

人胰岛素基因在体内外表达的研究

曹月青,周玲,韩柱,尚磊雄,虎良菊,姚文彬

(河北以岭医药研究院生物工程中心,石家庄 050091)

摘要:利用定点突变人胰岛素基因,以脂质体载体和质粒不同比例形成的复合物进行体内外转染。体外转染鼠肝细胞,G418 进行筛选,利用放免法测定培养液中胰岛素含量;体内通过肝门脉注射,测定模型鼠血糖及转染后 7 天时血液中胰岛素的含量,结果显示目的基因已转入肝细胞,且体内外转染都有一定量的成熟胰岛素表达,体外转染中质粒与脂质体比为 1:6 转染后 24h 表达量最高为 10.45 μ IU/ml,体内转染使模型鼠的糖尿病症状明显改善,血糖最高降幅达 55%。

关键词:人胰岛素基因;基因治疗;肝细胞;糖尿病

中图分类号:Q812

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2002)04-0407-03

The Expression of Human Insulin Gene *in vitro* and *in vivo*

CAO Yue-qing, ZHOU Ling, HAN Zhu, SHANG Lei-xiong, HU Liang-ju, YAO Wen-bin

(Biotechnology Center, Yi Ling Pharmacy Institute, Shijiazhuang, China)

Abstract: The transfection of mutated human insulin gene was studied using the complex of different proportion of plasmid and Liposome. Hepatic cell was used as the target cell *in vitro*, isolation of Hepatic cell including insulin gene was carried out by G418, the expression level of insulin in medium was measured by RIA method. The portal vein was cannulated with therapeutic gene *in vivo*, the blood glucose of the model was regularly examined and the insulin level was detected on the seventh day after transfection. The results showed that the target gene was transferred into the hepatic cell, expression of mature insulin was detected both *in vivo* and *in vitro*. It reached the peak 10.45 μ IU/ml on the 24th hour after transfection with the proportion 1:6 of plasmid and Liposome in hepatic cell. Diabetic symptom of the model was improved after transgene, the blood glucose could decrease 55% at the most.

Key words: human insulin gene; gene therapy; hepatic cell; diabetes

外源胰岛素注射治疗是 1 型和部分 2 型糖尿病治疗的重要措施,但并不能重建患者正常的血糖调控,给患者带来痛苦和不便。近年来,随着基因重组技术和转基因技术的发展,基因治疗成为治疗糖尿病的研究方向,目前已有一些关于人胰岛素基因转染非胰岛细胞及体内直接导入的报道,但其研究多采用的是胰岛素原或前胰岛素原基因^[1~3],我们利用定点突变人胰岛素基因表达质粒,即将 Furin 识别和切割位点引入胰岛素原基因 C 肽两端,研究了定点突变人胰岛素基因在鼠肝细胞中的表达情况,以及体内直接转染糖尿病大鼠后一些生理生化的

变化。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5a、质粒 pCMV-ImINS 在与 A、B 连接的 C 肽两端引入 Furin 酶切位点(由中国农业大学动物生化室惠赠)。

1.2 试剂

Lipofectamine、RPMI1640、G418 购自 Gibco; STZ 为 Sigma 分装;放射性免疫测定试剂盒购自中国原子能科学研究所。

收稿日期:2001-12-17;修回日期:2002-03-11

作者简介:曹月青(1975-),女,河北人,理学硕士,专业:细胞生物学

联系人:姚文彬(1959-),男,北京人,医学博士,副主任医师。Tel:0311-3828244

1.3 质粒提取

采用碱裂解法提取^[5]。

1.4 动物模型

Wistar 雄性大鼠,7 周龄,200g 左右(购自河北医科大学实验动物中心),STZ 60mg/kg 腹腔注射,血糖高于 300mg/dl,尿糖++++维持一周为模型成功。血糖测定取尾静脉血,用 One Touch 血糖仪(Lifescan.)检测;采用尿糖测定试纸(广州白云山实验仪器厂)测定尿糖。

1.5 细胞培养

Wistar 雄性大鼠,7 周龄,200g 左右,解剖取其肝脏,机械研磨过滤分离细胞,RPMI1640 10%FCS 37℃ 5%CO₂ 培养,基因转染的靶细胞均采用第 3 代肝细胞。

1.6 体外转染

参照 Lipofectamine 使用说明,以质粒与脂质体比例分别为 1:2、1:4、1:6、1:8、1:10 进行转染,分别于转染后 12、24、48、72h 取上清液,采用 RIA 法测定胰岛素、C 肽含量,对照采用不含胰岛素基因的空质粒,其余操作同上,每组设 3 个重复。

