

Pdx1 与 Ngn3 协同诱导 LO2 细胞 分化为胰腺 β 样细胞

郭 敏, 唐小龙, 张 涓

(暨南大学医学院血液病研究所, 广东 广州 510632)

[摘 要] 目的: 胰腺十二指肠同源框蛋白 1(Pdx1)与神经源素 3(Ngn3)联合诱导肝实质细胞向胰腺 β 样细胞分化。方法: 以人胚胎胰腺组织基因组的 mRNA 为模板经 RT-PCR 扩增获得 Pdx1 与 Ngn3 基因。应用分子生物学技术, 分别克隆到真核表达载体 pEGFP-C1 的多克隆位点中, 构建 pEGFP-C1/Pdx1 与 pEGFP-C1/Ngn3 真核表达质粒, 并共转染 LO2 细胞, 用 RT-PCR、免疫组化、间接荧光法检测目的基因及胰岛素相关基因葡萄糖转运体 2(GLUT2)与胰岛素的表达情况。结果: 目的基因克隆正确, RT-PCR、免疫组化、间接荧光证实转染后 LO2 细胞中有 Pdx1、Ngn3 和胰岛素及胰岛素相关基因 GLUT2 的表达。结论: Pdx1 与 Ngn3 协同作用可诱导肝实质细胞向胰腺 β 样细胞分化。

[关键词] 胰腺十二指肠同源框蛋白 1; 神经源素 3; LO2 细胞; 转分化; 胰腺 β 样细胞

[中图分类号] R322.4; Q813 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2008)04-0351-06

Pdx1 and Ngn3 co-induce the LO2 cell differentiation into the pancreatic β -cells

GUO Ming, TANG Xiao-long, ZHANG Yuan

(Institute of Hematology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Aim:** To explore the function of Pdx1 and Ngn3 in hepatic parenchymal cells to islet β -like cells differentiation. **Methods:** We obtained the Pdx1 gene and Ngn3 gene exon by using human embryo pancreas tissue mRNA as the template, and cloned them into multiple cloning sites of eukaryotic expression vector pEGFP-C1 to construct pEGFP-C1/Pdx1 and pEGFP-C1/Ngn3 eukaryotic expression plasmid, and the constructed plasmid was transfected LO2 cell. The expression of target gene, GLUT2 and insulin were detected by RT-PCR, immunohistochemistry, indirect fluorescence assay. **Results:** The target genes were successfully cloned, there were Pdx1, Ngn3, insulin and insulin related gene glucose transporter 2 (GLUT2) expression in transfected cells. **Conclusion:** The synergism of Pdx1 and Ngn3 were able to induct hepatic parenchymal cells to islet β -like cells differentiation.

[Key words] pancreatic and duodenal homeobox factor 1; neurogenin3; LO2 cell; transdifferentiation; pancreatic β -cells

糖尿病是一类严重危害人类健康的疾病,并且呈逐年上升趋势,而胰岛移植以及相关细胞的替代治疗是一种有可能根治的方法,但供体细胞来源的缺乏在一定成度上限制了此法应用,寻求足够的细胞来源就成为当务之急。在胰腺发育过程中,胰腺十二指肠同源框蛋白 1 (pancreatic and duodenal homeobox factor 1, Pdx1) 对早期胰腺分化以及胰腺内分泌细胞分化和功能的成熟起关键作用^[1-2];神经源素 (neurogenin 3, Ngn3) 对胰腺祖细胞向内分泌细胞分化也起重要作用^[3],此外,还存在许多因素控制着最后的 α 、 β 、 δ 、和 PP 细胞的命运,尤其是它们所调控的下游因子 NKX2.2, PAX4, NKX6.1 的活化对 β 细胞表型分化也非常重要。在机体的发育过程中,胰腺和肝脏均来源于中胚层,这为研究将肝实质细胞向胰腺样细胞转分化提供了理论基础^[4]。本研究的目的是 Pdx1 与 Ngn3 协同能否使肝细胞转化为胰腺 β 样细胞或诱导后具有胰腺 β 样生物特性细胞。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

