维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)05－0559－03

高血糖对体外培养的胎鼠胰岛 Pdx－1 基因的影响

贾延劼[1]，周　燕[2]，董为伟[1]，杨于嘉[3]

(重庆医科大学临床学院 1.神经病学研究所,2.放射科,重庆　400016,3.中南大学湘雅医院儿科,长沙　410008)

【摘　要】目的:研究在体外培养时,高血糖对胎鼠胰岛胰和十二指肠同源盒基因－1(Pdx－1)和胰岛素基因的影响。方法:胶原酶法分离胎鼠胰岛,分别在葡萄糖浓度为 5.5mmol/L,11.1mmol/L,33.3mmol/L 的条件下培养 24h。采用胰岛素含量测定、胰岛素释放实验评价胰岛功能;免疫细胞化学染色检测 Pdx－1 在细胞内的表达;逆转录 PCR(RT－PCR)检测 Pdx－1 和胰岛素 mRNA 表达水平。结果:高血糖组 1(11.1mmol/L)胎鼠单位重量胰岛细胞内胰岛素水平和刺激指数高于低糖组(5.5mmol/L)和高血糖组 2(33.3mmol/L)。而且,高血糖组胎鼠胰岛 Pdx－1 蛋白的核移位率和 mRNA 表达水平均高于低糖组,但是高糖组 2 胰岛素 mRNA 表达低于高血糖组 1,与低糖组无显著性差异。结论:高血糖刺激可以促进胎鼠 Pdx－1 表达和转录活性,可能是影响胰岛功能和 β 细胞对葡萄糖刺激敏感性增加的原因之一。

【关键词】高血糖症;Pdx－1;胰岛;胰岛素

【中国图书分类法分类号】R587.1　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－02－25

Effects of hyperglycemia on the Pdx－1 gene in fetal rat islets in vitro

JIA Yanjie, et al

(*Institute of Neurology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To investigate the effects of hyperglycemia on the pancreas and duodenal homeobox gene－1 (Pdx－1) and insulin gene in fetal rat islets in vitro. *Methods*: Fetal rat islets were digested by collagenase and underwent culture at 5.5 mmol/L, 11.1 mmol/L and 33.3 mmol/L glucose concentration respectively. The insulin content of fetal rat islets and insulin releasing test were measured by radioimmunoassay. The expression of Pdx－1 protein and mRNA were evaluated by indirect immunofluorescence cytochemistry staining and reverse transcriptase－polymerase chain reaction (RT－PCR). *Results*: The results showed that the insulin content and stimulated index of hyperglycemia group 1 (11.1 mmol/L) were significantly higher than that of controls (5.5 mmol/L) and hyperglycemia group 2 (33.3 mmol/L). The majority of Pdx－1 positive cells in control group were confined to the nuclear periphery, but the majority of Pdx－1 positive cells in hyperglycemia groups were translocated to the nucleoplasm, and the expression of Pdx－1 mRNA was also elevated in hyperglycemia groups. However, the expression of insulin mRNA decresed in hyperglycemia group 2. *Conclusion*: Hyperglycemia may regulate Pdx－1 in fetal rat islets by increasing its protein level and translocation to the nucleus.

【Key words】 Hyperglycemia; Pdx－1; Islet; Insulin

妊娠期糖尿病形成的高血糖状态,直接影响胎儿胰岛 β－细胞的发育和胰岛素的合成,造成新生儿高胰岛素血症,出现低血糖等不良后果,但是其分子机理尚不完全清楚[1]。从胚胎发育角度来看,胰和十二指肠同源盒基因－1(pancreas and duodenal homeobox gene－1、Pdx－1)在胰腺胚胎发育和胰岛素基因表达过程中起到重要的调节作用[2,3]。我们采用体外高血糖模型,观察高血糖对胎鼠胰岛 Pdx－1 和胰岛素基因的影响,初步探讨其分子机制。

作者介绍:贾延劼(1971－　),男,副主任医师,博士后,主要研究方向:成体干细胞诱导分化。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200128)。

