

大鼠 BTCe 对体外培养胰岛保护作用及对糖尿病大鼠降糖作用的研究*

李 鸿^{1,2)} 周伟斌¹⁾ 李凤英¹⁾ 顾燕云¹⁾ 田璟琰¹⁾ 钱 镭¹⁾
张 迪¹⁾ 周文中¹⁾ 吴国亭²⁾ 骆天红¹⁾ 李 果¹⁾ 罗 敏^{1)**}

(¹⁾上海市内分泌与代谢病研究所, 上海交通大学附属瑞金医院, 上海 200025;

(²⁾上海同济大学附属第十人民医院, 上海 200072)

摘要 β 细胞素 (betacellulin, BTC) 是目前较受关注的胰岛再生因子, 但其促胰腺、胰岛再生的机制不清. BTCe 是 betacellulin 的功能片段, 促细胞增殖能力与 BTC 相同. 实验通过原核表达方法获得 BTCe 蛋白, MTT 法证实促 3T3-L1 细胞增殖能力. 将 BTC 或 BTCe 作用于原代培养的大鼠胰岛, 观察其对胰岛分泌的急性及长期影响作用, 实时定量 PCR 及免疫荧光检测胰岛内关键基因的表达. 将质粒 pcDNA3.1-BTCe 注射入链脲霉素 (STZ) 诱导的糖尿病大鼠肌肉中, 观察对大鼠血糖的影响作用. 加入 BTC 或 BTCe 可明显提高体外培养大鼠胰岛的 GSIS 水平, 但实时定量 PCR 及免疫荧光显示胰岛内 4 种关键基因的表达并无明显变化; pcDNA3.1-BTCe 转染糖尿病大鼠 15~20 天后血糖出现下降, 糖耐量明显改善; 免疫荧光显示: 胰腺内有大量 PDX-1⁺ 的导管细胞及胰岛素阳性细胞出现. 推测 BTC 及 BTCe 对体外长期培养的大鼠胰岛具有一定的保护作用, 可能通过促进胰腺内 PDX-1⁺ 的导管细胞及胰岛素阳性细胞的增殖、诱导对 STZ 诱导的糖尿病大鼠的高血糖具有一定缓解作用.

关键词 betacellulin, 克隆, 融合蛋白, 胰岛, 转染, 糖尿病

学科分类号 R587.1

β 细胞素 (betacellulin, BTC) 属表皮生长因子 (EGF) 家族, 在胰腺中高表达, 1993 年首先由 Shing 克隆成功. 目前认为其有以下作用: a. 促进胰腺内细胞的增殖^[1] (包括胰岛细胞、导管细胞、腺泡细胞); b. 诱导某些细胞成为胰岛素分泌细胞^[2]; c. BTC 基因特定的 SNP 与某些人群 T2DM 的发病相关^[3]. 可见, BTC 与胰岛、胰腺及糖尿病关系密切. BTCe, 即 BTC 的 EGF 样结构 (the EGF-like domain of BTC)^[4], 是成熟 BTC 蛋白 C 端的 50 个氨基酸, 为 BTC 的重要功能活性基团, 促细胞增殖作用与全长 BTC 无差异. 但尚无 BTCe 对胰岛、胰腺的相关资料.

揭示 BTC 功能片段的作用也是研究 BTC 的手段之一. Ogata 等^[5]选择 C 端截短了 17 个氨基酸的 BTC 片段 betacellulin-84, 认为其具有促 AR42J 细胞分化为胰岛素分泌细胞的功能. 本实验分三部分: a. 通过原核表达方式获得 BTCe 蛋白, 并对其进行初步的功能验证. b. 探讨 BTC、BTCe 对体外培养大鼠胰岛在促分泌及胰岛保护方面的功能. c. 通过质粒的肌肉注射实现糖尿病大鼠的体内转染, 观察其对高血糖的影响. 明确 BTCe 的作用, 近而为

BTC 与 BTCe 的比较研究打下基础, 为阐明 BTC 作用机制积累资料.

1 材料和方法

1.1 质粒的构建及鉴定

构建 2 个质粒, 一为原核表达载体, 一为真核表达载体. 提取大鼠肾脏总 RNA, RT-PCR 法扩增 BTCe 片段, 上游引物 TTACGGATCCTCGAAAA-CCCACTTCT, 下游引物 TGATCTCGAGATAAA-ACAGGTCCACC, 引入酶切位点 *Bam*H I 和 *Xho* I, 插入载体 pGEX-4T-2 构建 pGEX-BTCe, 转化 BL21 菌. 扩增信号肽片段: 上游引物 ATAAGAATTCATGGACTCGACTGCCCCAGG, 下游引物 GTTTTCGATGCCACCACGCACTG, 所得 PCR 产物与 BTCe 片段再行 PCR, 将两者连接. 上游引物: ATAAGAATTCATGGACTCGACTGCCCCAGG, 下游引物: GCTACTCGAGTTAATAA-

*国家自然科学基金资助项目 (30470817), 上海市科委重大项目 (04DZ19507), 同济大学优秀青年培养基金和上海市第十人民医院启明星基金资助.

**通讯联系人. Tel: 021-66302531, E-mail: hppleecn@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-07-12, 接受日期: 2006-08-25

AACAGGTCCACC. 引入酶切位点 *EcoR* I 和 *Xho* I. 插入载体 pcDNA3.1 构建 pcDNA3.1-BTCe, 转化 DH5 α 菌. 酶切、测序鉴定.

1.2 融合蛋白的诱导表达和纯化

菌落于 250 ml 2 $\times$ YT 氨苄培养基中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 A_{600} = 0.8, 22 $^{\circ}$ C, 0.5 mmol/L IPTG 振荡培养 4 h, 收菌. 依 Pierce 蛋白纯化试剂盒说明书所示步骤进行操作. 加入裂解液后离心取上清, 加入 50% 树脂 1 ml 充分混合, 1 200 g, 离心 10 min, 沉淀即为吸附融合蛋白的树脂, 取出少量树脂, 加入 100 μ l 0.75% 谷胱甘肽洗脱液, 上清即为融合蛋白. 剩余树脂加入 0.25 ml 洗涤缓冲液, 转移至柱子中, 加入 10 U 凝血酶, 22 $^{\circ}$ C 放置 2 h, 离心收集洗脱液即为 BTCe 蛋白. 进行 SDS-PAGE、蛋白质印迹 (羊抗 GST 一抗, 购自 Amersham 公司) 鉴定, 并送复旦生物公司质谱鉴定.

