

· 基础研究 ·

染色质免疫沉淀分析胰岛 β 细胞中 TCF7L2 与 GPR40 的结合*

毕健琨, 任 伟[△], 郑晓雅, 许 丹

(重庆医科大学附属第一医院内分泌科 400016)

摘要:目的 探讨转录因子 TCF7L2 与 GPR40 基因启动子的相互作用。方法 采用染色质免疫沉淀(CHIP)技术,在胰岛 β TC6 细胞株中,用 TCF7L2 特异性抗体沉淀 DNA,聚合酶联式反应(PCR)检测 GPR40 基因 5' 特异性序列。结果 在 TCF7L2 特异性抗体免疫沉淀的 DNA 片段中,扩增出 GPR40 基因 5' 特异性序列。结论 在胰岛 β TC6 细胞中,转录因子 TCF7L2 与 GPR40 基因启动子存在特异的结合区域,TCF7L2 可能参与 GPR40 的表达调控。

关键词:染色质免疫沉淀;转录因子 TCF7L2 GPR40 基因启动子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.22.016

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)22-2270-03

Detection of TCF7L2 binding to GPR40 gene promoter by chromatin immunoprecipitation in β TC6 cells^{*}

Bi Jiankun, Ren Wei[△], Zheng Xiaoya, Xu Dan

(Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective Explore the interaction of transcription factor TCF7L2 and GPR40 gene promoter. **Methods** We used chromatin immunoprecipitation(CHIP) in β TC6 cells. Specific TCF7L2 antibody was involved in, the immunoprecipitated DNA fragments were amplified through PCR using the specific GPR40 primers. **Results** GPR40 gene specific fragment was detected in the DNA fragments immunoprecipitated by TCF7L2 antibody. **Conclusion** The results confirm that TCF7L2 was binded to GPR40 promoter in β TC6 cells and transcription factor TCF7L2 may involved in transcriptional regulation of GPR40 gene.

Key words: chromatin immunoprecipitation; GPR40 gene promoter transcription factor TCF7L2

2 型糖尿病(T2DM)属于复杂的多基因疾病,遗传因素与环境因素共同参与发病过程。2006 年首次报道 TCF7L2,即 T 细胞转录因子-4(TCF-4)单核苷酸多态性与 T2DM 显著相关^[1],Weedon 等^[2]认为 TCF7L2 rs7903146 位点基因变异型是目前发现的和 T2DM 发病风险相关性最强的基因型。随后在多范围大样本的研究中得到类似的结果。TCF7L2 位于染色体 10q25.3,表达产物是高迁移率(HMG)组盒包含的 1 个转录因子。TCF7L2 是 T 细胞因子/淋巴细胞增强子结合因子(TCF/LEF)之一。

GPR40 是 G 蛋白偶联受体家族(GPCRs)成员之一。它在脑、胰腺、肝、心脏、骨骼肌等均有表达^[3-4],尤其在胰岛、脑组织中表达丰富。GPR40 是脂肪酸的特异性受体,脂肪酸作为胞外配体,活化 GPR40,激活胰岛 β 细胞内信号转导途径,调节胰岛素分泌。GPR40 在脂肪酸增强 GSIS 和促进胰岛 β 细胞过度增殖,进而在引起胰岛 β 细胞功能缺陷中扮演重要角色。2007 年,Reut 等^[5]发现 GPR40 与转录因子 PDX-1 存在特异性结合位点,但是 GPR40 是否与转录因子 TCF7L2 存在结合位点,目前尚不清楚。

在后基因组时代,DNA-蛋白质的相互作用是研究基因表达调控的重要领域。染色质免疫沉淀技术(chromatin immunoprecipitation,CHIP),是一种在体内研究 DNA-蛋白质相互作用的理想方法,利用抗原抗体反应的特异性以及 PCR 的高灵敏性,可以真实地反映体内蛋白因子与基因组结合的状况,已成为染色质水平基因表达调控研究的最有效方法。本研究拟通过 CHIP 技术探讨 GPR40 蛋白与 TCF7L2 基因是否存在

