

胰腺疾病组织 N-myc 下游调节基因 2 的表达与分布

贺菲菲 焦凯 刘新平 沈岚

【摘要】 分离胰岛细胞增生症患者、胰岛素瘤患者、胰尾高中分化腺癌患者和正常人胰腺组织,制成石蜡切片,用抗 N-myc 下游调节基因 2(Ndr2)单克隆抗体进行免疫组织化学染色(ABC法),用 Western 印迹法检测 Ndr2 的表达与分布情况。结果显示,Ndr2 阳性反应物主要分布在胰岛细胞的胞浆,与胰岛素的阳性反应物分布与定位相似;胰岛细胞增生症患者胰岛数量增加,体积增大,且该疾病患者胰腺中 Ndr2 表达增加;Western 印迹实验结果显示胰岛细胞增生症患者胰腺组织中 Ndr2 蛋白的表达量较正常组增高。提示 Ndr2 基因可能在胰岛细胞中发挥重要的生理功能。

【关键词】 N-myc 下游调节基因 2; 胰岛细胞; 胰岛素; 免疫组织化学

Expression and distribution of N-myc downstream regulated gene 2 in pancreatic diseases HE Fei-fei*, JIAO Kai, LIU Xin-ping, SHEN Lan. *Department of Endocrinology, Tangdu Hospital, 4th Military Medical University, Xi'an 710038, China

Corresponding author: SHEN Lan, Email: lanshen@fmmu.edu.cn

【Summary】 The pancreatic tissues from patients with islet cell hyperplasia, insulinoma, and pancreatic adenocarcinoma, as well as normal pancreatic tissues were embedded with paraffin, serial sections were cut and mounted on glass slides. Immunohistochemical staining was carried out with N-myc down-stream regulated gene 2 (Ndr2) monoclonal antibody by means of ABC method, and Western blotting was carried out to detect the expression and distribution of Ndr2. The results showed that Ndr2 positive immunoreactivity was mainly localized in the cytoplasm of islet cell, being similar to the localization of insulin positive immunoreactivity. The number and volume of pancreatic islets were increased in the patients with islet cell hyperplasia, and Ndr2 expression was also increased. Western blotting results showed that the expression of Ndr2 in the pancreas of patients with islet cell hyperplasia was increased compared with normal group. The above results suggest that Ndr2 may play an important role in performing physiological function of islet cells.

【Key words】 N-myc downstream regulated gene 2; Pancreatic islet cells; Insulin; Immunohistochemistry
(Chin J Endocrinol Metab, 2013, 29; 162-164)

N-myc 下游调节基因 2(N-myc down-stream regulated gene 2, Ndr2) 是本研究组利用消减杂交技术克隆的新基因^[1], 基因库的登录号为 AF159092。该基因全长 2 024 bp, 编码分子量约 41 kDa 的功能未知蛋白。由于该基因在结构上与已发现的 N-myc 下游调节基因 NDRG1(N-myc downstream regulated gene 1) 具有较高的同源性, 故命名为 Ndr2^[2,3]。在 Ndr2 前期研究中, 本课题组观察到该分子与细胞分化^[4]和细胞凋亡^[5,6]密切相关; Ndr2 仅分布在胰内分泌部胰岛 β 细胞的细胞浆中, 而在胰外分泌部中表达量很低^[7,8]。本实验采用免疫组织化学及 Western 印迹的方法, 检测 Ndr2 在人胰腺疾病中的表达分布及变化规律, 为进一步研究 Ndr2 在内分泌代谢中的生物学功能奠定基础。