正常人肝实质不表达内源性 Pdx1 与 Ngn3 基因的 L02 细胞株购于上海细胞库。大肠杆菌 DH5 α 和质粒 pEGFP-C1 均为本实验室保存。RT-PCR 试剂盒、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nhe* I、*Xho* I、*Bgl* II、*Eco*R I 等和 DNA marker 购自大连宝生物公司;质粒提取试剂盒和 DNA 胶回收纯化试剂盒购自 Omegar 公司。PCR 引物与测序由上海生工生物工程公司完成。即用型免疫组化试剂盒和 DAB 酶底物显色试剂盒购自北京鼎国生物科技公司;鼠抗人 Pdx1 和 Insulin、兔抗人 Ngn3 和 GLUT2 抗体购自 Abcam 公司;HRP-抗鼠 IgG、HRP-抗兔 IgG、CY5-抗鼠 IgG、FITC-抗鼠 IgG 与 FITC-抗兔 IgG 购自 Bethyl 公司。

1.2 Pdx1 与 Ngn3 的 RT-PCR 扩增

参照 GenBank 人 Pdx1 的 CDS 序列设计引物如下:其中 Pdx1 上游引物 P1:5'-AAGCTAGCCCG-CAGCC ATGA-3',含 *Nhe* I 位点起始密码子 ATG,下游 P2:5'-TCCTCGAG TGATCCTGGTTCCTG-3',含 *Xho* I 位点与终止密码子 TGA,扩增基因长度为 882 bp。Ngn3 上游引物 P3:5'-TTAGATCTGCTAGAAAG-GATGACGC-3',含 *Bgl* II 位点和起始密码子 ATG,下游 P4:5'-CG GAATTCAGGTCCTTTGACAG-3',含

*Eco*R I 位点与终止密码子 TGA,扩增基因长度为 678 bp。

用 Trizol 三步法提取经产妇同意的自然流产人胚胎胰组织 RNA,DEPC-H₂O 溶解 RNA,检测 OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 值进行 RNA 纯度及含量计算,实验重复 3 次,每次做复管。反转录转录合成 cDNA。PCR 分别扩增 Pdx1 和 Ngn3 基因。反应体系按说明书,反应条件分别为:Pdx1 为 95 °C 预变性 5 min,95 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 60 s,35 个循环,72 °C 10 min;Ngn3 为 95 °C 5 min,95 °C 30 s,54.5 °C 30 s,72 °C 60 s,35 个循环,72 °C 10 min。扩增产物取 5 μ L 在质量分数为 2.0% 琼脂糖凝胶电泳,确定扩增产物大小正确无误。

1.3 载体的构建、鉴定与包装

Pdx1 的 RT-PCR 产物经过回收纯化后与 pEGFP-C1 质粒同时用 *Nhe* I + *Pme* I 双酶切后,电泳纯化后,酶切纯化的产物按照 3:1 的摩尔比混合,用 T₄ DNA 连接酶连接 24 h,转化用低温 CaCl₂ 制备的 *E. coli* DH5 α 感受态细菌,于含卡那霉素 30 μ g/mL 的 LB 固体培养基中,次日随机挑取数个单菌落,分别接种于 3 mL 含卡那霉素的 LB 培养液中,37 °C 下 150 r/min 振荡培养过夜。分别取少量菌液煮沸作为模板进行菌落 PCR 检测是否有 Pdx1 的存在,将菌落 PCR 筛选呈阳性的菌落用质粒提取试剂盒抽提质粒 DNA,*Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切质粒 DNA 后电泳检测。阳性克隆的菌液测序鉴定,测序采用 Sanger 双脱氧链终止法,对插入序列的两端进行测定,测序工作由上海生物工程公司完成。pEGFP-C1/Ngn3 质粒载体构建将 Ngn3 与 pEGFP-C1 质粒同时用 *Bgl* II + *Eco*R I 双酶切后,余下同 pEGFP-C1/Pdx1 载体的构建步骤。

1.4 细胞转染与观察

取对数生长期的 L02 细胞接种在 6 孔板内,待细胞生长至 60% ~ 70% 时,直接在体积分数 10% 新生牛血清的完全培养基的培养板中按(生理盐水:转染试剂 = 8:1)比例加入阳离子聚合物转染试剂 JetPEI (tm)和质粒 pEGFP-N1/Pdx1 与 pEGFP-C1/Ngn3 的混合物,细胞隔天换液,培养 24 h 后,检测 Pdx1 和 Ngn3 的表达情况。

1.5 免疫组化、间接免疫荧光检测

检测目的细胞固定后,用 PBS 冲洗,依次滴加过氧化酶阻断剂,正常动物非免疫血清封闭,分别与鼠抗人 Pdx1 和 Insulin、兔抗人 Ngn3 和 GLUT2 抗体

