

莫娇,敖青青,郑志坚,等. 肝特异性 LCMT1 基因敲除小鼠模型的制备及鉴定 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 17-22.
Mo J, Ao QQ, Zheng ZJ, et al. Establishment of liver-specific leucine carboxyl methyltransferase-1 gene knockout mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 17-22.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.002

肝特异性 LCMT1 基因敲除小鼠模型的制备及鉴定

莫娇¹,敖青青¹,郑志坚¹,吴懿洁¹,梁宁静¹,廖思米¹,王新航²,陆彩玲¹,
唐深²,李习艺^{1*}

(1. 广西医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系,南宁 530021; 2. 广西医科大学基础医学院免疫学教研室,南宁 530021)

【摘要】 目的 建立肝特异性 LCMT1 基因敲除小鼠模型。**方法** 运用 CRISPR/Cas9 技术构建肝特异性 LCMT1-KO 小鼠。通过 RT-PCR、实时定量 PCR、Western Blot 和 HE 染色等方法鉴定及比较野生和敲除小鼠的差异;观察和分析两组小鼠的一般情况、繁殖能力和子代存活率。**结果** 成功鉴定子代的基因型;LCMT1-KO 小鼠肝 LCMT1 mRNA 和蛋白质水平显著低于对照组小鼠;两组小鼠的饮食、饮水、体重、繁殖能力、子代存活率、肝外观和 HE 染色无明显差异;LCMT1-KO 小鼠心脏、大脑和肾组织中 LCMT1 表达与对照组相比没有显著变化;LCMT1-KO 小鼠 sgRNA 未发生脱靶。**结论** 成功构建肝特异性 LCMT1 基因敲除小鼠,为研究 LCMT1 基因在疾病中的调控作用提供实验手段。

【关键词】 肝;LCMT1;Cre/Loxp;基因敲除

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0017-06

Establishment of liver-specific leucine carboxyl methyltransferase-1 gene knockout mice

MO Jiao¹, AO Qingqing¹, ZHENG Zhijian¹, WU Yijie¹, LIANG Ningjing¹, LIAO Simi¹, WANG Xinhang²,
LU Cailing¹, TANG Shen², LI Xiyi^{1*}

(1. Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China.

2. Immunology, School of Basic Medical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021)

Corresponding author: LI Xiyi. E-mail: leeciye@163.com

【Abstract】 Objective To establish a liver-specific leucine carboxyl methyltransferase-1 (Lcmt1) gene knockout mouse model. **Methods** The Lcmt1 knockout (Lcmt1-KO) mice were established with CRISPR/Cas9 technology. RT-PCR, Real-time PCR, Western Blot and hematoxylin/eosin staining were used to characterize the differences between wildtype and gene knockout mice. The general condition, reproductive ability and survival rate of offspring were also observed in the two groups of mice. **Results** The genotypes of offspring were successfully identified. The hepatic mRNA and protein levels of Lcmt1 were significantly lower in Lcmt1-KO mice than those in control mice. No significant differences in diet, drinking water, body weight, reproductive ability, survival rate of offspring, liver appearance and hematoxylin/eosin staining were found between the two groups. The expression level of Lcmt1 in brain, heart and kidney tissues were equivalent between the two groups. The single guide RNA used to generate Lcmt1-KO mouse had no off-target actions.

【基金项目】国家自然科学基金(81860585,82160612),广西自然科学基金(2018GXNSFAA281130)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81860585, 82160612), Guangxi Natural Science Foundation (2018GXNSFAA281130).

【作者简介】莫娇(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向:蛋白磷酸酶甲基化调控的分子机制研究。Email:1633728470@qq.com

【通信作者】李习艺(1974—),女,教授,博士生导师,研究方向:代谢性疾病。Email:leeciye@163.com

Conclusions The liver-specific *Lcmt1*-KO mouse model was successfully constructed. This model provides the experimental means for studying the regulatory role of hepatic *Lcmt1* in diseases.

