

基因与细胞治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000269

TCF7L2 基因 RNA 干扰对胰岛素原水平的影响及机制

郑晓雅, 任 伟, 张素华, 汤为学, 许 丹, 毕健琨

(重庆医科大学附属第一医院内分泌科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究转录因子 7 类似物 2(transcription factor 7 like 2, TCF7L2)表达下调对胰岛素原水平的影响,进一步探讨 TCF7L2 通过前蛋白转化酶(proprotein convertase, PC)基因影响胰岛素原水平的机制。**方法:**在体外培养 Beta-TC-6 细胞株,通过构建 TCF7L2 的 RNA 干扰慢病毒转染细胞,下调 TCF7L2 的表达,实验分为 3 组,分别为空白对照组、乱序对照组和 TCF7L2 干扰组,采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 TCF7L2 和 PC 基因 mRNA 及蛋白水平的变化;收集上清液,采用 ELISA 方法测定基础和葡萄糖刺激状态下胰岛素和胰岛素原水平的变化。**结果:**慢病毒感染 Beta-TC-6 细胞 48 h 后,在荧光显微镜下观察慢病毒感染效率达 95%以上,与空白对照组比较,TCF7L2 mRNA 的干扰率约为 75%(0.25 ± 0.03 vs. 0.97 ± 0.11 , $P=0.000$),蛋白质水平的干扰率约为 50%(0.29 ± 0.08 vs. 0.57 ± 0.09 , $P=0.008$)。与乱序对照组比较,TCF7L2 干扰组葡萄糖刺激后胰岛素水平明显降低(7.47 ± 0.21) mU/L vs. (10.53 ± 0.38) mU/L($P=0.000$),而胰岛素原水平却明显增加(10.73 ± 0.51) pmol/L vs. (7.81 ± 0.29) pmol/L($P=0.001$),且 PC1 和 PC2 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$)。**结论:**TCF7L2 基因的 RNA 干扰可能通过降低 PC 基因的表达,进而减少该酶对胰岛素原的加工,从而影响胰岛素原的水平。

【关键词】转录因子 7 类似物 2; 2 型糖尿病; 胰岛素原; 前蛋白转化酶

【中图分类号】R318.15

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-03-14

Effects of TCF7L2 RNA interference on proinsulin levels
and its potential mechanism

Zheng Xiaoya, Ren Wei, Zhang Suhua, Tang Weixue, Xu Dan, Bi Jiankun

(Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of transcription factor 7 like 2 (TCF7L2) down-regulation on proinsulin levels and to explore the mechanism of TCF7L2 regulating proinsulin levels through proprotein convertase (PC). **Methods:** Beta-TC-6 cells were cultured in vitro. TCF7L2 expression was down regulated by siRNA. There were three groups: blank control, scrambled control, and TCF7L2 interference group. QRT-PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein levels of TCF7L2, PC1 and PC2. Cell culture medium was collected and changes in insulin and proinsulin levels under basic and glucose stimulated conditions were detected by ELISA. **Results:** At 48 h after lentivirus infection of Beta-TC-6 cells, the infection rate achieved more than 95% under fluorescence microscopy. Compared with those of blank control group, the interference efficiency of mRNA was about 75% (0.25 ± 0.03 vs. 0.97 ± 0.11 , $P=0.000$) and the interference efficiency of protein level was 50% in TCF7L2 interference group (0.29 ± 0.08 vs. 0.57 ± 0.09 , $P=0.008$). Compared with those of scrambled control, the TCF7L2 interference group had significantly lower levels of insulin (7.47 ± 0.21) mU/L vs. (10.53 ± 0.38) mU/L ($P=0.000$), but higher levels of proinsulin (10.73 ± 0.51) pmol/L vs. (7.81 ± 0.29) pmol/L ($P=0.001$) and lower mRNA and protein levels of PC1 and PC2 ($P<0.05$). **Conclusions:** TCF7L2 interference might affect the process and levels of proinsulin by decreasing the expression of PC.

