

*Ngn3*基因及其转录调控网络在胰腺内分泌发育与功能调控中的作用

高 勇¹ 喻 萍² 蔡 涛³ 陈 翔^{1*}

(¹温州医学院附属第二医院康复科, 温州 325027; ²温州医学院基因组医学研究院, 温州 325027;

³美国国立卫生研究院, 美国华人干细胞协会, 贝塞斯达 20892-4322)

摘要 *Ngn3*(neurogenin 3)基因及其直接靶基因*NeuroD1*(neurogenic differentiation 1)和*Islet-1*(insulin gene enhancer binding protein-1)是一类胰岛转录因子(islet transcription factors, ITFs)调控基因。*Ngn3*基因及其转录调控网络在小鼠和人胚胎胰腺内分泌细胞发育、胰岛素的产生和分泌及重编程干细胞或非β细胞生成胰岛素分泌β细胞中起着重要的调控作用。新近的研究发现, *INSM1*(insulinoma associated 1)和*INSM2*(insulinoma associated 2)基因家族成员也是*Ngn3*基因的直接靶基因, 初步证明了*INSM1/INSM2*基因对胰腺内分泌发育可能起重要的调控作用, 进一步补充和完善了*Ngn3*转录调控网络。因此, 深入理解*Ngn3*基因及其转录调控网络, 尤其是*INSM1/INSM2*基因对胰岛发育和成熟胰岛细胞命运的分子调控机制, 将有助于研究胰腺内分泌疾病和内分泌发育疾病, 特别是糖尿病的病因、治疗和预防。为此, 就近年来*Ngn3*基因及其转录调控网络的研究进展作一综述。

关键词 *Ngn3*; *INSM1*; *INSM2*; 转录调控网络; 胰腺内分泌; 胰岛细胞; 胰岛素

Role of *Ngn3* Gene and Its Transcriptional Regulatory Network in Pancreatic Endocrine Development and Function

Gao Yong¹, Yu Ping², Cai Tao³, Chen Xiang^{1*}

(¹Rehabilitation Department, the 2nd Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China;

²The Institute of Genome Medicine of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China;

³Experimental Medicine Section, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Chinese Stem Cell Association of USA, Bethesda 20892-4322, USA)

Abstract *Ngn3* (neurogenin 3) and its direct targets *NeuroD1* (neurogenic differentiation 1), *Islet-1* (insulin gene enhancer binding protein-1), *INSM1* (insulinoma associated 1) are core ITFs (islet transcription factors) regulatory genes. Recent reports demonstrate that *Ngn3* and its transcriptional regulatory network play an important role in embryonic pancreatic endocrine cell or islet development and insulin production and secretion, as well as reprogramming stem cells or non-β cells into insulin producing and secreting β cells. Further investigation of how *Ngn3* and its network including *INSM1/INSM2* (insulinoma associated 2) determine islet development and mature islet cell fate help to understand the causes, treatment and prevention of pancreatic endocrine disease like diabetes.

收稿日期: 2013-02-25 接受日期: 2013-04-15

浙江省科技厅钱江人才项目(批准号: 2009R10024)和浙江省自然科学基金(批准号: Y12H170002)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-8802053, E-mail: chenxiangnj2005@yahoo.com.cn

Received: February 25, 2013 Accepted: April 15, 2013

This work was supported by the Science Technology Department of Zhejiang Province Funded Qianjiang Talents Project (Grant No.2009R10024) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.Y12H170002)

*Corresponding author. Tel: +86-577-8802053, E-mail: chenxiangnj2005@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2013-06-08 11:01 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130608.1101.001.html

Hence, we reviewed some recent progresses of *Ngn3* and its transcriptional regulatory network studies.

Key words *Ngn3*; *INSM1*; *INSM2*; transcriptional regulatory network; pancreatic endocrine; islet cell; insulin

Ngn3(neurogenin 3)基因及其转录调控网络主要调控胰腺内分泌发育,对胰岛的形成、成熟胰岛细胞命运的维持起重要调控作用。近年来,随着胰腺内分泌疾病和内分泌发育疾病,尤其是糖尿病病例的不断增多,*Ngn3*基因及其转录调控网络的研究也倍受关注。经过研究人员的不断探索,*Ngn3*基因及其转录调控网络在胰腺内分泌发育和胰岛发育过程中的分子机制被逐渐揭开。为了解*Ngn3*基因及其转录调控网络的研究现状并为进一步的研究提供了理论基础,我们就近年来有关*Ngn3*基因及其转录调控网络研究的文献报道作一综述。

1 *Ngn3*基因及其转录调控网络对胰腺内分泌细胞发育或胰岛发育的作用

小鼠胚胎发育时期,胰腺的发育始于前肠(forgut),由背侧和腹侧原基(anlagen)组成。随着发育的进程,成熟的胰腺内分泌细胞聚集,定位于胰岛(islets of langerhans),散布于整个外分泌胰腺组织中。胰岛含有5种内分泌细胞,即生成胰岛素的 β 细胞,生成胰高血糖素的 α 细胞,生成生长素抑制素的 δ 细胞,生成胰多肽素的PP细胞和生成生长素的 ϵ 细胞^[1]。

胰腺内分泌的发育,依赖于一系列的转录因子所形成的调控网络的复杂作用。在胰腺内分泌发育过程中,*Pdx-1*(pancreas/duodenum homeobox protein-1)基因编码的Pdx-1蛋白通过特异性结合*Ngn3*基因上游启动子调控*Ngn3*(neurogenin 3)阳性

细胞中*Ngn3*基因的表达,*Ngn3*基因编码的Ngn3蛋白能调控一系列转录因子基因,如*NeuroD1*(neurogenic differentiation 1)、*INSM1*(insulinoma associated 1)、*Islet-1*(insulin gene enhancer binding protein-1)和*INSM2*(insulinoma associated 2)等^[2-8]的表达,这些转录因子基因及其蛋白通过复杂的网络调控胰腺内分泌发育和胰岛发育。鉴于这些转录因子在胰腺内分泌发育中的表达特点已有综述,我们主要就*Ngn3*基因及其转录调控网络在胰腺内分泌发育及胰岛发育过程中的功能及相关基因敲除小鼠的命运作一总结(表1)。