【Keywords】 liver; *Lcmt1*; Cre/loxP; gene knockout

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

亮氨酸羧基甲基转移酶 1 (Leucine carboxyl methyltransferase 1, LCMT1) 是一种大小为 38×10^3 包含 334 个氨基酸的蛋白质,其序列高度保守,广泛存在于动物、植物和酵母中^[1-3]。LCMT1 通过催化蛋白磷酸酶 2A 催化亚基 C (PP2Ac) 的羧基端亮氨酸 309 位点发生甲基化,从而发挥其重要作用^[4-5]。蛋白磷酸酶 2A (PP2A) 是丝氨酸/苏氨酸家族的特异性蛋白磷酸酯酶之一,由结构亚基 A,调节亚基 B 和催化亚基 C 组成的异源三聚体复合物,通过对下游信号通路去磷酸化发挥重要的作用^[6-8]。研究发现 LCMT1 和蛋白磷酸酶甲基酯酶 1 (PPME1) 共同维持 PP2Ac 甲基化水平的动态平衡^[9-10],干扰甲基化动态平衡导致有丝分裂纺锤体大小异常、细胞生长缓慢、细胞损伤甚至死亡^[11-12]。全身敲除 LCMT1 基因,导致全胚裂解物 PP2Ac 甲基化水平显著降低,胎儿肝造血功能严重缺陷,胚胎死亡率高达 90%^[13]。高表达 LCMT1 促进 PP2Ac 去甲基化,保护细胞免受 H_2O_2 诱导的氧化损伤^[14-16]。上述证据表明 LCMT1 在细胞增殖和胚胎发育过程中是必不可少的。目前关于 LCMT1 在肝的研究较少,国内外尚无在肝中特异性敲除 LCMT1 基因的动物模型。本课题通过 Cre/Loxp 系统特异性敲除肝 LCMT1 基因,在动物水平上探讨 LCMT1 基因在肝中的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

采用 CRISPR/Cas9 技术构建 8 周龄 SPF 级 C57BL/6N 背景的 *LCMT1*^{fllox/+} 小鼠与 Alb-Cre^{+/+} 小鼠雌雄各 2 只,体重 18~22 g。该工作与赛业生物科技有限公司【SCXK(粤)2018-0032】合作完成。动物饲养在广西医科大学 SPF 级实验动物中心【SYXK(桂)2020-0003】,8 周龄的 WT 鼠和 KO 鼠各 5 只,体重 18~21 g。饲养环境:温度 20~26℃,湿度 40%~70%,氨浓度不超过 14 mg/m³,每 12 h 进行明暗交替,垫料、鼠盒、水瓶高压灭菌。所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审查备案号:202107001)。

1.1.2 主要试剂与仪器

鼠尾 DNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、DL2000 DNA Marker (TaKaRa 公司);TRIzol (天根生化科技有限公司);SYBR Green Master (Roche 公司);I 型核酸染料 (北京索莱宝科技有限公司);琼脂糖粉、PVDF 膜、化学发光液 (Invitrogen 公司);蛋白预染 Marker (Thermo Fisher Scientific 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Anti-Tubulin (上海碧云天生物技术有限公司,货号:AF0001);Anti-LCMT1 (上海圣克鲁斯生物技术有限公司,货号:SC-81609);山羊抗鼠 IgG/HRP、山羊抗兔 IgG/HRP (北京中杉金桥生物技术有限公司);4% 多聚甲醛通用型组织固定液 (大连美仑生物技术有限公司)。

PCR 仪、iBright 蛋白免疫印迹成像系统、-80℃ 超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific 公司);水平凝胶电泳装置、电泳槽、电泳仪 (Bio-Rad 公司);凝胶扫描成像系统 (北京天根生化科技有限公司);超纯水仪 (Millipore 公司);超净工作台 (苏州净化设备有限公司);水平摇床 (上海智城分析仪器制造有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 肝 LCMT1 敲除小鼠的构建策略