【Key words】transcription factor 7 like 2 (TCF7L2); type 2 diabetes; proinsulin; proprotein convertase

作者介绍: 郑晓雅, Email: zhengxiaoya1983@163.com,

研究方向: 糖尿病分子遗传学。

通信作者: 任 伟, Email: weiren67@sina.com。

基金项目: 重庆市卫生局医学科学研究基金资助项目 (编号: 2008-2-96); 重庆医科大学附属第一医院医学科学基金资助项目 (编号: YXJJ2009-03)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000269.html>

转录因子 7 类似物 2(transcription factor 7 like 2,TCF7L2)是迄今为止报道的和 2 型糖尿病(type 2 diabetes,T2D)相关性最强的易感基因之一^[1-2]。其表达产物是高迁移组盒包含的一个核转录因子,是 Wnt 信号通路的重要因子。Loos 等^[3]通过软件分析发现前蛋白转化酶(proprotein convertase,PC)1 和 2 基因启动子上有 TCF7L2 的结合位点。而 PC1 和 PC2 是胰岛素原加工成胰岛素过程中的关键酶。因此,Loos 等^[3]提出 TCF7L2 基因的风险等位基因可能是通过影响 PC1 和 PC2 基因的转录表达来影响胰岛素原的加工,从而导致 T2D 的易感性增加。但这一假设尚未被体外研究所证实。

因此本研究拟通过在体外培养的胰岛 β 细胞株中,采用 RNA 干扰下调 TCF7L2 的表达,研究 TCF7L2 表达下调对胰岛素原水平的影响及对 PC 表达的影响,进而探讨 TCF7L2 影响胰岛素原水平的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 DMEM 高糖培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自德国 PAA 公司;TCF7L2 干扰慢病毒试剂购自上海生博医学生物公司;PCR 引物由上海英骏生物公司合成;兔抗鼠 TCF 抗体购自美国 CST 公司;兔抗鼠 PC1 和 PC2 抗体购自美国 Millipore 公司;兔抗鼠 GAPDH 抗体购自美国 NB 公司;小鼠胰岛素及胰岛素原 ELISA 试剂盒购自美国 RD 公司;RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒和 PCR 扩增试剂盒均购自 TaKaRa 公司;蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司。

1.1.2 细胞株 小鼠胰岛 β 细胞株 Beta-TC-6 购自中国科学院细胞库,该细胞株包含丰富的胰岛素和小量的胰高血糖素及生长抑素,响应葡萄糖刺激而分泌胰岛素。

1.2 方法

1.2.1 细胞株培养 细胞置于含 5%CO₂,37℃培养箱内,用含 15%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基培养,每 2~3 d 换液,当细胞生长至 80%左右即进行细胞传代。细胞传代 1 d 后可进行病毒转染。实验分为 3 组,分别为空白对照组(Blank 组)、乱序载体对照组(siSer 组)和 TCF7L2 干扰组(siTCF7L2 组)。

1.2.2 qRT-PCR 检测 TCF7L2、PC1 及 PC2 的表达 病毒转染 Beta-TC-6 48 h 后,收集细胞,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA 后检测 RNA 浓度及纯度,并逆转录为 cDNA,然后用 SYBR Green 荧光染料定量 PCR 扩增。引物设计采用 primer Premier 5.0 软件包进行,引物的特异性比对采用 NCBI 的 Primer-BLAST,引物合成由上海英骏生物有限公司完成。各引物的具体序列见表 1。以 GAPDH 为内参。用 SYBR Green

染料荧光定量 PCR 分析,扩增条件为 95℃预变性 2 min;随后 95℃10 s,退火温度 30 s,72℃延伸 45 s,共 40 个循环;最后 72℃延伸 10 min,分析溶解及扩增曲线。采用相对定量 2^{- $\Delta\Delta CT$} 法计算基因表达水平。

