用 clasto-lactacystin- β -lactone (β -lac) 对蛋白酶体抑制能够彻底的去除 MG53 引起的 IR 和 IRS1 蛋白的下调,并恢复 IR 和 IRS1 酪氨酸的磷酸化。以及 AKT 的丝氨酸 473 的磷酸化,还有胰岛素引起的葡萄糖摄取,这证明了 MG53 介导的胰岛素信号通路的抑制是通过蛋白酶体系统。在利用 MG132,另一种蛋白酶体抑制剂的实验中也得到了类似结果。总之,我们的体内实验和体外实验的实验结果证明, MG53 是一个新的 E3 连接酶,它能够通过泛素依赖的降解,直接调节 IR 和 IRS1 的蛋白稳定性。这个发现证实了 MG53 能够同时下调 IR 和 IRS1。是一个解释全身胰岛素抵抗和代谢疾病的潜在机制,而 RING 手指区域中的半胱氨酸是 MG53 介导 IR 和 IRS1 降解。

产生胰岛素抵抗，发生全身肥胖和代谢性疾病所必需的。

归纳起来，尽管MG53作为膜修复和心肌保护已经众所周知，发明人在这里展示了MG53是一个在胰岛素抵抗和代谢紊乱的动物模型中普遍高表达的，并且这种骨骼肌特异性的MG53高表达做为启动全身胰岛素抵抗和代谢综合征是必需的。MG53作为一个新的肌肉特异性E3连接酶能够导致IR和IRS1的泛素依赖性降解，成为了一个决定性的骨骼肌胰岛素信号的负向调节者，从而引起全身的胰岛素信号及代谢的缺陷。而RING手指区域中的半胱氨酸是MG53发挥上述代谢相关作用必需的，突变RING手指区域中的半胱氨酸能够使MG53丧失引起胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病和代谢综合征的作用。

这些发现不仅定义了MG53是一个骨骼肌胰岛素敏感性的负向调节者，还建立了MG53介导的肌肉胰岛素信号抑制是一个导致全身胰岛素抵抗和代谢综合征的重要的机制。这也标志着MG53 E3连接酶能够被作为一个治疗各种代谢疾病，包括肥胖、2型糖尿病和相关的心血管并发症的重要潜在靶点。

实验方法总结：

试剂和材料：PY100, p-Akt, p-GSK3 β 以及IRS1的抗体均来自Cell Signaling Technology公司；MG53和GLUT1的抗体来自Abcam公司；p-IR- β 和IRS1的抗体来自Upstate公司；IR- β , GAPDH, GSK3 β 和GLUT4的抗体来自Santa Cruze Biotechnology公司；MG132, clasto-lactacystin β -lactone (β -lac), anti-b-actin, Flag, Myc and insulin抗体来自Sigma-Aldrich公司。2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose (2-NBDG)来自Invitrogen公司。人的胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)来自PeproTech公司。如无特别说明，其他化学试剂均来自Sigma-Aldrich公司。

胰岛素抵抗的动物模型：糖尿病(db/db)小鼠(年龄为25周的雄性糖尿病小鼠)和对照组瘦小鼠来自Jackson Laboratory公司。自发性高血压大鼠(年龄为12个月的雄性自发性高血压大鼠)和同源同龄雄性正常血压大鼠来自北京市维通利华公司。自发性胰岛素抵抗和代谢综合征的非人灵长类动物模型的开展和鉴定在之前的文献中已有报道。

MG53基因敲除小鼠和饮食干预：所有动物程序和安乐死术都是按照中国北京大学动物研究委员会批准的协议来执行的，并且符合实验动物护理和使用指南(1985年由美国国家卫生研究所修订发行，发行号为86-23)。所有动物都维持在中国北京大学实验动物中心的一个光照/黑暗循环的温控屏障设施里，他们可自由获取食物和水。本研究仅使用雄性动物为研究材料。MG53基因敲除小鼠的构建之前已有说明。MG53基因敲除小鼠和野生型同窝出生小鼠从出生三周开始进行高脂饮食(60%卡路里来自脂肪，饮食研究有限公司，货号为D12492)

和正常饮食（11.4%的卡路里来自脂肪，中国军事医学科学学院）的干预。

MG53 转基因小鼠：鼠科 MG53 基因全长 cDNA 编码序列被克隆到 pUC-CAGGS 质粒的 XhoI 位点，受鸡 beta 肌动蛋白启动子调控。经 SalI 酶切线性化并通过凝胶纯化以后，这个片段被显微注射到小鼠的受精卵内。PCR 用来进行基因型鉴定。

5 质粒和腺病毒载体：通过 PCR 从小鼠 cDNA 文库扩增了 MG53 全长序列和缺失了 RING 结构域的 MG53 序列 (Δ RING)，并从 BglII 和 XbaI 两个酶切位点插入 p3XFLAG-CMV-10 的表达载体（来自 Sigma-Aldrich 公司）。全长的 MG53 序列也经 KpnI 和 XhoI 两个酶切位点嵌入 pcDNA4/TO/Myc-His B 的表达载体（来自 Invitrogen 公司）。C14A（第 14 位的半胱氨酸被丙氨酸替代）的 MG53 突变体是利用快速点突变试剂盒的策略对野生型（全长）MG53
10 质粒改造而成。胰岛素受体序列是从 pBABE-bleo 人胰岛素受体 B（来自 Addgene 公司）亚克隆而来，并经 HindIII 和 XbaI 两个酶切位点嵌入 pcDNA4/TO/Myc-His B 的表达载体（来自 Invitrogen 公司）。胰岛素受体底物 1（IRS1）是从 pBS-m IRS1（来自 Invitrogen 公司）亚克隆而来，并经 HindIII 和 NotI 两个酶切位点嵌入 pcDNA4/TO/Myc-His B 的表达载体（来自 Invitrogen 公司）。N 端带 HA 标签的泛素表达质粒和 C 端带 FLAG 标签的胰岛素受体表达质粒分别有陈
15 博士和 I. Leibiger 提供。表达 GFP 和融合表达 GFP-MG53 的腺病毒已在之前做出说明。

细胞培养，腺病毒感染和质粒转染：C2C12 成肌细胞（来自细胞资源中心，IBMS，中国医学科学院/中国协和医科大学）置于 37 摄氏度含 5% 二氧化碳的细胞培养箱中，经 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基（DMEM）培养，该培养基中补充有 10% 牛胎儿血清（Sigma-Aldrich 公司），0.11g/L 丙酮酸钠和 1% 的青霉素 - 链霉素。当 C2C12 成肌细胞 90% 密度时，我们通
20 过腺病毒感染或质粒转染进行基因导入。之后，细胞在含有 2% 的马血清的 DMEM 培养基里培养四天分化成肌管。

细胞缺氧的方法是，把细胞培养在 RPMI1640/5% 胎牛血清的培养基中 48 小时以后，更换培养基为不含血清的并利用 95% 氮气和 5% 二氧化碳饱和的 RPMI1640 培养基，而后把细胞放到 37 摄氏度的充满 95% 氮气和 5% 二氧化碳的密封小室（Ohmeda oxygen monitor, type 5120）
25 实现细胞缺氧。对于正常的对照，细胞的培养基换成 RPMI1640/5% 胎牛血清，放在 37 摄氏度含有 5% 二氧化碳的孵箱中。

心肌细胞损伤的检测方法如下：

对于 ATP 含量，采用 Promega 公司的 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Cat#G7571)。具体的实验方法：1 取试剂盒中的 CellTiter-Glo Substrate（1 管）与 CellTiter-Glo
30 Buffer（1 管）混合，实验前将试剂恢复至室温待用；2 细胞样本由孵箱中取出，放置恢复至

室温待用；3 细胞培养板中每个样本留取一定量的细胞培养液，与等量的 ATP 试剂混合（即，细胞培养液与 ATP 试剂按照 1:1 的比例混合）；4 将样本轻摇 2min（此步骤中细胞，细胞培养液和 ATP 试剂轻混）；5 室温静置 10min 后；6 吸取样本至酶标板中，上机检测 Luminescent。

对于 LDH 浓度，采用上海景源医疗器械有限公司（LDH0360）。具体的实验方法：1 取 5 LDH 试剂盒内试剂，按照试剂 2 和试剂 1（1:5）的比例完全混合后，2-8 度保存待用；2 酶标板中加样本 40ul/孔；3 与 200ul/孔的试剂混合后，上机测定 340nm 处的吸光度值。

进行免疫共沉淀（CoIP）：利用裂解液（pH7.6 的 30mM 的 HEPES，100mM 的氯化钠，0.5%NP-40，和蛋白酶抑制剂混合物）裂解组织或细胞，4° C 混合摇动 30min，将裂解物在 4° C，13,000 rpm 离心 10 分钟，去除沉淀，上清为总蛋白，备用。利用冰冷的 1XPBS 清洗 10 proteinA beads，PBS 重悬 beads，4000rpm 离心 2min，去除上清，如此反复清洗 3 次，去除 PBS，加入总蛋白裂解液和 anti-IRS1 的抗体 0.5ug，4° C 静音混合孵育 4 小时。照前法利用冰冷 1XPBS 清洗沉淀后的 beads，清洗 3 次，之后 beads 加入 1Xloading buffer，100° C 煮 5 分钟，13000rpm 离心 10min，取上清做为样品，SDS-PAGE 上样分离蛋白，转 PVDF 膜，利用 anti-IRS1-PY100 的抗体进行蛋白质免疫印迹分析。其他蛋白均利用选相应的特异抗体进行 15 蛋白质免疫印迹分析。