LCMT1 基因位于小鼠 7 号染色体,有 11 个外显子,在 2 号和 3 号外显子两端插入 Loxp 位点 (图 1A)。根据 CRISPR/Cas9 技术原理,用显微注射法将 sgRNA、Cas9 蛋白和打靶载体注射到小鼠受精卵。经胚胎移植,获得阳性 F0 代小鼠。由阳性 F0 代小鼠与野生型小鼠交配得到 F1 代 (*LCMT1*^{fllox/+}) 杂合子小鼠。

1.2.2 肝 LCMT1 敲除小鼠的繁殖流程

将引进的 *LCMT1*^{fllox/+} 小鼠与 Alb-Cre^{+/+} 小鼠进行交配,筛选出子代基因型为 *LCMT1*^{fllox/+}/Alb-Cre^{+/-} 的小鼠进行自交,最终获得子代基因型为 *LCMT1*^{fllox/fllox}/Alb-Cre 小鼠 (KO 小鼠) 和 Alb-Cre^{-/-} 小鼠 (WT 小鼠) (图 1B)。

1.2.3 肝 LCMT1 敲除小鼠的基因型鉴定

对 4 周龄小鼠编号,剪下约 1 cm 鼠尾,置于 EP 管内,在冰上剪碎小鼠尾巴,加入 180 μ L 的 Buffer GL、20 μ L 的 Proteinase K 和 10 μ L 的 RNase A,混匀

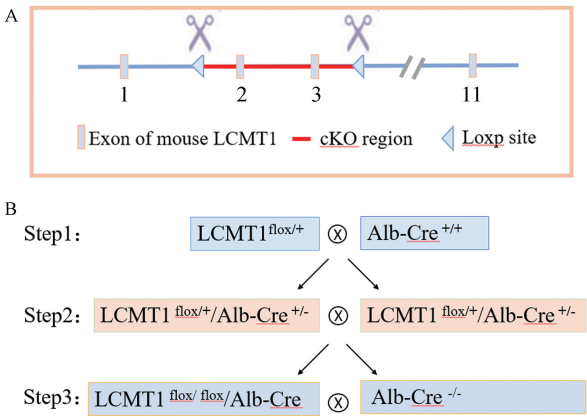


图 1 LCMT1 敲除小鼠的构建策略与流程图
Figure 1 strategy and flow chart of LCMT1 knockout mouse

后于 56℃ 水浴锅消化过夜提取 DNA。取 1 μL DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳。电泳完成后在凝胶扫描成像系统显影,根据对应片段长度进行基因型鉴定。Loxp 基因的上游引物:5'-GTGCAGGCATCAGAGAGACAAGC-3',下游引物:5'-GACAAGGTCTCACTTCATATCCTGG-3'; Cre 基因上游引物:5'-GAACGCACTGATTTTCGACCA-3',下游引物:5'-GCTAACCAGCGTTTTTCGTTTC-3'。

1.2.4 观察小鼠的基本情况和繁育能力

观察两组小鼠的饮食、饮水、活动、生长发育状态和繁殖能力等。

1.2.5 小鼠肝 LCMT1 基因 mRNA 水平检测

(1)总 RNA 提取:取 8 周龄小鼠新鲜肝,置于 EP 管中,加入 150 μL TRIzol,用匀浆器研磨使组织充分溶解,再加入 850 μL TRIzol 溶液,经酚/氯仿法提取总 RNA,使用 Bio Spec-nano 分光光度计测定 RNA 浓度。

(2)RNA 逆转录:利用 TaKaRa 公司的逆转录试剂盒逆转录得到 cDNA。

(3)实时定量 PCR 体系:反应体系总共 20 μL; ddH₂O 3 μL, SYBR Premix (2×) 10 μL, 前后引物各 1 μL, cDNA 5 μL。PCR 仪扩增条件:95℃ 预变性 1 min, 95℃ 变性 20 s, 60℃ 退火延伸 1 min, 40 个循环。内参 β-actin 上游引物:5'-GTGACGTTGACATC CGTAAAGA-3', 下游引物:5'-GCCGACTCATCGTA

