

强力霉素对糖尿病小鼠肌肉转染人胰岛素基因的调控作用

刘海霞, 李 鸿, 苏本利

(大连医科大学 附属第二医院 内分泌科, 辽宁 大连 116027)

摘要: [目的] 研究强力霉素对糖尿病小鼠肌肉转染人胰岛素基因表达的调控作用。 [方法] 构建 pTA- tet- hINS质粒; 以链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导昆明小鼠成糖尿病模型。采用电穿孔法转移质粒 pTA- tet- hINS, 通过强力霉素 (doxycycline, Dox) 水给药/撤除以评价四环素系统调控人胰岛素表达的可行性。检测末梢血糖, 血清人真胰岛素及小鼠肌肉组织人胰岛素原基因 mRNA 表达情况。 [结果] 电穿孔转染目的质粒胰岛素后, 立即予饮 Dox 水, 可在小鼠肌肉组织中检测到 mRNA 表达, 第 2 周降糖效果最佳, 撤除强力霉素后, 血糖回升, 于 48 h 升至转染前水平, 再次予饮 Dox 水后, 血糖逐渐下降, 72 h 内达到撤药前水平。重复给药/撤药两次结果一致。 [结论] 通过给药/撤除 Dox 可以实现对人胰岛素原基因表达的开关调控。

关键词: 四环素调控系统; 胰岛素; 糖尿病; 基因治疗

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7295(2011)05-0444-04

Regulated human proinsulin expression in vivo using Tet - inducible vectors

LU Hai- xia, LI Hong, SU Ben- li

(Department of Endocrinology, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

Abstract: [Objective] To evaluate the hypoglycemic effect of a doxycycline regulated insulin expression vector electroporated to skeletal muscle of streptozotocin- induced diabetic mice [Methods] The plasmid pTA- tet- hINS constructed previously was transferred to hind leg muscle of streptozotocin- induced diabetic mice of Kunming species, and fed in the drinking water with doxycycline immediately. The tail blood glucose was measured with glucose oxidase method daily. Human true insulin was analyzed with ELISA. Total mRNA were extracted from muscles and liver tissues. RT-PCR was used to analyze the human proinsulin mRNA levels. [Results] Following intramuscular injection of the vector, the insulin mRNA expressions in mice muscles were examined and repeated induction of serum insulin protein following doxycycline administration were observed. The best hypoglycemic effect was showed in second week after transfer; with withdrawal of inducer doxycycline, blood glucose began to increase to the level before transfer in 48 hours, and then with doxycycline administration, blood glucose of the mice decreased to the level gradually before withdrawal in 72 hours. Two cycles of regulation with the same results were achieved over 34 days. [Conclusion] The tet- on system is a useful tool for controlling the expression of human insulin electroporated in mice.

Key words: tetracycline regulatory system; insulin; diabetes mellitus; gene therapy

收稿日期: 2011-04-14; 修回日期: 2011-05-29

作者简介: 刘海霞 (1977-), 女, 黑龙江鸡西人, 主治医师, 博士研究生。E-mail: dlhx017@163.com

通信作者: 苏本利, 教授。E-mail: dlbenlisu@sina.com

1型糖尿病的病因为体内胰岛素绝对缺乏,故患者须终生应用胰岛素。基因治疗糖尿病始终为研究热点,它是将胰岛素基因直接导入患者体内,长期产生有生物活性的胰岛素。胰岛素如产生过量势必会发生低血糖的风险,因此,胰岛素基因的表达调控则是基因治疗成功的基本保障。四环素(tetracycline, Tet)调控的基因表达系统是近年来发展的人类基因治疗中可接受的一种表达调控系统^[1]。本实验通过构建可由四环素衍生物强力霉素调控的人胰岛素原基因(prfA- tet- hINS)表达载体,研究基因导入后胰岛素基因在糖尿病小鼠骨骼肌中的表达水平及活性,通过糖尿病小鼠饮用水中强力霉素(doxycycline, Dox)的给药/撤除以评价四环素系统中的Tet-on系统对人胰岛素基因表达的开关、调控作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂:质粒 pLNCX 购自美国 Clontech 公司, pINS-ABC(带有 furin 酶切位点的重组人胰岛素原基因)^[2]由西班牙巴塞罗那大学兽医院 Fatima Bosch 教授惠赠, pUHG102-8、pUHF1-1(四环素抗性基因操纵子系统)^[3]由德国 Heidelberg 大学 H. Bujard 教授惠赠。链脲佐菌素(STZ)、强力霉素(doxycycline)及 DEPC 水均购自 sigma 公司。Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。RT-PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。RT-PCR 所用引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。DL-2000, λ -HindIII 分子量标准购自宝生物工程(大连)有限公司。人胰岛素 ELISA 试剂盒购自美国 BIOSOURCE 公司,灵敏度为 0.15 μ IU/mL,与人胰岛素的交叉反应为 100%,与人胰岛素原及大鼠胰岛素的交叉反应为 0%。