反应后,分别用HRP-抗鼠/兔二抗、CY5-抗鼠、FITC-抗兔二抗再进行反应,免疫组化DAB显色,荧光反应用houchest复染细胞核,镜下检测。免疫组化时呈棕黄色者为阳性;间接荧光时,细胞核为深蓝色为阴性,核为红色为阳性。

1.6 RT-PCR检测目的基因、胰岛素与GLUT2表达

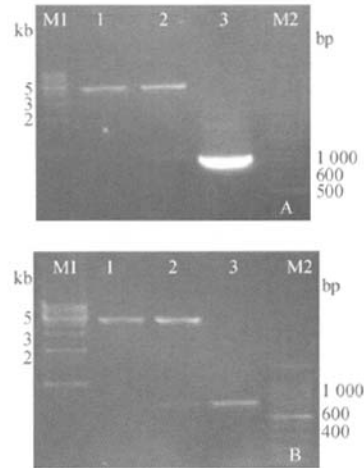
提取LO2靶细胞中的总RNA后进行反转录。Pdx1与Ngn3分别用下述引物与反应条件检测在细胞中的表达水平。Pdx1上游引物P5为5'-TGGCA-CATCTTCACCATCA-3',下游引物P6为5'-GCAGTC-CTGCTCAGGCTCT-3',扩增目的基因片段长度为446bp;Ngn3上游引物P7为5'-AAAGCGAGTTG-GCCTAAGCA-3',下游引物P8为5'-CGTCTGG-GAAGGTGGGAAGTA-3',扩增目的基因片段长度为132bp;反应条件均为:95℃预变性5min,95℃30s,55℃30s,72℃60s,35个循环,72℃10min。葡萄糖转运体2(glucose transporter, GLUT2)上游引物P9为5'-AGGACTTCTGTGGACCTTATGTG-3',下游引物P10为5'-GTTTCATGTCAAAAAGCAGGG-3',扩增目的基因片段长度为380bp;反应条件分别为:95℃预变性5min,95℃30s,55℃30s,72℃60s,35个循环,72℃10min。胰岛素上游引物P11为5'-AGCCTTTGTGAACCAACACC-3',下游引物P12为5'-GCTGCTAGAGGGAGCAGATG-3',扩增目的基因片段长度为246bp;反应条件分别为:95℃预变性5min,95℃30s,65℃30s,72℃60s,35个循环,72℃10min。内参GAPDH上游引物P13为5'-GTCAGTGCTGGACCTGACCT-3',下游引物P14为5'-TGAGGAGGGGAGATTTCAGTG-3',扩增基因片段长度为400bp。反应条件分别为:95℃预变性5min,95℃30s,57℃30s,72℃60s,35个循环,72℃10min。扩增产物取5μL在质量分数为2.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 限制性内切酶酶切、PCR结果与序列分析鉴定

融合质粒pEGFP-C1/Pdx1经Nhe I和Xho I双酶切后,电泳可见大小约为6.1kb与0.88kb两片段,载体pEGFP-C1经上述两个酶双酶切后,仅见一条6.1kb的片段,以P1、P2为引物,以融合质粒pEGFP-C1/Pdx1为模板,可扩增出约0.88kb的产

物(见图1A);融合质粒pEGFP-C1/Ngn3经Bgl II和EcoR I双酶切后,电泳可见大小约为6.1kb与0.68kb两片段,载体pEGFP-C1经上述两个酶双酶切后,仅见一条6.1kb的片段,以P3、P4为引物,以融合质粒pEGFP-C1/Ngn3为模板,可扩增出约0.68kb的产物(见图1B)。对上述二质粒上MCS内的DNA序列进行序列分析鉴定,测序结果与人Pdx1和Ngn3的序列完全相同。



M1:1 kb DNA marker; M2:100 bp DNA marker. (图A) 1: Nhe I与Xho I酶切pEGFP-C1; 2 Nhe I与Xho I酶切pEGFP-C1/Pdx1; 3:Pdx1 PCR product. (图B) 1: Bgl II与EcoR I酶切pEGFP-C1; 2 Bgl II与EcoR I酶切pEGFP-C1/Ngn3; 3:Ngn3 PCR product

