

Wnt/ β -catenin 信号通路促进 小鼠胚胎干细胞向胰岛素分泌细胞分化

何巧娟^{1,2}, 张娜娜¹, 殷应传², 胡红琳¹

摘要 目的 探讨 Wnt/ β -catenin 信号通路在小鼠胚胎干细胞向胰岛素分泌细胞定向分化过程中的功能。方法 在小鼠胚胎干细胞向胰岛素分泌细胞分化过程中的三个不同阶段分别添加 Wnt/ β -catenin 信号通路的激动剂 CHIR99021; 利用 Western blot、qPCR 以及免疫荧光等方法, 检测胰岛细胞标志基因 Pdx1、Ngn3、Pax4 和 Insulin1 的表达情况; 基于 Tet-On 表达调控系统, 建立由小分子 Doxycycline 控制的 β -catenin 基因可诱导过表达胚胎干细胞系, 在胰岛细胞形成的不同阶段进行诱导表达, 观察其功能是否与 CHIR99021 类似; 最后, 利用慢病毒干扰系统, 在干细胞中下调 β -catenin 的表达水平, 观察其是否可以减弱 CHIR99021 在胰岛细胞形成过程中的功能。结果 小鼠胚胎干细胞在三个不同时间段经过三种不同配方的溶液处理能够有效地分化成胰岛细胞。在胰岛细胞定向分化的早期和晚期阶段, 添加 CHIR99021 和过表达 β -catenin 均可以提高胚胎干细胞向胰岛素分泌细胞的分化效率, 表现为 Pdx1 和 Insulin 1 的表达上调 ($P < 0.01$), 而干扰 β -catenin 基因的表达则减弱了 CHIR99021 的功能 ($P < 0.01$)。结论 在小鼠胚胎干细胞向胰岛素分泌细胞分化的特定阶段, 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路能够促进胰岛细胞的形成, 优化了目前胚胎干细胞向胰岛素分泌细胞分化的方案, 为未来利用干细胞治疗糖尿病提供了有用线索。

关键词 胚胎干细胞; 分化; 糖尿病; 胰岛素; β -catenin

中图分类号 Q 254; R 329.2.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)12-1841-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.002

糖尿病的患病率在我国逐渐升高, 胰岛细胞功能破坏所导致的内源性胰岛素分泌不足是发生糖尿病的重要原因, 但是外源性胰岛素由于需要多次注射且存在导致低血糖等风险而在临床使用时受到限制, 迫切要求寻找新的治疗途径^[1]。胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 可以无限地进行自我更

新, 保证了临床治疗时对细胞数量的要求^[2]。同时通过体外定向诱导分化, ESCs 还能够成功分化为胰岛素分泌细胞, 将其移植到患糖尿病小鼠体内, 能够降低血糖浓度, 为糖尿病的细胞替代治疗提供了新的方向^[3-5]。但是目前胰岛细胞分化还存在很多问题, 如效率低、功能低下等。胰岛细胞源于内胚层细胞, Wnt/ β -catenin 信号通路在内胚层的定向分化过程中发挥着重要功能^[6]。该研究将在小鼠 ESCs 向胰岛素分泌细胞分化时激活 Wnt/ β -catenin 信号, 检测调控此信号通路能否提高胰岛细胞的分化效率。研究结果将为未来利用干细胞治疗糖尿病提供理论基础和策略。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 E14 小鼠胚胎干细胞 (mouse ESCs, mESCs) 和 293T 细胞购自中国科学院细胞库; 细胞培养基和血清购买自以色列 Biological Industries 公司; Pfu Polymerase 和荧光定量 PCR (qPCR) 试剂盒购买自北京天根生化有限公司; GAPDH、 β -catenin、Pdx1 和 Insulin1 (Ins1) 等抗体购自美国 ProteinTech 和英国 Abcam 公司; BamH I、Xho I 限制性内切酶和 T4 连接酶购自日本 TAKARA 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购买自美国 Axygen 公司; 白血病抑制因子购自美国 Millipore 公司; 细胞因子 Activin A、bFGF 和 FGF10 等细胞因子均购自美国 Peprotech 公司; ITS、B27、Lipofectamine 3000 脂质体和 Puromycin 等购买自美国 Invitrogen 公司; KAAD、Tetrabenazine 和尼克酰胺等胰岛细胞分化所用的试剂购自美国 Sigma 公司; 核酸分析仪 Nanodrop、普通和定量 PCR 仪、生物安全柜和细胞培养箱等均购自美国 Thermo Scientific 公司; 蛋白与核酸电泳设备购自北京六一生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 mESCs 的培养与传代 培养皿用 0.1% 的明胶进行包被, 加入 mESCs 及血清培养基。培养基的组成为: DMEM、10% 胎牛血清; 1 × 非必需氨基

2019-07-19 接收

基金项目: 中华医学会临床医学科专项基金 (编号: 13040420427)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院内分泌科, 合肥 230022

²合肥市第三人民医院内分泌科, 合肥 230022

作者简介: 何巧娟, 女, 硕士研究生;

