

基因治疗糖尿病的研究进展

张曙云 葛 炜

(解放军杭州疗养院, 杭州 310007)

钱凯先

(浙江大学生物系, 杭州 310025)

摘要 随着基因转移技术的进步, 引导了在分子水平研究替代正常胰岛素释放功能的方法, 葡萄糖刺激胰岛素分泌的 β 细胞系和非 β 细胞系的构建已有一定的进步, 胰岛素基因直接转染给动物体内可以控制血糖. 因此, 细胞工程和基因疗法必将会为糖尿病治疗开拓广阔的前景.

关键词 基因治疗, 胰岛素, 糖尿病

学科分类号 R587.1

基因治疗是近 10 年来随着现代医学与分子生物学相结合诞生的, 基因治疗的研究发展迅猛, 研究内容已经从遗传病扩大到肿瘤、艾滋病、心血管疾病和神经系统疾病等等, 在国外有学者正在进行基因治疗糖尿病的研究.

糖尿病有二个类型: I 型 (IDDM) 是由于自身免疫机制引起 β 细胞破坏, 胰岛素分泌缺乏, II 型 (NIDDM) 则是由于 β 细胞功能低下, 胰岛素分泌调节不适当使胰岛素相对缺乏, 后者与胰岛素抵抗密切相关^[1]. 基因治疗的目的是用基因转移技术重建患者的胰岛素分泌能力, 可以用有活性的胰岛素基因在体内直接导入组织或体外构建细胞移植入患者体内, 本文就糖尿病的基因治疗作一综述.

1 胰岛素的表达及分泌

胰岛素基因的表达主要是在胰岛 β 细胞中, 其 5' 侧翼序列由转录启动子、增强子及负性调控元件组成, 约 0.5 kb, 二个胰岛素基因增强子盒 (IEB): -GCCATCTG- 分别位于 -112 bp (IEB1) 和 -238 bp (IEB2), 还有 4 个 A 盒是胰岛素基因的启动子 (A1, A2, A3, A5)^[2]. 蛋白质结合分析实验已证明, 有 40 多种蛋白质因子参与胰岛素基因的表达调控, 但目前仅分离到胰岛素增强因子 (IEF) 和胰岛素上游因子 (IUF).

胰岛素的合成是以前体形式存在. 在运输途径中经过翻译后加工成为成熟的胰岛素. 最主要的胰岛素促分泌素是葡萄糖, 葡萄糖通过其代谢刺激胰岛的 β 细胞分泌胰岛素, 葡萄糖磷酸化的阻遏物抑制 β 细胞糖分解和胰岛素分泌. 葡萄糖的代谢可触发大量电子化学反应, 包括 ATP 敏感 K^+ 通路和 Ca^{2+} 电势-闸门通道的激活, Ca^{2+} 增加能广

泛影响 β 细胞, 包括激活磷酸甘油脱氢酶, 蛋白酶, 磷脂酶 C 以及其他线粒体酶等. 大量研究证实, 在对葡萄糖浓度变化的反应中葡萄糖激酶 (GK) 和葡萄糖转移因子 (GluT) 是控制胰岛素释放的关键物质, GK 在胰岛素释放调节中的重要性从与 GK 基因突变密切相关的成年型幼年糖尿病 (MODY) 中得到进一步证实. 在这类病人中, GK 基因误义突变发生在外显子 5、7、8 中, 此突变可影响酶活性位点结构和酶的稳定, 从而影响葡萄糖结合和胰岛素分泌^[3]. GluT-2 是在 β 细胞中表达的一种主要葡萄糖转移因子异构体, 在缺乏葡萄糖刺激胰岛素分泌和类似人类 NIDDM 特征的啮齿类动物胰岛细胞中明显减少^[4].

2 β 细胞系工程

β 细胞是人胰腺 β 细胞, 早已被用来治疗糖尿病, 但是用胰腺移植治疗糖尿病有许多困难, β 细胞工程可以避免胰腺的分离及纯化. 成人的 β 细胞是分化复杂的细胞之一, 不能在培养基中生长及分裂, 但是目前已得到一些无限繁殖的 β 细胞系.

