

- 11 Murr MM, Yang J, Fier A, Gallagher SF, Carter G, Gower WR Jr, Norman JG. Regulation of Kupffer cell TNF gene expression during experimental acute pancreatitis: the role of p38-MAPK, ERK1/2, SAPK/JNK, and NF-kappa B. *J Gastrointest Surg* 2003;7:20-25
- 12 Murr MM, Yang J, Fier A, Kaylor P, Mastorides S, Norman JG. Pancreatic elastase induces liver injury by activating cytokine production within Kupffer cells via nuclear factor-kappa B. *J Gastrointest Surg* 2002;6:474-480
- 13 Hori Y, Takeyama Y, Ueda T, Shinkai M, Takase K, Kuroda Y. Macrophage-derived transforming growth factor-beta1 induces hepatocellular injury via apoptosis in rat severe acute pancreatitis. *Surgery* 2000;127:641-649
- 14 Murr MM, Yang J, Fier A, Foulis PR, Loughorn TP Jr, Epling-Burnette PK, Norman JG. Pancreatitis-associated ascitic fluid induces hepatocyte death independent of local cytokines. *J Surg Res* 2002;106:308-313
- 15 Takeyama Y, Hori Y, Takase K, Ueda T, Yamamoto M, Kuroda Y. Apoptotic cell death of hepatocytes in rat experimental severe acute pancreatitis. *Surgery* 2000;127:55-64
- 16 Yang J, Fier A, Carter Y, Liu G, Epling-Burnette PK, Bai F, Loughran TP Jr, Mastorides S, Norman JG, Murr MM. Liver injury during acute pancreatitis: the role of pancreatitis-associated ascitic fluid (PAAF), p38-MAPK, and caspase-3 in inducing hepatocyte apoptosis. *J Gastrointest Surg* 2003;7:200-207
- 17 Ueda T, Takeyama Y, Takase K, Hori Y, Kuroda Y, Ho HS. Hematin is one of the cytotoxic factors in pancreatitis-associated ascitic fluid that causes hepatocellular injury. *Surgery* 2002;131:66-74
- 18 Ueda T, Takeyama Y, Hori Y, Takase K, Goshima M, Kuroda Y. Pancreatitis-associated ascitic fluid increases intracellular Ca²⁺ concentration on hepatocytes. *J Surg Res* 2000;93:171-176
- 19 雷若庆, 张圣道. 全身炎症反应在急性胰腺炎发病机理中的意义. *中华肝胆外科杂志* 2000;6:76-77
- 20 Miyahara S, Isaji S. Liver injury in acute pancreatitis and mitigation by continuous arterial infusion of an antibiotic via the superior mesenteric artery. *Pancreas* 2001;23:204-211
- 21 Gloor B, Todd KE, Lane JS, Lewis MP, Reber HA. Hepatic kupffer cell blockade reduces mortality of acute hemorrhagic pancreatitis in mice. *J Gastrointest Surg* 1998;2:430-435

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

大鼠胚胎胰腺外分泌功能基因的表达调控

仲燕, 袁栋, 袁庆新, 刘超, 柴伟栋, 管晓翔, 周锦勇, 胡静静, 滕丽萍, 德伟

仲燕, 袁栋, 管晓翔, 周锦勇, 胡静静, 滕丽萍, 德伟, 南京医科大学生物化学教研室 江苏省南京市 210029

袁庆新, 刘超, 柴伟栋, 南京医科大学第一附属医院内分泌科 江苏省南京市 210029

江苏省科委应用基础资助项目, No.BZ2001046

项目负责人: 德伟, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学生物化学教研室. dewei_98@yahoo.com

电话: 025-86862728 传真: 025-86862728

收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-06-24

摘要

目的: 探讨大鼠胚胎胰腺发育外分泌功能基因表达调控。

方法: 采用高密度寡核苷酸芯片(Affymetrix芯片)对E15.5和E18.5胚胎胰腺进行基因转录水平分析, 基于获得的基因表达信息对UCSC, TRANSFAC, NCBI等公共数据库进行检索。

结果: 在差异或特异表达的1319个基因中与胰腺细胞分化相关的转录因子和信号分子表达均下调, 但胰腺外分泌部特有的转录因子PTF1-P48, Mist1表达显著上调, 多种消化性酶表达亦显著增强, 然而与分泌功能相关的VAMP-2却无表达。