泛素化分析：转染了特定质粒的 C2C12 肌管细胞用 10mM 的 MG132 处理 12 小时，然后用冰冷的磷酸缓冲溶液 PBS 漂洗细胞，用 RIPA 裂解液（200mM 的 NaCl，pH 值 8.0 的 20mM 的 Tris-Cl，在 1mM 的 EDTA，1mM 的 EGTA，1%NP-40，0.5%脱氧胆酸钠，0.1%SDS，2.5 mM 焦磷酸钠，1 mM 的 β -甘油磷酸盐，1 mM 四氧嘧啶、蛋白酶抑制剂混合物及 10mM 的 20 MG132）于冰上裂解 10 分钟，然后 13000 rpm 离心 10 分钟。上清经蛋白 A 琼脂糖 4 快速流 20 动（GE Healthcare 公司）处理 1 小时，然后和抗 Myc 抗体，蛋白 A 琼脂糖珠在 4 摄氏度孵育 4 小时，最后用 RIPA 缓冲液洗涤该树脂三次，洗脱下来用于免疫印迹分析。

为了检测在体水平泛素化情况，骨骼肌肉在液氮中磨成粉末，用上述提到的 RIPA 缓冲液于 4 摄氏度裂解 1 小时，然后 13000 rpm 离心 10 分钟。蛋白 A 琼脂糖珠于特定抗体于 4 25 摄氏度孵育 8 小时，然后和 700ug 裂解物 4 摄氏度孵育 3 小时。最后用 RIPA 缓冲液洗脱免疫沉淀物，用 2XSDS 样品缓冲液洗脱下来用于免疫印迹分析。

组织学分析：用于组织学分析的组织（肝脏，胰腺，棕色脂肪，内脏脂肪和骨骼肌）被固定在4%多聚甲醛（pH7.4）中过夜，包埋在石蜡中，并在5 um连续切片。并对他们进行标准的苏木精和曙红染色以及免疫荧光染色。

30 血压测量：收缩压和舒张压的测量是以一种非侵入性的方法在有意识的小鼠上，用尾袋

系统加热至37摄氏度（Visitech BP-2000血压分析系统）完成的。小鼠对该设备的适应期为7-10天，之后经历了两个周期的测量，每天测量10个动物，为期三天至血压稳定。

2-NBDG摄取测定：导入特定基因的C2C12肌管细胞在不含血清的DMEM培养基中培养12小时，然后维持在的Krebs-Ringer磷酸盐缓冲液（128mM的NaCl，1.4mM氯化钙，1.4mM干燥的硫酸镁，5.2mM氯化钾，10mM的磷酸氢二钠和2mM丙酮酸钠，pH7.4）中于37摄氏度下孵育30分钟，随后用0.1uM的胰岛素和100uM 2-NBDG（Invitrogen）于37摄氏度处理6小时。然后，将细胞用冰冷的PBS缓冲液洗涤三次，用0.5%的胰蛋白酶将细胞消化下来，1000rpm离心5分钟，再用PBS重新悬浮细胞，最后用FACSCalibur流式细胞仪（BD）测定FL1的荧光值³¹。

代谢测量：在葡萄糖耐量实验中，小鼠禁食过夜（16小时），然后腹腔注射D-葡萄糖（2g/kg体重）。在胰岛素耐量实验中，小鼠随机喂养和腹腔注射牛胰岛素（0.75U/kg体重，Sigma-Aldrich公司）。为了检测葡萄糖刺激胰岛素的释放，小鼠禁食16 h后腹腔注射D-葡萄糖（2g/kg），收集注射前和注射后不同时间点的尾静脉血。测血糖和胰岛素浓度的测量是利用AccuCheck的血糖仪（罗氏诊断公司制）和凌嘉研究的ELISA试剂盒（目录的数量EZRM1-13K）分别进行的。血清甘油三酯和胆固醇浓度是利用试剂盒（目录编号分别为290-63701和294-65801）测量的。

对于代谢率分析，小鼠分别独立安置在一个12小时光照/黑暗的环境内。一个综合性的动物代谢监控系统（CLAMS;哥伦布仪器公司）被用来评价小鼠连续超过72小时的氧耗量（VO₂）和二氧化碳生产（VCO₂）。能源支出的计算公式为：能源支出= $(3.815+1.232\text{VO}_2/\text{VCO}_2)\times\text{VO}_2$ 。

统计：统计显著性检验组间差异采用单因素方差分析（ANOVA）或重复测量的方差分析，适当时候用Bonferroni 后t检验。所有P值小于0.05认为显著。数据表示为mean±s.e.m。

本发明还提供了一种动物表达载体，该载体插入了上述的 MG53 突变体基因，所述的该动物表达载体可以为腺病毒表达载体，还可以为 pcDNA4/TO/Myc-His B。

本发明还提供了一种动物细胞，该细胞转染了上述的动物表达载体；该动物细胞为 C2C12 肌管细胞。

本发明还提供了上述 MG53 突变体在制备应用心肌损伤修复的药物中的用途；其主要包括在心肌损伤修复引起的胰岛素抵抗、心脏缺血损伤、心脏缺血/再灌损伤、心肌梗塞、心力衰竭、心律失常、心脏破裂的药物中的用途。尤其是，本发明提供了一种 MG53 突变体在制备治疗胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病等代谢类疾病的药物中的用途。更优选在制备应用调节血压的药物中的用途。

上述的用途是指，该 MG53 突变体为 MG53C14A，MG53C14A 在制备治疗心肌损伤的药物中的用途。

以及, MG53 突变体为 MG53C29A, 上述的用途为 MG53C29A 在制备治疗心肌损伤的药物中的用途。

以及, MG53 突变体为 MG53C34A, 上述的用途为 MG53C34A 在制备治疗心肌损伤的药物中的用途。

附图说明

图 1: MG53、MG53C14A 和 MG53 Δ RING 都能够保护缺氧引起的心肌细胞的损伤。

在培养的心肌细胞中, 通过细胞内 ATP 含量 (左图) 和细胞外乳酸脱氢酶 (LDH) 浓度 (右图) 检测缺氧引起过表达对照载体 (vector) 的细胞出现明显的死亡, 而在过表达 MG53 或者 MG53C14A 的细胞中, 细胞的死亡均明显减少。同样, 过表达 MG53 Δ RING 也能够降低缺氧引起的心肌细胞的死亡 (下图)。

图 2: MG53 敲除能够保护高脂饮食引起的代谢疾病。

a 正常饮食或高脂饮食喂养不同时间的野生型和 MG53 敲除小鼠的体重变化。b-e 正常饮食或高脂饮食喂养 35 周的野生型和 MG53 敲除小鼠的血压 (b)、血糖 (c)、血胰岛素 (d)、血胆固醇 (e) 和血甘油三酯 (f) 数据。

图 3: MG53 敲除能够保护高脂饮食引起的胰岛素抵抗。

a 正常饮食或高脂饮食喂养 30 周的野生型和 MG53 敲除小鼠的糖耐量 (左) 和胰岛素耐量 (右) 数据。b 正常饮食或高脂饮食喂养 30 周的野生型和 MG53 敲除小鼠中葡萄糖引起的胰岛素分泌数据。

图 4: MG53 转基因能够引起的肥胖和代谢疾病。

a 用 western blots 实验检测 MG53 转基因小鼠的不同组织中 MG53 的表达量。b 正常饮食喂养不同时间的野生型和 MG53 转基因小鼠的体重数据。c 正常饮食喂养 38 周的野生型和 MG53 转基因小鼠的血胰岛素、血糖、血压和血胆固醇数据。

图 5: MG53 敲除能够保护高脂饮食引起的胰岛素抵抗。

a 正常饮食喂养 38 周的野生型和 MG53 转基因小鼠的骨骼肌中, 胰岛素 (Insulin) 刺激引起的 IR, IRS1 和 Akt 的磷酸化和总蛋白量变化。左侧是代表性的 western blots 图, 右侧是左边数据的统计图。b 正常饮食或高脂饮食喂养 35 周的野生型和 MG53 敲除小鼠的骨骼肌中, 胰岛素 (Insulin) 刺激引起的 IR, IRS1 和 Akt 的磷酸化和总蛋白量变化。左侧是代表性的 western blots 图, 右侧是左边数据的统计图。

图 6: MG53 能够与 IR 和 IRS1 相互作用, 并增加其泛素化。

a 通过免疫共沉淀实验检测野生型小鼠的骨骼肌中, MG53 与 IR 和 IRS1 相互作用。b 正

常饮食喂养 38 周的野生型和 MG53 转基因小鼠的骨骼肌中, IR (上) 和 IRS1 (下) 的泛素化程度数据。c 正常饮食或高脂饮食喂养 35 周的野生型和 MG53 敲除小鼠的骨骼肌中, IR(上) 和 IRS1 (下) 的泛素化程度数据。