胡红琳, 女, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hhl1994@sina.com

酸、0.1 mmol/L β -巯基乙醇以及1 000 U/ml LIF。当细胞生长密度达70%~80%时,用胰酶消化成单个细胞进行传代培养。

1.2.2 mESCs 向胰岛细胞分化 该实验主要基于前期研究人员发明的三步法^[3]诱导 mESCs 向胰岛细胞分化。5 000 个 mESCs 接种在 96 个孔细胞培养板中,依次经过 3 个不同配方的溶液进行处理,17 d 后收集细胞进行分析。溶液 1 的配方:DMEM, 4 500 mg/L 葡萄糖,1 \times 非必需氨基酸,2 mmol/L L-谷氨酰胺,1 mmol/L 丙酮酸,100 μ mol/L β -巯基乙醇,ITS,0.25% Albmax,10 ng/ml Activin A 和 5 ng/ml bFGF。溶液 2 的配方:RPMI 1640,2 000 mg/L 葡萄糖,1 μ mol/L retinoic acid,50 ng/ml FGF10,2% B27 和 0.25 μ mol/L Shh 信号激动剂 KAAD。溶液 3 的配方:DMEM,1 000 mg/L 葡萄糖,1 L-谷氨酰胺, β -巯基乙醇,ITS,0.25% Albmax,10 nmol/L GLP-1, Tetrabenazine 和 10 mmol/L 尼克酰胺。

1.2.3 β -catenin 基因重组质粒的构建、转染和筛选 针对克隆小鼠 β -catenin 基因编码区设计上下游引物,引物序列为 Forward:5'-ATGGCTACTCAAGCTGACCTGATGG-3'; Reverse:5'-TTACAGGTCAG-TATCAAACCAGGCC-3'。在上下游引物两端分别添加 BamH I 和 Xho I 的限制性内切酶位点,并连入 PiggyBac (PB)-TET On 系统。利用脂质体转染进 mESCs 2 d 后加入终浓度为 2 μ g/ml 的 Puromycin 筛选阳性克隆。

1.2.4 RNA 干扰慢病毒系统的构建与感染 针对小鼠 β -catenin 基因的 mRNA 序列,利用 BLOCK-It RNAi Designer 设计 2 个 21 bp 的小发卡 RNA (short hairpin RNA, shRNA),分别命名为:shRNA#1 (sh#1) 和 shRNA#2 (sh#2),连入 pLKO.1 慢病毒载体,干扰序列分别为 sh # 1: 5'-GGACCTACACTTA TGAGAAGC-3' 和 sh # 2: 5'-GCACCATGCAGAATA-CAAATG-3'。pLKO.1 载体、辅助质粒 psPAX2 和 VSVG 按 4:2:1 的质量比混合,利用脂质体将其转染到 293T 细胞中,2 d 后收集慢病毒感染 mESCs。48 h 后,加入终浓度为 2 μ g/ml 的 Puromycin 进行筛选。

1.2.5 荧光实时定量 PCR (qPCR) 用北京天根生化有限公司的 RNA 提取试剂盒抽提细胞总 RNA,利用 FastKing 预混试剂进行第一链 cDNA 的合成,接着按照 Talent 荧光定量检测试剂盒的说明进行 qPCR。所用的基因序列如下。 β -actin-Forward:5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'; β -actin-Reverse:5'-

GGGGTGTGAAGGTCTCAAA-3'; Pdx1-Forward: 5'-CCAAAACCGTGCATGAAGTG-3'; Pdx1-Reverse: 5'-CTCTCGTGCCTCAAGAATTTTC-3'; Ngn3-Forward: 5'-CTGCGCATAGCGGACCACAGCTTC-3'; Ngn3-Reverse: 5'-CTTCACAAGAAGTCTGAGAACACCAG-3'; Pax4-Forward: 5'-CCACCTCTCTGCCTGAAGAC-3'; Pax4-Reverse: 5'-CCCACAGCATAGCTGACAGA-3'; Ins1-Forward: 5'-CAGCCCTTAGTGACCAGCTA-3'; Ins1-Reverse:5'-ATGCTGGTGCAGCACTGATC-3'。

1.2.6 Western blot 检测 收集各组细胞,利用添加了蛋白酶抑制剂 PMSF 的 RIPA 裂解液裂解细胞,BCA 法测定总蛋白浓度。用 8% 的 SDS-PAGE 胶分离各蛋白组分,并利用湿转系统将蛋白转移至 PVDF 膜上,经过封闭、一抗孵育、TBST 洗脱、HRP 标记的二抗孵育、TBST 再洗脱等步骤后,使用 ECL 发光液进行发光。使用 Image J 进行灰度值分析比较,实验重复 3 次。

1.2.7 免疫荧光 吸去培养液,加入 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, PBS 洗两次,加入含有 5% BSA 的 PBS 封闭液在 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 1 h,0.2% Triton X-100 溶液进行细胞膜打孔,加入含有一抗的稀释液 (1:100) 覆盖细胞,4 $^{\circ}$ C 过夜,次日用 PBS 漂洗 3 次,加入含有绿色荧光基团 488 的二抗以及 Hoechst 染料的稀释液 (稀释比例均为 1:5 000),37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h,用 PBS 漂洗后在荧光显微镜下进行观察拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胚胎干细胞向胰岛素分泌细胞定向分化 mESCs 向胰岛细胞分化主要分为 3 个阶段,见图 1A。第一阶段为 1~7 d,主要通过添加“溶液 1”进行诱导;第二阶段为 7~11 d,细胞培养液换成“溶液 2”;最后阶段为 11~17 d,细胞培养在“溶液 3”中。每 2 d 换 1 次液。17 d 后收集细胞检测胰岛素分泌细胞形成的情况。qPCR 结果显示:随分化时间的增加,胰岛前体细胞标志基因 Pdx1 (pancreatic and duodenal homeobox factor 1),Ngn3 (neurogenin 3) 和 Pax4 (paired-homeobox 4) 的表达逐渐增加。见图 1B。至 17 d 时 Ngn3 和 Pax4 的表达有所降低,但是胰岛素基因 Ins1 的表达达到最高值 ($62.110 \pm$