1.3 BTCe 蛋白对 3T3-L1 细胞增殖的影响

3T3-L1 细胞接种于 96 孔板中, 1 000 个 / 孔, 共分 3 组, 每组 3 孔, 含 10% 小牛血清的高糖 DMEM 中培养. 分 n 组 (正常对照组), b 组 (培养液含 0.5 nmol/L BTC, Sigma 公司), e 组 (培养液含 0.5 nmol/L BTCe). 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 条件下培养. 每 24 h 换液, 补充相应因子. 接种后 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h 进行 MTT 检测. 酶标仪 570 nm 测定 A 值.

1.4 大鼠胰岛的分离、纯化

300 g SD 大鼠 (购自中国科学院斯莱克实验动物中心), 胰管插管法灌注 0.05% XI 型胶原酶 (Sigma 公司) 溶液, 37 $^{\circ}$ C 水浴消化, dextran70 (Amersham 公司) 不连续密度梯度离心 (密度分别为 A 液 1.094、B 液 1.081、C 液 1.048) 17 min, 胰岛集中于 B、C 两层间. 吸管吸取, Hank's 液清洗, 镜下手拣胰岛. 0.5% BSA 低糖 DMEM 中培养, 分 n 组 (正常对照组), b 组 (1 nmol/L BTC), e 组 (1 nmol/L BTCe). 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 条件下培养.

1.5 胰岛的葡萄糖刺激试验

于连续培养的第 1 天、3 天、5 天、7 天、10 天、15 天、20 天取各组 10 个胰岛, 每组平行设置 3 孔, 先后置于预温的含 3.3 mmol/L、20 mmol/L 葡萄糖的 KRB 液 1 ml 中孵育 1 h, 留取培养液待检.

1.6 胰岛的 BTC/BTCe、BTC/BTCe+cAMP 刺激试验

取低糖 DMEM 过夜培养的胰岛, 分别以终浓度 1、2、5、10 nmol/L BTC/BTCe 及上述浓度

BTC/BTCe + 100 μ mol/L cAMP (Sigma 公司) 作刺激试验, 放射免疫法检测刺激前后胰岛素的分泌量 (Linco 公司).

1.7 实时定量 PCR (real time PCR) 检测

将各组 (n, b, e) 培养不同天数胰岛 (1 天, 7 天, 20 天) 各 500 个提取 RNA (按照 RNeasy Micro RNA kit Qiagen 说明操作), 合成 cDNA. ABI 7000 Real Time PCR 检测胰岛素 (insulin)、胰高糖素 (glucagon)、PDX-1、Glut-2 等关键基因的表达. 每组各设 3 孔. 引物见表 1 (上海生工生物技术公司合成). 反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 15 min; 95 $^{\circ}$ C, 15 s, 58 $^{\circ}$ C, 1 min, 45 循环; 将反应结果 C_T 值按照公式: $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算相对 DNA 含量 ($\Delta\Delta C_T = (C_{T \text{ Target}} - C_{T \text{ Actin}})_{\text{Time } x} - (C_{T \text{ Target}} - C_{T \text{ Actin}})_{\text{Time } 0}$), 将各组均数方差分析进行组间比较.

Table 1 Primers of four key genes in rat islet

Glucagon	F	AGACCGTTTACATCGTGGCTG
	R	TGGGAATGATCTGGCGTTCT
Insulin	F	CCAGGCTTTTGTCAAACAGCA
	R	ACGGGACTTGGGTGTGTAGAA
Glut-2	F	AGGGATTGACAAGCGTGTGAC
	R	CATCTGGGCTATGAAGATGGC
PDX-1	F	AAC TTGAGGCTGCCTCTCGT
	R	TGGGACCGCTCAAGTTTGTA
β -actin	F	CTGGGACGATATGGAGAAGA
	R	AGAGGCATACAGGGACAACA

1.8 胰岛及组织的固定、冻存及免疫荧光鉴定

4% 多聚甲醛固定胰岛及胰腺、肝、肾、肌肉组织, 依次以 10%、20%、30% 蔗糖溶液浸泡脱水, OCT 包埋冻存. 10 μ m 厚连续切片. 4 $^{\circ}$ C, 一抗孵育 (insulin 单抗 1 : 100, 兔抗 glucagon 1 : 200, 兔抗 Glut-2 1 : 200, PDX-1 单抗 1 : 500 Zymed 公司) 过夜, FITC 二抗 1 : 200 (Cedarlane 公司) 孵育 1 h, Dapi 0.5 μ l 加入封片剂中封片. 以 Adobe photoshop6.0 分析图像颜色亮度, 每组取 5 个胰岛, 每个胰岛随机取 5 点颜色分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 代表每组颜色数值, 方差分析进行组间比较.

1.9 糖尿病大鼠模型的制备及质粒的体内转染

SD 大鼠 (7~8 周, 雄性, 200 g) 购自上海斯莱克公司. 1% 链脲霉素 (溶于 pH 4.5 枸橼酸 / 枸橼酸钠缓冲液) 60 mg/kg 尾静脉注入, 7 天后测随机血糖 >16.67 mmol/L, 3 天后复查仍 >16.67 mmol/L 为糖尿病模型. 将 pcDNA3.1-BTCe 45 μ g 注入大鼠后腿肌肉内 (15 只), 质粒对照组 (5 只) 注射 pcDNA3.1, 糖尿病对照组 (15 只), 正常对照组 (5 只). 隔日检测随机血糖 (Freestyle 公司 USA), 测

体重, 观察饮水量及尿量.

1.10 腹腔注射的葡萄糖耐量 (IPGTT) 试验

转染第 30 日, 大鼠禁食 12 h, 以 2 g/kg 腹腔注入 50% 葡萄糖, 于 0, 30, 60, 120 min 检测血糖、胰岛素水平.

1.11 凋亡检测

按照 Roche Tunel 试剂盒说明, 大鼠胰腺切片原位凋亡检测.

1.12 HE 染色

质粒转染 2 月的大鼠肝脏、肾脏、肌肉组织 HE 染色.

2 结 果

2.1 质粒鉴定

pGEX-BTCe 酶切为 4 900 bp 及 170 bp, pcDNA3.1-BTCe 酶切获得 5 300 bp 及 250 bp 条带, 测序结果证实质粒构建成功 (图 1).

2.2 原核表达蛋白的鉴定

融合蛋白于 BL21 菌中以可溶性形式表达于胞质中, 分子质量约为 32 ku, SDS-PAGE, 蛋白质印迹显示其分子质量与预期相符, 质谱鉴定结果证

实其氨基酸序列符合 BTCe 蛋白 (图 2).

