

研究简报

肌肉注射可调控胰岛素基因
对糖尿病小鼠降糖作用*李 鸿¹⁾ 苏本利¹⁾** 刘海霞¹⁾ 张雪扬²⁾吕 申¹⁾ 刘 敏¹⁾ 纪晓鹏¹⁾ F. BOSCH³⁾⁽¹⁾大连医科大学附属第二医院内分泌科, 大连 116027; ⁽²⁾大连医科大学附属第一医院内分泌科, 大连 116011;⁽³⁾Department of Molecular Biology and Biochemistry, Medical School of Veterinary Medicine, Autonomous University of Barcelona, Spain)

摘要 为研究四环素调控的胰岛素表达载体肌肉直接注射后对实验性糖尿病小鼠的降糖作用, 构建了质粒 prTA-tet4-rhINS. 以链脲佐菌素 (STZ) 诱导 Balb/C 小鼠成糖尿病模型, 300 μ g 质粒注射至小鼠的股部肌肉, 并同时在饮水中加入不同浓度强力霉素 (Dox), 监测小鼠末梢血糖、体重, 测定血清人胰岛素、C 肽水平. 用 RT-PCR 检测小鼠肌肉注射部位组织中胰岛素原 mRNA 水平的表达情况. 结果表明: 质粒 prTA-tet4-rhINS 注射后, 给予 Dox 可显著降低糖尿病小鼠的血糖, 血清人胰岛素、C 肽水平相应升高, 体重增加. 效果持续大约二周. 小鼠肌肉组织中有胰岛素原 mRNA 表达. 降糖效果和基因表达程度随 Dox 浓度增加而增强. 质粒 prTA-tet4-rhINS 对 STZ 诱导的糖尿病小鼠高血糖起到明显的降低作用. 在糖尿病小鼠肌肉组织能很好地表达, 并受 Dox 调控.

关键词 糖尿病, 基因调控, 基因治疗

学科分类号 Q78

合适的靶组织和有效的转染, 以及实现胰岛素基因的调控表达来符合生理需要, 是基因治疗糖尿病的关键. 现有调控序列虽有效果, 但仍有欠缺. 四环素调控系统是一种操作性很强的“基因开关”, 已有调控胰岛素基因的体外实验报道^[1-3]. 肌肉组织是外源基因的理想宿主^[4], 但缺乏受葡萄糖调控的基因表达元件, 而难以对胰岛素基因的表达实现生理性调控. 本实验将四环素调控系统与肌肉组织转染相结合, 针对上述关键问题进行探索, 将构建的质粒 prTA-tet4-rhINS 转染糖尿病小鼠肌肉组织, 以期获得在活体动物肌肉组织内四环素调控序列调控外源胰岛素基因的表达.

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pLNCX 购自美国 Clontech 公司, pUHG102-8、pUHR2-1 (四环素抗性基因操纵子系统) 为德国 Heidelberg 大学 Bujard 教授惠赠. 链脲佐菌素 (STZ) 购自日本和光纯药工业株式会社. 强力霉素 (doxycycline, Dox) 购自 Sigma 公司. 血糖仪及试纸条为罗氏公司产品. ¹²⁵I 人胰岛素放免分析试剂盒购自北京中国原子能研究所 (批内 CV

= 6.73%, 批间 CV = 9.29%). 免放分析试剂盒购自捷克 IMMUNOTECH (批内 CV = 2.33%, 批间 CV = 3.56%). 引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成. Balb/C 小鼠为雄性, 8~10 周龄, 体重 (22 ± 2) g, 购自大连医科大学病理教研室. 云南种系小鼠为雄性, 8~10 周龄, 购自大连医科大学动物中心.

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^[5], 通过基因重组将重组人胰岛素原基因构建为质粒 prTA-tet4-rhINS, 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 rhINS 片段进行限制性内切酶酶切鉴定和直接测序.

