

一种 GLP-1 过表达肠类器官构建的方法

曾之扬¹, 陆佳微¹, 曹希雅¹, 王芯悦^{2,3}, 李大力¹

1. 华东师范大学生命科学学院, 上海市调控生物学重点实验室, 上海 200241

2. 安徽理工大学医学院, 淮南 232000

3. 上海交通大学附属第六人民医院南院消化内科, 上海 201499

摘要: 胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1) 作为一种肠促胰岛素, 主要由肠道 L 细胞分泌, 由于其能够有效促进胰岛素的释放从而降低血糖, 因此 GLP-1 及其类似物在 2 型糖尿病的治疗上具有良好的应用前景。本研究优化了慢病毒感染类器官的方法, 利用该方法成功构建了 GLP-1 过表达的小鼠小肠类器官 (organoids)。结果显示该类器官分泌的 GLP-1 能够有效地提高野生型及糖尿病小鼠的葡萄糖耐受能力。因此, 本研究构建的 GLP-1 过表达类器官可以为 2 型糖尿病的治疗提供一种新的策略。

关键词: 胰高血糖素样肽 1; 2 型糖尿病; 小肠类器官

A method for constructing GLP-1 overexpression intestinal organoids

Zhiyang Zeng¹, Jiawei Lu¹, Xiya Cao¹, Xinyue Wang^{2,3}, Dali Li¹

1. Shanghai Key Laboratory of Regulatory Biology, School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China

2. School of Medicine, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232000, China

3. Department of Gastroenterology, South Campus of Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201499, China

Abstract: As a potent insulinotropic hormone, glucagon-like peptide 1 (GLP-1) is mainly secreted by intestinal L cells, which can effectively promote the release of insulin and thus reduce blood glucose. Therefore, GLP-1 and its analogs have a good prospect in the treatment of type 2 diabetes. In this study, we constructed mouse intestinal organoids that overexpress GLP-1 by optimizing the GLP-1 lentivirus infection method. We found that supernatants secreted by the GLP-1 overexpression organoids effectively enhanced glucose tolerance in wild-type and diabetic mouse. Thus, the GLP-1 overexpression organoids built in this study may provide a novel strategy for the treatment of type 2 diabetes.

Keywords: GLP-1; type 2 diabetes; intestinal organoids

收稿日期: 2021-03-01; 修回日期: 2021-04-14

基金项目: 国家重点研发计划(编号: 2019YFA0110802) [Supported by the National Key R&D Program of China (No. 2019YFA0110802)]

作者简介: 曾之扬, 博士, 博士后, 研究方向: 发育生物学。E-mail: 52161300029@stu.ecnu.edu.cn

通讯作者: 李大力, 博士, 研究员, 研究方向: 基因编辑。E-mail: dlli@bio.ecnu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.20-423

网络出版时间: 2021/5/12 16:42:36

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20210511.1319.001.html>

胰岛素分泌障碍是 2 型糖尿病的标志。2 型糖尿病治疗策略之一是基于肠道内分泌型 L 细胞产生的胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1) 的降血糖作用, GLP-1 具有促进胰岛素的释放, 提高胰岛 β 细胞增殖及存活, 促进饱腹感等功能^[1-3]。GLP-1 在机体摄取营养物质时被释放, 随后被二肽基肽酶 4(dipeptidyl peptidase 4, DPP4)迅速降解, 因此其半衰期大约只有 1~2 min^[4,5]。已有研究表明将人 GLP-1 与小鼠免疫球蛋白 G 重链恒定区(IgG₁ heavy chain constant regions)结合形成融合蛋白 (GLP-1/Fc)可以有效延长其半衰期, 提高生物利用率^[6,7]。目前 GLP-1/Fc 融合蛋白已在糖尿病小鼠模型的治疗中被广泛应用。例如通过肌肉注射 GLP-1/Fc 过表达质粒能够促进胰岛素产生并提高小鼠的糖耐受能力^[7]。此外, 通过光控诱导 HEK293T 细胞表达 GLP-1/Fc 可以有效减轻 2 型糖尿病小鼠的血糖损伤^[8,9]。然而以上的研究均未能实现 GLP-1/Fc 长期及原位表达, 因此通过构建 GLP-1/Fc 过表达的小肠类器官并将其原位移植到小鼠小肠中可能是一种有效治疗 2 型糖尿病的方法。