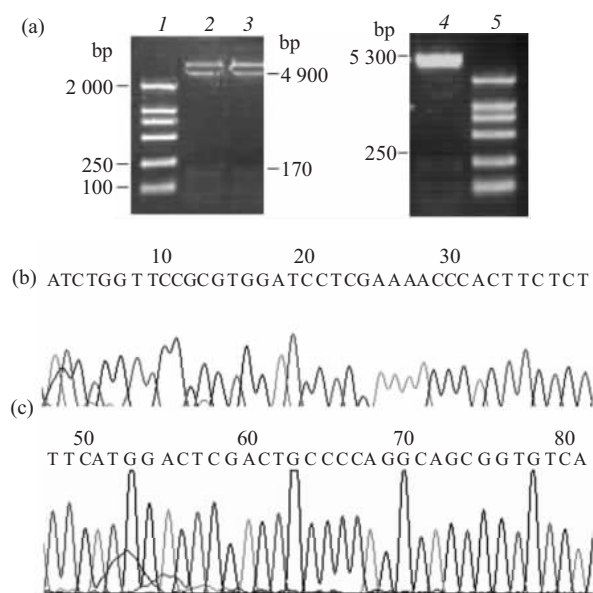


Fig. 1 Identification of plasmids

(a) Restriction analysis of pGEX-BTCe and pcDNA3.1-BTCe. 1,5: DL2000 marker, 2,3: products from pGEX-BTCe digested by *Bam*H I and *Xho* I, 4: Products from pcDNA3.1-BTCe digested by *Eco*R I and *Xho* I. (b) Sequencing result of pGEX-BTCe. (c) Sequencing result of pcDNA3.1-BTCe.

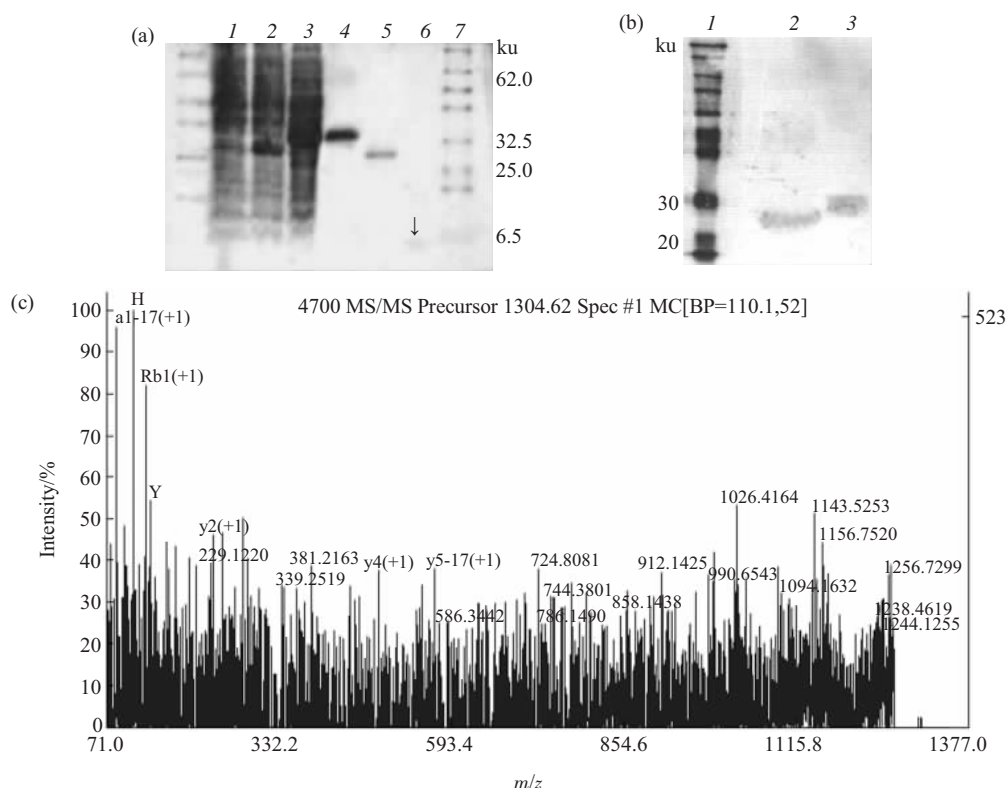


Fig. 2 Identification of proteins from *E. coli*

(a) SDS-PAGE result. 1: Protein from BL21, 2: BL-21 transfected with pGEX-4T-2, 3: BL-21 transfected with pGEX-BTCe, 4: Fusion protein, 5: GST tag protein, 6: Interest protein (arrow), 7: Protein marker. (b) Western blot analysis. 1: Protein marker, 2: GST tag protein (26 ku), 3: Fusion protein (32 ku). (c) Mass spectrometry (MS).

2.3 BTCe 蛋白对 3T3-L1 细胞增殖的影响

0.5 nmol/L BTCe 或 BTC 作用 60 h, 72 h 后 MTT 检测 A 值高于 n 组($P < 0.05$), b 和 e 组 A 值无差异 ($P > 0.05$) (图 3).

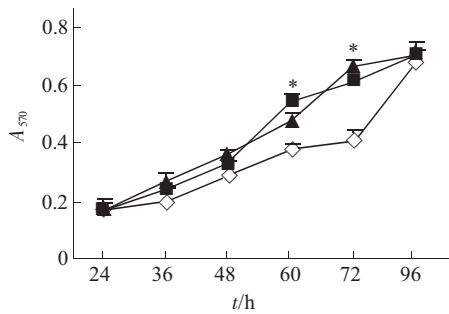


Fig. 3 Effect of BTC/BTCe on proliferation of 3T3-L1 cell by MTT

Cultured with 0.5 nmol/L BTC or BTCe, 3T3-L1 cells received a promotion on proliferation analyzed by MTT colorimetry. A_{570} values in group b and e were higher than those in n group on the 60 and 72 h. ($*P < 0.05$ compared to control). $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$: 3T3-L1 cells cultured with 0.5 mmol/L BTC, $\blacksquare$ — $\blacksquare$: 3T3-L1 cells cultured with 0.5 mmol/L BTCe, $\diamond$ — $\diamond$: Normal control.

2.4 胰岛的刺激分泌

a. 1、2、5、10 nmol/L BTC/BTCe 及联合 100 μ mol/L cAMP 作用于胰岛, 均未引起胰岛素的

急性分泌. b. 各组胰岛随培养时间延长, 葡萄糖反应性呈下降趋势, b、e 组胰岛较同一时段 n 组的 GSIS 水平增加 ($P < 0.05$, 除外第一天) (图 4).