表 1 qRT-PCR 的引物
Tab.1 Primers of qRT-PCR

目的基因	引物	扩增片段大小(bp)
GAPDH	5'-AAGGGCATCTTGGGCTACAC-3'	134
	5'-TCATACCAGGAAATGAGCTTGAC-3'	
TCF7L2	5'-CCCCTGACTTGAACCCACCC-3'	106
	5'-CCCTCGTCGTCGGATTGTAT-3'	
PC1	5'-GGAGGCAAACCCAAATCTTA-3'	129
	5'-AATCGGCTGTTACCATCAA-3'	
PC2	5'-CCCTATACCCAAATCGTGTC-3'	143
	5'-TGGATAAAGGCAATGTAAGAG-3'	

1.2.3 Western blot 检测 TCF7L2、PC1 及 PC2 的表达 病毒转染 Beta-TC-6 72 h 后,收集细胞,蛋白质提取按试剂盒说明书进行。蛋白含量的测定按照 BCA 蛋白测定试剂盒说明书进行。用 TSBT 按说明书稀释一抗,将 PVDF 膜完全浸于一抗工作中,4℃过夜孵育。弃去一抗工作液,加入 TBST 15 ml 洗膜,在摇床上漂洗 3 次,每次 5 min。加二抗工作液:HRP 标记的特异性二抗(1:2 000 稀释)37℃孵育 1 h。弃去二抗工作液,加入 TBST 15 ml 洗膜,在摇床上 3 次,每次 5 min。取出洗净膜并放置于图像分析仪中进行曝光,蛋白条带的平均密度值采用 Quantity-one 分析系统检测,并分析靶蛋白相对表达量。以 GAPDH 为内参,以目的蛋白条带与内参条带的平均密度值的比值进行统计分析。

1.2.4 细胞培养液中胰岛素、胰岛素原测定 分别将感染慢病毒和对照病毒的细胞接种于 6 孔板中,并培养至对数生长期,弃培养液,KRBB 缓冲液洗 2 次,加入无糖的 KRBB 0.5 ml 孵育 40 min,弃 KRBB 缓冲液,再次洗涤细胞 1 次,加入有不同葡萄糖浓度的 KRBB(分别为基础浓度 0.5 mmol/L,刺激浓度 2.8 mmol/L)培养 60 min,EP 管收集上清液,置于 4℃,1 100 r/min 离心 5 min,收集上清液于另一 EP 管中,-20℃冰箱储存,用于检测胰岛素和胰岛素原水平。采用 ELISA 方法,按试剂盒说明书进行胰岛素和胰岛素原检测。

1.3 统计分析

使用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。2 组间均数比较采用两独立样本 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK- q 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 慢病毒感染 Beta-TC-6 细胞后 TCF7L2 干扰效率的鉴定 慢病毒感染 Beta-TC-6 细胞 24 h 后,在荧光显微镜下观察

病毒的转染率达 95%以上(图 1),提取 RNA 并检测 TCF7L2 的 mRNA 变化;感染 Beta-TC-6 细胞 36 h 后提取蛋白,检测 TCF7L2 的蛋白变化。结果发现,干扰组 TCF7L2 的 mRNA 和蛋白表达水平均低于空白对照组($P<0.05$, $n=3$)。与空白对照组比较,TCF7L2 mRNA 的干扰率约为 75%(0.25 ± 0.03 vs. 0.97 ± 0.11 , $P=0.000$),蛋白质水平的干扰率约为 50%(0.29 ± 0.08 vs. 0.57 ± 0.09 , $P=0.008$),成功下调 TCF7L2 表达水平(表 2、图 2)。