12.457, $F = 298.4$, $P < 0.01$) ,差异有统计学意义,说明有大量的胰岛素分泌细胞生成。见图 1B。本研究分别使用了免疫荧光和 Western blot 进行了检测,Pdx1 与 Ins1 的蛋白在第 17 天时高水平表达,与 qPCR 检测结果一致,见图 1C 和 1D。表明 mESCs 被成功地诱导分化成了胰岛素分泌细胞。

2.2 CHIR99021 促进胰岛素分泌细胞的分化形成

为了检测 Wnt/ β -catenin 信号通路在胰岛细胞形成过程中的功能,本研究在 mESCs 向胰岛细胞分化的三个不同阶段分别添加 $3 \mu\text{mol/L}$ CHIR,然后检测胰岛素分泌细胞的形成情况。见图 2A。结果显示在分化的第一阶段,即第 1~7 天,CHIR 刺激后,

第 7 天时,胰岛 β 细胞的标志基因 Pdx1 和胰岛素 Ins1 表达均上调($F = 3.745, 3.987$, $P < 0.05$) ,差异有统计学意义。同样在第三阶段,即第 11~17 天,CHIR 刺激后,第 17 天时,胰岛 β 细胞的标志基因 Pdx1 和胰岛素 Ins1 表达均上调($F = 9.770$, $P < 0.01$; $F = 5.819$, $P < 0.05$) ,差异有统计学意义。且相比于第一阶段,第三阶段第 17 天收集的细胞经 CHIR 处理后产生更多的 Ins1,qPCR 检测的结果分别为(82.121 ± 15.422) 和 (99.218 ± 19.803) ,见图 2B、2D。而在第二阶段添加 CHIR 并不影响 Pdx1 和 Ins1 的表达,差异无统计学意义,见图 2C。以上结果表明,在 mESCs 向胰岛细胞分化的早期和晚期,

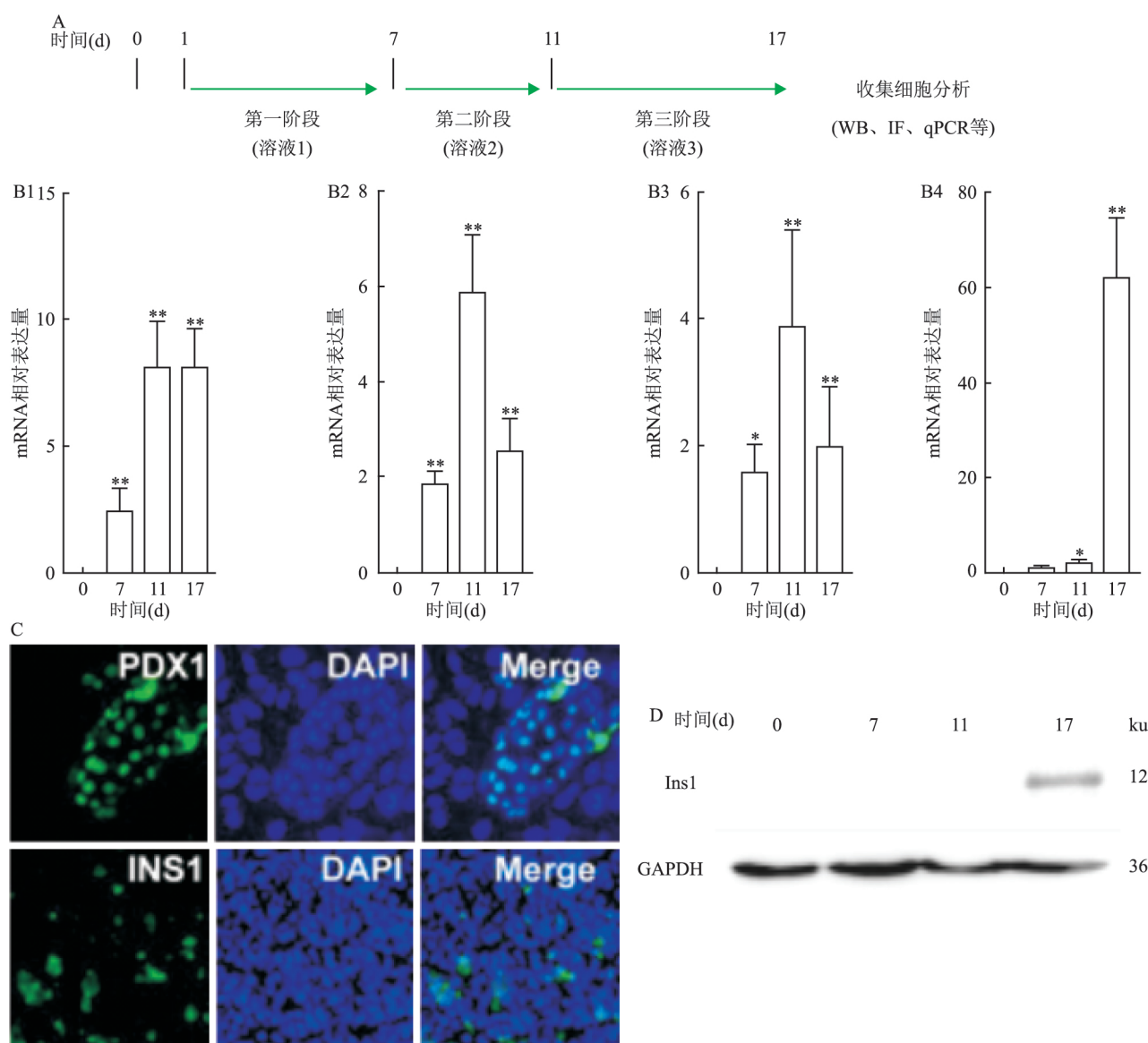


图 1 mESCs 分化为胰岛细胞

A: 分化方案; B: qPCR 检测 Pdx1、Ngn3、Pax4 和 Ins1 的表达; 1: Pdx1; 2: Ngn3; 3: Pax4; 4: Ins1; 与 0 d 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; C: 免疫荧光检测 Pdx1 和 Ins1 表达 $\times 100$; D: Western blot 检测 Ins1 和 GAPDH 的表达; GAPDH 为内参蛋白