1.2.2 动物模型建立及质粒骨骼肌转导: 50 只 Balb/C 小鼠, 按 150 mg/kg 剂量向小鼠腹腔内注射新鲜配制的 2% STZ 溶液 (pH 4.1). 鼠尾末梢随机

* 辽宁省教育厅基金资助项目 (99022067), 部分结果已在 2002 年上海亚洲分子糖尿病研究组织第二届年会上宣读.

** 通讯联系人.

Tel: 0411-4671291-3122, Fax: 0411-4720130

E-mail: benli_su@yahoo.com.cn 或 mxcsu@sina.com

收稿日期: 2003-08-18, 接受日期: 2003-11-28

血糖水平（葡萄糖氧化酶试纸法） ≥ 16.67 mmol/L 并维持 2 周，为成糖尿病模型小鼠，分 3 组，在小鼠（16 只）的两侧股四头肌各注射质粒 150 μ g（总计 300 μ g），同时喂 Dox 水（6 只为 Dox 2 g/L，4 只为 Dox 0.5 g/L，6 只为 Dox 0 g/L）。小鼠自由进食，每日监测鼠尾末梢血糖，同时测量小鼠体重，并与实验第一天血糖和体重做差值，进行组间比较。

1.2.3 动物标本的留取：转染第 6 天各组取部分小鼠断头取血，分离血清保存于 -20℃，放免法检测血清胰岛素、免疫放射法检测 C 肽。留取两股肌肉、肝脏组织保存于液氮中。

1.2.4 RT-PCR：以小鼠 β -actin 为内参，上游引物为 5' AGCCTTCCTTCTTGGGTATG 3'，下游引物为 5' AACGCAGCTCAGTAACAGTC 3'，扩增片段 364 bp。根据质粒 rhINS 片段设计引物，上游引物为 5' CGCAGCCTTTGTCAACCAAC 3'，下游引物为 5' CACAATGCCACGCTTCTGTC 3'，扩增片段 217 bp。RT-PCR 反应条件：30℃ 10 min，42℃ 30 min，99℃ 5 min，5℃ 5 min，1 个循环。PCR 反应条件：94℃ 2 min，1 个循环；94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 1 min，35 个循环。

1.2.5 统计学方法：结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，*t* 检验进行组间均值比较，SPSS 软件计算。

2 结 果

2.1 质粒的构建

图 1 示质粒结构，其中反式四环素激活因子（reverse type tetracycline activator, rTA）由人类巨

细胞病毒强启动子（PhCMV）引导。重组人胰岛素原基因四环素操纵子结构基因的启动子（Ptet4）引导，两个转录单元（以 3.3 kb 序列间隔，方向相反）构建于一个单一质粒，总长 9.3 kb。

2.2 各组糖尿病小鼠血糖及体重变化

由图 2 可见，质粒注射后饮水中加 Dox 的小鼠血糖均有下降，Dox 浓度为 2 g/L 组血糖下降幅度明显大于 0.5 g/L 组（平均降幅 10 mmol/L vs 5 mmol/L），饮水中无 Dox 组血糖未见明显波动。图 3 表明，饮水中加 Dox 的小鼠体重 3 天后均逐渐增加到注射前的体重，未加 Dox 组小鼠的体重继续下降。

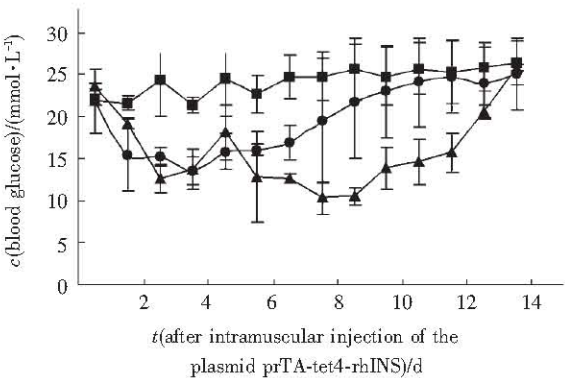


Fig. 2 Changes in blood glucose levels of streptozotocin-induced diabetic Balb/C mice after hind-leg intramuscular injection of prTA-tet4-rhINS plasmid with different concentration of doxycycline

▲—▲: Dox 2 g/L; ●—●: Dox 0.5 g/L; ■—■: Dox 0 g/L.