1　材料和方法

1.1　主要试剂

DMEM 培养基(低糖 1g/L)、胎牛血清购自 Hyclone 公司;胶原酶(V 型)购自 Sigma 公司:山羊抗大鼠 Pdx－1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;兔抗山羊－FITC 抗体购自 Sigma 公司;Trizol 购自 Gibco 公司;逆转录 PCR(RT－PCR)试剂盒购自 Promega 公司;胰岛素放射免疫试剂盒由中国原

维普资讯 http://www.cqvip.com

子能研究院提供;其余生化试剂均为进口分装分析纯。

大鼠 Pdx－1 引物序列为:正向 5′ GGTGCCAGAGTTCAGTGCTA3′,反向 5′ TTATTCTCCTCCGGTTCTGC 3′;大鼠胰岛素－1 引物序列为:正向 5′GCTACAATCATAGACCATC 3′,反向 5′ GGCGGGGAGTGGTGGACTC 3′,均由上海生工有限公司合成。

1.2 胎鼠胰岛分离

孕鼠在孕 19 天麻醉下取出胎鼠,无菌条件下收集胰腺,1g/L 胶原酶,37℃振荡水浴消化 10～20min,Ficoll400 不连续密度梯度离心分离胰岛。常规行免疫细胞化学法进行胰岛染色(工作效价 1:100)鉴定胰岛纯度≥85%;台盼蓝染色鉴定刚分离的胰岛存活率≥95%。

1.3 实验分组

实验分为低糖组,高糖组 1,高糖组 2,即胰岛分别在葡萄糖浓度为 5.5mmol/L(低糖 DMEM),11.1mmol/L(低糖 DMEM＋葡萄糖 1g/L),33.3mmol/L(低糖 DMEM＋葡萄糖 5g/L)培养基中培养 24h,500g 离心 5min,保留胰岛。

1.4 胰岛功能评价

1.4.1 胰岛素含量收集胎鼠胰岛,称重,超声粉碎,置 4℃酸化乙醇溶液抽提过夜,离心留上清,放射免疫法测定胰岛素含量。

1.4.2 胰岛素释放实验参考我们的方法[4],放射免疫法测定胰岛素含量。计算刺激指数,评价胰岛 β 细胞对葡萄糖刺激的敏感性。

1.5 免疫细胞化学染色

采用间接免疫荧光法,各组胰岛经 4%多聚甲醛固定,0.5%H_2O_2－甲醇液处理 30 min,1%牛血清白蛋白－0.3% Triton X－100 37℃处理 30 min。加入 Pdx－1－抗(1:200)37℃孵育 30min 后置于 4℃的冰箱 24h,再入兔抗山羊－FITC(1:64)37℃,30min,0.01mol/L PBS 充分冲洗以终止反应。其中阴性对照将一抗换用 PBS,其余步骤相同,荧光显微镜下观察照相,并记数核移位数。

1.6 RT－PCR

Trizol 试剂提取细胞总 RNA,紫外可见分光光度计对 RNA 样品定量。RT－PCR 扩增反应条件参照试剂盒操作手册,反应体系为 50μl,逆转录与 PCR 一步完成,扩增产物 10μl 加样于 1.7%的琼脂糖凝胶,常规电泳,紫外透射仪观察照相,结果进行扫描和密度分析。其中大鼠 Pdx－1 产物为 369bp,大鼠胰岛素－1 产物为 350bp。

1.7 统计处理

采用方差分析和 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为显著性差异。

2 结 果

2.1 胰岛功能评价

2.1.1 胰岛素含量 低糖组单位重量胰岛细胞内胰岛素水平为 179.4±16.7μg/g;高糖组 1 达到 195.5±12.8μg/g,显著高于低糖组($P=0.026$);但是高糖组 2 胰岛素水平下降至 184.7±8.8μg/g,显著低于高糖组 1($P=0.042$),与低糖组无显著性差异($P=0.383$)。

