文章编号:1000-5404(2007)24-2361-03

论著

稳定表达人胰岛素原突变基因的HepG2细胞构建及其胰岛素分泌

郑宏庭[1,2],邓华聪[1],兰丽珍[1],方 芳[2],刘金波[1],李丙蓉[1],蹇 锐[3] ([1]重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆400016;第三军医大学:[2]新桥医院内分泌科,重庆400037,[3]基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆400038)

提 要:目的 构建稳定表达人胰岛素原突变(mutated human proinsulin,mhPINS)基因的HepG2细胞,将HepG2细胞改建为具有胰岛素分泌能力的"胰岛代理细胞"(artificial beta cell)。**方法** 重组逆转录病毒载体pL-mhPINS-SN转包装细胞PA317,经G418筛选,NIH3T3细胞测定病毒滴度,获取高滴度的稳定产毒细胞克隆,以PCR进行鉴定。以mhPINS病毒感染HepG2细胞,经G418筛选,对HepG2/mhPINS细胞进行RT-PCR、Western blot、放免法鉴定,并行葡萄糖刺激的胰岛素分泌检测。**结果** 所获HepG2/mhPINS细胞生长良好,RT-PCR获得286 bp目的条带,Western blot检测可见34×10^3的特异性条带,放免法在其培养上清中检测到胰岛素与C肽,而HepG2/pLXSN细胞上述各项检测均为阴性。葡萄糖刺激的胰岛素分泌检测显示,HepG2/mhPINS细胞在不同葡萄糖浓度(0.1、10、20 mmol/L)条件下引起的胰岛素分泌无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 成功构建稳定表达mhPINS基因的HepG2细胞,其内获得成熟胰岛素的表达与分泌,但其胰岛素分泌对葡萄糖刺激缺乏反应。

关键词:mhPINS基因;逆转录病毒;HepG2细胞;胰岛素
中图法分类号:R322.57;R329.25;R394-33 **文献标识码**:A

Construction and insulin secretion of $HepG_2$ cell stably expressing mutated human proinsulin gene

ZHENG Hong-ting[1,2], DENG Hua-cong[1], LAN Li-zhen[1], FANG Fang[2], LIU Jin-bo[1], LI Bing-rong[1], JIAN Rui[3] ([1]Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Department of Endocrinology, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, [3]Department of Microbiology, College of Medicine, Third Millitary Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct an "artificial beta cell" that possesses mature insulin secretion from a human hepatoma cell line HepG2. **Methods** The recombinant retroviral vector pL-mhPINS-SN was transfected into PA317 packaging cells and selected with G418 selective medium. Virus titer was detected with NIH3T3 cells, and PA317/mhPINS cells were assessed with PCR. HepG2 cells were infected by mhPINS virus and screened with G418. HepG2/mhPINS cells were tested with RT-PCR, Western blot and radioimmunoassay, respectively. The insulin secretion stimulated by glucose in HepG2/mhPINS cells was also detected. **Results** HepG2/mhPINS cells grew well. The target fragment of 286 bp was acquired in RT-PCR. A special strap of 34×10^3 was exhibited in Western blot. Insulin and C peptide were detected in the culture supernatant of HepG2/mhPINS cells by radioimmunoassay. The results of HepG2/pLXSN cells in the detections above were all negative. As shown in detection of glucose-stimulating insulin secretion in HepG2/mhPINS cells, there were no significant differences in the insulin secretion at 0.1, 10, 20 mmol/L glucose concentration ($P>0.05$). **Conclusion** HepG2 cells expressing mhPINS gene were successfully constructed, and the mature insulin secretion was made in HepG2/mhPINS cells.

Key words: mhPINS gene; retrovirus; HepG2 cell; insulin

糖尿病以胰岛素绝对或相对缺乏引致各种代谢紊乱为主要特征,其病因尚未完全阐明。传统治疗手段为外源胰岛素注射,由于与胰岛素分泌的生理模式不符,易致血糖波动和胰岛素剂量不当而引起的相关并发症。细胞移植治疗是近年研究的热点,但由于胰岛β细胞分离与储存技术难度较大,代价昂贵,因此寻找新的移植细胞来源是该方法亟待解决的关键难题[1]。

作者简介:郑宏庭(1974-),男,重庆市人,博士,讲师,主要从事糖尿病基因治疗方面的研究。电话:(023)68774625
通讯作者:邓华聪,电话:(023)68700611
收稿日期:2007-06-25;**修回日期**:2007-07-20