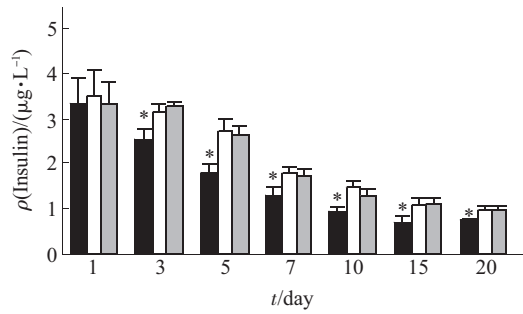


Fig. 4 Effects of BTC or BTCe on glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) during islets culture *in vitro*

During a 20-day culture span *in vitro*, the level of glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) from islets cultured with 1 nmol/L BTC or BTCe was much higher than that of normal control islets at the same stage. ($*P < 0.05$) (except the first day). $\blacksquare$: Normal control, $\square$: Islets cultured with 1 nmol/L BTC, $\blacksquare$: Islets cultured with 1 nmol/L BTCe.

2.5 Real time PCR 结果

实时 PCR 结果见表 2. 比较各组胰岛相同时段关键基因的表达总体无差异 ($P > 0.05$), 比较同一基因不同时间段 (1 天, 7 天, 20 天) 的表达亦总体无差异 ($P > 0.05$).

Table 2 Expression of genes in different groups by real time PCR

	Glucagon			Insulin		
	n	b	e	n	b	e
1 d	1.0 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.3
7 d	1.0 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.2
20 d	1.0 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.2
	Pdx-1			Glut-2		
	n	b	e	n	b	e
1 d	0.9 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.2
7 d	1.0 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.2
20 d	1.0 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1

2.6 免疫荧光结果

以 Adobe photoshop6.0 分析 Glu、INS、PDX-1、Glut-2 的表达强度, 随时间并无明显减弱, 各组胰岛亦未见差异 (图 5).

2.7 大鼠随机血糖结果

质粒注射 15~20 天后大鼠血糖开始下降, 并

持续 2 周, 形成一明显的“波谷”, 注射空载质粒及糖尿病对照组大鼠血糖则维持于较高水平 (图 6a). 3 只大鼠实施第二次注射 (间隔 20 天), 血糖出现 2 次下降, 呈现 2 个“波谷” (图 6b).

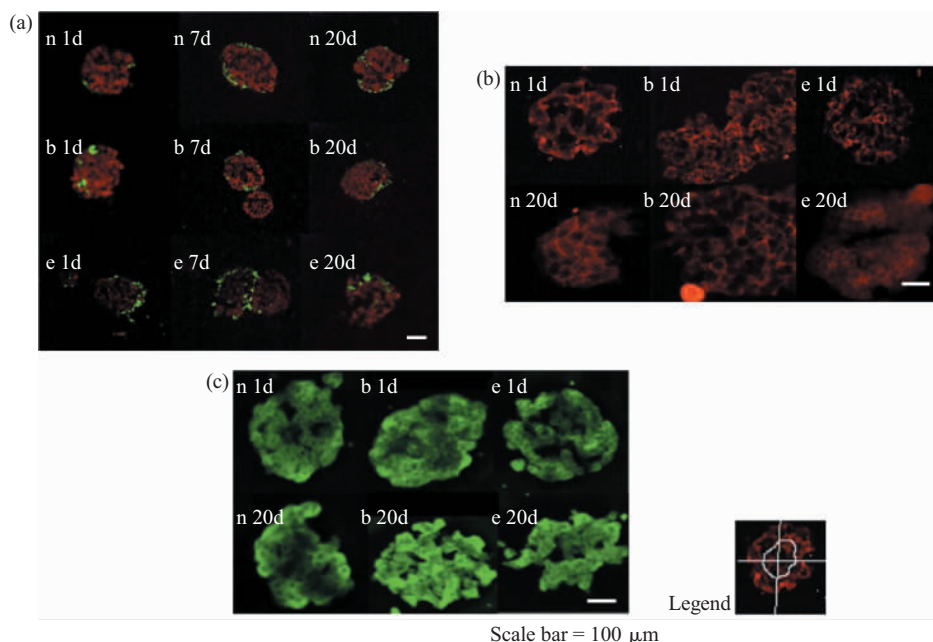


Fig. 5 Expression of genes in different groups by immunofluorescence

(a) Glucagon(green) and insulin(red). (b) Glut-2(red line). (c) PDX-1(green particles). n means normal control islets, b means islets cultured with 1 nmol/L BTC, e means islets cultured with 1 nmol/L BTCe.

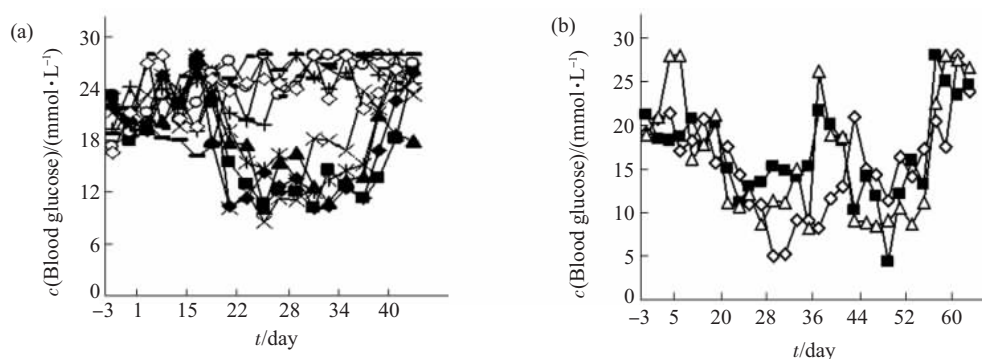


Fig. 6 Random blood glucose of rats in different groups

(a) Random blood glucose from rats received a single plasmid injection(▲—▲, ■—■, ◆—◆, ×—×, *—*) was much lower than that of normal control rats(◇—◇, ○—○, |—|, ———, ———)($n=5$). (b) Random blood glucose from rats received two plasmid injections (a 20-day interval $n=3$).

2.8 大鼠腹腔注射葡萄糖耐量试验 (IPGTT) 结果

以 2 g/kg 腹腔注射 50%葡萄糖行糖耐量试验. 糖尿病对照组和质粒对照组大鼠血糖在 30 min、

60 min 均明显高于质粒注射组(图 7a); 质粒注射组大鼠于 60 min 出现胰岛素高峰, 而糖尿病对照组和质粒对照组则为低平曲线 ($P < 0.05$, 图 7b).