一、材料和方法

1. 标本来源: 正常健康胰腺和胰岛细胞增生症患者、胰岛素瘤患者、胰尾高中分化腺癌患者的胰腺石蜡切片均取自第四

军医大学附属西京医院病理科; 胰岛细胞增生症患者增生的胰腺组织及正常的胰腺组织取自第四军医大学附属西京医院胃肠外科。

2. HE 染色: (1) 切片常规二甲苯、梯度酒精脱蜡至水后, 1×PBS 洗 5 min×3 次; (2) 苏木素染液染色 1 min; (3) 水洗玻片上多余染液, 盐酸酒精分色片刻。镜检控制, 直至细胞核及核内染色质清晰为止; (4) 流水冲洗 2 min, 伊红染液染色 1 min; (5) 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 37℃ 干燥 48 h, 在目镜为 10 倍, 物镜为 40 倍的条件下 Olympus 显微镜观察并照相。

3. 免疫组织化学染色: 对正常胰腺组织、胰岛细胞增生症患者、胰岛素瘤患者、胰尾高中分化腺癌患者的胰腺组织分别用 ABC 法进行免疫组织化学染色, 试剂盒购自华美生物工程公司。具体步骤为: 石蜡切片常规二甲苯、梯度酒精脱蜡至水; 0.3% 甲醇-H₂O₂ 封闭 20 min, 10% 正常山羊血清封闭 30 min 后吸去血清, 滴加一抗, 鼠抗 Ndr2 单克隆抗体 FMU-Ndr2.3 为本校免疫学教研室制备, 该抗体的特异性已经得到反复验证^[9,10](FMU-Ndr2.3 鼠抗 Ndr2 单克隆抗体 1:150 稀释, 鼠抗 Insulin 抗体博士德公司 1:150 稀释), 4℃ 冰箱孵育过夜; 滴加二抗(生物素标记羊抗鼠 IgG Chemicon 公司 1:400 稀释, 生

DOI:10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2013.02.017

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31171112)

作者单位: 710038 西安, 第四军医大学唐都医院内分泌科(贺菲菲、焦凯); 第四军医大学生物化学与分子生物学教研室(刘新平、沈岚)

通信作者: 沈岚, Email: lanshen@fmmu.edu.cn

物素标记羊抗鼠 IgG Chemicon 公司 1 : 200 稀释), 37°C 孵育 30 min, ABC 复合物 37°C 孵育 30 min; 新鲜配制的 DAB 显色液避光显色, 显微镜下控制显色程度, 中止显色, 苏木素衬染细胞核; 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 37°C 干燥 48 h, 在镜为 10 倍, 物镜为 40 倍的条件 Olymupus 显微镜观察并照相。

4. Western 印迹: 收集各组织标本, 加入适量裂解液, 玻璃匀浆器冰上充分研磨, 静置 30 min 后, 4°C 离心 12 000 转/min × 30 min, 取上清, BCA 法进行蛋白定量。先后配制 10% 分离胶和 6% 浓缩胶; 制备蛋白样品, 使用 Bio-Rad 电泳装置, 进行 SDS-PAGE 电泳 (浓缩胶 120 V, 分离胶 160 V, 电泳时间约 100 min), 湿转法将蛋白条带转移至 NC 膜上, 用 5% 脱脂奶粉 (1 × TBST 配制) 中室温封闭 1 h 后加入一抗 (鼠抗 Ndr2 单克隆抗体 Abnova 公司 1 : 500; 兔抗 Actin 多克隆抗体 Cell Singaling 公司 1 : 250), 4°C 孵育过夜。次日 TBST 洗膜 (10 min × 3) 后加入 1 × TBST 稀释的荧光二抗 (羊抗鼠 IRDyeTM800 ROCKLAND 公司 1 : 20 000), 室温孵育 1 h; 1 × TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; 近红外激光扫描系统扫描成像; 采用 Odyssey 软件对目的条带灰度定量分析; 分析每种小鼠细胞系的 Ndr2 灰度值与自身 α -tubulin 灰度值之比 (Ndr2/ α -tubulin), 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并以此绘图描述不同细胞系中 Ndr2 蛋白的表达情况。

5. 统计学处理: 实验所得计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间资料比较用方差分析。使用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析。