*Pdx-1*基因编码的Pdx-1是胰腺发育的一个关键的转录因子,*Pdx-1*基因剔除小鼠出现胰腺发育缺失^[9]。Pdx-1表达于小鼠胚胎E8.5天时所有的胰腺祖细胞和肠祖细胞中,在胰腺发育的后期能控制胰腺内分泌和外分泌组份的平衡^[10]。它在胰岛 β 细胞的失活可导致 β 细胞功能的缺失,从而导致小鼠糖尿病^[11]。因此,*Pdx-1*对胰腺的发育和胰岛 β 细胞功能的维持必不可少。

Notch信号依赖的分子网络在平衡胰腺祖细胞向内分泌细胞和导管上皮细胞的分化过程中起重要作用。其一直被认为在胰腺发育过程中能抑制胰腺祖细胞的分化进程,但最近的研究发现,Notch能启动胰腺内分泌和导管上皮细胞的分化^[12]。Notch的高表达可阻断胰腺内分泌分化进程,同时诱导*Ngn3*阻遏蛋白*Hes1*(transcription factor HES-1)基因

表1 决定胰腺内分泌细胞命运的*Ngn3*及其直接靶基因
Table 1 Genes required for determination of pancreatic endocrine cell fate

基因 Gene	在胰腺细胞中的表达 Expression in the pancreas cells	在胰腺内分泌细胞分化中的功能 Function in the specification of pancreatic endocrine cells	基因敲除对胰岛细胞的影响 Islet cells affected by knockout
<i>Ngn3</i>	Endocrine progenitor cell	Required for all	All(lost)
<i>NeuroD1</i>	Endocrine progenitor cell and Islet cell	Required for all	All(reduced)
<i>INSM1</i>	Endocrine progenitor cell	Required for all	All(reduced)
<i>Islet-1</i>	Endocrine progenitor cell and Islet α cell	Required for all	All(reduced)
<i>INSM2</i>	Islet cells in developing and adult pancreas	Unknown	Unknown

遗传分析表明这些基因在胰腺发育中表达,并提示了其在胰岛发育中的作用。

Genetic analysis shows expression of these genes in the developing pancreas and implicates their roles in the development of islet.

表达。此外, Notch能激活*Sox9*(SRY-box containing gene 9)的表达, 后者在胰腺内分泌细胞和导管细胞分化过程中起重要作用。*Sox9*在*Pdx-1*阳性胰腺内分泌祖细胞中高表达, 在成熟的胰岛内分泌细胞中低表达。*Sox9*缺失小鼠胰岛β细胞数量显著减少, 并且成年后葡萄糖耐受不良, 形成MODY4^[13]。*Sox9*过表达显著增加了胰岛细胞的数量, 同时上调相应转录因子和胰岛素的表达^[12]。

CTNNB1/CREBBP(β-CaTeNIN/CREB binding protein)信号在胰腺内分泌发育和胰岛素分泌中起重要作用。CTNNB1/CREBBP是非特异性转录因子, 位于*Pdx-1*下游, 几乎在所有胰腺内分泌祖细胞中表达, 在胚胎胰腺发育过程中及维持成熟β细胞的功能中起重要作用^[14]。阻断CTNNB1/CREBBP信号可导致代谢障碍如2型糖尿病的产生及相应下游转录因子基因如*Hnf1*、*Ngn3*等表达的下调^[15]。

*Ngn3*基因编码含214个氨基酸序列的蛋白^[16], 是碱性螺旋-环-螺旋bHLH(basic helix-loop-helix)转录因子家族成员之一。*Ngn3*主要在胚胎发育期的胰腺、神经管和下丘脑组织表达^[17], 是胚胎时期决定胰腺内分泌细胞命运的重要因子^[18]。*Ngn3*在胰腺发育过程中短暂表达, 在小鼠胚胎E9.5-E11.5天达到高峰期, 随后表达逐渐减少。*Ngn3*是胰腺内分泌祖细胞的标记, 也是胰岛发育的关键^[19-20]。*Ngn3*基因剔除小鼠胚胎和胰腺外分泌发育未见异常, 但胰腺内分泌发育受阻, 相应的胰岛转录因子无表达, 胰岛无法形成, 同时葡萄糖感应系统缺失, 小鼠产后死于糖尿病^[4,18,21]。在小鼠胚胎时期胰岛素分泌细胞和成年小鼠*Pdx-1*表达的胰岛细胞中, *Ngn3*失活小鼠胰腺内分泌功能严重受损, 伴有促胰岛细胞分化、成熟和维持胰岛细胞功能的靶基因表达下调^[22]。*Ngn3*的严重不足, 可导致新生儿永久性糖尿病中的一种罕见的新亚型^[20]。遗传分析表明, 位于*Ngn3*基因螺旋(helix) II区的E123X缺失, 可导致新生儿早产, 胰腺虽然存在, 但出现新生儿的糖尿病^[23]。*Ngn3*的异位表达, 可直接上调*NeuroD1*基因的表达, 导致小鼠早产和胰岛细胞异位分化, 胰岛细胞主要生成胰高血糖素^[2]。

*NeuroD1*基因编码含356个氨基酸序列的*NeuroD1*蛋白^[24], 是bHLH转录因子家族成员之一。*NeuroD1*主要在胰腺内分泌细胞、脑和肠细胞中表达, 可激活胰岛素基因转录, 并能诱导神经元的分化^[2]。

*NeuroD1*是决定胰腺内分泌细胞命运和胰岛素基因表达的一个重要调节因子。其表达可见于小鼠胚胎E13.5天胰岛内分泌细胞中, E15.5天后其表达继续增加。*NeuroD1*的过表达可促使胰腺祖细胞向内分泌细胞的分化^[25]。在成熟的胰腺, *NeuroD1*在胰岛细胞表达水平可维持成熟胰岛细胞的不同命运。*NeuroD1*基因缺失小鼠的胚胎胰腺无法形成成熟的胰岛, 胰岛素生成的β细胞的数量显著减少, 其它类型的胰岛内分泌细胞的数量也有不同程度的减少, 不能形成成熟的胰岛, 故小鼠出现重度的糖尿病, 死于围产期^[2]。

