

胰十二指肠同源盒基因-1 逆转录病毒表达载体的构建及其在肝干细胞中的稳定表达

金彩霞^{1,2}, 李文林¹, 朱吉¹, 田棣¹, 张南¹, 胡以平^{1*}

(1. 第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室, 上海 200433; 2. 宁夏医学院医学遗传学与细胞生物学教研室, 银川 750004)

[摘要] **目的:**通过克隆胰十二指肠同源盒基因-1(pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1), 构建表达 PDX-1 的逆转录病毒表达载体和稳定表达 PDX-1 的肝原始细胞系(liver epithelial progenitor cells, LEPCs), 以研究肝干细胞向胰腺细胞的转分化潜能。**方法:**通过 PCR 方法克隆 PDX-1 基因全长, 将其构建到 pMSCVpuro 逆转录病毒载体中获得 pMSCV PDX-1 puro 载体。将该载体导入 Phoenix 包装细胞系, 进而采用乒乓转染的方法感染包装细胞 PT67, 获得高滴度稳定产毒的 PT67 细胞系。**结果:**成功构建了 pMSCV PDX-1 puro 载体, 并转染 PT67 细胞。利用 PT67 细胞系产生的病毒上清可以高效的感染体外培养的肝干细胞 LEPCs, 获得稳定表达 PDX-1 基因的 LEPCs(LEPCs PDX-1)。**结论:**PDX-1 逆转录病毒表达载体的成功构建和稳定表达 PDX-1 的肝干细胞系的获得为研究 LEPCs 向胰腺细胞的转分化奠定了基础。

[关键词] 胰十二指肠同源盒基因-1; 逆转录病毒科; 肝; 干细胞

[中图分类号] Q 782 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)08-0834-03

Construction of pancreatic duodenal homeobox-1 recombinant retroviral vector and its stable expression in liver progenitor cells

JIN Cai-xia^{1,2}, LI Wen-lin¹, ZHU Ji¹, TIAN Di¹, ZHANG Nan¹, HU Yi-ping^{1*} (1. Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Medical Genetics and Cell Biology, Ningxia Medical College, Yinchuan 750004)

[ABSTRACT] **Objective:** To construct a recombinant retroviral vector expressing pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1) gene and express the PDX-1 expression cassette in liver progenitor cells (LEPCs), so as to study the conversion of hepatic cells to pancreatic-like cells. **Methods:** The full length of PDX-1 gene was amplified by PCR and subcloned into pMSCVpuro vector. The pMSCV PDX-1 puro was then introduced into Phoenix package cells and the cell culture supernatant was used for Ping-Pong infection of another packaging cell line PT67 to obtain stable virus-producing cell line. **Results:** The pMSCV PDX-1 puro vector was successfully constructed and transfected into PT67 cells. The viral supernatants of PT67 cells efficiently infected LEPCs *in vitro* and the infected LEPCs stably expressed PDX-1 gene. **Conclusion:** The pMSCV PDX-1 puro vector and PDX-1 expressing LEPCs have been successfully constructed, laying a basis for studying the transdifferentiation of liver progenitor cells to pancreas lineage cells.

[KEY WORDS] pancreatic duodenal homeobox-1; retroviridae; liver; stem cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(8): 834-836]

胰十二指肠同源盒基因-1 (pancreatic-duodenal homeobox1 gene, PDX-1) 又称为胰岛十二指肠同源盒-1 (islet duodenum homeobox-1, IDX-1)、胰岛素启动子因子-1 (insulin promoter factor-1, IPF-1)、生长抑素转录活化因子-1 (somatostatin transactivating factor-1, STF-1) 及葡萄糖敏感因子 (glucose-sensitive factor, GSF) 等, 是同源盒家族中的一员。近些年被认为是胰岛内分泌细胞群发育和分化的主要调控基因^[1], 目前的一些研究结果显示 PDX-1 在肝细胞中的异位表达可以实现肝脏细胞向胰腺细胞的转分化^[2]。本研究构建了 PDX-1 的逆转录病毒载体并利用逆转录病毒将 PDX-1 基因导入肝原始细胞系(liver epithelial progenitor cells, LEPCs), 研究稳定表达 PDX-1 的 LEPCs 向

胰腺细胞的转分化潜能。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和材料 dNTP、Taq plus 酶、pUC-mT 载体、UNIQ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒购自 Sangon 公司; 限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶和预染蛋白 marker 购自 MBI Fermentas 公司; 超纯质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自 V-gene 公司, 质粒

[基金项目] 国家自然科学基金(30270668, 30200138). Supported by National Natural Science Foundation of China(30270668, 30200138).