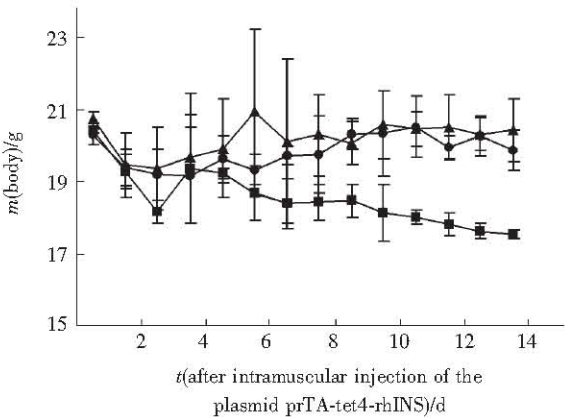


Fig. 3 Changes in body mass of streptozotocin-induced diabetic Balb/C mice after hind-leg intramuscular injection of prTA-tet4-rhINS plasmid with different concentration of doxycycline

▲—▲: Dox 2 g/L; ●—●: Dox 0.5 g/L; ■—■: Dox 0 g/L.

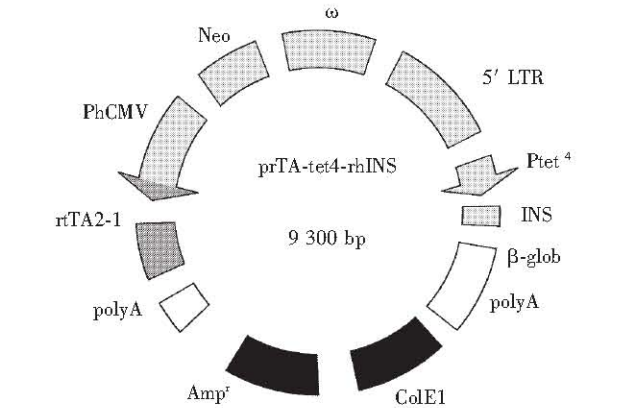


Fig. 1 Construct of prTA-tet4-rhINS plasmid

Neo、 ω 、5'LTR are non-functioning separator fragments. PhCMV-rTA2-PolyA is the expression unit for the reverse type tetracycline activator. Ptet⁴-INS- β glob PolyA is the expression unit for proinsulin. Amp^r is ampicillin resistant gene. ColE1 is replicon in *E. coli*. INS is the furin-cleavable proinsulin gene.

2.3 各组小鼠血清人胰岛素及 C 肽的比较

图 4 表明, 质粒注射并给予不同浓度 Dox 后小鼠血清人胰岛素、C 肽水平. 可见饮水中 Dox 2 g/L 组明显高于 0 g/L 组.

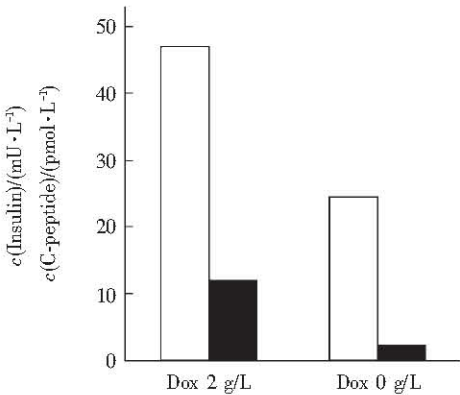


Fig. 4 Changes in plasma insulin and C-peptide levels of streptozotocin-induced diabetic Balb/C mice 6 days after hind-leg intramuscular injection of prTA-tet4-rhINS plasmid with different concentration of doxycycline
 $P < 0.05$. □: Insulin; ■: C-peptide.

2.4 人胰岛素原基因在小鼠肌肉组织中的表达

在 Dox 2 g/L 组、0.5 g/L 组肌肉组织 RT-PCR 均得到预期 217 bp 条带, 且前者在亮度上较后者略强, 肝脏组织中未扩增出特异条带 (图 5). 说明人胰岛素原基因仅在注射部位的肌肉组织中表达.

