

## IRE1 $\alpha$ 影响非洲爪蟾胰腺发育

李昕昕,冯娇娇,殷晨阳,徐校佩,王璐璐,郭 静,王学军,王 宁,袁 砾\*

(南京医科大学生化与分子生物学系,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨肌醇依赖性激酶 1 $\alpha$ (inositol requiring enzyme 1 $\alpha$ ,IRE1 $\alpha$ )对非洲爪蟾胰腺发育的影响。方法:通过显微注射基因特异性反义寡核苷酸实现基因敲降;利用整体胚胎原位杂交方法检测基因表达。结果:IRE1 $\alpha$  表达于爪蟾发育中的胰腺;利用基因特异性反义寡核苷酸敲降 IRE1 $\alpha$  后,非洲爪蟾肠道明显异常,胰腺内外分泌标志性基因胰岛素、淀粉酶表达显著减少;胰腺前体细胞的标志基因 pdx1 和 p48 表达明显减少;敲降 IRE1 $\alpha$  下游基因 X-盒结合蛋白 1 (X-box binding protein 1, XBP1)后,非洲爪蟾的胰岛素、淀粉酶表达也明显减少。结论:IRE1 $\alpha$  影响非洲爪蟾胰腺发育,可能通过 XBP1 发挥作用。

**[关键词]** 肌醇依赖性激酶 1 $\alpha$ ;非洲爪蟾;胰腺发育

**[中图分类号]** Q132

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)11-1483-05

## The effects of IRE1 $\alpha$ on pancreas development in *Xenopus laevis*

LI Xin-xin, FENG Jiao-jiao, YIN Chen-yang, XU Xiao-pei, WANG Lu-lu, GUO Jing, WANG Xue-jun, WANG Ning, YUAN Li\*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of inositol requiring enzyme 1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ) on pancreas development of *Xenopus laevis*. **Methods:** The gene-specific antisense oligonucleotides, morpholino (MO)s, were microinjected to knockdown IRE1 $\alpha$  and XBP1. The whole mount *in situ* hybridization of *Xenopus* embryos was used to detect the gene expression. **Results:** IRE1 $\alpha$  was expressed in developing pancreas in *Xenopus*. There were serious defects in gut development observed in IRE1 $\alpha$  knockdown embryos of *Xenopus*. The expression of the endocrine marker gene (insulin) and the exocrine pancreas marker gene (amylase) was undetectable during tadpole stages of development in IRE1 $\alpha$  knockdown embryos compared to the control embryos. The expression of the pancreas progenitor cell marker genes (pdx1 and p48) was repressed significantly. And after knockdown of XBP1, the expression of insulin and amylase decreased significantly and can't be detectable. **Conclusion:** IRE1 $\alpha$  plays an essential role in pancreas development of *Xenopus* and may be through XBP1 dependent pathway.

**[Key words]** inositol requiring enzyme-1 $\alpha$ ; *Xenopus laevis*; pancreas development

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(11): 1483-1487]

肌醇依赖性激酶 (inositol requiring enzyme, IRE)1 $\alpha$  是一种 I 型跨膜蛋白激酶/RNA 酶,定位于内质网。在感受到内质网应激信号后,发生二聚化,激活其 RNA 酶活性,进而剪接、激活下游分子 X-盒结合蛋白 1(X-box binding protein 1, XBP1)<sup>[1]</sup>。XBP1 作为转录因子继续激活其下游基因从而缓解内质网

应激<sup>[2]</sup>。在胰岛细胞中,IRE1 $\alpha$  还可以不依赖于 XBP1 而直接降解胰岛素 mRNA<sup>[3]</sup>。IRE1 $\alpha$  广泛存在于胚胎及成年组织,高表达于胰腺和胎盘<sup>[4]</sup>。IRE1 $\alpha$  缺陷小鼠胚胎发育中胎盘形成受到抑制<sup>[4]</sup>,血糖升高,胰腺导管形态异常<sup>[5]</sup>;非洲爪蟾 IRE1 $\alpha$  表达于早期胰腺原基<sup>[6]</sup>,提示 IRE1 $\alpha$  可能影响胰腺发育,但目前未见相关报道。