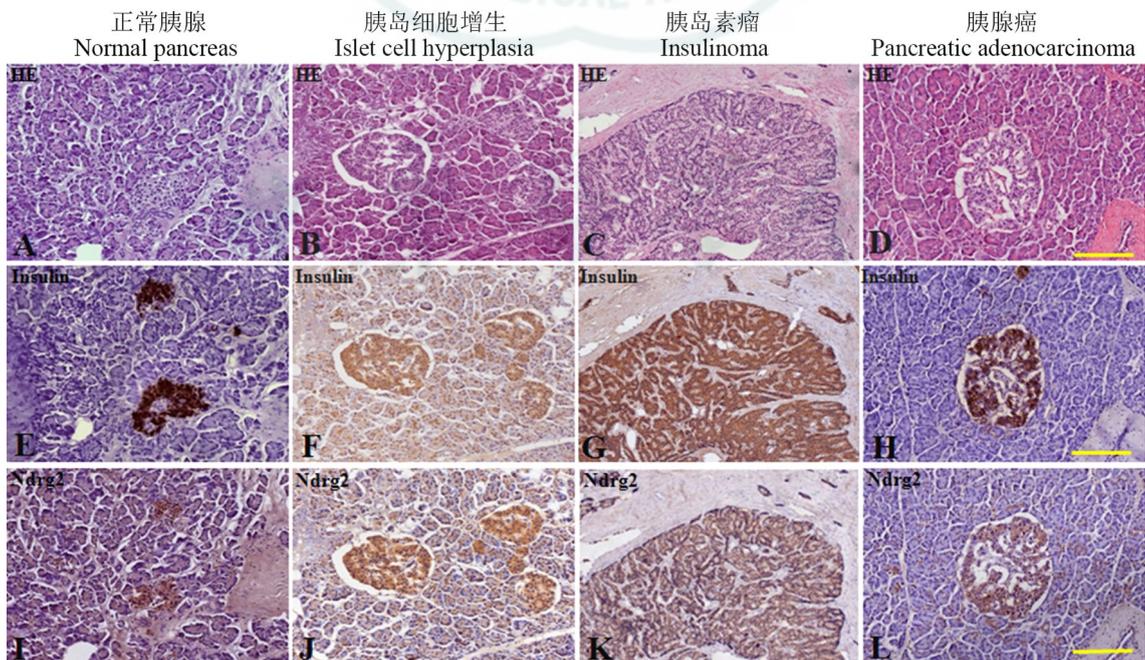
二、结果

1. 疾病胰腺组织和正常胰腺组织中 Ndr2 的分布: HE 染色的结果可以观察到: (1) 正常胰腺组织中, 胰腺的实质由外分

泌部和内分泌部组成, 胰内分泌部为散在的胰岛。(2) 胰岛细胞增生症患者的胰腺组织中, 胰岛的数目和大小均增加。(3) 胰岛素瘤患者的胰腺组织中不能分辨出胰腺的外分泌部和内分泌部 (胰岛), 瘤细胞呈多角形, 细胞界限模糊, 胞浆稀疏较透亮。细胞核圆形或椭圆形, 大小一致, 染色质均匀细致。瘤细胞成团排列, 与毛细血管关系密切。(4) 胰尾高分化腺癌患者胰腺组织中, 腺体分化良好, 胰岛组织保存良好 (图 1A-D)。