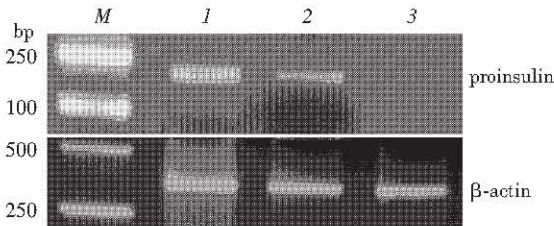


Fig. 5 RT-PCR results of proinsulin mRNA in muscle and liver of streptozotocin-induced diabetic Balb/C mice 6 days after hind-leg intramuscular injection of prTA-tet4-rhINS plasmid with different concentration of doxycycline
M: DL2000 DNA marker; 1: Muscle of 2 g/L doxycycline in drink; 2: Muscle of 0.5 g/L doxycycline in drink; 3: stands for liver.

3 讨 论

基因治疗糖尿病是一种从分子水平上控制和缓解糖尿病的方法. 根据所导入基因种类不同可归纳为三类: 替代基因治疗, 免疫基因治疗和调节基因

治疗^[1].

本研究是在成功完成体外实验的基础上做进一步探索^[2], 具有两个特点: a. 采用肌肉组织作为胰岛素基因表达的宿主细胞^[4]. 理由为肌肉细胞为永久细胞, 外源基因易获稳定表达, 易于操作, 含有丰富的 Furin 酶可将胰岛素原加工为成熟胰岛素. 肝细胞虽具有胰岛素分泌的葡萄糖调节感受器, 被认为是胰岛素基因表达的最佳宿主, 但转染操作复杂且难以保证绝对安全, 实用性和安全性均不及肌肉组织; b. 采用四环素调控系统调控胰岛素基因的表达. 胰岛素基因的表达调控一直是困扰人们的难题. 目前认为有效的生理性调控序列如磷酸烯醇式丙酮酸激酶 (PEPCK)、肝脏丙酮酸激酶 (L-PK) 和葡萄糖 6 磷酸酶 (G6Pase) 的启动子, 因易受高血糖抑制及启动作用不够强大等原因使得胰岛素基因表达效率不高, 从而影响了降糖效果^[6-8].

采用四环素调控系统可弥补肌肉组织对胰岛素基因调控的缺陷. 这种反式作用因子调控模式于 1992 年首先由 Gossen 和 Bujard 构建成功, 包括 tet-off 和 tet-on 两种形式. 本实验采用的 tet-on 系统中, 四环素的存在使转录发生, 撤除则转录中断. tet-off 系统与此相反. 这种调控的突出特点为: 通过增减一种外源小分子物质来实现阶梯式调控, 操纵性很强; 另外, 这一系统来自原核生物, 不干扰真核生物基因组的表达, 安全性很高. 目前, 四环素调控系统是一种应用比较成熟的调控系统^[9,10], 其安全、高效的特点已得到公认.

本研究实验结果显示: a. 质粒 prTA-tet4-rhINS 对于糖尿病小鼠的高血糖具有良好的缓解作用; b. 降糖效果与 Dox 浓度相关. 从小鼠的症状、血糖值、及 RT-PCR 结果来看, Dox 2 g/L 组均优于 Dox 0.5 g/L 组, Dox 0 g/L 组则未见降糖效果, 胰岛素基因的表达很好地受到四环素调控系统的调控; c. 实验过程中, 小鼠未出现低血糖, 证实胰岛素基因无过表达现象, 严格处于四环素调控系统的控制下.

Scougall 等^[3]采用 tet-off 系统指导人胰岛素原基因的表达, 以共转染的方式转染大鼠肌肉原代细胞进行体外培养也获得成功. 与 Scougall 相比, 本实验将四环素调控系统与人胰岛素原基因共同克隆为一个质粒, 表达背景降低, 体内转染的操作得以简化, 在活体动物体内获得表达成功, 其实用意义又大大前进了一步.