2.1.2 胰岛素释放实验 低糖组胎鼠胰岛刺激指数为 2.6±0.3;高糖组 1 刺激指数达到 3.3±0.5,显著高于低糖组($P=0.0004$)。同样高糖组 2 刺激指数下降至 2.8±0.3,显著低于高糖组 1($P=0.011$),与低糖组无显著性差异($P=0.124$)。

2.2 免疫细胞化学染色

低糖组胰岛 Pdx－1 表达主要在核周区域,核移位率为 15.4%±3.8%;高糖组 1 大部分胰岛 Pdx－1 表达移位至核内,核移位率为 49.3%±3.6%;而且荧光强度高于低糖组(图 1a)。高糖组 2 核移位率更高,达到 78.7%±5.2%,显著高于高糖组 1($P=8.041\times10^{-20}$)。

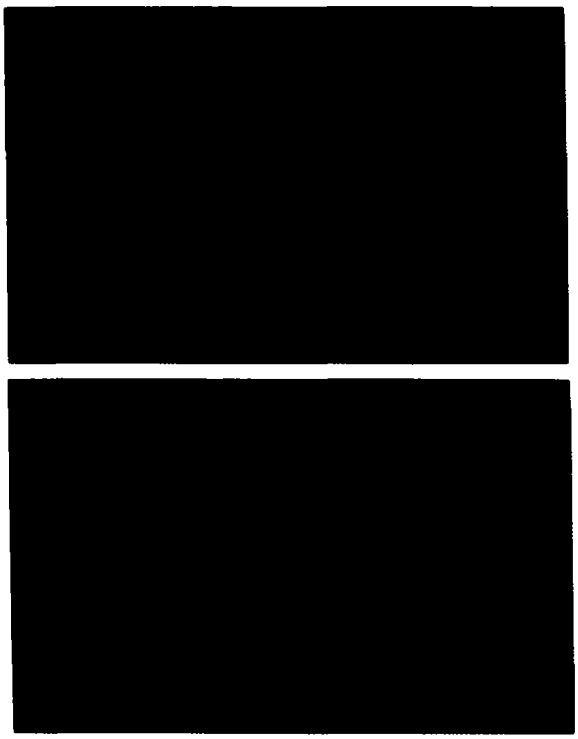


图 1 葡萄糖浓度对 Pdx－1 在细胞内分布的影响(FITC)

A、低糖组(5.5mmol/L)×300

B、高糖组 1(11.1mmol/L)×300

2.3 RT－PCR

RT－PCR 扩增产物在 1.7%的琼脂糖凝胶 300－400bp 之间出现阳性条带,高糖组 1 的 Pdx－1 和胰岛素 mRNA 表达均高于低糖组,其相对密度分别为 1.4976±0.1374,1.8626±0.1891(对照组密度

维普资讯 http://www.cqvip.com

为 1);高糖组 2 的 Pdx－1 mRNA 表达为 1.8410±0.1395,高于高糖组 1($P=0.001$),但是胰岛素 mRNA 表达降至 1.0479±0.1244,显著低于高糖组 1($P=4.992\times10^{-6}$),与低糖组无显著性差异($P=0.368$,图 2)。