[作者简介] 金彩霞, 博士生。

* Corresponding author. E-mail: yphu@smmu.edu.cn

大抽试剂盒购自 Qiagen 公司; M-MLV 逆转录酶购自 Promega; Fugene 6 购自 Roche 公司; G418、DMEM 高糖培养基均购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自 Hyclone 公司; PDX-1 兔抗鼠一抗购自 Chemicon 公司 (Lot NO: 25010757); 辣根过氧化物酶标记的二抗 (羊抗兔) 购自 Sigma 公司 (Lot NO: 034K4836); 细胞系 LEPCs 由本实验室建立^[3]; 逆转录病毒包装细胞系 Phoenix E 由长海医院血液科王健民教授赠送; 逆转录病毒载体 pMSCV puro、逆转录病毒包装细胞系 PT67 细胞、大肠杆菌 DH5 α 均由本室保存。

1.2 pMSCV PDX-1 puro 载体的构建 利用 PCR 法从本实验室构建的 pEGFP PDX-1 C1^[4] 中扩增 PDX-1 cDNA, 引物为 5'-CCC AGA TCT CCG GCT GCC ACC ATG-3' 和 5'-ACC CTC GAG CTG CTG TCC TCA CCG-3'。PCR 反应采用 50 μ l 体系, 含上下游引物各 0.5 μ l, dNTP 100 μ mol/L, Taq 酶 0.5 μ l, 循环条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s。目的片段为 885 bp 并经测序验证。将 PCR 产物用 *Bgl* II 和 *Xho* I 双酶切, 得 PDX-1 片段; 将 pMSCV puro 载体用 *Bgl* II 和 *Xho* I 双酶切, 得载体的骨架片段。将载体的骨架片段和 PDX-1 片段用 T₄ DNA 连接酶连接后得到 pMSCV PDX-1 puro 载体。

1.3 乒乓转染法获得高滴度的 pMSCV PDX-1 puro 稳定产毒 PT67 细胞系 将 Phoenix E 细胞接种于直径为 60 mm 细胞培养皿中, 待生长至大约 50% 融合时, 用 Fugene 6 转染试剂将 pMSCV PDX-1 puro 质粒导入 Phoenix 细胞。转染后 12 h 换新鲜培养基, 48 h 后收获培养基, 0.45 μ m 滤膜过滤后得到含病毒上清。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 1:3 稀释病毒上清, 添加终浓度为 4 μ g/ml 的 Polybrene 后感染 60 mm 平皿中处于对数生长期的逆转录病毒包装细胞系 PT67。感染后 12 h 换新鲜培养基继续培养 12 h, 重复上述感染过程 1 次。再培养 24 h 后向培养基中添加终浓度为 4 μ g/ml 的嘌呤霉素筛选 2 周得到稳定产毒细胞系, 扩增并冻存。

1.4 感染 LEPCs 细胞 如上所述收获 PT67 细胞产毒上清, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 1:3 稀释并添加终浓度 4 μ g/ml 的 Polybrene 后感染 60 mm 平皿中处于对数生长期的 LEPCs 细胞。12 h 后更换新鲜培养基, 48 h 后向培养基中添加终浓度为 4 μ g/ml 的嘌呤霉素筛选 2 周得到稳定转染的细胞, 命名为 LEPCs PDX-1, 扩增并冻存。

1.5 RT-PCR 检测 PDX-1 在 LEPCs 细胞中的表达 UNIQ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒抽取稳定转

染了 PDX-1 基因的 LEPCs 总 RNA, 总 RNA 经 DNase I 在 37 $^{\circ}$ C 消化 1 h 以去除可能污染的痕量基因组 DNA, 取 2 μ g RNA 以 OligodT₁₈ 为引物用 M-MLV 逆转录酶进行逆转录。取 2 μ l 逆转录产物进行 RT-PCR 检测 PDX-1 的表达, 上游引物 5'-CCT CCA CCA CCA CCT TCC AG -3'; 下游引物 5'-CCG AGG TCA CCG CAC AAT CT-3'。PCR 反应采用 50 μ l 体系, 含上下游引物各 0.4 μ l, dNTP 100 μ mol/L, Taq 酶 0.5 μ l, 循环条件为 94 $^{\circ}$ C 40 s, 61 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 扩增片段为 452 bp。