图 7: RNG 手指区删除和 C14A 突变的 MG53, 不能引起 IR 和 IRS1 的泛素化增加, 而且不能抑制胰岛素信号。

a 在 C2C12 肌管细胞中, MG53 的过表达 (Flag-FL-MG53) 能显著引起 IR (左) 和 IRS1 (右) 的泛素化增加, 但 RNG 手指区删除 (Flag-ΔRNG) 和 C14A 突变 (Flag-C14A) 的 MG53 过表达, 对于 IR (左) 和 IRS1 (右) 的泛素化无影响。b C2C12 肌管细胞中, 通过 western blots 实验检测 MG53 的过表达 (FL-MG53) 能显著抑制胰岛素 (Insulin) 引起的 IR, IRS1 和 Akt 的磷酸化, 减少 IR 和 IRS1 的总量; RNG 手指区删除 (ΔRNG) 和 C14A 突变 (C14A) 的 MG53 无类似的作用。左为代表性的 western blots 图, 右为左边数据的统计图。

图 8: 蛋白酶体抑制剂能抑制 MG53 引起的胰岛素信号变化。

a C2C12 肌管细胞中, 通过 western blots 实验检测 MG53 的过表达 (Adv-MG53) 能够显著抑制胰岛素 (Insulin) 引起的 IR, IRS1 和 Akt 的磷酸化, 并减少 IR 和 IRS1 的总量, 而利用蛋白酶体抑制剂β-lac 能够抑制 MG53 的作用。左侧是代表性的 western blots 图, 右侧是左边数据的统计图。b C2C12 肌管细胞中, 胰岛素 (Insulin) 引起细胞对于葡萄糖衍生物 (2-NBDG) 的摄取增加, 而 MG53 过表达 (Flag-MG53) 能够抑制胰岛素引起的 2-NBDG 的摄取, MG53 的作用能够被蛋白酶体抑制剂β-lac 抑制。

附图 9: MG53C29A 与 MG53C34A 都能够保护缺氧引起的心肌细胞的损伤。

在培养的心肌细胞中, 通过细胞内 ATP 含量 (左图) 和细胞外乳酸脱氢酶 (LDH) 浓度 (右图) 检测缺氧引起过表达对照载体 (vector) 的细胞出现明显的死亡, 而过表达 MG53C29A 与 MG53C34A 两种突变体都能够和 MG53 或者 MG53C14A 相似, 明显的减少细胞的死亡。

附图 10: MG53C29A 与 MG53C34A 不能够引起 IRS1 的降解。

a 在培养的 C2C12 细胞中, 转染野生型 MG53, 以及 MG53C14A、MG53C29A 和 MG53C34A 突变体后, 能够表达类似水平的 MG53/MG53 突变体。b 在培养的 C2C12 细胞中, MG53 过表达能够降低细胞内 IRS1 的含量, 而与 MG53C14A 突变体类似, MG53C29A 和 MG53C34A 突变体不能够引起 IRS1 的蛋白量下降。

具体实施方案

以下实施例中采用的试剂盒是市售的北京全式金公司的 Easy Mutagenesis System。

实施例 1. MG53C14A 的突变过程: (MG53 蛋白突变体 即, MG53 突变体; MG53C14A)

1、设计突变引物，使上下游引物都带有突变位点，并且重叠区域为 18-27bp。引物序列为：

C14A primer 1:

5'-gaactgtccgccccactgtgcttgacagtg-3'

C14A primer 2:

5 - 5'- agcacagtggggcggacagttcctgacgca-3'

2、以突变质粒 200ng 作为模板，使用高保真 DNA 聚合酶，用特异性突变引物进行 PCR 反应扩增。反应产物用琼脂糖凝胶鉴定。

PCR 反应条件如下：

10 95°C 10min

95°C 30sec

55°C 30sec 20 Cycles

72°C 3.5sec

72°C 5min

15 4°C Hold (维持)

3、利用 DpnI 进行酶切反应处理 PCR 产物，反应条件如下：10uL PCR 产物加入 1uL DpnI，37°C 处理过夜。

4、转化大肠杆菌感受态细胞 TOP10：融解感受态 TOP10，加入处理后的 PCR 产物，放在冰上孵育 30 分钟，42°C 热刺激 60 秒，加入 LB，37°C 孵育 45 分钟。涂氨苄抗性 LB 平板。

20 37°C 过夜培养 16 小时。

5、挑取平板上的单菌落，DNA 测序检测突变结果。

参考：Stratagene 的 QuikChange Site-directed Mutagenesis kit. 北京全式金公司 Easy Mutagenesis System。

说明书可参见如下公开内容：<http://www.transgen.com.cn/uploadfile/201111/20111109161357731.pdf>

25 实施例 2. MG53 蛋白的突变体，即，MG53 突变体：MG53C17A。

MG53C17A 的突变过程：

引物序列为：

C17A primer 1:

5'- gccactggccttgacagtggtcgatgcgc-3'

30 C17A primer 2:

5'- cagctgcaaggccagtgggcaggacagttc-3'

其他步骤同 C14A。

实施例 3. MG53 突变体: MG53C29A。

MG53C29A 的突变过程:

引物序列为:

5 C29A primer 1:

5'- acggctgaggctggccacagttctgccgt-3'

C29A primer 2:

5'- actgtggccagcctcagccgtcactggcgc -3'

其他步骤同 C14A。或可参见实施例 1 或 2.

10 实施例 4. MG53 突变体: MG53C34A。

MG53C34A 的突变过程:

引物序列为:

C34A primer 1:

15 5'- cacagtttcgcccgctgcctgatccgg-3'

C34A primer 2:

5'- gcaggcacgggcgaaactgtggccacactc-3'

其他步骤同 C14A。

20 实施例 5. MG53 突变体: MG53C37A。

MG53C37A 的突变过程:

引物序列为:

C37A primer 1:

5'- tgccgtgccgccctgatccgggtggcaggg -3'

25 C37A primer 2:

5'- ccggatcagggcggcacggcagaaactgtg -3'

其他步骤同 C14A。或可参见实施例 1~4.

序列对比见附图 9.

30 实施例 6. MG53 突变体: MG53C53A。

MG53C53A 的突变过程:

引物序列为:

C53A primer 1:

5'-acagttgccgctccctgtgtcaggcacct-3'

C53A primer 2:

5'-acaacagggagcggcaactgtgccgtccgc-3'

其他步骤同 C14A。

5

实施例 7. MG53 突变体: MG53C56A。

MG53C56A 的突变过程:

引物序列为:

C56A primer 1:

10 5'-tgtccctgtgtcaggcacctacacggccg-3'

C56A primer 2:

5'-aggtgcctgagcacaggacaggcaactgt-3'

其他步骤同 C14A。

15

实施例 8. MG53 突变体: MG53C14G。

MG53C14G 的突变过程:

引物序列为:

C14G primer 1:

5'-gaactgtccggcccactgtgcttcagctg-3'

20

C14G primer 2:

5'-agcacagtgggccggacagttcctgacgca-3'

其他步骤同 C14A。

实施例 9. MG53 突变体: MG53C17G。

25

MG53C17G 的突变过程:

引物序列为:

C17G primer 1:

5'-gccactgggcttgacagctgttcgatgcgc-3'

C17G primer 2:

30

5'-cagctgcaagcccagtgggcaggacagttc-3'

其他步骤同 C14A。

实施例 10. MG53 突变体: MG53C29G。

MG53C29G 的突变过程:

引物序列为:

C29G primer 1:

5'- acggctgaggggtggccacagtttctgccgt-3'

5 C29G primer 2:

5'- actgtggccaccctcagccgtcactggegc -3'

其他步骤同 C14A。

实施例 11. MG53 突变体: MG53C34G。

10 MG53C34G 的突变过程:

引物序列为:

C34G primer 1:

5'- cacagtttcggccgtgcctgcctgatccgg-3'

C34G primer 2:

15 5'- gcaggcacggccgaaactgtggccacactc-3'

其他步骤同 C14A。

实施例 12. MG53 突变体: MG53C37G。

MG53C37G 的突变过程:

20 引物序列为:

C37G primer 1:

5'- tgccgtgccggcctgatccgggtggcaggg -3'

C37G primer 2:

5'- ccggatcaggccggcacggcagaaactgtg -3'

25 其他步骤同 C14A。

实施例 13. MG53 突变体: MG53C53G。

MG53C53G 的突变过程:

引物序列为:

30 C53G primer 1:

5'- acagttgccggtcctgtgtcaggcacct-3'

C53G primer 2:

5'-acaacagggaccggcaactgtgccgtccgc-3'

其他步骤同 C14A。

实施例 14. MG53 突变体: MG53C56G。

5 MG53C56G 的突变过程:

引物序列为:

C56G primer 1:

5'-tgccctgtggtcaggcacctacacggccg-3'

C56G primer 2:

10 5'-aggtgcctgaccacagggacaggcaactgt-3'

其他步骤同 C14A。

实施例 15. MG53 突变体: MG53C14L。

MG53C14L 的突变过程:

15 引物序列为:

C14L primer 1:

5'-gaactgtccctcccactgtgcttgacagctg-3'

C14L primer 2:

5'-agcacagtgggagggacagttcctgacgca-3'

20 其他步骤同 C14A。

实施例 16. MG53 突变体: MG53C14V。

MG53C14V 的突变过程:

引物序列为:

25 C14V primer 1:

5'-gaactgtccgtcccactgtgcttgacagctg-3'

C14V primer 2:

5'-agcacagtgggacggacagttcctgacgca-3'

30 其他步骤同 C14A。

实施例 17. MG53 突变体: MG53C14I。

MG53C14I 的突变过程:

引物序列为:

C14I primer 1:

5'-gaactgtccatcccactgtgcttgacagctg-3'

C14I primer 2:

5'- agcacagtgggatggacagttcctgacgca-3'

5 其他步骤同 C14A。

实施例 18. MG53 突变体: MG53C14P。

MG53C14P 的突变过程:

引物序列为:

10 C14P primer 1:

5'-gaactgtccccaccactgtgcttgacagctg-3'

C14P primer 2:

5'- agcacagtggatgggacagttcctgacgca-3'

15 其他步骤同 C14A。

实施例 19. MG53 突变体: MG53C17L。

MG53C17L 的突变过程:

引物序列为:

C17L primer 1:

20 5'- gccactgctcttgacagctgttcgatgcgc-3'

C17L primer 2:

5'- cagctgcaagagcagtgaggcaggacagttc-3'

其他步骤同 C14A。

25 实施例 20. MG53 突变体: MG53C29L。

MG53C29L 的突变过程:

引物序列为:

C29L primer 1:

5'-acggctgagcttgccacagtttctgccgt-3'

30 C29L primer 2:

5'-actgtggccaagctcagccgtcactggcg-3'

其他步骤同 C14A。

实施例 21. MG53 突变体质粒通过利用 ScreenFectA 转染细胞方式获得 MG53 突变体。

HEK293T 细胞培养在 60mm 培养皿中至 90%密度, 准备大量的质粒 (Flag-MG53 或 Flag-C14A MG53), 利用 ScreenFectA (Incella) 转染细胞, 具体步骤如下:

- (1) .首先弃去细胞培养液, 加入 DMEM 2mL。
- (2) .在一个 eppendoff 管 A 中加入提供的 dilution buffer 250uL, 加入 5mg 质粒, 混匀;
- (3) .在 eppendoff 管 B 中加入提供的 dilution buffer 250uL, 加入 ScreenFectA50uL, 混匀;
- (4) .5min 后, A、B 两管液体混匀, 室温放置 30min;
- (5) .将混合物均匀加入细胞, 培养 6 小时, 换成普通培养基。

48 小时后, 利用细胞裂解 buffer 裂解细胞, SDS-PAGE 分离蛋白, 转膜后利用 Flag 抗体检测蛋白表达。

实施例 22. 通过 PCR 的方法截断 RING 结构域:

PCR 引物:

dR-F: 5'-ata ggtacc gccacc atg gcacctacacggccgcagg-3'

dR-R: 5'-ata ctcgag gc ggctgttctctgctccggc-3'

酶切位点为 KpnI 和 XhoI, 以此 MG53 全长质粒为模板, 利用这两个引物做 PCR, 反应体系为:

Template DNA:	1 uL (100ng/uL)
Primer dR-F:	1 uL
Primer dR-R:	1 uL
KAPA Hotstart PCR mix:	50 uL
H ₂ O:	47 uL

反应条件为:

98 °C	5 min	
98 °C	30 sec	} 30 Cycles
66 °C	30 sec	
72 °C	70 sec	
72 °C	5 min	
4 °C	Hold	

反应产物经 KpnI/XhoI 双酶切处理, 同时 pcDNA4/TO/myc-His B 质粒也用两种酶双酶切

处理。之后琼脂糖凝胶分离 DNA，做胶回收，利用 T4 连接酶做连接反应，连接产物转化大肠杆菌 Top10 菌株。验证阳性克隆利用测序验证序列正确。

申请人构建好的 dRING 质粒，表达的蛋白为：从 N-端 58Ala 开始，到 MG53 全蛋白结束，并在 C-端带有 Myc 标签。

5

实施例 23. 不同突变体和 MG53 野生型保护心肌细胞缺氧的能力差异

根据实施例 1、3、4 构建 MG53C14A、MG53C29A、MG53C34A 三种质粒，根据实施例 21 进行心肌细胞表达，在缺氧环境下检测细胞内 ATP 含量和细胞外乳酸脱氢酶浓度检测来检测缺氧引起过表达对照载体(vector)的细胞出现明显的死亡，而过表达 MG53C29A 与
10 MG53C34A 两种突变体都能够和 MG53 或者 MG53C14A 相似，明显减少细胞的死亡。如图 9。

细胞缺氧的方法是，把细胞培养在 RPMI1640/5% 胎牛血清的培养基中 48 小时以后，更换培养基为不含血清的并利用 95%氮气和 5%二氧化碳饱和的 RPMI1640 培养基，而后把细胞放到 37 摄氏度的充满 95%氮气和 5%二氧化碳的密封小室（Ohmeda oxygen monitor, type 5120）实现细胞缺氧。对于正常的对照，细胞的培养基换成 RPMI1640/5% 胎牛血清，放在 37 摄氏
15 度含有 5%二氧化碳的孵箱中。

心肌细胞损伤的检测方法如下：

对于 ATP 含量，采用 Promega 公司的 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Cat#G7571)。具体的实验方法：1 取试剂盒中的 CellTiter-Glo Substrate（1 管）与 CellTiter-Glo Buffer（1 管）混合，实验前将试剂恢复至室温待用；2 细胞样本由孵箱中取出，放置恢复至
20 室温待用；3 细胞培养板中每个样本留取一定量的细胞培养液，与等量的 ATP 试剂混合（即，细胞培养液与 ATP 试剂按照 1:1 的比例混合）；4 将样本轻摇 2min（此步骤中细胞，细胞培养液和 ATP 试剂轻混）；5 室温静置 10min 后；6 吸取样本至酶标板中，上机检测 Luminescent。对于 LDH 浓度，采用上海景源医疗器械有限公司（LDH0360）。具体的实验方法：1 取 LDH 试剂盒内试剂，按照试剂 2 和试剂 1（1:5）的比例完全混合后，2-8 度保存待用；2 酶标板中
25 加样本 40ul/孔；3 与 200ul/孔的试剂混合后，上机测定 340nm 处的吸光度值。

实施例 24. 不同突变体和 MG53 野生型 C2C12 细胞的蛋白表达能力差异

根据实施例 1、3、4 构建 MG53C14A、MG53C29A、MG53C34A 三种质粒，C2C12 成肌细胞（来自细胞资源中心，IBMS，中国医学科学院/中国协和医科大学）置于 37 摄氏度含 5
30 %二氧化碳的细胞培养箱中，经 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基（DMEM）培养，该培养基中补充有 10%牛胎儿血清（Sigma-Aldrich 公司），0.11g/L 丙酮酸钠和 1%的青霉素 - 链霉素。

当 C2C12 成肌细胞 90% 密度时，我们通过腺病毒感染或质粒转染进行四种质粒导入。之后，细胞在含有 2% 的马血清的 DMEM 培养基里培养四天分化成肌管。

在培养的 C2C12 细胞中，转染野生型 MG53，以及 MG53C14A、MG53C29A 和 MG53C34A 突变体后，能够表达类似水平的 MG53/MG53 突变体。如图 10a。

5

实施例 25. 不同突变体和 MG53 野生型降解 IRS1 能力的差异

根据实施例 1、3、4 构建 MG53C14A、MG53C29A、MG53C34A 三种质粒，C2C12 成肌细胞（来自细胞资源中心，IBMS，中国医学科学院/中国协和医科大学）置于 37 摄氏度含 5 % 二氧化碳的细胞培养箱中，经 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基（DMEM）培养，该培养基中补充有 10% 牛胎儿血清（Sigma-Aldrich 公司），0.11g/L 丙酮酸钠和 1% 的青霉素 - 链霉素。当 C2C12 成肌细胞 90% 密度时，我们通过腺病毒感染或质粒转染进行四种质粒导入。之后，细胞在含有 2% 的马血清的 DMEM 培养基里培养四天分化成肌管。

进行免疫共沉淀（CoIP）：利用裂解液（pH7.6 的 30mM 的 HEPES，100mM 的氯化钠，0.5% NP-40，和蛋白酶抑制剂混合物）裂解组织或细胞，4° C 混合摇动 30min，将裂解物在 4° C，13,000 rpm 离心 10 分钟，去除沉淀，上清为总蛋白，备用。利用冰冷的 1XPBS 清洗 proteinA beads，PBS 重悬 beads，4000rpm 离心 2min，去除上清，如此反复清洗 3 次，去除 PBS，加入总蛋白裂解液和 anti-IRS1 的抗体 0.5ug，4° C 静音混合孵育 4 小时。照前法利用冰冷 1XPBS 清洗沉淀后的 beads，清洗 3 次，之后 beads 加入 1Xloading buffer，100° C 煮 5 分钟，13000rpm 离心 10min，取上清做为样品，SDS-PAGE 上样分离蛋白，转 PVDF 膜，利用 anti-IRS1-PY100 的抗体进行蛋白质免疫印迹分析。其他蛋白均利用选相应的特异抗体进行蛋白质免疫印迹分析。