CTCC-3'。目的基因 LCMT1 上游引物:5'-AGAAGGAACGGCTGCTGTTGAATG-3', 下游引物:5'-CTGCCCCGAGGTAGCCCCACTG-3'。

1.2.6 Western Blot

(1)组织总蛋白提取:随机选取 LCMT1-KO 小鼠和 WT 小鼠各 3 只,使用 RIPA 裂解液提取小鼠肝、大脑、心和肾组织总蛋白,利用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。

(2)SDS-PAGE 电泳:采用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳 2 h, 转膜 1.5 h, 37℃ 摇床封闭 1 h, 4℃ 过夜孵育 LCMT1 一抗 (1:1000), 次日用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入山羊抗兔 IgG (1:4000), 37℃ 孵育 2 h。TBST 洗 3 次, 每次 10 min。

(3)化学发光显影:化学发光剂 A 液和 B 液按 1:1 配置, 用枪头向 PVDF 膜加适量发光液, 并小心涂抹均匀, 用 iBright 蛋白免疫印迹成像系统显影。

1.2.7 肝苏木精-伊红染色

小鼠肝置于 4% 多聚甲醛组织固定液中, 石蜡包埋, 切片, 苏木精-伊红染色, 观察肝形态学。

1.2.8 LCMT1 sgRNA 脱靶分析

登录 Cas-OFFinder 网站 (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>), 将 sgRNA 序列录入, 以小于等于 3 个碱基错配作为判断标准, 脱靶信息如表 1 所示, 其中红色代表靶序列与 sgRNA 系列不同的碱基。根据脱靶位点的 DNA 序列设计 PCR 引物, 对 LCMT1-KO 小鼠鼠尾 DNA 进行扩增, 琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收纯化目的片段, 测序检测脱靶情况。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析, 采用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) Graphpad Prism 8 软件绘图。两组数据比较采用独立样本 *t* 检验, 以双侧 *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肝 LCMT1 敲除小鼠基因型鉴定

小鼠交配产生子代的基因型鉴定结果见图 2。使用 Loxp 引物和 Cre 引物对小鼠的基因型进行鉴定, 若 DNA 中存在 LCMT1^{flox/flox}, 则能扩增出 234 bp

表 1 脱靶位点信息

Table 1 Off-target information

sgRNA 序列 sgRNA sequence	脱靶位点 Off-target site	脱靶序列 Off-target sequence
GTCAGCCTTGTTACTTAGTGTGG	AG3	GGCACCTTTCTTACTTAGTGCAG
AGTTAGTCTAGCCTACTTGCTGG	AG7	TGAGAGTCTAGCCTACTTGCAAG
TGCTACCACACTAAGTAACAAGG	BG2	TGATACCTCATTAAAGTAACACAG
AGCAAGTAGGCTAGACTAACTGG	BG7	AGCCAGCAGGCTAGACTAACTGG

的片段,否则只有 172 bp 的片段;若有 Cre 基因,则能扩增出 204 bp 的片段,反之则无法扩增出条带。如图 2A 所示 1、2、3、5、6、8 均为带有 234 bp 的 $LCMT1^{lox/lox}$ 基因目的条带;如图 2B 所示 2、3、5、6 均为带有 204 bp 的 Cre 基因目的条带。其中 2、3、5、6 为 LCMT1-KO 小鼠,1、4、7、8 为 WT 小鼠,9、10、11 为空白对照。