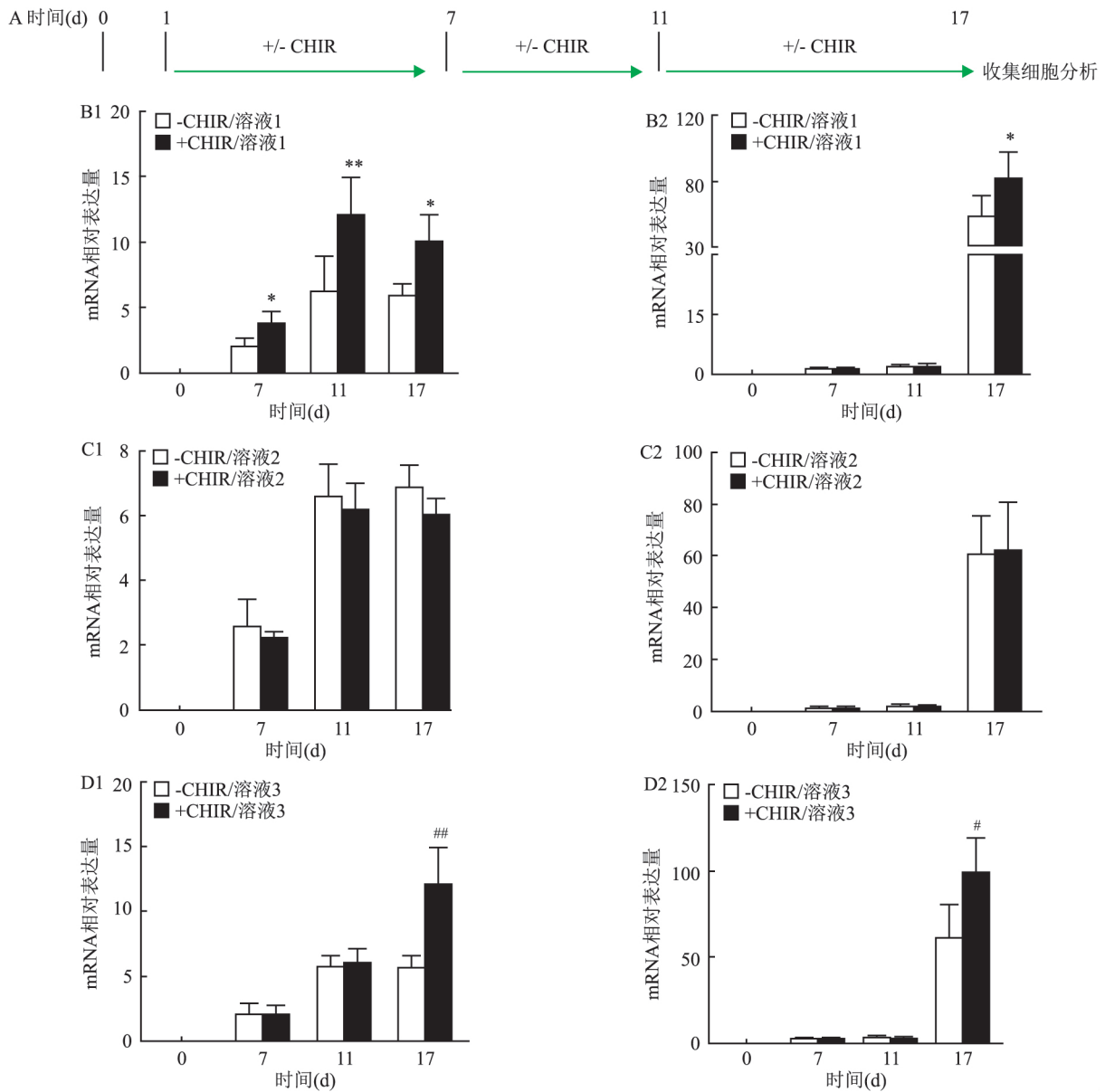


图2 CHIR 在胰岛细胞定向分化中的作用

A:实验方案;B:溶液1中有无CHIR时qPCR检测Pdx1和Ins1的表达;C:溶液2中有无CHIR时qPCR检测Pdx1和Ins1的表达;D:溶液3中有无CHIR时qPCR检测Pdx1和Ins1的表达;1:Pdx1;2:Ins1;与-CHIR/溶液1组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与-CHIR/溶液3组比较:## $P < 0.05$,# $P < 0.01$

添加 CHIR 能够增加胰岛细胞的定向分化效率。

2.3 诱导 β -catenin 基因表达能够促进胰岛细胞的诱导分化 为了明确 Wnt/ β -catenin 信号通路在 mESCs 向胰岛细胞分化过程中发挥功能,本研究首先使用 Tet-on 质粒构建了一个 β -catenin 可诱导表达系统,并导入 mESCs 里。Western blot 结果以及蛋白条带灰度分析结果表明,添加终浓度为 2 $\mu\text{g/ml}$ 的盐酸强力霉素(Doxycycline, Dox)可以有效地诱导 β -catenin 基因的表达($F = 279.9, P < 0.01$)。见图 3A、3B。接着根据 CHIR 的实验结果,在 mESCs 向