15

20

培养的 C2C12 细胞中，MG53 过表达能够降低细胞内 IRS1 的含量，而与 MG53C14A 突变体类似，MG53C29A 和 MG53C34A 突变体不能够引起 IRS1 的蛋白量下降。该实施例说明相较于 MG53 过表达，其他 MG53 突变体不能引起胰岛素抵抗，较小影响机体代谢。见图 10b。

25

经实验证实，包括实施例 1 所述的 MG53C14A 在内的 MG53 突变体，即，MG53C14A、MG53C17A、MG53C29A、MG53C34A、MG53C37A、MG53C53A、MG53C56A 均对心脏能产生保护作用，可保护心脏损伤。MG53 含量的增加在保护心脏的同时，会引起胰岛素抵抗、肥胖和糖尿病，MG53 在保护心脏的同时，伴有胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病和代谢综合征等副作用。而 MG53 的第 14 位点、第 17 位点、第 29 位点、第 34 位点、第 37 位点、第 53 位点、第 56 位点的半胱氨酸，特别是第 14 位点的 C，是 MG53 引起胰岛素抵抗、肥胖和糖尿病所必需的，

30

也就是说上述位点的半胱氨酸尤其是第14位C发生突变的MG53突变体（例如MG53C14A）不能引起胰岛素抵抗、肥胖和糖尿病，却仍然能够保护心肌细胞的损伤，即，MG53突变体（包括MG53C14A）能够在不引起胰岛素抵抗、肥胖和糖尿病等副作用等前提下，行使心脏保护功能。

5 本发明所述的 MG53 突变体，包括上述实施例的 MG53 突变体，其序列的属种包括灵长类动物（例如：人）、大鼠和小鼠。其中本试验选用原始野生序列为小鼠 MG53(TRIM72)mRNA 的 NCBI 编号: NM_001079932.3 而其他序列可选自人类: mRNA :NM_001008274.3 相应氨基酸序列: NP_001008275.2。大鼠: mRNA: NM_001077675.1 相应氨基酸序列: NP_001071143.1。猴子: mRNA:XM_001112866.2 相应氨基酸序列: XP_001112866.1 且不应局限于所列举的有限序列，包含所涉及物种的所有 MG53 相应序列。以如上序列为基础得到的 MG53 突变体。

10

本申请中所提及的突变体，即突变蛋白或突变体蛋白。

以上旨在进一步说明本发明，并不对本发明的范围加以限制。本领域技术人员对在此公开的实施方案可进行并不偏离本发明范畴和精神的改进和变化。

权 利 要 求 书

1、一种 MG53 突变体，其特征在于，该 MG53 突变体为 MG53 氨基酸序列的 N 端的 RING 结构域 7 个半胱氨酸中的任一个或两个或两个以上的半胱氨酸突变为非极性氨基酸的突变体；该 7 个半胱氨酸分别在 RING 结构域的第 14 位点、第 17 位点、第 29 位点、第 34 位点、第 37 位点、第 53 位点、第 56 位点。

2、如权利要求 1 所述的 MG53 突变体，其特征在于，所述的氨基酸为丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或蛋氨酸。

3、如权利要求 2 所述的 MG53 突变体，其特征在于，所述的非极性氨基酸为丙氨酸、甘氨酸、亮氨酸、脯氨酸、缬氨酸或异亮氨酸。

4、一种 MG53 突变体基因，其特征在于，MG53 突变体基因具有编码权利要求 1 所述的 MG53 突变体的碱基序列。

5、如权利要求 3 所述的 MG53 突变体，其特征在于，所述的非极性氨基酸为丙氨酸，所述的 MG53 突变体选自 MG53C14A、MG53C17A、MG53C29A、MG53C34A、MG53C37A、MG53C53A、MG53C56A 中的任意一种。

6、一种 MG53 突变体的突变方法，其特征在于，该方法是利用定点突变试剂盒对野生型 MG53 质粒的全长序列进行定点突变，得到所述的 MG53 突变体质粒。

7、如权利要求 6 所述的突变方法，其特征在于，利用定点突变试剂盒对野生型 MG53 质粒的全长序列进行突变，得到第 14 位的半胱氨酸突变为非极性氨基酸的 MG53 突变体质粒。

8、如权利要求 6 所述的改造方法，其特征在于，该定点突变的过程为：

(1) 先设计突变引物，使上下游引物都带有突变位点，重叠区域为 18-27bp；

(2) 以待突变质粒作为模板，使用 DNA 聚合酶，用特异性突变引物进行 PCR 反应扩增，反应产物用琼脂糖凝胶电泳鉴定；该待突变质粒为野生型 MG53 质粒；

(3) 利用 DpnI 进行酶切反应处理 PCR 产物；

(4) 转化大肠杆菌感受态细胞 TOP10，融解感受态 TOP10，加入处理后的 PCR 产物，冰上孵育，加入 LB，孵育，涂氨苄，抗性 LB 平板，培养，挑取平板上的单菌落，DNA 测序检测得突变结果为阳性，将所得到的突变基因插入到载体中得到 MG53 突变体的质粒；

(5) 上述 MG53 突变体质粒通过利用 ScreenFectA 转染细胞方式获得 MG53 突变体。

9、一种动物表达载体，其特征在于该载体插入了权利要求 8 所述的 MG53 突变体基因。

10、如权利要求 9 所述的动物表达载体，其特征在于载体可以为腺病毒表达载体。

11、如权利要求 10 所述的动物表达载体，其特征在于载体可以为 pcDNA4/TO/Myc-His B。

12、一种动物细胞，其特征在于该细胞转染了权利要求 9 或 10 所述的动物表达载体。

13、如权利要求 12 所述的动物细胞，其特征在于所述动物细胞为 C2C12 肌管细胞。

14、权利要求 1 所述的 MG53 突变体在制备应用心肌损伤修复的药物中的用途。

15、如权利要求 14 所述的用途，其特征在于，所述药物在制备应用心肌损伤修复引起的胰岛素抵抗、心脏缺血损伤、心脏缺血/再灌损伤、心肌梗塞、心力衰竭、心律失常、心脏破裂的药物中的用途。

16、如权利要求 14 所述的用途，其特征在于，所述药物在制备治疗胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病等代谢类疾病的药物中的用途。

17、如权利要求 14 所述的用途，其特征在于，所述药物在制备应用调节血压的药物中的用途。

18、如权利要求 14-17 任一项所述的用途，其特征在于，该 MG53 突变体为 MG53C14A，其为 MG53C14A
5 在制备治疗心肌损伤的药物中的用途。