非洲爪蟾胰腺发育与哺乳动物类似,起源于前肠内胚层,经历了胰腺前体细胞形成阶段和内、外分泌细胞分化阶段。早期胰腺前体细胞表达 pdx1 和 p48,而胰岛素(insulin)、胰高血糖素(glucagon)和淀

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30971680);江苏高校优势学科建设工程项目(JX10131801038);2010 年江苏省高校“青蓝工程”项目

\*通讯作者, E-mail: yuanli@njmu.edu.cn

粉酶(amylase)等表达则标志着胰腺内外分泌部的分化<sup>[7]</sup>。非洲爪蟾受精卵体积较大,易通过显微注射进行基因功能研究;胚胎在体外发育,可以实时观察发育中的表型变化。本研究利用非洲爪蟾作为模式动物,利用显微注射特异性反义寡核苷酸吗啉低聚物(morpholino,MO)封闭基因表达,研究 IRE1 $\alpha$  在胰腺发育中的作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 主要试剂

人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin,hCG)、半胱氨酸(美国 Sigma 公司);限制性核酸内切酶、DNase I(立陶宛 Fermentase 公司);RNA 纯化试剂盒 RNeasy kit(德国 Qiagen 公司);dig-UTP、anti-DIG-AP 和 BM purple(美国 Roche 公司)。

##### 1.1.2 反义寡核苷酸 MO

由美国 Gene Tools 公司合成。根据 IRE1 $\alpha$  5'端序列设计特异性封闭 IRE1 $\alpha$  的 MO,命名为 IRE1 $\alpha$  MO,其序列为:5'-AAGAGAACCGCCAGAGGCGC-CATGT-3'<sup>[8]</sup>;特异性封闭 XBP1 的 XBP1 MO 序列为:5'-GACATCTGGGCCTGCTCCTGCTGCA-3'<sup>[6]</sup>。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 胚胎操作

于实验前 12 h 注射 300~600 U hCG 诱导雌性个体排卵,收集卵细胞进行体外受精,30 min 后以 2%半胱氨酸(pH8.2)去除受精卵外的胶囊,在 0.1 $\times$ MBSH 缓冲液(含 8.8 mmol/L NaCl,0.24 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 mmol/L KCl, 0.082 mmol/L MgSO<sub>4</sub>,

0.041 mmol/L CaCl<sub>2</sub>,0.033 mmol/L Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,1 mmol/L Hepes,pH7.4)中培养至相应发育阶段。胚胎的分期依照 Nieuwkoop 和 Faber 分期<sup>[9]</sup>。

##### 1.2.2 显微注射

待受精卵分裂至四细胞期,选择生长状态良好的胚胎,将 50 ng IRE1 $\alpha$  MO 或 50 ng XBP1 MO 注入 4 个细胞中,之后于培养箱中培养至所需发育阶段,用于观察表型及基因表达分析。

##### 1.2.3 探针制备

将 pDrive-IRE1 $\alpha$  以 Hind III 酶切,T7 RNA 聚合酶进行体外转录;pGEM-T-Easy-pdx1 以 Sal I 酶切,T7 RNA 聚合酶进行体外转录;PTF1-p48 以 Sac II 酶切,T7 RNA 聚合酶进行体外转录;pCRScript-insulin 以 EcoR I 酶切,T3 RNA 聚合酶进行体外转录;pCRScript-amylase 以 EcoR V 酶切,T3 RNA 聚合酶进行体外转录,合成反义 RNA 探针,反应体系中加入地高辛标记的 UTP 以标记探针,探针纯化后备用。

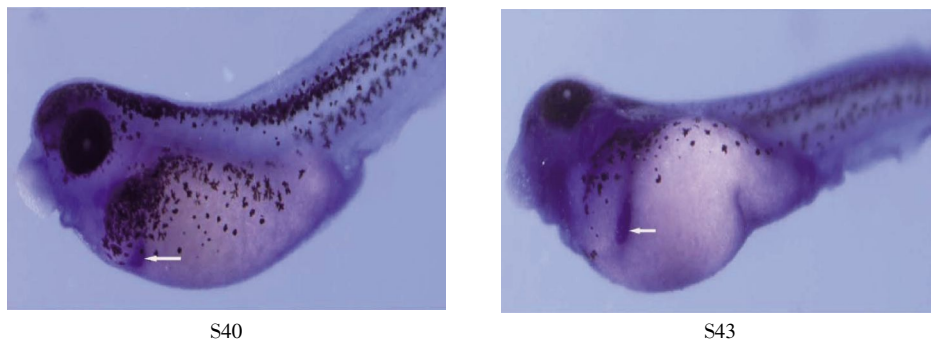
##### 1.2.4 整体胚胎原位杂交

收集、固定相应发育阶段的胚胎,进行梯度乙醇脱水处理,在蛋白酶 K 处理 30 min 后进行预杂交和杂交,加入 AP 标记的抗地高辛抗体后,与底物液 BM purple 进行显色反应。

