

PDX-1 基因对人胚肾细胞胰岛发育 相关基因表达的影响

夏华强^{1,2}, 徐小明¹, 刘律君¹, 卢光琇^{1,2}

(1 中南大学 生殖与干细胞工程研究所, 湖南 长沙 410078; 2 人类干细胞国家工程研究中心, 湖南 长沙 410078)

[摘要] **【目的】**研究人 PDX-1 基因对胰岛发育相关基因和胰岛素基因(Insulin, INS)表达的影响, 探讨 PDX-1 基因诱导非 β 细胞为胰岛素分泌细胞的可能性。**【方法】**采用 PCR 扩增技术, 从人的胰腺 cDNA 中扩增 PDX-1 基因和 INS 基因的阅读框架, 分别构建了质粒 pAAV-PDX-1 和 pAAV-INS; 将 pAAV-PDX-1 转染人胚肾细胞(293T) 48 h 后, RT-PCR 检测 293T 细胞中胰岛发育相关基因的表达; 再将 pAAV-PDX-1 和 pAAV-INS 共转染 293T 细胞 48 h 后, RT-PCR 检测 293T 细胞中 INS 的表达。**【结果】**转染 pAAV-PDX-1 的 293T 细胞中, 检测到胰岛发育相关基因 PDX-1、Ngn3、PC2、BETA2 的表达; PDX-1 没有直接增强 INS 基因表达的作用。**【结论】**在 293T 细胞中, PDX-1 基因对胰岛发育相关基因的表达有重要影响, PDX-1 在诱导非 β 细胞为胰岛素分泌细胞的过程中可能有着重要的作用。

[关键词] pAAV-PDX-1; pAAV-INS; 293T 细胞; 胰岛发育相关基因; 表达

[中图分类号] R541; R587.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)05-0022-05

Effect of PDX-1 on the expression of pancreas islet development-related genes

XIA Hua-qiang^{1,2}, XU Xiao-ming¹, LIU Lv-jun¹, LU Guang-xiu^{1,2}

(1 Institute of Reproduction and Stem Cell Engineering, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China;

2 National Engineering Research Center of Human Stem Cell, Changsha, Hunan 410078, China)

Abstract: **【Objective】**The research was conducted to study the function of the PDX-1 gene and the effect of PDX-1 gene on regulation of INS gene expression in non- β -cells. **【Method】**The plasmid pAAV-PDX-1 was transfected into the 293T cells and the expression of the pancreas islet development-related genes was analyzed by RT-PCR. The plasmid pAAV-PDX-1 and pAAV-INS were transfected into the 293T cells and the expression of the INS gene was analyzed by RT-PCR. **【Result】**Some insulin-secreting cell related genes (PDX-1, Ngn3, PC2, BETA2) were expressed in the 293T cells transfected with pAAV-PDX-1. There was no detectable change in the expression of the INS gene in the 293T cells co-transfected with pAAV-PDX-1 and pAAV-INS compared to the cells transfected with pAAV-INS or the cells co-transfected with pAAV-PDX-1 and pAAV-INS. **【Conclusion】**The PDX-1 gene affects the expression of the Insulin-secreting cell related genes in 293T cells and plays a potential role in the induction of non- β -cells into the insulin-secreting cells.

Key words: pAAV-PDX-1; pAAV-INS; 293T cell; the pancreas islet development-related gene; expression

* [收稿日期] 2010-01-09

[基金项目] 国家“973”项目(2007CB947900, 2007CB948103); 国家“863”项目(2006AA02A102); 国家自然科学基金项目(30800650)

[作者简介] 夏华强(1974—), 男, 湖南临武人, 博士, 主要从事分子遗传学研究。

[通信作者] 卢光琇(1939—), 女, 湖北天门人, 教授, 博士生导师, 主要从事干细胞工程及生殖与不孕研究。

E-mail: lugxdirector@yahoo. com. cn

糖尿病已被世界卫生组织列为三大疑难病之一。细胞移植将可能成为治疗糖尿病的重要方法之一,而当前细胞移植存在的主要问题是可移植的细胞来源缺乏。现已知 pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1)基因在胰腺发育中有很重要的作用^[1],是胰腺发育必需的转录因子,也是β细胞形成和成熟的标志^[2]。在 PDX-1 基因剔除的小鼠中未发现成熟的胰腺组织,且小鼠在出生后很快死于高血糖症。在缺乏功能性 PDX-1 蛋白的人群中,同样导致胰腺发育不全^[3]。PDX-1 在维持成体胰腺β细胞功能方面也起着重要的作用^[4]。