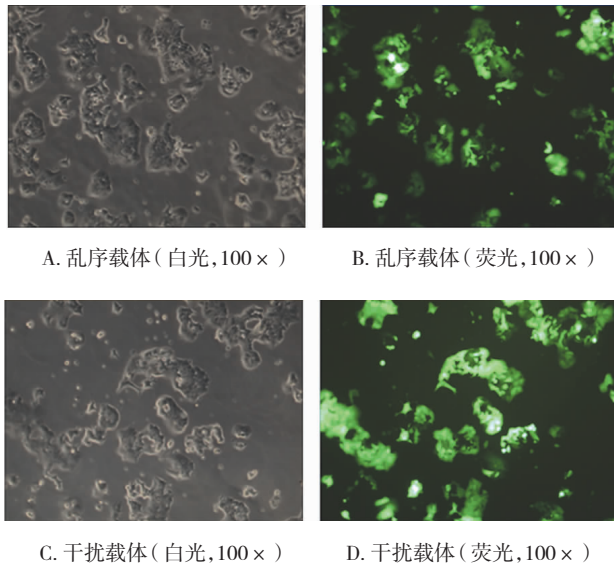


图 1 慢病毒感染 Beta-TC-6 细胞

Fig.1 Beta-TC-6 cell infected by lentiviral

表 2 TCF7L2 干扰慢病毒的干扰效率

Tab.2 Interference efficiency of TCF7L2 against lentivirus

分组	mRNA 水平 ($n=3$)	蛋白水平 ($n=3$)
Blank 组	0.97 ± 0.11	0.57 ± 0.09
siScr 组	1.03 ± 0.02	0.50 ± 0.05
siTCF7L2 组	0.25 ± 0.03^{ab}	0.29 ± 0.08^{ab}
<i>F</i> 值	138.55	12.96
<i>P</i> 值	0.000	0.008

注:a,与空白对照组比较 $P<0.05$;b,与 siScr 对照组比较 $P<0.05$

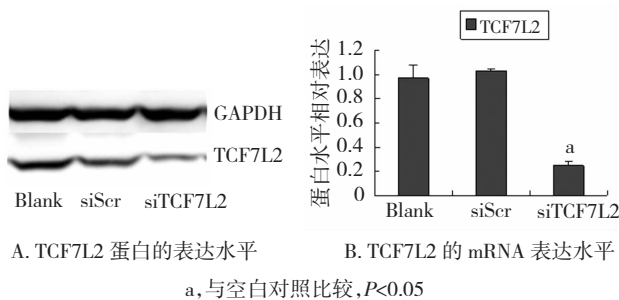


图 2 TCF7L2 干扰慢病毒的干扰效率

Fig.2 Interference efficiency of TCF7L2 against lentivirus

2.2 TCF7L2 表达降低对葡萄糖刺激的胰岛素和胰岛素原分泌的影响

TCF7L2 干扰组与 siScr 对照组比较,基础葡萄糖(0.5

mmol/L)状态下胰岛素分泌无统计学差异(6.03 ± 0.70 vs. 7.05 ± 0.09 , $P=0.068$),但葡萄糖刺激(2.8 mmol/L)后的胰岛素分泌明显降低(7.47 ± 0.21 vs. 10.53 ± 0.38 , $P=0.000$),以刺激后胰岛素水平与刺激前胰岛素水平的比值为胰岛素刺激指数,则胰岛素刺激指数亦明显降低(1.25 ± 0.10 vs. 1.50 ± 0.07 , $P=0.028$,图 3A、B);相反,与 siScr 对照组比较,TCF7L2 干扰组基础状态下胰岛素原水平明显增高(7.49 ± 0.66 vs. 6.19 ± 0.78 , $P=0.026$),而葡萄糖刺激后胰岛素原分泌增高更为明显(10.73 ± 0.51 vs. 7.81 ± 0.29 , $P=0.001$),以刺激后胰岛素原水平与刺激前胰岛素原水平的比值为胰岛素原刺激指数,则胰岛素原刺激指数亦增高(1.44 ± 0.14 vs. 1.27 ± 0.13 , $P=0.021$,表 3、图 3C、D)。