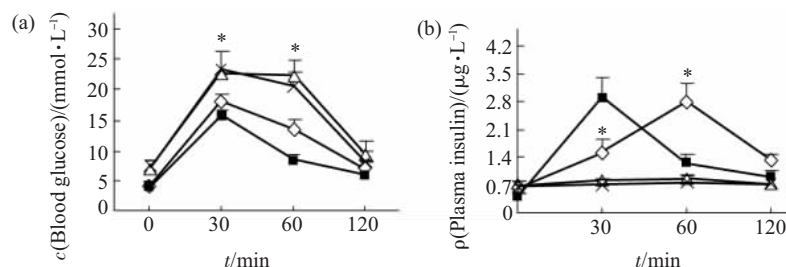


Fig. 7 Level of blood glucose and insulin during intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT)

(a) Level of blood glucose of rats received plasmid injection (◇—◇) was much lower than that of rats received pcDNA3.1 injection and diabetic control rats during IPGTT (×—×, △—△, * $P < 0.05$), (■—■: Normal control). (b) Level of plasma insulin of rats received plasmid injection (◇—◇) was much higher than that of rats received pcDNA3.1 injection and diabetic control rats during IPGTT (×—×, △—△ * $P < 0.05$), (■—■: Normal control).

2.9 大鼠胰岛素测定

检测各时段 (STZ 注射前 0 周, 质粒注射后 4 周, 8 周) 大鼠血浆胰岛素及胰腺内胰岛素含量, 糖尿病对照组、质粒对照组大鼠空腹胰岛素水平较正常对照组大鼠升高 (4 周, 8 周), 胰腺内胰岛素则明显降低 ($P < 0.05$). 质粒注射组大鼠胰岛素水平较糖尿病对照组、质粒对照组大鼠均无明显变化.

2.10 大鼠胰腺组织免疫荧光结果

正常大鼠胰腺胰岛结构完整, 胰高糖素、胰岛素分布正常, 胰岛素表达丰度高. 糖尿病大鼠胰岛结构丧失, α 细胞增生显著, β 细胞明显减少, INS、PDX-1、Glut-2 的表达均减弱. 质粒注射第 4 周, 比较 4 种基因的表达, 质粒注射组与糖尿病对照组无差异 (图 8). 糖尿病对照组和质粒注射组胰

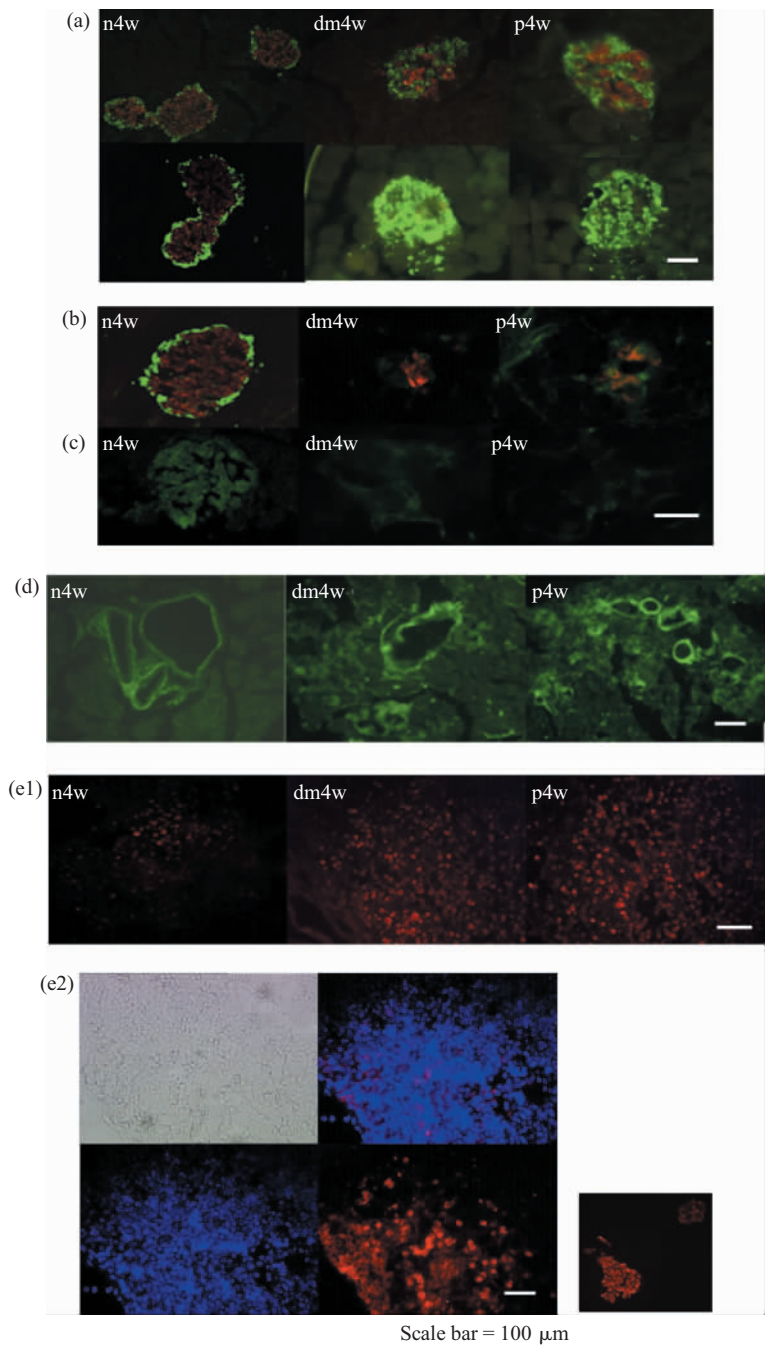


Fig. 8 Expression of genes in pancreas by immunofluorescence

Expression of key genes in pancreas of rats from different group including diabetic rats(dm), plasmid injection rats(p) and normal control rats(n) was analyzed by immunofluorescence. (a) Double staining for glucagons(green) and insulin(red). (b) Glut-2(green line). (c) PDX-1(green particles). (d) Lots of PDX-1⁺ duct cells were shown in pancreas of dm and p group. (e) Many insulin positive cells appeared in rat pancreas from dm and p group(e1).This morphological evidence was further confirmed by observation respectively under bright light, ultraviolet light and green fluorescence at the same time, then made them up to one photo(e2).

腺内 PDX-1⁺ 的导管细胞均明显增生, 并以质粒注射组大鼠显著 (图 8 d). 糖尿病对照组和质粒注射组大鼠胰腺内均出现大量胰岛阳性细胞 (图 8 e1), 图 8 e2 为在白光、紫外及绿色荧光下观察的细胞结构, 并将 3 者进行图像的合成.