图1 pEGFP-C1/Pdx1与pEGFP-C1/Ngn3质粒酶切图

2.2 荧光观察

pEGFP-C1/Pdx1与pEGFP-C1/Ngn3共转染LO2细胞24h与72h后,荧光显微镜镜下观察,24h后可观测到转染细胞内有较强的绿色荧光,72h后细胞阳性率仍较高,通过读数阳性细胞率约60%~70%,见图2。

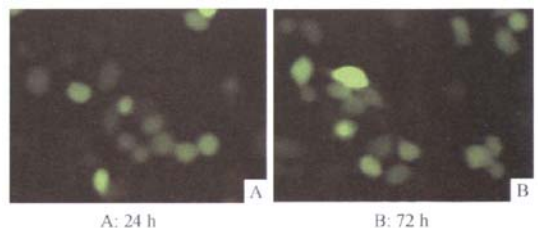
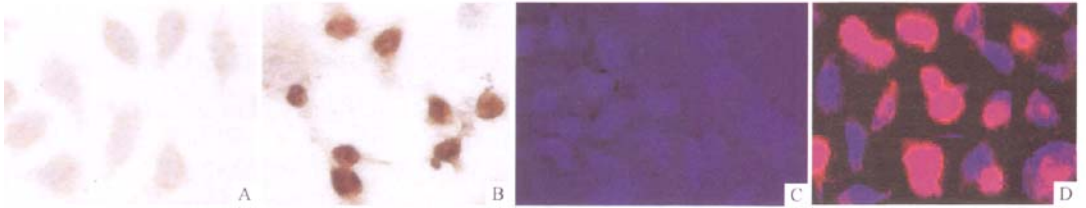


图2 荧光显微镜检测pEGFP-C1/Pdx1与pEGFP-C1/Ngn3共转染LO2细胞

2.3 Pdx1 和 Ngn3 转录因子在 L02 细胞中表达

采用转染了空载体的细胞为阴性对照。免疫组化染色检测显示, pEGFP-C1/Pdx1 与 pEGFP-C1/Ngn3 共转染的 L02 细胞中 Pdx1 高表达,棕黄色阳性

信号主要位于胞核,而胞质中相对较少,见图 3(A,B)所示;间接荧光显示,部分 L02 细胞核内 Ngn3 也有表达,红色阳性信号位于胞核中,图 3(C,D)所示。

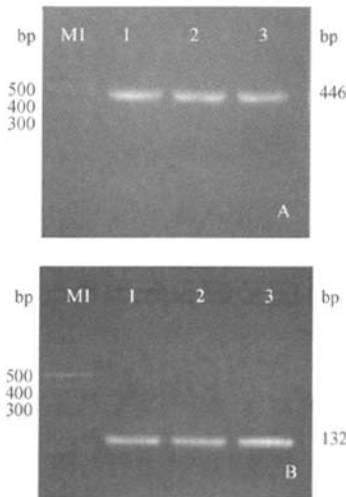


A:阴性对照组; B: Pdx1 阳性组; C:阴性对照组; D: Ngn3 阳性组

图 3 Pdx1 和 Ngn3 在 L02 细胞中表达

2.4 RT-PCR 检测

收集 pEGFP-C1/Pdx1 与 pEGFP-C1/Ngn3 共转染后 1、4 和 8 d 的 L02 细胞,提取 mRNA 进行反转录后,RT-PCR 检测结果有目的基因 Pdx1 和 Ngn3 的表达,见图 4。



1、2、3 分别代表第 1 d、4 d 和 8 d.

图 4 pEGFP-C1/Pdx1 与 pEGFP-C1/Ngn3 共转染的 L02 细胞中 Pdx1 和 Ngn3 基因表达

2.5 间接荧光检测胰岛素与 GLUT2 表达

间接荧光检测显示, pEGFP-C1/Pdx1 与 pEGFP-C1/Ngn3 转染后的第 30 天的 L02 细胞中胰岛素与 GLUT2 表达呈阳性,其中胰岛素主要位于胞质,阳性细胞质为红色;而 GLUT2 主要集中于细胞质中与细胞膜上,细胞质呈绿色,Houchest 特异性结合细胞核而使其显示深蓝色荧光,见图 6。

收集 pEGFP-C1/Pdx1 与 pEGFP-C1/Ngn3 共转染后 15、20、25 与 30 d 的 L02 细胞,提取 mRNA 进行反转录后,RT-PCR 检测结果有胰岛素与 GLUT2 基因表达,见图 5。