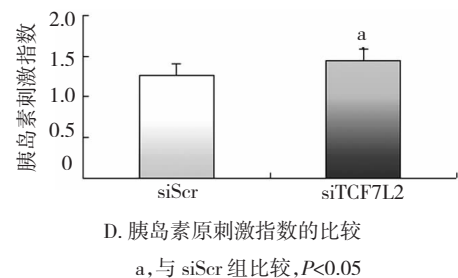
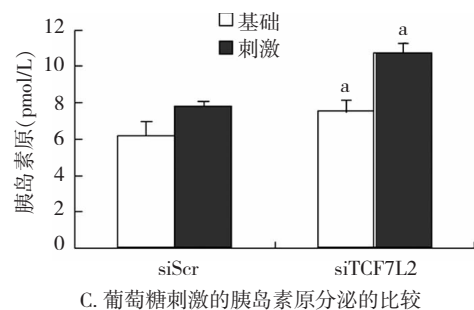
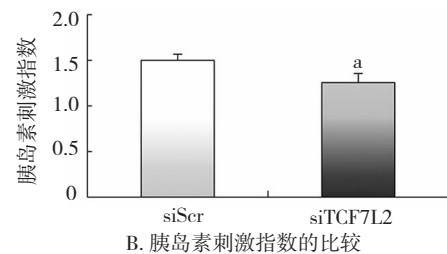
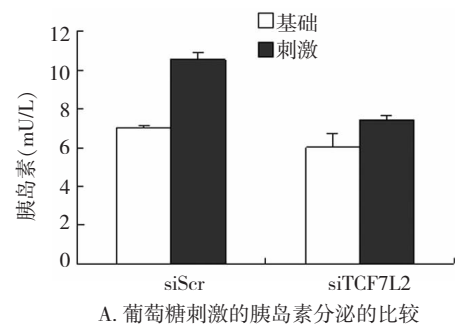


图 3 TCF7L2 干扰对葡萄糖刺激的胰岛素和胰岛素原分泌的影响

Fig.3 Effect of TCF7L2 depletion on glucose stimulated insulin and proinsulin secretion

表 3 TCF7L2 干扰对葡萄糖刺激的胰岛素和胰岛素原分泌的影响

Tab.3 Effect of TCF7L2 depletion on on glucose stimulated insulin and proinsulin secretion

分组	胰岛素 (mU/L)			胰岛素原 (pmol/L)		
	基础	刺激后	刺激指数	基础	刺激后	刺激指数
siScr组	7.05 ± 0.09	10.53 ± 0.38	1.50 ± 0.07	6.19 ± 0.78	7.81 ± 0.29	1.27 ± 0.13
siTCF7L2组	6.03 ± 0.70	7.47 ± 0.21	1.25 ± 0.10	7.49 ± 0.66	10.73 ± 0.51	1.44 ± 0.14
<i>t</i> 值	2.49	12.34	3.38	-3.20	-8.65	-3.50
<i>P</i> 值	0.068	0.000	0.028	0.026	0.001	0.021

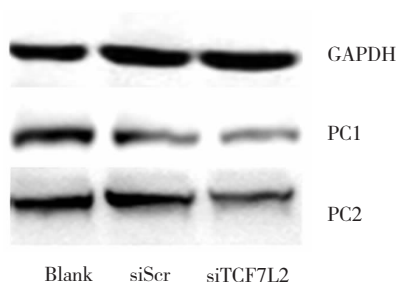
2.3 TCF7L2 的表达降低对 PC1 和 PC2 表达的影响

结合文献报道 TCF7L2 表达的转录因子在 PC1 和 PC2 基因的启动子上存在结合位点,PC1 和 PC2 可能是 TCF7L2 下游的靶基因,因此本研究还探讨了 TCF7L2 表达下调对 PC1 和 PC2 表达的影响。结果发现,TCF7L2 表达降低后,PC1 和 PC2 基因的 mRNA 和蛋白表达水平均较 Blank 组降低 ($P < 0.05, n = 3$)。见表 4、图 4。

