

Pdx1 诱导胰岛素分泌细胞形成研究进展

李艳琼 李 薇 崔照琼 张 彦

Pdx1 基因对胰腺发育胰岛功能的影响有着十分重要的作用,近年来利用 Pdx1 在体外细胞培养的转分化作用,将成体肝细胞、胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞、肠上皮细胞等诱导分化成胰岛素分泌细胞的试验研究已经成为糖尿病基因和细胞学治疗的研究热点之一。这些研究为更科学更有效地控制和治疗糖尿病特别是 1 型糖尿病开辟了新的途径和前景。

一、Pdx1 基因、蛋白及其生物学意义

Pdx1 (pancreatic duodenal homeobox - 1) 基因即胰十二指肠同源盒基因 - 1,属于同源盒基因家族成员之一,是主控胰腺细胞群发育并维持成体胰岛正常分泌功能的重要基因,也是公认的胰腺干细胞特异性标志基因。Pdx1 基因包括两个外显子和一个内含子,外显子编码 Pdx1 蛋白的氨基端、羧基端和同源结构域,Pdx1 蛋白有 283 个氨基酸,相对分子质量约 31kDa,它借助氨基端与胰岛素基因启动子结合而调控胰岛素基因的转录表达和胰岛素的分泌。同源结构域包含 DNA 结合区,引导胰岛素 mRNA 从细胞核转移到细胞质,协同其氨基端增强胰岛素的表达。羧基端与生长素抑制激素基因结合,促进生长素抑制激素在 δ 细胞中的表达。在个体的早期发育过程中,Pdx1 蛋白对胰腺的形成具有重要作用,它通过激活与胰腺的形成有关的基因调控胰腺发育,无论是小鼠还是人类,如果 Pdx1 基因在胚胎发育早期不表达,将导致无胰畸形。在个体生活过程中,Pdx1 是调控胰岛素基因转录、胰岛素颗粒成熟和分泌的重要转录因子,它通过结合胰岛素基因转录调控区 A3 (- 201 ~ - 196 bp) 而激活其转录过程,上调胰岛素表达水平。此外,在胰岛素 mRNA 转录水平不变的情况下,Pdx1 的高表达能提高细胞间胰岛素含量。因此,Pdx1 决定着胰岛素基因的启动、表达和增强效应,同时也调

控着胰岛素的成熟和分泌过程。

二、Pdx1 诱导非 β 细胞转化为胰岛素分泌细胞的研究

1. Pdx1 诱导肝细胞转化为胰岛素分泌细胞:由于肝脏与胰腺共同起源于前肠末端的内胚层,在成体组织中二者也共同表达某些与葡萄糖调节有关的基因,如葡萄糖转运蛋白 2、葡萄糖激酶。同时,肝细胞具有某些组织干细胞功能特征,在一定条件下具有很强的增生更新能力,而且,Pdx1 细胞转染实验也发现,肝细胞是比较理想的诱导转分化形成胰岛素分泌细胞的靶细胞。2000 年,以色列 Ferber 等^[1]首次将含有 Pdx1 基因和巨细胞病毒启动子的重组腺病毒经尾静脉注入小鼠,细胞转染检测发现肝、肾、心、上皮等组织均有 Pdx1 基因表达,而肝细胞表达水平最高,并使肝细胞表现了胰岛细胞某些特征,即有胰岛素和胰高血糖素表达的细胞功能转换。

肝细胞转分化机制研究表明,导入的 Pdx1 激活了肝细胞内的胰腺发育相关基因,使得肝细胞沿着胰腺的方向分化形成胰岛素分泌细胞,发生转分化的肝细胞一般都分布在肝脏中央静脉附近,可能是中央静脉附近的这些细胞比较容易被 Pdx1 转染而诱导产生转分化,这些细胞中有一定水平的肝细胞核因子表达^[2]。有报道称,肝细胞核因子 HNF3 β 、HNF1 β 和 HNF - 6 在胰腺的发育分化中起着重要作用^[3, 4]。但是,导入的 Pdx1 在使胰腺内分泌基因表达的同时,也引起了胰腺外分泌基因的表达,导致一些不良反应,2003 年,Kojima 等^[5]用 Pdx1 诱导小鼠肝细胞转分化形成胰岛素分泌细胞时,引起了严重的肝炎。2004 年,美国 Cao 等^[6]将单纯疱疹病毒 VP16 蛋白激活结构域与 Pdx1 融合 (Pdx1 - VP16),由慢病毒载体 (lentiviral vector, LV) 介导,体外转染肝卵圆细胞株 WB,肝细胞选择性地转化为胰岛素分泌细胞,在胰岛内分泌基因表达的同时避免了外分泌基因激活作用。在上述研究中,研究者都是以病毒作为载体将 Pdx1 基因导入实验小鼠,病毒的引入会引起一些不良反应,它的安全问题令人担心。Noguchi 等^[7]曾报道