1.1.2 主要器材:血糖仪及试纸(葡萄糖氧化酶法,美国罗氏公司),DNA 扩增仪(美国 PE 公司),TS-B 转基因仪(北京医科大学仪器厂),酶标仪(芬兰 Thermo Lab systems 公司),M-26 型紫外光透照仪(美国)。

1.1.3 实验动物:昆明种小鼠 150 只,雄性,8~10 周龄,体重(28 \pm 2)g 购自大连医科大学实验动物中心,实验动物饲养及实验经过大连医科大学医学伦理学委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建,扩增和提取:pINS-ABC 带有 furin 酶切位点的重组人胰岛素原基因,能够在成肌细胞成熟为胰岛素,通过基因重组将重组人胰岛素

原基因构建为 prfA- tet- hINS,电转至感受态大肠杆菌 JM109 中,碱裂解法提取质粒,聚乙二醇沉淀法进行纯化,并对插入的 hINS 片段进行限制性内切酶酶切鉴定和直接测序^[4]。

1.2.2 糖尿病小鼠模型的建立及质粒的转染:150 只昆明小鼠,每只小鼠以 120 mg/kg 腹腔注射新鲜配制的 1.5% STZ 溶液(pH 4.1)。5 d 后检测随机鼠尾末梢血糖 \geq 16.67 mmol/L 为成模,筛选血糖稳定在 26~32 mmol/L 达 2 周者留做实验。实验小鼠分两组,第 1 组小鼠(42 只)的两侧股部肌肉各注射质粒 prfA- tet- INS150 μ g(总计 300 μ g),转染后立即喂浓度为 2 mg/mL Dox 水(简称 Dox 组);第 2 组小鼠(35 只)的两侧股部肌肉各注射质粒 prfA- tet- INS150 μ g(总计 300 μ g),转染后饮用水中无 Dox(简称 no Dox 组)。第 1、2 组质粒注射后 5 min 内在注射部位两侧与注射平行方向插入两根电极针(直径 0.2 mm,长度 1.5 cm,两针间距 0.5 cm)并将其与转基因仪连接,给予方波电脉冲刺激(电压 200 V/cm,波宽 40 ms,脉冲次数 6 和频率 1 Hz)^[5,6]。两组转染后监测鼠尾末梢血糖。

1.2.3 动物标本的留取及检测:转染第 14 天,各组各取 3~4 只小鼠,摘眼球取血,分离血清,保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中;留取两股肌肉、肝脏组织,保存于液氮中。

1.2.4 小鼠血清人胰岛素:按厂家提供说明书 ELISA 法检测小鼠血清人胰岛素。

1.2.5 小鼠肌肉组织中人胰岛素原基因 mRNA 的提取及 RT-PCR 检测:按厂家提供的方法用 Trizol 试剂提取肌肉、肝脏组织 mRNA。以小鼠 β -actin 为内参,上游引物:5'-AGCCTTCCTTCTTGGGTATG-3',下游引物:5'-AACGCAGCTCAGTAACAGTC-3',扩增片段长度为 364 bp。根据质粒 prfA- tet- hINS 的 hINS 片段设计引物,上游引物:5'-CGCAGCCTTTGTCAACCAAC-3',下游引物:5'-CACAAATGCACGCTTCTGTC-3',扩增片段长度为 217 bp。RT-PCR 反应条件:30 $^{\circ}$ C,10 min;42 $^{\circ}$ C,30 min;99 $^{\circ}$ C,5 min;5 $^{\circ}$ C,5 min;1 个循环。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C,2 min;1 个循环;94 $^{\circ}$ C,30 s;55 $^{\circ}$ C,30 s;72 $^{\circ}$ C,1 min;共 35 个循环。