1.7 G418 筛选

转染后 24h,在细胞培养液中加入 G418(终浓度为 500μg/ml),每隔两天更换一次培养液和 G418。

1.8 体内转染

取质粒 100μg,质粒与脂质体比例为 1:6,糖尿病鼠肝门脉注射,对照采用不含胰岛素基因的空质粒,分别于转染 5、7、10、14、21、28d 测定血糖、尿糖、体重,并于 7d 时眼底静脉取血测定胰岛素、C 肽含量,每组 8~10 只大鼠。

2 结果与分析

2.1 体外转染

以脂质体为载体,体外转染肝细胞,结果表明,在转染肝细胞后不同时间,上清液都有一定量的胰岛素表达,其中 24、48、72h 表达量都比较高,质粒与 Lipofectamine 比为 1:6 转染后 24h 表达量最高为 10.45μIU/ml(图 1),各组不同转染时间 C 肽与胰岛素含量高低相互对应,C 肽最高表达量为 0.67ng/ml。经 G418 筛选,证实以脂质体作载体的目的基因已转入肝细胞中。

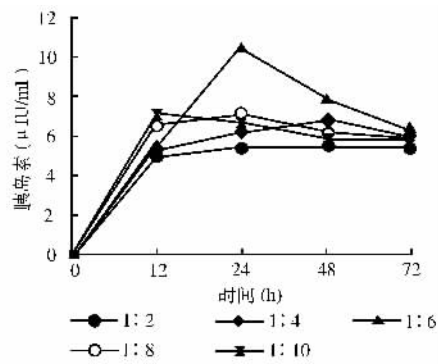


图 1 体外转染中胰岛素的表达量

Fig. 1 Insulin level of transfection in vitro

2.2 体内转染

体内直接转染后,糖尿病鼠较对照组体重有所增长,尿糖由++++转为++或+,于不同时间测定糖尿病鼠血糖,结果表明(图 2),血糖于转染后 7d 降至最低(165mg/dl),下降幅度约为 55%,稍高于正常血糖(90±10mg/dl),7d 后血糖有所回升,但较初始血糖仍有大幅度降低,4 个半月后出现反复,血糖约升至 220mg/dl,但仍低于初始血糖 350mg/dl。7d 时治疗组血液中胰岛素含量明显高于对照组(表 1)。

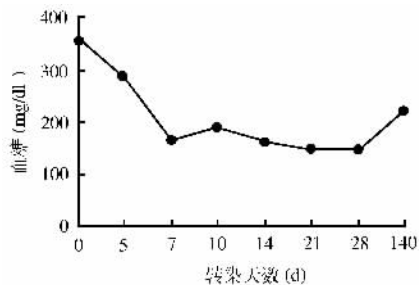


图 2 pCMV-ImIns 对糖尿病鼠血糖的影响

Fig. 2 The effect of pCMV-ImIns on the blood glucose of diabetic rat

表 1 转染 7d 后血液中胰岛素的含量

Table 1 Insulin level in the blood on the seventh day

组别 Group	胰岛素(mg/dl) Insulin(mg/dl)
正常组 Normal Group	23.2±9.2
对照组 Control	6.9±2.2*
治疗组 Therapeutic Group	15.0±5.8*

* P<0.05

3 讨 论

肝脏是葡萄糖代谢和蛋白质合成的主要场所。糖、蛋白质和其他营养成分吸收入血,通过门静脉进入肝脏,为肝脏提供绝大部分血供,这使细胞或基因的转染较易进入^[6],已有报道肝脏是异位表达胰岛素基因的最好靶器官^[7~8]。但肝细胞不具有 β 细胞所特有的进行的蛋白酶 PC2 和 PC3,这两种酶可加工前胰岛素原,切掉 C 肽使其成为成熟胰岛素,并可调节胰岛素的释放。pCMV-ImIns 是采用定点突变技术,将普通细胞内存在的 Furin 酶识别位点引入人胰岛素基因中,使其能在普通非内分泌细胞中表达分泌成熟胰岛素^[9~10]。