本实验尚存在一些缺陷。首先,四环素调控系统毕竟为非生理性调控,具有滞后性,难以实现瞬时血糖控制。另外,采用裸质粒直接注射虽然简便,但表达时间较短,实验中昆明种小鼠可持续表达50余天,是否仅为种属差异,样本尚小,还需补充证据。进一步可采用腺病毒^[11]、逆转录病毒及电穿孔(electroporation)^[7,8]等方法提高转染效率,延长表达时间。

综上所述,本实验对胰岛素基因治疗糖尿病存在的两大关键问题做了有益的探索。成功地运用四环素调控系统调控人胰岛素原基因的转录,弥补肌肉组织无胰岛素基因调控敏感元件的缺陷,在活体小鼠肌肉组织中获得成功表达。四环素调控系统虽然是一种非生理性调控系统,但调控效果确实、可操作性强,这种调控系统将为胰岛素基因的表达调控增加新的方式,为糖尿病的基因治疗开辟新的思路。

参 考 文 献

- 1 Shen K, Qin X, Xiao H, *et al.* Mature insulin production by engineered non-beta cells. *Chin Med J (Engl)*, 2002, **115** (4): 532 ~ 535
- 2 Zhang X Y, Su B L, Li C C, *et al.* Construction of a recombinant human insulin expression vector under the control of doxycycline for

- insulin gene therapy and the expression *in vitro* (abstract). *Hong Kong Medical Journal*, 2001, **7** (Suppl 2): 148
- 3 Scougall K T, Maltin C A, Shaw J A. Tetracycline-regulated secretion of human insulin in a transfected non-endocrine cell line. *J Mol Endocrinol*, 2003, **30** (3): 331 ~ 346
- 4 MacCol I G S, Goldspink G, Bouloux X P M G. Using skeletal muscle as an artificial endocrine tissue. *J Endocrinol* 1999, **162** (1): 1 ~ 9
- 5 Gros L, Riu E, Montoliu L, *et al.* Regulated production of mature insulin by non-beta-cells. *Hum Gene Ther*, 1997, **10** (7): 2249 ~ 2259
- 6 李 鸿, 苏本利. 糖尿病基因治疗新进展. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (1): 24 ~ 26
- Li H, Su B L. *Prog Biophem Biophys*, 2003, **30** (1): 24 ~ 26
- 7 Yin D, Tang J G. Gene therapy for streptozotocin-induced diabetic mice by electroporational transfer of naked human insulin precursor DNA into skeletal muscle *in vivo*. *FEBS Lett*, 2001, **20** (1 ~ 2): 16 ~ 20
- 8 Martinenghi S, Cusella de Angelis G, Biressi S, *et al.* Human insulin production and amelioration of diabetes in mice by eletrotransfer-enhanced plasmid DNA gene transfer to the skeletal muscle. *Gene Ther*, 2002, **9** (21): 1429 ~ 1437
- 9 Samakoglu S, Bohl D, Heard J M. Mechanisms leading to sustained reversion of beta-thalassemia in mice by doxycycline-controlled Epo delivery from muscles. *Mol Ther*, 2002, **6** (6): 793 ~ 803
- 10 Baron U, Schnappinger D, Helbl V, *et al.* Generation of conditional mutants in higher eukaryotes by switching between the expression of two genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (3): 1013 ~ 1018
- 11 Yamaguchi M, Kuzume M, Matsumoto T, *et al.* Adenovirus-mediated insulin gene transfer improves nutritional and post-hepatectomized conditions in diabetic rats. *Surgery*, 2000, **127** (6): 670 ~ 678

Hypoglycemic Effect of Direct Intramuscular Gene Transfer of a Nude Doxycycline-controlled Insulin Expression Plasmid on STZ-induced Diabetic Mice*

LI Hong¹⁾, SU Ben-Li¹⁾ **, LIU Hai-Xia¹⁾, ZHANG Xue-Yang²⁾,
LÜ Shen¹⁾, LIU Min¹⁾, JI Xiao-Peng¹⁾, F. BOSCH³⁾

⁽¹⁾ Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospitals of Dalian Medical University, Dalian 116027, China;

⁽²⁾ Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China;

⁽³⁾ Department of Molecular Biology and Biochemistry, Medical School of Veterinary Medicine, Autonomous University of Barcelona, Spain).