1.3 统计学方法

采用 SPSS10.0 统计软件进行统计学处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,t 检验进行组间均值比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人胰岛素原基因在小鼠肌肉组织中的表达

Dox组与 no Dox组转移后通过 RT-PCR在肌肉组织均得到预期的 217 bp 人胰岛素原基因 mRNA 条带,且前者在亮度上显著强于后者(图 1 A),证实载有 Tet- on系统的人胰岛素原基因经 Dox调控后在小鼠肌肉组织中具有较高水平的 mRNA 表达,当无 Dox调控时,同样可以检测出较低水平的表达。而两组肝脏组织的 RT-PCR 未扩增出特异条带(图 1 A)。

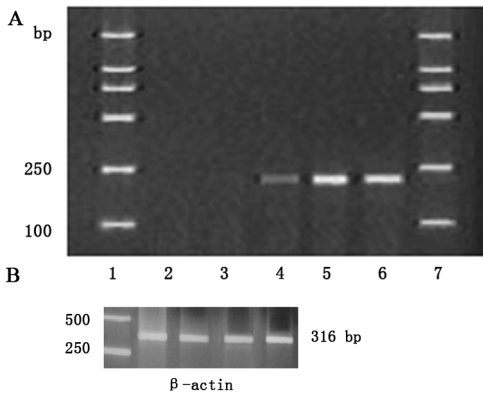


图1 人胰岛素原基因在小鼠肌肉组织中的表达
Fig1 mRNA RT-PCR results

A. 人胰岛素原基因在各组小鼠肌肉与肝脏的 mRNA 表达。1, 7: DL-2000 分子量标准;2. no Dox组肝脏组织胰岛素原基因 RT-PCR结果;3. Dox组肝脏组织 RT-PCR结果;4. no Dox组肌肉组织 RT-PCR结果;5. Dox组肌肉组织 RT-PCR结果;6. 质粒 pTA-te4-ihNS PCR结果。B 内参 β -actin RT-PCR结果。1. DL-2000 分子量标准;2. no Dox组肝组织 β -actin RT-PCR结果;3. Dox组肝脏组织 β -actin RT-PCR结果;4. no Dox组肝脏组织 β -actin RT-PCR结果;5. Dox组肌肉组织 β -actin RT-PCR结果

marker 2; RT-PCR for liver in the no Dox group;3; RT-PCR for liver in the Dox group;4; RT-PCR for muscle in the no Dox group;5; RT-PCR for muscle in the Dox group;6; PCR for plasmid pTA-te4-ihNS β -actin mRNA 1; DL-2000 marker 2-5; β -actin mRNA RT-PCR for corresponding tissues in figure 1 A.

2.2 两组小鼠血清人胰岛素比较

Dox组转移 pTA-te4-ihNS质粒之后糖尿病小鼠血清中人胰岛素水平明显增高,为(55.67 ± 1.366) μ IU/L, no Dox组也可检测到糖尿病小鼠血清胰岛素,但水平较低(16.3 ± 0.577) μ IU/L,两组比较差异有显著性意义, $P < 0.01$ 。

2.3 强力霉素对 pTA-te4-ihNS基因表达的调控

电穿孔转移人胰岛素原基因后, no Dox组虽然血清中可检测到人胰岛素,但并无明显降糖作用,电转移 24 h后, Dox组与 no Dox组小鼠的血糖比较差异有显著性意义, $P < 0.05$,可实现较为明显的降糖效果;撤除 Dox组饮用水中的 Dox后,糖尿病小鼠体内血糖开始升高,于 48 h后升至治疗前血糖水平,此时两组比较血糖差异无显著性意义, $P > 0.05$;再次给予 Dox,血糖水平逐渐下降,并于 72 h内达到撤药前水平, Dox组与 no Dox组小鼠的血糖比较差异有显著性意义, $P < 0.05$ 。见图 2。