结论: 从E15.5至E18.5大鼠胚胎胰腺外分泌部积极地完善其消化功能, 但尚不能分泌多种消化性酶。

仲燕, 袁栋, 袁庆新, 刘超, 柴伟栋, 管晓翔, 周锦勇, 胡静静, 滕丽萍, 德伟. 大鼠胚胎胰腺外分泌功能基因的表达调控. *世界华人消化杂志* 2004;12(8): 1988-1990

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1988.asp>

0 引言

胰腺内外分泌部来源于共同的前体细胞-内胚层上皮细胞^[1], 近年来内分泌部发育进程研究及转录因子在其中的调控作用倍受关注, 2004年Melto *et al*^[2]以基因芯片技术建立了胰岛分化相关转录因子表达谱, 但外分泌部发育及其转录调控机制的研究进展却尚处于初期. 大鼠胚胎胰腺外分泌细胞标志物淀粉酶在E14.0开始表达, 在E15.5-E18.5腺泡结构渐清晰^[1], 但此时外分泌部是否具备消化功能尚未明确. PTF1-P48和Mist1是目前已发现的胰腺外分泌部特异表达的极少数转录因子之一, 二者均属于碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)家族, 其在生理状态下胚胎胰腺外分泌部发育中的作用尚未见报道. 基因芯片技术已得到广泛应用^[3-4], 但尚未见该项技术被应用于研究外分泌胰腺的发育问题. 2003年Davidson *et al*^[5]提出基因调控网络的观点, 故我们采用基因芯片技术来探讨大鼠胚胎胰腺外分泌部在E15.5-E18.5功能完善进程及Mist1, PTF1-P48在其中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 成年SD大鼠30只, ♀20只, ♂10只, 于18:00时, 将雌雄以1:2合笼, 次日检测有阴栓者, 定为受精0.5 d(E0.5). 取E15.5, 18.5母鼠, 引颈处死, 分离出胚胎, 显微解剖镜下用显微镊子取出胰腺后, 迅速在液氮中冷冻. 用Trizol[®] Reagent(美国

GibcoBrl 公司)提取大鼠 E15.5, E18.5 胰腺总 RNA, 利用美国 Qiagen 公司生产的 RNeasy Mini Kit 纯化总 RNA. 1.2 方法 以 15 μg 总 RNA 为模板合成双链 cDNA, 采用 BioArray™ High Yield™ RNA Transcript Labeling Kit 体外转录生成生物素标记的 cRNA; 再经纯化和片段化处理, 取 30 μg cRNA 与 GeneChip® Murine Genome RAE230A 芯片(Affymetrix 公司)杂交. 洗脱后, 用链酶亲和素-藻红蛋白进行染色扫描检测信号. 在微阵列分析软件(the Microarray Suite Software version 5.0)上进行数据分析. 对样品的表达结果采用线性度量(scaling)的方法在样品间进行校准.

2 结果

相对于 E15.5, E18.5 胰腺表达上调 2 倍以上的基因有 664 个, 其中特异表达的基因有 207 个, E18.5 胰腺表达下调 2 倍以上的基因有 655 个, 其中特异表达的基因有 182 个(图 1).

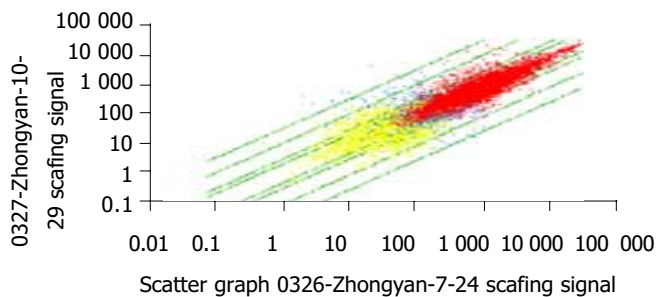


图 1 X轴: E15.5 胰腺 mRNA 表达水平, Y轴: E18.5 胰腺 mRNA 表达水平. 每一个点代表一个基因的表达水平: 红色的点表示该基因在 E15.5 和 E18.5 均有表达; 黄色的点表示该基因在 E15.5 和 E18.5 均无表达; 蓝色的点表示该基因在 E15.5 有表达, E18.5 无表达, 或者在 E18.5 有表达, E15.5 无表达. P: 有表达, A: 无表达, M: 临界值.