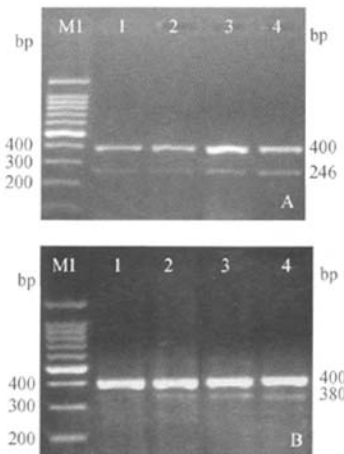


图 5 pEGFP-C1/Pdx1 与 pEGFP-C1/Ngn3 转染的 L02 细胞中胰岛素和 GLUT2 基因表达

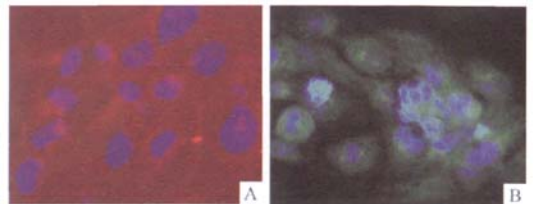


图 6 胰岛素(A)与 GLUT2(B)在 L02 中表达的间接荧光检测结果(×200)

3 讨论

胰腺十二指肠同源框蛋白1(Pdx1)是胰岛内分泌细胞群发育的关键基因之一,现已知其翻译的因子蛋白Pdx1蛋白含有若干个转录调控区域,Pdx1可借助N-末端转录调控相关功能结构域与胰岛素基因启动子A3区的GG2元件(-145~-140 bp)上结合,调控胰岛素转录和分泌,但Pdx1这种效应需多种分子协同作用;同时Pdx1也可与葡萄糖载体2(GLUT2)的TATA盒结合,并参与GLUT2转录^[5-7]。近年的研究证明Pdx1基因在诱导胰腺分化及发育中的作用:只有当Pdx1基因活化后,在相关诱导因子及相关信号通路活化的联合作用才有可能使间充质干细胞向胰腺β样细胞方向分化,说明Pdx1基因在胰腺分化过程中起到“总开关”的作用^[8-10]。有研究证明用Pdx1基因可诱导肌细胞转化为产胰岛素的β样细胞^[11-12]。而神经源素(Ngn3)调控早期胰腺发育和内分泌分化程序,Ngn3对从胰腺祖细胞向内分泌细胞分化以及诱导NeuroD1因子而增强胰岛素基因转录与生物合成等起到重要作用^[13],因而Pdx1与Ngn3在胰腺的发育过程也是必不可少的,对下游一系列基因的活化,启动相关转录因子的表达,从而对胰岛的内分泌细胞定向分化具有关键作用^[14],提示Pdx1与Ngn3可能在胰岛β细胞定向分化发育过程中可能具有一定的协同作用,因此选择Pdx1与Ngn3基因,协同诱导肝实质细胞,观察其是否具有诱导肝实质细胞向胰腺β样细胞分化的作用。

酶切电泳结果显示成功构建pEGFP-C1/Pdx1和pEGFP-C1/Ngn3,通过相应的酶切与PCR均获得目的大小的DNA片段。进一步扩增并提取pEGFP-C1/Pdx1和pEGFP-C1/Ngn3质粒并共转染L02细胞,于24 h后即可在观察到L02细胞内pEGFP-C1质粒上所带的报告基因EGFP所激发的绿色荧光,提示所构建的pEGFP-C1/Pdx1和pEGFP-C1/Ngn3载体可以有效地转染靶细胞,进一步RT-PCR检测到载体所带的目的基因Pdx1与Ngn3在细胞内表达,免疫细胞化学与间接荧光也证实Pdx1与Ngn3基因在细胞内有效表达。

