

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00472

## 钾通道 KCNQ1 在大鼠胰腺发育过程中的表达

刘莉洁<sup>1</sup>, 石丽娟<sup>1</sup>, 王 莉<sup>1</sup>, 郭 静<sup>2</sup>, 德 伟<sup>2</sup>

1. 东南大学医学院生理学教研室, 南京 210009

2. 南京医科大学生物化学与分子生物学系, 南京 210029

**[摘要]** **目的** 分析钾通道 KCNQ1 在不同发育阶段大鼠胰腺以及成年大鼠胰岛中的表达情况, 为探悉其在胰腺 B 细胞发育及功能中可能的作用提供实验依据。**方法** 采用高密度寡核苷酸芯片对胚胎第 12.5 天(E12.5)、E15.5、E18.5、新生和成年大鼠胰腺进行基因转录水平分析, 并用 RT-PCR 对 KCNQ1 通道亚基在上述 5 个时期大鼠胰腺以及成年大鼠胰岛中的表达进行验证和分析。**结果** 与胰腺内分泌细胞分化、成熟有关的转录因子分别于 E15.5、E18.5 达到表达高峰; E18.5 胰腺中 B 细胞功能成熟标志基因的表达显著增加, 而 KCNQ1 钾离子通道的编码基因 KCNQ1 及 KCNE1 此时才出现表达。成年胰腺及胰岛中均具有多种 KCNQ1 通道亚基的表达。**结论** KCNQ1 通道的表达出现于胰腺发育后期内分泌细胞功能逐渐成熟阶段, 在成年胰岛中亦具有较高表达水平, 提示 KCNQ1 通道可能表达于成熟 B 细胞并参与其内分泌功能。

**[关键词]** KCNQ1 钾通道; 胰岛; 胰腺; 发育

**[中图分类号]** R 339.35

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2010)05-0472-04

### Expression of KCNQ1 channel during rat pancreas development

LIU Li-jie<sup>1</sup>, SHI Li-juan<sup>1</sup>, WANG Li<sup>1</sup>, GUO Jing<sup>2</sup>, DE Wei<sup>2</sup>

1. Department of Physiology, Medical College of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu, China

2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the dynamic expression profile of KCNQ1 channel in rat developing pancreas and adult rat islets, so as to provide experimental basis for further analyzing the possible role of KCNQ1 channel in  $\beta$ -cell development and function. **Methods** The gene expression patterns of embryonic day 12.5 (E12.5), E15.5, E18.5, new-born and adult rat pancreas were compared using the GeneChipRAE 230A. The expressions of KCNQ1 channel subunits in rat pancreas at the above five stages and adult rat islets were also detected and analyzed by RT-PCR. **Results** The results of genechip showed that the expression of transcription factors related to endocrine cell differentiation and maturation peaked at E15.5 and E18.5, respectively. The expression of mature  $\beta$ -cell specific genes increased significantly at E18.5, but KCNQ1 and KCNE1 only started to express at E18.5. The results of RT-PCR showed expression of multiple KCNQ1 channel subunits in adult rat pancreas and islet. **Conclusion** The expression of KCNQ1 channel appears in the later stage of pancreatic development when the endocrine cells undergo further maturation, and has a higher level in adult islets. The expression profile of KCNQ1 channel subunits indicates that KCNQ1 channel might be expressed in mature  $\beta$ -cell and involved in its endocrine function.

**[Key words]** KCNQ1 potassium channel; islets of Langerhans; pancreas; development

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(5):472-475]

钾离子通道 KCNQ1 由功能亚基 KCNQ1 与辅助亚基 KCNE 家族成员 (KCNE1~5) 共同装配而成<sup>[1]</sup>。在心脏、内耳、消化道及肾脏等组织, 不同的辅助亚基通过对通道门控特性、单通道电流强度等的修饰, 赋予 KCNQ1 通道独特的电生理学特性, 使其具有多种生物学效能, 参与心肌细胞复极化、内耳钾离子循环、消化液分泌、水盐代谢等多项生理过程。该通道功能异常已被发现与多种心律失常、遗