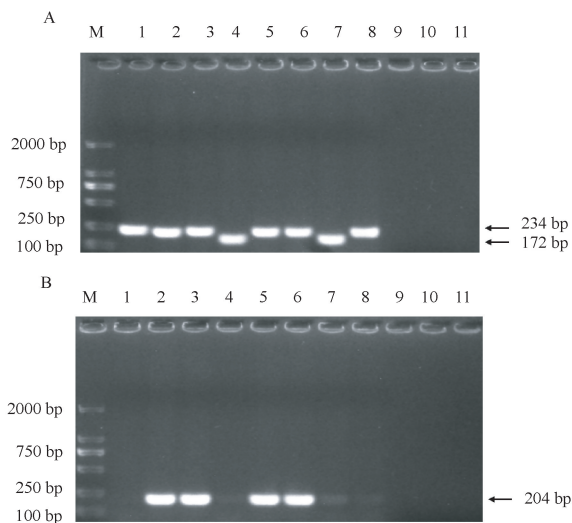


图 2 小鼠基因型鉴定

Figure 2 Mouse genotype identification

2.2 小鼠的一般情况

8 周龄的 WT 小鼠和 KO 小鼠每日饮水、饮食和体重无明显差异。两组小鼠生长发育良好,毛发柔顺有光泽(见图 3)。

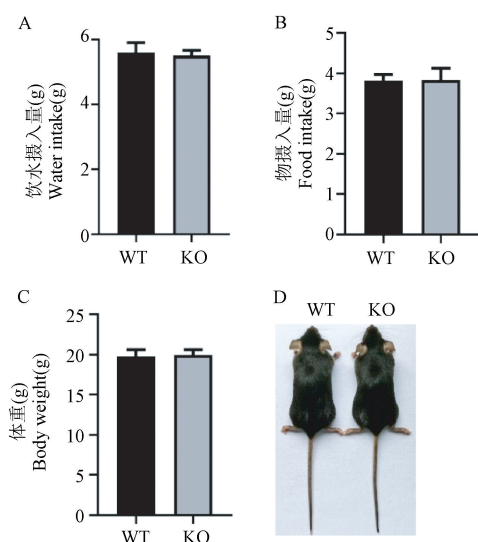


图 3 小鼠的一般情况

Figure 3 General situation of mouse

2.3 小鼠的繁育情况

LCMT1-KO 母鼠每胎产 5 ~ 9 只幼鼠,成活率 > 90%,其中 LCMT1-KO 小鼠与 WT 小鼠的雌雄比例如图 4 所示,LCMT1-KO 小鼠与 WT 小鼠繁殖情况无明显差异。

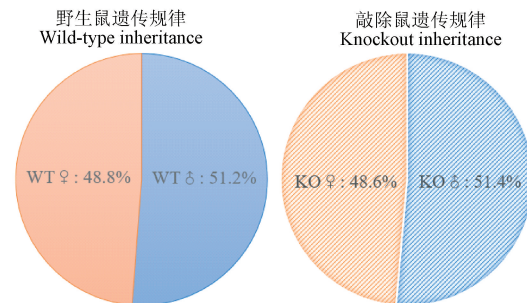
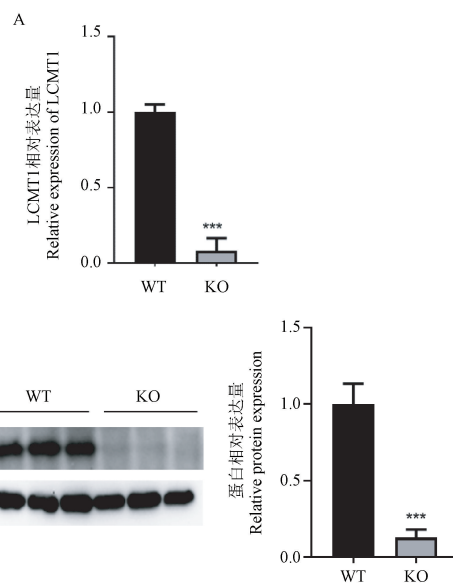


图 4 小鼠的繁殖规律

Figure 4 Reproduction law of mouse

2.4 小鼠肝 LCMT1 的 mRNA 和蛋白水平

实时定量 PCR 结果显示 LCMT1-KO 小鼠与 WT 小鼠相比肝中 LCMT1 mRNA 水平显著降低,具有统计学差异($P < 0.001$) (见图 5A)。Western Blot 结果显示,与 WT 小鼠相比,LCMT1-KO 小鼠肝 LCMT1 蛋白表达显著降低($P < 0.01$) (见图 5B)。



注:与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。

图 5 肝 LCMT1 基因表达和蛋白表达

Note. Compared with the control group, *** $P < 0.001$.