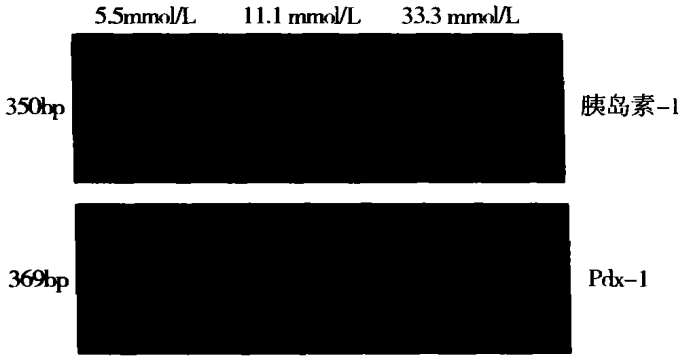


图 2 RT－PCR 结果

3 讨 论

Pdx－1 又称为胰岛素启动子因子－1(insulin promoter factor－1,IPF－1),在胰腺胚胎发育和胰岛素基因表达调控方面起到重要作用[2,3]。完全敲除小鼠 Pdx－1 基因导致胰腺发育不全,出生 2～3 天便死亡;部分敲除小鼠 Pdx－1 基因虽然胰腺发育正常,但是对血糖变化无正常胰岛素分泌反应[5]。整个妊娠期 Pdx－1 有 2 次表达高峰,以大鼠为例,首先在孕 9.5～10 天达到峰值,然后迅速将至最低值,这一过程参与胰腺胚胎早期发育。其次在妊娠晚期(孕 18d)至出生后,一直保持在较高水平,主要功能是调节胰岛 β 细胞分化成熟,参与胰岛素基因的表达[6]。本研究采用孕 19 天胎鼠胰岛,可以观察到胰腺发育晚期(β 细胞分化成熟期)高血糖状态对 Pdx－1 基因表达的影响。

在低葡萄糖浓度时,Pdx－1 位于核周区域;当葡萄糖浓度升高时,Pdx－1 移位到核内,与胰岛素Ⅰ启动子的 A、C、E 区结合,参与胰岛素基因的转录[7]。本研究采用免疫荧光染色发现,低糖组胎鼠胰岛细胞 Pdx－1 蛋白主要位于核周区域,但是高糖组胰岛细胞 Pdx－1 蛋白移位到核内。而且 RT－PCR 结果提示高血糖刺激还能够上调 Pdx－1mRNA 的表达。这些结果说明高血糖刺激可以增强 Pdx－1 表达和转录活性。

但是,是否 Pdx－1 的表达越高,胰岛素水平会相应升高?本研究结果发现,当葡萄糖浓度达到很高(33.3mmol/L)时,虽然其 Pdx－1 核移位率和 mRNA 的表达高于其它组,但是单位重量胰岛的胰岛素的平均水平和刺激指数却低于高糖组 1(葡萄糖 11.1mmol/L),而且胰岛素 mRNA 的表达也有所降低,提示 Pdx－1 对胰岛素水平的影响可能是双相的。导致这种现象的原因尚不清楚,可能与下列因素有关。(1)过高水平的 Pdx－1 抑制了胰岛素启动子的活性[8];(2)过高浓度的葡萄糖可以诱导胰岛凋亡,减少了胰岛素的生成[9]。

总之,高血糖刺激可以促进胎鼠 Pdx－1 表达和转录活性,最终可以影响了胰岛素的水平和对葡萄糖刺激的反应能力,表现为可能对出生后、甚至成年后的胰岛功能造成潜在影响。

参 考 文 献

[1] Carrapato MR, Marcelino F. The infant of the diabetic mother: The critical developmental windows[J]. Early Pregnancy, 2001;5:57－58.

[2] Hui H, Perfetti R. Pancreas duodenum homeobox－1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood [J]. Eur J Endocrinol, 2002;146:129－141.

[3] Dutta S, Gannon M, Peers B, et al. PDX: PBX complexes are required for normal proliferation of pancreatic cells during development [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001;98:1065－1070.

[4] 贾延劼,杨于嘉,刘 玲,等.胰岛与 Sertoli 细胞体外共同培养[J].中华内分泌代谢杂志,2002;18:148－151.

[5] Grapin－Botton A, Majithia AR, Melton DA. Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes[J]. Genes Dev, 2001;15:444－454.

[6] Soria B. In－vitro differentiation of pancreatic β－cells [J]. Differentiation, 2001;68:205－219.

[7] Melloul D, Marshak S, Cerasi E. Regulation of insulin gene transcription [J]. Diabetologia, 2002;45:309－326.

[8] Seijffers R, Ben－david O, Cohen Y, et al. Increase in Pdx－1 levels suppresses insulin gene expression in RIN 1046－38 cells [J]. Endocrinology, 1999;140:3311－3317.

[9] Harmon JS, Gleason CE, Tanaka Y, et al. In vivo prevention of hyperglycemia also prevents glucotoxic effects on Pdx－1 and insulin gene expression [J]. Diabetes, 1999;48:1995－1999.