传性耳聋等疾病的发生有关<sup>[1]</sup>。

*Nature Genetics* 在 2008 年同期有 2 篇论文报道了 KNCQ1 单核苷酸多态性与 2 型糖尿病易感性显著相关, 具有该基因多态性的糖尿病患者伴胰岛素分泌障碍<sup>[2-3]</sup>。其后, 来自不同国家、地域的多个研究小组相继报道了类似发现<sup>[4]</sup>, 动物实验也显示 KCNQ1 基因敲除可使小鼠血液胰岛素水平显著降低<sup>[5]</sup>。这些信息都提示 KCNQ1 通道可能与胰腺 B

**[收稿日期]** 2010-03-17 **[接受日期]** 2010-04-12

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30770537). Supported by National Natural Science Foundation of China(30770537).

**[作者简介]** 刘莉洁, 博士, 讲师. Tel: 025-83272361, E-mail: liulijie1973@163.com

细胞的发育或功能有关。然而, KCNQ1 通道在胰腺发育过程中的表达情况迄今尚未见报道。

本研究运用高通量的基因芯片技术, 对不同发育时期大鼠胰腺中内分泌细胞分化及成熟相关转录因子、胰岛素分泌功能相关基因以及 KCNQ1 通道相关基因的表达进行了平行分析, 在用 RT-PCR 对芯片中 KCNQ1 通道的表达情况进行验证之后, 又进一步用 RT-PCR 检测了 KCNQ1 通道亚基在成年大鼠胰岛中的表达, 旨在明确不同发育时期大鼠胰腺中 KCNQ1 通道的表达情况, 为揭示该通道在胰腺内分泌部的发育及功能完善中的作用提供线索。

## 1 材料和方法

**1.1 实验动物和材料** 成年 SD 大鼠(2 个月龄)60 只(雌 40 只, 雄 20 只), 体质量 250 g 左右, 由南京医科大学实验动物中心提供[实验动物生产许可证号: SCXK(苏)2002-0031, 使用许可证号: SYXK(苏)2008-0007]。Motic 显微解剖镜; TRIpure<sup>®</sup> 试剂(Roche); GeneChip<sup>®</sup> Murine Genome RAE230A (Affymetrix); RNeasy Mini Kit (Qiagen), RT-PCR 试剂盒(Toyobo)。

**1.2 不同发育时期大鼠胰腺提取** 于每日 18:00 时, 将雌雄大鼠以 1:2 合笼, 次日检测有阴栓者, 定为受精第 0.5 天(E0.5)。取 E12.5、E15.5、E18.5 母鼠, 引颈处死, 分离出胚胎, 显微解剖镜下用显微镊子取出胰腺; 新生和成年大鼠分别于出生当天和成年大鼠直接分离获取胰腺组织<sup>[6]</sup>。将所取胰腺迅速放入液氮中速冻。

**1.3 成年大鼠胰岛分离纯化** 成年大鼠(2 月龄)腹腔注射 4% 戊巴比妥钠麻醉, 沿腹中线打开腹腔, 上翻肝脏, 自胆总管注入预冷的胶原酶 V (1 mg/ml) 10 ml, 快速完整切取胰腺, 于 37℃ 水浴消化 15 min。采用 Ficoll 不连续密度梯度离心法纯化胰岛, 取样用双硫脲(DTZ)染色鉴定。

**1.4 组织总 RNA 提取** 分别取各时期大鼠胰腺组织和成年胰岛, 用 TRIpure 试剂提取组织总 RNA, 利用 RNeasy Mini Kit 纯化总 RNA。

**1.5 芯片杂交及数据分析** 分别以 E12.5、E15.5、E18.5、新生和成年胰腺总 RNA (15 μg) 为模板合成双链 cDNA, 采用 BioArray<sup>™</sup> High Yield<sup>™</sup> RNA Transcript Labeling Kit 体外转录生成生物素标记 cRNA, 再经纯化和片段化处理, 取 30 μg cRNA 与 GeneChip<sup>®</sup> Murine Genome RAE230A 芯片杂交; 洗脱后, 用链霉亲和素-藻红蛋白染色; 对扫描所得信号利用微阵列分析软件 (MicroArray Suite, version 5.0) 进行数据分析, 并采用线性度量方法对样品的表达结果在各样品间进行校准<sup>[7]</sup>。