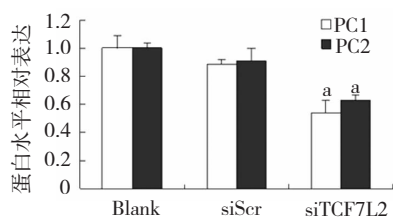
表 4 TCF7L2 干扰对 PC1 和 PC2 表达的影响

Tab.4 Effect of TCF7L2 depletion on the expression of PC1 and PC2

分组	mRNA水平 ($n=3$)		蛋白水平 ($n=3$)	
	PC1	PC2	PC1	PC2
Blank组	1.01 ± 0.13	1.00 ± 0.01	0.41 ± 0.05	0.84 ± 0.05
siScr组	1.08 ± 0.23	0.98 ± 0.18	0.47 ± 0.03	0.68 ± 0.08
siTCF7L2组	0.15 ± 0.05 ^{ab}	0.16 ± 0.07 ^{ab}	0.28 ± 0.04 ^{ab}	0.53 ± 0.03 ^{ab}
<i>F</i> 值	32.61	56.80	21.26	22.60
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.002	0.002



A. PC1 和 PC2 的蛋白表达水平



B. PC1 和 PC2 mRNA 的表达水平

a, 空白对照比较, $P < 0.05$

图 4 TCF7L2 干扰对 PC1 和 PC2 表达的影响

Fig.4 Effect of TCF7L2 depletion on the expression of PC1 and PC2

3 讨论

T2D 是由于遗传突变和环境因素相互作用而导致的一种复杂多基因疾病,其发病机制至今尚未完全阐明,遗传因素在 T2D 的发生发展中起着重要的作用。2006年,通过全基因组关联研究发现TCF7L2 和 T2D 显著相关后,T2D 遗传学的研究迎来了新的曙光^[4-5]。TCF7L2 随即成为 T2D 易感基因研究的热点,在不同地区、不同种族的大样本人群研究中,大多数研究都认为 TCF7L2 是和T2D 相关性最强的易感基因^[6-8]。尽管 TCF7L2 基因多态性和 T2D 的易感性显著相关,但 TCF7L2 风险基因增加 T2D 发病风险的机制尚不清楚,继而TCF7L2 基因的功能受到研究者的广泛关注^[9]。

Loos 等^[3]研究发现在 rs7903146 位点,携带 T/T 基因型者血清完整的胰岛素原浓度比 C/T 型携带者高 15%,而 C/T 型完整的胰岛素原浓度又比 C/C 型高 9%。TCF7L2 的其他 SNPs 也有相似结果,因此,TCF7L2 风险基因型者胰岛素原水平是显著增加的,这就提示 TCF7L2 可能和胰岛素原的加工有关。TCF7L2 基因变异型个体胰岛素水平下降可能是因为 β 细胞对胰岛素原加工效率降低,增加的胰岛素原不能转化为胰岛素被有效利用,而胰岛素原的增加正是机体对胰岛素原加工效率降低的代偿反应。

PC1 和 PC2 是胰岛素原加工为胰岛素过程中的关键酶,在胰岛素原加工的过程中发挥着重要的作用。PC1 和 PC2 的表达或酶的活性缺陷均可导致胰岛素原加工障碍,导致高胰岛素血症和胰岛素抵抗,进而影响 T2D 的发生和发展^[10]。

TCF7L2 基因可以在胰岛 β 细胞的核内表达,其表达产物是一个具有 DNA 结合结构域的转录因子,同时也是 Wnt 信号通路的重要组成部分^[11]。因此,TCF7L2 的表达变化可以直接或间接地影响其

