

胰腺发育相关 *maf* 基因在胰腺导管和胰岛的表达 *

张贤玲 顾燕云 周文中 张宏利 李 果 **

(上海市内分泌代谢病研究所, 上海交通大学医学院瑞金医院内分泌代谢科, 上海市内分泌代谢病临床医学中心, 上海 200025)

摘要 为探讨胰岛功能和发育相关 *maf* 基因在胰腺导管上皮中的表达情况, 对新鲜小鼠胰腺组织切片进行显微切割, 分离纯化胰腺组织中的导管和胰岛, 以及外分泌腺组织细胞作为对照, 利用荧光实时定量 PCR 的方法完成对目的基因的相对定量. 结果显示, *mafa* mRNA, *mafb* mRNA 水平在胰岛及导管中非常接近, 无统计学差异. 而 *c-maf* 在导管的表达高于胰岛 ($P < 0.05$), 外分泌腺则无上述基因的表达. 胰腺导管中 *mafa*, *mafb*, *cmaf* 均有表达, 肯定了导管上皮细胞向内分泌细胞分化的潜能, 而 *c-maf* 在导管中的表达高于胰岛, 提示导管上皮 *c-maf* 的下调可能有助于导管上皮细胞向内分泌细胞的分化成熟.

关键词 激光显微切割, 胰腺导管上皮细胞, *maf* 家族基因, 实时定量 PCR

学科分类号 R587.1, R322.5+7

随着胰岛移植治疗糖尿病的逐步开展和深入, 供体的缺乏成为一个关键问题. Pictet 和 Rutter 等于 1972 年提出内分泌细胞由胰腺导管上皮细胞分化而来, 之后, 研究者发现, 在胰腺胚胎发育过程中, 内分泌细胞最先在导管上皮之间及周围单个出现, 然后数量增多, 逐渐聚集成团, 最终移位, 脱离导管上皮, 形成以 β 细胞为中心、周围被其他内分泌细胞包围的胰岛结构^[1]. 最近有研究用荧光蛋白标记 β 细胞得到它在整个胰腺中的三维图像, 发现胰岛靠近导管的分布特征^[2]. 另外也有很多利用不同方法成功诱导不同种属的导管上皮细胞分泌胰岛素的例子^[3~5]. 以上证据都表明, 导管上皮是体外诱导获得 β 细胞的祖细胞来源.

胰岛发育过程中的一些转录因子在导管的表达十分重要. 通过转录因子的表达差异可以找到发育信号通路的干预切入点. 迄今, 对 *pdx-1*, *nkx6.1* 等的研究日趋成熟^[6, 9], 但最新鉴定出来的调控胰岛素表达的转录因子 *mafa*, 及其家族成员 *mafb*, *c-maf*^[7], 它们在胰岛中负责胰岛素的表达和内分泌细胞的发育. Matsuoka 等^[8]证明, 外分泌腺泡中没有上述 *maf* 基因的表达, 但导管上皮中的表达情况还不清楚. 所以我们就此课题进行研究.

1 材料和方法

1.1 材料

C57BL 小鼠(种系购于中国科学院), 冰冻切片

机(Leica 公司), 激光显微切割系统(Leica 公司), Rneasy Mini kit(QIAGEN 公司), 逆转录酶(Invitrogen 公司), Sybr green 荧光定量试剂(Takara 公司), ABI 7300 real-time PCR system(ABI 公司).

1.2 胰腺组织获取和保存

戊巴比妥钠麻醉小鼠, 暴露内脏, 剪破心脏放血, 之后迅速将胰腺取出, 用 OCT(组织包埋剂, Leica 公司)包埋, 放入液氮快速冷冻固定, 液氮保存.

1.3 显微切割组织切片制备

用冰冻切片机切片, 厚度 8 μm , 过程中要尽量避免 RNA 的降解. 组织片贴于 Leica 显微切割专用载玻片上.