**1.6 不同发育时期大鼠胰腺及成年胰岛中 KCNQ1 通道亚基表达的检测** 取 1 μg 的 E12.5、E15.5、E18.5、新生、成年胰腺及成年胰岛 RNA 分别进行反转录: 30℃ 10 min, 42℃ 20 min, 99℃ 5 min, 4℃ 5 min, 合成 cDNA, 进行 PCR 扩增。KCNQ1 上游引物: 5'-TCC TCC CCG CCC AAT GCT GA-3', 下游引物: 5'-CGG CAG CCT GCA GAC CAG AG-3', 预计扩增产物 530 bp; KCNE1 上游引物: 5'-CCG TGA AGC CCC AGG ATG GC-3', 下游引物: 5'-AAG CTC TCC AGA ACG CGG GC-3', 预计扩增产物 326 bp; KCNE2 上游引物: 5'-GCC GAA CAA CAG GCG CTC CA-3', 下游引物: 5'-CAC TGT GAA CCC CGT CGC CC-3', 预计扩增产物 270 bp; KCNE3 上游引物: 5'-GGC TAG CCT TCC CGG CCG TA-3', 下游引物: 5'-TCA GCC CCT CTT CTC TGG TCC C-3', 预计扩增产物 340 bp; KCNE4 上游引物: 5'-CTT TGA TCC CGG CTG GGC GA-3', 下游引物: 5'-AAA GGG TGC AGG ACA GCG CA-3', 预计扩增产物 383 bp; β-actin 为内参照, 上游引物: 5'-CCA CAC CCG CCA CCA GTT CG-3', 下游引物: 5'-AGA GGG GCC TCG GTG AGC AG-3', 预计扩增产物 351 bp。PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 用凝胶分析软件对基因表达进行分析。

**1.7 统计学处理** KCNQ1 通道亚基相对表达量用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 Origin 8.0 统计学分析软件进行 ANOVA 方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 内分泌细胞分化、成熟相关转录因子在不同发育时期胰腺的表达** 通过对不同发育时期大鼠胰腺基因表达谱的分析可见, 与胰腺内分泌细胞分化相关的特异性转录因子 Pdx1、Nkx6-1、Notch1、Follistatin 和 Pax4 多于 E12.5 已出现表达, 并均于 E15.5 表达水平达到高峰, E18.5 开始下降; 与内分泌细胞功能成熟有关的转录因子 Pax6、Hnf4a、Ptf1a 等则多在 E15.5 出现表达, 并均于 E18.5 达到各自峰值(表 1)。

**2.2 胰岛素分泌相关基因在不同发育时期胰腺的表达** 基因芯片结果分析(表 2)显示, 代表 B 细胞功能成熟度的标志物 Glut-2、胰岛素(insulin)的表达于 E18.5 出现显著增高; 与 B 细胞胰岛素分泌功能有关的离子通道基因, 包括编码 ATP 敏感性钾通道(ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel, K<sub>ATP</sub>)的 Kcnj6 和 Abcc8、编码电压依赖性钙离子通道(voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel, VDCC)的 Cacna1c 以及编码电压依赖性钾离子通道(voltage-dependent K<sup>+</sup> channel, K<sub>v2.1</sub>)的 Kcnbl, 它们的表达均于 E18.5 达到高峰, 标志此时期胰腺 B 细

胞已完成分化,细胞功能已渐至成熟。

**表 1 大鼠胰腺发育过程中内分泌细胞分化、成熟相关转录因子的表达**

**Tab 1 Expression profile of transcription factors related to endocrine cell differentiation and maturation during rat pancreatic development**

