

蛋白酶体活性测定与组分分析方法的建立**

陈晓勤¹, 潘小芬², 谢 军²

Methods for proteasome activity measurement and component analysis

Chen Xiao-qin¹, Pan Xiao-fen², Xie Jun²

Abstract

BACKGROUND: 26S proteasome plays an important role in maintaining normal cell cycle, proliferation, and survival. However, there is not a precise method can test *in vivo* proteasome activity and composition.

OBJECTIVE: To establish methods for analyzing proteasome activity and composition in cancer tissues.

METHODS: Three specific fluorogenic peptide substrates: Suc-LLVY-AMC, Z-ARR-AMC and Z-LLE-AMC were used to monitor chymotrypsin-like, trypsin-like and peptidyl-glutamyl peptide-hydrolyzing-like (PGPH-like) proteolytic activity, and a proteasome-specific affinity probe AdaK(Bio)Ahx3L3VS was employed to assay the $\beta 1/\beta 1i$, $\beta 2/\beta 2i$, and $\beta 5/\beta 5i$ subunits of proteasome.

RESULTS AND CONCLUSION: We investigated the catalytic activity and the expression of the component of proteasome, and the effects of proteasome inhibitor PS341 and PSI on the activity and composition of proteasome in erythroleukemia K562 cells. Our results showed that the expression of the $\beta 2$ and $\beta 5$ subunits of proteasome was high, while PS341 and PSI inhibited $\beta 5/\beta 5i$ subunits, and the chymotrypsin-like activity of proteasome in K562 cells. Methods for analyzing proteasome activity and composition was established and supplied experimental methods for identifying *in vitro* activity of proteasome inhibitors.

Chen XQ, Pan XF, Xie J. Methods for proteasome activity measurement and component analysis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(50): 9374-9377. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 26S 蛋白酶体对维持细胞周期、增殖、生存等细胞生物学行为的正常具有极其重要的作用,但目前对细胞体内蛋白酶体活性的测定及组分分析缺少明确的方法。

目的: 建立蛋白酶体活性与组分的分析方法,用以检测肿瘤组织、细胞蛋白酶体的活性状态与组分表达情况。

方法: 应用 3 种特异性的荧光多肽底物 Suc-LLVY-AMC、Z-ARR-AMC 和 Z-LLE-AMC 建立对蛋白酶体的糜蛋白酶样、胰蛋白酶样和肽基谷氨酰胺水解酶样蛋白酶活性的测定方法。并基于蛋白酶体特异亲和性探针 AdaK(Bio)Ahx3L3VS 建立对蛋白酶体各亚基(包括 $\beta 1/\beta 1i$ 、 $\beta 2/\beta 2i$ 、 $\beta 5/\beta 5i$)组分分析的方法。

结果与结论: 利用特异性的荧光多肽底物检测蛋白酶活性及蛋白酶体特异亲和性探针检测蛋白酶体亚基组分分析的方法发现在 K562 红白血病细胞, $\beta 2$ 、 $\beta 5$ 亚基表达较高,而蛋白酶体抑制剂 PS341 及 PSI 对 K562 细胞的蛋白酶体活性与组分的抑制作用主要是靶定在 $\beta 5$ 和 $\beta 5i$ 亚基,抑制其糜蛋白酶样活性。实验建立了对以上 3 种蛋白酶体活性测定及组分分析的方法,为蛋白酶体抑制剂的体外活性鉴定提供了实验方法。

关键词: 蛋白酶体; 活性; 组分; 蛋白酶体抑制剂; 蛋白酶体活性; 检测方法

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.50.016

陈晓勤,潘小芬,谢军. 蛋白酶体活性测定与组分分析方法的建立[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(50):9374-9377. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

¹Department of Hematology, Cancer Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; ²Guangzhou Institute of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510663, Guangdong Province, China

Chen Xiao-qin★, Master, Department of Hematology, Cancer Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China
xiaoqinchen2005@hotmail.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 06107503*

Received: 2010-05-04
Accepted: 2010-07-06

¹中山大学肿瘤防治中心,血液肿瘤科,广东省广州市 510080; ²中国科学院广州生物医药与健康研究院,广东省广州市 510663

陈晓勤★,女,1970年生,广西壮族自治区南宁市人,1999年湖南医科大学毕业,硕士,主要从事血液肿瘤研究。
xiaoqinchen2005@hotmail.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225
(2010)50-09374-04