3 讨论

鉴于生理情况下,胰岛素的分泌是受葡萄糖调节感受器调控的,而导入体内的胰岛素基因的持续

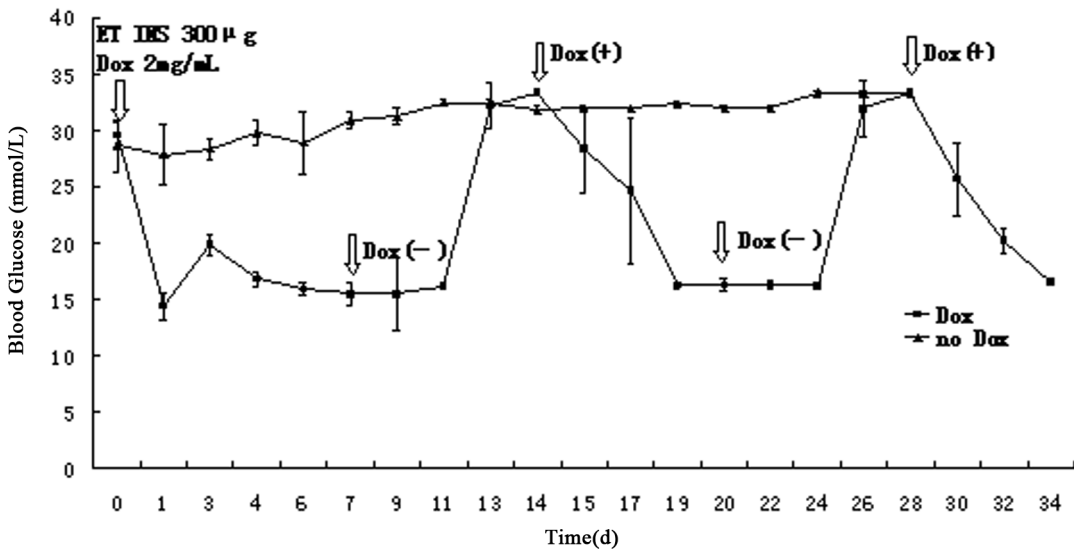


图2 两组糖尿病小鼠电转后血糖水平及调控作用

Fig2 Comparison of the hypoglycemic effect in the Dox and no Dox group and tetracycline regulation on human proinsulin expression

表达势必会存在低血糖的危险,故胰岛素基因的调控表达则成为基因治疗的关键,本研究从此方面进行了探索。

四环素调控系统是一种反式作用因子调控模式,于1992年首先由Gossen和Bujard构建成功。反式作用因子 tTA / rtTA 为一融合蛋白,两者仅相差4个氨基酸,分别组成四环素调控系统的两种形式: tet-off 和 tet-on 系统。 tet-on 系统中,四环素的存在使 rtTA 发生构象变化,从而与四环素启动子(Ptet)中的四环素操纵子(tetO)相结合使转录发生;而在 tet-off 系统中,加入四环素则使 tTA 与 Ptet 分离,从而使转录中断。本实验采用的是 tet-on 系统,通过加入/撤除强力霉素(四环素的衍生物), $\text{rtTA}2-1$ 特异、可逆地与 Ptet 结合、分离,从而作为一种转录开关调节基因的表达。本实验中,为增加表达效率,在 Ptet 与 PhCMV 两启动子之间插入一段3.3 kbp序列,以使两者互不干扰发挥最大作用。

四环素调控系统的突出特点为:可产生阶梯式、渐进性调控。另外,它来源于原核生物,不干扰真核生物基因组的表达,同时其诱导物强力霉素(Dox)剂量相当于其毒性剂量的1/300,故较为安全。目前,四环素调控系统已成功调控了多种基因的表达^[7-9],其安全、高效的特点已得到公认。