胰岛素分泌细胞分化的第一和第三阶段分别添加 Dox 然后检测胰岛细胞的形成情况。qPCR 结果显示:在第一阶段,与未处理组相比,Dox 处理的细胞在第 17 天时表达更多的 Pdx1 和 Ins1 ($F = 11.2、92.49, P < 0.01$),差异具有统计学意义,见图 3C;同样,在第三阶段,第 17 天收集的细胞中,Dox 诱导更高的 Pdx1 和 Ins1 表达($F = 39.84、147.4, P < 0.01$),差异有统计学意义,见图 3D。且溶液 3 和 Dox 诱导细胞产生的 Ins1 高于溶液 1 和 Dox 的功能,分别为 (99.113 ± 18.191) 和 $(117.452 \pm$

21.233) ,见图 3C、3D。以上研究结果说明在胰岛细胞定向分化的早期和晚期阶段 ,激活 Wnt/ β -catenin 信号可以促进 mESCs 向胰岛细胞的定向分化。

2.4 干扰 β -catenin 基因表达削弱 CHIR 在胰岛细胞定向分化中的功能 为了反向验证 β -catenin 是否可以介导 CHIR 的作用 ,本研究设计了两条针对 β -catenin 基因的靶向干扰序列 ,包装慢病毒并感染 mESCs 药杀筛选后 ,在转录水平用 qPCR 检测 ,结果显示 : 相比较于 Scramble 对照组 (1.000 ± 0.333) ,在 β -catenin shRNA 两株细胞内 , β -catenin 的相对表达分别为 (0.201 ± 0.111) 和 (0.186 ± 0.103) ,差异有统计学意义 ($P < 0.01$) 。见图 4A。同样 ,Western blot 结果显示 : 相比较于对照组 Scramble 病毒感染的细胞 , β -catenin shRNA 病毒感染的细胞中 β -catenin 的蛋白水平被有效地下调。见图 4B。Scramble 和 β -catenin shRNA 细胞培养在含 CHIR 的培养条件下 ,17 d 后 ,收集细胞进行检测。qPCR 结果显示 ,在胰岛细胞分化的第一阶段 ,与 Scramble 对照组相比 ,干扰 β -catenin 基因表达能

够减弱 CHIR 的功能 ,所以胰岛细胞形成的效率低于 Scramble 病毒感染的细胞 ,差异有统计学意义 ($F = 13.92, 31.50 P < 0.01$) 。见图 4C。同样 ,在第三阶段干扰 β -catenin 表达后 ,第 17 天收集细胞进行检测 ,也显示干扰 β -catenin 表达也会减弱 CHIR 的功能 ($F = 9.036, 11.27 P < 0.01$) ,差异有统计学意义。说明 CHIR 主要通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路从而诱导 mESCs 向胰岛素分泌细胞 ,而干扰 β -catenin 基因则会抑制 CHIR 的作用。

3 讨论

糖尿病一直没有特效的治疗方法 ,寻找替代材料和疗法现已成为临床上亟待解决的重大问题之一。本项目研究建立并优化了目前胚胎干细胞向胰岛素分泌细胞的分化方法 ,表明在胚胎干细胞向胰岛细胞分化的早期和晚期 ,用小分子 CHIR 处理可以有效地诱导胰岛细胞的生成效率。因为 GSK-3 抑制很多蛋白的活性 ,从而调控多个信号通路^[7] ,所以接下来通过调控 β -catenin 基因的表达来确定