收稿日期:2010-05-04
修回日期:2010-07-06
(20100321002/ZW·Z)

0 引言

26S蛋白酶体是普遍存在于所有真核细胞的细胞核和细胞质的多蛋白复合物,在20S核心颗粒中主要包含有3个活性位点 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、和 $\beta 5$,对应负责肽基谷氨酰胺水解酶样(peptidyl-glutamyl peptide-hydrolyzing-like, PGPH-L),胰蛋白酶样(trypsin-like, T-L),糜蛋白酶样(chymotrypsin-like, CT-L)的蛋白酶体活性,对维持细胞周期、增殖、生存等细胞生物学行为的正常具有极其重要的作用^[1-2]。然而,对细胞体内蛋白酶体的3种活性的测定方法仍不十分确定。

研究发现,上述3种蛋白酶的特异荧光多

肽底物分别是Suc-LLVY-AMC、Z-ARR-AMC和Z-LLE-AMC,这3种特异底物具有细胞通透性,当它们进入细胞后,3种蛋白酶对底物的特异氨基链进行识别,并发挥酶活性对其进行切割,被切割后的底物释放出游离的发光基团,可以通过荧光进行监测。细胞内的酶活性与荧光值成正比的关系,因此可通过这种方法对细胞体内蛋白酶体的3种活性进行测定^[4-7]。当蛋白酶体受到干扰素类的刺激时,就会应激变成免疫蛋白酶体,使具有活性的 β 亚基表达成另一种形式 $\beta 1i$ 、 $\beta 2i$ 和 $\beta 5i$,同时也表现出不同的底物特异性^[1]。AdaK(Bio)Ahx3L3VS是蛋白酶体的特异亲和性标记探针^[8-9],它可共价修饰和标记蛋白酶体有催化活性的 β 亚基(包括组成型的 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ 和免疫型的 $\beta 1i$ 、 $\beta 2i$ 、 $\beta 5i$),因此,

可利用抗生素蛋白链霉素结合检测体系对各亚基的组分进行分析。本实验旨在建立蛋白酶体活性测定与组分分析的方法, 利用这个平台对潜在的新型蛋白酶体抑制剂进行筛选和评价, 为蛋白酶体抑制剂的鉴定奠定基础。

1 材料和方法

设计: 方法学体外实验。

时间及地点: 于2009年在中山大学肿瘤防治中心完成。

材料:

细胞株: 人慢性粒细胞白血病K562细胞株和小鼠淋巴瘤EL4细胞株为本实验室保种。用内含10%胎牛血清及100 kU/L青霉素, 100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养基培养、传代, 取对数生长期细胞用于实验。

主要试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
Ps-341	美国强生公司
PSI	日本 Peptide institute
1640 培养基, 胎牛血清	Hyclone 公司
Suc-LLVY-AMC, Z-ARR-AMC, Z-LLE-AMC, AdaK(Bio)Ahx3L3VS	Calbiochem 公司
glass beads	sigma 公司
Chemiluminescent nucleic acid detection module 试剂盒	PIERCE 公司
酶标仪	BIO-TEK

实验方法:

活性测定: 在96孔板中接种K562细胞, 按 1.1×10^5 的浓度每孔接入90 μ L细胞, 接种量为 $(8 \sim 10) \times 10^3$ 个细胞/孔, 设4个复孔, 把PS-341和PSI分别配成100 nmol/L和400 nmol/L, 按10 μ L/孔加入, 空白对照加入10 μ L培养基, 加入不同浓度的药物或不加药处理, 37 $^{\circ}$ C培养24 h, 加入4 mmol/L的荧光底物, 1 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C培养2 h后用酶标仪监测荧光活性(激发光波长380 nm, 发射光波长460 nm), 对3种蛋白酶体活性进行测定。

蛋白提取和定量: 参照Altun等^[11]的方法, 收集K562细胞, 用预冷的PBS洗1次, 进行细胞计数, 按每 10^6 个细胞加入40 μ L glass beads和80 μ L匀浆裂解液(pH 7.4, 50 mmol/L Tris base, 5 mmol/L MgCl₂, 250 mmol/L sucrose, 现配的 2 mmol/L ATP 和1 mmol/L DTT)的比例, 最后根据细胞总数加入适当体积的裂解液, 充分振荡, 室温裂解30 min。4 $^{\circ}$ C, 13 000 r/min离心10 min, 上清液为蛋白提取物, 沉淀中包含了glass beads, 细胞膜, 核及碎片。收集上清到新EP管中, 按照Bradford assay法^[10]进行蛋白定量, 分装保存于-80 $^{\circ}$ C冰箱中待测。