相互作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 胰岛 β TC6 细胞购买于中国科学院细胞库。

1.1.2 主要试剂和仪器 PAA 胎牛血清(德国德图),DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司),TCF7L2 的抗体为兔抗人 TCF7L2 单克隆抗体 C9B9(美国 Cell signaling technology),PCR 引物由上海生工生物工程技术服务公司合成。CHIP 试剂盒为美国 Millipore 公司 magna chipTM A。超声破碎仪为美国 Sonic 公司 VC750 型,PCR 仪为美国 MJ 公司 PTC-200 型。

1.2 方法

1.2.1 胰岛 β TC6 细胞的培养及细胞的甲醛交连 胰岛 β TC6 细胞用含 20% 的胎牛血清的 DMEM 高糖培养液在 37 °C,5% CO₂ 饱和湿度条件下培养,2 d 换液,7 d 传代 1 次。实验时取对数生长期细胞。取 1 培养皿细胞(10 cm 培养皿),吸掉培养皿中的培养基,加入 10 mL 1% 甲醛,37 °C 孵育 10 min。加入 1.25 mol/L 甘氨酸 1 mL,至终浓度为 125 mmol/L,室温下放置 2 min。弃上清液,用 1 mL 冷 PBS 刮细胞,移至 1.5 mL 的 EP 管中,2 500 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 800 μ L PBS,4 °C 预冷 15 min,然后 4 °C 2 500 r/min 离心 5 min,重复 PBS 清洗 1 遍。然后用包含 10 mmol/L HEPES pH7.5,10 mmol/L EDTA,0.5 mmol/L EGTA,0.75% Triton X-100 的溶液清洗细胞一遍,再用包含 10 mmol/L HEPES pH7.5,200 mV NaCl,1 mmol/L EDTA,0.5 mmol/L EGTA 的溶液清洗细胞一遍。

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

[△] 通讯作者,Tel:13452420938;E-mail:weiren67@yahoo.com.cn。

1.2.2 超声破碎 在样品中加入 1 mL 的 lysis buffer (150 mmol/L NaCl 1% Triton X-100, 25 mmol/L Tris pH7.5, 0.1% SDS, 0.5% 脱氧胆酸盐), 充分混匀, 超声震荡, 30% 功率震荡强度 (10 s + 60 s) × 10 次, 4 °C 2 500 r/min 离心 5 min, 取上清, 测蛋白浓度。

1.2.3 检验超声破碎效果 取 100 μL 超声破碎后产物, 加入 4 μL 5 mol/L NaCl, 65 °C 处理 2 h 解交联。分出一半用氯仿抽提。电泳检测超声破碎后的效果。

1.2.4 免疫沉淀 取 200~500 μg 蛋白, 加入 80 μL 蛋白 A 琼脂糖/鲑精 DNA, 室温下放置 30 min。4 °C 2 500 r/min 离心 5 min, 留蛋白上清总体积的 10% 作为 input, 然后将剩余上清分成 2 份, 分别加目的 TCF7L2 抗体、阳性对照乙酰化组蛋白 H3 抗体和阴性对照 IgG。4 °C 150 r/min 放摇床过夜。次日早晨, 每样品加入 60 μL 蛋白 A 琼脂糖/鲑精 DNA, 4 °C 放置 4 h, 4 °C 2 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液。每管加入 500 μL RIPA buffer (150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl pH8, 0.1% SDS, 0.5% Deoxycholat, 1 mmol/L EDTA, 1% NP-40), 4 °C 放置 15 min, 4 °C 2 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液。分别用预冷 high salt buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH8, 0.1% SDS, 0.5% Deoxycholate, 1 mmol/L EDTA, 1% NP-40, 500 mmol/L NaCl) 和 LiCl buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH8, 250 mmol/L LiCl, 0.1% SDS, 0.5% Deoxycholate, 1% NP-40, 1 mmol/L EDTA) 洗胶一遍, 用预冷 TE buffer (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA) 洗胶 2 遍, 弃上清液。