1.4 快速苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 显微切割

染色步骤: 75%乙醇固定 1 min, Depc 水洗 15 s, 苏木素 20 s, Depc 水洗 30 s, Depc 水洗 30 s, 75%乙醇固定 30 s, 伊红 5~8 s, 95%乙醇脱水 30 s, 无水乙醇脱水 30 s, 无水乙醇脱水 30 s.

染色完毕, 稍晾, 进行切割. 在最初实验时.

* 国家自然科学基金资助项目(30470817).

** 通讯联系人.

Tel: 021-64749885, E-mail: liguopb12002@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-08-23, 接受日期: 2007-09-27

为鉴别导管和血管结构,我们对2张连续切片分别进行HE和DAPI(diamidino-phenyl-indole,一种特异染核染剂)染色,对照鉴定导管细胞的结构特征.

显微切割技术原理:激光捕获显微切割系统由激光显微镜,激光发射器和一台用于观察和控制的计算机组成.显微镜下图像在计算机上显示,观察选定要切割的部位,通过专用软件启动激光束,将组织与周围分离,通过一束激光脉冲将组织打落入玻片正下方的200 μ l离心管盖中,离心管盖中盛有RNA抽提试剂.具体过程可参照文献[9, 10],为避免组织切片中的RNA降解,需尽快完成切割,本试验在30 min内结束切割^[11].

1.5 RNA抽提和逆转录

本实验中使用QIAGEN公司的Rneasy Mini kit进行RNA抽提,具体操作步骤见该试剂盒说明书.获得的RNA经电泳鉴定,质量合格.然后按照superscript III逆转录酶说明书进行RNA逆转录.

1.6 mafs基因表达检测

以逆转录得到的胰岛,导管,外分泌组织的cDNA为模板,扩增insulin, mafa, mafb, c-maf片段,扩增产物以1.2%琼脂糖凝胶电泳.

1.7 荧光定量PCR

选 β -actin为内参.引物序列: β -actin, 上游: TGTTACCAACTGGGACGACA, 下游: GGGGT-GTTGAAGGTCTCAAA, ins, 上游: TATAAAG-

CTGGTGGGCATCC, 下游: GGGACCACAAAG-ATGCTGTT, pdx-1, 上游: GGGACAAAGATGC-AGAAGGA, 下游: CCTGTTGGCAAAGAATGG-TT, mafa, 上游: TTCAGCAAGGAGGAGGTC-AT, 下游: CCGCCAACTTCTCGTATTTTC, mafb, 上游: AGACAGGCTTTGAGTCTAA, 下游: CG-TTAGTTTCCAATGTGTGG, c-maf, 上游: CAT-GCATTACGATGCTTGCT, 下游: TGGATGT-CATGCGCTAAGTC. 反应体系30 μ l. PCR程序: 预变性95 $^{\circ}$ C 10 s; 95 $^{\circ}$ C, 5 s, 60 $^{\circ}$ C, 31 s, 循环次数40. 溶解曲线程序: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C, 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s.

1.8 统计分析

应用spss13.0统计软件包进行数据处理,对实验数据采用配对 t 检验,检验水准为0.05.

2 结 果

2.1 导管与血管的鉴别

在组织形态方面,上皮细胞排列紧密,而血管内皮则较松散.连续切片分别以HE或DAPI染色后,观察到同样的结果.如图1所示,导管细胞在条索状轮廓里,胞核紧密排列管腔小而不规则(图1a, b),血管内皮细胞HE染色时管壁红染(图1c),DAPI染色见管壁细胞核排列松散,管腔大而规整(图1d).