蛋白结合, 电泳, 转膜: K562和EL4细胞培养于10 cm培养皿中, 培养浓度为 2×10^8 L⁻¹, PS341和PSI的作用终浓度分别为10 nmol/L和40 nmol/L, 加入药物后培养24 h, 收集细胞, 按上述方法进行蛋白提取, 与特异探针结合, 变性, 电泳, 转膜, 然后用Chemiluminescent nucleic acid detection module试剂盒进行检测, 曝光显影后扫描结果。把保存于-80 $^{\circ}$ C冰箱中的蛋白取出, 进行蛋白结合, 电泳, 转膜。并同时取各样品相同量的蛋白进行Western blot分析细胞骨架蛋白 β -actin的表达, 以确定上样量的一致性。按蛋白定量结果各样品取60 μ g的蛋白, 加入生物素标记的活性探针(终浓度为10 μ mol/L), 充分混匀后在37 $^{\circ}$ C孵育2 h。在结合反应后的混合液中按比例加入5 \times SDS 上样缓冲液, 95 $^{\circ}$ C变性5 min, 配制浓度为12.5%的SDS-PAGE凝胶, 把变性好的样品上样电泳, 当溴酚蓝跑至胶的底部时停止电泳, 将蛋白转移到PVDF膜上。

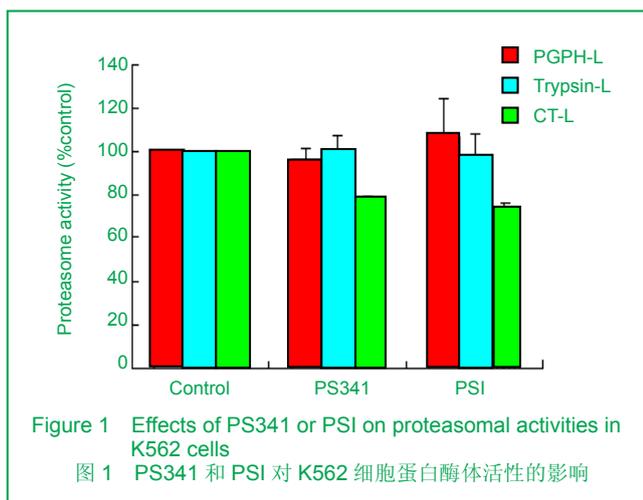
生物素-链霉素亲和反应: 根据Chemiluminescent nucleic acid detection module试剂盒的说明方法进行。在37 $^{\circ}$ C水浴锅中加热 stocking buffer 和4 \times washing buffer, 使所有成分完全溶解; 把PVDF膜放入到装有20 mL stocking buffer的小盒子中在摇床上慢摇15 min进行封闭; 加入66.7 μ L stabilized streptavidin-horseradish peroxidase conjugate 到 stocking buffer中, 慢摇30 min; 在120 mL ddH₂O中加入40 mL的4 \times washing buffer 得到1 \times washing buffer, 把膜转移到新的小盒子中, 加入20 mL的1 \times washing buffer, 5 min/次, 共洗5次; 倒掉washing buffer, 在盒子中加入15 mL的 substrate equilibration buffer 慢摇5 min; 配底物工作液, 把3 mL luminal/enhancer solution 加入到3 mL stable peroxide solution中混匀; 将膜取出, 尽量甩干膜表面的液体, 平铺于保鲜膜上, 加底物工作液覆盖膜表面, 静置孵育5 min; 用保鲜膜把PVDF膜包好, 保持膜表面平整, 暗室显影曝光。