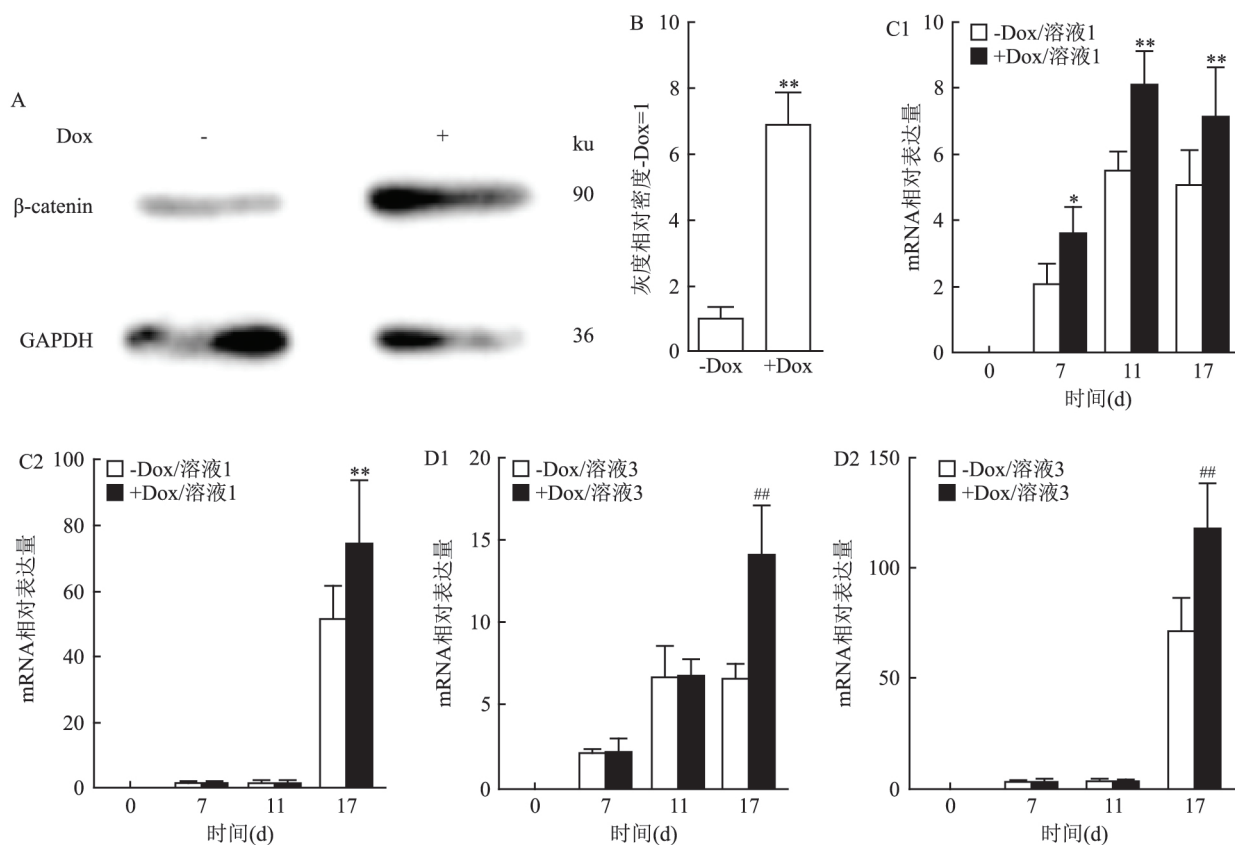


图3 β -catenin 对胰岛细胞分化形成的影响

A: 有无 Dox 条件下 ,Western blot 检测 β -catenin 和 GAPDH 的表达;B: 根据 A 的结果进行条带灰度分析;C: 溶液 1 中有无 Dox 时 ,qPCR 检测 Pdx1 和 Ins1 的表达;D: 溶液 3 中有无 Dox 时 ,qPCR 检测 Pdx1 和 Ins1 的表达;1: Pdx1; 2: Ins1; 与 -Dox/溶液 1 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 -Dox/溶液 3 组比较: ## $P < 0.01$

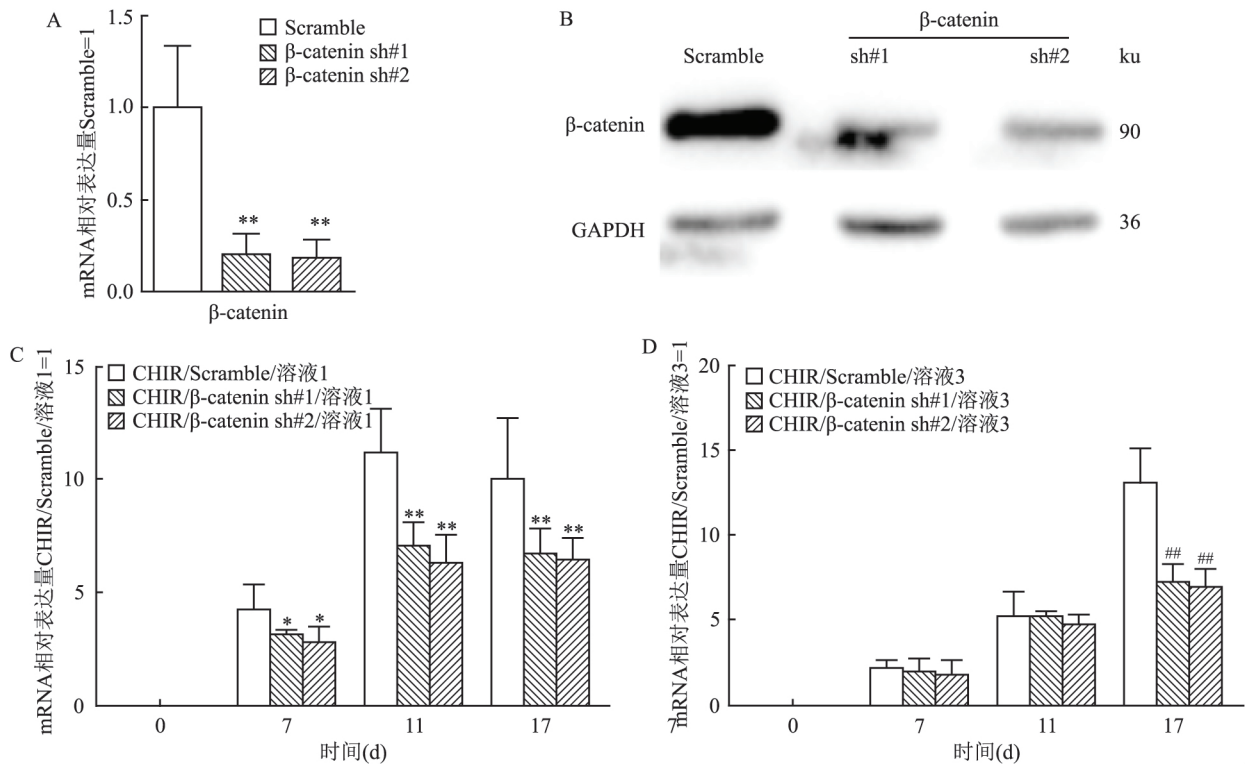


图4 β-catenin 介导 CHIR 诱导 mESCs 向胰岛细胞分化的作用

A: qPCR 检测 β-catenin 的表达; B: Western blot 检测 β-catenin 和 GAPDH 的表达; C: 溶液 1 中添加 CHIR 后, 在有干扰 β-catenin 基因表达时, qPCR 检测 Pdx1 的表达; D: 溶液 3 中添加 CHIR 后, 在有干扰 β-catenin 基因表达时, qPCR 检测 Pdx1 的表达; 与 CHIR/Scramble/溶液 1 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 CHIR/Scramble/溶液 3 组比较: ## $P < 0.01$

CHIR 确实通过 Wnt/β-catenin 信号发挥功能。结果表明过表达 β-catenin 能够模拟 CHIR 的作用, 从而促进小鼠胚胎干细胞向胰岛细胞分化, 而下调 β-catenin 基因的表达则会削弱 CHIR 的功能。因此, 激活 Wnt/β-catenin 信号通路对于高质量胰岛素分泌细胞的高效产生具有促进作用。