Gene symbol	Signal intensity				
	E12.5	E15.5	E18.5	New-born	Adult
Pdx1	84.7	422.4	-	41.5	-
Nkx6-1	25.7	391.4	274.9	95.3	-
Notch1	209.8	823	646.5	145.7	36.7
Follistatin	25	157.6	141.7	20.0	18.7
Pax4	-	155.5	147.2	17.1	-
Pax6	-	225.1	493.9	112.2	-
Hnf4a	-	-	234.5	-	-
Ptfla	-	384.2	2 854.3	366.3	983.9

-: Not detected

**表 2 大鼠胰腺发育过程中胰岛素分泌相关基因的表达**

**Tab 2 Expression profile of genes related to endocrine function during rat pancreatic development**

Gene symbol	Signal intensity				
	E12.5	E15.5	E18.5	New-born	Adult
Insulin 1	159.3	617.7	11 039.5	6 715.2	4 651.4
Insulin 2	-	392	11 182.2	4 771.1	2 702.5
Glut-2	47.1	158.2	1 067	534.1	38.4
Kcnj6	-	85.7	101.4	-	-
Abcc8	59.7	131.9	202.3	63.7	-
Caacalc	38.7	129	341.4	46.3	-
Kenbl	-	42.3	72.3	-	-

-: Not detected

**2.3 KCNQ1 通道亚基在不同发育时期胰腺的表达** 从基因芯片结果(表 3)可见,KCNQ1 通道功能亚基 KCNQ1 和辅助亚基 KCNE1 的编码基因均在 E18.5 才开始表达,在成年胰腺中 KCNQ1、KCNE1 也都有较高水平表达。利用 RT-PCR 对基因芯片结果进行验证,结果如图 1 所示,可见 KCNQ1、KCNE1 在胰腺发育的不同时期呈现差异表达,表达量变化趋势与芯片结果一致。

**表 3 大鼠胰腺发育过程中 KCNQ1 通道亚基的表达**

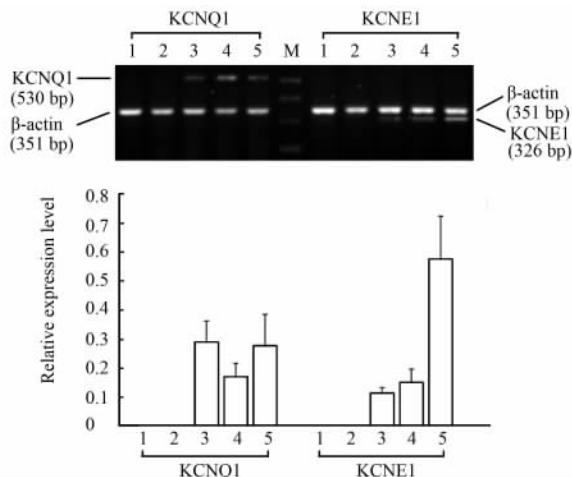
**Tab 3 Expression profile of KCNQ1 channel subunits during pancreatic development**

Gene symbol	Signal intensity				
	E12.5	E15.5	E18.5	New-born	Adult
KCNQ1	-	-	420.6	181.5	405
KCNE1	-	-	98.6	120.4	907.4
KCNE2	-	-	-	-	-
KCNE3	-	-	-	-	-

-: Not detected

**2.4 KCNQ1 通道亚基在成年大鼠胰腺及胰岛的表**

达 RT-PCR 结果(图 2)显示,在成年大鼠胰腺及胰岛中均有 KCNQ1 通道功能亚基编码基因 KCNQ1、以及多种通道辅助亚基编码基因(KCNE1、KCNE2、KCNE4)的表达。胰岛中 KCNE4 具有显著高表达;虽然 KCNE1 在胰岛的表达水平显著低于胰腺,但它仍为胰岛所表达的 KCNQ1 通道主要辅助亚基之一。



**图 1 不同发育时期大鼠胰腺中 KCNQ1 与 KCNE1 的表达**

**Fig 1 Expression of KCNQ1 and KCNE1**

**in rat pancreas at different developmental stages**

1: E12.5; 2: E15.5; 3: E18.5; 4: New-born; 5: Adult; M: Marker.  $n=3, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

