

c-met 及相关基因在大鼠胰腺发育功能完善中的表达^{*}

程梅 刘莉洁 郭静 石慧 曹丽华 侯良芹 蔺扬波 德伟

(南京医科大学生物化学与分子生物学教研室 南京 210029)

摘要 目的:研究原癌基因 c-met 及其相关基因在大鼠胰腺发育及细胞功能完善过程中的表达。方法:采用高密度寡核苷酸芯片(Affymetrix 芯片)对孕 12.5(E12.5)、E15.5 和 E18.5、新生、成年胰腺进行基因转录水平分析,并用 RT-PCR 验证基因在大鼠胰腺不同发育时期的表达。结果:c-met 基因在 E15.5、E18.5 较成年特异高表达。芯片中 c-met 转录调控基因和信号传导通路相关基因的表达趋势与 c-met 高度相似。RT-PCR(所用引物设计区域与芯片相同)验证,c-met 表达趋势与芯片结果相符;与芯片 c-met 探针所用引物不同 RT-PCR,结果却在各发育阶段呈现与芯片不同的表达趋势。结论:提示 c-met 可能在胰腺发育细胞功能完善的关键阶段起调控作用,参与胚胎胰腺发育中晚期细胞功能完善的信号传导过程。并且 c-met 在胰腺发育中发挥作用有可能存在不同转录本。

关键词: c-met;胰腺生长发育;细胞功能完善;高通量寡核苷酸芯片;RT-PCR

中图分类号: R318, Q78 **文献标识码:** A

Expression of c-met and its related genes in the function maturation stages of rat pancreatic development

CHENG Mei, LIU Li-jie, GUO Jing, et al

(Nanjing Medical University, Nanjing, 210029, Jiangsu, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the function of c-met and its related genes in the different development stages of rat pancreas. **Methods:** Gene Chip Expression Set230A was used to detect the signal value of different development stages of rat pancreas(E12.5, E15.5, E18.5, newborn, adult). RT-PCR was used to verify the results and to detect different transcription of c-met. **Results:** C-met was expressed highly at rat embryonic day 15.5, 18.5. The c-met expression tendency of Gene Chips was consistent with result of RT-PCR, but different primer of RT-PCR has another result. **Conclusion:** C-met proto-oncogene may plays a role in the function maturation stages of rat pancreatic development. There may be different transcriptions of c-met in the progression of rat pancreatic maturation.

Key words: C-met; pancreatic development; Cell function maturation; Gene Chips; RT-PCR

前言

胰腺起源于原始前肠内胚层的上皮细胞。大鼠胰腺的生长发育过程分为胚胎 12.5 天(E12.5)、E15.5、E18.5、新生几个关键点。其中 E12.5 胰腺雏形形成,E15.5 出现内外分泌部的分化,到 E18.5 时典型的胰岛结构形成。多种因子参与共同调控,相关因子间相互作用影响,调节器官的定向发育分化^[1,2]。c-met 做为一种原癌基因,所介导的信号传导系统在心、肾、肌肉、牙齿等器官发育过程发挥重要生物学作用^[3-6]。近年来已引起越来越广泛的关注。目前,对该基因在胰腺发育过程中的作用研究较少。而胰腺发育不全是导致青少年糖尿病的重要危险因素之一。

本文以 SD 大鼠为模型,选取 E15.5 天、E18.5 天及新生这三个大鼠胰腺发育和细胞功能完善的关键时期,通过 affymetrix 高通量多聚寡核苷酸芯片及 RT-PCR 技术对 c-met 基因及相关调控基因在胰腺发育中的表达做出初步分析。为揭示 c-met 基因及其相关基因在胰腺发育细胞功能完善过程中的作用提供了一定依据。

1 材料和方法

1.1 材料

成年 SD 大鼠 60 只,雌 20 只,雄 40 只,体质量 250g 左右,由南京医科大学动物中心提供。于 6:00 时,将雌雄以 1:2 合笼,次日检测有阴栓者,定为受精 0.5d(E0.5),取 E12.5、E15.5 和 E18.5 胚胎胰腺以及新生鼠胰腺; GeneChip Murine Genome RAE230A 芯片(Affymetrix 公司)。Eppendorf 公司 mastercycler PCR 仪,Trizol Reagent(美国 Gibco 公司),RNAeasy Mini Kit (Qiagen),RT-PCR 试剂盒(Tayobo)。