## 2 结果

### 2.1 IRE1 $\alpha$ 表达于发育中的胰腺

IRE1 $\alpha$  在发育早期已出现于胰腺原基<sup>[6]</sup>,本研究继续在发育晚期的胚胎中检测 IRE1 $\alpha$  的表达。原位杂交结果显示,在器官形成期第 40(S40)及 43 期(S43)IRE1 $\alpha$  高表达于胰腺(图 1)。



箭头所指处为胰腺。

图 1 IRE1 $\alpha$  表达于发育中的胰腺( $\times 20$ )

Figure 1 Expression pattern of IRE1 $\alpha$  during pancreas development( $\times 20$ )

### 2.2 敲降 IRE1 $\alpha$ 影响肠道形成

在四细胞期注射 IRE1 $\alpha$  MO,待胚胎发育至肠道

形成期时,发现胚胎肠道出现明显异常。与正常胚胎相比,肠道的正常扭转消失,肠道结构无法分辨(图2)。

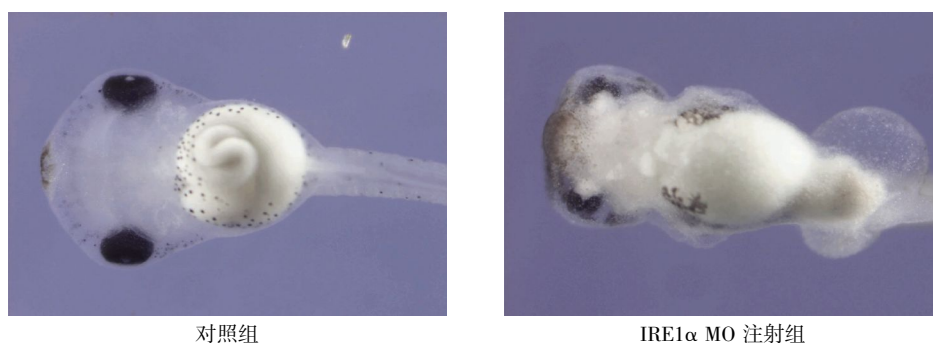


图 2 IRE1 $\alpha$  影响肠道形成( $\times 20$ )

Figure 2 IRE1 $\alpha$  is required for gut development( $\times 20$ )