目前将胚胎干细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞有多种手段, 如: ① 通过过表达胰腺组织特异性的转录因子 Pdx1、Ngn3、Pax4、Nkx2.2 和 Nkx6.1 等^[8]; ② 通过组合不同生长因子进行诱导, 如 Activin A、Tgf-β、VEGF 和 bFGF 等^[9]; ③ 通过将胚胎干细胞形成拟胚体进行自发分化^[10]。但是这些方法胰岛素分泌细胞分化的效率比较低, 远不能满足糖尿病移植需要, 而且降血糖的效果也不是十分理想。Wnt/β-catenin 信号通路在胚胎早期发育过程中, 对于中内胚层形成极其重要, 同样在胚层干细胞中, 激活此信号通路也能够诱导干细胞向中内胚层细胞的分化^[6]。虽然前期也有报道: 激活此信号通路能够促进胚胎干细胞向胰岛样细胞分化, 但是得到的是胰岛前体细胞^[11]。Sakano et al^[3] 通过使用 100 个小分子化合物处理胰岛前体细胞, 发现 ve-

sicular monoamine transporter 2 (VMAT2) 的抑制剂 Reserpine 和 Tetrabenazine 可以增加胰岛细胞分泌胰岛素, 从而发明了一种胚胎干细胞分化成熟胰岛 β 细胞的方法, 培养出的胰岛 β 细胞媲美正常实验小鼠内的胰腺细胞^[3]。但是在这个方案中他们未尝试调控 Wnt/β-catenin 信号通路。基于此方法, 本研究在胚胎干细胞向胰岛细胞分化的早期和晚期激活此信号能够促进胰岛细胞的产生, 见图 2、3, 不仅体现在分化效率上, 并且也能够诱导更加成熟的胰岛细胞形成, 因为本研究优化的方案得到的胰岛细胞能够分泌更多的胰岛素。小分子 CHIR 是 GSK3 的选择性抑制剂, 能够有效地激活 Wnt/β-catenin 信号通路, 现已被广泛用于干细胞的培养和扩增^[12], 所以它的运用可以避免使用动物源性来源的 Wnt 蛋白, 有利于未来的临床应用。

间充质干细胞具有免疫原性低和多能性等优点, 尽管目前已有报道被应用于临床上治疗糖尿病, 有能够有效地降低血糖、修复胰岛细胞、缓解晚期患者的糖尿病足等^[13]。但是间充质干细胞的治疗效果因人而异, 而且其直接进入人体存在很多不确定性, 如分化的效率、分化形成的细胞类型、在体内存

活的时间、归巢的位置以及发挥的其他功能等,增加了其应用的潜在风险性^[14]。而应用胚胎干细胞分化而来的胰岛素分泌细胞能够有效地解决以上问题。加之当前诱导多能性干细胞的出现,患者可以定制自己的“胚胎干细胞”,因为诱导性多能干细胞的生物学特性与胚胎干细胞类似^[15],未来可以分离患者自身的成体细胞进行重编程而获得,进而分化为胰岛细胞,为实现糖尿病的个性化治疗提供新的策略。

参考文献

- [1] Animaw W, Seyoum Y. Increasing prevalence of diabetes mellitus in a developing country and its related factors [J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187670.
- [2] Huang G, Ye S, Zhou X, et al. Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: from signaling pathways to pluripotency network [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(9): 1741–57.
- [3] Sakano D, Shiraki N, Kikawa K, et al. VMAT2 identified as a regulator of late-stage beta-cell differentiation [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(2): 141–8.
- [4] Yabe S G, Fukuda S, Takeda F, et al. Efficient generation of functional pancreatic beta-cells from human induced pluripotent stem cells [J]. *J Diabetes*, 2017, 9(2): 168–79.
- [5] Pagliuca F W, Millman J R, Gurtler M, et al. Generation of functional human pancreatic beta cells *in vitro* [J]. *Cell*, 2014, 159(2): 428–39.
- [6] Sun H, Wang X, Liu K, et al. beta-catenin coordinates with Jup and the TCF1/GATA6 axis to regulate human embryonic stem cell fate [J]. *Dev Biol*, 2017, 431(2): 272–81.
- [7] Beurel E, Grieco S F, Jope R S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 148: 114–31.
- [8] Guo T, Landsman L, Li N, et al. Factors expressed by murine embryonic pancreatic mesenchyme enhance generation of insulin-producing cells from hESCs [J]. *Diabetes*, 2013, 62(5): 1581–92.
- [9] Petersen M B K, Azad A, Ingvorsen C, et al. Single-cell gene expression analysis of a human ESC model of pancreatic endocrine development reveals different paths to beta-cell differentiation [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 9(4): 1246–61.
- [10] Jeon K, Lim H, Kim J H, et al. Differentiation and transplantation of functional pancreatic beta cells generated from induced pluripotent stem cells derived from a type 1 diabetes mouse model [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(14): 2642–55.
- [11] Champeris Tsaniras S, Jones P M. Generating pancreatic beta-cells from embryonic stem cells by manipulating signaling pathways [J]. *J Endocrinol*, 2010, 206(1): 13–26.
- [12] Martello G, Sugimoto T, Diamanti E, et al. Esrrb is a pivotal target of the Gsk3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(4): 491–504.
- [13] Zeng X, Tang Y, Hu K, et al. Three-week topical treatment with placenta-derived mesenchymal stem cells hydrogel in a patient with diabetic foot ulcer: a case report [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(51): e9212.
- [14] Path G, Perakakis N, Mantzoros C S, et al. Stem cells in the treatment of diabetes mellitus – focus on mesenchymal stem cells [J]. *Metabolism*, 2019, 90: 1–15.
- [15] Jacobson E F, Tzanakakis E S. Who will win: induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells for beta cell replacement and diabetes disease modeling [J]. *Curr Diab Rep*, 2018, 18(12): 133.

