



吴昊,张久盘,宋雅萍,姜超,宋小雨,焦若普,杨东梅,马云,魏大为.牛PPP1R3基因家族的生物信息学分析及PPP1R3C基因的mRNA表达水平分析[J].中国农业大学学报,2025,30(03):13-23.

WU Hao, ZHANG Jiupan, SONG Yaping, JIANG Chao, SONG Xiaoyu, JIAO Ruopu, YANG Dongmei, MA Yun, WEI Dawei. The bioinformatics analysis of the PPP1R3 gene family in cattle and the analysis of mRNA expression levels of the PPP1R3C gene[J]. Journal of China Agricultural University, 2025, 30(03): 13-23.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.03.02

牛PPP1R3基因家族的生物信息学分析及PPP1R3C基因的mRNA表达水平分析

吴昊¹ 张久盘² 宋雅萍¹ 姜超¹ 宋小雨¹ 焦若普¹ 杨东梅¹
马云¹ 魏大为^{1*}

(1. 宁夏大学 动物科技学院/宁夏反刍动物分子细胞育种重点实验室, 银川 750021;
2. 宁夏农林科学院 动物科学研究所, 银川 750002)

摘要 为系统分析PPP1R3C所在基因家族于牛及其他物种间的进化水平、分子结构及功能特性,本研究利用生物信息学技术分析了PPP1R3C所属家族—PPP1R3基因家族基因特征,并采用RT-qPCR检测PPP1R3C基因的表达水平。结果表明:1)PPP1R3基因家族成员在等电点和分子量上存在显著差异。2)进化树和保守结构域分析表明,PPP1R3基因家族成员在进化过程中形成了不同的基序和结构域组合;共线性分析表明了PPP1R3基因家族成员在牛与小鼠、人类、绵羊及家猪染色体之间的位置变化规律。3)RT-qPCR检测结果显示,PPP1R3C基因在牛的脂肪和肺组织中具有显著的高表达,而在肌肉相关组织中的表达水平最低;随着牛脂肪细胞分化成熟,其表达水平逐步提升。综上,本研究探究了PPP1R3基因家族在牛及其他物种间的进化水平、分子结构及功能特性,揭示了PPP1R3C基因在脂肪代谢和能量平衡中的关键调控作用,为深入研究该基因家族在不同生理和病理状态下的具体机制提供了一定的理论基础。

关键词 PPP1R3C; PPP1R3基因家族; 表达分析; 生物信息学分析

中图分类号 S823 文章编号 1007-4333(2025)03-0013-11 文献标志码 A

The bioinformatics analysis of the PPP1R3 gene family in cattle and the analysis of mRNA expression levels of the PPP1R3C gene

WU Hao¹, ZHANG Jiupan², SONG Yaping¹, JIANG Chao¹, SONG Xiaoyu¹, JIAO Ruopu¹,
YANG Dongmei¹, MA Yun¹, WEI Dawei^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology/Ningxia Key Laboratory of Molecular and Cellular Breeding of Ruminants, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;
2. Institute of Animal Science, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, China)

Abstract To systematically analyze the evolutionary relationships, molecular structures, and functional characteristics of the PPP1R3C gene family across bovine and other species, this study employed bioinformatics approaches to investigate the genetic features of the PPP1R3 gene family, to which PPP1R3C

收稿日期: 2024-07-05

基金项目: 中央引导地方科技发展专项(2024FRD05052);国家自然科学基金项目(32060744, 32202641);中科院“西部之光”人才培养计划项目(2024);国家科技重大专项-科技创新2030专项(2023ZD0404803-02);宁夏重点研发计划项目(2023BCF01006)

第一作者: 吴昊(ORCID:0009-0005-9270-2919), 硕士研究生, E-mail: wuhao18709632791@163.com

通讯作者: 魏大为(ORCID:0000-0002-0252-0099), 副教授, 主要从事肉牛生物技术育种, E-mail: weidaweidw@163.com

belongs, and examined *PPP1R3C* expression levels using RT-qPCR. The results revealed: 1) Members of the *PPP1R3* gene family exhibited significant variations in their isoelectric points and molecular weights. 2) Phylogenetic tree and conserved domain analyses demonstrated that *PPP1R3* family members have evolved distinct motif and domain combinations throughout their evolution; synteny analysis revealed patterns of positional changes of *PPP1R3* family members across the chromosomes of cattle, mice, humans, sheep, and pigs. 3) RT-qPCR analysis demonstrated that *PPP1R3C* exhibits significantly high expression in bovine adipose and lung tissues, while showing minimal expression in muscle-related tissues; furthermore, its expression levels progressively increased during bovine adipocyte differentiation and maturation. In conclusion, this study investigated the evolutionary relationships, molecular structures, and functional characteristics of the *PPP1R3* gene family across bovine and other species, highlighting the crucial regulatory role of *PPP1R3C* in lipid metabolism and energy homeostasis. These findings provide a theoretical foundation for further investigation of the specific mechanisms of this gene family under various physiological and pathological conditions.

Keywords *PPP1R3C*; *PPP1R3* gene family; expression analysis; bioinformatics analysis

蛋白磷酸酶 1(Protein phosphatase 1, PP1)由一个催化亚基(PP1c)和多个调节亚基(PP1r)组成^[1],通过催化蛋白质去磷酸化来发挥其功能^[2]。*PPP1R3* 家族属于 PP1c 结合蛋白的大型超家族(*PPP1R1~PPP1R16*)^[3]。蛋白磷酸酶 1 调节亚基 3C(*PPP1R3C*)也被称为糖原靶向蛋白(PTG),作为 PP1r 的一员,其在小鼠的所有组织(睾丸除外)中均有表达,尤其在骨骼肌、心脏和肝脏中表达最为丰富^[4]。研究表明,破坏 PTG 的基因产物会显著减少组织分离细胞和小鼠模型中的糖原储存^[5]。在诱导分化成熟的 3T3-L1 细胞中,*PPP1R3C* 的表达水平显著升高^[6]。在小鼠肝细胞中,*PPP1R3C* 可以显著促进糖原的合成与储存^[7],并在全身的能量代谢尤其是糖代谢与脂代谢中,起到重要的调控作用^[8]。研究发现,在 db/db 小鼠(Ⅱ型糖尿病小鼠模型)中敲减 *PPP1R3C* 的表达可以显著改善血糖水平,同时降低糖异生关键基因的表达^[7]。而 Lu 等^[9]发现,小鼠中 PTG 的缺失阻止了 HFD(高脂肪饮食)诱导的肝糖原积累。除此之外,PTG 缺失还阻断了 HFD 喂养的小鼠的肝脂肪变性,并降低了许多成脂基因的表达。王晨玺^[10]研究发现,过表达 *PPP1R3C* 可以促进 3T3-L1 脂肪分化过程中的脂滴形成以及分化关键基因的表达,从而促进脂肪分化,敲减 *PPP1R3C* 可以抑制脂肪分化。此外,*PPP1R3C* 基因与人类肥胖相关的炎症关系密切^[11-12]。在大鼠中,*PPP1R3C* 基因受胰岛素调控并主要在肝脏和心肌组织中表达^[13],且其在印度鲶鱼中作为缺氧诱导基因参与缺氧应激反应^[14]。以上研究表明,*PPP1R3C* 在小鼠中的糖、脂代谢及维持体内代谢