本课题组前期对人胰岛素原基因进行改造，使之能在非内分泌细胞内为 Furin 蛋白酶识别，从而切除 C 肽，表达成熟胰岛素。本研究在此基础上，通过逆转录病毒载体介导的转基因技术，构建了稳定表达经改造的人胰岛素原突变（mutated human proinsulin，mhPINS）基因的 HepG2 细胞，获得成熟胰岛素的表达，旨在为该问题的解决找到一条可能的途径。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

携 mhPINS 基因的重组逆转录病毒载体 pL-mhPINS-SN 由我室兰丽珍[2]博士构建。逆转录病毒载体 pLXSN、荧光质粒 pEGFP-N1 由第三军医大学基础医学部微生物学教研室蹇锐博士惠赠。PA317、NIH3T3 及 HepG2 细胞来自第三军医大学基础医学部微生物学教研室。Lipofectamine2000、Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司，*Taq* 酶购自 Promega 公司，DMEM、HBSS、FBS、G418 购自 Gibco 公司，Polybrene 购自 Sigma 公司，ECL 试剂购自北京中山公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞以含 10% FBS 的 DMEM（高糖）培养基，常规培养。

1.2.2 病毒包装及滴定 以 Lipofectamine2000 介导荧光质粒 pEGFP-N1 转 PA317 细胞，确定转染效率。而后以 pL-mhPINS-SN 转包装细胞 PA317 进行包装，3 d 后接种细胞于 10 cm 培养皿，以 G418 选择培养基（1 mg/ml）筛选，直至抗性细胞克隆形成。用克隆环挑取分隔良好的细胞克隆于 600 μg/ml G418 选择压力下扩大培养，并以 NIH3T3 细胞行病毒滴度测定（滴度按以下公式计算）。选取滴度较高的产毒细胞克隆以 PCR 对 mhPINS 基因整合进行鉴定。

病毒滴度（CFU/ml）=（克隆数 / 病毒原液稀释度）×细胞稀释倍数

1.2.3 mhPINS 病毒感染 HepG2 细胞 感染前 1 d，以 1×10^5/孔接种细胞于 12 孔板。感染当天，移去原有培养液，据病毒滴度加入适量稀释病毒原液，并加 Polybrene 至终浓度 8 μg/ml，吸附 4 h，换 DMEM 培养基培养 12 h。同前感染 HepG2 细胞 3 次，最后一次吸附后将 HepG2 细胞按 1∶20 分传，以 1 mg/ml G418 选择培养基筛选，直至可见抗性细胞克隆形成，挑取分隔良好的抗性细胞克隆扩大培养并行产物鉴定。

1.2.4 RT-PCR 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA，按试剂说明进行。以 mhPINS 特异引物行 RT-PCR 鉴定，上游引物：5′-GCCCTCTGGGGACCTGAC-3′，下游引物：5′-TGCAGTAGTTCTCCAGTTGGTA-3′。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，紫外观察并照相记录。

1.2.5 Western blot 约 5×10^6 个细胞悬于 150 μl PBS 中，加等体积细胞裂解液，超声粉碎。按文献[3]方法行 SDS-PAGE 与 Western blot，ECL 显色，胶片冲洗。

1.2.6 胰岛素与 C 肽检测 收集细胞上清，放免法检测胰岛素与 C 肽含量，由第三军医大学新桥医院内分泌实验室完成。

1.2.7 葡萄糖刺激的胰岛素分泌检测 以 3×10^5/孔接种细胞于 12 孔板，5 h 后移去原有培养液，HBSS 液清洗细胞 2 次，每次 30 min。以不同葡萄糖浓度的 HBSS 液孵育细胞 1 h，放免法检测上清中的胰岛素含量，计算每小时 10^5 个细胞的胰岛素分泌量。

1.3 统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件，组间差异采用方差分析。

2 结果

2.1 病毒滴度测定

以倍比稀释的 PA317/mhPINS 细胞上清感染 NIH3T3 细胞，加入 G418（1 mg/ml）后约 2～3 周可见抗性细胞克隆形成，姬姆萨染色计数克隆数并计算病毒滴度。总共检测到 8 个样品滴度 $>10^5$ CFU/ml，依次为 2.6×10^5、7.4×10^5、4.3×10^5、4.7×10^5、1.4×10^5、6.1×10^5、1.8×10^5、2.3×10^5 CFU/ml，但没有样品滴度 $>10^6$ CFU/ml。