1.2 方法

1.2.1 组织取材:取怀有胚胎 E12.5、E15.5 和 E18.5 的母鼠,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。新生和成年鼠直接分离出胰腺^[7]。

1.2.2 胰腺发育各阶段芯片制备:用 Trizol mReagent 提取大鼠 E12.5、E15.5、E18.5、新生和成年胰腺总 RNA,利用 RNAeasyMiniKit 纯化总 RNA。寡核苷酸芯片分析 mRNA 表达:分别以 15μg E15.5 和 E18.5 胰腺总 RNA 为模板合成双链 cD-

* 基金项目:教育部科学技术重点研究项目(地方 01042)

作者简介:程梅,(1979-),女,硕士,主要研究方向:大鼠胰腺生长发育及功能完善

通讯作者:程梅, E-mail: chm790217@126.com

(收稿日期:2006-08-10 接受日期:2006-09-07)

NA,采用 BioArray™ High Yield™ RNA Transcription 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 后,取 30μg cRNA GeneChipMurine Genome RAE230A 芯片杂交; 洗脱后,用链酶亲和素藻红蛋白进行染色扫描检测信号;对获 得的信号在微阵列分析软件(the MicroarraySuite Software version 5.0)上进行数据分析并对样品的表达结果采用线性度量(scal- ing)的方法在样品间进行校准。

1.2.3 RT-PCR 扩增:根据基因文库 c-met 的序列,用 Primer 5.0 设计 PCR 扩增引物。引物 1(同 affymetrix 芯片引物):上游 引物:5'-CCACCCCAATGTTCTCTAC-3',下游引物:5'- GGTGCTGAACCTTTGCGTCT-3',预计扩增产物 298bp;引物 2 (靠近 5'端编码区):上游引物:5'-GTTCAACCAC CAAGTCAGA -3',下游引物:5'-CTTCCGATGAATACA-3',预计扩增产物 257bp。引物由江苏赛百盛基因有限公司合成。取 1μg 的 E15. 5,E18.5,新生和成年四个时期(每组 5 只)胰腺组织总 RNA 进 行反转录:30℃ 10min,42℃ 20min,99℃ 5min,4℃ 5min,合成 cDNA。

c-met 的 PCR 条件:
引物 1:94℃ 5min;94℃ 30s,59.5℃ 30s,74℃ 1min,36 个循 环。
引物 2:94℃ 5min;94℃ 30s,51.5℃ 30s,74℃ 1min,35 个循 环。

RT-PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后在紫 外光下进行观察照像。用捷达 801 系列凝胶分析软件进行凝 胶密度扫描分析,计算待测基因 PCR 产物各条带密度与内对 照 β-actine 条带密度,两者的比值作为待测基因 mRNA 表达 的相对含量。同一条带重复测量 3 次。

2 结果

2.1 c-met 及其相关调控因子在大鼠胰腺发育过程中的表

图 1 c-met 转录调控基因在大鼠胰腺发育各阶段表达趋势

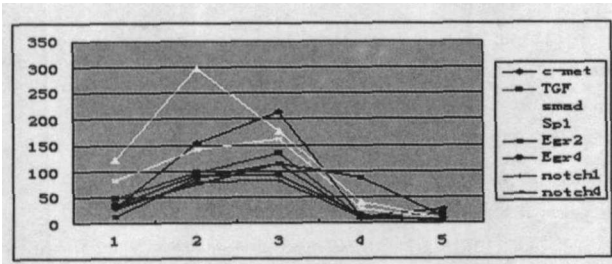


Fig 1 Tendency of genes related to c-met transcription in different stages of rat pancreatic development

2.2 c-met RT-PCR 结果比较

3 讨论

胚胎 15.5 天、18.5 天及新生是大鼠胰腺发育、细胞功能

达信号值及趋势分析

表 1 c-met 基因及转录调控基因在大鼠胰腺发育各阶段的表达
Table 1 Expression profile of genes related to c-met transcription in gene chips of different stages of rat pancreatic development

