

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00465

MafA 逆转录病毒表达载体的构建及其在肝原始细胞中的稳定表达

金彩霞^{1,2}, 李文林¹, 徐方^{2*}, 胡以平^{1*}

1. 第二军医大学基础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:** 构建表达 MafA(v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue A) 的逆转录病毒表达载体, 并建立稳定表达 MafA 的肝原始细胞系(liver epithelial progenitor cells, LEPCs)。**方法:** 通过 PCR 方法克隆 MafA 基因全长, 将其构建到 pBMN-Z-IRES-Neo 逆转录病毒载体中获得 pBMN-MafA-Neo 载体; 将该载体导入 Phoenix 包装细胞系, 收集病毒上清并感染 LEPCs, 筛选稳定表达 MafA 的 LEPCs; RT-PCR 方法检测 MafA 表达对 LEPCs 分子表型的影响。**结果:** 成功构建 pBMN-MafA-Neo 载体, 并获得稳定表达 MafA 基因的肝原始细胞系(LEPCs-MafA)。LEPCs-MafA 细胞 GK 和 GLUT2 基因表达高于 LEPCs。**结论:** 成功获得稳定表达 MafA 的肝原始细胞系, 为研究 MafA 诱导肝干细胞向胰腺细胞转分化奠定了基础。

[关键词] MafA; 逆转录病毒载体; 肝原始细胞系

[中图分类号] Q 782 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)05-0465-04

Construction of MafA recombinant retroviral vector and its stable expression in liver epithelial progenitor cells

JIN Cai-xia^{1,2}, LI Wen-lin¹, XU Fang^{2*}, 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 harboring MafA and to establish a liver epithelial progenitor cell (LEPC) line for stable expression of MafA. **Methods:** MafA was amplified by PCR and subcloned into pBMN-Z-IRES-Neo vector to obtain pBMN-MafA-Neo vector. After introducing the pBMN-MafA-Neo into Phoenix package cells, the cell culture supernatant was used to infect LEPCs. LEPCs stably expressing MafA gene were screened out. RT-PCR was used to detect the influence of MafA on the phenotype of LEPCs. **Results:** We successfully constructed pBMN-MafA-Neo vector and obtained LEPCs which stably expressed MafA. Expression of GK and GLUT2 genes in LEPCs-MafA cells was higher than that in the LEPCs. **Conclusion:** We have successfully obtained LEPCs which can stably express MafA, laying a basis for studying the differentiation of LEPCs into pancreas cells.

[KEY WORDS] MafA; retroviral vector; liver progenitor cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(5): 465-468]

转录因子 MafA/L-Maf (v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue A, MafA) 属于碱性亮氨酸拉链转录因子(basic-leucine zipper transcription factors, bZIP)家族, 对胰岛 β 细胞的发育分化 and 功能发挥具有重要的调控作用^[1-4]。本研究构建 MafA 逆转录病毒表达载体, 将其导入肝原始细胞系(liver epithelial progenitor cells,

LEPCs) 诱导其稳定表达, 探讨稳定表达 MafA 的肝干细胞向胰腺细胞转分化的潜能。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及载体 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

[收稿日期] 2007-09-11 **[接受日期]** 2008-01-07

[基金项目] 国家自然科学基金(30600326), 宁夏自然科学基金(NZ0775), 宁夏医学院特殊人才启动基金。Supported by National Natural Science Foundation of China(30600326), Natural Science Foundation of Ningxia Autonomous Region (NZ0775), and Scientific Research Priming Item for Talents of Ningxia Medical College(School Priming)。

[作者简介] 金彩霞, 博士, 讲师。E-mail: cxjin4659@sina.com

* 通讯作者(Corresponding authors). Tel: 021-25070291, E-mail: yphu@smmu.edu.cn; Tel: 0951-6980056, E-mail: xufang@nxmc.edu.cn