1.6 Western 印迹检测 PDX-1 在 LEPCs 细胞中的表达 LEPCs 及稳定转染 PDX-1 的 LEPCs (LEPCs PDX-1), 用 PBS (pH 7.4) 洗 3 次, 细胞刮刮取细胞, 1 000 \times g 离心 5 min 弃上清。沉淀的细胞加 100 μ l 缓冲液 A [10 mmol/L HEPES-NaOH (pH 7.8), 15 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 1 μ g/ml Leupeptin, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF], 混悬, 置于冰上 15 min, 再加 10% NP-40 10 μ l, 涡动 10 s。10 000 \times g 离心 20 s, 仔细弃全部上清, 加 100 μ l 缓冲液 B [20 mmol/L HEPES-NaOH (pH 7.9), 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.42 mol/L NaCl, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF, 25% 甘油, 1 μ g/ml Leupeptin], 混悬, 冰浴 30 min, 间以搅拌。4 $^{\circ}$ C, 12 000 \times g 离心 4 min, 吸取上清, 分装, Bradford 法测定蛋白浓度后 -70 $^{\circ}$ C 保存^[5]。从上述制备的样品中分别取出 150 μ g 的核蛋白, 用 12% 的 SDS-PAGE 在室温 80 mA 条件下电泳, 电泳至分离胶时, 将电流增加到 150 mA。电泳完成后, 室温 30 mA, 4 h 将蛋白质从 SDS-PAGE 上转移至硝酸纤维素 (NC) 膜上。转移完成后 PBS (pH 7.4) 漂洗转好的 NC 膜 3 次, 每次 5 min, 用 PBS (含 0.2% Tween 20) 配制的 10% 脱脂牛奶 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜; 然后 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 室温下将 NC 膜与抗 PDX-1 抗体 (1:5 000) 温浴 1 h, 用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:1 000) 温浴 1 h 后, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 然后与 ECL 试剂反应约 5 min 后, 在暗室中进行 X 光胶片的曝光、显影和定影。

2 结果

2.1 pMSCV PDX-1 puro 病毒载体的包装和目的细胞的感染 构建的 pMSCV PDX-1 puro 载体经 *Bgl* II 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 酶切片段为 885 bp 和 6 300 bp 与预期相符 (结果见图 1), 测序结果表明 PDX-1 全序列没有发生突变 (结果未显示)。

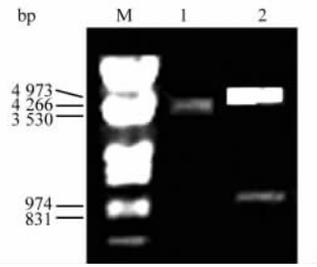


图1 pMSCV PDX-1 puro 载体酶切鉴定

Fig 1 Restrictive enzyme digestion of recombinant plasmids pMSCV PDX-1 puro

M: λDNA *EcoR* I /*Hind* III marker; 1: pMSCVPDX-1 puro plasmid; 2: pMSCV PDX-1 puro digested with *Bgl* II and *Xho* I, fragment are 6 300 bp and 885 bp

2.2 RT-PCR 检测 PDX-1 在 LEPCs PDX-1 细胞中的表达 经 RT-PCR 分析表明用含有 PDX-1 表达框架的逆转录病毒感染 LEPCs 后, LEPCs 细胞在 mRNA 水平稳定表达 PDX-1 基因(结果见图 2)。

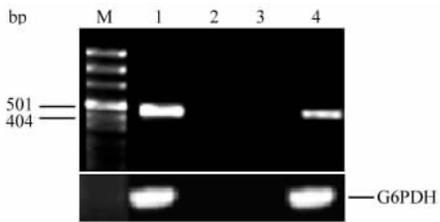


图2 RT-PCR 检测 PDX-1 基因在 LEPCs PDX-1 中的表达

Fig 2 Expression of *pdx-1* mRNA in LEPCs PDX-1 by RT-PCR analysis

M: pUC Mix marker ; 1: Pancreas sample used as positive control; 2: Water; 3: RNA sample without retrotranscription; 4: cDNA of LEPCs PDX-1 cells