KCNQ1 自 1996 年作为遗传性 QT 延长综合征的致病基因被发现以来,已使相关疾病发生机制及临床治疗的研究取得了突破性进展<sup>[8]</sup>。KCNQ1 基因多态性与 2 型糖尿病易感性之间的联系<sup>[2-3]</sup>则使 KCNQ1 通道再度成为相关领域的关注热点。

为探悉 KCNQ1 通道在胰腺内分泌细胞发育及功能中的作用,我们首先对大鼠胰腺不同发育时期内分泌细胞相关转录因子及 KCNQ1 通道的表达进行了系统分析。基因芯片结果显示:与胰腺内分泌细胞分化相关的转录因子(Pdx1、Nkx6-1、Notch1、Follistatin 和 Pax4)<sup>[9]</sup>于 E12.5 即已出现表达,E15.5 表达水平均达其高峰,E18.5 开始下降;而与内分泌细胞成熟有关的转录因子(Pax6、Hnf4a、Ptfla 等)则多在 E15.5 才出现表达,E18.5 到达各自峰值;代表 B 细胞功能成熟度的 Glut-2、胰岛素以及胰岛素分泌相关离子通道编码基因<sup>[10]</sup>的表达水平也是在 E18.5 出现了显著增高。这些数据再次反映出 E12.5~E15.5 是大鼠胰腺内分泌细胞分化的重要时期,E18.5 之后胰腺内分泌细胞的分化已基本完成,进入了细胞功能成熟阶段<sup>[11]</sup>。基因芯片及 RT-PCR

结果均显示 KCNQ1 通道功能亚基的编码基因 KCNQ1 及辅助亚基编码基因 KCNE1 在 E18.5 大鼠胰腺中才出现表达,提示该通道对于内分泌细胞的分化

可能不是必需的。这可能正是 KCNQ1 基因敲除小鼠仍然具有一定的胰岛素分泌能力<sup>[5]</sup>的原因。

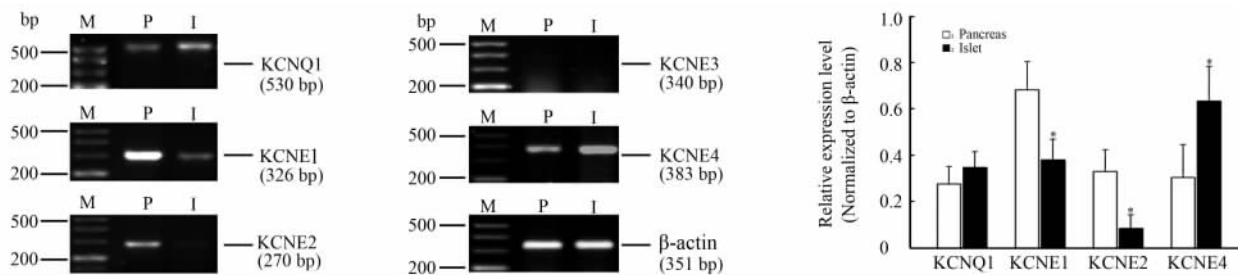


图 2 成年大鼠胰腺及胰岛 KCNQ1 通道亚基的表达

Fig 2 Expression of KCNQ1 channel subunits in adult rat pancreas and islet

M: Marker; P: Pancreas; I: Islet. \*  $P < 0.05$  vs pancreas,  $n = 3, \bar{x} \pm s$