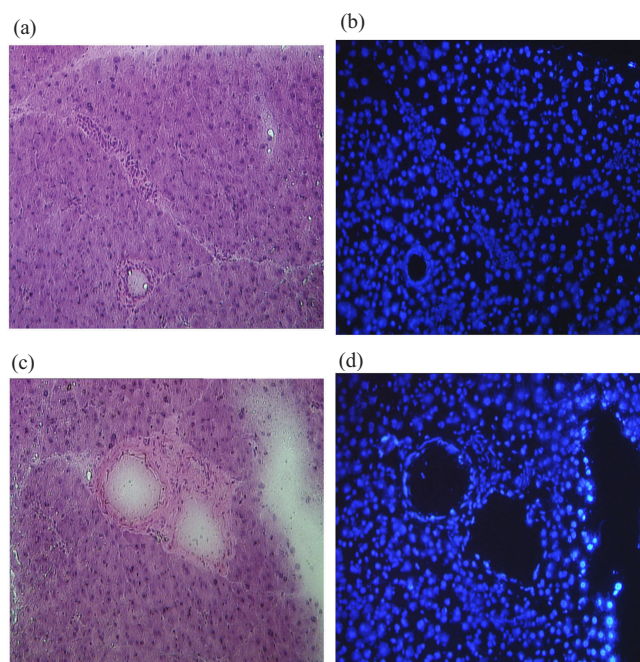


Fig. 1 The differences in structure of duct and blood vessel

The picture showed pancreatic continuum sections stained by HE (a,c) and DAPI (b,d) respectively. (a, c) showed duct structure and (c, d) showed blood vessel. Magnification: 20 $\times$.

2.2 导管与胰岛的伴行特征

在实验中我们还发现了导管上皮与胰岛伴行分

布的结构特征。这印证了先前的理论^[12]，也提供了导管上皮与胰岛发育密切相关的重要辅证(图 2)。

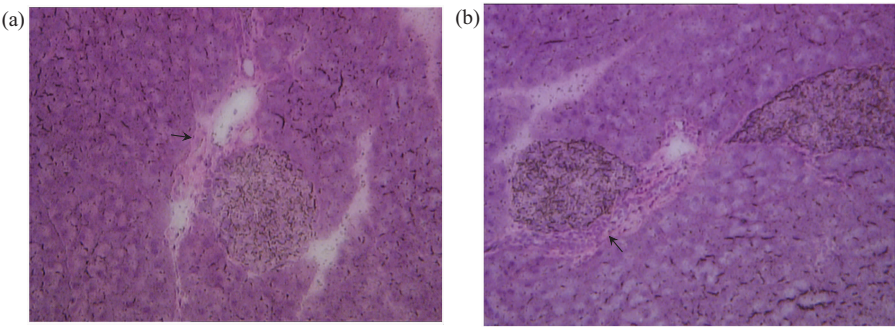


Fig. 2 Adjacent distributing characteristic of duct and islet
(a, b) showed islet and duct distribution fast stained by HE. The deep stained structure like island was islet, and adjacent strip structure was duct (indicated by arrow). Magnification: 20×.