*Islet-1*基因编码含349个氨基酸序列的蛋白^[26], 是LIM同源盒基因家族成员之一。*Islet-1*主要在肾上腺髓质、背根神经节以及胚胎发育时期胰腺以及成熟的胰岛细胞中表达, 在视网膜内核和神经节细胞层, 松果体和大脑某些区域的神经元亚群也有表达^[27-28]。*Islet-1*在胰腺发育不同阶段均起作用。*Islet-1*位于*NeuroD1*下游, 是胚胎背侧胰腺间质和胰岛细胞增殖和维持内分泌细胞存活的关键。*Islet-1*的表达在胚胎E9.5-E13天达到高峰, 随后逐渐减少, *Islet-1*基因剔除小鼠胚胎背侧胰腺间质细胞、胰腺外分泌细胞和胰岛细胞分化受阻, 完全未见成熟的胰岛细胞, 但腹侧胰腺发育未受影响, 从而提示*Islet-1*在胰腺发育早期起重要作用^[28]。在小鼠胚胎E13.5天, *Islet-1*基因在胰岛细胞特异性地缺失可导致胰腺内分泌细胞的增殖受损, 胰岛功能的缺失, 胰腺内分泌激素无法表达, 随后发展成为严重的糖尿病^[6,29-30], 从而证明了*Islet-1*在胰腺增殖阶段对胰腺内分泌细胞成熟、增殖和存活均起重要作用。*Islet-1*在成熟的胰岛细胞亦有表达, 在体外培养葡萄糖氧化酶刺激胰腺细胞模型与1型和2型糖尿病小鼠模型中, 发现*Islet-1*的表达上调, 而胰岛素的分泌却没有增加^[31]。

*INSM1*基因编码含510个氨基酸序列的INSM1蛋白, 称胰岛素瘤相关蛋白1或IA-1(zinc finger protein IA-1), 是*Snail*/*Gfi1*转录超抑制家族成员^[32]。*INSM1*主要在发育阶段的神经内分泌组织表达, 特别是在中枢神经组织、胰岛和神经内分泌肿瘤中有较高的表达^[32-34]。*INSM1*在所有类型的胰腺内分泌细胞, 包括成熟和未成熟的胰岛细胞中都有表达。在胰腺内分泌祖细胞中*INSM1*表达与*Ngn3*有部分重叠, 在胚胎E10.5-E11.5天达到高峰期, 胚胎E18.5

天后减少或消失^[35]。*INSM1*基因敲除小鼠胚胎胰腺仍有内分泌祖细胞形成,但仅有少量的胰岛 α 细胞、 δ 细胞、PP细胞、 ϵ 细胞和胰岛素阳性 β 细胞产生,即内分泌祖细胞有积聚,但无胰腺内分泌激素表达,此外,与胰岛素信号通路的相应转录因子基因的表达均显著下调^[36]。*INSM1*^{-/-}小鼠出生时因呼吸障碍死亡,表明这些小鼠还存在其他未探明的*INSM1*功能。

*INSM2*基因编码含566个氨基酸序列的INSM2蛋白,称为胰岛素瘤相关蛋白2或IA-6(zinc finger protein IA-6),是*Snail/Gfi1/INSM1*转录抑制超家族的新成员,其结构与*INSM1*高度相似^[8,37]。*INSM2*主要在大脑皮质的神经细胞、心脏、骨骼肌、肾上腺和胰腺的胰岛细胞表达,此外在脾、胃、肝、肾和睾丸也有表达^[8,37]。在小鼠胰腺内分泌发育过程中,*INSM2*主要在胰岛细胞中表达,其表达与*Ngn3*和*NeuroD1*有部分重叠,在胚胎E10.5-E13.5天达到高峰期,E15.5后逐渐减少^[8]。在人胚胎胰腺发育过程中,*INSM2*只表达于胰岛细胞中,且其表达与*Ngn3*和*NeuroD1*的表达相关。在成熟的胰腺,其表达亦可见于胰岛素生成的 β 细胞和胰高血糖素生成的 α 细胞^[8]。关于其在胰岛发育及成熟胰岛细胞命运维持中的作用,仍需*INSM2*基因剔除小鼠开展研究并进行进一步验证。

MafA(V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A)基因编码的MafA蛋白是巨噬细胞激活因子家族成员。MafA是 β 细胞特异性的转录因子,其表达始于胚胎E13.5天,随后持续表达。在胰岛 β 细胞发育过程中,其表达位于*Islet-1*下游。在*MafA*缺失的小鼠胚胎,胰岛发育不受影响,但胰岛细胞丧失了对葡萄糖感应,不能生成胰岛素^[38]。这表明虽然其在胰岛细胞发育过程中作用可被替代,但在胰岛素产生和分泌中起到了不可忽视的重要作用。

Nkx6.1(homeobox protein Nkx 6.1)位于*NeuroD1*

的下游,是NK家族的同源异构基因,主要在胚胎E9.5-E13天的 β 细胞表达^[39-40]。*Nkx6.1*基因缺失的小鼠胚胎胰腺 β 细胞前体缺失,同时 β 细胞的数量降低^[41]。因此,在胰岛细胞分化中,*Nkx6.1*对 β 细胞的生成起重要作用。

2 *Ngn3*基因及其转录调控网络在胰岛素产生和分泌过程中的调控作用

成年哺乳动物的血液中胰岛素主要来源于胰岛 β 细胞。在胰岛素合成的复杂过程中,胰岛 β 细胞特异性转录因子通过与胰岛素基因启动子结合调控转录过程,进而调控胰岛素的产生和分泌^[42](图1)。胰岛素基因的核心启动子区的转录调控元件位于转录起始位点上游-208~239 bp处,由E1/E3、A3/A4和RIPE3b/C1三个元件组成,其序列高度保守,其中RIPE3b/C1在胰岛素基因转录过程中起核心作用^[43]。

Pdx-1被认为是胰岛素基因转录的关键调节因子,它能促进组蛋白H3的乙酰化,乙酰化的组蛋白H3通过结合胰岛素启动子E1和A3元件上调胰岛素基因的表达^[22]。而Pdx-1的过表达则会抑制胰岛素基因的转录。*Ngn3*不能直接作用于胰岛素基因启动子,基因缺失和突变分析表明*NeuroD1*启动子近端E1盒(E1 box)和E3盒(E3 box)结合区能与*Ngn3*/E47二聚体结合促进胰岛素基因转录,*Ngn3*缺失可导致*NeuroD1*启动子激活的胰岛素基因表达的下调。此外,*Ngn3*/E47二聚体可选择性地结合和激活胰岛素启动子*INSM1*结合位点的E3元件上调胰岛素基因的表达。近年的研究发现,内源性的*Ngn3*在CBP(CREB-binding protein)的辅助下激活*INSM1*启动子,亦可诱导人类神经胶质细胞瘤细胞株组蛋白H3/H4染色体高度乙酰化,上调胰岛素基因表达^[3]。这表明*Ngn3*可通过调控*NeuroD1*和*INSM1*,诱导胰岛素基因的表达上调。*NeuroD1*除了在 β 细胞发育过程中表达,在成熟的 β 细胞中也有表达,*NeuroD1*