最近的研究发现,PDX-1 在非β细胞向β细胞的转化过程中起着重要的作用^[5-6],为促进干细胞及非β细胞诱导为胰岛素分泌细胞的研究,以及解决糖尿病细胞替代疗法中细胞来源匮乏的问题提供了新思路。本研究采用 PCR 方法,从人的胰腺 cDNA 中扩增胰岛素基因(Insulin,INS)的阅读框架,构建了质粒 pAAV-INS;用已有质粒 pAAV-PDX-1 转染人胚胎肾细胞(293T)48 h 后,RT-PCR 检测 293T 细胞中胰岛发育相关基因的表达;再用 pAAV-PDX-1 和 pAAV-INS 共转染 293T 细胞 48 h 后,RT-PCR 检测 293T 细胞中 INS 的表达,以期观察 293T 细胞中 PDX-1 基因的表达对胰岛发育相关基因和 INS 基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pAAV-MCS、pAAV-PDX-1,均由中南大学生殖与干细胞工程研究所分子实验室提供;293T 细胞购自 ATCC。

各种限制性内切酶、LA Taq DNA 聚合酶、Dnase I 购自 NEB 公司;Trizol 购自 Invitrogen 公司;dNTP(10 mmol/L)、逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司;低糖 DMEM 购自 Gibeco 公司;小牛血清购自杭州四季青公司;梭华-SofastTM购自厦门太阳马公司。

1.2 INS 基因的克隆及 pAAV-INS 质粒的构建

以人流产胎儿(6 月龄)胰腺 cDNA 为模板、以 5'-gctctagaagaggccatcaagcacatc-3'和 5'-cccaagcttggttcaagggtttattcca-3'为引物(上海生工合成),PCR 扩增包含 INS 基因阅读框架在内的 437 bp 片段。反应体系:2×GC buffer 5 μL,dNTP(各 2.5 mmol/L)1.0 μL,LA Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL,上、下游引物(20 μmol/L)各 0.2 μL,cDNA

模板 0.6 μL。反应条件:94℃预变性 2 min;94℃变性 40 s,60.5℃退火 40 s,72℃延伸 3 min,35 个循环;72℃5 min。PCR 产物经胶回收纯化后与 pMD18-T 载体连接,得到 pMD18-T-INS,经测序正确后用限制性内切酶 Xba I 和 Hind III 切下,连于 pAAV-MCS 的 Xba I 和 Hind III 多克隆位点,得到质粒 pAAV-INS(图 1)。将质粒 pAAV-INS 转化至 DH5α,挑取单菌落,提取质粒进行 PCR 和酶切鉴定。

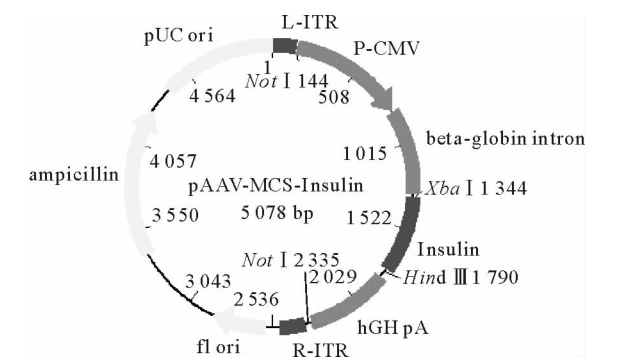


图 1 pAAV-INS 质粒构建示意图

Fig. 1 Scheme of pAAV-INS

1.3 293T 细胞的培养与转染

1.3.1 293T 细胞的培养 293T 细胞用含体积分数 10% FBS 的低糖 DMEM 培养基,于体积分数 5% CO₂、37℃的细胞培养箱中培养,每 3 d 传代 1 次。在转染前传入六孔板中,等细胞长到 70%时,用梭华-SofastTM做转染试剂进行转染。转染方法如下:2 μg DNA 质粒稀释于 100 μL 不含血清和抗菌素的 DMEM 中,轻轻混匀;3~6 μL 梭华-SofastTM稀释于 100 μL 不含血清和抗菌素的 DMEM 中,轻轻混匀。将 100 μL 梭华-SofastTM的稀释液滴加到 DNA 质粒稀释液中,一边滴加一边混匀,室温孵育 15~20 min,200 μL 梭华-SofastTM/质粒混合物加到每孔中并轻轻摇动使均匀混合。