Abstract In order to study hypoglycemic effect after direct injection of a doxycycline-controlled insulin expression plasmid to the skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic mice, Balb/C mice were induced to diabetes. 300 µg of prTA-tet4-rhINS was injected into the muscles of mouse hind legs bilaterally and fed with drinking water containing different concentrations of doxycycline right after the injection. Tail blood glucose (random glucose level) was measured everyday with glucose oxidase method. Total RNA were isolated from muscles and liver tissues and RT-PCR was used to analyze the rhINS mRNA level and mouse β-actin mRNA was used as an internal control. After injection of the plasmid prTA-tet4-rhINS, the blood glucose in diabetes mice decreased markedly for an average of 10 mmol/L and 5 mmol/L at doxycycline concentration of 2 g/L and 0.5 g/L in the drinking water respectively. prTA-tet4-rhIN injected diabetic mice gained mass, and urine volume decreased. This hypoglycemic effect lasted for nearly two weeks. Furthermore, the hypoglycemic effect was closely related to the concentration of

doxycycline in the drinking water in a dose-dependent manner. RT-PCR proved the expression of human proinsulin mRNA in the total muscle RNA. It can be concluded that a single tetracycline controlled recombinant pro-insulin gene expression plasmid could decrease the glucose levels of streptozotocin-induced diabetic mice dose-dependently by doxycycline in the drinking water. Muscle can be used as good target tissue for foreign insulin gene transfer and expression.

Key words diabetes mellitus, tetracycline regulatory system, gene therapy

* This work was supported by a grant from Liaoning Provincial Department of Education (99022067).

** Corresponding author. Tel: 86-411-4671291-3122, Fax: 0411-4720130, E-mail: benli_su@yahoo.com.cn or mxxsu@sina.com

Received: August 18, 2003 Accepted: November 28, 2003

第三届亚洲视觉科学会议 (ACV2004) 第一轮通知

由中国科学院视觉信息加工重点实验室、上海神经科学研究所和西南眼科医院联合主办的第三届亚洲视觉科学会议 (ACV) 定于 2004 年 11 月 15 ~ 19 日在重庆举行。

大会组织委员会: 主 席: 李朝义 (中国)

副主席: Keiji Uchikawa (日本), Chan-Sup Chung (韩国), 赫荣乔 (中国)

大会学术委员会: 主 席: 王书荣 (中国)

副主席: Makoto Ichikawa (日本), Choongkil Lee (韩国)

大会执行委员会: 主 席: 李书章 (中国), 副主席: 李兵 (中国), 谢汉平 (中国)

会议主题:

1) Visual Neuroscience; 2) Visual Perception; 3) Depth and Spatial Vision; 4) Color Vision 5) Visual Attention; 6) Eye Movements and Visuo-Motor Coordination; 7) Mathematical Models on Vision; 8) Retina 9) Object Recognition; 10) Clinical Vision Studies; 11) Neural Imaging of Visual System; 12) Vision and Other Modalities.

重要时间: 1) 会议回执: 2004 年 5 月 15 日

2) 论文摘要截止日期: 2004 年 8 月 30 日

有关会议地点、注册费、论文摘要格式等信息请详见第二轮通知。第二轮通知将于 2004 年 5 月初登出, 届时将通过 E-mail 或邮寄发出, 并请见会议网址: www.ibp.ac.cn/acv2004

第三届亚洲视觉科学会议 (ACV2004) 回执 (2004 年 11 月 15 日 ~ 19 日, 重庆)

姓 名: 性别: 职务:

工作单位:

通讯地址:

邮政编码:

电 话: 传真:

E-mail

☐ 我拟参加第三届亚洲视觉科学会议, 请寄第二轮通知

☐ 我拟提交会议论文摘要

会议回执寄至: 北京 100101 朝阳区大屯路 15 号 中国生物物理学会 魏舜仪

电话: 010-64889894, 传真: 010-64853625, E-mail: acv2004@sun5.ibp.ac.cn