GENE	GENEBANK	E12.5	E15.5	E18.5	newborn	adult
c-met	Rn.10617	30.1	154.2	215.1	11.4	27.5
TGF	Rn.24822	49.5	95.5	134.5	10.9	17.8
smad	Rn.8811	121.9	296.0	175.9	40.5	9.1
sp1	Rn.44609	82.0	141.4	163.0	28.8	5.6
Egr2	Rn.89235	13.4	88.7	115.7	86.5	12.2
Egr4	Rn.31998	36.3	91.0	93.0	15.4	3.9
notch1	Rn.162638	27.1	80.3	81.5	11.3	6.1
notch4	Rn.12967	33.6	75.3	115.2	7.3	7.6

表 2 c-met 信号传导通路相关基因在大鼠胰腺发育各阶段的表达
Table 2 Factors related to c-met signal system in gene chips of different stages of rat pancreatic development

GENE	GENEBANK	E12.5	E15.5	E18.5	newborn	adult
stam	Rn.14662	53.9	184.0	249.3	57.0	30.2
Hrs	Rn.21	14.3	663.2	1159.8	117.0	134.4
MAPK1	Rn.34914	150.1	391.6	528.8	56.4	14.8
MAPK6	Rn.88457	574.4	965.4	675.1	95.4	18.5
MAPK9	Rn.9910	59.7	360.0	236.3	25.6	32.8
MAPK14	Rn.88085	411.0	1323.0	1991.5	543.3	341.6
c-fos	Rn.10796	51.1	213.9	223.9	45.9	2.0
stat3	Rn.10247	133.2	528.4	731.1	256.3	198.8
Akt1	Rn.11422	444.2	1240.8	1455.0	139.5	105.2
Akt2	Rn.87066	111.5	368.0	435.4	4.2	9.7

图 2 c-met 信号传导通路相关基因在大鼠胰腺发育各阶段表达趋势

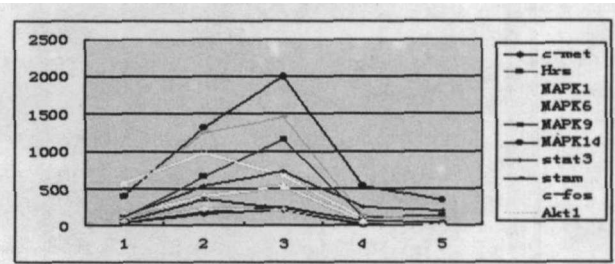


Fig 2 Tendency of genes related to c-met signal system in different stages of rat pancreatic development

完善的关键时期。尽管胰腺的发育从 E9 左右就开始发生,且 四种内分泌激素在胰腺胚胎发育的早期就可检测到,但分泌 这些激素的内分泌细胞尚不具备成熟的生物学功能,它们需 要经历典型胰岛的形成过程以及胚胎后期甚至出生后的进一 步成熟过程。典型的胰岛形成大约在 E17 左右开始,四种内

分泌细胞迁移,相互聚集黏附形成岛样结构,这个过程将持续到初生。多种因素共同参与相互作用,调节器官的发育分化及功能完善^[1,2]。本课题组利用芯片技术研究 E12.5、E15.5、E18.5、新生及成年五个阶段胰腺基因表达情况,提取它们的总 mRNA,并用基因芯片和 RT-PCR 的方法进行检测,以证明各时期的大鼠胰腺 mRNA 中有胰岛素、胰高血糖素、胰多肽的表达(结果未显示),提取出的组织为胰腺标本^[8,9]。芯片结果 c-met 在 E15.5、E18.5 时芯片的信号值相对于 E12.5、新生及成年特异高表达。并通过 RT-PCR 验证结果与芯片一致(图 4),强烈提示 c-met 在大鼠胰腺发育功能完善关键阶段发挥生物调控作用。c-met 的转录调控因子中,我们芯片检测到的在胰腺发育功能完善阶段起作用的有正向调控因子 TGF、Sp1、smad 及特殊的自身反向调控环路因子 notch。TGF 在在上皮细胞可诱导 c-met 的表达,Sp1 (ubiquitous special protein) 与 smad 蛋白形成的复合体通过 TGF 共同作用参与调控 c-met 的转录^[10]。Erg 又可作用于 SP1,从而发挥 c-met 转录表达的间接调控作用^[11]。M. Cristina 等在细胞水平研究发现, c-met 与 notch 所形成的是一个特殊信号调控环路。Notch 的激活后引起 c-met 转录的下调,抑制 c-met 信号系统功能。c-met 本身又可作为 notch 的刺激因子,反过来增强 notch 的表达^[12]。这些调控因子在 E15.5、E18.5 的特异高表达,与 c-met 表达趋势一致(图 1),旁证了 c-met 在大鼠胰腺发育功能完善关键阶段的调控作用。