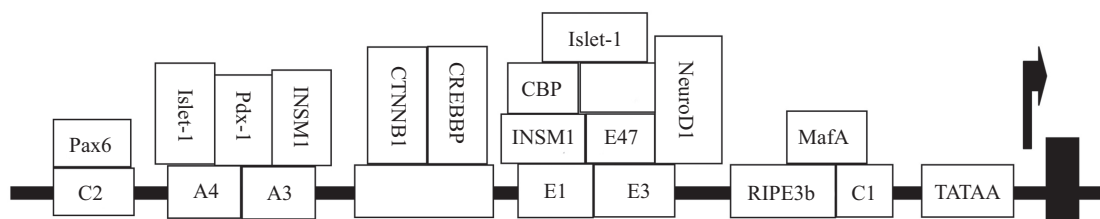


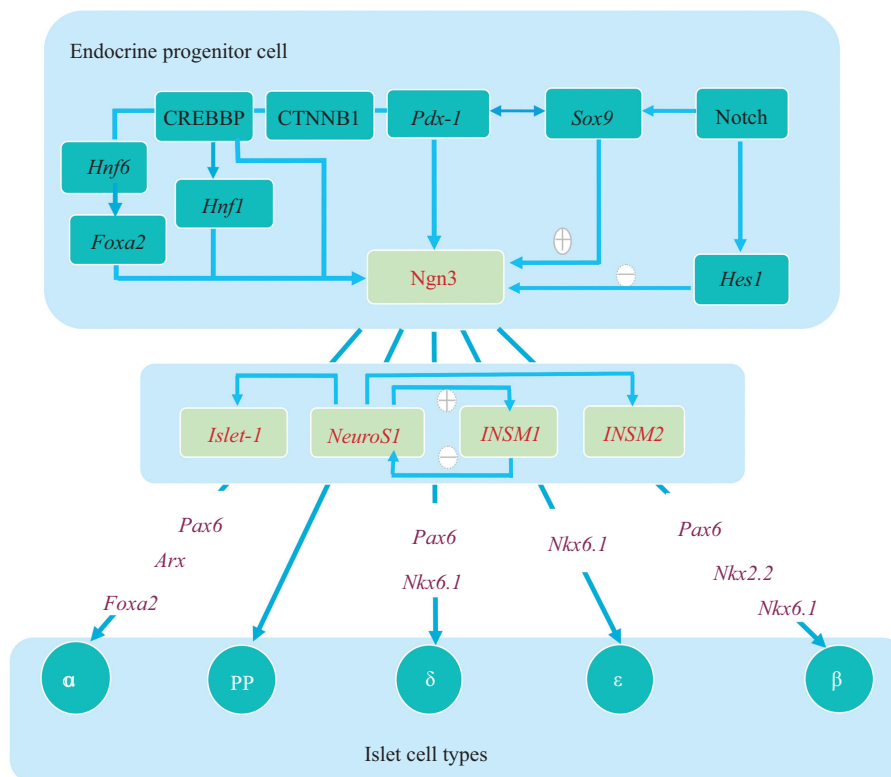
图1 *Ngn3*转录调控网络在小鼠胰岛素基因上游调控序列的作用示意图

Fig.1 Diagram of *Ngn3* transcriptional network in the upstream regulatory sequence of mouse

还能促进组蛋白H3的乙酰化, 结合INSM1和胰岛素启动子E1/E3元件和A3元件, 上调胰岛素基因的表达^[44-45]。如前文所述, *NeuroD1*纯合子突变导致新生儿糖尿病和神经系统异常综合征, 但*NeuroD1*^{-/-}的小鼠胰腺Ngn3的表达不受影响, 胰岛素基因仍有表达^[21,46], 提示胰岛素基因的表达还存在其他调控通路。*Islet-1*可结合于胰岛素基因上游的核心启动子, 增强子调控序列A3/A4元件, 该序列与Pdx-1的结合位点邻近。*Islet-1*的LIM区和*NeuroD1*的bHLH结构域直接结合协同激活胰岛素基因的转录, *Islet-1*^{-/-}小鼠胰岛发育受阻, 整个胰岛均缺失, 删除*Islet-1*的2个LIM区能下调胰岛素基因的转录激活率^[30]。*MafA*能够结合和激活胰岛β细胞胰岛素基因启动子C1元件, 上调胰岛素基因的表达^[43]。*MafA*缺失小鼠β细胞功能减退, 胰岛素基因的表达下调^[29]。INSM1

可介导早期胰岛发育中的胰岛素基因的转录, 体内ChIP(chromatin immunoprecipitation)分析证实INSM1占据了内源性胰岛素启动子的E3元件上调胰岛素基因的表达, 但INSM1过表达对胰岛素转录无抑制作用^[47-48]。INSM2的氨基酸序列与INSM1高度相似, 其近端启动子部分10个E盒, 其中E1盒和E2盒均可被Ngn3或*NeuroD1*激活^[8]。如前所述, 小鼠*INSM2*基因启动子近端E1盒和E2盒是Ngn3和*NeuroD1*的直接作用位点。E1/E3元件是胰岛素启动子转录起始的关键元件, INSM2可能通过其启动子上的E1盒或E3盒与胰岛素启动子E1/E3元件相结合, 介导胰岛发育过程中或成熟β细胞中胰岛素基因的转录。

以上研究表明, 任何胰岛转录因子基因及其蛋白单独作用, 均不能使胰岛素基因的表达处于正常水平。*Ngn3*基因及其转录调控网络可能以某种方式



图为推测的Ngn3转录网络参与胰腺内分泌细胞分化或胰岛发育的调控(蓝色箭头)。Ngn3是内分泌祖细胞的标记, 促使各类型胰岛细胞的分化, 在胰岛发育的核心调控网络中, Ngn3能直接激活*Islet-1*、*NeuroD1*和*INSM1/INSM2*(红色字体)。在胰岛内分泌发育体系中, Ngn3上游调控因子包括*Pdx-1*(CTNNB1/CREBBP信号)和Notch信号通路(包括*Sox9*和*Hes1*)。标记为紫色的基因参与不同胰腺内分泌细胞的分化过程(详见上下文)。The hypothetical Ngn3 transcriptional regulatory network is involved in the pancreatic endocrine cells or islet development(blue arrows). Ngn3 is a biomarker of progenitor cells, which gives rise to all five types of islet cells. *Islet-1*, *NeuroD1* and *INSM1/2*(in red) are directly activated by Ngn3 in the core program for islet development. Upstream regulators of Ngn3 include *Pdx-1*(including CTNNB1/CREBBP signal) and Notch signaling pathway (including *Sox9* and *Hes1*) in the pancreatic developing systems. Genes listed in purple are required for various islet cell development, as described in the context.