19、如权利要求 14-17 任一项所述的用途，其特征在于，该 MG53 突变体为 MG53C29A，其为 MG53C29A 在制备治疗心肌损伤的药物中的用途。

20、如权利要求 14-17 任一项所述的用途，其特征在于，该 MG53 突变体为 MG53C34A，其为 MG53C34A 在制备治疗心肌损伤的药物中的用途。

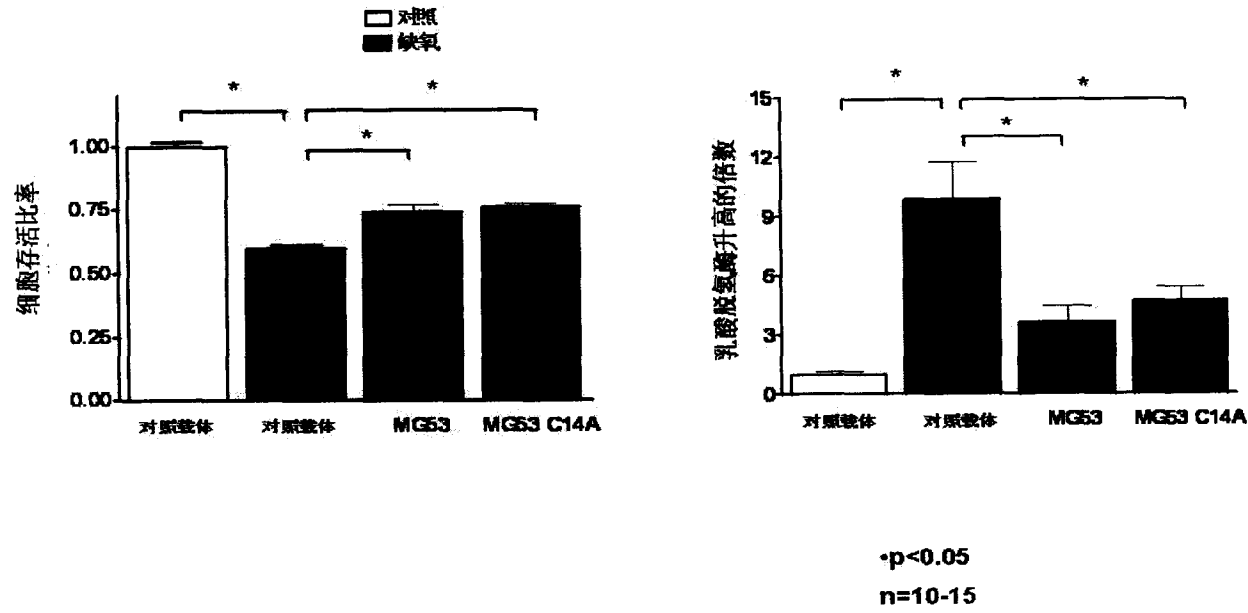


图 1

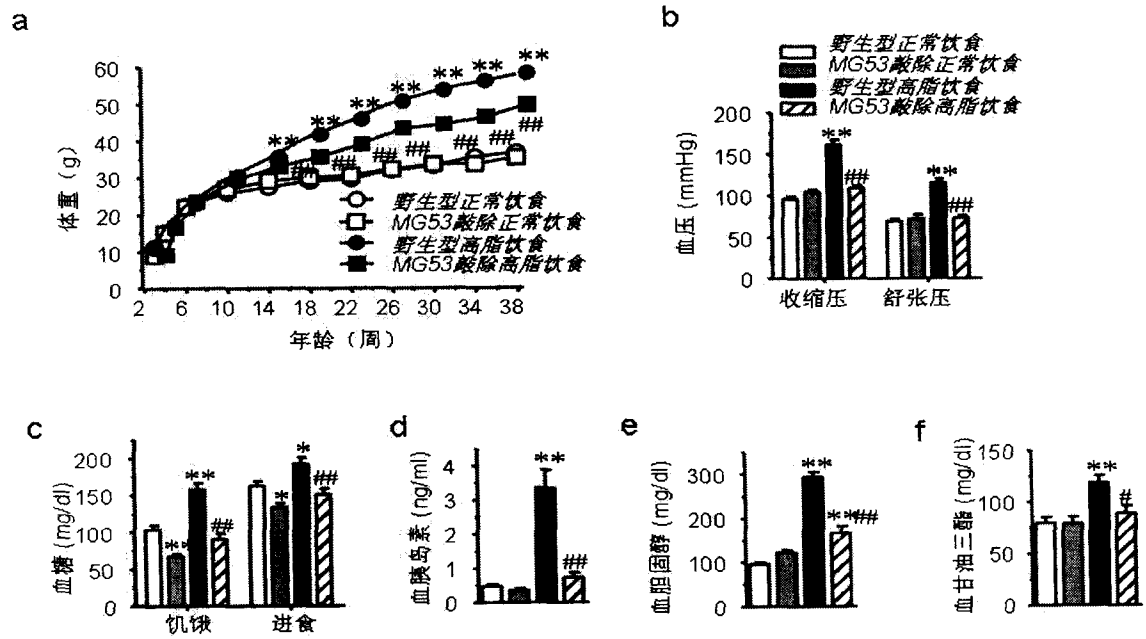


图 2

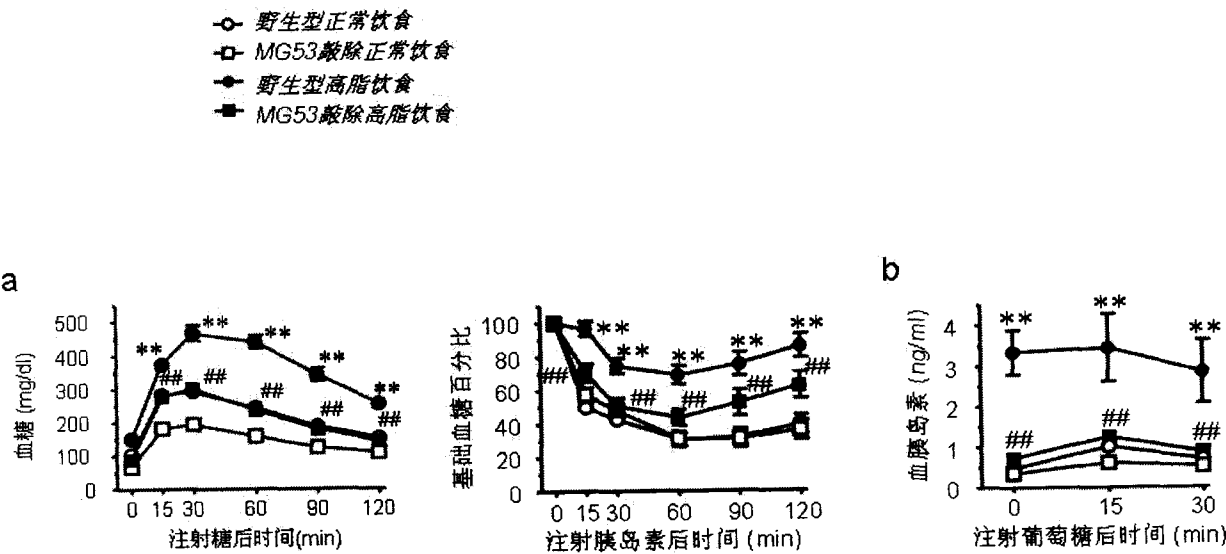


图 3

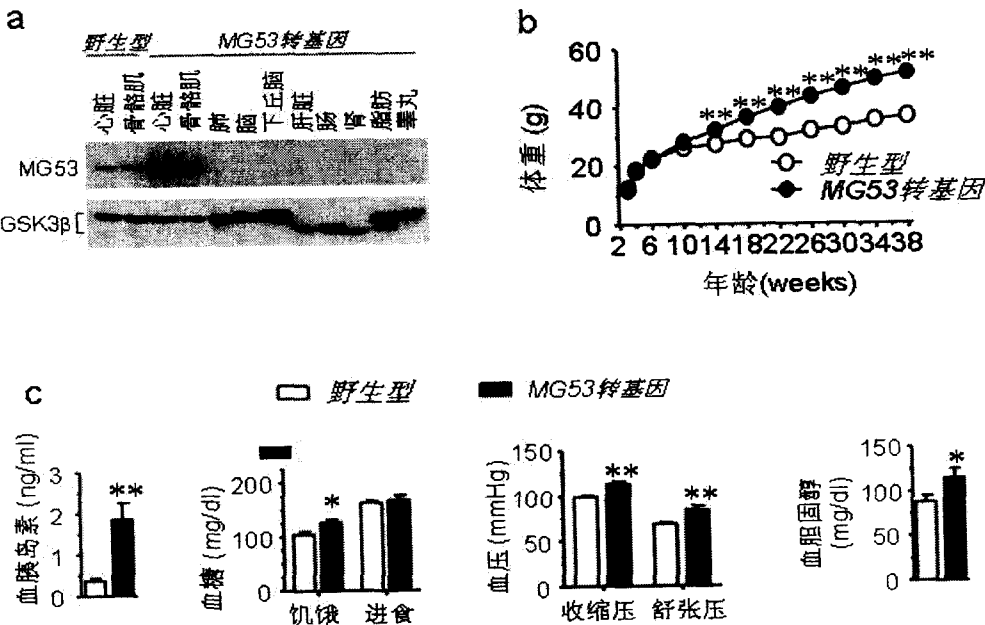


图 4

3/5

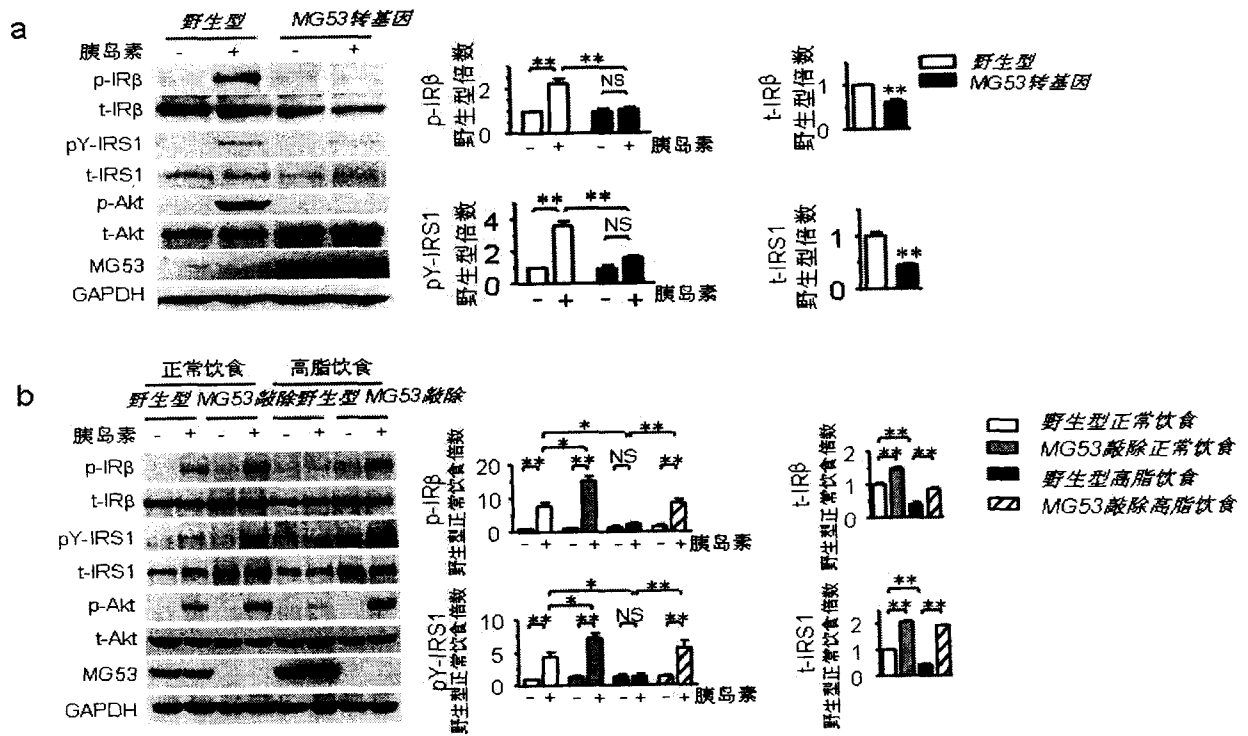


图 5

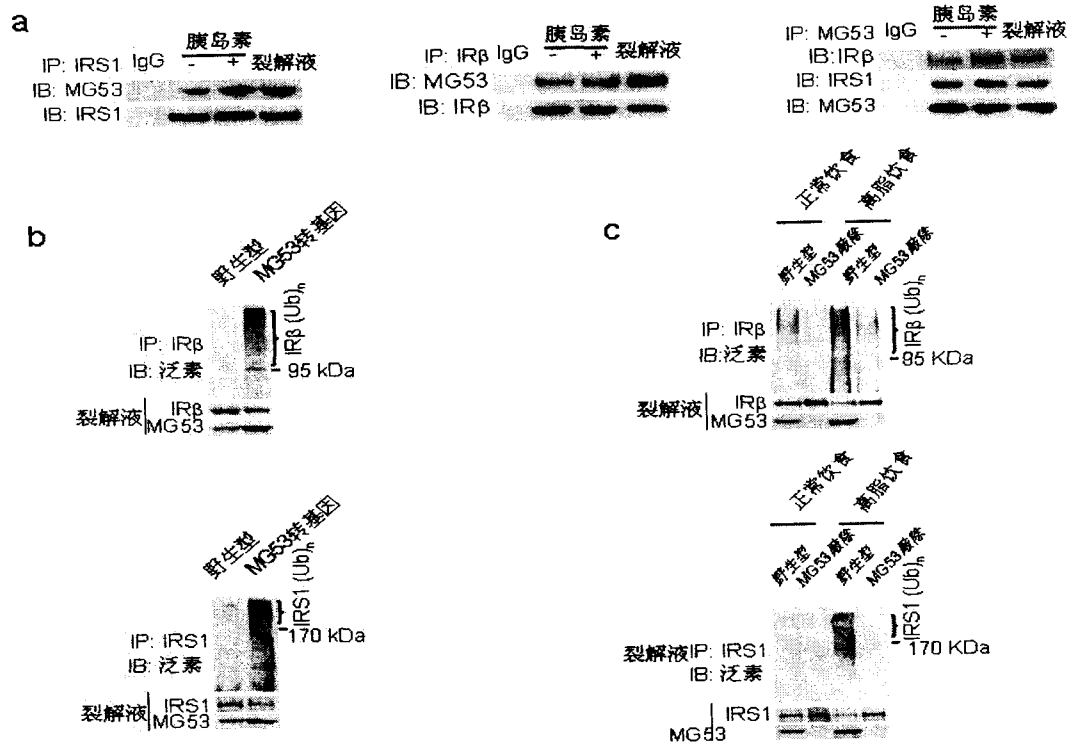


图 6

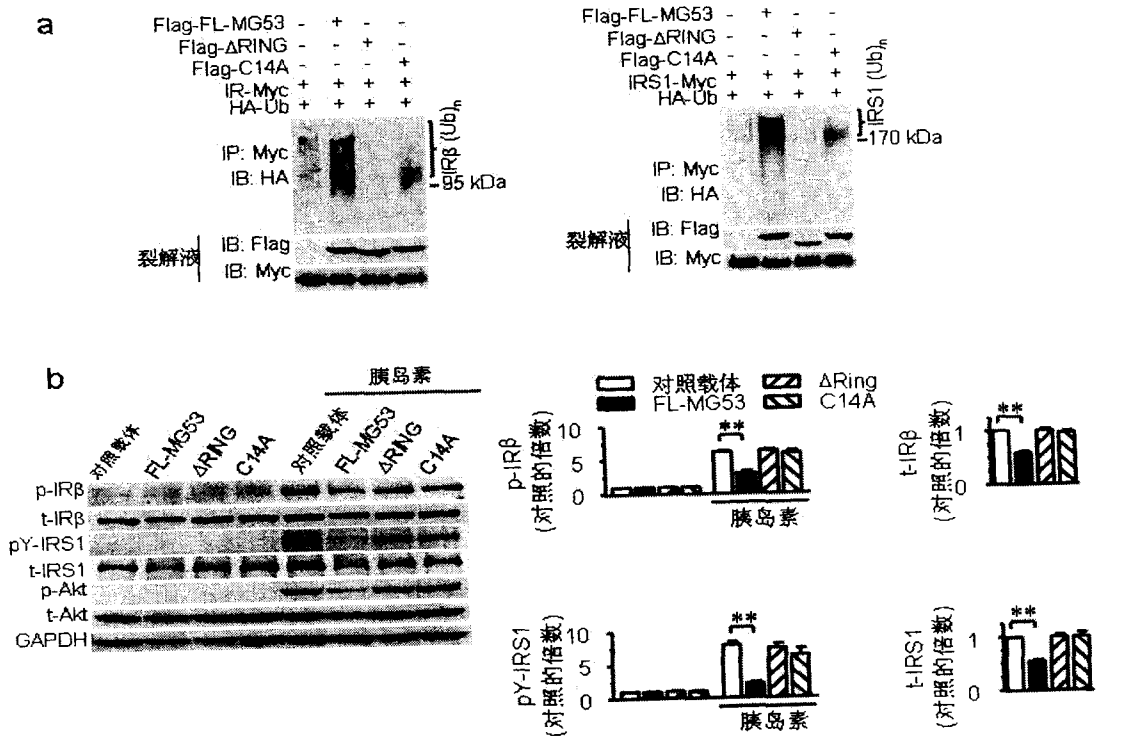


图 7

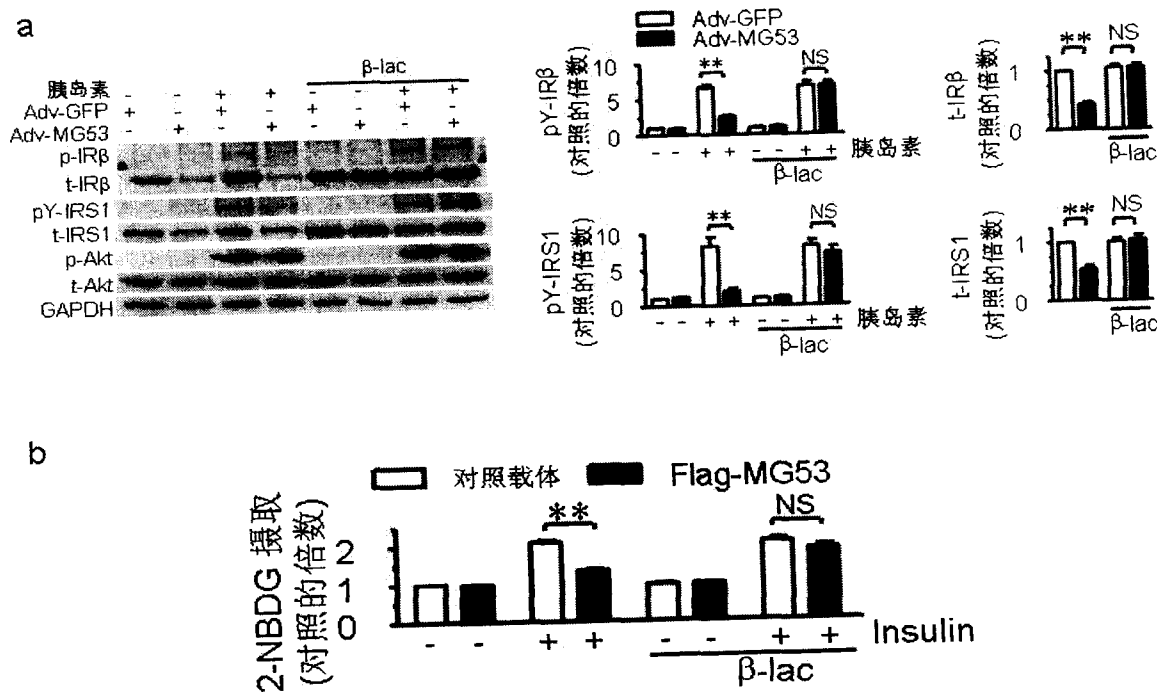


图 8

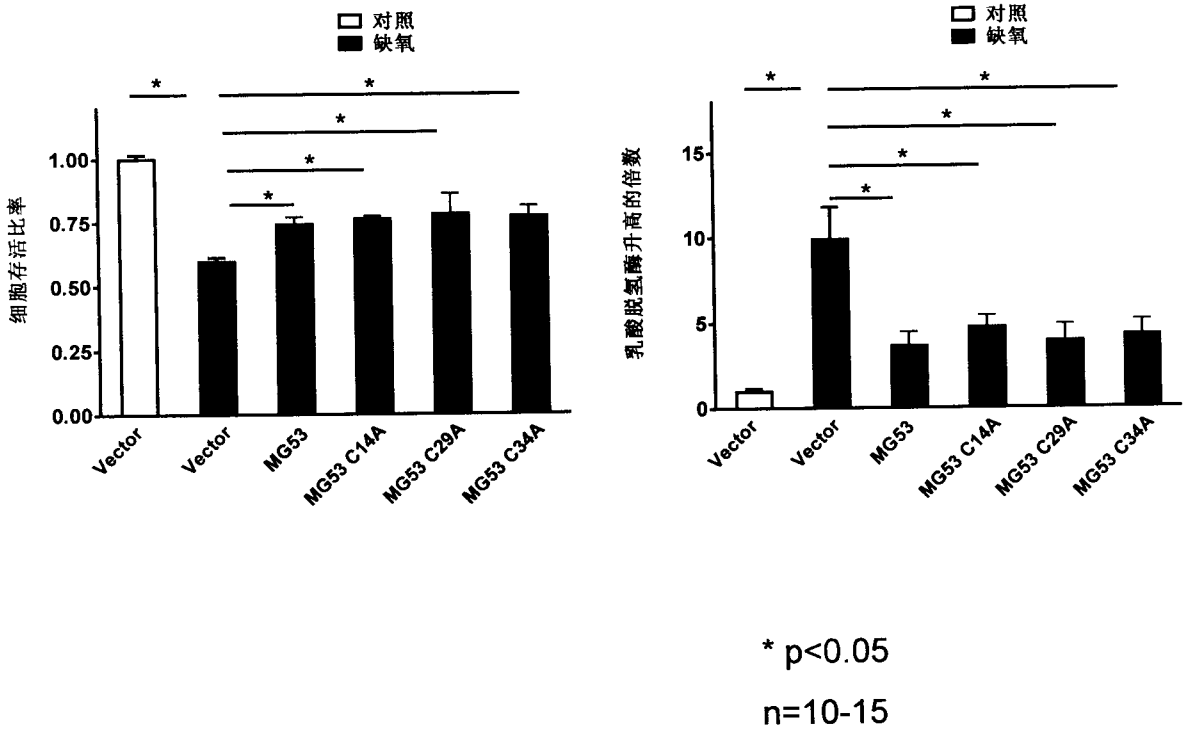


图 9

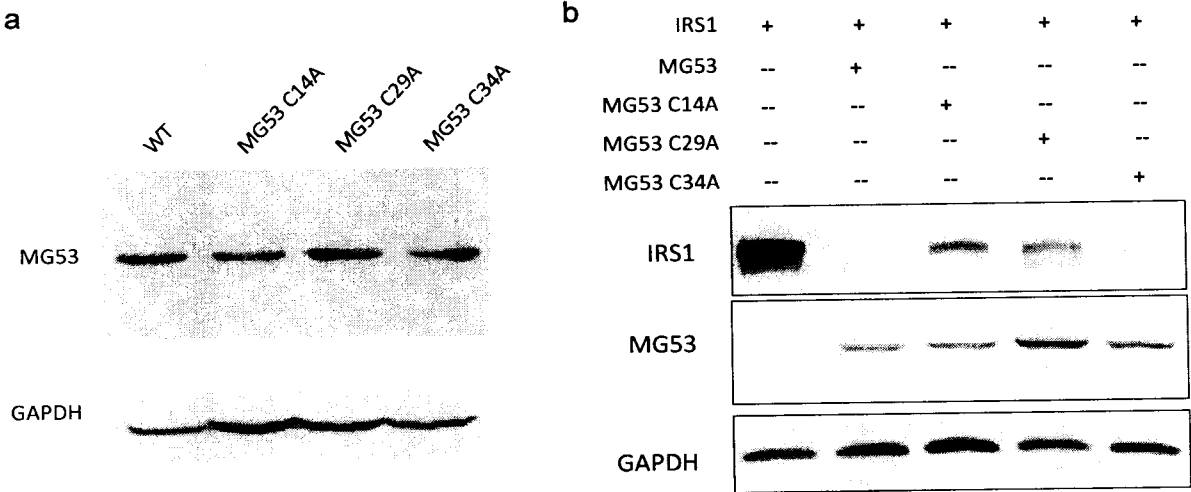


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/000078

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/47 (2006.01) i; C12N 15/12 (2006.01) i; C12N 15/01 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; A61P 9/00 (2006.01) i; A61P 9/04 (2006.01) i; A61P 9/06 (2006.01) i; A61P 9/10 (2006.01) i; A61P 3/00 (2006.01) i

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC: C07K; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE and search terms: MG53, mitsugumin53, TRIM72, mutant, C14A, C29A, C34A, RING, Cys, Cysteine, insulin resistance, cardioprotection, repair, cardiac, heart

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SONG, Ruisheng et al., "Central role of E3 ubiquitin ligase MG53 in insulin resistance and metabolic disorders", NATURE, vol. 494, 27 January 2013 (27.01.2013), page 375, left column, lines 35-46, and page 378, right column, lines 5-30, and figure 5, "METHODS", sections of "Plasmid and adenoviral vectors" and "Cell culture, adenoviral infection and plasmid transfection"	1-20