2.3 组织的切割和收集

我们选取了结构典型的胰岛，导管进行显微切

割，并在没有任何这 2 种结构的部位切割组织得到外分泌腺组织，切割及标本的收集过程如图 3 所示。

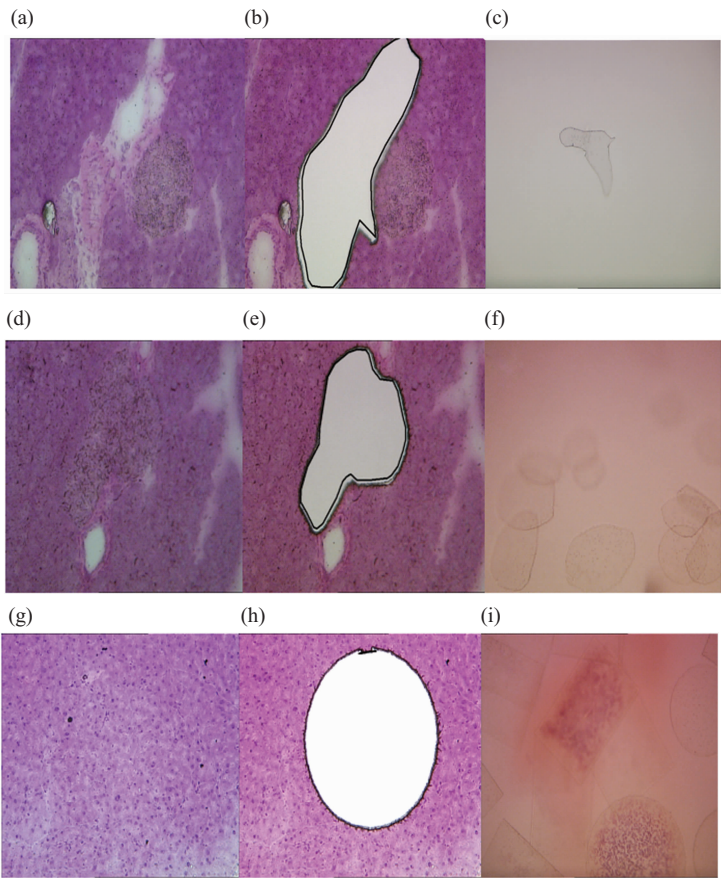


Fig. 3 The process of laser-capture microdissection and collecting the target tissues
The picture showed the process of acquiring islet, duct and exocrine through laser-capture microdissection. (a, b, c for duct, d, e, f for islet, g, h, i for exocrine). (a, d, g) displayed tissues before dissection, (b, e, h) showed after, and (c, f, i) for collectors with tissues and liquid in it. Magnification: 20×, for collector: 10×.

2.4 目的基因的扩增

目的基因在 3 种待测组织中的 PCR 扩增产物

经琼脂糖凝胶电泳后，我们发现，胰岛素只在切割的胰岛中表达，而 *mafa*，*mfab*，*c-maf* 在胰岛和导

管组织中都有表达, 在外分泌腺中却完全没有表达 (图 4).

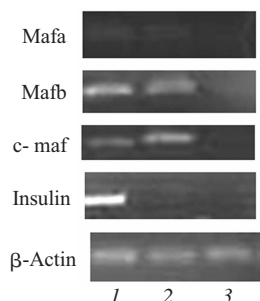


Fig. 4 The expression of target genes in three tissues

The three tissues are islet(1), duct (2) and exocrine(3). Amplified genes are β -actin, insulin, mafa, mafb and c-maf.