染蛋白 Marker 购自 MBI Fermentas 公司; Primer Star 酶、Pyrobest 酶购自 TaKaRa 公司; 超纯质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自 V-gene 公司; M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司; Lipofectamin2000 购自 Invitrogen 公司; G418、DMEM 高糖培养基均购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自 Hyclone 公司; MafA 兔抗鼠一抗购自 Calbiochem 公司 (Lot NO: DR1019); FITC 标记的二抗(羊抗兔)购自 Sigma 公司; 细胞系 LEPCs 由本实验室建立^[5]; 逆转录病毒包装细胞系 Phoenix E 由第二军医大学长海医院血液科王健民教授惠赠; 逆转录病毒载体 pBMN-Z-IRES-Neo、大肠杆菌 DH5 α 均由本室保存。

1.2 pBMN-MafA-Neo 逆转录病毒载体的构建

以鼠尾基因组为模板, PCR 方法扩增 MafA 基因 (MafA 基因无内含子), 上下游引物分别为 5'-GCT GGG GCC CCG GGC GAT GG -3' 和 5'-CCA GGG TCC GGC ACT CAC AG -3'; PCR 反应采用 50 μ l 体系, 含上下游引物各 0.5 μ l, dNTP 250 μ mol/L、Primer Star 0.5 μ l; 循环条件为 98 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 2 min。目的片段大小约 1 200 bp。胶回收后的 PCR 产物用 *Taq* 酶加 A, 反应体系为 50 μ l (30 μ l PCR 产物, 5 μ l buffer, 1 μ l dATP), 72 $^{\circ}$ C 10 min。纯化后将两端加 A 的 MafA 片段克隆到 pUCmT 载体得到 pUCm-MafA, 并经测序验证。然后以 pUCm-MafA 为模板用 PCR 方法扩增 MafA, 上下游引物分别为 5'-TGG GGA TCC GGG CGA TGG CCG CGG AGC T -3' (含 *Bam*H I) 和 5'-AGG GAA TTC ACT CAC AGA AAG AAG TCG -3' (含 *Eco*R I)。将 pBMN-Z-IRES-Neo 载体用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切, 得载体的骨架片段。将载体的骨架片段与 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 MafA 片段用 T4 DNA 连接酶连接得到 pBMN-MafA-Neo 载体。

1.3 感染 LEPCs 细胞 将 Phoenix 细胞接种于 6 孔板, 待生长至大约 50% 融合时, 用 Lipofectamin2000 转染试剂将 pBMN-MafA-Neo 载体质粒导入 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 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 后向培养基中加入终浓度为 800 μ g/ml 的 G418 筛选 2 周得到稳定转染的细胞, 命名为 LEPCs-MafA, 扩增并冻存。

1.4 Western 印迹检测 MafA 表达 LEPCs、LEPCs-MafA 细胞用 PBS (pH7.4) 洗 3 次, 刮取细胞, 1 000 \times g 离心 5 min, 弃上清, 沉淀的细胞加 500 μ l RIPA 缓冲液混悬, 冰浴 30 min (间以搅拌)。4 $^{\circ}$ C, 12 000 \times g 离心 10 min, 吸取上清, 分装, Bradford 法测定总蛋白浓度后 -70 $^{\circ}$ C 保存。从上述制备的样品中分别取 50 μ g 总蛋白, 10% SDS-PAGE 室温 60 mA 电泳至分离胶时, 将电流增加到 100 mA。电泳完成后, 室温 50 mA、2 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 (pH7.4) 漂洗 NC 膜 3 次, 每次 10 min, 用 PBS (含 0.2% Tween20) 配制的 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h; 然后 PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min; 将 NC 膜与兔抗小鼠 MafA 的多克隆抗体 (1:2 000) 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min; 加辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:500) 温浴 1 h 后, PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min; 然后与 ECL 试剂反应约 5 min 后, 在暗室中进行 X 线胶片的曝光、显影和定影。