RIN1046-38 细胞系来自放射线所致的胰岛肿瘤, GluT-2 和 GK 基因在此表达, 但是在培养过程中逐渐丧失葡萄糖刺激分泌胰岛素的能力^[5]. Ferber 等^[6]发现在这些细胞中葡萄糖刺激胰岛素分泌与 GluT-2 和 GK 的表达有关, 把含 GluT-2 cDNA 的质粒转染到 RIN 细胞中, 可以观察到葡萄糖刺激胰岛素分泌, 但是转染含 GK cDNA 的质粒后不能提高葡萄糖刺激胰岛素分泌能力, 有意义的

Tel: (0571) 7995854; E-mail: zhangshuyun@163.net

收稿日期: 1998-11-23, 修回日期: 1999-04-19

是当 GluT-2 表达增强后 GK 活性也相应增强. 将含 GluT-2 基因的 RIN 细胞在含 2-脱氧葡萄糖培养基中培养 24 h 后, 细胞能在葡萄糖浓度 50 $\mu\text{mol/L}$ ~ 5 mmol/L 范围内刺激胰岛素分泌. Clark 等^[7]进一步对 RIN1046-38 细胞进行改造, 将多拷贝的人胰岛素基因转染给 RIN 细胞, 这些细胞系胰岛素含量大大增加, 与正常人的胰岛细胞相似, 同时用 HPLC 分析在这些细胞中胰岛素加工的效率相当高, 进一步将 GK 和 GluT-2 基因导入细胞系后, 发现这三种转基因的表达可持续 0.5~1 a (年). 将这些人工细胞系移植到裸鼠体内所有的转基因至少表达 48 d. 这些结果提示导入所构建的细胞系的优点是能保持功能及表型的稳定性, 特别是在活体内. 同时该小组还研究了这些新构建的胰岛素瘤细胞系的胰岛素分泌能力及葡萄糖代谢的调控. 含人前胰岛素基因的 $\beta\text{GI}/17$ 细胞系胰岛素分泌量明显比 RIN1046-38 高, 导入 GluT-2 和 GK 基因的 $\beta\text{G49}/206$ 和导入 GK 基因的 $\beta\text{G40}/110$ 细胞系的胰岛素分泌量比 $\beta\text{GI}/17$ 要少, 但是后二者葡萄糖刺激胰岛素分泌能力增强^[8].

Asafari 等^[9]分离出 INS-1 细胞系, 该细胞系保留不同于 β 细胞的许多特征, 主要是胰岛素含量高, 以及葡萄糖刺激胰岛素分泌的反应超过了生理浓度, INS-1 细胞能分别表达 GK 和 GluT-2. Sekine 等^[10]将 INS-1 细胞在含催乳素、IGF-1 和 Triiodothyronine 的无血清培养基中生长, 3 d 后, 生长在无血清培养基中的 INS-1 细胞对葡萄糖、丙氨酸、亮氨酸的反应能力降低, 而对 30 mmol/L K^+ 的反应稍微增强.

另一种产生转化的 β 细胞系的方法是在细胞中导入病毒癌基因 SV40 T 抗原 (SV40Tag) 基因, SV40Tag 通过隔绝肿瘤抑制基因 p53 和 RB 基因的产物而起作用的. 无限繁殖的细胞系中胰岛素基因启动子通常和编码 SV40Tag 基因连接, 这 DNA 结构注射入小鼠胚胎, 然后移植入假孕的雌鼠中, 在其子代中 SV40Tag 仅在 β 细胞中表达, 生长成肿瘤, 分离 β 细胞肿瘤即产生细胞系. 存在的问题是 SV40Tag 保留了某些转化活性, 产生的细胞系趋向于再分化^[11].

Deuschle 等^[12]将 SV40Tag 安置在大肠杆菌 *E. coli* 转座子 Tn10 中四环素操纵子调控系统的控制下, 利用这一系统 Tag 活性可以在体内调控. Efrat 等^[13]利用 Tet 抗性操纵子调控 SV40Tag 基因表达, 在转基因小鼠中产生有条件的转化胰腺 β 细

胞. 在 β 细胞中表达的 Tet R-VP16 融合蛋白激活 Tag 基因的转录, 导致 β 细胞肿瘤的产生. 这些肿瘤在 Tet 缺失培养基中培养分离得到的 β 细胞系, 在四环素存在的条件下, 由于抑制 Tet R-VP16 融合蛋白表达, 细胞停止生长, 当这些细胞移植入有 STZ 处理过的小鼠体内, 血糖在 2 周内正常. 但是这些细胞继续增殖, 产生低血糖直至小鼠死亡. 如果细胞移植时同时移植缓慢释放的四环素量小, 细胞不再生长, 正常的血糖可维持 4 个月, 这一结果提示含遗传开关的细胞用来治疗糖尿病是有前景的.