2.11 大鼠肝、肾、肌肉 HE 染色结果

HE 结果显示, 与正常大鼠及糖尿病大鼠相比, 质粒注射 8 周后大鼠的肝、肾、肌肉组织未见有增生、浸润及细胞异型性改变.

2.12 大鼠胰腺凋亡检测

Tunel 法检测大鼠胰腺凋亡, 细胞核被 Dapi 染成蓝色, 凋亡细胞核被标记出红色的凋亡小体. 在凋亡细胞分布集中区域选取 3 个视野, 每个视野计数 500 个细胞, 计算凋亡指数 $AI = (\text{凋亡细胞数} / 500) \times 100\%$. 正常对照组、糖尿病对照组及质粒注射组大鼠的凋亡指数 (AI) 分别为: $(0.3 \pm 0.2)\%$ 、 $(0.4 \pm 0.2)\%$ 、 $(0.3 \pm 0.2)\%$, 3 组间的凋亡指数未见差异.

3 讨 论

目前, 糖尿病 (1 型、2 型) 病因不清, 只笼统归结为胰岛功能受损和胰岛素抵抗两大因素. 胰岛的再生能力是目前研究的热点. 阐明胰岛再生机制^[6], 提升胰岛的再生能力对于揭示糖尿病病因及最终治愈糖尿病都具有重要意义.

Betacellulin (BTC) 是近年来逐渐受到关注的一个胰岛再生因子.

1996 年, Mashima 和 Watada 分别将 BTC 作用于 AR42J 和 α TC1.6 细胞, 成功诱导其向 β 细胞方向分化并表达胰岛素. 之后, BTC 促胰岛、胰腺再生的作用得到进一步的证实. 综合现有资料, BTC 可能通过以下途径发挥作用: a. 促进胰岛细胞的增生、复制. b. 促进导管来源的“干细胞”增殖, 同时促进其向 β 细胞方向分化, 形成 ICCs (islet-like cell clusters). c. 刺激胰岛内的“前体细胞”的增殖和分化. 以上结果均已在糖尿病动物模型的体内实验中得到验证.

但 BTC 促胰岛再生的机制不清. BTC 促胰岛增殖和促胰岛干细胞分化在促再生过程中孰轻孰重? BTC 是通过 erbB-1、erbB-4 受体还是其特异受体发挥作用? BTC 在糖尿病发生、发展过程中扮演什么样的角色? BTC 怎样对离体胰岛直接作用? 这些问题目前仍未得到明确答案.

BTCe (the EGF-like domain of betacellulin) 是

BTC 的重要功能片段, 较全长 BTC 少 30 个氨基酸, 可与 erbB-1、erbB-4 受体结合, 促细胞增殖的能力与全长无差异, 但 BTCe 对于胰岛、胰腺的作用目前尚无报道.

本研究首先通过原核表达方法获得 BTCe 蛋白, 在对 3T3-L1 细胞的增殖作用上显示与 BTC 蛋白相似效果, 提示其具有一定生物活性, 可用于后续研究 (图 1、2、3).

2003 年, Buteau 等^[7]发现: $5 \mu\text{g/L}$ 的 BTC (相当于 0.5 nmol/L) 作用于 INS-1 细胞, 可引起 PI3K 途径的激活. MacDonald 等^[8]也报道: 单独使用 $5 \mu\text{g/L}$ BTC 可在一定程度上减少 MIN6 细胞和原代大鼠胰岛 K 通道的电流. 当与 $100 \mu\text{mol/L}$ 的 cAMP 联合作用时, 可引起 β 细胞膜上 K^+ 通道显著地去极化, 其作用程度与 GLP-1 类似物 exendin4 相当. PI3K 途径的激活和 K^+ 通道的去极化均是胰岛素分泌过程的重要变化. 这些资料吸引我们去明确 BTC 或 BTCe 是否具有对胰岛的急性促分泌作用? 从实验结果看, 各浓度 BTC 或 BTCe 单独或联合 $100 \mu\text{mol/L}$ cAMP 作用于原代大鼠胰岛, 均未见有急性促分泌作用. 如能排除浓度选择的偏差, 实验结果提示: 胰岛素的分泌调控是一个复杂的过程, 目前所了解的有关 K^+ 通道及信号转导通路的资料还十分有限.

实验中将大鼠胰岛连续体外培养 20 天, 观察 BTC 和 BTCe 对胰岛的影响作用. 加入 1 nmol/L BTC 或 BTCe 可明显减缓葡萄糖刺激的胰岛素分泌 (GSIS) 下降的速度. 胰岛培养前 5 天均保持对葡萄糖良好的反应性, 明显的胰岛素分泌功能减退出现在培养 7 天以后, 培养至第 10 天仍能达到 2 倍基础值的胰岛素分泌水平, 较同期的正常对照组胰岛均有显著意义的提升 (图 4), 说明 BTC、BTCe 对离体的大鼠胰岛功能具有一定的保护作用.

我们试图从胰岛内关键基因表达的变化阐明 BTC、BTCe 对胰岛 GSIS 功能的保护机制. 经内参 β -actin 校对后, 以 Real time PCR 评价基因在 mRNA 水平的表达丰度, 以免疫荧光强度显示基因在蛋白质水平上的表达程度. 结果显示, 随着培养天数的延长, 胰岛内 4 种关键基因 Glucagon、Insulin、PDX-1、Glut-2 在 mRNA 和蛋白质水平上的表达量并未持续下降, 加入 BTC、BTCe 与正常对照组胰岛之间亦未见差异. 实验中, 曾通过降低抗体滴度 ($1:100 \sim 1:1000$)、缩短一抗孵育时间 ($72 \sim 12 \text{ h}$) 来降低抗体反应的灵敏度, 以排除因实

验条件引起的各组无差别的阴性结果, 增加免疫荧光在蛋白质水平半定量检测的可信性. 这些结果提示: 引起体外培养胰岛 GSIS 下降的原因并非是由于上述 4 种关键基因表达的下调, BTC、BTCe 的保护作用可能与信号转导途径的修复等深层次因素相关.