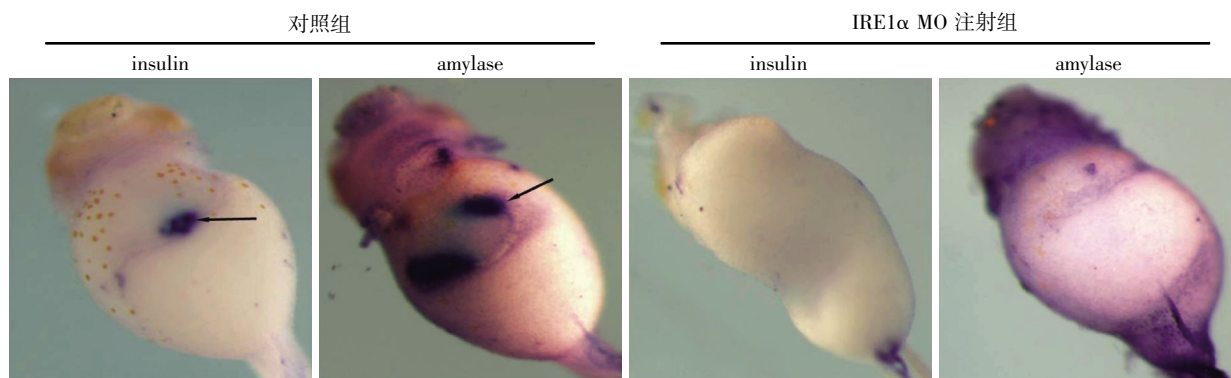
### 2.3 敲降 IRE1 $\alpha$ 影响胰腺分化相关基因的表达

在敲降 IRE1 $\alpha$  后产生肠道形成受损的表型,但表达模式显示 IRE1 $\alpha$  高表达于胰腺,因此进一步检测了胰腺的形成是否受到影响。整胚原位杂交结果显示,在胚胎发育至 43 期时,利用 insulin、amylase 基因作为探针进行检测,胰腺结构清晰可见(图 3);而在注射 IRE1 $\alpha$  MO 进行基因敲降的胚胎中,胰腺内分泌标志性基因 insulin、外分泌标志性基因 amy-

lase 几乎检测不到。

### 2.4 敲降 IRE1 $\alpha$ 影响胰腺前体细胞标志基因的表达

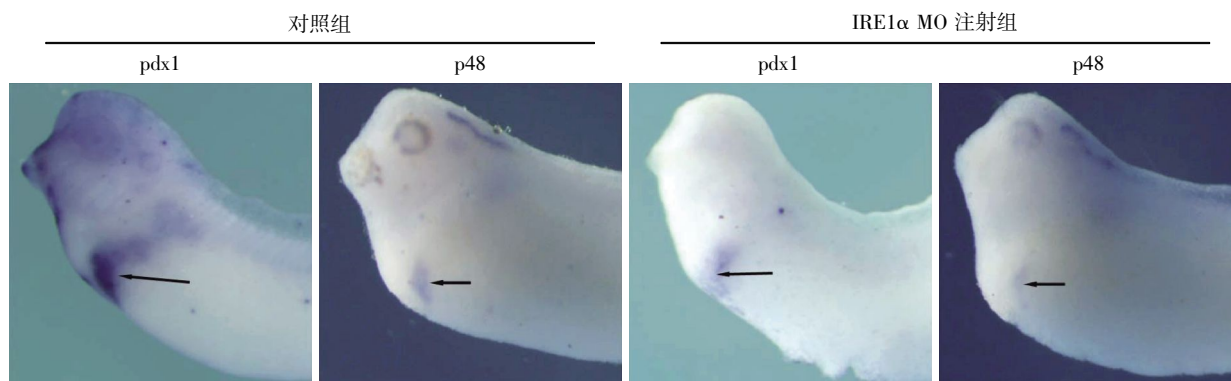
在证实了 IRE1 $\alpha$  影响胰腺形成后,进一步检测 IRE1 $\alpha$  是否影响胰腺前体细胞的形成。在胚胎发育至 32 期时,以 pdx1、p48 为探针,利用整胚原位杂交进行检测。结果显示,与对照胚胎相比,敲降 IRE1 $\alpha$  的胚胎中,胰腺前体细胞标志基因 pdx1、p48 的表达明显减少(图 4)。



箭头所指处为胰腺。

图 3 敲降 IRE1 $\alpha$  抑制胰腺分化相关基因的表达( $\times 20$ )

Figure 3 IRE1 $\alpha$  knockdown leads to inhibiting expression of pancreas markers genes during embryo development( $\times 20$ )



箭头所指处为胰腺。

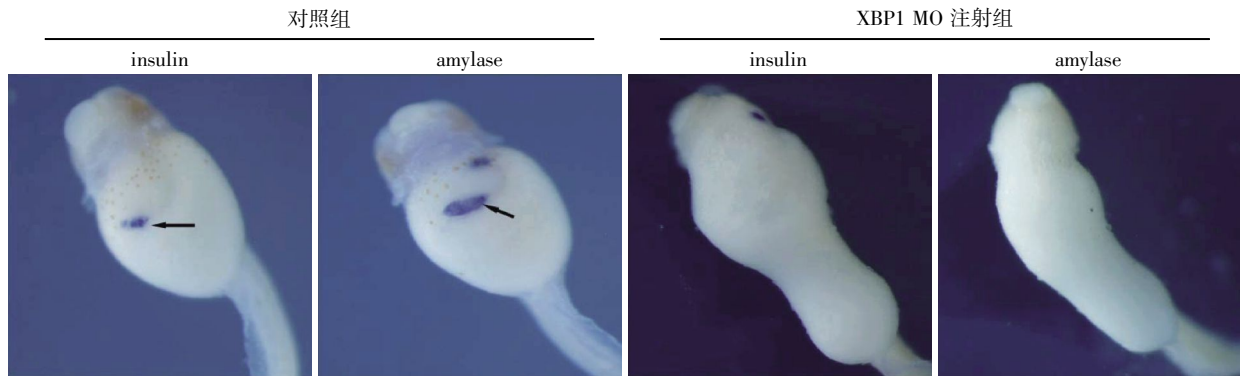
图 4 敲降 IRE1 $\alpha$  抑制胰腺前体细胞标志基因的表达( $\times 20$ )