使用胰岛素抗体进行免疫组织化学染色的结果可以观察到: 与阴性对照相比正常胰腺组织的胰岛中反应产物呈强阳性, 且该阳性反应物位于内分泌细胞胞浆。胰岛细胞增生症患者的胰腺组织中阳性反应产物在增生的胰岛中较强, 但是外分泌部也存在散在的弱阳性, 可能与胰岛 β 细胞的弥漫性分布相关。胰岛素瘤患者的胰腺组织中较难辨认胰岛内分泌部, 胰腺组织均出现较强的胰岛素免疫阳性反应物。胰尾高分化腺癌患者的胰腺组织中胰岛结构完整, 免疫反应产物呈强阳性 (图 1E-H)。使用 Ndr2 抗体进行免疫组织化学染色的结果与胰岛素相类似, 但是阳性信号相对较弱 (图 1I-L)。因此, 在临床胰岛 β 细胞疾病的患者胰腺组织中, Ndr2 的定位和变化趋势与胰岛素具有相似性, 提示 Ndr2 可能与胰岛 β 细胞中胰岛素的生物学功能相关联。

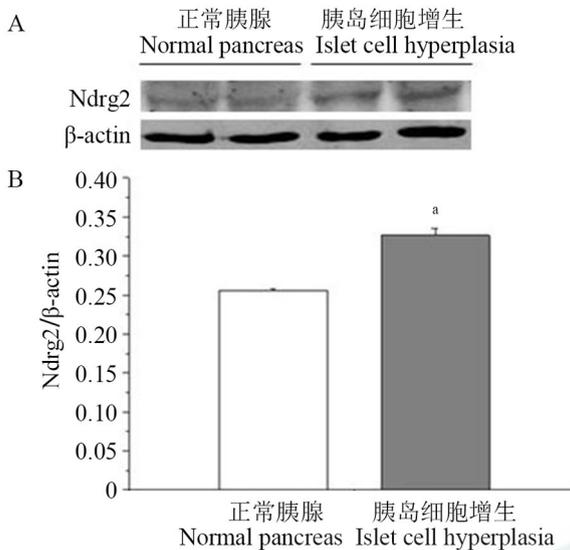
2. 胰岛细胞增生症患者胰腺组织中 Ndr2 的表达变化: 收集胰岛细胞增生症患者的胰腺组织和正常胰腺组织通过免疫印迹观察 Ndr2 表达情况。Western 印迹扫描后, 对目的条带进行灰度分析, 胰岛细胞增生症患者组与正常组分别分析 Ndr2/ β -actin 的灰度值之比。结果显示, 胰岛细胞增生症患者组胰腺中 Ndr2 蛋白的表达量, 是正常组的 (1.27 ± 0.04) 倍 (图 2A、B), 具有显著统计学差异 ($P < 0.05$)。



注: A-D: HE 染色 HE staining; E-H: 胰岛素抗体免疫组织化学染色 Immunohistochemical staining with insulin antibody; I-L: Ndr2 抗体免疫组织化学染色 Immunohistochemical staining with Ndr2 antibody

图 1 Ndr2 蛋白在正常胰腺组织和胰岛细胞增生、胰岛素瘤、胰腺癌的胰腺组织中的表达和分布

Fig 1 Expression and distribution of Ndr2 protein in normal pancreas and tissues from islet cell hyperplasia, insulinoma, and pancreatic adenocarcinoma



注:组间比较 Comparison between 2 groups, ^a $P < 0.05$

图2 Ndr2蛋白在正常胰腺组织与胰岛细胞增生胰腺组织中的表达差异

Fig 2 Difference in the expression of Ndr2 protein between tissues from normal pancreas and islet cell hyperplasia

三、讨论

在本研究中,采用免疫组织化学的方法,观察 Ndr2 在胰岛素瘤患者,胰岛细胞增生症患者,胰尾高分化腺癌患者胰腺组织中的表达和分布,研究结果显示:在胰岛细胞增生症患者的病变胰腺组织中,胰岛内分泌细胞出现弥漫性增生,胰岛素与 Ndr2 均出现在数量较多的胰岛中,在外分泌部表达较弱。胰岛素瘤患者胰腺组织中胰岛组织结构不能明显辨认,其中胰岛素与 Ndr2 均出现弥散性分布。由于胰尾高分化腺癌发生在外分泌部的导管,没有影响胰岛结构的完整性,胰岛素与 Ndr2 都特异性表达在疾病胰腺组织的胰岛中。在这些收集的临床标本中, Ndr2 与 Insulin 的表达与分布极为相似,但是 Ndr2 阳性免疫反应物相对较弱。