平衡中具有关键作用。再者,*PPP1R3C* 在人类肾细胞癌、宫颈癌和前列腺癌等多种肿瘤的发生与发展中也发挥了重要作用^[15-17]。

尽管目前对 *PPP1R3C* 功能的研究已取得了显著进展,但对其所在的 *PPP1R3* 家族在不同物种中的系统性认识仍然有限。研究表明,*PPP1R3* 家族蛋白与糖原结合,并作为支架蛋白介导糖原合成或降解^[18-20]。虽然随着多物种参考基因组的不断完善,*PPP1R3* 基因家族的存在已得到证实,但其相关的系统生物信息学研究仍未报道,且其成员 *PPP1R3C* 在牛体内的表达模式还未确定。因此,本研究旨在通过 *PPP1R3C* 的同源序列比对与隐马尔可夫模型的共分析,探索其在牛(*Bos taurus*)基因组中的家族成员关系,并运用生物信息学方法对这些成员进行系统分析,比对不同物种的基因组序列进行共线性分析。然后通过 RT-qPCR 检测 *PPP1R3C* 基因在牛不同组织和细胞分化阶段中的特异性表达模式。本研究可为进一步理解 *PPP1R3* 基因家族及 *PPP1R3C* 基因的生物功能和调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验样品采集

本研究所用组织样品采自于固原黄牛。无菌条件采集皮下脂肪组织,并用 75% 酒精和 PBS 清洗后,放置于含 1% 双抗的 PBS 溶液中,带回细胞室,用于细胞分离;此外,采集心、肝、脾、肺、肾、腿肌、背最长肌、皮下脂肪、肾周脂和睾丸组织,并将其置

于无酶管中,用于组织表达分析。

1.1.2 试验试剂

Trizol、反转录试剂盒和 TB Green® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)等购自 TaKaRa 公司(大连);DMEM/High-Glucose、PBS、青霉素/链霉素(以下简称双抗)和胰酶等购自海克隆生物化学制品有限公司(北京);胎牛血清(FBS)购自赛默飞世尔科技有限公司(中国);罗格列酮、地塞米松和 IBMX 均购自 Sigma 公司;无水乙醇、甲醛、氯仿和异丙醇等均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 *PPP1R3* 基因家族成员理化性质分析与染色体定位

所用分析软件 TBtools 由 GitHub 网站下载(<https://github.com/CJ-Chen/TBtools/releases>);牛(*Bos taurus*, ARS-UCD1.3)的基因组文件与 gff3 文件都由 Ensembl 下载(https://asia.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index);小鼠(*Mus musculus*)的 *PPP1R3C* 蛋白序列由 NCBI 下载(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_058550.1)。 *PPP1R3C* 基因的 Pfam 文件由 InterPro 下载(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/pfam/PF03370/curation/>)。

1.2.2 *PPP1R3* 基因家族保守结构域分析及进化树的构建

使用 NCBI CDD(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)进行批量 cd search,而保守基序 MEME 则是由(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)完成。进化树的构建是由 MEGA11(https://www.megasoftware.net/active_download)结合 TBtools 完成。

1.2.3 *PPP1R3* 基因家族的物种间共线性分析

其中用到的小鼠(*Mus musculus*, GRCm39)、人类

(*Homo sapiens*, GRCh38. p14)家猪(*Sus scrofa*, Sscrofa11.1)和绵羊(*Ovis aries*, ARS-UI_Ramb_v2.0)的基因组文件与 gff3 文件都由 Ensembl 下载(<https://asia.ensembl.org/>)。

1.2.4 牛脂肪细胞的分离培养与鉴定

参考郭红芳等^[21]的方法进行酶消化法分离固原黄牛脂肪细胞。将切碎的皮下脂肪组织加入含有胰蛋白酶的消化液中于 37℃ 消化 1 h,细胞筛过滤后离心收集细胞。将分离出的原代细胞接种于细胞培养皿中,使用生长培养基(1% 双抗+10% 血清+89% DMEM/High Glucose),在 37℃,5% CO₂的培养箱中培养。待细胞密度达到 80%~90% 时进行铺板。通过诱导分化培养基(1% 双抗+0.5 mmol/L IBMX+1 μmol/L 地塞米松+1 μmol/L 罗格列酮+10% FBS+10 μg/mL 胰岛素+DMEM/High Glucose)诱导脂肪细胞分化,每 2 d 换液一次。油红 O 染色参考 Wang 等^[22]的方法。首先用 4% 多聚甲醛固定牛脂肪细胞 5 min,再加入等体积的 10% 多聚甲醛溶液,室温孵育 1 h;利用 60% 异丙醇清洗,静置 5 min;待培养皿完全干燥后加入油红 O 工作液,室温孵育 30 min;于显微镜下进行成像观察并拍照记录。

1.2.5 *PPP1R3C* 基因在牛不同组织和脂肪细胞分化阶段中的表达模式分析

使用 Trizol 试剂盒分别提取牛不同组织、分化不同阶段的脂肪细胞的总 RNA。选用完整性良好的 RNA 样品作为模板进行反转录为 cDNA,于 -20℃ 保存备用。参照 NCBI 数据库中已公布的牛 *PPARγ*、*PPP1R3C* 和 *GAPDH* 的 mRNA 序列,使用 Primer 5.0 软件设计引物后交由安徽通用生物技术有限公司进行合成(表 1)。利用 TB Green® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa)试剂盒检测 *PPP1R3C* 在牛背最长肌、腿肌、心、肝、脾、肺、肾、肾周脂、睾丸、皮下脂肪组织的表达

表 1 定量引物序列信息表

Table 1 The sequence information of qPCR primers

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	扩增片段长度/bp Product length	NCBI 登录号 GenBank No.
<i>PPARG</i>	F: AGGATGGGGTCCTCATATCC R: GCGTTGAACTTCACAGCAAA	121	NM_181024.2
<i>PPP1R3C</i>	F: ACAACCAAGCCAAGAAGC R: CAGGTCCAAGAGGTCAAAC	125	NM_001076164.2
<i>GAPDH</i>	F: CCAACGTGTCTGTTGTGGAT R: CTGCTTCACCACCTTCTTGA	80	NM_001034034.2

水平;检测 *PPP1R3C* 和 *PPAR γ* 在脂肪细胞分化第 0、2、4、6、8 和 10 天的表达水平($n=3$)。RT-qPCR 反应体系为:TB Green® Premix Ex TaqTM II(Tli RNaseH Plus)7.5 μ L;cDNA 模板 1.0 μ L;上下游引物各 0.3 μ L;ddH₂O 5.9 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,延伸 30 s(72 $^{\circ}$ C),40 个循环。*GAPDH* 为内参基因。采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 方法对基因的 mRNA 表达水平进行相对定量分析。