2.3 Western 印迹检测 PDX-1 在 LEPCs PDX-1 细胞中的表达 结果表明用含有 PDX-1 表达框架的逆转录病毒感染 LEPCs 后, LEPCs PDX-1 细胞在蛋白水平可以稳定表达 PDX-1 基因(结果见图 3)。

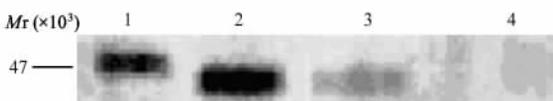


图3 Western 印迹检测 LEPCs PDX-1 中 PDX-1 蛋白的表达

Fig 3 Western blot analysis of PDX-1 protein expression in LEPCs PDX-1

Nuclear extracts (150 μg protein) from pancreas tissue, retroviral transfected LEPCs and LEPCs. 1: Prestained protein molecular weight marker; 2: Pancreas tissue; 3: LEPCs PDX-1 cells; 4: LEPCs

3 讨论

肝脏细胞和胰腺细胞间转分化的研究是基于对目前世界上大约 1 亿 5 千万糖尿病患者的治疗问题而引发的一个研究热点。Tosh 实验室报道了在肝脏中表达 PDX-1 同源基因的转基因爪蟾蝌蚪中可以发生肝脏向胰腺转分化^[6], 随后此实验室又通过试验进一步证实了人肝癌细胞系 HepG2 在高表达 PDX-1 后可以向胰腺细胞发生转分化^[7]。而 Ferber 实验室发现表达大鼠 PDX-1 的重组腺病毒转染肝细胞后可以诱导体内肝细胞分泌胰岛素, 并可以降低链脲霉素处理后小鼠的血糖水平^[2]。Efrat 实验室用表达 PDX-1 的逆转录病毒感染人胎肝干细胞也可以将肝干细胞诱导为可以分泌胰岛素的细胞^[8]。对于此类由肝细胞转分化而来的具有胰腺 B 细胞表型和部分功能的细胞是否对临床糖尿病患者具有治疗效果尚有待进一步的研究证实。

本研究利用逆转录病毒将外源基因 PDX-1 稳定导入到本实验室建立的肝原始细胞系 LEPCs 中, 筛选获得稳定表达 PDX-1 的 LEPCs PDX-1 细胞, RT-PCR 和 Western 印迹分别在 mRNA 水平和蛋白质水平证实了 PDX-1 的表达。本实验室构建的 LEPCs 已证实具有分化为肝细胞和胆管上皮细胞的双向潜能^[3], LEPCs PDX-1 细胞系的建立为进一步研究 LEPCs 向胰腺细胞的转分化及其转分化过程的分子机制奠定了基础。

[参考文献]

[1] McKinnon CM, Docherty K. Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell function and identity [J]. *Diabetologia*, 2001, 44:1203-1214.

[2] Ber I, Shternhall K, Perl S, et al. Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation [J]. *J Bio Chem*, 2003, 278:31950-31957.

[3] Li W, Su J, Yao Y, et al. Isolation and characterization of bi-potent liver progenitor cells from adult mouse [J]. *Stem Cells*, 2006, 24: 322-332.

[4] 陈元晓, 李文林, 何志颖, 等. Pdx-1 基因克隆及其在人肝癌细胞系 SMMC-7721 中的表达 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2006, 18:81-83.

[5] 王 勇, 黄文华. 一种改进的核转录因子的电泳迁移率改变分析法 [J]. *第三军医大学学报*, 2001, 23:119-120.

[6] Horb ME, Shen C, Tosh D, et al. Experimental conversion of liver to pancreas [J]. *Curr Biol*, 2003, 13:105-115.

[7] Zalzman M, Gupta S, Giri RK, 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, 100:7253-7258.

[8] Li W, Horb ME, Tosh D, et al. *In vitro* transdifferentiation of hepatoma cells into functional pancreatic cells [J]. *Mech Dev*, 2005, 122:835-847.

[收稿日期] 2006-03-07

[修回日期] 2006-06-07

[本文编辑] 尹 荼