1.3.2 pAAV-PDX-1 转染 293T 细胞及 RT-PCR 检测 293T 细胞胰岛发育相关基因的表达 用 pAAV-MCS、pAAV-PDX-1 各单独转染 293T 细胞,48 h 后,用 Trizol 法提取总 RNA,经 Dnase I 处理后,逆转录得到 cDNA。胰岛发育相关基因扩增引物见表 1,引物由上海生工合成。反应体系:ddH₂O 6.2 μL,10×buffer 1.0 μL,MgCl₂(25 mmol/L)0.8 μL,dNTP Mix(各 2.5 mmol/L)1.0 μL,Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL,上、下游引物(20 μmol/L)各 0.2 μL,cDNA 模板 0.6 μL。反

应条件:94 ℃预变性 2 min;94 ℃变性 30 s,退火(退 ℃ 5 min。PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖电泳检测。
火温度见表 1)30 s,72 ℃延伸 30 s,35 个循环;72

表 1 检测胰岛发育相关基因表达的 PCR 引物

Table 1 PCR primer for the Insulin-secreting cell related genes

基因名称 Gene	上游引物(5' → 3') Forward primer(5' → 3')	下游引物(5' → 3') Revered primer(5' → 3')	退火温度/℃ T _m	片段长度/bp Length
PDX-1	GGATGAAGTCTACCAAAGCTCACGC	CCAGATCTTGATGTGTCTCTCGGTC	54	217
INS	AGCCTTTGTGAACCAACACC	GCTGGTAGAGGGAGCAGATG	56	244
ISL1	GATTTCCCTATGTGTTGGTTGC	CTTCCACTGGGTTAGCCTGTAA	57	720
Ngn3	CAATCGAATGCACAACCTCA	GGGAGACTGGGGAGTAGAGG	60	253
Pax4	GTGGGCAGTATCCTGATTCACT	TGTCACCTCAGACACCTTTCTGG	54	308
Pax6	GCCTTTTATTGTGAGAGTG	CTCACACATCCGTTGGACAC	56.6	251
BETA2	CAGAACCAGGACATGCC	ATCAAAGGAAGGGCTGGTG	58	217
PC2	GCATCAAGCACAGAC	GAGACACAACCACC	58.7	314
β-actin	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG	TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT	60.5	243

1.3.3 pAAV-PDX-1 和 pAAV-INS 共转染 293T 细胞及 RT-PCR 检测 293T 细胞中 INS 基因的表达
为进一步观察 PDX-1 对外源 INS 基因表达的影响,将质粒 pAAV-PDX-1 或空质粒 pAAV-MCS 分别与 pAAV-INS 共转染 293T 细胞,以及将质粒 pAAV-INS 单独转染 293T 细胞 48 h 后,RT-PCR 检测 293T 细胞中 INS 基因的表达。

INS,质粒 pAAV-INS 经 PCR 扩增及 *Xba* I 和 *Hind*Ⅲ酶切验证(图 4),结果均表明质粒 pAAV-INS 正确。

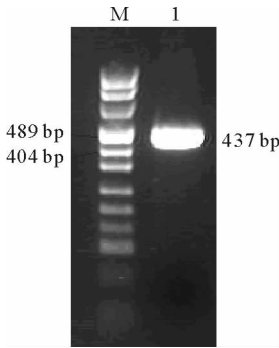


图 2 INS 阅读框架的 PCR 扩增产物
M. pUC Mix8 Marker;1. INS 阅读框架 PCR 扩增产物

Fig.2 PCR production of the INS ORF

M. pUC Mix8 Marker;
1. PCR production of the INS ORF

2 结果与分析

2.1 INS 基因的克隆及 pAAV-INS 质粒的构建

以人胰腺 cDNA 为模板,用 PCR 方法扩增 INS 基因的阅读框架,产物长度为 437 bp(图 2),经胶回收纯化后与 pMD18-T 载体连接,得到质粒 pMD18-T-INS,经 PCR 扩增、*Xba* I 和 *Hind* Ⅲ 酶切验证及测序(TaKaRa 公司,图 3),结果均表明所插入的目的片段正确。将目的片段插入 pAAV-MCS 的 *Xba* I 和 *Hind* Ⅲ 多克隆位点中,构建质粒 pAAV-