Figure 4 IRE1 $\alpha$  knockdown inhibits pancreas progenitor cell marker gene expression( $\times 20$ )

### 2.5 敲降 XBP1 影响胰腺形成

XBP1 是 IRE1 $\alpha$  的下游基因,在 IRE1 $\alpha$  的剪接作用下激活,观察检测敲降 XBP1 是否同样会影响胰腺的形成。以 insulin、amylase 作为探针,通过整胚原位杂交进行检测。

结果显示,在胚胎发育至 43 期时,对照胚胎胰腺结构清晰可见(图 5);而在注射 XBP1 MO 进行基因敲降的胚胎中,肠道结构无法分辨,胰腺内分泌基因 insulin、外分泌基因 amylase 几乎检测不到。



箭头所指处为胰腺。

图5 敲降 XBP1 抑制胰腺形成( $\times 20$ )

Figure 5 XBP1 knockdown inhibits pancreas marker gene expression( $\times 20$ )

### 3 讨论

在脊椎动物进化过程中,调控胰腺细胞分化的机制是高度保守的。利用小鼠、非洲爪蟾、斑马鱼等模式生物已鉴定出多种分子在胰腺发育中发挥重要作用<sup>[7,10-13]</sup>。本研究利用非洲爪蟾作为模式动物,观察 IRE1 $\alpha$  对胰腺发育的影响。发现 IRE1 $\alpha$  表达于发育中的胰腺,敲降 IRE1 $\alpha$  抑制爪蟾胰腺发育,并可能通过 XBP1 途径发挥作用。

胰腺作为体内重要的腺体,具有内、外分泌功能。大量内、外分泌蛋白的合成对于内质网而言也是一种生理性应激。发生内质网应激时,细胞会启动保护性反应,未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),以缓解应激、维持内质网稳态。UPR 由 3 种跨膜分子蛋白激酶样内质网激酶(protein kinase RNA-dependent-like ER kinase, PERK)、活化转录因子 6(activating transcription factor 6, ATF6)和 IRE1 介导<sup>[2]</sup>。IRE1 介导其中最为保守的分支,作为感受内质网应激的中心组分,在成熟的胰岛细胞中,IRE1 $\alpha$  调节胰岛素的合成,参与糖尿病的发生<sup>[14]</sup>。

哺乳动物 IRE1 $\alpha$  广泛表达于各组织器官,高表达于胰腺和胎盘组织<sup>[4]</sup>。敲除 IRE1 $\alpha$  可以在不同阶段影响 B 淋巴细胞向浆细胞的分化<sup>[15]</sup>,影响胎盘功能和外分泌胰腺的组织形态,导致血糖升高<sup>[4-5]</sup>。本文通过基因敲降的方法研究了 IRE1 $\alpha$  对胰腺发育的影响,发现 IRE1 $\alpha$  不仅影响外分泌胰腺的形成,也影响了内分泌胰腺的形成。胰腺的发育经历了前肠内胚

层的局部特化、胰腺特化、内外分泌胰腺的分化。在非洲爪蟾中 pdx1 和 p48 表达于胰腺发育早期,作为胰腺前体细胞的标志基因。在发育晚期 pdx1 局限于胰岛  $\beta$  细胞,而 p48 则表达于外分泌细胞<sup>[11]</sup>。为进一步探究 IRE1 $\alpha$  对胰腺发育产生影响的时期,进一步检测了胰腺前体细胞标志基因的表达,发现敲降 IRE1 $\alpha$  显著抑制 pdx1 和 p48 的表达,提示 IRE1 $\alpha$  对于前体细胞的形成起到非常重要的作用。但 IRE1 $\alpha$  是否在更早期开始发挥作用,仍需进一步研究。