2.1 外分泌部特异基因表达 胰腺外分泌部所特有的多种消化性酶如淀粉酶, 弹性蛋白酶, 胰糜蛋白酶, 羧肽酶表达均显著上调, 1, 4, 5-三磷酸肌醇受体 3(IP3R3), 水通道 8(Aquaporin 8)及胆囊收缩素受体(CCKAR)亦表达上升(表 1). 胰腺外分泌部由腺泡和导管组成, 腺泡合成并分泌至少 22 种消化性酶, 其细胞内刺激分泌偶联机制为: 促分泌原如胆囊收缩素(CCK), 胃泌素等结合 G 蛋白偶联的受体(如 CCKAR), 激活磷脂酶 C, 产生第二信使 IP3, 在 IP3R3 介导下内质网释放 Ca^{2+} , 胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的升高引起酶原颗粒移动, 在 VAMP2^[7]介导下入坞(docking), 最终胞吐^[6,8]. 无活性的酶原通过导管进入肠道后被激活, 消化糖, 蛋白, 脂肪三大物质. 此外水通道 8 特异表达于腺泡细胞, 与胰液分泌紧密相关^[9]. 本结果表明从 E15.5 至 E18.5 大鼠胚胎胰腺外分泌部进入功能完善活跃时期.

2.2 PTF1-P48 及 Mist1 表达趋势 相对于 E15.5, PTF1-P48 在 E18.5 表达上升 5.28 倍, Mist1 表达上升 7.46 倍. PTF1-P48 和 Mist1 均为胰腺外分泌部特异表达的基因, PTF1-P48 启动多种消化性酶的表达, Mist1 对维

持腺泡的结构极其重要^[6,10], 本结果表明从 E15.5 至 E18.5 PTF1-P48 和 Mist1 在启动胰腺外分泌部进入功能完善活跃时期中起了重要作用.

2.3 转录因子及相关信号分子表达趋势 从 E15.5 至 E18.5 与细胞分化相关的转录因子和信号分子表达均下降(表 2), 此阶段胰腺细胞分化下调.

表 1 E15.5-E18.5 胰腺外分泌功能相关基因差异表达谱

探针号	GenBank号	相关功能	差异(18.5/15.5)
1369787_at	NM_012688	Cholecystokinin A receptor(Cckar)	14.93 \uparrow P/A
1387700_at			
1368005_at	NM_013138	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor 3(IP3R3)	1.52 \uparrow P/P
1368316_at	NM_019158	Aquaporin 8	45.25 \uparrow P/A
1371160_at	AJ133104	Vesicle-associated membrane protein 2(VAMP-2)	A/A
1387819_at	NM_012552	Elastase 1	4.59 \uparrow P/P
1387471_at	NM_012553	Elastase 2(Ela2)	22.63 \uparrow P/A
1369951_at	NM_012536	Chymotrypsin B(Cub1)	21.11 \uparrow P/P
1369030_at	NM_012635	Pancreatic trypsin I	4.29 \uparrow P/P
1370126_at	NM_012729	Pancreatic trypsin II(Prss2)	68.59 \uparrow P/A
1368532_at	NM_032081	Pancreatic lipase related protein 1	5.28 \uparrow P/P
1369701_at	NM_012597	Lipase(Lipe)	2.64 \uparrow P/P
1370084_at	NM_012533	Carboxypeptidase B(Cpb)	4.29 \uparrow P/A
1369657_at	NM_016998	Carboxypeptidase A1(Cpa1)	1.87 \uparrow P/P
1387503_at	NM_053526	Carboxypeptidase N(Cpn1)	2.64 \uparrow P/P
1369206_at	NM_05361	Carboxypeptidase B2(plasma)(Cpb2)	3.73 \uparrow P/A
1368196_at	NM_013139	Colipase pancreatic(Clps)	21.11 \uparrow P/P
1370831_at	AY081195	Monoglyceride lipase	3.48 \uparrow P/A
1369502_a_at	NM_031502	Amylase I	2.14 \uparrow P/P

\uparrow : 从 E15.5 到 E18.5 表达上升, \downarrow : 从 E15.5 到 E18.5 表达下降, P: 有表达, A: 无表达.