主要观察指标: 用特异性的荧光多肽底物检测蛋白酶活性及蛋白酶体特异亲和性探针检测蛋白酶体亚基组分。

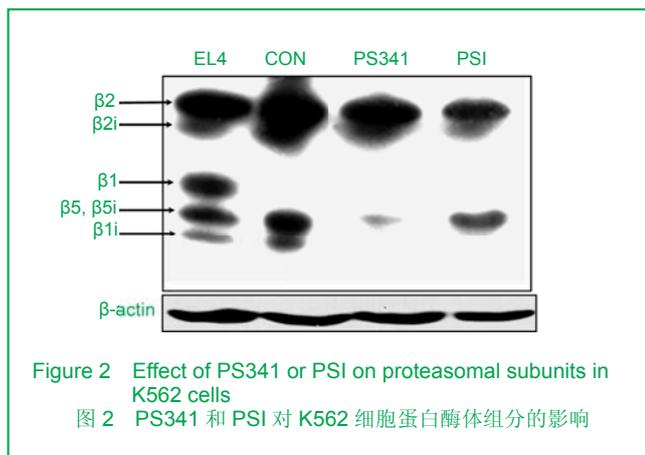
设计、实施、评估者: 设计、实施、评估为全体作者。

2 结果

2.1 蛋白酶体活性的测定 如图1所示, 结果分析显示蛋白酶体抑制剂PS341与PSI对K562细胞蛋白酶体的作用效果相当, 对胰蛋白酶样和肽基谷氨酰胺水解酶样蛋白酶活性基本上没有抑制作用, 而对糜蛋白酶样活性则都有约25%的抑制作用。



2.2 蛋白酶体组分的分析 EL4细胞表达所有的活性蛋白酶体β亚基(包括组成型和免疫型),可作为标记性对照。结果显示,在K562细胞中β2亚基表达最高,β5次之,β1亚基表达较低。蛋白酶体抑制剂PS341对β5/β5i亚基有明显的抑制作用,而对β2/β2i亚基的影响比较弱,与对糜蛋白酶样活性的抑制作用结果相符合。PS1对β1i、β5i亚基的抑制作用较明显,而对β5亚基的抑制作用较弱。见图2。



3 讨论

蛋白酶体是在真核生物和古菌中普遍存在的,在一些原核生物中也存在的一种巨型蛋白质复合物。在真核生物中,蛋白酶体位于细胞核和细胞质中。蛋白酶体的主要作用是降解细胞不需要的或受到损伤的蛋白质,这一作用是通过打断肽键的化学反应来实现。蛋白酶体是细胞用来调控特定蛋白质和除去错误折叠蛋白质的主要场所。经过蛋白酶体的降解,蛋白质被切割为七八个氨基酸的短肽;这些肽段可以被进一步降解为单个氨基酸分子,然后被用于合成新的蛋白质。需要被降解的蛋白质会先被一个称为泛素的小型蛋白质所标记,这一标记反应是被泛素连接酶所催化。蛋白酶体的组分通常根

据它们的斯韦德贝里沉降系数(以“S”来标记)来命名。

最普遍的蛋白酶体的形式是26S蛋白酶体,其相对分子质量约为 2×10^6 ,包含有一个20S核心颗粒和两个19S调节颗粒。所有的20S颗粒都由4个堆积的七元环所组成,这些环结构则是由两种不同的亚基构成:α亚基为结构性蛋白,而β亚基则发挥主要的催化作用。外部的两个环,每个环都含有七个α亚基,一方面作为调节颗粒的结合部,另一方面发挥“门”的作用,阻止蛋白质不受调控地进入核心颗粒的内部。内部的两个环,每个环都含有七个β亚基,且包含蛋白酶活性位点,用于蛋白质水解反应。在哺乳动物中,β1、β2、和β5亚基具有催化作用,有着共同的催化机制,但具有不同的底物特异性,也对应着20S核心颗粒所具有3种主要的蛋白酶活性,分别是肽基谷氨酰胺水解酶样活性,胰蛋白酶样活性,糜蛋白酶样活性。这3种活性负责了体内大部分的蛋白降解,包括关键的细胞周期蛋白、肿瘤抑制蛋白、转录因子和受损的胞内蛋白,是维持细胞动态平衡所必需的。在暴露于前炎症信号时,细胞应激反应会促使造血细胞表达另一些形式的β亚基,即β1i、β2i、和β5i。由这些替代亚基所组装成的蛋白酶体又被称为“免疫蛋白酶体”,相对于正常形式的蛋白酶体,其底物特异性发生了改变。

实验利用蛋白酶体活性位点特异的荧光多肽底物Suc-LLVY-AMC、Z-ARR-AMC和Z-LLE-AMC以及特异亲和性标记探针AdaK(Bio)Ahx3L3VS建立了对蛋白酶体活性与组分的检测方法。应用这两个方法测定了蛋白酶体抑制剂PS341及PSI在K562细胞中对蛋白酶体活性及组分的影响作用。通过对结果的分析发现,无论是体内的活性测定还是体外的组分分析,PS341和PSI主要作用于β5和β5i催化亚基,抑制其糜蛋白酶样水解活性。此结果与以往文献结果一致^[9],说明本实验建立的方法是可靠的。