图2 Ngn3转录调控网络

Fig.2 Ngn3-mediated transcriptional regulatory network

相互作用,从而激活胰岛素基因启动子,使胰岛素的表达与机体需要相平衡。但其具体作用途径及机制仍未明确,尚需进一步探讨。例如, *INSM2* 基因敲除对胰岛素基因的转录及胰岛素的表达和分泌有何作用及 *INSM2* 与其他胰岛转录因子基因及其蛋白的相互作用,仍有待深入研究。

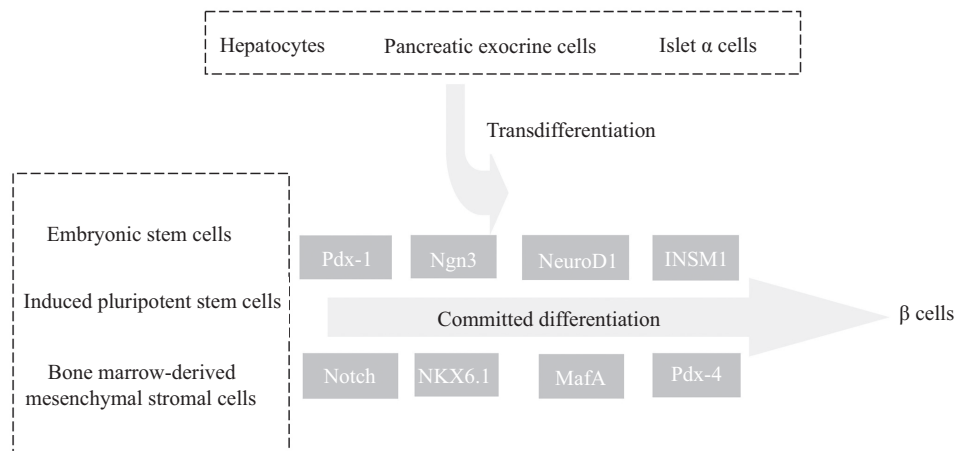
3 *Ngn3* 基因及其转录调控网络相互作用的研究进展

对 *Ngn3* 基因及其转录调控网络的相互作用,在不同种属的中枢神经组织,甲状腺、肾上腺、胸腺和胰腺等内分泌器官的发育均有深入研究,本文主要就其在胰腺内分泌发育过程的相互作用作一简介(图2)。

Pax-1 是内分泌祖细胞的标记,在胰腺发育早期的内分泌祖细胞中, *Pax-1* 通过与 *Ngn3* 基因一个进化高度保守的增强子区域的结合,直接调控 *Ngn3* 的表达。此外, *Pax-1* 还可通过结合 CTNNB1/CREBBP 信号^[15] 及其下游 *Hnf1*、*Foxa2* 和 *Hnf6* 的调控序列激活 *Ngn3* 增强子的表达,间接调控 *Ngn3* 转录调控网络。在内分泌祖细胞中, Notch 能诱导 *Ngn3* 阻遏蛋白 *Hes1* 与 *Sox9* 的表达^[43], *Sox9* 能调控 *Pdx-1* 和 *Ngn3* 的表达,但对 *Foxa2* 和 *Hnf6* 的表达均无影响^[13], 故 *Ngn3* 表达的调控极为复杂。

在小鼠胚胎胰腺发育的早期, *Ngn3* 的表达与 *NeuroD1* 的表达有部分重叠。 *Ngn3* 基因突变导致 *NeuroD1*、*Islet-1*、*INSM1* 和 *INSM2* 表达的显著减少

或缺失^[8,21,35]。 *Ngn3* 的过表达能诱导爪蟾胚胎胰腺 *NeuroD1* 的异位表达和上调内分泌细胞系中的内源性 *NeuroD1* mRNA 表达^[22]。此外,通过研究 *Ngn3* 基因敲除小鼠胚胎胰腺发育过程,证明 *INSM1* 是 *Ngn3* 的靶基因,但位于 *NeuroD1*、*Pax4* (paired box protein Pax-4)、*Arx* (aristaless-related homeobox) 和 *Pax6* (paired box protein Pax-6) 基因的上游^[35]。在 *Islet-1* 基因剔除小鼠中, *Pax6* 和 *MafA* 的表达缺失,但 *NeuroD1* 仍有表达^[10,28,49],提示 *NeuroD1* 位于 *Islet-1* 的上游,而 *Pax6* 和 *MafA* 位于 *Islet-1* 的下游。生化研究发现, *Islet-1* 能与 *MafA* 基因启动子3区结合而发挥作用,从而提示 *MafA* 是 *Islet-1* 的直接作用因子。 *Foxa2* 和 *Arx* 是 *Islet-1* 的靶基因,在胰岛 α 细胞分化过程中起重要作用^[50]。对 *INSM1* 基因突变小鼠胰腺内分泌细胞命运的研究证实了 *INSM1* 位于 Notch 信号与 *Ngn3* 的下游。在 β 细胞的发育过程中, *Ngn3* 激活 *INSM1* 短暂地表达,从而调节其靶基因 *NeuroD1* 和胰岛素基因的表达。 *INSM1* 能上调 *Pax6*、*Nkx6.1* 和 2 种胰岛特异性转录因子 *NeuroD1* 和 *Pdx-1* 的表达,而 *Pdx-1*、*Nkx2.2* (homeobox protein Nkx-2.2)、*NeuroD1*、*Pax4* 和 *Ngn3* 的表达不受影响。生化研究发现, *INSM1* 可抑制其靶基因 *NeuroD1* 和胰岛素基因的转录,以及抑制自身基因的表达^[44,48]。 *INSM1* 异位表达可直接上调胰岛素基因、*Pax6* 和 *Nkx6.1* 基因的表达,轻度下调 *Pdx-1* 和 *NeuroD1* 基因的表达。以上研究表明, *INSM1* 位于 *Ngn3* 的下游,也可受 *NeuroD1* 的调控,对 *Neu-*



重编程研究表明, *Ngn3* 转录调控网络在诱导干细胞和非 β 细胞向 β 细胞分化过程中起重要调控作用。

The reprogramming studies indicate that *Ngn3* transcriptional regulatory networks play an essential role in induced differentiation of stem cells or non- β -cells into β -cells.