表 2 E15.5-E18.5 胰腺发育相关转录因子及相关信号分子差异表达谱

探针号	GeneBank号	名称及相关功能	差异倍数(18.5/15.5)	
bHLH	1387212_at	NM_012863	Muscle, intestine and stomach expression 1(mist1)	7.46 \uparrow P/p
	1369803_at	NM_053964	Pancreas specific transcription factor, 1a(Ptf1a) or Ptf1-P48	5.28 \uparrow P/p
ZF domain	1387894_at	L22761	GATA binding protein 4(Gata4)	2 \uparrow P/p
	1368510_at	NM_012764	GATA binding protein 1(Gata1)	3.48 \uparrow P/p
	1368827_at	NM_019185.1	GATA-binding protein 6(Gata6)	2.14 \uparrow P/p
HD	1369681_at	NM_017339	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain 1(Isl1)	2.64 \uparrow P/A
	1369516_at	NM_022852	Pancreatic and duodenal homeobox gene 1(Pdx 1)	1.74 \uparrow P/A
	1368873_at	NM_012581	Hoxa2	2.30 \uparrow P/p
	1388197_at	AA900970	Hoxa2	3.48 \uparrow P/A
	1370969_at	BE107303	Hoxa5	3.48 \uparrow P/P
Others	1371034_at	NM_022671	Hepatocyte nuclear factor 6	1.87 \uparrow P/p
	1368998_at	NM_031737	NK homeobox (Drosophila), family 6, A(NKX6.1)	2.14 \downarrow P/p

\uparrow : 从 E15.5 到 E18.5 表达上升, \downarrow : 从 E15.5 到 E18.5 表达下降, P: 有表达, A: 无表达.

3 讨论

转录因子及相关信号分子在启动基因表达, 调控细胞分化中的作用已得到共识. Gata家族有6个成员, Gata4, 5, 6在内胚层细胞分化中起关键作用^[11]. Gata6^{-/-}小鼠内胚层分化缺陷^[12]. ISL1胚胎早期表达于背胰间充质细胞, 为胰腺分化所必需^[18]. Pdx-1特异表达于胰腺胚芽, Pdx-1^{-/-}小鼠胰腺缺如^[17], Hnf6^{-/-}小鼠胚胎期表达Pdx-1的内胚层细胞显著减少, 胰腺发育不全^[13], Nkx6.1是胰腺β细胞分化的关键因子^[14], 在本实验中Gata6, ISL1, Hnf6, Pdx-1, Nkx6.1表达均显著下调. 由此可见, 在E15.5-E18.5与细胞分化相关的转录因子和信号分子表达显著下降, 胰腺细胞分化下调. 此外Hox家族与消化系统发育紧密相关, 过表达Hoxa4的小鼠发生巨结肠, Hoxa5胚胎期通过间充质-上皮间信号传导调控呼吸系统和消化系统发育^[15], Hoxa2, 4, 5在本实验中表达趋势一致, 三者胚胎胰腺发育尤其是功能完善中的作用是我们下一步要研究的问题.

本实验中转录因子PTF1-P48, Mist1在E15.5-E18.5表达上调, 各种消化性酶开始表达或表达上升, 受调分泌信号通路中关键因子CCKAR, IP3R3亦表达上升. PTF1-P48特异表达于胰腺腺泡, 与其他bHLH成员形成异三聚体启动多种消化性酶基因的表达^[6], PTF1-P48^{-/-}小鼠胰腺外分泌部缺如^[10]. Mist1则特异分布于浆液性和浆液黏液性腺体, 如胰腺腺泡细胞, 在建立和维持这些组织的分泌功能中起关键作用^[16], 小鼠E13d胰腺导管周围细胞核Mist1染色阳性, Mist1^{-/-}小鼠出生后胰腺腺泡进行性破坏, 结构紊乱, 细胞极性消失, 酶原提前激活及受调胞吐异常, IP3R3表达缺失, 类似于胰腺炎表现^[6]. 基于本实验中PTF1-P48, Mist1及多种消化性酶的表达趋势可以认为在E15.5-E18.5胰腺外分泌部处于功能完善活跃时期, PTF1-P48和Mist1在此过程中起了重要作用, 至于Mist1是否直接增强IP3R3的表达有待证明, 但值得注意的是受调胞吐中的必需因子-VAMP2并未表达, 可见此时外分泌部尚不具备分泌功能.