3 非 β 细胞系工程

非 β 细胞工程有二种方法, 一是把胰岛素基因及其必需的基因直接导入来自糖尿病患者的原代细胞; 二是将胰岛素基因导入非 β 细胞, 这些细胞是在培养基中生长, 移植时需要微囊化.

来自垂体前叶 ACTH 分泌细胞, 因为含有胰岛细胞同样的调节分泌通路, 能将前胰岛素加工成为成熟的胰岛素. 大鼠的垂体细胞 AtT20 细胞系稳定地导入胰岛素基因后构成 AtT20ins 细胞, 能有效地把前胰岛素加工成胰岛素. 该细胞系能对 cAMP 等类似物有反应, 能刺激细胞释放胰岛素, 但是对葡萄糖不敏感, 而且 GluT-2 表达缺失. Hughes 等^[14]将 GluT-2 基因转染到 AtT-20ins 细胞系后, 显示胰岛素含量增加, 葡萄糖直接刺激胰岛素的分泌, 而且亚生理状态的葡萄糖浓度有最大的反应性. 但是导入 GluT-1 基因后, 则不能增加胰岛素释放或生物合成, 因此, 只有 GluT-2 转染细胞才能在外源葡萄糖变化的较短时间内分泌胰岛素, 而且当葡萄糖刺激消失时胰岛素分泌迅速减少. 但是已有数据表明该细胞系胰岛素分泌量最大在 10~15 mol/L 葡萄糖浓度, 大大低于正常细胞反应开始的浓度. 另有研究, AtT20 细胞被导入含金属硫蛋白启动子的人胰岛素 cDNA 后, 构建成 AtT-20Mins 细胞系, 移植入 STZ 处理的小鼠, 1~2 d 后血浆中 C 肽浓度为 0.02 nmol/L, 喂食硫酸锌 3~5 d 后, 血浆 C 肽为 0.11 nmol/L, 如果不继续喂锌, 血浆 C 肽浓度将下降, 高血糖的数量明显低于不移植 AtT-20Mins 细胞系, 提示体细胞基因治疗糖尿病是有潜力的^[15].

另一种治疗糖尿病的体细胞分泌系统是人的肝细胞系, 含胰岛素 cDNA 基因转染到人肝细胞系 (HEPG2ins), 该细胞系可以对 cAMP 等类似物起

反应,引起胰岛素合成、贮存及释放。但是对葡萄糖的刺激不敏感。Simpson 等^[16]将这细胞系导入人胰岛的 GluT-2 后,细胞系显示葡萄糖刺激胰岛素分泌的能力。葡萄糖反应的浓度较低,接近正常的胰岛水平,分泌曲线也接近正常生理条件,免疫电子显微技术显示含胰岛素分泌颗粒大小、形态与正常 β 细胞相似。

Gros 等^[17]将胰岛素原基因与磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶 (PEPCK) 基因的启动子组成嵌合基因并导入到大鼠肝癌细胞中形成 FTOInsm 细胞系,该细胞系表达较高水平的胰岛素的 mRNA 和蛋白质,而且 90% 是成熟的胰岛素,同时在 cAMP 和地塞米松的诱导下胰岛素的分泌迅速增加。Lu 等^[18]发现将 PEPCK 基因的启动子和原胰岛素基因连接后转染到原代培养的肝细胞中,胰岛素的产生随 cAMP 和胰高血糖素增加而增加,随着胰岛素增加而减少。

4 胰岛素基因直接导入体内

基因治疗的另一种方法是外源遗传物质如裸露的 DNA、脂质体包被的 DNA 或用逆转录病毒和腺病毒介导的 DNA 直接转移到体内组织使其表达。近年已有一些研究在体内直接用基因治疗糖尿病的方法。Kaneda^[19]将含人胰岛素基因质粒用脂质体包被,直接通过成年大鼠的门静脉输入,7 d 内在鼠肝脏可见人胰岛素基因的 DNA 和 RNA,7 d 以后迅速下降,在血清中检测到人胰岛素并且逐渐升高到最大值,7 d 或 8 d 后迅速下降,提示外源基因可以直接导入体内进行表达。