c-met 属于肝细胞生长因子受体家族,作为一种酪氨酸蛋白激酶受体,由原癌基因 c-met 编码,酪氨酸蛋白激酶 (TPK) 在细胞的生长,增殖,分化等过程中起重要的调节作用。c-met 受体信号系统的激活首先是 c-met 上酪氨酸蛋白激酶 (PTK) 激活,激活的 PTK 先使受体自身酪氨酸磷酸化,同时受体自身酪氨酸磷酸化后进一步激活 PTK,PTK 再激活靶蛋白上的酪氨酸磷酸化,经过瀑布式的磷酸化反应,将外界信号逐级

放大,最终传至细胞核内,导致细胞增殖、分化。据目前文献报道 c-met 信号传导主要存在以下几种通路:①3-磷脂酰肌醇激酶(phosphatidylinositol-kinase, PI-3K)通路的激活;②细胞丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路的激活;③磷脂酶 C- γ -磷脂酰肌醇 PLC- γ -PI 通路的激活;④磷脂酶 A2(PLA2)及花生四烯酸(AA)通路的激活^[13,14]。其信号传导通路发挥作用有组织器官特异性。芯片结果显示在大鼠胚胎胰腺的发育过程中,c-met 信号传导主要是经过 MAPK 和 stat 通路。而 MAPK 的激活包括依赖 ras 和非 ras 依赖,芯片中并没有检测到 ras 的存在,故 c-met 胰腺中激活,可能是非 ras 途径,通过 PKC 激活 MAPK^[15,16]。信号系统激活后引起细胞核内一系列转录因子 c-fos、Akt 的表达,控制细胞生长及 DNA 合成,细胞周期素 A、B、D 和 E 等的含量也发生变化,最终细胞进入增值期^[17]。芯片所用探针位于 c-met 基因靠 3' 端区域,针对该端设计引物 RT-PCR 结果与芯片一致。c-met 由于剪接位点不同,人上皮细胞可表达多种 c-met 转录本,最终翻译成不同的 c-met 变异体^[18]。我们针对该基因 5' 端区域设计引物做 RT-PCR,表达趋势与芯片完全相反(图 4,图 5),初步提示 c-met 在胰腺发育功能完善过程中发挥作用也有可能在不同转录本。

综上所述,c-met 在大鼠胰腺发育的关键阶段通过其信号传导途径发挥调控作用,影响细胞的功能完善。并且在这一过程中极有可能存在不同的转录剪切本。对以往研究中信号通路对早期胚胎胰腺发育的调控作用提出了新的补充^[19-21],即某些生长因子介导的信号通路在胰腺发育的功能完善阶段同样存在生物调控。为各种先天性胰腺发育不良及各种后天性的胰腺疾病尤其是糖尿病的治疗提供了新的理论依据。c-met 在胰腺发育功能完善的细胞组织学定位及相应分子生物学机制是我们下一步研究的课题。

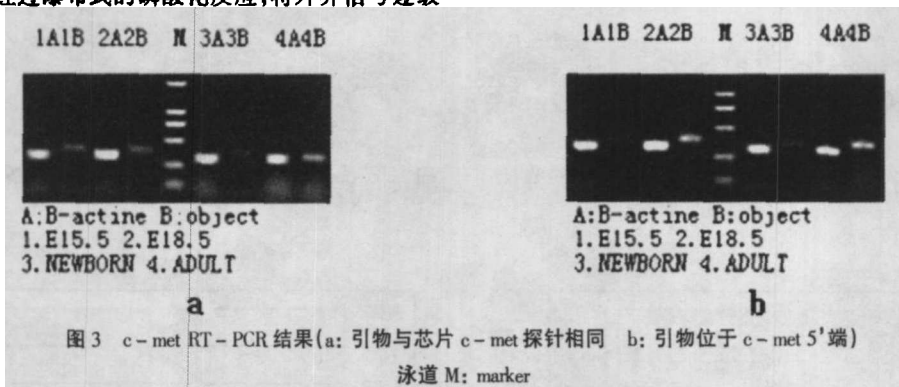


图 3 c-met RT-PCR 结果(a: 引物与芯片 c-met 探针相同 b: 引物位于 c-met 5' 端)