Figure 5 Liver LCMT1 gene expression and liver LCMT1 protein expression

2.5 小鼠肝组织形态学改变

两组小鼠肝质地柔软、边缘锐利、表面光滑无结节,呈棕红色(见图 6A)。HE 染色结果显示两组小鼠

肝小叶以中央静脉(CLV)为中心,呈放射性排列整齐,肝细胞核呈紫蓝色,细胞质着色均匀呈红色。未发现脂肪滴异常积累和炎细胞浸润(见图 6B)。

2.6 小鼠肝外组织 LCMT1 的蛋白水平

Western Blot 检测小鼠 LCMT1 在肝外组织的表达,两组小鼠 LCMT1 的表达在心脏、大脑和肾组织

中没有显著差异(见图 7)。

2.7 LCMT1 敲除小鼠脱靶位点分析

LCMT1-KO 小鼠 PCR 产物的测序峰图如图 8 所示,在可能脱靶的位点处未发现碱基突变、移码、套峰、少峰和乱峰等现象,因此 LCMT1-KO 小鼠 sgRNA 未发生脱靶。

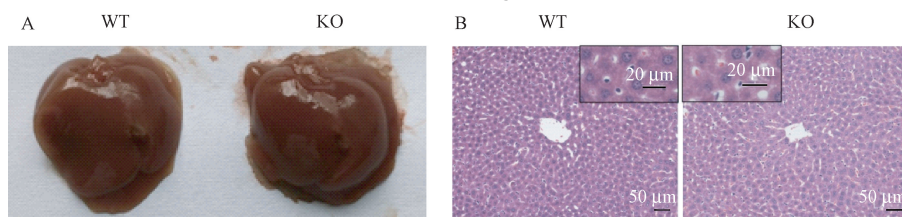


图 6 小鼠肝组织及 HE 染色

Figure 6 Liver of mouse and HE staining

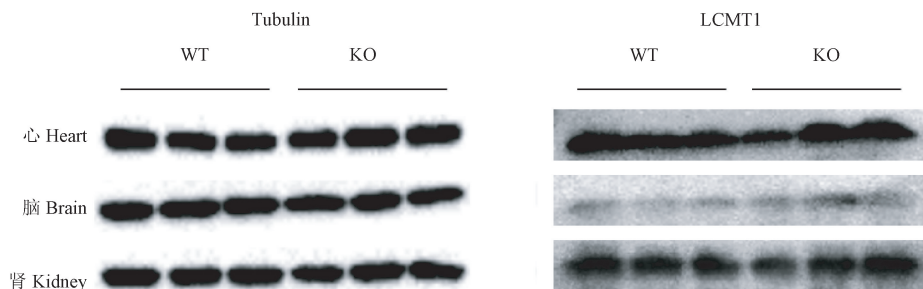
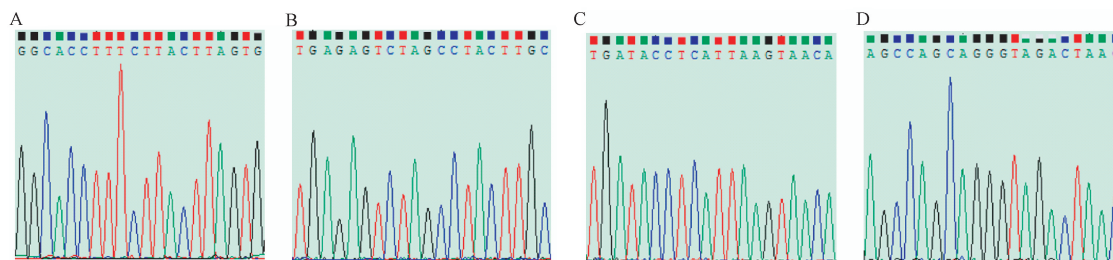


图 7 肝外组织 LCMT1 蛋白表达

Figure 7 LCMT1 protein expression in extrahepatic tissue



注:A:AG3 位点;B:AG7 位点;C:BG2 位点;D:BG7 位点。

图 8 PCR 产物的测序峰图

Note. A. AG3 site. B. AG7 site. C. BG2 site. D. BG7 site.