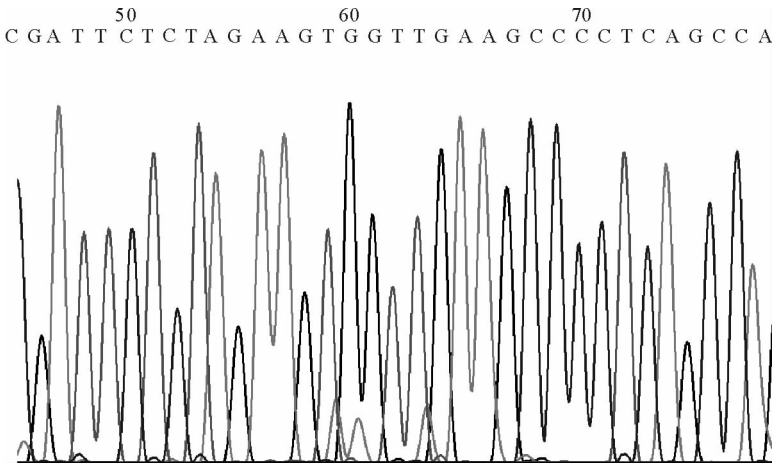


图 3 pMD18-T-INS 测序图
Fig.3 The map of pMD18-T-INS sequencing

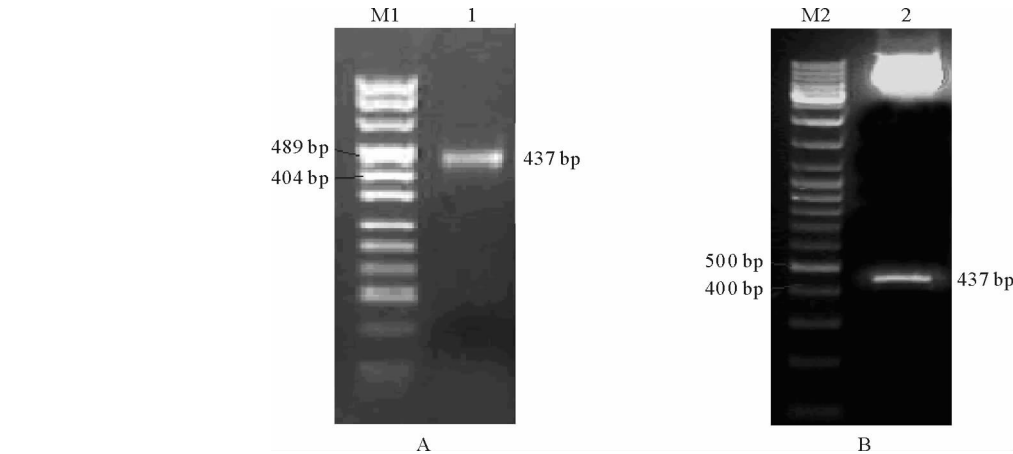


图 4 质粒 pAAV-INS 的 PCR 鉴定(A)和酶切验证(B)

M1. pUC Mix8 Marker;M2. SW0331 Marker;1. pAAV-INS 的 PCR 产物;2. pAAV-INS 经 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切产物

Fig. 4 PCR (A) and the enzymetic digestion identification (B) of pAAV-INS positive clone

M1. pUC Mix8 Marker;M2. SW0331 Marker;1. PCR identification of pAAV-INS positive clone;

2. Identification of pAAV-INS positive clone by enzymetic digestion(*Xba* I and *Hind* III)

2.2 PDX-1 对 293T 细胞中胰岛发育相关基因表达的影响

pAAV-PDX-1 转染 293T 细胞 48 h 后,RT-PCR 检测 293T 细胞转染 pAAV-PDX-1 前后胰岛发育相关基因表达的变化,结果表明,在转染 pAAV-PDX-1 48 h 后,293T 细胞中检测到胰岛发育相关基因 PDX-1、Ngn3、PC2、BETA2 的表达,而未转染的和转染 pAAV-MCS 的 293T 细胞中未检测到这些基因的表达(图 5)。