1.5 免疫荧光化学法检测 MafA 表达 取接种于飞片的 LEPCs、LEPCs-MafA 细胞, 丙酮室温固定 15 min。PBS (含 3% Triton-x100) 漂洗 3 次, 每次 10 min, 然后用 PBS 配制的 5% 山羊血清室温封闭 30 min, 加入兔抗小鼠 MafA 的多克隆抗体 (1:2 000), 湿盒 4 $^{\circ}$ C 反应过夜。PBS 洗 3 次, 每次 10 min。加入 FITC 标记-山羊抗兔 IgG (1:150), 室温反应 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 10 min, DAPI 复染细胞核。阴性对照组, 不加一抗, 其余过程相同。

1.6 RT-PCR 检测细胞分子表型 UNIQ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒抽取 LEPCs、LEPCs-MafA 细胞的总 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 Oligo dT₁₈ 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 检测细胞分析表型的表达, 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 30 s, 不同基因各自合适的退火温度下 (表 1) 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 循环 34~36 次, 然后 72 $^{\circ}$ C 延长 10 min, 于 4 $^{\circ}$ C 保存。取 20 μ l PCR 产物以 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳鉴定扩增片段。其中 MafA 的 PCR 反应体系中使用 Primer Star 酶 0.5 μ l, 2 \times GC II buffer 25 μ l, 其余条件同上。RT-PCR 检测引物见表 1, 引物由上海生工生物工程技术有限公司及英俊生物公司合成。

表 1 RT-PCR 检测引物序列
Tab 1 List of primers for RT-PCR

Gene	Primer	PCR size(bp)	Annealing temperature t/°C
MafA	5'-CGC AGG CCA CCA CGT GCG CTT GGA GGA G -3'	370	60
	5'-CTG CGC TGG CGA GGG CTC CCG AGG GAA G-3'		
GK	5'-GAT CAT TGG CGG AAA GTA CA-3'	443	53.5
	5'-ATT TAC TTT GTG GCT GGA TTG-3'		
GLUT2	5'-TAG TGA CCA GCT ATA ATC AGA G-3'	441	57.8
	5'-CCC TGC TGG CCC TGC TCT T-3'		
GAPDH	5'-AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG-3'	222	61
	5'-ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA-3'		

2 结果

2.1 pBMN-MafA-Neo 病毒载体的鉴定 构建的 pBMN-MafA-Neo 载体经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定, 酶切片段为 1 200 bp 和 6 432 bp(图 1), 与预期相符; 测序结果证实 MafA 全序列没有发生突变。

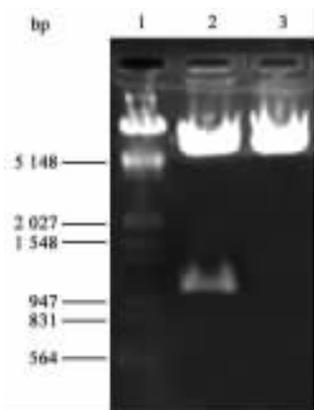


图 1 pBMN-MafA-Neo 载体酶切鉴定
Fig 1 Restrictive enzyme digestion of recombinant plasmid pBMN-MafA-Neo

1: λDNA *Eco*R I / *Hind* III marker; 2: pBMN-MafA-Neo digested with *Bam*H I and *Eco*R I ; 3: pBMN-MafA-Neo plasmid

2.2 Western 印迹检测 MafA 蛋白表达 结果表明感染病毒载体的 LEPCs-MafA 细胞稳定表达 MafA 蛋白, 而未感染的 LEPCs 细胞未检测到 MafA 蛋白的表达(图 2)。

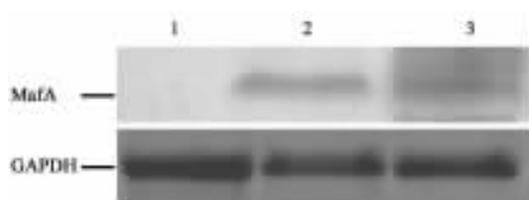


图 2 Western 印迹检测 MafA 蛋白的表达
Fig 2 Western blotting analysis of MafA protein

1: LEPCs; 2: Pancreas tissue; 3: LEPCs-MafA

2.3 免疫荧光化学法检测 MafA 的表达 感染病毒载体的 LEPCs-MafA 细胞核内可检测到 MafA 蛋白的表达, 而 LEPCs 细胞未检测到 MafA 的表达(图 3)。