此外本实验中胰腺外分泌细胞分化标志物淀粉酶为E15.5, E18.5均有表达, 但多种消化性酶如胰蛋白酶II, 羧肽酶B(Cpb), B2, 弹性蛋白酶2(Ela2), 甘油一酯酶以及CCKAR, Aquaporin 8均为E18.5特异表达, 这些基因都是外分泌胰腺行使其功能所必需的关键因子, 由此可见从E15.5至E18.5外分泌胰腺进入分化后功能完善阶段. 至于胰腺内外分泌部在此期的发育是否同步及

二者发育是否需要相互间的协调作用则有待研究.

4 参考文献

- Slack JM. Developmental biology of the pancreas. *Development* 1995;121:1569-1580
- Gu G, Wells JM, Dombkowski D, Preffer F, Aronow B, Melton DA. Global expression analysis of gene regulatory pathways during endocrine pancreatic development. *Development* 2004; 131:165-179
- 陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞. 乙型肝炎病毒e抗原肝细胞结合蛋白新基因E-36基因表达谱芯片分析. *世界华人消化杂志* 2004;12:66-69
- 蒋业贵, 李兆申. 生物芯片技术及其在消化系统疾病研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:1609-1613
- Davidson EH, McClay DR, Hood L. Regulatory gene networks and the properties of the developmental process. *PNAS* 2003; 100:1475-1480
- Pin CL, Rukstalis JM, Johnson C, Konieczny SF. The bHLH transcription factor Mist1 is required to maintain exocrine pancreas cell organization and acinar cell identity. *J Cell Biol* 2001;155:519-530
- Gaisano HY, Sheu L, Grondin G, Ghai M, Bouquillon A, Lowe A, Beaudoin A, Trimble WS. The vesicle-associated membrane protein family of proteins in rat pancreatic and parotid acinar cells. *Gastroenterology* 1996;111:1661-1669
- Williams JA. Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystokinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells. *Annu Rev Physiol* 2001; 63:77-97
- Calamita G, Mazzone A, Bizzoca A, Cavalier A, Cassano G, Thomas D, Svelto M. Expression and immunolocalization of the aquaporin-8 water channel in rat gastrointestinal tract. *Eur J Cell Biol* 2001;80:711-719
- Krapp A, Knofler M, Ledermann B, Burki K, Berney C, Zoerkler N, Hagenbuchle O, Wellauer PK. The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev* 1998;12:3752-3763
- Stainier DY. A glimpse into the molecular entrails of endoderm formation. *Genes Dev* 2002;16:893-907
- Morrissey EE, Tang Z, Sigris K, Lu MM, Jiang F, Ip HS, Parmacek MS. GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev* 1998;12:3579-3590
- Jacquemin P, Lemaigre FP, Rousseau GG. The Onecut transcription factor HNF-6 (OC-1) is required for timely specification of the pancreas and acts upstream of Pdx-1 in the specification cascade. *Dev Biol* 2003;258:105-116
- Oster A, Jensen J, Serup P, Galante P, Madsen OD, Larsson LI. Rat endocrine pancreatic development in relation to two homeobox gene products (Pdx-1 and Nkx 6.1). *J Histochem Cytochem* 1998;46:707-716
- Aubin J, Déry U, Lemieux M, Chailier P, Jeannotte L. Stomach regional specification requires Hoxa5-driven mesenchymal-epithelial signaling. *Development* 2002;129:4075-4087
- Pin CL, Bonvissuto AC, Konieczny SF. Mist1 expression is a common link among serous exocrine cells exhibiting regulated exocytosis. *Anat Rec* 2000;259:157-167
- Sander M, German MS. The beta cell transcription factors and development of the pancreas. *J Mol Med* 1997;75:327-340
- Ahlgren U, Pfaff SL, Jessell TM, Edlund T, Edlund H. Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* 1997;385:257-260