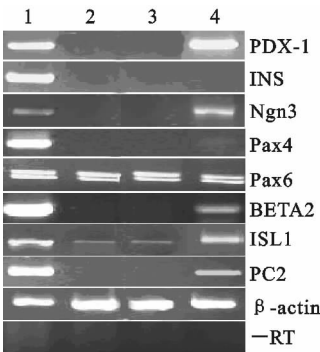


图 5 转染 pAAV-PDX-1 293T 细胞中胰岛发育相关基因表达的 RT-PCR 检测结果

1. 人胰腺 cDNA;2. 未转染的 293T 细胞;3. 转染 pAAV-MCS 的 293T 细胞;4. 转染 pAAV-PDX-1 的 293T 细胞

Fig. 5 Analysis of the expression of pancreatic development-related genes in the 293T cells by RT-PCR

1. Human pancreas cDNA;2. Untransfected 293T cells;

3. 293T cells transfected pAAV-MCS;

4. 293T cells transfected pAAV-PDX-1

2.3 PDX-1 对外源 INS 基因表达的影响

将质粒 pAAV-PDX-1 或空质粒 pAAV-MCS 分别与 pAAV-INS 共转染 293T 细胞,以及将质粒 pAAV-INS 单独转染 293T 细胞 48 h 后,RT-PCR 检测 293T 细胞中 INS 基因的表达,结果表明,INS 基因在 pAAV-PDX-1 和 pAAV-INS 共转染 293T 细胞中的表达,与 pAAV-MCS 和 pAAV-INS 共转染 293T 细胞、pAAV-INS 单独转染 293T 细胞中的表达相比,无明显改变(图 6)。

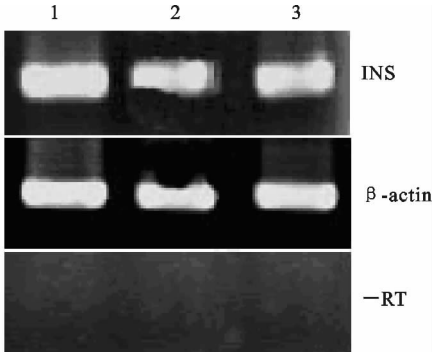


图 6 人 INS 基因表达的 RT-PCR 检测结果

1. pAAV-PDX-1 和 pAAV-INS 共转染的 293T 细胞;

2. pAAV-MCS 和 pAAV-INS 共转染的 293T 细胞;

3. pAAV-INS 单独转染的 293T 细胞

Fig. 6 Analysis of expression of human insulin genes in the 293T cells by RT-PCR

1. 293T cells transfected with pAAV-PDX-1 and pAAV-INS;

2. 293T cells transfected with pAAV-MCS and pAAV-INS;

3. 293T cells transfected with pAAV-INS

3 讨 论

Yoshida 等^[7]构建了 pCDNA3.1-PDX-1 载体并将其转入小肠上皮细胞中,得到表达 PDX-1 的细胞,但未检测到胰岛素的产生,然而将这些细胞移植到肾囊内 2 周后,表达 PDX-1 的细胞开始有胰岛素产生;研究还发现,将表达 PDX-1 的细胞用 β 细胞素(Betacellulin)处理后也出现了与移植到肾囊下相同的效果,表达 PDX-1 的细胞有胰岛素产生。Yoshida 等^[7]认为,小肠上皮细胞能转化为产生胰岛素的细胞可能是以下两个原因引起的:一是小肠上皮细胞与胰岛 β 细胞有相似的发育起源,二是小肠上皮细胞中存在分化和未分化的细胞,未分化的细胞具有分化为其他细胞的能力。Shternhall-Ron 等^[8]认为,PDX-1 基因能引起肝细胞的再分化,用重组的腺病毒介导的 PDX-1 对糖尿病 CAD-NOD 小鼠进行治疗,结果发现,外源的 PDX-1 在肝脏细胞中表达,能引起肝细胞胰腺发育相关基因的表达,并能分泌胰岛素。通过 Ad-CMV-PDX-1 处理的糖尿病 CAD-NOD 小鼠中有 45% 的恢复正常体质量和血糖。所以认为 PDX-1 可用于糖尿病的基因治疗。