作者单位:650106 昆明医学院海源学院细胞生物学暨医学遗传学教研室(李艳琼、崔照琼);昆明医学院海源学院病原实验室(李薇);昆明医学院生物教研室(张彦)

通讯作者:张彦,电子信箱:yzha37@163.com

Pdx1 蛋白含有蛋白转导结构域 (protien transduction domain, PTD) 系列, 通过这个 PTD 系列, Pdx1 可以通过细胞膜进入细胞质、细胞核, 从而发挥作用。Koya 等^[8]利用这个原理将重组过的 Pdx1 蛋白 (Pdx1 - his6) 腹腔注射入小鼠, 发现以这样的方式导入的 Pdx1 蛋白也能使胰腺的 β 细胞增生、肝细胞转分化为胰岛素分泌细胞, 并且它们共同降低了链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 导致的高血糖。

2. Pdx1 诱导干细胞转化为胰岛素分泌细胞: 干细胞 (embryonic stem cell, ES) 属于未分化细胞, 具有较强增生能力和发育的全能性, 能够分化成包括胰岛素分泌细胞在内的多种细胞类型。2004 年, 日本的 Miyazaki 等将能够精确控制 Pdx1 基因表达的 Tet - off 系统定点整合到 backbone knock - in 载体的 ROSA26 位点, 将该载体转染人胚胎干细胞, 结果早期 Pdx1 的表达增强了该干细胞中胰岛素及其他相关基因的表达, 两个月后, 随着细胞的不断增生, 转染细胞逐渐丧失了胰岛素表达能力^[9], 随后用 NeuroD1 再次转染这些丧失胰岛素表达能力的细胞, 它们又重新恢复了胰岛素表达能力, 试验表明, Pdx1 和 NeuroD1 协同表达可以维持干细胞形成的胰岛素分泌细胞的特性^[10]。同年, 李艳华等将含有 Pdx1 基因的重组腺病毒 (pAd - Pdx1) 转染人骨髓间充质干细胞, 7 天后, 转染了 pAd - Pdx1 的细胞中有 Pdx1 及胰岛素基因的表达, 这些细胞向胞外分泌的胰岛素量为 15. 21mU/L 左右, 后来她们发现这些转染了 pAd - Pdx1 的骨髓间充质干细胞还表达早期基因 Ngn3, 且对葡萄糖刺激反应不太敏感, 将这些细胞移植到 STZ 大鼠肾包膜下, 两周后大鼠的血糖转为正常, 并且维持了至少 42 天^[11,12]。2006 年, 孙吉平等构建含有 Pdx1 的真核表达载体, 并使用新型纳米介质 Superfect 介导重组载体转染骨髓间充质干细胞, 诱导后的骨髓间充质干细胞分化为胰岛素阳性细胞, 这些细胞可以在受葡萄糖刺激的情况下而分泌胰岛素, 而且对葡萄糖刺激反应较敏感。将这些细胞移植到 STZ 糖尿病大鼠肾包膜下, STZ 糖尿病大鼠的血糖迅速下降, 但不足的是其降血糖作用维持不久, 在细胞移植 21 天后其抑制血糖水平的能力减弱, 出现血糖反弹^[13]。2009 年, 高峰等应用 Tet - on 基因表达系统, 在四环素的调控下使 Pdx1 和 β 细胞促进因子 (betacellulin) 在大鼠骨髓间充质干细胞中共表达, 置入基础分化培养基中进一步诱导后, 骨髓间充质干细胞分化形成胰岛素分泌细胞, 移植到 STZ 糖尿病大鼠肾包膜下, 胰岛素分泌细胞