图3 重编程干细胞和非 β 细胞向 β 细胞分化

Fig.3 Reprogramming of stem cells or non- β cells into β cells

*roD1*的表达有双重作用。基因突变和染色质免疫沉淀实验分析表明,小鼠*INSM2*基因启动子近端E1盒和E2盒是*Ngn3*和*NeuroD1*的直接作用位点^[8]。*INSM2*是*Ngn3*转录调控网络一个重要的靶基因,受*Ngn3*和*NeuroD1*调控,在胰岛分化的*Ngn3/NeuroD1*信号级联中可能扮演了重要的角色。

在成熟的 β 细胞中,*NeuroD1*、*Islet-1*、*INSM2*和胰岛素均有表达,而*INSM1*和*Ngn3*基因的表达则较难检出,提示*INSM1*和*Ngn3*可能是一类短效分化因子,在内分泌细胞分化早期调控多种胰岛转录因子的表达^[8,51]。

4 *Ngn3*基因及其转录调控网络在重编程干细胞及非 β 细胞生成胰岛素分泌 β 细胞中的作用

哺乳动物的干细胞和肝细胞有高度的再生和分化潜力,在胚胎发育过程中,胰腺和肝脏的发育同时起源于胚芽形成的阶段,故干细胞和肝细胞被认为是胰腺内分泌组织再生的潜在来源。胰腺内分泌祖细胞中*Ngn3*基因及其转录调控网络协同决定 β 细胞的命运,提供了糖尿病细胞治疗的新思路——转录因子共表达重编程干细胞或非 β 细胞转分化成胰岛素分泌的 β 细胞^[52](图3)。近年来的研究证实了*MafA*单独重编程胎盘源性诱导多能干细胞(Induced pluripotent stem cells, iPSC)向胰岛素分泌的 β 细胞分化^[53]。*Pdx-1*和*Ngn3*共表达重编程人骨髓间充质细胞分化成对葡萄糖敏感的胰岛素分泌型的胰腺内分泌细胞^[54]。*Pdx-1*、*MafA*和*Ngn3/NeuroD1*共表达可重编程小鼠胚胎干细胞分化为胰岛素分泌细胞^[55],但分化率仍然很低,无法形成成熟的功能性 β 细胞。*Pdx-1*单独重编程肝细胞转分化为胰岛素生成 β 细胞,*NKX6.1*和*Pdx-1*共表达重编程能上调肝细胞转分化生成 β 细胞的胰岛素分泌量, β 细胞对葡萄糖的敏感性增加,但转分化细胞的数量并未增加^[56]。*Pdx-1*、*Ngn3*和*MafA*共表达可重编程链脲霉素(streptozotocin, STZ)诱导的NOD-SCID(非肥胖型糖尿病重症联合免疫缺陷)小鼠肝细胞向胰岛素分泌细胞的分化,结果生成了葡萄糖敏感的胰岛素分泌细胞群,然而胰岛素分泌量仍无法达到正常水平^[57-58]。在成年小鼠体内,利用*Pdx-1*、*Ngn3*、*MafA*和*Pax4*共表达可重编程诱导已分化的胰腺外分泌细胞生成与内源性胰岛 β 细胞的大小、形状和超微结构无明显差异的

新生细胞群,这类细胞可表达维持 β 细胞功能的基因和分泌胰岛素^[49,59],并减轻链脲霉素诱导的NOD-SCID小鼠糖尿病^[49,60]。另有研究表明,*Ngn3*单独重编程胰腺导管细胞分化为胰岛素分泌细胞,其分化率低于10%,抑制Notch信号通路可增加其分化率^[61]。*INSM1*单独重编程AR42J细胞株和原代培养的小鼠胰腺腺泡细胞转分化为胰岛素阳性细胞^[48]。*INSM1*与*Ngn3*和*MafA*的共表达,能增加其转化率,但缺少维持 β 细胞功能的重要基因,转分化的胰岛素阳性细胞的胰岛素分泌量仍然很低,无法形成 β 细胞特异性的命运^[48]。此外,新近的研究证实*Pdx1*单独重编程亦可诱导胰岛 α 细胞转分化成胰岛 β 细胞^[62]。但由于维持 β 细胞功能的几个重要的关键转录因子的表达缺失,尚未能形成有葡萄糖感应系统的细胞。以上研究表明,重编程的转录调控网络仍未完全探明,为增加重编程的转化率,获得能自主分泌胰岛素和有葡萄糖感应系统的功能性 β 细胞,仍需进一步的探索。例如,*INSM2*在重编程干细胞或非 β 细胞生成功能性 β 细胞中的作用如何,有待深入研究。期待胰岛转录调控网络的进一步补充和完善在不远的将来能为糖尿病的细胞治疗提供潜在的方案。

5 小结与展望

对胰腺内分泌发育转录调控网络机制的深入研究有助于阐释胰腺内分泌疾病如糖尿病和内分泌发育相关疾病的分子病理机制。故对*Ngn3*介导的转录调控网络,包括对*INSM1*和*INSM2*全面深入的研究等,将有助于阐明神经内分泌疾病的病理生理机制,从而为更有效的预防和治疗该类疾病打下基础。值得注意的是,为重编程诱导干细胞及非 β 细胞向胰岛素生成细胞的研究可提供新的途径,对糖尿病的细胞治疗将产生积极的影响,并为彻底治愈糖尿病提供新的可能途径。

致谢

感谢Michael S. Lan教授对本文的指导和建议。

参考文献 (References)

- 1 Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F. The ghrelin cell: A novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* 2002; 107(1/2/3): 63-9.
- 2 Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, et al. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal

- enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 1997; 11(18): 2323-34.
- 3 Breslin MB, Wang HW, Pierce A, Aucoin R, Lan MS. Neurogenin 3 recruits CBP co-activator to facilitate histone H3/H4 acetylation in the target gene INSM1. *FEBS Lett* 2007; 581(5): 949-54.
 - 4 Juhl K, Sarkar SA, Wong R, Jensen J, Hutton JC. Mouse pancreatic endocrine cell transcriptome defined in the embryonic Ngn3-null mouse. *Diabetes* 2008; 57(10): 2755-61.
 - 5 Zhang T, Liu WD, Saunee NA, Breslin MB, Lan MS. Zinc finger transcription factor INSM1 interrupts cyclin D1 and CDK4 binding and induces cell cycle arrest. *J Biol Chem* 2009; 284(9): 5574-81.
 - 6 May CL. The role of Islet-1 in the endocrine pancreas: Lessons from pancreas specific Islet-1 deficient mice. *Islets* 2010; 2(2): 121-3.
 - 7 Rubio-Cabezas O, Minton JA, Kantor I, Williams D, Ellard S, Hattersley AT. Homozygous mutations in *NEUROD1* are responsible for a novel syndrome of permanent neonatal diabetes and neurological abnormalities. *Diabetes* 2010; 59(9): 2326-31.
 - 8 Cai T, Chen X, Wang R, Xu H, You Y, Zhang T, *et al.* Expression of insulinoma-associated 2 (*INSM2*) in pancreatic islet cells is regulated by the transcription factors *Ngn3* and *NeuroD1*. *Endocrinology* 2011; 152(5): 1961-9.
 - 9 Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 1994; 371(6498): 606-9.
 - 10 Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H. Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 1998; 12(12): 1763-8.
 - 11 Fujitani Y, Fujitani S, Luo H, Qiu F, Burlison J, Long Q, *et al.* *Ptf1a* determines horizontal and amacrine cell fates during mouse retinal development. *Development* 2006; 133(22): 4439-50.
 - 12 McDonald E, Li J, Krishnamurthy M, Fellows GF, Goodyer CG, Wang R. *SOX9* regulates endocrine cell differentiation during human fetal pancreas development. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44(1): 72-83.
 - 13 Dubois CL, Shih HP, Seymour PA, Patel NA, Behrmann JM, Ngo V, *et al.* *Sox9*-haploinsufficiency causes glucose intolerance in mice. *PLoS One* 2011; 6(8): e23131.
 - 14 Welters HJ, Kulkarni RN. Wnt signaling: Relevance to beta-cell biology and diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19(10): 349-55.
 - 15 Kapasa M, Vlachakis D, Kostadima M, Sotiropoulou G, Kossida S. Towards the elucidation of the regulatory network guiding the insulin producing cells' differentiation. *Genomics* 2012; 100(4): 212-21.
 - 16 Sommer L, Ma Q, Anderson DJ. Neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol Cell Neurosci* 1996; 8(4): 221-41.
 - 17 Ma Q, Kintner C, Anderson DJ. Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 1996; 87(1): 43-52.
 - 18 Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(4): 1607-11.
 - 19 Rukstalis JM, Habener JF. Neurogenin3: A master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration. *Islets* 2009; 1(3): 177-84.
 - 20 Rubio-Cabezas O, Jensen JN, Hodgson MI, Codner E, Ellard S, Serup P, *et al.* Permanent neonatal diabetes and enteric anodercinosis associated with biallelic mutations in *NEUROG3*. *Diabetes* 2011; 60(4): 1349-53.
 - 21 Wang S, Jensen JN, Seymour PA, Hsu W, Dor Y, Sander M, *et al.* Sustained *Neurog3* expression in hormone-expressing islet cells is required for endocrine maturation and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(24): 9715-20.
 - 22 Zhang T, Wang H, Saunee NA, Breslin MB, Lan MS. Insulinoma-associated antigen-1 zinc-finger transcription factor promotes pancreatic duct cell trans-differentiation. *Endocrinology* 2010; 151(5): 2030-9.
 - 23 Breslin MB, Zhu M, Lan MS. *NeuroD1/E47* regulates the E-box element of a novel zinc finger transcription factor, *IA-1*, in developing nervous system. *J Biol Chem* 2003; 278(40): 38991-7.
 - 24 Tamimi R, Steingrimsson E, Copeland NG, Dyer-Montgomery K, Lee JE, Hernandez R, *et al.* The *NEUROD* gene maps to human chromosome 2q32 and mouse chromosome 2. *Genomics* 1996; 34(3): 418-21.
 - 25 Schwitzgebel VM, Scheel DW, Connors JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, *et al.* Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 2000; 127(16): 3533-42.
 - 26 Karlsson O, Thor S, Norberg T, Ohlsson H, Edlund T. Insulin gene enhancer binding protein *Isl-1* is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* 1990; 344(6269): 879-82.
 - 27 Thor S, Ericson J, Brannstrom T, Edlund T. The homeodomain LIM protein *Isl-1* is expressed in subsets of neurons and endocrine cells in the adult rat. *Neuron* 1991; 7(6): 881-9.
 - 28 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(6613): 257-60.
 - 29 Du A, Hunter CS, Murray J, Noble D, Cai CL, Evans SM, *et al.* *Islet-1* is required for the maturation, proliferation, and survival of the endocrine pancreas. *Diabetes* 2009; 58(9): 2059-69.
 - 30 Zhang H, Wang WP, Guo T, Yang JC, Chen P, Ma KT, *et al.* The LIM-homeodomain protein *ISL1* activates insulin gene promoter directly through synergy with *BETA2*. *J Mol Biol* 2009; 392(3): 566-77.
 - 31 Guo T, Wang W, Zhang H, Liu Y, Chen P, Ma K, *et al.* *ISL1* promotes pancreatic islet cell proliferation. *PLoS One* 2011; 6(8): e22387.
 - 32 Goto Y, De Silva MG, Toscani A, Prabhakar BS, Notkins AL, Lan MS. A novel human insulinoma-associated cDNA, *IA-1*, encodes a protein with "zinc-finger" DNA-binding motifs. *J Biol Chem* 1992; 267(21): 15252-7.
 - 33 Xie J, Cai T, Zhang H, Lan MS, Notkins AL. The zinc-finger transcription factor *INSM1* is expressed during embryo development and interacts with the *Cbl*-associated protein. *Genomics* 2002; 80(1): 54-61.
 - 34 Lan MS, Breslin MB. Structure, expression, and biological