同时也通过免疫印迹的方法分析 Ndr2 在胰岛细胞增生症患者增生和正常胰腺中的表达差异。免疫印迹的结果显示:胰岛细胞增生症患者增生的胰腺组织中 Ndr2 表达明显增加。这种 Ndr2 表达的增加可能是由于胰腺组织中胰岛数量的增加和胰岛体积的增大,同时胰岛 β 细胞也出现增生,导致胰岛细胞增生症患者胰腺组织中 Ndr2 表达增加。上述的结果提示 Ndr2 可能在胰岛 β 细胞中发挥着重要的功能,该基因与胰岛素合成与分泌的关联性有待于进一步研究。

在 Ndr2 的后续研究中,使用本组实验室自己制备的抗

Ndr2 单克隆抗体 FMU-Ndr2.3 (该抗体的特异性已经反复验证)^[7,9]进行组织化学实验,观察 Ndr2 组织分布与表达的特点^[7]。在胰腺组织中该基因特异性表达在胰岛,在胰岛的四种主要内分泌细胞(α 细胞、β 细胞、δ 细胞、PP 细胞)中,该基因特异性在胰岛 β 细胞的细胞浆中高表达,而在其它内分泌细胞中表达很低^[8]。本组进一步在胰岛素瘤细胞系 βTC3 中过表达或者降低 Ndr2 基因,观察 βTC3 细胞中胰岛素的生物合成与分泌。初步实验结果表明, Ndr2 与胰岛素的合成和分泌之间存在负向相关性。当 Ndr2 过表达时,胰岛素的合成和分泌降低;当 Ndr2 表达降低时,胰岛素的合成和分泌增加。但是,特异性表达在胰岛 β 细胞的 Ndr2 对胰岛素生物合成和分泌的具体调节机制有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Deng YC, Yao LB, Liu XP, et al. Exploring a new gene containing ACP like domain in human brain and expression it in E. coli. Prog Biochem Biophys, 2001, 28:72-76.
- [2] Qu X, Zhai Y, Wei H, et al. Characterization and expression of three novel differentiation-related genes belong to the human NDRG gene family. Mol Cell Biochem, 2002, 229:35-44.
- [3] Kyuno J, Fukui A, Michiue T, et al. Identification and characterization of Xenopus NDRG1. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 309:52-57.
- [4] Zhang J, Li F, Liu X, et al. The repression of human differentiation-related gene NDRG2 expression by Myc via Miz-1-dependent interaction with the NDRG2 core promoter. J Biol Chem, 2006, 281:39159-39168.
- [5] Wang L, Liu N, Yao L, et al. NDRG2 is a new HIF-1 target gene necessary for hypoxia-induced apoptosis in A549 cells. Cell Physiol Biochem, 2008, 21:239-250.
- [6] Liu N, Wang L, Li X, et al. N-Myc downstream-regulated gene 2 is involved in p53-mediated apoptosis. Nucleic Acids Res, 2008, 36:5335-5349.
- [7] Hu XL, Liu XP, Deng YC, et al. Expression analysis of the NDRG2 gene in mouse embryonic and adult tissues. Cell Tissue Res, 2006, 325:67-76.
- [8] Shen L, Liu XW, Hou WG, et al. NDRG2 is highly expressed in pancreatic β cells and involved in protection against lipotoxicity. Cell Mol Life Sci, 2010, 67:1371-1381.
- [9] Liu X, Hu X, Zhang J, et al. Preparation and application of monoclonal antibody against hNDRG2. Appl Biochem Biotechnol, 2009, 152:306-315.

(收稿日期:2012-05-07)

(本文编辑:朱铨达)