Horb 等^[9]利用转分化技术,通过在肝实质细胞中表达 PDX-1 基因,使得肝脏细胞转化成为具有内分泌和外分泌活性的胰腺细胞。Michal 等^[10]通过表达 PDX-1 基因诱导人胎儿肝脏细胞(FH 细胞)分化成产胰岛素的细胞,并在 FH 细胞中引入人端粒酶催化亚基,使其成为永生化的人胎儿肝脏祖细胞(FH-hTERT),因而具备了良好的复制能力,无论在体内或是在体外试验中,FH-hTERT 细胞都未转化成肿瘤细胞。永生化 FH-hTERT 细胞表达 PDX-1 基因,而且在 PDX-1 的调节下产生、贮存了大量的胰岛素,并能在葡萄糖的刺激下释放胰岛素。将此细胞移植给患高血糖症的小鼠,可使小鼠血糖恢复并保持正常水平。Sapir 等^[6]将大鼠 PDX-1 基因转入人 22 周龄胚胎肝细胞和成年肝细胞中,发现 PDX-1 基因的表达引起了一系列胰岛发育相关基因的表达,并且人 22 周龄胚胎肝细胞和成年肝细胞这两类肝细胞都有胰岛素基因的表达。把转染 PDX-1 的肝细胞移植到糖尿病小鼠的肾囊下后,糖尿病小鼠血糖浓度明显降低。Sapir 等^[6]还发现,PDX-1 阳性的肝细胞通过在培养基中加入一些可溶性因子,如尼克酰胺和表皮生长因子(EGF)后产生胰岛素的量明显增多。

本研究用质粒 pAAV-PDX-1 转染 293T 细胞,

结果表明,在转染 pAAV-PDX-1 48 h 后,293T 细胞被检测到有胰岛发育相关基因 PDX-1、Ngn3、PC2、BETA2 的表达,但未检测到 INS 基因的表达,这一结果与 Yoshida 等^[7]用 pCDNA3-PDX-1 质粒转入小肠上皮细胞中的结果相同。

为进一步观察 PDX-1 对 INS 基因表达的影响,本研究用 pAAV-PDX-1 或 pAAV-MCS 与 pAAV-INS 共转染 293T 细胞,以及 pAAV-INS 单独转染 293T 细胞 48 h 后,RT-PCR 检测 293T 细胞中 INS 基因的表达,结果表明,上述 3 种转染组合未见有明显差异。这说明 PDX-1 的表达对 INS 基因的表达没有直接的促进作用。

综合以上结果表明,在 293T 细胞中,PDX-1 基因对胰岛发育相关基因的表达有重要影响,PDX-1 在诱导非 β 细胞为胰岛素分泌细胞的过程中可能有着重要的作用。至于其诱导机理目前尚不清楚,有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Stephan C C, Chang K C, Lejeune W, et al. Role for heparin-binding growth factors in glucose-induced vascular dysfunction [J]. *Diabetes*, 1998, 47(11): 1771-1778.
- [2] Milewski W M, Duguay S J, Chan S J, et al. Conservation of PDX-1 structure, function, and expression in zebrafish [J]. *Endocrinology*, 1998, 139(3): 1440-1449.
- [3] Ashizawa S, Brunicardi F C, Wang X P, et al. PDX-1 and the pancreas [J]. *Pancreas*, 2004, 28(2): 109-120.
- [4] Melloul D. Transcription factors in islet development and physiology: Role of PDX-1 in beta-cell function [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1014: 28-37.
- [5] Ber I, Shternhall K, Perl S, et al. Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(34): 31950-31957.
- [6] Sapir T, Shternhall K, Meivar-Levy I, et al. Cell-replacement therapy for diabetes: Generating functional INS-producing tissue from adult human liver cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(22): 7964-7969.
- [7] Yoshida S, Kajimoto Y, Yasuda T, et al. PDX-1 induces differentiation of intestinal epithelioid IEC-6 into insulin-producing cells [J]. *Diabetes*, 2002, 51: 2505-2513.
- [8] Shternhall-Ron K, Quintana F J, Perl S, et al. Ectopic PDX-1 expression in liver ameliorates type I diabetes [J]. *J Autoimmunity*, 2007, 28(2/3): 134-142.
- [9] Horb M E, Shen C N, Tosh D, et al. Experimental conversion of liver to pancreas [J]. *Current Biology*, 2003, 13(2): 105-115.
- [10] Michal Z, Gupta S, Giri R K, et al. Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(12): 7253-7258.