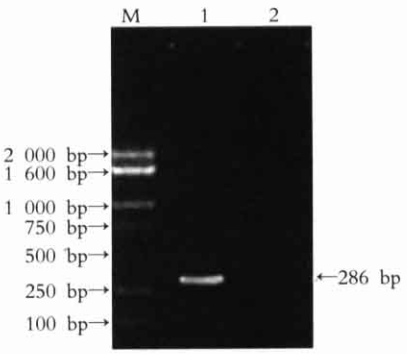
2.2 mhPINS 病毒感染 HepG2 细胞

感染前的 HepG2 细胞生长良好；感染后的 HepG2 细胞，在加入 G418（1 mg/ml）第 18 天，出现肉眼可见抗性细胞克隆，镜下其细胞形态与感染前的 HepG2 细胞无差别。

2.3 HepG2/mhPINS 细胞鉴定

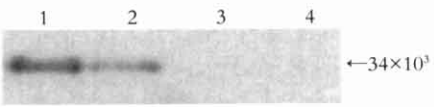
2.3.1 RT-PCR 鉴定 分别对 HepG2/mhPINS、HepG2/pLXSN 细胞进行 RT-PCR 鉴定。HepG2/mhPINS 细胞在 286 bp 处出现目的条带，与预期产物大小相符，而 HepG2/pLXSN 细胞无目的条带出现，证实 HepG2/mhPINS 细胞内有 mhPINS 基因转录（图 1）。

2.3.2 Western blot 鉴定 Western blot 结果如图 2，可于 HepG2/mhPINS 细胞及其培养上清提取蛋白中见到 1 条相对分子质量为 34×10^3 的特异性条带，而在 HepG2/pLXSN 细胞及其培养上清提取蛋白中则未见。



M：标准（DL 2000）；1：HepG2/mhPINS；2：HepG2/pLXSN

图 1 HepG2/mhPINS 细胞 RT-PCR 鉴定



1：HepG2/mhPINS；2：HepG2/mhPINS 上清；3：HepG2/pLXSN；4：HepG2/pLXSN 上清

图 2 Western blot 检测 HepG2/mhPINS 细胞及其培养上清中胰岛素的表达

2.3.3 胰岛素与 C 肽检测 放免法检测 HepG2/mhPINS 细胞上清中的胰岛素与 C 肽含量，结果 6 株 HepG2/mhPINS 细胞

上清均测出胰岛素与 C 肽，胰岛素依次为 19.21、38.44、22.36、47.62、29.51、41.39 mU/L，C 肽分别为 2.13、4.09、2.27、4.35、3.39、3.92 μg/L，而 HepG2/pLXSN 细胞上清中则无法测到，证实 HepG2/mhPINS 细胞内已有成熟胰岛素分泌。

2.4　葡萄糖刺激的胰岛素分泌检测

HepG2/mhPINS 细胞在不同葡萄糖浓度（0.1、5、10、20 mmol/L）条件下引起的胰岛素分泌依次为（13.21 ±0.86）、（9.35 ±0.93）、（14.14 ±1.04）、（13.47 ±1.08）mU/L（n =4）。组间行单因素方差分析，除葡萄糖浓度 5 mmol/L 组外，其余各组的胰岛素分泌与葡萄糖浓度 0.1 mmol/L 组无显著性差异（P > 0.05），故 HepG2/mhPINS 细胞的胰岛素分泌对葡萄糖刺激缺乏反应。

3　讨论

β 细胞内胰岛素基因编码胰岛素原，依靠激素原转换酶 PC2、PC3 将胰岛素原加工为成熟胰岛素。因 PC2、PC3 特异存在于内分泌细胞内，故将胰岛素基因导入非内分泌细胞内，只能获得胰岛素原的表达，其活性仅为成熟胰岛素的 10%[4]。然而，在非内分泌细胞内却普遍存在另一种蛋白加工酶 Furin，其能识别特异的氨基酸序列，即“Arg-X-Lys/Arg-Arg”序列（X 代表任意氨基酸），若将胰岛素原 A-C 与 C-B 连接处突变为 Furin 的识别位点，就能使其在非内分泌细胞内被 Furin 识别，从而切除 C 肽，形成成熟胰岛素。故在项目前期研究中，我们应用 PCR 体外定点突变技术对人胰岛素原基因进行了改造[2]。