Woo 等将重组逆转录病毒作载体,将大鼠胰岛素-1cDNA 注入大鼠门静脉,24 h 后,5% ~ 15% 肝细胞转染了胰岛素-1 基因,并持续表达可达 6 个月。二周后再给大鼠腹腔注射大剂量 (250 mg) STZ 致糖尿病,转染了鼠胰岛素基因的动物有 80% 可存活至 21 d,与对照比较酮体减低,胰岛素升高,胰高血糖素下降,并不出现低血糖,组合分析研究也未见异常,以不同剂量病毒注射进行检验,结果给予小剂量病毒,小鼠出现轻度非禁食性高血糖症,但是可防止致命的酮症酸中毒;给予中等剂量病毒 (使血清胰岛素水平保持在 1.6 $\mu\text{g/L}$ 的水平),可使小鼠血糖水平接近正常,血清中不出现酮体,即使禁食 24 h,小鼠也不发生低血糖症;给予大剂量病毒,小鼠表现非禁食性血糖正常水平,但禁食时可出现一定程度的低血糖

症。当血清胰岛素浓度在 0.1 ~ 1.6 $\mu\text{g/L}$ 时,可以避免酮症酸中毒的发生。肝胰岛素基因持续表达,有希望发展成为严重的 I 型糖尿病人治疗的新方法^[20,21]。

5 基因治疗前景

基因治疗糖尿病目前还存在许多问题,首先是调控系统,即对外源基因导入体内后的可控性,因为胰岛素的分泌是发生在一个很狭窄的范围,过高或过低都会致生命危险。Efrat 等^[22]提出用基因治疗糖尿病需要改进基因转移技术和精确预测易患人群的方法。Bailey^[23]展望了用 *ex-vivo* 体细胞基因治疗方法释放胰岛素的前景,从糖尿病患者体内分离非 β 细胞的体细胞,将这些细胞在体外进行改造,使其分泌胰岛素。这些细胞在体外生长,回输到体内使其用来替代胰岛素,用患者自身细胞移植可以克服免疫排斥等问题。但是用非 β 细胞的体细胞胰岛素存在加工和葡萄糖刺激胰岛素分泌等问题,无疑用 *ex-vivo* 体细胞进行基因治疗提供了一个可行胰岛素替代治疗的方法。糖尿病是多基因的疾病,基因治疗可能是整体治疗的一个部分。胰岛素分泌细胞系作为胰岛素释放的媒介物具有潜在的有利条件。毫无疑问细胞工程和基因疗法必将会为糖尿病治疗开拓广阔的前景。

参 考 文 献

- 1 Newgard C B. Cellular engineering and gene therapy strategies for insulin replacement in diabetes. *Diabetes*, 1994, **43** (3): 341~350
- 2 Dochery K. Gene therapy for diabetes mellitus. *Clin Sci*, 1997, **92** (4): 321~330
- 3 Froguel P, Zouali H, Vionnet N, *et al.* Familial hyperglycemia due to mutations in glutokinase. *N Engl J Med*, 1993, **328** (10): 697~702
- 4 Unger R H. Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic β -cells. *Science*, 1991, **251** (4998): 1200~1205
- 5 Clark S A, Burnham B L, Chick W L. Modulation of glucose induced insulin secretion from a rat clonal β -cell line. *Endocrinology*, 1990, **127** (6): 2779~2788
- 6 Ferber S, BeltrandelRio H, Johnson J H, *et al.* GluT-2 gene transfer into insulin cells confers both low and high affinity glucose-stimulated insulin release. *J Biol Chem*, 1994, **269** (15): 11523~11529
- 7 Clark S A, Quaade C, Xonstandy H, *et al.* Novel insulinoma cell lines produced by iterative engineering of GluT-2, glutokinase and human insulin expression. *Diabetes*, 1997, **46** (6): 958~967
- 8 Hohmeier H E, BeltrandelRio H, Clark S A, *et al.* Regulation of insulin secretion from novel engineered insulinoma cell lines. *Diabetes*, 1997, **46** (6): 968~977
- 9 Asafari M, Janjic D, Meda P, *et al.* Establishment of 2-