本实验进一步探讨 BTCe 对糖尿病大鼠高血糖的影响作用. 2000 年, Yamamoto 等^[9]将 BTC 注入四氧嘧啶所致的糖尿病大鼠模型, 发现其只刺激胰腺导管细胞的增殖, 而对 β 细胞和腺泡细胞的增殖无效, 并认为导管细胞作为 β 细胞的前体细胞可进一步发育为胰岛 β 细胞, 完成新生过程 (neogenesis). 2001 年, Li 等^[10]采用 90% 胰腺切除的糖尿病大鼠模型研究 BTC 对胰岛的再生作用. 认为 BTC 不仅刺激胰腺 β 细胞的增殖, 还促进导管来源的 β 细胞前体细胞的增殖及向 β 细胞的分化, 形成 ICCs. 2004 年, Li 等^[11]继续采用 STZ 作用下的新生大鼠模型, 认为 BTC 对胰岛内“前体细胞”的促增殖分化具有更显著的作用.

另外, Kojima 等^[12]观察到 BTC 联合 NeuroD 进行基因转染糖尿病小鼠也会降低血糖, 改善糖尿病症状, 并在肝脏门脉附近发现了能够分泌胰岛素的细胞. 由此推测可能是肝脏内的“干细胞”被诱导分化成胰岛素分泌细胞.

有关 BTC 对糖尿病大鼠高血糖的影响作用, 目前已有多篇文献资料, 但 BTCe 在糖尿病大鼠的体内作用尚无研究积累.

实验中, 为使 BTCe 蛋白在体内得到良好分泌, 首先将 BTC 信号肽与 BTCe 结构蛋白相连^[13], 构建质粒 pcDNA3.1-BTCe, 并采用裸质粒的肌肉注射实现体内转染. 肌肉组织是良好的表达宿主, 具有体积大、血运丰富、表达稳定持久、易于操作等优点, 已成功表达过 VEGF^[14]、IL-10^[15]、EPO^[16]、胰岛素^[17]等多种蛋白质, 是在体内研究基因功能的重要方法. 裸质粒直接注射虽然易被宿主破坏, 转染效率不高、不稳定持久, 但具有简单、经济的特点. 之前, 我们曾采用裸质粒注射方法在小鼠肌肉组织中成功表达了人胰岛素基因^[18].

实验结果显示: 质粒注射 15~20 天后, 大鼠血糖明显下降, 降幅可达 10 mmol/L, 大鼠尿量、饮水量减少. 这种降糖效果可持续 2 周, 之后, 血糖迅速上升, 达到甚至高于质粒注射前的血糖水平. 再次注射质粒后依然可以取得相似的效果. 与此相比, 糖尿病对照组大鼠在整个实验过程中无一例

出现血糖持续的“波谷”(图 6). 糖耐量试验显示: 质粒注射后, 大鼠接受葡萄糖刺激的胰岛素分泌能力得到了明显的改善, 出现了预期的高峰, 而糖尿病对照组大鼠则仍是低平曲线, 对葡萄糖的刺激未见回应(图 7).

免疫荧光结果显示: STZ 所致的糖尿病大鼠胰岛严重破坏, 正常结构丧失, 出现明显的 α 细胞增生, 表现为胰高血糖素 (glucagon) 荧光面积的扩大和胰岛素 (insulin) 荧光面积的缩小, 同时 PDX-1 和 Glut-2 的表达也异常微弱. 与此相应, 糖尿病大鼠模型在最初 4 周胰腺内胰岛素含量已明显下降, 约为正常大鼠的一半. 这些表现与糖尿病大鼠胰岛功能的减退是相一致的. 注射质粒后, 胰腺内胰岛素含量并未有明显上升, 但糖尿病对照组和质粒注射组大鼠胰腺内均出现了 PDX-1⁺ 的导管和腺泡细胞, 并以质粒注射组为著(图 8), 这与 Li 等^[10]的报道是一致的. 提示 BTCe 对于 STZ 诱导的糖尿病大鼠胰腺可能存在促增殖作用. PDX-1⁺ 的导管细胞被认为可能是胰岛的前体细胞, 对于胰岛的新生具有重要意义. 但我们在实验中未观察到增殖的导管细胞中出现胰岛素的表达, 分析原因可能有: a. 观察时间较短, “干细胞”尚未被诱导成功; b. BTCe 剂量较小; c. 这些 PDX-1⁺ 的导管细胞并不是胰岛 β 细胞的干细胞, 对胰岛的再生并无贡献, 也不参与血糖的下降.

Tunel 检测凋亡结果显示, 糖尿病大鼠胰腺内无大量凋亡细胞. 文献报道: STZ 注射大鼠体内 2 天后出现明显凋亡. 本次检测时间为 STZ 注射后 6 周, 此时胰岛内的大量细胞已破坏完全, 推测凋亡在此时可能不是一个维持胰岛功能减退的后续环节.

实验中还发现, 质粒注射后大鼠胰腺内出现了大量的胰岛素阳性细胞 (如图 8 e1. 2). 这些细胞聚集成片, 约有单个 β 细胞大小, glucagon 及 PDX-1 染色均为阴性. 这些细胞是否为新生的 β 细胞? 是否可以发育为成熟的胰岛? 对糖尿病大鼠血糖的下降是否有一定贡献? 这些问题都为我们的后续研究提供了有价值的方向.

本实验在安全性上也对 BTCe 作了短期、初步的监测. 质粒转染 2 月后, 通过 HE 染色观察大鼠的重要组织肝、肾及转染部位——肌肉. 质粒的转染未引起这些组织的增生、浸润、细胞异型性等改变. 当然, 本次实验为单次注射, 作用时间短, 也可能不足以显现 BTCe 在安全性上的缺陷. 我们将

进一步探讨多次、长期的注射对机体带来的负面影响。BTC 虽然是一个有价值的胰岛再生因子，但作为生长因子，其受体又广泛分布，在实际应用中是否存在安全隐患是一个值得探讨的问题。新近，Schneider 等^[9]发现 BTC 过度表达的转基因小鼠，其肺、心、视网膜均出现了不同程度的增生和损害。能否保留 BTC 对胰岛、胰腺特异的修复作用而去除对其他器官的不良影响？BTCe 是否比 BTC 具有更高的安全性？这些都是课题即将深入的问题。

综上所述，BTCe 对糖尿病大鼠血糖的缓解作用可能和以下因素相关：a. 直接促进 PDX-1⁺导管细胞增殖，这些细胞进一步发育为胰岛 β 细胞；b. 实验中出现的大量胰岛素染色阳性细胞可能对血糖的缓解具有一定贡献；c. 质粒注射后，大鼠血糖虽有明显下降，但免疫荧光显示胰岛内的 4 种关键基因的表达并无变化，结合细胞水平实验，其保护作用除促增殖外可能还存在其他途径的修复，而这种深层次的修复可能占据着主导地位。