2 结果与分析

2.1 *PPP1R3* 基因家族成员理化性质分析与染色体定位

为鉴定出 *PPP1R3* 基因家族成员,首先使用模式

动物小鼠的 *PPP1R3C* 蛋白序列与牛的基因组蛋白序列进行同源序列比对(Blast);再次使用 *PPP1R3C* 的隐马尔可夫模型(Pfam)文件与牛的基因组蛋白序列进行比对,将最终得到的 2 组转录本 ID 进行去重复与各项理化性质分析,并进一步分析了家族各成员在牛染色体上的位置。结果显示,*PPP1R3* 基因家族中编码 *PPP1R3A* 与 *PPP1R3F* 基因的氨基酸数量与其他家族成员相差很多,*PPP1R3C*、*PPP1R3B*、*PPP1R3D* 与 *PPP1R3E* 同时拥有多个转录本亚型,但其中的主转录本以及其他转录变体的等电点、分子质量与氨基酸数量都相近或相同(表 2)。同时从染色体定位图中可见 *PPP1R3C* 基因家族各成员分布在牛的不同染色体上(图 1)。

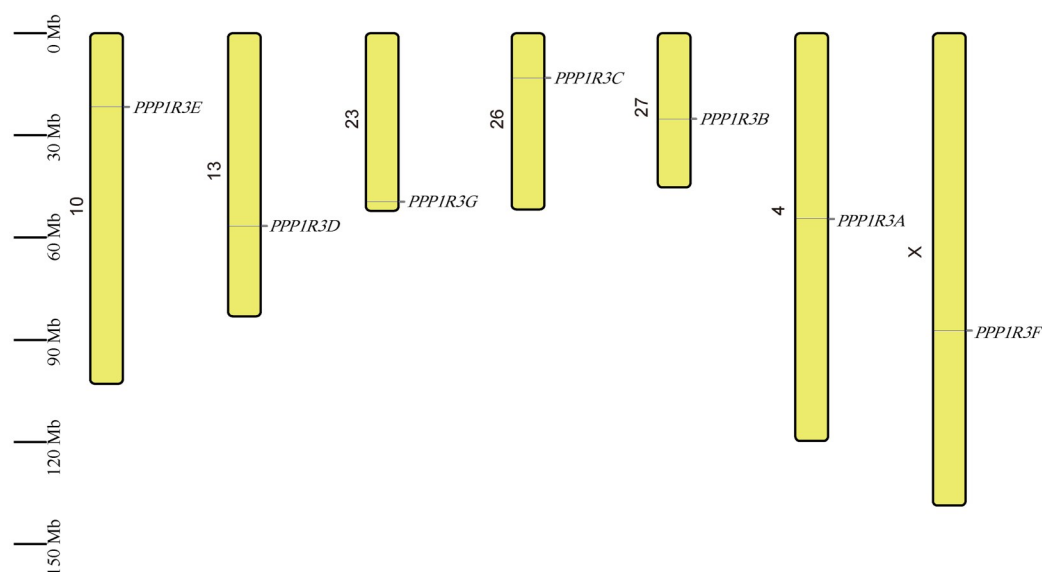
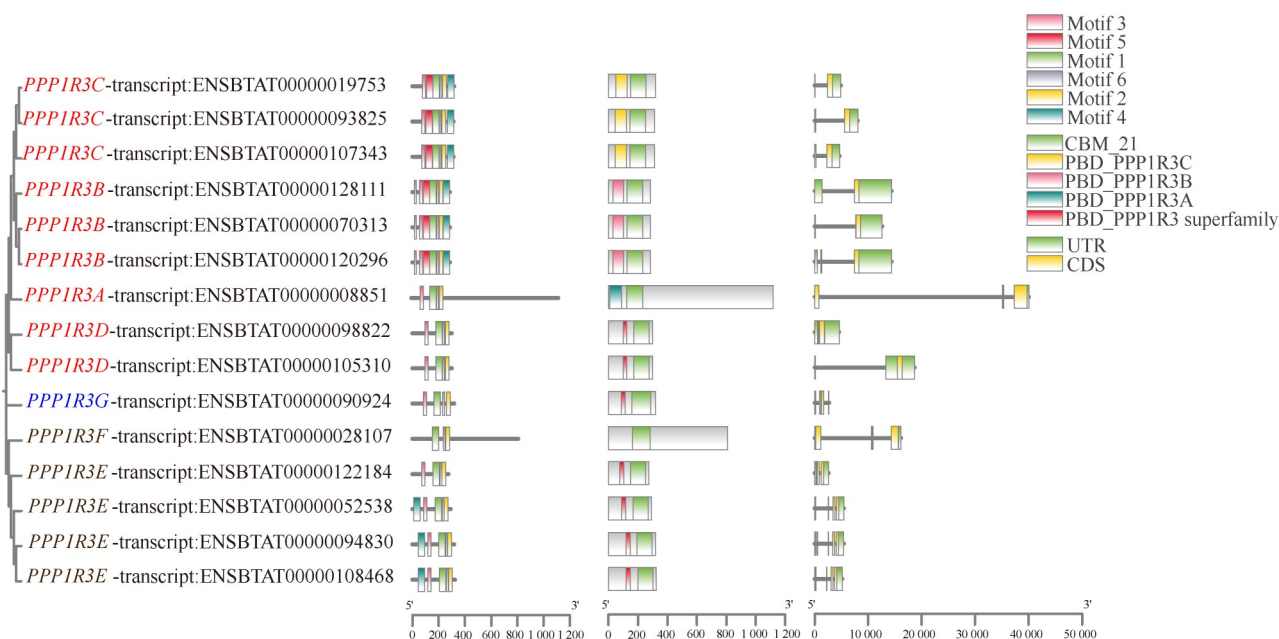
表 2 *PPP1R3* 基因家族理化性质
Table 2 Physicochemical properties of *PPP1R3* gene families

基因 Gene	基因 ID Gene ID	转录本 ID Transcript ID	等电点 pI	分子量/ku Mw	氨基酸 Amino acid
<i>PPP1R3A</i>	ENSBTAG00000006733	ENSBTAT00000008851	4.88	124.92	1 117
<i>PPP1R3G</i>	ENSBTAG000000062175	ENSBTAT000000090924	8.85	33.64	318
<i>PPP1R3C</i>	ENSBTAG000000014831	ENSBTAT00000107343	6.08	35.74	313
		ENSBTAT00000019753	6.25	36.32	318
		ENSBTAT00000093825	6.08	35.74	313
		ENSBTAT00000128111	5.19	32.38	284
<i>PPP1R3B</i>	ENSBTAG000000010606	ENSBTAT00000070313	5.19	32.38	284
		ENSBTAT00000120296	5.19	32.38	284
		ENSBTAT00000098822	8.49	32.33	299
<i>PPP1R3D</i>	ENSBTAG000000061854	ENSBTAT00000105310	8.49	32.33	299
		ENSBTAT00000094830	11.1	34.63	317
<i>PPP1R3E</i>	ENSBTAG000000037679	ENSBTAT00000122184	10.5	29.74	272
		ENSBTAT00000052538	11.0	31.94	291
		ENSBTAT00000108468	11.1	35.29	323
<i>PPP1R3F</i>	ENSBTAG000000021100	ENSBTAT00000028107	4.59	84.27	807