本实验证实载有 Tet-on 系统的人胰岛素原基因经强力霉素(Dox)调控后在小鼠肌肉组织中具有较高水平的mRNA表达。当无Dox调控时,同样可以检测出较低水平的表达,说明该系统存在背景表达。而两组肝脏组织的RT-PCR未扩增出特异条带,说明人胰岛素原基因仅在注射部位的肌肉组织中特异表达。本实验通过转染载有 Tet-on 系统的人胰岛素原基因实现了该基因的表达,通过饮水水中加入Dox,获得了较为理想的降糖效果,同时撤除Dox后,糖尿病小鼠体内血糖开始升高,于48 h后升至治疗前血糖水平,再次给予Dox,血糖水平逐渐下降,并于72 h内达到撤药前水平。如此重复加入/撤除两次均能实现对质粒 $\text{pTet-}t\text{et4-}h\text{INS}$ 的表达开关,从而达到安全调控的目的。而饮水水中未加入调控诱导剂Dox时,在肌肉组织中可以检测到较低水平的人胰岛素基因mRNA水平表达,且血清中可检测到较低水平的人胰岛素,但此胰岛素水平并不能使糖尿病小鼠血糖降低,据此可推断, Tet-on 系统对于调控基因的背景表达或许可为糖尿

病小鼠提供较为安全平稳的基础胰岛素分泌,这恰恰为胰岛素基因治疗糖尿病要求非进餐时体内存在低水平的基础胰岛素,而餐后较高水平表达控制餐后血糖所需要的,但应该看到本研究Dox调控虽然可以通过给药与撤除强力霉素实现对 $\text{pTet-}t\text{et4-}h\text{INS}$ 质粒的表达开关,从而使血糖随其升降,但胰岛素基因表达以及血糖的升降滞后于给药撤药的时间过长,如何实现该基因体内表达的瞬时调控需进一步深入研究。

本实验在胰岛素基因治疗的调控方面做一尝试,结果表明强力霉素调控的胰岛素基因可实现糖尿病小鼠体内稳定的表达,产生明显的降糖效果,且仅通过饮水水中诱导剂的加入撤除,即可实现该基因的开关表达,重复性好,操作简便、安全,为分泌蛋白的人体内调控的可行性提供了依据。

参考文献:

- [1] Wildon M O, Svouhsl K T, Rsysnsmsty J, et al Tetracycline-regulated secretion of human (pro) insulin following plasmid-mediated transfection of human muscle [J]. *J Mol Endocrinol* 2005, 34(2):391-403.
- [2] Gros L, Riu E, Montoliu L, et al Regulated production of mature insulin by non-beta-cells [J]. *Hum Gene Ther* 1997, 10(7):2249-2259.
- [3] Baron U, Schnappinger D, Helbl V, et al Generation of conditional mutants in higher eukaryotes by switching between the expression of two genes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(3):1013-1018.
- [4] 李鸿,苏本利,刘海霞,等.肌肉注射可调控胰岛素基因对糖尿病小鼠降糖作用 [J]. *生物物理与生物化学进展*, 2004, 31(2):278-281.
- [5] 张国华,沈冬,金采科,等.电脉冲介导基因转移效率的实验研究 [J]. *中华医学杂志*, 2001, 1(81):937-940.
- [6] Jaichandran S, Yap ST, Khoo AB, et al In vivo liver electroporation: optimization and demonstration of therapeutic efficacy [J]. *Hum Gene Ther* 2006, 17(3):362-375.
- [7] Reboledo M, Kramer MG, Smerdou C, et al Transcriptional Effects of Tet-On and Mifepristone-Inducible Systems in Mouse Liver [J]. *Hum Gene Ther* 2008, 19(11):1233-1248.
- [8] Seo E, Kim S, Jho EH Induction of cancer cell-specific death via MMP2 promoter-dependent Bax expression [J]. *BMB Rep*, 2009, 42(4):217-222.
- [9] Hojnan P, Gissel H, Gehl J Sensitive and precise regulation of haemoglobin after gene transfer of erythropoietin to muscle tissue using electroporation [J]. *Gene Ther* 2007, 14(12):950-959.