Figure 8 Sequencing peak map of PCR products

3 讨论

LCMT1 催化 PP2Ac 甲基化,调节 PP2A 的活性和生物学功能^[17]。PP2A 在真核生物中广泛表达,通过调节关键蛋白的去磷酸化,参与细胞代谢、细胞分化和细胞周期等生理活动,已有大量报道显示 PP2A 在肿瘤、阿尔兹海默病和糖尿病等多种疾病的病理进程中发挥关键性作用^[18]。LCMT1 作为细胞内唯一催化 PP2Ac 甲基化的酶,其对机体的作用尚未知。为探讨 LCMT1 在体内的功能,既往研究尝

试构建全身 LCMT1 敲除小鼠,但结果显示 LCMT1 敲除纯合鼠子代存活率下降,在胚胎期 12.5 d 时 LCMT1 蛋白几乎全部失活,胎儿肝发育和造血功能受损,基因敲除鼠通常在胚胎期的 14.5 ~ 16.5 d 死亡^[13],无法满足后续功能研究需求,同时也提示 LCMT1 对小鼠胚胎早期发育具有不可或缺的作用,对 LCMT1 功能的体内研究需采取条件敲除的策略。

既往研究结果显示,PP2A 在肝糖代谢发挥重要作用。肝特异性敲除 PP2Ac 小鼠对外周葡萄糖的清除能力增强,促进糖原沉积,抑制糖异生,增加

小鼠糖代谢稳态^[19]。课题组前期研究发现肝细胞 MIHA 中 siRNA LCMT1, PP2Ac 去甲基化水平和糖原合成增加,糖异生基因的表达水平降低^[20],提示 LCMT1 可能通过调控 PP2A 在肝糖代谢中发挥重要作用。为进一步探讨肝 LCMT1 在体内的功能,本研究采用 CRISPR/Cas9 方法构建肝特异 LCMT1 敲除小鼠。由于 LCMT1 的敲除作用是通过 Alb-cre 对两个同向 LoxP 位点的特异性识别剪切而实现,而肝特异 Alb-cre 小鼠的 Alb-cre 活性仅局限于肝,在胚胎发育早期并未对全身的 LCMT1 位点发生剪切,因而小鼠胚胎得以发育存活,从而实现肝特异性敲除 LCMT1 小鼠的成功构建。

本研究构建成功的基因敲除鼠,经基因测序未发现 sgRNA 脱靶,采用实时定量 PCR 和 Western Blot 检测小鼠各脏器 LCMT1 的表达,显示肝 LCMT1 水平显著降低,而在肝外组织中的表达没有显著变化。结果表明肝 LCMT1 特异性基因敲除小鼠表型符合预期。在目前完成的 8 周饲养时长中,该基因敲除小鼠生长发育良好,毛发柔顺有光泽,繁殖子代符合孟德尔遗传定律,子代存活率高。解剖见肝发育良好表面无结节,HE 染色显示小鼠肝细胞排列整齐,未见细胞变性和坏死等病变,未见与野生型鼠存在显著性差异。后续研究将探讨在高糖高脂饮食、衰老等代谢压力下,肝 LCMT1 基因特异敲除对小鼠糖脂代谢的影响,以进一步明确 LCMT1 在肝的功能。

参 考 文 献 (References)