研究 BTC 的意义和作用包括：a. BTC 可能参与了胰腺 / 胰岛发生、发育、分泌、增殖的关键环节，搞清 BTC 的作用及其机制对于阐明糖尿病的病因将会提供重要线索，有关 BTC 的研究可能会是一个有效的切入点；b. 目前实验均证实 BTC 与胰岛再生密切相关，BTC 对胰岛的保护、修复可能具有积极作用。挖掘 BTC 对干细胞的诱导潜能、开发 BTC 在胰岛移植中对胰岛的保护作用，都是今后有益的探索方向；c. BTC 的促胰岛再生作用赋予其成为糖尿病治疗药物的潜质，具有一定的商业价值。

作为 BTC 的功能片段，有关 BTCe 的研究是对 BTC 资料的丰富，也是揭示其机制的一个良好的切入点。明确 BTCe 对体外培养胰岛的保护作用及对糖尿病大鼠高血糖的缓解作用，为进一步分析、比较 BTC、BTCe 作用机制的异同，进而阐明 BTC 促胰岛再生机制，揭示糖尿病病因打下基础。

参 考 文 献

- Demeterco C, Beattie G M, Dib S A, *et al.* A role for activin A and betacellulin in human fetal pancreatic cell differentiation and growth. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, **85** (10): 3892~3897
- Humphrey R K, Bucay N, Beattie G M, *et al.* Characterization and isolation of promoter-defined nestin-positive cells from the human fetal pancreas. *Diabetes*, 2003, **52** (10): 2519~2525
- Silver K, Tolea M, Wang J, *et al.* The exon 1 Cys7Gly polymorphism within the betacellulin gene is associated with type 2 diabetes in African Americans. *Diabetes*, 2005, **54** (4): 1179~1184
- Miura K, Doura H, Aizawa T, *et al.* Solution structure of betacellulin, a new member of EGF-family ligands. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **294** (5): 1040~1046
- Ogata T, Dunbar A J, Yamamoto Y, *et al.* Betacellulin- $\delta 4$, a novel differentiation factor for pancreatic β cells, ameliorates glucose intolerance in streptozotocin-treated rats. *Endocrinology*, 2005, **146** (11): 4673~4681
- Dor Y, Brown J, Martinez O I, *et al.* Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*, 2004, **429** (6987): 41~46
- Buteau J, Foisy S, Joly E, *et al.* Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic β -cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Diabetes*, 2003, **52** (1): 124~132
- MacDonald P E, Wang X, Xia F, *et al.* Antagonism of rat beta-cell voltage-dependent K⁺ currents by exendin4 requires dual activation of the cAMP/protein kinase A and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways. *J Biol Chem*, 2003, **278** (52): 52446~52453
- Yamamoto K, Miyagawa J, Waguri M, *et al.* Recombinant human betacellulin promotes the neogenesis of beta-cells and ameliorates glucose intolerance in mice with diabetes induced by selective alloxan perfusion. *Diabetes*, 2000, **49** (12): 2021~2027
- Li L, Seno M, Yamada H, *et al.* Promotion of beta-cell regeneration by betacellulin in ninety percent-pancreatectomized rats. *Endocrinology*, 2001, **142** (12): 5379~5385
- Li L, Yi Z, Seno M, *et al.* Activin A and betacellulin: effect on regeneration of pancreatic beta-cells in neonatal streptozotocin-treated rats. *Diabetes*, 2004, **53** (3): 608~615
- Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, *et al.* NeuroD-betacellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med*, 2003, **9** (5): 596~603
- 方艳辉, 金玉怀, 王永祥, 等. 人 IL-2 信号肽基因增强柯萨奇病毒 B3 型 VP1 DNA 疫苗诱导的中和抗体应答. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, **24** (3): 202~205
- Fang Y H, Jin Y H, Wang Y X, *et al.* *Chin J Microbiol Immunol*, 2004, **24** (3): 202~205
- Shyu K G, Chang H, Wang B W, *et al.* Intramuscular vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with chronic critical leg ischemia. *Am J Med*, 2003, **114** (2): 85~92
- Zhang Y C, Pileggi A, Agarwal A, *et al.* Adeno-associated virus-mediated IL-10 gene therapy inhibits diabetes recurrence in syngeneic islet cell transplantation of NOD mice. *Diabetes*, 2003, **52** (3): 708~716
- Seppen J, Barry S C, Harder B, *et al.* Lentivirus administration to rat muscle provides efficient sustained expression of erythropoietin. *Blood*, 2001, **98** (3): 594~596
- 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 Letters*, 2001, **495** (1~2): 16~20
- 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. 生物化学与生物物理进展, 2004, **31** (3): 278~281

Li H, Su B L, Liu H X, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2004, **31** (3): 278~281

19 Schneider M R, Dahlhoff M, Herbach N, *et al.* Betacellulin overexpression in transgenic mice causes disproportionate growth, pulmonary hemorrhage syndrome, and complex eye pathology. Endocrinology, 2005, **146** (12): 5237~5246

Study of The Effect on Islets Cultured *In vitro* and STZ-induced Diabetic Rats *In vivo* of EGF-like Domain of Betacellulin*

LI Hong^{1,2}, ZHOU Wei-Bin¹, LI Feng-Ying¹, GU Yan-Yun¹, TIAN Jing-Yan¹, QIAN Lei¹, ZHANG Di¹, ZHOU Wen-Zhong¹, WU Guo-Ting², LUO Tian-Hong¹, LI Guo¹, LUO Min¹**

⁽¹⁾Shanghai Institute of Endocrine and Metabolic Disease, Ruijin Hospital of Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China;

⁽²⁾Shanghai Tenth People's Hospital Affiliated to Shanghai Tongji University, Shanghai 200072, China)

Abstract Betacellulin (BTC) is one of “islets regeneration factors” which received more and more attention these years. BTCe is the C-terminal 50-residue region of mature BTC protein and can bind with erbB-1、erbB-4 receptor. It has the same mitogenic activity on cells as the whole section. BTC and BTCe can improve the level of glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) during islets culture *in vitro* though they had no effect on the acute insulin secretion. BTCe also effectively ameliorated the hyperglycemia of STZ-induced diabetic rats by a single plasmid injection into muscle of rats. It is supposed that BTCe promote the proliferation of PDX-1 positive cells or repair some signal transduction pathway. Perhaps the latter is more important.

Key words betacellulin, cloning, fusion protein, islet, transfection, diabetes mellitus

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30470817), The Key Program of Shanghai (04DZ19507), The Talent Youth Culture Plan of Tongji University and The Venus Fund of Shanghai the Tenth People's Hospital.

**Corresponding author . Tel: 86-21-66302531, E-mail: hppleecn@yahoo.com.cn

Received: July 12, 2006 Accepted: August 25, 2006