$K_{ATP}$ 、 $K_{V2.1}$ 、VDCC 等离子通道所介导的细胞生物电活动在胰腺 B 细胞感受刺激、传递信息、发动与完成胰岛素分泌等过程中具有重要作用,它们已成为相关疾病的有效诊疗靶点<sup>[10]</sup>。对基因芯片结果的分析显示,这些通道编码基因的表达量在 E18.5 出现了显著增高,部分反映出此时 B 细胞的成熟与增殖。然而在成年期芯片结果中它们的信号值都已降低甚至未能检测到,这可能是由于胰岛在成年胰腺组织中所占比例很少所造成的。KCNQ1 通道已被证明在胰腺腺泡细胞基底侧膜及分泌性囊泡膜上均有表达,通过介导钾离子流分别参与了细胞电解质及酶的分泌过程<sup>[12]</sup>。为了更真实地了解 KCNQ1 通道在胰腺内分泌细胞的表达情况,我们通过 RT-PCR 分别对成年大鼠胰腺及胰岛中 KCNQ1 通道的表达进行了检测,结果显示,在成年大鼠胰腺及胰岛中都有 KCNQ1、KCNE1、KCNE2、KCNE4 不同水平的表达;同时提示参与胰岛中 KCNQ1 通道构成的辅助亚基可能主要是 KCNE4 和 KCNE1。

Ullrich 等<sup>[13]</sup>报道 KCNQ1 通道在 INS-1(B 细胞瘤株)细胞膜上有功能性表达,特异性阻断该通道可延长 INS-1 细胞动作电位的复极化过程,在特定条件下改变细胞在葡萄糖刺激下的胰岛素分泌量。本研究显示,KCNQ1 在胰腺发育后期、胰腺内分泌细胞功能逐渐成熟阶段才开始出现表达,而在成年胰岛中则具有较高水平表达,提示 KCNQ1 通道可能分布于成熟 B 细胞并参与细胞功能的维持。本实验结果为研究 KCNQ1 通道与 B 细胞内分泌功能之间的联系提供了重要的实验基础。

## [参考文献]

[1] Jespersen T, Grunnet M, Olesen S P. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function[J]. Physiology

(Bethesda), 2005, 20: 408-416.

- [2] Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Osawa H, Furuta H, et al. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus[J]. Nat Genet, 2008, 40: 1092-1097.
- [3] Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T, Hara K, Horikoshi M, Andersen G, et al. SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations[J]. Nat Genet, 2008, 40: 1098-1102.
- [4] Jonsson A, Isomaa B, Tuomi T, Taneera J, Salehi A, Nilsson P, et al. A variant in the KCNQ1 gene predicts future type 2 diabetes and mediates impaired insulin secretion[J]. Diabetes, 2009, 58: 2409-2413.
- [5] Boini K M, Graf D, Hennige A M, Koka S, Kempe D S, Wang K, et al. Enhanced insulin sensitivity of gene-targeted mice lacking functional KCNQ1[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009, 296: R1695-R1701.
- [6] Liu L, Guo J, Yuan L, Cheng M, Cao L, Shi H, et al. Alpha-fetoprotein is dynamically expressed in rat pancreas during development[J]. Dev Growth Differ, 2007, 49: 669-681.
- [7] Hou L Q, Wang Y H, Liu L J, Guo J, Teng L P, Cao L H, et al. Expression and localization of mesothelin in developing rat pancreas[J]. Dev Growth Differ, 2008, 50: 531-541.
- [8] Wang Q, Curran M E, Splawski I, Burn T C, Millholland J M, VanRaay T J, et al. Positional cloning of a novel potassium channel gene; KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias [J]. Nat Genet, 1996, 12: 17-23.
- [9] Habener J F, Kemp D M, Thomas M K. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development[J]. Endocrinology, 2005, 146: 1025-1034.
- [10] MacDonald P E, Joseph J W, Rorsman P. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360: 2211-2225.
- [11] Kim S K, Hebrok M. Intercellular signals regulating pancreas development and function[J]. Genes Dev, 2001, 15: 111-127.
- [12] Lee W K, Torchalski B, Roussa E, Thévenod F. Evidence for KCNQ1  $K^+$  channel expression in rat zymogen granule membranes and involvement in cholecystokinin-induced pancreatic acinar secretion[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 294: C879-C892.
- [13] Ullrich S, Su J, Ranta F, Wittekindt O H, Ris F, Rösler M, et al. Effects of I(Ks) channel inhibitors in insulin-secreting INS-1 cells [J]. Pflugers Arch, 2005, 451: 428-436.