肝细胞是胰岛素基因异位表达的最佳靶细胞，因其直接参与了糖、脂代谢，且拥有众多代谢相关蛋白及其基因中的葡萄糖反应元件（glucose inducible regulatory elements，GIREs）[5]。故在本研究中，我们将经改造的 mhPINS 基因导入 HepG2 细胞，通过 RT-PCR、Western blot 检测证实该细胞内已获得 mhPINS 基因的转录与表达。同时，通过放免法在其上清中检测到胰岛素与 C 肽，证实在该细胞内已成功实现胰岛素原的加工与成熟胰岛素的分泌。因此，之前我们对人胰岛素原基因进行的定点突变与修饰是成功的，已达到预期目的。

目前，基因转染较常使用的载体包括普通质粒、腺病毒、逆转录病毒等，相比之下其各有优缺点[6]。普通质粒、腺病毒可高效转染静止期细胞，具有较高的转染效率，但不能将目的基因整合至靶细胞染色体中长期稳定表达。而构建“胰岛代理细胞”（artificial beta cell）需目的基因长期稳定表达，故普通质粒与腺病毒载体不适于本研究。逆转录病毒能将目的基因整合至靶细胞基因组中长期稳定表达，但只能感染分裂期细胞，对有丝分裂后的细胞无感染能力，故选用逆转录病毒载体，需设法提高其介导的基因转染效率。本研究选用源于 Moloney 小鼠白血病病毒的逆转录病毒载体 pLXSN，为提高其介导的基因转染效率，保证更多的被感染细胞处于分裂期，我们以携 mhPINS 基因的逆转录病毒多次重复（12 h/次，共 4 次）感染 HepG2 细胞，获得较高的转染效率及目的基因的表达。

理想的“胰岛代理细胞”应具有近似于 β 细胞的功能，故需具备以下条件：①有成熟胰岛素的表达与分泌；②胰岛素分泌呈生理模式，即受葡萄糖浓度的调控[7]。本研究中我们通过 mhPINS 基因转染，在 HepG2 细胞内获得了成熟胰岛素的表达与分泌，但葡萄糖刺激的胰岛素分泌检测却显示，该细胞内的胰岛素分泌对葡萄糖刺激缺乏反应。β 细胞胰岛素分泌反应的强度与葡萄糖在细胞内的代谢率成正比，故控制葡萄糖流入细胞的蛋白或酶类被认为是调节胰岛素释放的葡萄糖传感器。葡萄糖激酶（glucokinase，GK）就是 β 细胞内的葡萄糖传感器，其活性受葡萄糖浓度调节，进而通过其活性改变影响胰岛素分泌[8]。研究表明 HepG2 细胞内 GK 表达与活性较 β 细胞显著降低[9]，这有可能就导致了所构建的 HepG2/mhPINS 细胞的胰岛素分泌对葡萄糖刺激缺乏反应。故在接下来的研究中，我们拟通过 GK 基因转染对 HepG2/mhPINS 细胞进一步修饰，以期在该细胞内获得葡萄糖刺激的胰岛素分泌。

参考文献：

[1] Longuet C, Broca C, Costes S, *et al*. Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases) phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 beta-cell line and islets of Langerhans [J]. Endocrinology, 2005, 146(2): 643 - 654.

[2] 兰丽珍，邓华聪，孙　辽，等. 人胰岛素原基因突变体的构建[J]. 第三军医大学学报，2004，26(19)：1714 - 1716.

[3] 奥斯伯 F M，布伦特 R，金斯顿 R E，等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖，王海林，译. 第 3 版. 北京：科学出版社，2001：366 - 373.

[4] Lu Y, Wang Z, Zhu M. Human bone marrow mesenchymal stem cells transfected with human insulin genes can secrete insulin stably [J]. Ann Clin Lab Sci, 2006, 36(2): 127 - 136.

[5] Thule P M, Liu J M. Regulated hepatic insulin gene therapy of STZ-diabetic rats[J]. Gene Ther, 2000, 7(20): 1744 - 1752.

[6] Kobinger G P, Deng S, Louboutin J P, *et al*. Transduction of human islets with pseudotyped lentiviral vectors[J]. Hum Gene Ther, 2004, 15(2): 211 - 219.

[7] Wilson M O, Scougall K T, Ratanamart J, *et al*. Tetracycline- regulated secretion of human (pro) insulin following plasmid- mediated transfection of human muscle[J]. J Mol Endocrinol, 2005, 34(2): 391 - 403.

[8] Del-Guerra S, Lupi R, Marselli L, *et al*. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2005, 54(3): 727 - 735.

[9] Thule P M, Liu J, Phillips L S. Glucose regulated production of human insulin in rat hepatocytes[J]. Gene Ther, 2000, 7(3): 205 - 214.

（编辑　栾　嘉）