小肠类器官是指将小肠隐窝或干细胞在体外培养形成具有肠干细胞及各种终末分化细胞的类似于花环状的囊状细胞团, 因其能在体外模拟体内小肠的自我更新, 因此又可以被称为迷你器官^[10]。这种迷你器官的培养体系最早是由 Sato 等^[11,12]在 2009 年构建, 除了含有 Lgr5⁺肠干细胞, 类器官还包含有 Lysozyme⁺潘氏细胞, Muc2⁺杯状细胞, Chromogranin A⁺肠内分泌型细胞等终末分化细胞。最新的研究表明体外培养的人肠及小鼠肠类器官中均含有能表达 GLP-1 的 L 细胞^[13-16], 这说明肠类器官几乎包含着所有肠上皮的分化细胞类型, 因而具有重建器官的潜能。研究人员进一步将体外培养的小肠类器官原位移植到小鼠的肠内后, 发现能重新形成基本的隐窝——绒毛结构, 并长期稳定存在^[17-19]。因此, 类器官还可以为再生医学提供供体细胞或组织来源。

基于以上背景, 本研究建立了一种 GLP-1/Fc 过表达小鼠小肠类器官构建的方法。利用该方法构建的 GLP-1/Fc 过表达类器官能够高效表达活性 GLP-1/Fc, 通过腹腔注射该活性 GLP-1/Fc 能有效提高野生型及糖尿病小鼠的糖耐受能力。随后本研究初步验证了小肠类器官原位移植的可能性, 为 2 型

糖尿病提供一种潜在的治疗方案。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用野生型 C57BL/6J 小鼠均来源于华东师范大学实验动物中心, 糖尿病(db/db)小鼠(C57BL/6J 背景)购自上海实验动物中心, 所有的小鼠均饲养于华东师范大学 SPF 级实验动物中心。所有涉及小鼠和实验方案的程序均符合上海市实验动物护理评估与认证协会起草的规定, 并经华东师范大学实验动物伦理委员会批准。HEK293T 购买于美国 ATCC 公司。

1.2 过表达载体的构建

实验所用过表达载体为 pLenti-CMV-IRES2-ZsGreen, 购于美国 Addgene 公司。GLP-1/Fc 片段(约 900 bp)由华东师范大学叶海峰研究员惠赠。设计扩增 GLP-1/Fc 的 PCR 引物, 并分别在正向引物及反向引物中添加 Age I 和 Xba I 酶切位点和相应保护碱基序列。PCR 扩增 GLP-1/Fc 片段后胶回收约 900 bp 的 DNA 片段, 然后同时用 Age I 和 Xba I 酶分别酶切 pIRES2-ZsGreen 载体及 GLP-1/Fc 回收产物, 随后再次胶回收酶切过后的载体及 PCR 片段。接着用 T4 DNA 连接酶连接酶切过后的载体和片段, 在 16℃中连接过夜, 连接产物转化到感受态细胞中, 随后涂板, 挑取单克隆, 培养过夜后提取质粒, 通过一代测序验证得到 pLenti-CMV-GLP-1/Fc-IRES2-ZsGreen 质粒。慢病毒包装所需 pMD2.G 及 psPAX2 质粒均由北京大学魏文胜教授惠赠。

1.3 慢病毒的包装、浓缩及滴度测定

培养 20 皿 HEK293T 细胞, 待细胞长至 70%~80%密度时进行转染。将 pLenti-CMV-GLP-1/Fc-IRES2-ZsGreen、pMD2.G 和 psPAX2 质粒各 10 μ g 与 90 μ L 的 PEI 充分混匀, DMEM 补足到 1 mL, 涡旋震荡后室温放置 20 min, 随后均匀的加入到细胞中。转染 8 h 后更换培养基, 次日补充适量培养基并在荧光显微镜下观察细胞状态及转染效率。转染 48 h 后再次补充适量培养基, 72 h 后收集上清,