- [1] De Baere I, Derua R, Janssens V, et al. Purification of porcine brain protein phosphatase 2A leucine carboxyl methyltransferase and cloning of the human homologue [J]. *Biochemistry*, 1999, 38(50): 16539–16547.
- [2] Creighton MT, Kolton A, Kataya ARA, et al. Methylation of protein phosphatase 2A-Influence of regulators and environmental stress factors [J]. *Plant Cell Environ*, 2017, 40(10): 2347–2358.
- [3] Wu Z, He Q, Zeng B, et al. Juvenile hormone acts through FoxO to promote Cdc2 and Orc5 transcription for polyploidy-dependent vitellogenesis [J]. *Development*, 2020, 147(18): dev188813.
- [4] Lee J, Stock J. Protein phosphatase 2A catalytic subunit is methyl-esterified at its carboxyl terminus by a novel methyltransferase [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(26): 19192–19195.
- [5] MacKay KB, Tu Y, Young SG, et al. Circumventing embryonic lethality with Lcmt1 deficiency: generation of hypomorphic Lcmt1 mice with reduced protein phosphatase 2A methyltransferase expression and defects in insulin signaling [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): 65967.
- [6] Yabe R, Tsuji S, Mochida S, et al. A stable association with PME-1 may be dispensable for PP2A demethylation: Implications for the detection of PP2A methylation and immunoprecipitation [J]. *FEBS Open Bio*, 2018, 8(9): 1486–1496.
- [7] Reynhout S, Janssens V. Physiologic functions of PP2A: Lessons from genetically modified mice [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019, 1866(1): 31–50.
- [8] Nasa I, Kettenbach AN. Effects of carboxyl-terminal methylation on holoenzyme function of the PP2A subfamily [J]. *Biochem Soc Trans*, 2020, 48(5): 2015–2027.
- [9] Wu CG, Zheng A, Jiang L, et al. Methylation-regulated decommissioning of multimeric PP2A complexes [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 2272.
- [10] Sents W, Ivanova E, Lambrecht C, et al. The biogenesis of active protein phosphatase2A holoenzymes: a tightly regulated process creating phosphatase specificity [J]. *FEBS J*, 2013, 280(2): 644–661.
- [11] Xia X, Gholkar A, Senese S, et al. A LCMT1-PME-1 methylation equilibrium controls mitotic spindle size [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(12): 1938–1947.
- [12] Lee JA, Pallas DC. Leucine carboxyl methyltransferase-1 is necessary for normal progression through mitosis in mammalian cells [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(42): 30974.
- [13] Lee JA, Wang Z, Sambo D, et al. Global loss of leucine carboxyl methyltransferase-1 causes severe defects in fetal liver hematopoiesis [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(25): 9636–9650.
- [14] 秦富. PP2A 甲基化调控在细胞氧化应激中的作用研究 [D]. 南宁: 广西医科大学; 2016.
- [15] 秦 F. The role of PP2A methylation regulation in cellular oxidative stress [D]. Nanning: Guangxi Medical University; 2016.
- [16] Wang X, Tang S, Qin F, et al. Proteomics and phosphoproteomics study of LCMT1 overexpression and oxidative stress: overexpression of LCMT1 arrests H₂O₂-induced loss of cells viability [J]. *Redox Rep*, 2019, 24(1): 1–9.
- [17] Tang S, Qin F, Wang X, et al. H₂O₂ induces PP2A demethylation to downregulate mTORC1 signaling in HEK293 cells: H₂O₂ demethylates PP2A to downregulate mTORC1 [J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(9): 1182–1191.
- [18] Wu CG, Zheng A, Jiang L, et al. Methylation-regulated decommissioning of multimeric PP2A complexes [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 2272.
- [19] Sutter BM, Wu X, Laxman S, et al. Methionine inhibits autophagy and promotes growth by inducing the SAM-responsive methylation of PP2A [J]. *Cell*, 2013, 154(2): 403–415.
- [20] Xian L, Hou S, Huang Z, et al. Liver specific deletion of Ppp2cα enhances glucose metabolism and insulin sensitivity [J]. *Aging*, 2015, 7(4): 223–232.
- [21] 梁紫微. PP2Ac 甲基化在衰老及肝脏糖代谢调控中作用的研究 [D]. 南宁: 广西医科大学; 2019.
- [22] Liang ZW. The role of PP2Ac methylation in aging and the regulation of liver glucose metabolism [D]. Nanning: Guangxi Medical University; 2019.

[收稿日期] 2021-08-09