同时实验也发现PS341和PSI对β1i亚基的抑制作用也是很明显,然而在体内对肽基谷氨酰胺水解酶样活性基本上没有抑制作用,对于这一矛盾,推测是因为荧光多肽底物Z-LLE-AMC是特异的被β1亚基所识别,而免疫应激反应后产生的β1i亚基其底物特异性已经发生了改变,并不能通过对荧光的监测来确定其活性的变化^[9]。而且细胞体内的蛋白酶体活性测定与体外的组分分析方法是两个不同的系统,只有通过这两个方法的互相验证,才能排除其他一些物质的干扰,更可靠、稳定地鉴定出对蛋白酶体有真正抑制作用的药物。对一个潜在蛋白酶体抑制剂的鉴定是需要多种方法的结合评价,经分析认为通过细胞体内的蛋白酶体活性测定与体外的组分分析、基于绿色荧光蛋白的蛋白酶体抑制剂筛选平台等综合方法^[9-12],可以明确化合物是否具有蛋白酶体抑制活性。

综上所述, 本实验利用蛋白酶体活性位点特异的荧光多肽底物 Suc-LLVY-AMC、Z-ARR-AMC 和 Z-LLE-AMC 以及特异亲和性标记探针 AdaK(Bio)Ahx3L3VS 建立了对蛋白酶体活性与组分的检测方法, 为今后蛋白酶体组分、活性的检测和进一步研究奠定了基础。

4 参考文献

- [1] Kraus M, Rückrich T, Reich M, et al. Activity patterns of proteasome subunits reflect bortezomib sensitivity of hematologic malignancies and are variable in primary human leukemia cells. *Leukemia*. 2007;21(1):84-92.
- [2] Jan S, Richard DV. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol*. 2004; 55:555-590.
- [3] Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(5):349-360.
- [4] Yang H, Chen D, Cui QC, et al. Celestrol, a triterpene extracted from the Chinese "Thunder of God Vine," is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice. *Cancer Res*. 2006;66(9):4758-4765.
- [5] Nam S, Smith DM, Dou QP. Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2001;276(16):13322-13330.
- [6] Nam S, Smith DM, Dou QP. Tannic acid potently inhibits tumor cell proteasome activity, increases p27 and Bax expression, and induces G1 arrest and apoptosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10(10):1083-1088.
- [7] Chen D, Daniel KG, Chen MS, et al. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol*. 2005;69(10):1421-1432.
- [8] Berkers CR, Verdoes M, Lichtman E, et al. Activity probe for in vivo profiling of the specificity of proteasome inhibitor bortezomib. *Nat Methods*. 2005;2(5):357-362.
- [9] Kessler BM, Tortorella D, Altun M, et al. Extended peptide-based inhibitors efficiently target the proteasome and reveal overlapping specificities of the catalytic beta-subunits. *Chem Biol*. 2001;8(9):

- 913-929.
 - [10] Noble JE, Bailey MJ. Quantitation of Protein. *Methods Enzymol*. 2009;463:73-95.
 - [11] Altun M, Galardy PJ, Shringarpure R, et al. Effects of PS-341 on the activity and composition of proteasomes in multiple myeloma cells. *Cancer Res*. 2005;65(17):7896-7901.
 - [12] Fang HT, Hu M, Zhou GB. *Shengwu Gongcheng Xuebao*. 2009;25(3):452-456.
- 方海同, 胡政, 周光鹰. 一种基于绿色荧光蛋白的蛋白酶体抑制剂细胞筛选模型. *生物工程学报*, 2009, 25(3):452-456.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 课题受广东省自然科学基金重点项目(06107503)资助, 课题名称: 整合化学生物学的血液系统恶性肿瘤基因组解剖计划。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的意义: 蛋白酶体是体内降解内源性蛋白质的主要场所, 其在肿瘤中的表达特点目前研究不多, 而阐明肿瘤细胞中蛋白酶体组分、活性的表达情况不仅有助于了解肿瘤的发生机理, 还为临床是否应用蛋白酶体抑制剂提供依据。本文建立的对蛋白酶体活性与组分检测方法, 为蛋白酶体组分、活性的检测奠定了基础, 因而具有较大的意义。