IRE1 $\alpha$  敲除鼠胰腺腺泡组织体积减小,腺泡细胞部分缺失<sup>[5]</sup>;而在 XBP1 敲除鼠中也出现胰腺腺泡发育缺陷<sup>[16]</sup>,本研究发现敲降 XBP1 与敲降 IRE1 $\alpha$  均可抑制非洲爪蟾胰腺发育,说明 IRE1 $\alpha$ /XBP1 途径在胰腺发育中发挥重要作用,IRE1 $\alpha$  影响胰腺发育可能是通过 XBP1 而实现的。但是 IRE1 $\alpha$  发挥作用既可以通过剪接、激活下游靶基因 XBP1,亦可以不依赖 XBP1 而是直接降解靶基因的 mRNA 以发挥作用<sup>[16]</sup>。因此,在非洲爪蟾胰腺发育中 IRE1 $\alpha$  是否完全依赖于 XBP1 发挥作用还需要通过拯救实验进一步验证。

#### [参考文献]

- [1] Uemura A, Oku M, Mori K, et al. Unconventional splicing of XBP1 mRNA occurs in the cytoplasm during the mammalian unfolded protein response [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(16): 2877-2886
- [2] Malhotra JD, Kaufman RJ. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response [J]. *Semin Cell Dev Biol*,

- 2007,18(6):716-731
- [3] Lipson KL,Fonseca SG,Ishigaki S,et al. Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1[J]. Cell Metab,2006,4(3):245-254
- [4] Iwawaki T,Akai R,Yamanaka S,et al. Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability[J].Proc Natl Acad Sci U S A,2009,106(39):16657-16662
- [5] Iwawaki T,Akai R,Kohno K. IRE1a disruption causes histological abnormality of exocrine tissues,increase of blood glucose level,and decrease of serum immunoglobulin level[J]. PLoS One,2010,5(9):e13052
- [6] Yuan L,Cao Y,Oswald F,et al. IRE1beta is required for mesoderm formation in *Xenopus* embryos[J]. Mech Dev,2008,125(3-4):207-212
- [7] Pearl EJ,Bilogan CK,Mukhi S,et al. *Xenopus* pancreas development[J]. Dev Dyn,2009,238(6):1271-1286
- [8] 李昕昕,冯娇娇,侯道荣,等. IRE1 $\alpha$  通过 UPR 影响非洲爪蟾胚胎发育[J].南京医科大学学报(自然科学版),2011,31(10):795-798
- [9] Nieuwkoop PD,Faber J. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin)[M]. 2nd ed. Amsterdam,North Holland;Elsevier,1967:35-36
- [10] Jørgensen MC,Ahnfelt-Rønne J,Hald J,et al. An illustrated review of early pancreas development in the mouse[J]. Endocr Rev,2007,28(6):685-705
- [11] Tiso N,Moro E,Argenton F. Zebrafish pancreas development[J]. Mol Cell Endocrinol,2009,312(1-2):24-30
- [12] Horb LD,Jarkji ZH,Horb ME. *Xenopus* insm1 is essential for gastrointestinal and pancreatic endocrine cell development[J]. Dev Dyn,2009,238(10):2505-2510
- [13] Wen L,Yang Y,Wang Y,et al. Appl1 is essential for the survival of *Xenopus* pancreas,duodenum,and stomach progenitor cells[J]. Dev Dyn,2010,239(8):2198-2207
- [14] Hetz C,Glimcher LH. Fine-tuning of the unfolded protein response:Assembling the IRE1alpha interactome[J]. Mol Cell,2009,35(5):551-561
- [15] Zhang K,Wong HN,Song B,et al. The unfolded protein response sensor IRE1 $\alpha$  is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis[J]. J Clin Invest,2005,115(2):268-281
- [16] Lee AH,Chu GC,Iwakoshi NN,et al. XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands[J]. EMBO J,2005,24(24):4368-4380

[收稿日期] 2012-07-30

## 喜 讯

本刊再次入编《中文核心期刊要目总览》2011 年版(第 6 版)之综合医药卫生类核心期刊,这是本刊连续 4 届被确定为中文核心期刊。