分泌胰岛素, 大鼠体内胰岛素水平明显升高, 血糖水平显著降低, 糖尿病症状得到缓解^[14]。

3. Pdx1 诱导上皮细胞转化为胰岛素分泌细胞: 除了肝细胞和多种干细胞成为近年糖尿病细胞和基因治疗重点研究对象之外, 肠上皮细胞也是具有诱导产生胰岛素分泌细胞的潜力, 其原因可能在于胰腺与肠道上皮在胚胎发生中共同起源于前肠内胚层。日本的 Kojima 和 Yodaida 两个研究组分别以 Pdx1 基因转染大鼠小肠上皮细胞 IEC - 6, 在转染细胞中诱导产生了多种 β 细胞特异性基因表达, 包括胰淀粉样肽、葡萄糖激酶和 Nkx6. 1 等, 但未能检测到胰岛素表达^[15-17]。Yoshida 研究组用 β 细胞促进因子 (betacellulin) 处理转染了 Pdx1 的 IEC - 6 细胞, 结果获得了胰岛素分泌细胞, 但这类细胞对葡萄糖刺激不敏感。此外, 他们将转染了 Pdx1 的 IEC - 6 细胞移植到鼠的肾包膜下, 检测发现, 这些细胞中 50% 以上有胰岛素产生^[16]。Kojima 研究组用 β 细胞促进因子处理转染了 Pdx1 的 IEC - 6 细胞后, 转染细胞分泌胰岛素, 同时发现还有转录因子 Isl - 1 表达, 而转染之前没有表达, 这一结果提示, Pdx1 和 Isl - 1 足以诱导小肠上皮细胞形成胰岛素分泌细胞, 用 Isl - 1 处理 Pdx1 阳性的小肠上皮细胞得到胰岛素分泌细胞证实了这一点。但是得到的胰岛素分泌细胞对葡萄糖刺激不够敏感, 移植到 STZ 糖尿病鼠后疗效持续时间亦较短^[17]。

三、总结与展望

Pdx1 在胰腺早期发育、较晚期 β 细胞的分化以及 β 细胞维持正常功能中起着重要作用, 基于这个原理, 许多研究者用 Pdx1 在体内或体外诱导一些起源上与 β 细胞具有相同祖先的非 β 细胞 (如肝细胞) 形成胰岛素分泌细胞, 且这些细胞在体内对 STZ 导致的高血糖已表现出一定的疗效。但是, 通过上述的实验结果, 我们不难看出, 仅 Pdx1 诱导形成的胰岛素分泌细胞并不成熟, 如 Ngn3 的高表达、胰岛素分泌不是葡萄糖依赖的、对 STZ 导致的糖尿病疗效的有限性等都说明了所得到的胰岛素分泌细胞的不成熟性或不稳定性。所以, 虽然 Pdx1 在诱导非 β 细胞转化为胰岛素分泌细胞的过程中发挥了关键作用, 但是, 单纯 Pdx1 还不足以使非 β 细胞转化成具有 β 细胞功能的细胞, 其他与 β 细胞成熟有关的因子如 Mafa、 β 细胞促进因子等的协同^[18,19], 或将这种未成熟胰岛素分泌细胞进一步置于各种体外 (高糖环境培养、生长因子诱导) 或体内 (肾被囊腔) 环境中继续

诱导,才可能促使这些细胞继续成熟。

将 Pdx1 导入非 β 细胞后启动与胰腺发育相关的基因表达,使这些非 β 细胞转化成为胰岛素分泌细胞,代替 β 细胞分泌胰岛素稳定患者的血糖,是糖尿病治疗的策略之一。现在的研究已经证明 Pdx1 是诱导非 β 细胞分化形成胰岛素分泌细胞的关键因子,但要使诱导所形成的胰岛素分泌细胞达到临床治疗的要求,还需要解决许多的问题:①Pdx1 诱导形成的胰岛素分泌细胞的不成熟性或不稳定性,胰腺发育是 Pdx1 及其他因子在时空上选择性表达的结果,怎样利用其他的因子辅助 Pdx1 将非 β 细胞很好地转分化形成成熟的、能够替代 β 细胞的胰岛素分泌细胞,还需要继续探索;②人为导入 Pdx1,是否会引起细胞其他的癌变,这还没有充分估计;③诱导形成的胰岛素分泌细胞是否同样会遭到免疫攻击,如果会,怎么避免,这类问题尚无定论。虽然待解决的问题不少,但相信随着技术的不断进步,研究的不断深入,这些问题都会得到解决,给全世界的糖尿病患者带来福音。