Fig 3 RT-PCR results of different primer

a: primer consistent with chips of c-met. b: primer at 5' termination of c-met

Line M: Marker; Lines 1-4: RT-PCR amplification products and control(1.E15.5 2.E18.5 3.newborn 4.adult)

图 4 c-met 胰腺发育各阶段芯片结果与 RT-PCR(a)结果趋势比较

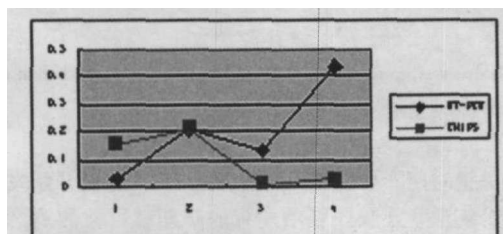


Fig 4 Trengcy of RT-PCR (a) and Gene Chips of c-met during different stages of rat pancreatic development

图 5 c-met 不同引物 RT-PCR 结果趋势比较

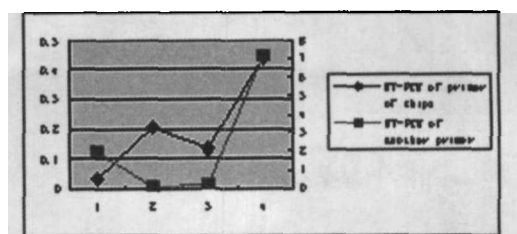


Fig 5 Trendency of RT-PCR (b) and RT-PCR(a)

(下转第 24 页)

- [10] Campbell - Thompson M, Reyher KK, Wilkinson LB Immunolocalization of estrogen receptor alpha and beta in gastric epithelium and enteric neurons [J]. J Endocrinol, 2001,171(1):65 - 73
- [11] Takano N, Iizuka N, Hazama S, et al. Expression of estrogen receptor - alpha and - beta mRNAs in human gastric cancer [J]. Cancer Lett, 2002,176(2):129 - 135
- [12] Rutherford T, Brown WD, Sapi E, et al. Absence of estrogen receptor - beta expression in metastatic ovarian cancer [J]. Obstet Gynecol, 2000,96(3):417 - 421
- [13] Park B W, Kim K S, Heo M K, et al. Expression of estrogen receptor - beta in normal mammary and tumor tissues: is it protective in breast carcinogenesis [J]? Breast Cancer Res Treat, 2003,80(1):79 - 85
- [14] Yang GS, Chen ZD. Comparative studies of the expression of estrogen receptor - alpha and estrogen receptor - beta in prostatic carcinoma. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2004,42(18):1111 - 1115
- [15] Foley EF, Jazayeri AA, Shupnik MA, Jazayeri O, Rice LW. Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon [J]. Cancer Res, 2000,60(2):245 - 248
- [16] Konstantinopoulos PA, Kominea A, Vandalos G, et al. Oestrogen receptor beta (Erbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation [J]. Eur J Cancer, 2003,39(9):1251 - 1258
- [17] Fixemer T, Remberger K, Bonkhoff H. Differential expression of the estrogen receptor beta (ERbeta) in human prostate tissue, premalignant changes, and in primary, metastatic, and recurrent prostatic adenocarcinoma [J]. Prostate, 2003,54(2):79 - 87
- [18] Sumi K, Matsuyama S, Kitajima Y, et al. Loss of estrogen receptor beta expression at cancer front correlates with tumor progression and poor prognosis of gallbladder cancer [J]. Oncol Rep, 2004,12(5):979 - 984
- [19] Jassam N, Bell SM, Speirs V, et al. Loss of expression of oestrogen receptor beta in colon cancer and its association with Dukes' staging [J]. Oncol Rep, 2005,14(1):17 - 21
- [20] Wada - Hiraike O, Imanov O, Hiraike H, et al. Role of estrogen receptor? in colonic epithelium [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(8):2959 - 2964
- [21] Lazennec G. Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis [J]. Cancer Lett, 2006,231(2):151 - 157
- [22] Matsuyama S, Ohkura Y, Eguchi H, et al. Estrogen receptor beta is expressed in human stomach adenocarcinoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2002,128(6):319 - 324
- [23] Scobie GA, Macpherson S, Millar MR, et al. Human oestrogen receptors: differential expression of ER alpha and beta and the identification of ER beta variants [J]. Steroids, 2002,67(12):985 - 992
- [24] Hirata S, Shoda T, Kato J, et al. Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans [J]. Trends Endocrinol Metab, 2003,14(3):124 - 129 (图1请见封3)