1.2.5 蛋白质/DNA 复合物的洗脱及 DNA 的去交联 向胶中加入 250 μL Elution buffer (1% SDS, 0.1 mol/L NaHCO₃), 室温放置 15 min, 2 500 r/min 离心 5 min, 转移上清液至新 EP 管, 重复洗一遍。取上清液 (500 μL) 于新 EP 管, 加 20 μL NaCl (5 mol/L), 混匀, input 加 Elution Buffer 补体积至 500 μL, 再加 20 μL NaCl (5 mol/L) (如: 100 μL input + 4 μL Elution Buffer + 20 μL 5 mol/L NaCl) 一起 65 °C 水浴过夜。取出置室温, 加入 2 μL ProteinaseK (10 mg/mL), 45 °C 水浴 1 h。加入等体积 (520 μL) 氯仿, 剧烈震荡 10 s, 室温, 12 000 r/min 离心 1 min, 将含 DNA 上层 400 μL 移入新管中, 加 1/10 体积即 40 μL 3 mol/L 乙酸钠, 稍加震荡, 加 2 体积即 800 μL 100% 预冷乙醇, 加 1 μL (20 μg) 糖原, 震荡混匀, 置 -30 °C 过夜, 充分沉淀 DNA。12 000 r/min 离心 10 min。加入 1 mL 70% 乙醇, 混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 室温干燥至少 30 min。加入 dH₂O 50~100 μL, 65 °C 水浴至少 30 min。洗脱后的 DNA 即可进行 PCR 检测。

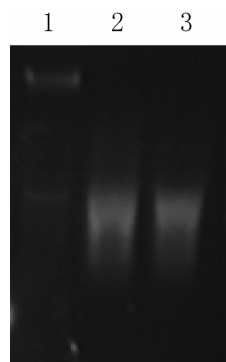
1.2.6 PCR 及琼脂糖凝胶电泳检测 设计 GPR40 基因引物为 5'-CTC ACA GTC CTC CCA GGG TC-3', 5'-CTT CAG TGC GAC ATC GTC TT-3', 预计扩增长度为 155 bp。扩增体系为 10 μL, PCR Mix 5 μL, 超纯水 3 μL, DNA 模板 1 μL, 上游引物 0.5 μL, 下游引物 0.5 μL。扩增条件, 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 25 个循环后 72 °C 延伸 7 min。PCR 反应结束后, 取 4 μL 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 观察并分析结果。

2 结 果

2.1 胰岛 βTC6 细胞株核染色质切割有效性的确定 为了得到合适大小的 DNA 片段, 摸索了不同的超声功率, 超声时间的超声破碎条件, 最终得到了合适的条件, 使得 DNA 片段长度为 100~1 000 bp (图 1)。

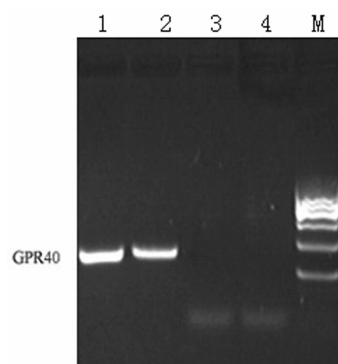
2.2 TCF7L2 抗体免疫沉淀 DNA 模板的 PCR 扩增结果检测

阳性对照乙酰化组蛋白 H3 抗体免疫沉淀的 DNA 为模板, 阴性对照以 IgG 抗体免疫沉淀的 DNA 为模板, 阳性对照条带清晰明亮。而阴性对照看不见扩增产物。结果说明实验中沉淀可信。以 TCF7L2 抗体免疫沉淀的染色质片断提取的 DNA 为模板, PCR 扩增 GPR40, 结果显示模板中含有被扩增区段的 DNA (图 2)。



1: 对照 (未超声破碎); 2, 3: 超声打断后的染色质。

图 1 琼脂糖电泳检验超声打断染色质效果图



1: 乙酰化组蛋白 H3 抗体免疫沉淀的 DNA; 2: TCF7L2 抗体免疫沉淀的 DNA; 3: 羊抗人 IgG 抗体免疫沉淀的 DNA; 4: DEPC 水; M: DNA Marker。