2.2 *PPP1R3* 基因家族保守结构域分析及进化树的构建

为探究 *PPP1R3* 基因家族成员的蛋白与基因结构特征,本研究根据基因进化树、保守基序与保守结构域共同预测了它们的系统发育情况。结果发现,其中 7 个基因家族成员共有 3 个亚家族,6 个保守基序和 5 个保守结构域。*PPP1R3A*、*PPP1R3B*、*PPP1R3C* 和 *PPP1R3D* 属于同一个亚家族,但其中只有 *PPP1R3B* 以及 *PPP1R3C* 拥有全部的 6 个基序,而 *PPP1R3A* 与 *PPP1R3D* 则缺少基序 4 与 5;*PPP1R3G* 独立于一个亚家族,且同样缺少基序 4 与 5;最后一个

亚家族中,*PPP1R3E* 除 ENSBTAT00000122184 转录蛋白缺少基序 4 与 5 以外,其他 *PPP1R3E* 蛋白均只缺少基序 5,而 *PPP1R3F* 则同时缺少基序 3、4 与 5。同一进化亚家族中的 *PPP1R3* 基因家族成员也具有相似的基因结构模式和保守结构域,其中它们共有的保守结构域 CBM21 全称为碳水化合物/淀粉结合模块 21 号家族(Carbohydrate/starch-binding module family 21),而除了 *PPP1R3A*、*PPP1R3B* 及 *PPP1R3C* 拥有各自独属的保守结构域外,其他家族成员除 *PPP1R3F* 外都具有保守结构域 PBD_ *PPP1R3* 超家族(图 2)。

图1 *PPP1R3* 基因家族成员牛 (*Bos taurus*) 的染色体定位Fig. 1 Chromosomal mapping of *PPP1R3* gene family member bovine (*Bos taurus*)图2 在牛中鉴定的 *PPP1R3* 基因家族的系统发育情况Fig. 2 Phylogeny of *PPP1R3* gene families identified in cattle

2.3 *PPP1R3* 基因家族的物种间共线性分析

通过牛与其他物种的共线性分析,鉴定了牛全基因组中 *PPP1R3* 基因家族保守性的转录本。结果如图3和表3所示, *PPP1R3D* 与 *PPP1R3G* 基因在不同物种中显示出复杂的共线性模式,例如 *PPP1R3D* 均分布在除人类的其他4个物种的13号染色体上,同时它又存在于人类的6号和20号染色体上。牛与不同物种间的 *PPP1R3* 基因家族共线性

分析揭示了物种间差异性以及进化程度的差异性,为探究该基因家族成员的进化水平提供切实证据。

2.4 牛脂肪细胞的分离培养与鉴定

本试验利用酶消化法成功分离了牛脂肪细胞,从消化后第1天增殖至第4天贴壁并长满培养皿,细胞状态良好,形态分明,呈长梭状(图4(a)~(b))。随后采用表型和标志基因表达谱2种方法鉴

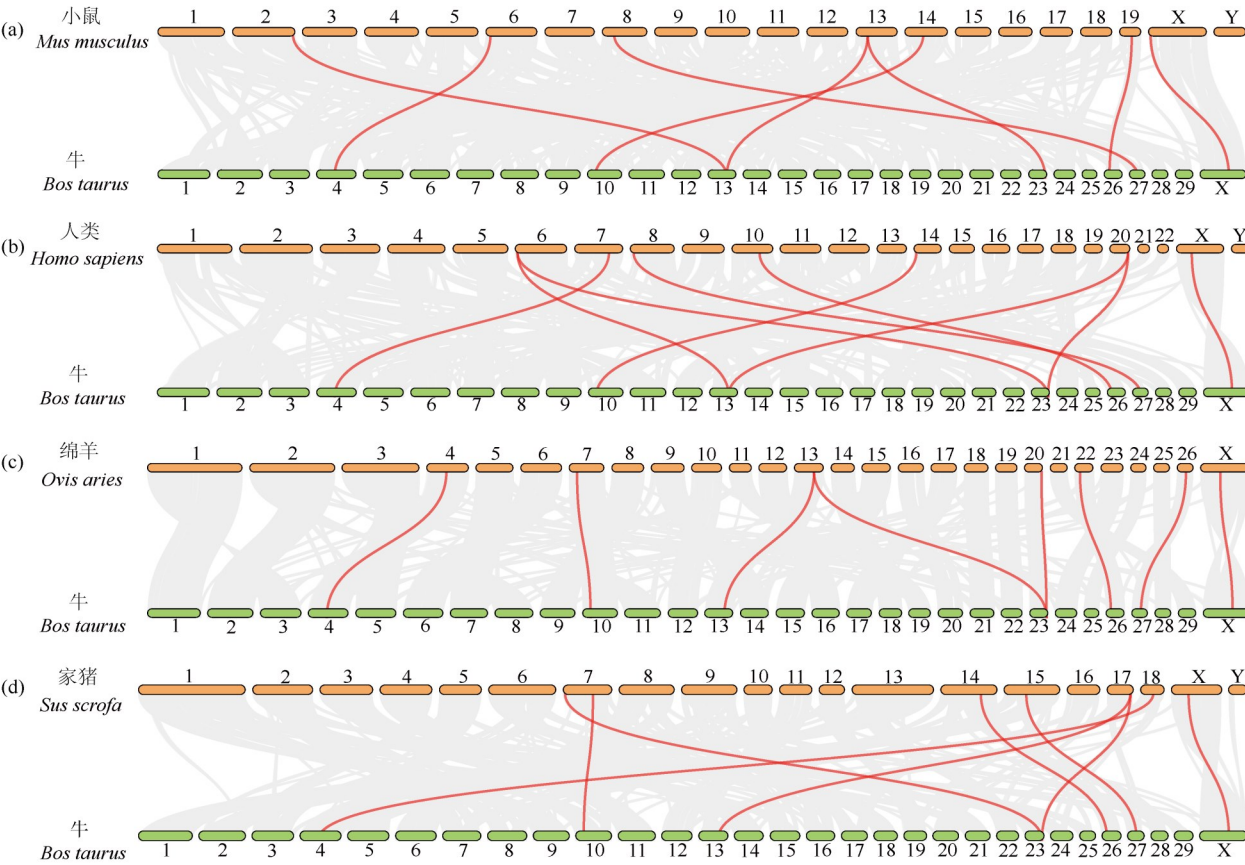


图3 *PPP1R3*基因家族的物种间共线性分析

Fig. 3 Collinearity analysis of the *PPP1R3* gene family across species

表3 牛与其他物种*PPP1R3*基因家族的共线性信息

Table 3 Colinearity information of *PPP1R3* gene families of cattle and other species