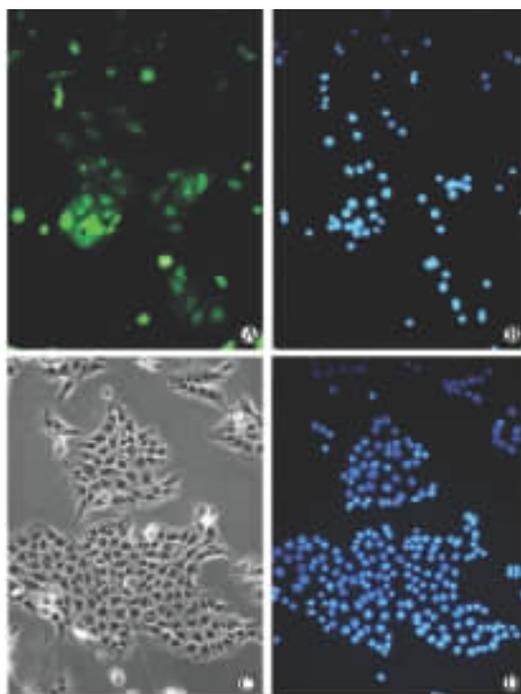


图 3 免疫荧光化学法检测 LEPCs 细胞核中 MafA 蛋白的表达
Fig 3 Immunofluorescent analysis of MafA protein in nuclei of LEPCs

A: MafA was expressed in nuclei of LEPCs-MafA; B: DAPI staining displayed the nuclei in the same visual field of A; C: LEPCs; D: DAPI staining displayed the nuclei in the same visual field of C. Original magnification: ×200

2.4 LEPCs-MafA 细胞表型的改变 LEPCs-MafA 细胞稳定表达 MafA mRNA, 而 LEPCs 细胞未检测到 MafA mRNA 表达; LEPCs-MafA 细胞 GLUT2 和 GK 基因 mRNA 表达高于 LEPCs 细胞(图 4)。但 LEPCs-MafA 细胞胰腺 β 细胞相关分子(如胰岛素)的表达并未升高。

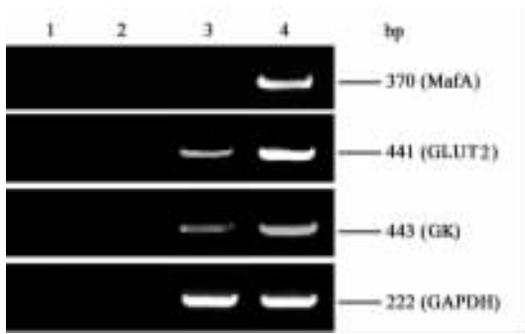


图4 LEPCs-MafA细胞表型的RT-PCR检测结果

Fig 4 Phenotype of LEPCs-MafA cells by RT-PCR analysis

1: Water; 2: RNA sample without retrotranscription; 3: LEPCs; 4: LEPCs-MafA. cDNA are equalized for GAPDH expression

3 讨论

MafA是在胰岛β细胞中特异表达的转录调控因子,对β细胞的发育成熟和发挥功能具有重要作用^[6-9]。目前的研究^[10-11]表明MafA主要是通过激活胰岛素启动子的RIPE3b1结合区域发挥作用,其被认为是一个可以有效的用于产生分泌胰岛素细胞的转录因子,具有极大的开发潜能^[11-13]。目前肝脏细胞是被用于产生分泌胰岛素细胞的主要细胞类型之一。各种有效的转录因子的发现使得肝细胞向胰腺细胞的转分化成为可能,成为目前糖尿病治疗新的研究热点。