(上接第20页)

参考文献

- [1] Habener JF, Kemp DM, Thomas SK, et al. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development [J]. Endocrinology, 2005, 146: 1025 - 1034
- [2] Schwitzgebel VM, Scheel DW, Connors JR, et al. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas [J]. Development, 2000,127:3533 - 3542
- [3] Ohnishi T, Daikuhara Y. Hepatocyte growth factor/scatter factor in development inflammation and carcinogenesis: its expression and role in oral tissues [J]. Arch Oral Biol, 2003,48(12):979 - 804
- [4] Dekel B, Biton S, Yerushalmi GM, et al. In situ activation pattern of Met docking site following renal injury and hypertrophy [J]. Nephrol Dial Transplant, 2003,18(8):1493 - 1504
- [5] Yasuda S, Goto Y, Bata T, et al. Enhanced secretion of cardiac hepatocyte growth factor from an infarct region is associated with less severe ventricular enlargement and improved cardiac function [J]. Am Cardiol, 2000,36:115 - 121
- [6] Ahsuda S, Sawa Y, Yamaguchi T, et al. Gene transfer of hepatocyte factor improves angiogenesis and function of chronic ischemic myocardium in canine heart [J]. Ann Thorac Surg, 2003,5(4):283 - 287
- [7] 倪雪峰,袁栋,程志祥,等.巢蛋白在大鼠胚胎、新生及成年胰腺中的表达变化 [J].第四军医大学学报,2004,25(3):193 - 196
- [8] 仲燕,袁栋,袁庆新,等.大鼠胚胎胰腺外分泌功能基因的表达调控 [J].世界华人消化杂志,2004,12(8):1988 - 1990
- [9] 周锦永,胡静静,仲燕,等.大鼠不同发育时期胰腺相关蛋白的差异表达 [J].生物化学与生物物理学进展,2004,31(12):1106 - 1113
- [10] Xianghong Zhang, Junwei Yang, Yingjian Li, et al. Both Sp1 and Smad participate in mediating TGF - beta1 - induced HGF receptor expression on renal epithelial cells [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2005,288: F16 - F26
- [11] Xianghong Zhang, Youhua Liu. Suppression of HGF receptor gene expression by oxidative stress is mediated through the interplay between Sp1 and Egr - 1 [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003,284:F1216 - F1225
- [12] Stella MC, Trusolino L, Pennacchietti S, et al. Negative feedback regulation of Met - dependent invasive growth by Notch [J]. Mol Cell Biol, 2005,25(10):3982 - 3996
- [13] Maulik G, Shrikhande A, Kijima T, et al. Role of the hepatocyte growth factor receptor c - Met in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002,13(1):41 - 59
- [14] Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins [J]. Oncogene 2000, 19(49):5582 - 5589
- [15] Gines P, Li X, Zammarrin JL, et al. Tyrosine kinase growth factor receptors but not seven - membrane spanning receptors or phorbol esters activate mitogen - activated protein kinase in rat hepatocytes [J]. Hepatology, 1995,22:1296 - 1303
- [16] Adachi T, Nakashima S, Saji S, et al. Mitogen - activated protein kinase activation in hepatocyte growth factor - stimulated rat hepatocytes: involvement of protein tyrosine kinase and protein kinase C [J]. Hepatology, 1996,23:1244 - 1253
- [17] Gomez Lechon MJ, Guillen I, Ponsoda X, et al. Regulation of amyloid precursor protein expression and secretion via activation of ERK1/2 by hepatocyte growth factor in HEK293 cells transfected with APP751 [J]. Hepatology, 1996,23:1012 - 1019
- [18] Rodriguez GA, Naujokas MA, Park M. Alternative splicing generates isoforms of the met receptor tyrosine kinase which undergo differential processing [J]. Mol Cell Biol, 1991,11:2962 - 2970
- [19] Kim SK, Hebrok M. Intercellular signals regulating pancreas development and function [J]. Genes Dev, 2001,15:111 - 127
- [20] Servitja JM, Ferrer J. Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function [J]. Diabetologia, 2004,47:597 - 613
- [21] Kume S. The molecular basis and prospects in pancreatic development [J]. Dev Growth Differ, 2005,47:363 - 374