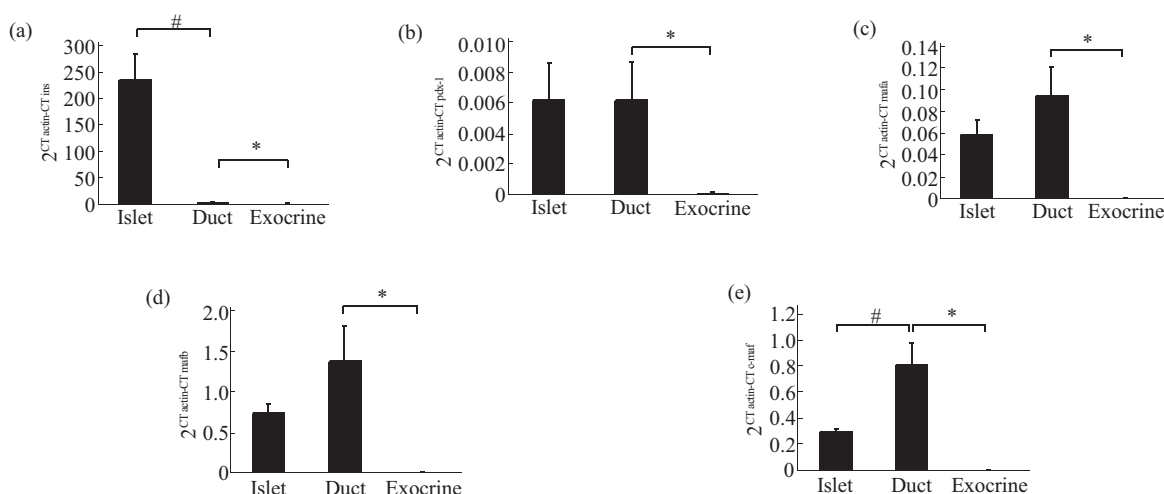


Fig. 5 Quantitative analysis of target genes in inferred tissues

The graph above denotes quantitative compare of insulin, pdx-1, mafa, mafb, c-maf in islet, duct and exocrine. y axis represents expression folds of target gene compared to β -actin, composed as $2^{CT_{actin}-CT_x}$. #Means statistic differentia between islet and duct. $P < 0.05$, * Means statistic differentia between duct and exocrine. $P < 0.05$. ($n=6$). (a) Insulin. (b) pdx-1. (c) mafa. (d) mafb. (e) c-maf.

3 讨 论

Maf 家族是碱性亮氨酸拉链(the basic leucine zipper, bZip)转录因子的一个亚群, 是 v-maf 癌蛋白类似物. 1989 年, v-maf 最先从鸡肌腱膜肉瘤逆转录病毒 AS42 的基因组中分离鉴定出来^[14]. 至今, 哺乳动物, 鸟类, 蛙, 鱼类及无脊椎动物果蝇属体内均已分离出 Maf 蛋白^[15]. Maf 家族按照结构和功能可划分为两个部分, 大 Maf 蛋白与小 Maf 蛋白. 大 Maf 蛋白包括 v-Maf / c-Maf, MafB / Kreisler, MafA / L-Maf / S-Maf1, S-Maf2 / Krm12, Nrl, DMaf / Traffic Jam, 它们均拥有高度保守的氨基端激活域和羧基端碱性亮氨酸拉链 DNA 结合域 (extended homology region, EHR), EHR 结合 DNA 上的 maf- 识别序列(Maf-recognition elements,

2.5 目的基因的相对定量

对目的基因的表达进行实时定量, 在校正内参后, 我们得到目的基因相对于 β -actin 表达的倍数. 见图 5, 胰岛(islet), 导管(duct), 外分泌腺(exocrine)之间胰岛素表达有显著的差异, ($P < 0.05$), pdx-1 只在胰岛和导管中表达, 这与之前的结论一致^[3, 13], 但两者之间的表达无统计学意义. Mafa, mafb, c-maf 在外分泌组织无表达, 而在导管中均有表达, 其中 c-maf 的表达高于胰岛, 具有统计学意义. Mafa, mafb 在胰岛和导管之间的表达无统计学差异.

MAREs)后促进靶基因的转录. 而小 Maf 蛋白 (MafK, MafF, MafG, MafT, Maf-S)因为缺少激活域而达到抑制转录的效果^[16, 17].

大 Maf 蛋白 Mafa, Mafb 以及 c-Maf 在胰岛中的分布大致明确. Mafa 在胰岛 β 细胞中特异表达, 它结合胰岛素基因启动子调控区域的 C1 元件, 与结合于 A1, E1 顺式元件的转录因子 pdx-1, neuroD/BETA2 共同调节胰岛素的转录^[16, 18, 19]. Mafb 在成体胰岛 α 细胞中表达, 与胰高血糖素的表达有关, 另外, 在发育中的 α , β 细胞中也有表达^[12]. C-maf 在胰岛中的表达相对较少, 免疫荧光检测表明 c-maf 只在极少量的 α , β 细胞中存在^[20].

实时定量结果显示, 导管中 mafa, mafb 的表达与胰岛中相似, 无统计学差异, 而 c-maf 的表达却明显在导管中更高. 最近 Artner 等^[12]用基因敲除

的小鼠模型证实了 *mafa*, *mafb*, *c-maf* 在胚胎发育过程中的表达及促进正常内分泌细胞表型分化的重要作用, 在发育过程中, *mafa* 可能位于 *nkx6.1* 下游. *Mafb* 在胰腺发育的内分泌祖细胞中表达, 负责 α , β 细胞的发育. 另外, *mafb*, *c-maf* 在哺乳动物的其他组织如脑, 肾, 眼睛中表达并调节其发育^[9]. 由此可见, *maf* 基因在组织发育和细胞分化过程中起到了重要作用, 而它们在导管中的表达, 则进一步加强了导管上皮细胞具有向内分泌细胞分化潜能的证据.