Wnt/ β -catenin signaling pathway promotes the differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin producing cells

He Qiaojuan^{1,2}, Zhang Nana¹, Yin Yingchuan², et al

(¹Dept of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Endocrinology, The Third People's Hospital of Hefei, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the function of Wnt/ β -catenin signaling pathway in the differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-secreting cells. **Methods** The small molecule CHIR99021, a selective agonist of Wnt/ β -catenin signaling pathway, was added in three different stages of mouse embryonic stem cell differentiation into insulin-secreting cells. The expression levels of islet cell markers Pdx1, Ngn3, Pax4 and Ins1 were then detected by Western blot, qRT-PCR and immunofluorescence. To confirm the function of CHIR99021, the Tet-On inducible system was performed to establish β -catenin transgene gene embryonic stem cell line, in which the expression of exogenous β -catenin was controlled by the small molecule compound Doxycycline. The Doxycycline was added to induce β -catenin expression at different stages of islet cell formation. Finally, we used the lentiviral interference system to down-regulate the expression of β -catenin in stem cells and observed whether it can impair

干扰 DOT1L 基因抑制胃癌 MGC-803 细胞增殖、侵袭和迁移

王庆康 宋早智 刘雪 钱军

摘要 目的 观察抑制 DOT1L 基因表达对胃癌 MGC-803 细胞增殖、迁移及侵袭的影响,并探讨其机制。方法 采用 Western blot 检测 BGC-823、MGC-803、SGC-7901 胃癌细胞系中 DOT1L 基因的表达量;分别采用 Real-time PCR、Western blot 检测各组细胞 DOT1L mRNA 和相关蛋白表达量;通过细胞集落克隆实验和 CCK-8 法检测细胞增殖能力;通过 Transwell 实验和划痕损伤实验检测细胞侵袭和迁移能力;通过 Western blot 检测细胞中的上皮间质转化(EMT)相关分子(E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin)的蛋白表达量。结果 DOT1L 在 3 种胃癌细胞中呈不同程度表达,在 MGC-803 细胞中表达量最高;转染后 DOT1L 相关蛋白及 mRNA 的表达能力显著降低($P < 0.05$);与对照组比较,细胞增殖、侵袭和迁移能力均明显减弱($P < 0.05$);细胞中 N-Cadherin、Vimentin 蛋白表达减少($P < 0.05$),E-Cadherin 蛋白表达增加($P < 0.05$)。结论 抑制 DOT1L 基因表达可降低胃癌 MGC-803 细胞的增殖与集落形成能力;并通过调控 N-Cadherin、Vimentin、E-Cadherin 的表达逆转 EMT 进程,进而减弱胃癌 MGC-803 细胞的迁移和侵袭能力。

关键词 胃癌;DOT1L 基因;细胞增殖;细胞迁移;细胞侵袭;上皮间质转化

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)12-1848-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.003

2019-07-19 接收

基金项目:2018 年度安徽高校自然科学研究项目(编号:KJ2018A1013)

作者单位:蚌埠医学院第一附属医院肿瘤外科 蚌埠 233010

作者简介:王庆康,男,硕士研究生;

钱军,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:Qianjun215036@sina.com

在我国,胃癌发病率和病死率分居恶性肿瘤的第二位和第三位,晚期胃癌的 5 年生存率小于 5%^[1-2]。放化疗主要用于中晚期胃癌患者的治疗,但因其不良反应较多,患者通常难以耐受。类端粒沉默干扰体-1(disruptor of telomeric silencing-1, DOT1)是一种在哺乳动物进化过程中发挥作用的保守蛋白,其在人类基因中被称为 DOT1-like(DOT1L)^[3]。DOT1L 可使组蛋白 H3 的第 79 位赖氨酸(H3K79)发生甲基化^[4]。对肺癌 A549 或 NCI-H1299 细胞 DOT1L 基因干扰后,细胞常表现出非增殖的多核表型^[5]。上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)是胃癌发生发展的关键驱动因素,在胃癌侵袭、复发转移的早期阶段均发挥重要作用^[6]。有研究^[7]表明,EMT 与 H3K79 甲基化修饰有一定相关性。该研究通过干扰胃癌 MGC-803 细胞中 DOT1L 基因,下调 H3K79 甲基化水平,进而观察 DOT1L 基因对胃癌 MGC-803 细胞增殖的影响,并探索迁移及侵袭能力改变与 EMT 的相关性。

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂 MGC-803、BGC-823、SGC-7901 细胞株均由本实验室提供;RPMI 1640 培养基、1%青霉素-链霉素混合物均购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;Real-time PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司;TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;Primescript RT 试剂购自日本 Takara 公司;CCK-8 试剂盒、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、0.1%结晶紫均购

the function of CHIR99021 in islet cell generation. **Results** Mouse embryonic stem cells could effectively differentiate into islet cells by adding three different solution formulations at three different time periods. In the early and late stages of islet cell formation, CHIR99021 addition and overexpression of β -catenin both could increase the efficiency of differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells, characterized by up-regulation of Pdx1 and Ins1 expression. In the contrast, downregulation of β -catenin by two short hairpins RNA impaired the function of CHIR99021. **Conclusion** Activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway at specific stages of mouse embryonic stem cell differentiation into insulin-secreting cells can promote the formation of islet cells. Our results provide useful clues for the application of stem cells for the treatment of diabetes in the future.

Key words embryonic stem cells; differentiation; diabetes; insulin; β -catenin