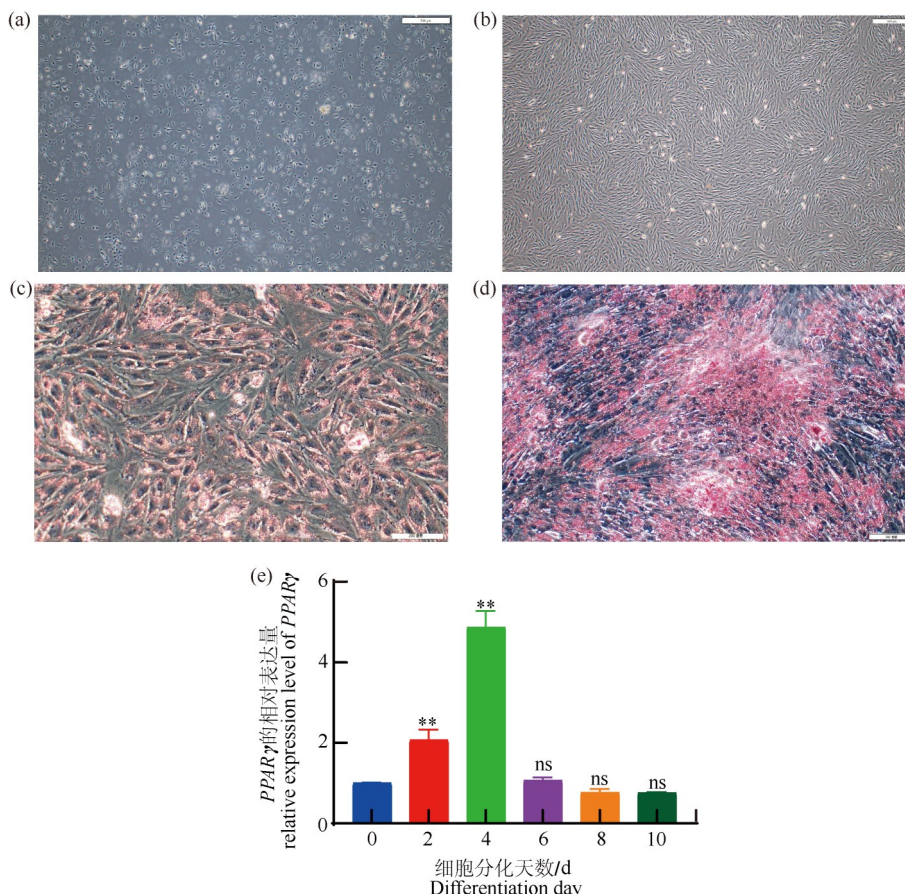
基因 Gene	转录本 ID Transcript ID	牛染色体 ID <i>Bos taurus</i> Chr ID	小鼠染色体 ID <i>Mus musculus</i> Chr ID	人类染色体 ID <i>Homo sapiens</i> Chr ID	绵羊染色体 ID <i>Ovis aries</i> Chr ID	猪染色体 ID <i>Sus scrofa</i> Chr ID
<i>PPP1R3A</i>	ENSBTAT00000008851	4	6	7	4	4
<i>PPP1R3G</i>	ENSBTAT00000090924	23	13	6 20	13 20	13 20
<i>PPP1R3B</i>	ENSBTAT00000128111	27	8	8	26	26
<i>PPP1R3C</i>	ENSBTAT00000019753	26	19	10	22	22
<i>PPP1R3D</i>	ENSBTAT00000105310	13	2 13	6 20	13	13
<i>PPP1R3E</i>	ENSBTAT00000108468	10	14	14	7	7
<i>PPP1R3F</i>	ENSBTAT00000028107	X	X	X	X	X

定了所分离细胞的纯度和分化潜能。结果显示，与分化0 d相比,牛脂肪细胞诱导分化后期(10 d)时,视野中可明显地观察到大量脂滴,且小脂滴呈

聚集趋势(图4(c)~(d))。在分化过程中, *PPAR γ* 基因的表达水平在2 d显著增加,并在4 d达到峰值(图4(e))。此时脂肪细胞已经基本完成

了分化过程,并开始执行其储存脂质的功能。*PPAR γ* 的表达水平显著下降,并在 6、8 和 10 d 与基线水平无显著差异。因为在这个阶段其主要任务—诱导脂肪细胞分化已经完成,虽然脂肪细胞

仍然需要低水平的 *PPAR γ* 来维持基本的脂质代谢,但高表达不再必要。以上结果表明本研究牛脂肪细胞的分离并诱导分化后的形态与增殖分化能力较好,可用于后续试验。



数据以平均值 $\pm$ SEM ($n=3$) 表示。显著性通过单因素方差 (One-way ANOVA) 分析确定, $**P < 0.01$, ns 表示差异不显著。下同。

Data are presented as mean $\pm$ SEM ($n=3$). Significance was determined by One-way ANOVA ($**P < 0.01$, ns indicates no significant difference. The same below.

(a) 牛脂肪细胞消化第 1 天; (b) 牛脂肪细胞的增殖培养; (c) 牛脂肪细胞分化 0 d 的油红 O 染色; (d) 牛脂肪细胞分化 10 d 的油红 O 染色; (e) *PPAR γ* 在牛脂肪细胞分化过程中的表达模式。

(a) Digestion of bovine adipocytes on day 1; (b) Proliferation culture of bovine adipocytes; (c) Oil Red O staining of bovine adipocytes on day 0 of differentiation; (d) Oil Red O staining of bovine adipocytes on day 10 of differentiation; (e) Expression pattern of *PPAR γ* during the differentiation of bovine adipocytes.

图 4 牛脂肪细胞的分离鉴定

Fig. 4 Isolation and identification of bovine adipocytes

2.5 *PPP1R3C* 基因在牛不同组织和脂肪细胞分化阶段中的表达模式分析

为探究 *PPP1R3C* 基因在牛这一物种中的表达模式,本研究采用 RT-qPCR 进行 *PPP1R3C* 基因在牛不同组织与脂肪细胞不同分化时间段的定量检测。结果所示, *PPP1R3C* 基因在牛的脂肪和肺组织中具有显著的高表达,而在肌肉相关组织中基因表达水平最

低(图 5(a)~(b)),这一现象可能与该基因在这些组织中的重要生物学功能有关。而 *PPP1R3C* 基因在牛脂肪细胞分化过程中的表达呈现出明显的时间依赖性。其表达量在分化早期(2 d)显著增加,并在中期(8 d)达到峰值,随后在分化晚期(10 d)略有下降但仍保持较高水平。这表明 *PPP1R3C* 基因可能在牛脂肪细胞分化过程中起重要作用。