设计或课题的偏倚与不足: 实验仅为方法学的研究, 未做进一步应用研究和证实。

提供临床借鉴的价值: 实验利用蛋白酶体活性位点特异的荧光多肽底物 Suc-LLVY-AMC、Z-ARR-AMC 和 Z-LLE-AMC 以及特异亲和性标记探针 AdaK(Bio)Ahx3L3VS 建立了对蛋白酶体活性与组分的检测方法, 为今后蛋白酶体组分、活性的检测和进一步研究应用提供依据。

组织构建中基因表达载体的构建与表达: 本刊中文部^①

- 1 携带低氧诱导因子1 α mu和入源化海肾绿色荧光蛋白双基因真核表达载体构建及其在HEK293A细胞中的表达
- 2 携RSKA/hIGF-1杂交基因重组质粒的构建及表达
- 3 重组pEGFP-N1-IGF-1质粒体内转染骨质疏松大鼠的可行性
- 4 新型骨形态发生蛋白2反转录病毒载体的构建及活性检测
- 5 构建携带重组人胰岛素基因慢病毒表达载体及其病毒包装
- 6 构建人热休克蛋白70基因重组腺病毒载体及鉴定
- 7 分子伴侣辅因子热休克蛋白70羧基末端相互作用蛋白真核表达载体 pDsRed2-N1(+)/CHIP构建及在COS-7细胞中的表达
- 8 真核表达载体pcDNA3-CTLA4lg的构建及体内表达
- 9 Wnt7b重组反转录病毒载体的构建及其在C3H10T1/2中的表达
- 10 变异链球菌表面蛋白SpaP P区真核表达质粒的构建及表达

- 1 携带低氧诱导因子1 α mu和入源化海肾绿色荧光蛋白双基因真核表达载体构建及其在HEK293A细胞中的表达

张 正 (辽宁医学院附属第一医院骨关节外科, 辽宁省锦州市 121001)

推荐理由: 低氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor 1 alpha, HIF-1 α)已经被证实可以激活低氧代谢和调控促血管新生基因的转录; 在转基因小鼠体内实验证实, 重组的HIF-1 α 可以促进皮肤形态功能正常的血管新生。由于HIF-1 α 诱导的新生血管不渗漏、无组织水肿、炎症反应小, 血管没有曲折和囊性血管形成, 使其成为最具有临床应用前景的基因之一。然而, 在常氧条件下, HIF-1 α 蛋白极易被降解和失活。

实验利用人源化海肾绿色荧光蛋白(human renilla reniformis green fluorescent protein, hrGFP)为报告基因, 成功构建了新型重组腺病毒突变型真核细胞表达载体 pAd-HIF1 α mu-IRES- hrGFP-1, 并且为了避免常氧条件下HIF1 α 基因迅速降解以及表达量低的情况发生, 通过PCR技术突变了HIF1 α 基因CDS区三个羟基化修饰位点, 使得HIF1 α 基因在正常氧条件下能够在HEK293A细胞内高效

且大量表达。实验为骨组织工程技术的改进和进步提供了一定的帮助, 在分子水平为骨缺损疾病促血管新生治疗开辟了新的途径。见2010年46期8594页。

- 2 携RSKA/hIGF-1杂交基因重组质粒的构建及表达

郑水长 (重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆市 400010)

推荐理由: 人胰岛素样生长因子1(human insulin-like growth factor-1, hIGF-1)可调节细胞组织的生长发育和再生, 加速损伤的骨骼肌修复、延缓骨骼肌萎缩, 且可以促进失神经骨骼肌的神经再支配。随着基因治疗技术的不断成熟, 发现基因的启动子和尾端可分别起到不同的作用, 基因疗法可以促进肌肉组织的生长、增强肌肉强度, 有望用于人类肌肉萎缩症等神经肌肉障碍疾病的治疗。

实验构建的真核表达质粒 PBS-RSKA/hIGF-1酶切及测序结果均准确无误, 符合要求。质粒转染进入细胞后经RT-PCR检测显示IGF-1 mRNA表达明显增强, Western blot结果证实转染IGF-1明显增多, 说明细胞内有IGF-1的表达。该质粒的成功构建, 为今后骨骼肌萎缩或其他骨骼肌疾病的基因治疗研究奠定了基础。见2010年46期8604页。