此外, 相对于胰岛, *c-maf* 在导管上皮中的高表达提示我们, *c-maf* 可能主要调控发育过程, 并在此过程中逐渐减少, 于成熟内分泌细胞中表达较少, 对功能的影响微弱. 由此, 我们推测干预下调导管的 *c-maf* 基因, 可能有助于内分泌前体细胞的分化. 当然, 关于 *maf* 转录因子的作用模式, 它们之间可能相互结合形成异二聚体^[21], 并且经过磷酸化激活才可以促进靶基因的转录^[8, 22], 所以, 胞内 *maf* mRNA 水平可能并不直接反映其靶基因的转录活性, 这其中的精细调节值得我们深入探究.

总之, 胰腺导管上皮细胞是重要的内分泌前体细胞来源, 而胰腺发育相关 *maf* 基因在导管上皮中相对较高的表达, 提示, 它们在胰岛胚胎发育及体外诱导分化过程中可能具有重要作用. *Maf* 基因在分化发育和调控胰岛素表达两方面的作用, 容许我们得以进一步研究发育通路中 *maf* 上下游基因, 以及 *maf* 调控胰岛素转录的更全面的机制, 同时也为我们未来导管上皮的深入研究提供了另外一条崭新的思路.

参 考 文 献

- Pictet R L, Clark W R, Williams R H, *et al.* An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev Biol*, 1972, **29** (4): 436~467
- Hara M, Dizon R F, Glick B S, *et al.* Imaging pancreatic β -cells in the intact pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, **290**(5): E1041~E1047
- Bonner-Weir S, Taneja M, Weir G C, *et al.* *In vitro* cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(14): 7999~8004
- Yatoh S, Dodge R, Akashi T, *et al.* Differentiation of affinity-purified human pancreatic duct cells to β -cells. *Diabetes*, 2007, **56** (7): 1802~1809
- Noguchi H, Kaneto H, Weir G C, *et al.* PDX-1 protein containing its own antennapedia-like protein transduction domain can transduce pancreatic duct and islet cells. *Diabetes*, 2003, **52**(7): 1732~1737
- Matsuoka T A, Artner I, Henderson E, *et al.* The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(9): 2930~2933
- Olbro M, Rud J, Moss L G, *et al.* Identification of β -cell specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(10): 6737~6742
- Matsuoka T A, Zhao L, Artner I, *et al.* Members of the large Maf transcription family regulate insulin gene transcription in islet β -cells. *Mol Cell Biol*, 2003, **23**(17): 6049~6062
- Fink L, Kinfe T, Seeger W, *et al.* Immunostaining for cell picking and real-time mRNA quantitation. *Am J Pathol*, 2000, **157** (5): 1459~1466
- Fink L, Kinfe T, Stein M M, *et al.* Immunostaining and laser-assisted cell picking for mRNA analysis. *Lab Invest*, 2000, **80**(3): 327~333
- Batorfi J, Ye B, Mok S C, *et al.* Protein profiling of complete mole and normal placenta using proteochip analysis on laser capture microdissected cells. *Gynecol Oncol*, 2003, **88**(3): 424~428
- Artner I, Le Lay J, Hang Y, *et al.* MafB: An activator of the glucagon gene expressed in developing islet α - and β -cells. *Diabetes*, 2006, **55**(2): 297~304
- Heimberg H, Bouwens L, Heremans Y, *et al.* Adult human pancreatic duct and islet cells exhibit similarities in expression and differences in phosphorylation and complex formation of the homeodomain protein Ipf-1. *Diabetes*, 2000, **49**(4): 571~579
- Nishizawa M, Kataoka K, Goto N, *et al.* v-maf, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86** (20): 7711~7715
- Coolen M, Sii-Felice K, Bronchain O, *et al.* Phylogenomic analysis and expression patterns of large Maf genes in *Xenopus tropicalis* provide new insights into the functional evolution of the gene family in osteichthyans. *Dev Genes Evol*, 2005, **215**(7): 327~339
- Kataoka K. Multiple mechanisms and functions of Maf transcription factors in the regulation of tissue-specific genes. *J Biochem*, 2007, **141**(6): 775~781
- Shimohata H, Yoh K, Morito N, *et al.* MafK overexpression in pancreatic β -cells caused impairment of glucose-stimulated insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **346**(3): 671~680
- Docherty H M, Hay C W, Ferguson L A, *et al.* Relative contribution of PDX-1, MafA and E47/ β 2 to the regulation of the human insulin promoter. *Biochem J*, 2005, **389**(3): 813~820
- Kataoka K, Han S I, Shioda S, *et al.* MafA is a glucose-regulated and pancreatic β -cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *J Biol Chem*, 2002, **277**(51): 49903~49910
- Kataoka K, Shioda S, Ando K, *et al.* Differentially expressed Maf family transcription factors, c-Maf and MafA, activate glucagon and insulin gene expression in pancreatic islet α - and β -cells. *J Mol Endocrinol*, 2004, **32**(1): 9~20
- Benkhelifa S, Provot S, Lecoq O, *et al.* MafA, a novel member of the maf proto-oncogene family, displays developmental regulation and mitogenic capacity in avian neuroretina cells. *Oncogene*, 1998, **17** (2): 247~254
- Raum J C, Gerrish K, Artner I, *et al.* FoxA2, Nkx2.2, and PDX-1