- mercatoethanol dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*, 1992, 130 (1): 167~178
- 10 Sekine N, Fasolate C, Pralong W F, *et al.* Glucose induced insulin secretion in INS-1 cells depends on factors present in fetal calf serum and rat islet-conditioned medium. *Diabetes*, 1997, 46 (9): 1424~1433
 - 11 Mclean J S. Improved techniques for immortalizing animal cells. *TIBTECH*, 1993, 11 (3): 232~238
 - 12 Dueschle U, Pepperkok R, Wang F, *et al.* Regulated expression of foreign genes in mammalian cells under the control of coliphage T3 RNA polymerase and Lac repressor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86 (11): 5400~5404
 - 13 Efrat S, Fuscó-Demant D, Lemberg H, *et al.* Conditional transformation of a pancreatic β -cell line derived from transgenic mice expressing a tetracycline regulated oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92 (8): 3576~3580
 - 14 Hughes S D, Quaade C, Johnson J H, *et al.* Transfection of AtT-20ins cells with GluT-2 but not GluT-1 confers glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem*, 1993, 268 (20): 15205~15212
 - 15 Stewart C, Taylor N A, Green I C, *et al.* Insulin-releasing pituitary cells as a model for somatic cell gene therapy in diabetes mellitus. *J Endocrinology*, 1994, 142 (2): 339~343
 - 16 Simpson A M, Marshall G M, Tuch B E, *et al.* Gene therapy of diabetes: glucose-stimulated insulin secretion in a human hepatoma cell line (HEP G2ins/8). *Gene Ther*, 1997, 4 (11): 1207~1215
 - 17 Gros L, Montoliu L, Riu E, *et al.* Regulated production of mature insulin by non- β cells. *Hum Gene Ther*, 1991, 8 (18): 2249~2259
 - 18 Lu D, Tamemoto H, Shibata H, *et al.* Regulatable production of insulin from primary-cultured hepatocytes: insulin production is up-regulated by glucagon and cAMP and down-regulated by insulin. *Gene Ther*, 1998, 5 (7): 888~895
 - 19 Kaneda Y, Iwal K, Uchida T. Introduction and expression of the human insulin gene in adult rat liver. *J Biol Chem*, 1989, 264 (16): 12126~12129
 - 20 Kolodka T M, Finegold M, Moss L, *et al.* Gene therapy for diabetes mellitus in rats by hepatic expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92 (8): 3293~3297
 - 21 李秀钧, 董砚虎, 程丽霞, 等. 糖尿病研究进展——第16届国际糖尿病联盟大会纪要. *中华内分泌代谢杂志* (Li X J, Dong Y H, Cheng L X, *et al.* Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism), 1998, 14 (1): 72~77
 - 22 Efrat S. Prospects for gene therapy of insulin β dependent diabetes mellitus. *Diabetologies*, 1998, 41 (12): 1401~1409
 - 23 Bailey C J, Davie E L, Docherty K. Prospects for insulin delivery by *ex-vivo* somatic cell gene therapy. *J Mol Med*, 1999, 77 (1): 244~249

Progress in the Studies of Gene Therapy for Diabetes Mellitus. ZHANG Shu-Yun, GE Wei (*Hangzhou Sanatorium of PLA, Hangzhou 310007, China*); QIAN Kai-Xian (*Department of Biology, Zhejiang University, Hangzhou 310025, China*).

Abstract That advances in gene transfer technology have led to the investigation of molecular strategies for replacement of normal insulin delivery function. Substantial progress has been made in engineering glucos-responsive β -cell lines and non- β -cell lines. *In vivo* transfer the insulin gene to animals can improved control of the diabetes. New therapeutic approaches to diabetes which are based on gene technology and implications for future are summarized.

Key words gene therapy, insulin, diabetes mellitus

BAC-FISH 在植物基因组研究中的应用*

覃 瑞 魏文辉 宋运淳

(武汉大学发育生物学研究中心, 武汉 430072)

摘要 细菌人工染色体与荧光原位杂交合成技术 (BAC-FISH) 是 90 年代开始发展起来的一种新的定位技术。由于该技术较常规荧光原位杂交 (FISH) 技术的信号检出率高得多, 近年来在植物基因组研究中得到了越来越多的应用。运用该技术已将一些重要的功能基因定位到相应植物染色体上。

关键词 细菌人工染色体与荧光原位杂交合成技术, 植物基因组, 原位杂交, Cot-1 DNA

学科分类号 Q343.2

DNA 荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization) 是 80 年代末开始发展起来的一种重要的非放射性标记原位杂交技术。用不同非放射性标记物标记的核苷酸分子 (如 digoxigenin-11-dUTP 或 biotin-11-dUTP) 制备探针, 再用不同的

荧光素分子偶联, 通过激发荧光检测不同的探针分子, 可以对多个 DNA 探针在一张切片上进行同时

* 国家自然科学基金 (207982333) 和国家教委博士点基金 (207980112) 资助项目。

Tel: (027) 87684505, E-mail: ycsong@whu.edu.cn

收稿日期: 1999-01-20, 修回日期: 1999-05-20