图 2 免疫沉淀染色质 PCR 结果分析

3 讨 论

染色质免疫沉淀技术是基于体内分析发展起来的方法, 已经成为表观遗传信息研究的主要方法。它能够较真实地反映体内状态下染色质与基因转录调控因子的结合情况^[6]。这种方法与 DNA 芯片与分子克隆技术相结合, 可用于高通量的筛选已知蛋白因子的未知 DNA 靶点和研究反式作用因子在整个基因组上的分布情况, 这将有助于深入了解 DNA-蛋白质相互作用的调控网络^[7]。

染色质免疫沉淀技术虽然在基因表达调控中发挥了越来越重要的作用, 但是该技术操作繁琐、复杂, 实验操作对实验结果影响较大, 其中 DNA 片段的大小对实验结果起着较大的影响^[8]。DNA 片段较大, 不利于区分染色质上结合有目的蛋白和没有结合目的蛋白的区域, DNA 片段较小不利于 PCR 扩增。因此, 适当的 DNA 片段大小对于染色质免疫沉淀的结果非常重要, 一般认为 100~1 000 bp 的长度范围是比较合适的。此外, 用于染色质免疫沉淀的抗体的质量直接决定实验的成败, 一般用于免疫组化和 Western blotting 的抗体不适合用于做染色质免疫沉淀, 染色质免疫沉淀需要更高特异性的抗体。抗体的用量也特别重要, 抗体用量过多可能会沉淀某些非特异性蛋白, 抗体用量过少则特异蛋白沉淀不完全, 适宜的抗体量

是刚好沉淀经超声剪切的特异性蛋白^[9]。只有优化各种实验条件,才能得到较满意的染色质免疫沉淀的实验结果。

胰岛 β 细胞通过分泌适量的胰岛素来维持机体的需要,这对保持机体的代谢平衡起到了决定性的作用。胰岛素的分泌主要取决于血糖的波动,同时,营养因素,神经传导作用以及激素的相互作用均对胰岛素的分泌产生影响^[10]。为了实现其重要的生理作用,胰岛 β 细胞对某些在该细胞中选择表达的基因进行调控,对这些基因的调控是通过转录控制机制来完成的^[11],这涉及普遍存在的整合机制以及细胞的转录因子^[12]。GPR40 基因选择性地表达在胰岛 β 细胞,它对胰岛素分泌起到了重要作用。

研究证实 TCF7L2 与 GPR40 与 T2DM 显著相关。转录因子 TCF7L2 可以通过改变 Wet 信号途径来直接影响胰岛 β 细胞的生物学功能,而且 TCF7L2 也可以间接引起肠胰轴的功能缺陷,包括 GLP-1 的分泌减少和 GLP-1 所诱导的胰岛素分泌缺陷和(或)功能障碍。但是,GPR40 是通过何种途径调节胰岛素的分泌以及胰岛 β 细胞功能目前尚不清楚。Del Guerra 等^[13]研究发现脂肪酸调节了人类胰岛中的 GPR40 的表达,T2DM 患者胰腺中的 GPR40 的表达量较正常人少,胰岛素的分泌以及胰岛 β 细胞功能的异常均与 GPR40 有关。Kebede 等^[14]认为 GPR40 不仅能够在脂肪酸刺激的胰岛素分泌中起作用,而且在高脂饮食的情况下对葡萄糖刺激的胰岛素分泌也起作用。Naqasumi 等^[15]研究发现 GPR40 可以调节葡萄糖刺激的胰岛素分泌以及体内的血浆葡萄糖水平,同时可以提高普通小鼠以及糖尿病小鼠的糖耐量。Thierry 等^[16]研究发现 GPR40 的缺失可以降低胰岛素的分泌,其机制并不是通过影响脂肪酸刺激的胰岛素分泌,而是减少了葡萄糖以及精氨酸刺激的胰岛素分泌,其机制是通过影响肌醇磷酸类的产生。Pang 等^[17]则认为 GPR40 介导的胰岛素的分泌,部分是由于刺激了肾上腺素受体所引起的。然而 GPR40 基因启动子是否与转录因子 TCF7L2 相互结合,从而影响胰岛素的分泌,目前未见相关报道。