X	NGUYEN, N. et al., "MG53 ubiquitinates focal adhesion kinase during skeletal myogenesis", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 16 December 2013 (16.12.2013), abstract, page 3, right column, lines 1-7, page 4, left column, line 20 to right column, line 6, page 7, left column, line 29 to right column, line 5, page 7, right column, line 27 to page 8, left column, line 4, and page 9, left column, lines 1-5	1-5, 9-20
A	CN 101797375 A (PEKING UNIVERSITY et al.), 11 August 2010 (11.08.2010), the whole document	1-20
A	WO 2012135868 A2 (UNIV NEW JERSEY MED et al.), 04 October 2012 (04.10.2012), the whole document	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 17 April 2014 (17.04.2014)	Date of mailing of the international search report 06 May 2014 (06.05.2014)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer LI, Chen Telephone No.: (86-10) 62411100

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/000078

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101912617 A (PEKING UNIVERSITY et al.), 15 December 2010 (15.12.2010), the whole document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2014/000078

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101797375 A	11.08.2010	CN 101797375 B	23.01.2013
WO 2012135868 A2	04.10.2012	WO 2012135868 A3	22.11.2012
		CN 103547281 A	29.01.2014
		WO 2012135868 A8	02.05.2013
		WO 2012134478 A1	04.10.2012
CN 101912617 A	15.12.2010	CN 101912617 B	26.09.2012

A. 主题的分类		