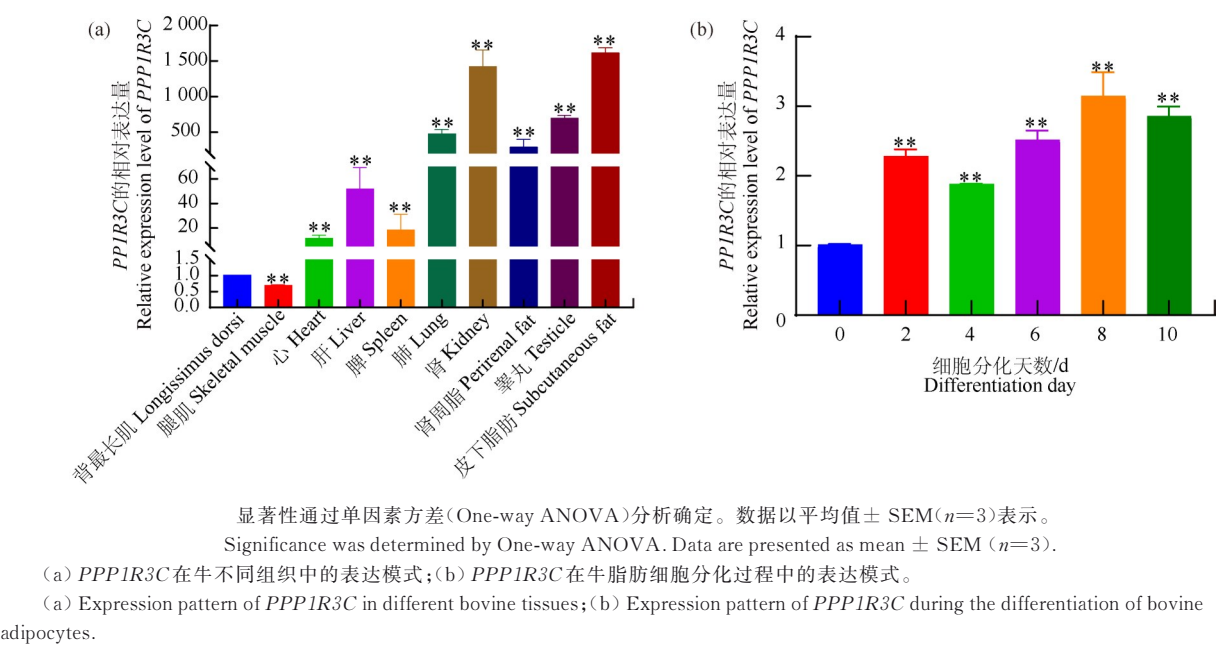


图5 *PPP1R3C*基因在牛不同组织和脂肪细胞分化阶段中的表达模式分析

Fig. 5 Analysis of the expression pattern of the *PPP1R3C* gene in different bovine tissues and during the stages of adipocyte differentiation

3 讨论

本研究中 *PPP1R3* 基因家族中 7 个成员蛋白产物的氨基酸组成主要包括芳香族和极性氨基酸,这一类型的氨基酸有助于其与碳水化合物的结合^[23-24]。而这些蛋白质的疏水性则主要由亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸等疏水氨基酸决定^[25]。这些特性使得该家族在碳水化合物结合和酶活性调控中具有重要功能。*PPP1R3A* 基因具有较高的分子量和氨基酸序列长度,研究证明,*PPP1R3A/B* 通过靶向 PP1 调节糖原合成、肌肉收缩和蛋白质合成,对细胞分裂至关重要^[26]。另外 *PPP1R3A* 也是心力衰竭的中枢调节因子^[27],而 *PPP1R3G* 基因的等电点较高,表明其在不同 pH 环境中的溶解性和稳定性存在差异。此外,*PPP1R3G* 作为最新被发现的 PP1 调节亚基,在禁食-进食周期中发生表达变化,并在餐后葡萄糖稳态中发挥作用^[28]。研究表明, *PPP1R3G* 通过促进肝糖原合成,增加糖原合成酶的活性,降低禁食引起的肝脂肪变性,对葡萄糖和脂质代谢有重要影响^[3]。*PPP1R3E* 基因的等电点明显高于其他成员,表明其在细胞内可能具有独特的生理功能^[29]。*PPP1R3D* 同样作为 PP1 的调节亚基,参与糖原代谢,其在增强糖原合成和维持葡萄糖稳态方面具有类似作用,可能影响代谢性疾

病^[30]。*PPP1R3F* 被发现主要在脑星形胶质细胞中表达,特别是在细胞内质网中^[31],并且其能够在葡萄糖水平不断变化的情况下维持稳定的脑糖原水平。此外,*PPP1R3F* 中的有害变异还与一种新的糖原代谢 X 连锁紊乱有关^[31]。*PPP1R3C* 基因的多个转录本在等电点和分子量上仅具有轻微差异,表明该基因进化的完整性。

通过基因进化树、保守基序和保守结构域分析,本研究揭示了 *PPP1R3* 基因家族成员的系统发育关系和结构特征。CBM 结构域能够特异性地与碳水化合物表面的糖分子相互作用,从而在细胞代谢和信号传导中发挥重要功能。例如,CBM 结构域可以增强酶的底物亲和力,提高其催化效率,这对于代谢复杂碳水化合物的酶类尤其重要^[25]。该基因家族中的成员均具有 CBM_21(碳水化合物/淀粉结合模块 21 号家族)的保守结构域,说明其可能在碳水化合物结合和代谢中发挥重要功能^[23]。而除了 *PPP1R3A*、*PPP1R3B* 及 *PPP1R3C* 具有独属的结构域之外,其他基因除 *PPP1R3F* 外均包含 PBD_ *PPP1R3* superfamily,更加说明这些基因在保持核心功能(如与 PP1 结合)的同时,可能在某些部分发生了进化,从而形成了各自独特的调控机制和结构域。而 *PPP1R3F* 目前所展现的功能与调控 PP1 并无关联,这可能是该基因不包含 PBD 相关保

守结构域的原因。PPP1R3基因家族的不同成员具有不同的保守基序组合,这种基序的不同导致基因在不同的生理环境中具有不同的功能特性^[32]。PPP1R3基因家族的系统发育分析揭示了家族成员在进化过程中的分支和分化,通过比较不同基因成员的保守结构域和基序,可以推测它们在进化过程中如何通过结构的保守和变异实现功能分化。

通过对牛与不同物种之间PPP1R3基因家族的共线性分析,揭示了该基因家族的进化过程和保守性,展示了基因在不同物种中的相对位置,并揭示了可能存在的基因重排或重复的潜在进化事件^[33]。研究发现,PPP1R3D基因在小鼠13号染色体上显示出多个条目,而在牛中始终位于13号染色体上。这种复杂的共线性模式表明,小鼠在进化过程中可能经历了染色体重复或重排事件^[29]。基因重复和重排是基因组进化中的常见现象,可以导致基因功能的多样化和适应性增强^[34-36]。PPP1R3A基因在牛和人类中分别位于4号和7号染色体上,PPP1R3B基因在牛和绵羊中分别位于27号和26号染色体上,显示出高度的保守性。而PPP1R3C基因在牛和家猪中均位于26号和22号染色体上,显示了较高的共线性和保守性。