已经证实 GPR40 与转录因子 PDX-1 存在特异性结合位点。为了探讨转录因子 TCF7L2 是否对 GPR40 基因直接起作用,本研究以 TCF7L2 抗体免疫沉淀 TCF7L2 结合的染色质片段,PCR 扩增出 GPR40 基因,该结果证实 TCF7L2 可与 GPR40 基因调控区结合,为 TCF7L2 参与 GPR40 表达调控提供了强有力的证据。本研究为 GPR40 如何参与胰岛素分泌找到了新的依据。但是 TCF7L2 是如何参与 GPR40 表达调控还需进一步研究。

参考文献:

[1] Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes[J]. *Nat Genet*, 2006, 38:320-323.

[2] Weedon MN, Mc Carthy MI, Hitman G, et al. Combining information from common type 2 diabetes risk polymorphism improves disease prediction[J]. *Plos Med*, 2006, 3: e347-351.

[3] Kotarsky K, Nilsson NE, Flodgren E, et al. A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 301:406-410.

[4] Briscoe CP, Tadayon M, Andrews JL, et al. The orphan

G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 11303-11311.

- [5] Reut BS, Gabriel R, Bahar K, et al. Regulation of the gene encoding GPR40, a fatty acid receptor expressed selectively in pancreatic β cells [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (32): 23561-23571.
- [6] Weinmann AS, Farnham PJ. Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation[J]. *Methods*, 2002, 26(1):37-47.
- [7] 王春雨, 石建党, 朱彦, 等. 染色质免疫沉淀技术在研究 DNA 与蛋白质相互作用中的应用[J]. *遗传*, 2005, 27 (5):801-807.
- [8] Kuo MH, Allis CD. In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic protein:DNA association in a chromatin environment [J]. *Methods*, 1999, 19 (3): 425-433.
- [9] Hecht A, Grunstein M. Mapping DNA interaction sites of Chromosomal proteins using immunoprecipitation and polymerase chain reaction[J]. *Methods Enzymol*, 1999, 304:399-414.
- [10] Henquin JC, Ravier MA, Nenquin M, et al. Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion [J]. *Eur J Clin Invest*, 2003, 33(9):742-750.
- [11] German M, Ashcroft S, Docherty K, et al. The insulin gene promoter. a simplified nomenclature [J]. *Diabetes*, 1995, 44(8):1002-1004.
- [12] Wilson ME, Scheel D, German MS. Gene expression cascades in pancreatic development [J]. *Mech Dev*, 2003, 120 (1):65-80.
- [13] Del Guerra S, Bugliani MD, Aleo V, et al. G-protein-coupled receptor (GPR40) expression and its regulation in human pancreatic islets: the role of type 2 diabetes and fatty acids [J]. *Nutr Metab Cardiovas Dis*, 2010, 20(1):22-25.
- [14] Kebede M, Alquier T, Latour MG, et al. The fatty acid receptor GPR40 plays a role in insulin secretion in vivo after high-fat feeding [J]. *Diabetes*, 2008, 57(9):2432-2437.
- [15] Naqasumi K, Esaki R, Lwachidow K, et al. Overexpression of GPR40 in pancreatic beta-cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improve glucose tolerance in normal and diabetic mice [J]. *Diabetes*, 2009, 58(5): 1067-1076.
- [16] Thierry A, Marie-Line P, Martin G, et al. Deletion of GPR40 impairs glucose-induced insulin secretion in vivo in mice without affecting intracellular fuel metabolism in islets [J]. *Diabetes*, 2009, 58(11):2607-2615.
- [17] Pang Z, Wu Z, Zhang X, et al. GPR40 is partially required for insulin secretion following activation of beta 3-adrenergic receptors [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 325(1-2): 18-25.