C07K 14/47(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/01(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A61P 9/04(2006.01)i; A61P 9/06(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 3/00(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C07K; C12N; A61K; A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE和检索词: MG53, mitsugumin53, TRIM72, mutant, 突变体, C14A, C29A, C34A, RING, Cys, Cysteine, insulin resistance, cardioprotection, repair, cardiac, 修复, 心, 胰岛素抵抗		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	SONG, Ruisheng等. "Central role of E3 ubiquitin ligase MG53 in insulin resistance and metabolic disorders" Nature, 第 494卷, 2013年 1月 27日 (2013 - 01 - 27), 第375页左栏第35-46行, 第378页右栏第5-30行, 图5, "METHODS" 中 "Plasmid and adenoviral vectors" 和 "Cell culture, adenoviral infection and plasmid transfection" 部分	1-20
X	NGUYEN, Nga等. "MG53 ubiquitinates focal adhesion kinase during skeletal myogenesis" The journal of biological chemistry, 2013年 12月 16日 (2013 - 12 - 16), 摘要, 第3页右栏第1-7行, 第4页左栏第20行-右栏第6行, 第7页左栏第29行-右栏第5行, 第7页右栏第27行-第8页左栏第4行, 第9页左栏第1-5行	1-5, 9-20
A	CN 101797375A ((北京大学等)) 2010年 8月 11日 (2010 - 08 - 11) 全文	1-20
A	WO 2012135868A2 ((UNIV NEW JERSEY MED等)) 2012年 10月 04日 (2012 - 10 - 04) 全文	1-20
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2014年 4月 17日		2014年 5月 06日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国		李晨
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)62411100

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 101912617A ((北京大学等)) 2010年 12月 15日 (2010 - 12 - 15) 全文	1-20

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/000078

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 101797375A	2010年 8月 11日	CN 101797375B	2013年 1月 23日
WO 2012135868A2	2012年 10月 04日	WO 2012135868A3	2012年 11月 22日
		CN 103547281A	2014年 1月 29日
		WO 2012135868A8	2013年 5月 02日
		WO 2012134478A1	2012年 10月 04日
CN 101912617A	2010年 12月 15日	CN 101912617B	2012年 9月 26日