通过RT-qPCR检测,本研究分析了PPP1R3C基因在牛不同组织以及脂肪细胞不同分化时间段的表达模式。发现PPP1R3C基因在脂肪和肺组织中具有显著的高表达,而在肌肉相关组织中的基因表达水平最低。在脂肪组织中,PPP1R3C基因的高表达与其在脂肪代谢中的重要调节作用有关。研究表明,敲低PPP1R3C基因的小鼠胰岛素敏感性和能量消耗显著增强,揭示该基因在调节脂肪细胞的胰岛素信号传导和代谢平衡中发挥关键作用^[10]。PPP1R3C基因在脂肪细胞分化过程中的表达也显示出明显的上调,表明该基因在脂肪代谢中可能具有重要作用,该结果也与前人的研究结果一致^[9-10,37]。说明PPP1R3C基因可能通过调节脂肪细胞中的糖原代谢,进而影响脂肪细胞的能量储存和代谢过程。

4 结 论

PPP1R3基因家族的进化水平较高,进化压力较小,呈高度保守性。PPP1R3C基因在牛的脂肪和肺组织中高表达,并促进牛脂肪细胞分化。

参考文献 References

- [1] Chown E E, Wang P X, Zhao X C, Crowder J J, Strober J W, Sullivan M A, Xue Y L, Bennett C S, Perri A M, Evers B M, Roach P J, Depaoli-Roach A A, Akman H O, Pederson B A, Minassian B A. GYS1 or PPP1R3C deficiency rescues murine adult polyglucosan body disease [J]. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2020, 7 (11): 2186-2198
- [2] Oleson B J, Naatz A, Proudfoot S C, Yeo C T, Corbett J A. Role of protein phosphatase 1 and inhibitor of protein phosphatase 1 in nitric oxide-dependent inhibition of the DNA damage response in pancreatic β -cells[J]. *Diabetes*, 2018, 67(5): 898-910
- [3] Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M. Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution [J]. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 2002, 24(4): 371-381
- [4] Doherty M J, Young P R, Cohen P T. Amino acid sequence of a novel protein phosphatase 1 binding protein (R5) which is related to the liver- and muscle-specific glycogen binding subunits of protein phosphatase 1 [J]. *FEBS Letters*, 1996, 399(3): 339-343
- [5] Worby C A, Gentry M S, Dixon J E. Malin decreases glycogen accumulation by promoting the degradation of protein targeting to glycogen (PTG) [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283 (7): 4069-4076
- [6] Brady M J, Printen J A, Mastick C C, Saltiel A R. Role of protein targeting to glycogen (PTG) in the regulation of protein phosphatase-1 activity[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(32): 20198-20204
- [7] Ji X Y, Wang S S, Tang H J, Zhang Y Q, Zhou F Y, Zhang L L, Zhu Q, Zhu K C, Liu Q Q, Liu Y, Wang X, Zhou L B. PPP1R3C mediates metformin-inhibited hepatic gluconeogenesis [J]. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 2019, 98: 62-75
- [8] Dang Y Q, Hao S J, Zhou W J, Zhang L, Ji G. The traditional Chinese formulae Ling-Gui-Zhu-Gan decoction alleviated non-alcoholic fatty liver disease via inhibiting PPP1R3C mediated molecules [J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 19(1): 8
- [9] Lu B B, Bridges D, Yang Y M, Fisher K, Cheng A L, Chang L, Meng Z X, Lin J D, Downes M, Yu R T, Liddle C, Evans R M, Saltiel A R. Metabolic crosstalk: Molecular links between glycogen and lipid metabolism in obesity[J]. *Diabetes*, 2014, 63(9): 2935-2948
- [10] 王晨玺. Ppp1r3c对脂肪生成和肥胖形成的影响及机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2022
Wang C X. *Effect and mechanism of Ppp1r3c on adipogenesis and obesity* [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2022 (in Chinese)
- [11] Ceperuelo-Mallafre V, Ejarque M, Serena C, Duran X, Montori-Grau M, Rodríguez M A, Yanes O, Nunez-Roa C, Roche K, Puthanveetil P, Garrido-Sanchez L, Saez E, Tinahones F J, Garcia-Roves P M, Gomez-Foix A M, Saltiel A R, Vendrell J, Fernandez-Veledo S. Adipose tissue glycogen accumulation is associated with obesity-linked inflammation in humans[J]. *Molecular Metabolism*, 2016, 5(1): 5-18
- [12] Montori-Grau M, Guitart M, Garcia-Martinez C, Orozco A, Gomez-Foix A M. Differential pattern of glycogen accumulation after protein phosphatase 1 glycogen-targeting subunit PPP1R6 overexpression, compared to PPP1R3C and PPP1R3A, in skeletal muscle cells[J]. *BMC Biochemistry*, 2011, 12: 57