regulate islet β -cell-specific mafA expression through conserved sequences located between base pairs -8118 and -7750 upstream

from the transcription start site. *Mol Cell Biol*, 2006, **26** (15): 5735~5743

Expression of Pancreatic Development Related maf Genes in Pancreatic Duct and Islet*

ZHANG Xian-Ling, GU Yan-Yun, ZHOU Wen-Zhong, ZHANG Hong-Li, LI Guo**

(Shanghai Institute of Endocrine and Metabolic Diseases, Department of Pediatrics, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai Clinical Center for Endocrine and Metabolic Diseases, Shanghai 200025, China)

Abstract As a candidate for progenitor of endocrine cells, pancreatic duct epithelium displays more and more importance of differentiation potential to insulin-producing cells. Some cell markers such as pdx-1, nkx6.1 expressed in pancreatic islet development have also been found in duct. The maf family, which is a subgroup of the basic leucine zipper(bZip) transcription factors with homology to the v-Maf oncoprotein, the founding member of the Maf family, which was originally identified in the genome of the AS42 chicken musculoaponeurotic sarcoma retrovirus in 1989, has been involved in pancreatic research recently. Members of Maf family, mafa, mafb, c-maf, which have been reported to be regulators of tissue-specific gene expression and cell-differentiation in a wide variety of tissues, are all expressed in islet and regulate insulin expression as well as islet development. Whether these genes are expressed in duct remains unclear and demands further investigation. Islet, duct and exocrine tissues were acquired by laser-capture microdissection from mouse pancreatic section, followed by real-time PCR to quantitate the target genes expression. Mafa, mafb, c-maf were all detected in duct and islet but none was in exocrine tissue. In addition, c-maf mRNA level in duct was higher than islet (0.300 ± 0.018 vs 0.796 ± 0.173 , $P < 0.05$), however, there was no difference in mafa and mafb mRNA level between islet and duct. The expression of mafa, mafb, c-maf in pancreatic duct epithelium, gives more support to not only the roles of the three genes in endocrine development, but also the potential of converting duct epithelium to endocrine cells. Moreover, the higher expression of c-maf in duct than islet suggests that down-regulation of c-maf might help to differentiation and mature of endocrine cells.

Key words laser-capture microdissection, pancreatic duct epithelium cell, maf family genes, real-time PCR

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(30470817).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-64749885, E-mail: liguopbl2002@yahoo.com.cn

Received: August 23, 2007 Accepted: September 27, 2007