- function of INSM1 transcription factor in neuroendocrine differentiation. *FASEB J* 2009; 23(7): 2024-33.
- 35 Mellitzer G, Bonne S, Luco RF, van de Casteele M, Lenne-Samuel N, Collombat P, *et al.* IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas. *EMBO J* 2006; 25(6): 1344-52.
- 36 Gierl MS, Karoulias N, Wende H, Strehle M, Birchmeier C. The zinc-finger factor *Insm1* (IA-1) is essential for the development of pancreatic beta cells and intestinal endocrine cells. *Genes Dev* 2006; 20(17): 2465-78.
- 37 Tateno M, Fukunishi Y, Komatsu S, Okazaki Y, Kawai J, Shibata K, *et al.* Identification of a novel member of the snail/Gfi-1 repressor family, *mlt 1*, which is methylated and silenced in liver tumors of SV40 T antigen transgenic mice. *Cancer Res* 2001; 61(3): 1144-53.
- 38 Zhang C, Moriguchi T, Kajihara M, Esaki R, Harada A, Shimohata H, *et al.* MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol* 2005; 25(12): 4969-76.
- 39 Oster A, Jensen J, Edlund H, Larsson LI. Homeobox gene product *Nkx 6.1* immunoreactivity in nuclei of endocrine cells of rat and mouse stomach. *J Histochem Cytochem* 1998; 46(6): 717-21.
- 40 Pedersen JK, Nelson SB, Jorgensen MC, Henseleit KD, Fujitani Y, Wright CV, *et al.* Endodermal expression of *Nkx6* genes depends differentially on *Pdx1*. *Dev Biol* 2005; 288(2): 487-501.
- 41 Sander M, Sussel L, Connors J, Scheel D, Kalamaras J, Dela Cruz F, *et al.* Homeobox gene *Nkx6.1* lies downstream of *Nkx2.2* in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development* 2000; 127(24): 5533-40.
- 42 Matsuoka TA, Zhao L, Artner I, Jarrett HW, Friedman D, Means A, *et al.* Members of the large Maf transcription family regulate insulin gene transcription in islet beta cells. *Mol Cell Biol* 2003; 23(17): 6049-62.
- 43 Huang HP, Liu M, El-Hodiri HM, Chu K, Jamrich M, Tsai MJ. Regulation of the pancreatic islet-specific gene *BETA2* (neuroD) by neurogenin 3. *Mol Cell Biol* 2000; 20(9): 3292-307.
- 44 Edlund H. Transcribing pancreas. *Diabetes* 1998; 47(12): 1817-23.
- 45 Bramswig NC, Kaestner KH. Transcriptional regulation of alpha-cell differentiation. *Diabetes Obes Metab* 2011; 13 Suppl 1: 13-20.
- 46 Naya FJ, Stellrecht CM, Tsai MJ. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev* 1995; 9(8): 1009-19.
- 47 Wang HW, Muguiru M, Liu WD, Zhang T, Chen C, Aucoin R, *et al.* Identification of an INSM1-binding site in the insulin promoter: Negative regulation of the insulin gene transcription. *J Endocrinol* 2008; 198(1): 29-39.
- 48 Zhang T, Saunee NA, Breslin MB, Song K, Lan MS. Functional role of an islet transcription factor, INSM1/IA-1, on pancreatic acinar cell trans-differentiation. *J Cell Physiol* 2012; 227(6): 2470-9.
- 49 Akinci E, Banga A, Greder LV, Dutton JR, Slack JM. Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a beta (beta) cell character using *Pdx1*, *Ngn3* and *MafA*. *Biochem J* 2012; 442(3): 539-50.
- 50 Pinney SE, Oliver-Krasinski J, Ernst L, Hughes N, Patel P, Stoffers DA, *et al.* Neonatal diabetes and congenital malabsorptive diarrhea attributable to a novel mutation in the human neurogenin-3 gene coding sequence. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(7): 1960-5.
- 51 Sander M, German MS. The beta cell transcription factors and development of the pancreas. *J Mol Med* 1997; 75(5): 327-40.
- 52 Oropez D, Horb M. Transient expression of *Ngn3* in *Xenopus* endoderm promotes early and ectopic development of pancreatic beta and delta cells. *Genesis* 2012; 50(3): 271-85.
- 53 Chiou SH, Chen SJ, Chang YL, Chen YC, Li HY, Chen DT, *et al.* MafA promotes the reprogramming of placenta-derived multipotent stem cells into pancreatic islets-like and insulin+ cells. *J Cell Mol Med* 2011; 15(3): 612-24.
- 54 Limbert C, Path G, Ebert R, Rothhammer V, Kassem M, Jakob F, *et al.* PDX1- and NGN3-mediated *in vitro* reprogramming of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells into pancreatic endocrine lineages. *Cytotherapy* 2011; 13(7): 802-13.
- 55 Xu H, Tsang KS, Chan JC, Yuan P, Fan R, Kaneto H, *et al.* The combined expression of *Pdx1* and *MafA* with either *Ngn3* or *NeuroD* improve the differentiation efficiency of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Cell Transplantation* 2013; 22(1): 147-58.
- 56 Gefen-Halevi S, Rachmut IH, Molakandov K, Berneman D, Mor E, Meivar-Levy I, *et al.* NKX6.1 promotes PDX-1-induced liver to pancreatic beta-cells reprogramming. *Cell Reprogram* 2010; 12(6): 655-64.
- 57 Blyth NJ. Mechanisms and techniques of reprogramming—using PDX-1 homeobox protein as a novel treatment of insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr* 2012; 6(2): 113-9.
- 58 Banga A, Akinci E, Greder LV, Dutton JR, Slack JM. *In vivo* reprogramming of Sox9+ cells in the liver to insulin-secreting ducts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(38): 15336-41.
- 59 Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008; 455(7213): 627-32.
- 60 Lima MJ, Docherty HM, Chen Y, Docherty K. Efficient differentiation of AR42J cells towards insulin-producing cells using pancreatic transcription factors in combination with growth factors. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 358(1): 69-80.
- 61 Swales N, Martens GA, Bonne S, Heremans Y, Borup R, van de Casteele M, *et al.* Plasticity of adult human pancreatic duct cells by neurogenin3-mediated reprogramming. *PLoS One* 2012; 7(5): e37055.
- 62 Yang YP, Thorel F, Boyer DF, Herrera PL, Wright CV. Context-specific alpha- to-beta-cell reprogramming by forced *Pdx1* expression. *Genes Dev* 2011; 25(16): 1680-5.