为进一步研究目的基因Pdx1与Ngn3诱导L02细胞转分化为胰腺β样细胞的能力,检测了β样细

胞的关键标志分子——胰岛素与胰腺β细胞分化成熟的标志分子——葡萄糖转运体2(GLUT2)。通过pEGFP-C1/Pdx1和pEGFP-C1/Ngn3持续作用于L02细胞,第5天后部分细胞开始变圆,并有一定的聚集趋势;诱导2周以后,RT-PCR结果显示在细胞中可以检测胰岛素的表达,20 d后胰腺内分泌细胞相关转录因子葡萄糖转运体2(GLUT2)开始表达;间接免疫荧光也显示L02细胞内胰岛素与GLUT2表达,且主要存在于细胞质中和细胞膜上。胰岛素的表达显示Pdx1与Ngn3双基因可以诱导靶细胞合成并表达胰岛素而成为β样细胞。而GLUT2是存在于β细胞中的一种特殊跨膜转运蛋白,可转运葡萄糖入胞内,并调节细胞膜上的离子通道,促进细胞内储存的胰岛素颗粒分泌,被认为GLUT2是胰腺β细胞分化成熟的标志之一;GLUT2在L02细胞内表达提示靶细胞的不仅具有β样细胞表型,而且具有β细胞相关的部分生物学功能,提示Pdx1与Ngn3双基因联合,在诱导细胞转分化为β样细胞方面具有协同作用,可启动部分β细胞功能相关的基因表达,但具体机制尚不清楚。

尽管实验结果证明诱导后的细胞具有β样细胞的表型与部分功能,但表达的胰岛素是胰岛素原或在相应蛋白酶作用下分解而具有相应的生物学功能的胰岛素;是否对高糖具有相应生理反应尚不清楚;但结果提示:功能相关的转录因子Pdx1与Ngn3之间可能存在某种相互协同作用网络,对指导体外β细胞工程具有重要意义,进而为治疗糖尿病提供实验基础。

[参考文献]

- [1] DOYLE M J, LOOMIS Z L, SUSSEL L. Nkx2.2-repressor activity is sufficient to specify {alpha}-cells and a small number of {beta}-cells in the pancreatic islet[J]. *Development*, 2007, 134(3): 515-523.
- [2] WANG A Y, EHRHARDT A, XU H, et al. Adenovirus transduction is required for the correction of diabetes using pdx1 or neurogenin3 in the liver[J]. *Mol Ther*, 2007, 15(2):255-263.
- [3] FUJITANI Y, FUJITANI S, BOYER D F, et al. Targeted deletion of a cis-regulatory region reveals differential gene dosage requirements for pdx1 in foregut organ differentiation and pancreas formation[J]. *Genes & Dev*,

- 2006, 20(2): 253 - 266.
- [4] YATOH S, AKASHI T, CHAN P P, et al. NeuroD and reaggregation induce beta-cell specific gene expression in cultured hepatocytes [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2007, 23(3): 239 - 249.
- [5] BEN-SHUSHAN E, MARSHAK S, SHOSHKES M, et al. A pancreatic β -cell-specific enhancer in the human PDX-1 gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 3 β (HNF-3 β), HNF-1 α , and SPs transcription factors [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(20): 17533 - 17540.
- [6] RAUN J C, GERRISH K, ARTNER I, et al. FoxA2, Nkx2.2, and PDX1 regulate islet beta-cell-specific *mafa* expression through conserved sequences located between base pairs -8118 and -7750 upstream from the transcription start site [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(15): 5735 - 5743.
- [7] LAVON N, YANUKA O, BENVENISTY N. The effect of overexpression of *pdx1* and *foxa2* on the differentiation of human embryonic stem cells into pancreatic cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(8): 1923 - 1930.
- [8] JOHANSSON K A, DURSUN U, JORDAN N, et al. Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types [J]. *Dev Cell*, 2007, 12(3): 457 - 465.
- [9] MELLITZER G, BONNE S, LUCO R F, et al. IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas [J]. *EMBO J*, 2006, 25(6): 1344 - 1352.
- [10] WANG H, MAECHLER P, RITZ-LASER B, et al. *Pdx1* level defines pancreatic gene expression pattern and cell lineage differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(27): 25279 - 25286.
- [11] CAO L Z, TANG D Q, HORB M E, et al. High glucose is necessary for complete maturation of *pdx1*-VP16-expressing hepatic cells into functional insulin-producing cells [J]. *Diabetes*, 2004, 53(12): 3168 - 3178.
- [12] KIM W H, LEE J W, SUH Y H, et al. Exposure to chronic high glucose induces β -cell apoptosis through decreased interaction of glucokinase with mitochondria: downregulation of glucokinase in pancreatic β -cells [J]. *Diabetes*, 2005, 54(9): 2602 - 2611.
- [13] GERRISH K, VAN VELKINBURGH J C, STEIN R. Conserved transcriptional regulatory domains of the *pdx1* gene [J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18(3): 533 - 548.
- [14] GERRISH K, VAN VELKINBURGH J C. Conserved transcriptional regulatory domains of the *pdx1* gene [J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18(3): 533 - 548.

[责任编辑:朱颖娜]