胰岛素表达的调控是糖尿病基因治疗不可忽视的问题。将胰岛素基因导入细胞后,如缺乏调控,理论上讲,胰岛素基因将处于永久开放状态,导致低血糖。胰岛细胞移植不存在外源基因的调控问题,曾被认为是比较有前途的糖尿病治疗方法,但因供体不足且存在免疫排斥,其应用受到很大限制。干细胞研究的兴起和发展使细胞移植治疗糖尿病有了新的希望。目前已有皮肤干细胞分离鉴定的报道^[11],如将胰岛素基因导入糖尿病病人的皮肤干细胞中,再将其移入患者体内,不仅解决了胰岛素基因的调控,也免除了异体移植的免疫排斥反应,目前我研究室正在致力于这方面的研究。

参 考 文 献(References):

- [1] Dong Yin, Tang Jian-Guo. Gene therapy for streptozotocin-induced diabetic mice by electroporational transfer of naked human insulin precursor DNA into skeletal muscle *in vivo* [J]. FEBS Letter, 2001, 495: 16~20.
- [2] Kuzume M, Yamaguchi T, *et al.* Insulin gene transfer can be a new optional therapy for replacement of pancreas [J]. Transplantation Proc, 1998, 30: 3416.
- [3] F Bartlett, Denis M, Secore S L. Toward engineering skeletal muscle to release peptide hormone from the human pre-proinsulin gene [J]. Transplantation Proc, 1998, 30: 451.
- [4] 肖新华, 方福德, 孙 琦. 人胰岛素基因转染成纤维细胞致糖尿病大鼠血糖下降效应的研究 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 1998, 4: 248~251.
- [5] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [6] 白 然. I 型糖尿病胰岛素基因治疗的研究进展 [J]. 国外医学内分泌学分册, 1998, 18: 135~138.
- [7] Koldka T M. Gene therapy for diabetes mellitus in rats by hepatic expression of insulin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 3293.
- [8] Thule P M, Liu J, Philips L S. Glucose regulated production of human insulin in rat hepatocytes [J]. Gene Therapy, 2000, 7: 205~214.
- [9] 寿思明, 朱宝利, 崔振中. 定点突变人胰岛素基因在 CHO 细胞表达的研究 [J]. 中国糖尿病杂志, 1999, 5: 269~273.
- [10] 王吉贵. 人胰岛素基因组基因在真核细胞中的表达及表达产物的研究 [D]. 硕士学位论文, 中国农业大学, 2000.
- [11] Jean G T, Mahnaz A, Karl J L. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin [J]. Nature Cell Biology, 2001, 3: 778~784.

第五期《人类基因组研究基本技术》学习班通知

经国家卫生部继续教育委员会批准,我院 2002 年国家级继续医学教育项目——第五期《人类基因组研究基本技术》学习班定于今年 9 月份举办。本学习班由国家人类基因组研究南方中心主任、上海血液学研究所所长、中科院副院长陈竺研究员、白血病基础和临床研究专家、血研所执行所长陈赛娟研究员以及掌握国际人类基因组研究最新技术的黄薇、陈国强、张庆华、王铸刚等研究人员担任主讲。学习内容包括:系统介绍人类基因组研究进展,详尽传授荧光素原位杂交(FISH)、染色体涂沫、多重荧光原位杂交(M-FISH, SKY)、辐射杂种细胞系(RH)、比较基因组杂交(CGH)、单核苷酸多态性(SNP)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、单链构象多态性(SSCP)、寡核苷酸引物设计、DNA 测序技术、RT/PCR、PCR、实时定量 PCR 和 DNA 测序、DNA 芯片、模式生物体研究、生物信息学等技术。本学习班宗旨:以人类基因组研究的最新进展为基础,全面介绍基因组学的新理论和新方法以及这些方法在临床医学中的应用。对学习进行有关当代国际最新、最常用的分子生物学技术的基本培训,提高现代医学的临床及科研水平。

参加学习者经考试合格后可取得国家级 I 级学分 10 分,作为职务续聘及职称晋升的必备条件之一,本学习班的项目编号为 2002-01-03-004。现将有关事项通知如下:

一、学习班举办时间:2002 年 9 月 2 日~9 月 7 日;二、地点:上海第二医科大学附属瑞金医院;三、招生对象:中级职称及以上的医师 1 名;四、名额:30 名 学费:700 元/人,食宿及交通费自理,报到时交款;五、有意参加本学习班者请于 8 月 5 日前报名。报名请寄:上海市瑞金二路 197 号 瑞金医院继教办 杜晓凤、沈以刚收 邮编:200025 8 月 10 日起将陆续寄出报到通知。联系电话:021-64370045 转 662714 或 662715。

上海第二医科大学附属瑞金医院

上海血液学研究所

2002 年 5 月 20 日