- [13] Petrie J L, Al-Oanzi Z H, Arden C, Tudhope S J, Mann J, Kieswich J, Yaqoob M M, Towle H C, Agius L. Glucose induces protein targeting to glycogen in hepatocytes by fructose 2, 6-bisphosphate-mediated recruitment of MondoA to the promoter [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2013, 33(4): 725-738
- [14] Mohindra V, Tripathi R K, Singh R K, Lal K K. Molecular characterization and expression analysis of PPP1R3C in hypoxia-tolerant Indian catfish, *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758) under hypoxia [J]. *Gene*, 2013, 527(1): 292-300
- [15] Dai F F, Chen G T, Wang Y Q, Zhang L, Long Y M, Yuan M Q, Yang D Y, Liu S Y, Cheng Y X, Zhang L P. Identification of candidate biomarkers correlated with the diagnosis and prognosis of cervical cancer via integrated bioinformatics analysis [J]. *OncoTargets and Therapy*, 2019, 12: 4517-4532
- [16] Zhao Y Y, Ye G, Wang Y, Luo D. MiR-4461 inhibits tumorigenesis of renal cell carcinoma by targeting PPP1R3C [J]. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 2022, 37(6): 503-514
- [17] Wang Z, Liu Z J, Yang Y X, Kang L. Identification of biomarkers and pathways in hypertensive nephropathy based on the ceRNA regulatory network [J]. *BMC Nephrology*, 2020, 21(1): 476
- [18] Fong N M, Jensen T C, Shah A S, Parekh N N, Saltiel A R, Brady M J. Identification of binding sites on protein targeting to glycogen for enzymes of glycogen metabolism [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(45): 35034-35039
- [19] Luo X L, Zhang Y X, Ruan X B, Jiang X M, Zhu L, Wang X, Ding Q R, Liu W Z, Pan Y, Wang Z Z, Chen Y. Fasting-induced protein phosphatase 1 regulatory subunit contributes to postprandial blood glucose homeostasis via regulation of hepatic glycogenesis [J]. *Diabetes*, 2011, 60(5): 1435-1445
- [20] Newgard C B, Brady M J, O'Doherty R M, Saltiel A R. Organizing glucose disposal: Emerging roles of the glycogen targeting subunits of protein phosphatase-1 [J]. *Diabetes*, 2000, 49(12): 1967-1977
- [21] 郭红芳, 鲁林森, 孙永刚. 牛前体脂肪细胞的分离培养及诱导分化 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2014, 42(2): 1-6, 12
- Guo H F, Zan L S, Sun Y G. Primary culture and differentiation of bovine preadipocytes [J]. *Journal of Northwest A & F University : Natural Science Edition*, 2014, 42(2): 1-6, 12 (in Chinese)
- [22] Wang Y N, Goulart R A, Pantanowitz L. Oil red O staining in cytopathology [J]. *Diagnostic Cytopathology*, 2011, 39(4): 272-273
- [23] Li Y H, Guan X Y, Chaffey P K, Ruan Y, Ma B, Shang S Y, Himmel M E, Beckham G T, Long H, Tan Z P. Carbohydrate-binding module O-mannosylation alters binding selectivity to cellulose and lignin [J]. *Chemical Science*, 2020, 11(34): 9262-9271
- [24] Dab A, Hasnaoui I, Mechri S, Allala F, Bouacem K, Noiriell A, Bouanane-Darenfed A, Saaloui E, Asehrou A, Wang F H, Abousalham A, Jaouadi B. Biochemical characterization of an alkaline and detergent-stable Lipase from *Fusarium annulatum* Bugnicourt strain CBS associated with olive tree dieback [J]. *PLoS One*, 2023, 18(5): e0286091
- [25] Xiong K, Yan Z X, Liu J Y, Pei P G, Deng L, Gao L, Sun B G. Inter domain interactions influence the substrate affinity and hydrolysis product specificity of xylanase from *Streptomyces chartreusis* L1105 [J]. *Annals of Microbiology*, 2020, 70(1): 19
- [26] Chen Y H, Hansen L, Chen M X, Bjørbaek C, Vestergaard H, Hansen T, Cohen P T, Pedersen O. Sequence of the human glycogen-associated regulatory subunit of type 1 protein phosphatase and analysis of its coding region and mRNA level in muscle from patients with NIDDM [J]. *Diabetes*, 1994, 43(10): 1234-1241
- [27] Cordero P, Parikh V N, Chin E T, Erbilgin A, Gloudemans M J, Shang C, Huang Y, Chang A C, Smith K S, Dewey F, Zaleta K, Morley M, Brandimarto J, Glazer N, Waggott D, Pavlovic A, Zhao M M, Moravec C S, Wilson Tang W H, Skreen J, Malloy C, Hannenhalli S, Li H Z, Ritter S, Li M Y, Bernstein D, Connolly A, Hakonarson H, Lusis A J, Margulies K B, Depauli-Roach A A, Montgomery S B, Wheeler M T, Cappola T, Ashley E A. Pathologic gene network rewiring implicates PPP1R3A as a central regulator in pressure overload heart failure [J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 2760
- [28] Zhang Y X, Xu D Q, Huang H, Chen S S, Wang L D, Zhu L, Jiang X M, Ruan X B, Luo X L, Cao P J, Liu W Z, Pan Y, Wang Z Z, Chen Y. Regulation of glucose homeostasis and lipid metabolism by PPP1R3G-mediated hepatic glycogenesis [J]. *Molecular Endocrinology*, 2014, 28(1): 116-126
- [29] Tokmakov A A, Kurotani A, Sato K I. Protein pI and intracellular localization [J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, 8: 775736
- [30] Rubio-Villena C, Sanz P, Garcia-Gimeno M A. Structure-function analysis of PPP1R3D, a protein phosphatase 1 targeting subunit, reveals a binding motif for 14-3-3 proteins which regulates its glycogenic properties [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0131476
- [31] Liu Z G, Xin B Z, Smith I N, Sency V, Szekely J, Alkelai A, Shuldiner A, Efthymiou S, Rajabi F, Coury S, Brownstein C A, Rudnik-Schöneborn S, Bruel A L, Thevenon J, Zeidler S, Jayakar P, Schmidt A, Cremer K, Engels H, Peters S O, Zaki M S, Duan R Z, Zhu C L, Xu Y R, Gao C, Sepulveda-Morales T, Maroofian R, Alkhawaja I A, Khawaja M, Alhalasah H, Houlden H, Madden J A, Turchetti V, Marafi D, Agrawal P B, Schatz U, Rotenberg A, Rotenberg J, Mancini G M S, Bakhtiari S, Kruer M, Thiffault I, Hirsch S, Hempel M, Stühn L G, Haack T B, Posey J E, Lupski J R, Lee H, Sarn N B, Eng C, Gonzaga-Jauregui C, Zhang B, Wang H. Hemizygous variants in protein phosphatase 1 regulatory subunit 3F (PPP1R3F) are associated with a neurodevelopmental disorder characterized by developmental delay, intellectual disability and autistic features [J]. *Human Molecular Genetics*, 2023, 32(20): 2981-2995
- [32] Ju L L, Deng G B, Liang J J, Zhang H L, Li Q, Pan Z F, Yu M Q, Long H. Structural organization and functional divergence of high isoelectric point α -amylase genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *BMC Genetics*, 2019, 20(1): 25
- [33] Sankoff D. Rearrangements and chromosomal evolution [J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2003, 13(6): 583-587
- [34] Stewart N B, Rogers R L. Chromosomal rearrangements as a source of new gene formation in *Drosophila yakuba* [J]. *PLoS Genetics*, 2019, 15(9): e1008314
- [35] Li X C, Wang J B, Yu Y N, Li G, Wang J P, Li C P, Zeng Z X, Li N, Zhang Z B, Dong Q L, Yu Y Y, Wang X F, Wang T Y, Grover C E, Wang B, Liu B, Wendel J F, Gong L. Genomic rearrangements and evolutionary changes in 3D chromatin topologies in the cotton tribe (Gossypieae) [J]. *BMC Biology*, 2023, 21(1): 56
- [36] Xia Y, Yuan X Y, Luo W, Yuan S Q, Zeng X M. The origin and evolution of chromosomal reciprocal translocation in *Quasipaa boulengeri* (Anura, Dicroglossidae) [J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 10: 1364
- [37] 崔潇, 李成萍, 张海燕, 刘雪燕, 周国利. PPP1R3C基因在3T3-L1前脂肪

细胞分化过程中的功能研究[J]. 聊城大学学报:自然科学版, 2021, 34(4): 95-102

Journal of Liaocheng University :Natural Science Edition, 2021, 34(4): 95-102 (in Chinese)

Cui X, Li C P, Zhang H Y, Liu X Y, Zhou G L. Study on function of *PPP1R3C* gene during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes [J].

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 吴昊, 宁夏大学硕士研究生。曾荣获牛精英杯校级团队赛三等奖, 在“第六届(2023)中国肉牛选育改良与产业发展国际研讨会”优秀学术墙报评选活动中荣获一等奖。



通讯作者简介: 魏大为, 宁夏大学副教授, 博士, 博士生导师, 主要从事肉牛生物技术育种。目前主持国家自然科学基金项目3项, 主持宁夏重点研发、宁夏自然科学基金(重点)等省部级项目7项。授权专利4项, 参编“十四五”规划教材2部, 完成省级科技成果登记5项, 以第一或通讯作者在国内外高质量期刊发表论文30余篇, 获得国家及省部级奖励5项。