参考文献

- 1 Ferber S, Halkin A, Cohen H, *et al.* Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia[J]. *Nat Med*, 2000, 6(5): 568 - 572
- 2 Ber I, Shternhall K, Perl S, *et al.* Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(34): 31950 - 31957
- 3 Jacquemin P, Lemaigre FP, Rousseau GG. The Onecut transcription factor HNF-6 (OC-1) is required for timely specification of the pancreas and acts upstream of Pdx-1 in the specification cascade[J]. *Dev Biol*, 2003, 258: 105 - 116
- 4 Maestro MA, Cardalda C, Boj SF, *et al.* Distinct roles of HNF1 β , HNF1 α , and HNF4 α in regulating pancreas development, beta-cell function and growth[J]. *Endocr Dev*, 2007, 12: 33 - 45
- 5 Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, *et al.* NeuroD - betacellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice[J]. *Nat Med*, 2003, 9(5): 596 - 603
- 6 Cao LZ, Tang DQ, Horb ME, *et al.* High glucose is necessary for complete maturation of pdx-1 - vp16 - expressing hepatic cells into functional insulin - producing cells[J]. *Diabetes*, 2004, 53(12): 3168 - 3178
- 7 Noguchi H, Kaneto H, Weir GC, *et al.* PDX-1 protein containing

its own antennapedia - like protein transduction domain can transduce pancreatic duct and islet cells[J]. *Diabetes*, 2003, 52(7): 1732 - 1737

- 8 Koya V, Lu S, Sun YP, *et al.* Reversal of Streptozotocin - Induced Diabetes in Mice by Cellular Transduction With Recombinant Pancreatic Transcription Factor Pancreatic Duodenal Homeobox - 1[J]. *Diabetes*, 2008, 57(3): 757 - 769
- 9 Miyazaki S, Yttnato E, Miyazaki J. Regulated expression of pdx - 1 promotes in vitro differentiation of insulin - producing cells from embryonic stem cells[J]. *Diabetes*, 2004, 53(4): 1030 - 1037
- 10 Saitoh K, Yamato E, Miyazaki S, *et al.* Both Pdx - 1 and NeuroD1 genes are requisite for the maintenance of insulin gene expression in ES - derived differentiated cells[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2007, 77(3): S138 - 142
- 11 Li YH, Zhang R, Wang YF, *et al.* The Expression of PDX21 Gene in Mesenchymal Stem Cells Transduced by Adenovirus Vector[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2004, 31(6): 538 - 542
- 12 Li YH, Zhang R, Qiao HF *et al.* Generation of Insulin - Producing Cells From PDX - 1 Gene - Modified Human Mesenchymal Stem Cells[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 211(1): 36 - 44.
- 13 孙吉平, 杨于嘉, 王晓莉, 等. 胰腺十二指肠同源框 - 1 基因促进大鼠骨髓间充质干细胞分化为胰岛样细胞[J]. *中国科学 C 辑 生命科学*, 2006, 36(2): 171 - 179
- 14 高峰, 周汉新, 李莉莎, 等. Pdx1 和 BTC 共表达的骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠糖尿病的实验研究[J]. *广东医学*, 2009, 30(6): 866 - 869
- 15 Yamada S, Kojima H, Fujimiya M, *et al.* Differentiation of immature enterocytes into enteroendocrine cells by Pdx - 1 overexpression[J]. *Am J Physiol*, 2001, 281(1): G229 - G236
- 16 Yodaida S, Kajimoto Y, Yasuda T, *et al.* PDX - 1 induces differentiation of intestinal epithelioid IEC - 6 into insulin - producing cells[J]. *Diabetes*, 2002, 51(8): 2505 - 2513
- 17 Kojima H, Nakama T, Fujita Y, *et al.* Combined expression of pancreatic duodenal homeobox 1 and islet factor 1 induces immature enterocytes to insulin - producing cells[J]. *Diabetes*, 2002, 51(5): 1398 - 1408
- 18 Wang H, Brun T, Kataoka K, *et al.* MAFA controls genes implicated in insulin biosynthesis and secretion[J]. *Diabetologia*, 2007, 50(2): 348 - 358
- 19 Thowfeequ S, Ralphs KL, Yu WY. *et al.* Betacellulin inhibits amylase and glucagon production and promotes beta cell differentiation in mouse embryonic pancreas[J]. *Diabetologia*, 2007, 50(8): 1688 - 1697

(收稿:2009 - 12 - 08)

欢迎订阅

欢迎赐稿