本研究利用逆转录病毒将外源基因MafA导入到本实验室建立的并已证实具有分化为肝细胞和胆管上皮细胞双向潜能^[5]的肝原始细胞系LEPCs中,筛选获得稳定表达MafA的LEPCs-MafA细胞,在mRNA和蛋白质水平均证实了MafA的表达。本研究结果表明LEPCs-MafA细胞GLUT2和GK基因的表达明显上调。由于GLUT2和GK基因是β细胞重要的葡萄糖感受器,GLUT2和GK基因上调提示MafA在葡萄糖刺激的胰岛素分泌中发挥作用,具体作用机制需进一步研究探讨。本研究发现,表达MafA后并没有诱导LEPCs细胞表达胰岛素,可能是由于本实验所构建的MafA逆转录病毒载体使肝细胞转分化为胰腺细胞的效率有限,后续研究可以通过提高逆转录病毒的表达效率、调整培养条件等方法获得更为有效的转分化效果。

LEPCs-MafA细胞系的建立为进一步研究肝脏细胞向胰腺细胞的转分化潜能及转分化过程的分子机制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Olbrot M, Rud J, Moss L G, Sharma A. Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 6737-6742.
- [2] Matsuoka T A, Zhao L, Artner I, Jarrett H W, Friedman D, Means A, et al. Members of the large Maf transcription family regulate insulin gene transcription in islet beta cells [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23: 6049-6062.
- [3] Kataoka K, Shioda S, Ando K, Sakagami K, Handa H, Yasuda K. Differentially expressed Maf family transcription factors, c-Maf and MafA, activate glucagon and insulin gene expression in pancreatic islet alpha- and beta-cells [J]. J Mol Endocrinol, 2004, 32: 9-20.
- [4] Matsuoka T A, Artner I, Henderson E, Means A, Sander M, Stein R. The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 2930-2933.
- [5] Li W L, Su J, Yao Y C, Tao X R, Yan Y B, Yu H Y, et al. Isolation and characterization of bipotent liver progenitor cells from adult mouse [J]. Stem Cells, 2006, 24: 322-332.
- [6] Kataoka K, Han S I, Shioda S, Hirai M, Nishizawa M, Handa H. MafA is a glucose-regulated and pancreatic beta-cell-specific transcriptional activator for the insulin gene [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 49903-49910.
- [7] Zhang C, Moriguchi T, Kajihara M, Esaki R, Harada A, Shimohata H, et al. MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25: 4969-4976.
- [8] Zhao L, Guo M, Matsuoka T A, Hagman D K, Parazzoli S D, Poitout V, et al. The islet beta cell-enriched MafA activator is a key regulator of insulin gene transcription [J]. J Biol Chem, 2005, 280: 11887-11894.
- [9] Wang H, Brun T, Kataoka K, Sharma A J, Wollheim C B. MAF A controls genes implicated in insulin biosynthesis and secretion [J]. Diabetologia, 2007, 50: 348-358.
- [10] Kajihara M, Sone H, Amemiya M, Katoh Y, Isogai M, Shimano H, et al. Mouse MafA, homologue of zebrafish somite Maf 1, contributes to the specific transcriptional activity through the insulin promoter [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 312: 831-842.
- [11] Kaneto H, Matsuoka T A, Nakatani Y, Miyatsuka T, Matsu-hisa M, Hori M, et al. A crucial role of MafA as a novel therapeutic target for diabetes [J]. J Biol Chem, 2005, 280: 15047-15052.
- [12] Ren J, Jin P, Wang E, Liu E, Harlan D M, Li X, et al. Pancreatic islet cell therapy for type I diabetes: understanding the effects of glucose stimulation on islets in order to produce better islets for transplantation [J]. J Transl Med, 2007, 5: 1.
- [13] Vanderford N L, Andrali S S, Ozcan S. Glucose induces MafA expression in pancreatic beta cell lines via the hexosamine biosynthetic pathway [J]. J Biol Chem, 2007, 282: 1577-1584.

[本文编辑] 贾泽军