下游靶基因的表达或功能。Loos 等^[3]通过软件分析发现 TCF7L2 表达的转录因子在 PC1 和 PC2 基因的启动子上存在结合位点,因此 PC1 和 PC2 可能是 TCF7L2 下游的靶基因,但这一推测尚未被体外研究所证实。

本研究通过体外细胞实验发现,TCF7L2 基因表达下调可以使 β 细胞葡萄糖刺激状态下胰岛素水平显著降低,这与 Shu 等的研究结果^[10]是一致的,提示 TCF7L2 在维持 β 细胞功能中是必需的。同时还发现 TCF7L2 表达下调后,不管是基础还是葡萄糖刺激状态下胰岛素原的水平均是明显增加的,这提示 TCF7L2 可能与胰岛 β 细胞对胰岛素原的加工有关。因此本研究进一步探讨了 TCF7L2 表达下调对 PC 基因的影响,结果发现,TCF7L2 表达下调可以导致 PC1 和 PC2 基因的 mRNA 及蛋白表达水平明显降低。因此,本研究在体外证实 TCF7L2 的 RNA 干扰可以导致胰岛素水平降低和胰岛素原水平增加,这一变化可能与 TCF7L2 干扰降低 PC1 和 PC2 的表达导致胰岛 β 细胞对胰岛素原的加工障碍有关。

综上,本研究结果提示 TCF7L2 表达下调可能通过降低 PC 的表达,进而降低胰岛素原的加工效率,最终导致胰岛素原水平的增高。

参 考 文 献

[1] Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, et al. TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the diabetes prevention program[J]. N Engl J Med, 2006, 355(3): 241–250.

[2] 郑晓雅,任伟,张素华,等.TCF7L2 基因 rs7903146 和 rs11198218 单核苷酸多态性和新诊断 2 型糖尿病患者早相胰岛素分泌的相关性分析[J].解放军医学杂志,2011,36(3):280–283.

[3] Loos RJ, Franks PW, Francis RW, et al. TCF7L2 polymorphisms modulate proinsulin levels and β -cell function in a British European population[J]. Diabetes, 2007, 56(7): 1943–1947.

[4] 郑晓雅,任伟,张素华,等.胰岛素原和胰淀素原水平与胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能的相关性研究[J].第三军医大学学报,2010,32(2):169–172.

[5] Sladek R, Rocheleau G, Rung J, et al. Genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes[J]. Nature, 2007, 445(7130): 881–885.

[6] Kirchhoff K, Machicao F, Haupt A, et al. Polymorphisms in the TCF7L2, CDKAL1 and SLC30A8 genes are associated with impaired proinsulin conversion[J]. Diabetologia, 2008, 51(4): 597–601.

[7] Zheng XY, Ren W, Zhang SH, et al. Association of type 2 diabetes susceptibility genes (TCF7L2, SLC30A8, PCSK1 and PCSK2) and proinsulin conversion in a Chinese population[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(1): 17–23.

[8] Gonzalez-Sanchez J, Martinez-Larrad M, Zabena C, et al. Association of variants of the TCF7L2 gene with increases in the risk of type 2 diabetes and the proinsulin:insulin ratio in the Spanish population[J]. Diabetologia, 2008, 51(11): 1993–1997.

[9] Fritsche A, Madaus A, Stefan N, et al. Relationships among age, proinsulin conversion, and beta-cell function in nondiabetic humans[J]. Diabetes, 2002, 51(S1): S234–S239.

[10] Shu L, Sauter NS, Schulthess FT, et al. TCF7L2 regulates beta-cell survival and function in human pancreatic islets[J]. Diabetes, 2008, 57(3): 645–653.

[11] Jin, Tianru L, Ling, et al. The Wnt Signaling Pathway Effector TCF7L2 and Type 2 Diabetes Mellitus[J]. Mol Endocrinol, 2008, 22(11): 2383–2392.

(责任编辑:冉明会)

欢迎订阅,敬请赐稿!