3500 r/min 离心 10 min, 上清用 0.45 μm 细胞滤器过滤, 滤液置于 4℃ 冰箱暂时保存。病毒滤液转移至贝克曼离心管中, 4℃、25,000 r/min 离心 3 h。离心过后看到离心管底部出现半透明的病毒颗粒沉淀, 弃上清, 用 1 mL 的类器官培养基重悬病毒沉淀得到病毒原液, 病毒收集后分装置于 -80℃ 冰箱保存, 避免反复冻融。在 24 孔板中接种 10^5 个 HEK293T 细胞, 待细胞长至 70% 密度时用病毒进行感染。取 10 μL 病毒原液制备 10 倍连续梯度稀释的病毒液, 然后往每个孔中加入稀释后的病毒液 10 μL , 即从高往低分别加入 1 μL ~ 10^{-6} μL 的病毒, 加完稍微混匀, 感染 48~72 h 后, 流式细胞仪分析 GFP 阳性的细胞, 选取感染率为 1%~10% 之间的数据及其对应所加的病毒量, 然后根据公式: 病毒滴度 = $10^3 \times N \times P / V$ IU/mL (N 代表感染时候的细胞量, P 代表阳性细胞的百分比, V 代表加到每个孔中的病毒量) 计算病毒滴度。

1.4 小肠类器官的培养、传代、冻存与复苏

取 6~8 周大的小鼠小肠约 10 cm, 纵向剪开, 预冷的 PBS 洗干净, 载玻片轻轻地将小肠表面的绒毛刮去, 将绒毛去除的小肠置于 50 mL 离心管中, 放在冰盒中短暂保存。将冰盒转移至安全柜中, 用含抗生素的 PBS 清洗小肠 5~8 次, 将小肠转移至 25 mL 含 2.5 mmol/L 的 EDTA 溶液中, 4℃ 摇床中消化 20 min。弃 EDTA 溶液, 将小肠转移至新的 50 mL 离心管中, 加 25 mL 含抗生素的 PBS, 轻晃 20~30 次, 悬液用 70 μm 的细胞过滤器过滤, 重复上述步骤, 将两次过滤后的悬液转移至同一个 50 mL 离心管中, 4℃、800 r/min 离心 5 min。弃上清, 用 2 mL 的基础培养基重悬沉淀, 计数。取一定体积的悬液(2000~2500 个隐窝)加入到 1.5 mL 的离心管中, 室温 900 r/min 离心 5 min。用事先在冰上预冷的 200 μL 基质胶(matrigel, BD)重悬沉淀, 隐窝的密度控制在 10~15 个/ μL 。接板之前, 将 96 孔板事先在培养箱中预热 30 min, 随后每个孔接种 5 μL 的隐窝-基质胶混合液, 若为 24 孔板则每孔接种 50 μL 。将接种好的板于 37℃ 培养箱中放置 25~30 min 让基质胶凝固。最后, 每孔加 100 μL 培养基(24 孔板加 500 μL), 每 2~3 d 更换一次培养基, 5~7 d 传代一次(注: 所有的试剂均需添加抗生素以避免染菌, 隐窝需尽可能置于冰上以保持活性)。

将培养 5~7 d 的类器官在冰上放置 5~10 min。弃上清, 加入预冷的 1 mL 的 DMEM, 用大枪头将基质胶打碎, 反复吹打 30~50 次, 操作过程中尽量避免产生气泡。随后取适量的悬液观察, 若在显微镜下能观察到较多完整的类器官团, 则继续用大枪吹打, 直至将类器官吹散为止。将悬液转移至 1.5 mL 离心管中, 室温 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀用适量的 matrigel 重悬。接板过程同上述步骤(注: 理论上类器官传一次可以扩增 3~5 倍, 但由于操作过程中的损失, 因此一般只能扩增 2~3 倍)。

将需要冻存的类器官于冰上放置 5~10 min。弃上清, 加入预冷的 1 mL 的 DMEM, 用大枪头将基质胶打碎, 随后均匀吹打 30~50 次左右, 此过程应该尽量避免产生气泡。悬液转移至 15 mL 离心管中, 用预冷的 PBS 补足到 10 mL, 4℃、800 r/min 离心 5 min。去上清, 用 1 mL 的冻存培养基(Recovery™ Cell Culture Freezing Medium, 美国 Gibco 公司)重悬类器官, 将重悬液转移至冻存管中, 标记好日期、品系, 放入冻存盒中于 -80℃ 冰箱中过夜, 随后转移至液氮罐中保存。若需要复苏, 将冻存的隐窝取出, 置于 37℃ 水浴锅, 快速解冻, 随后将悬液转移至 15 mL 离心管中, 加入 14 mL 预冷的基础培养基, 4℃、800 r/min 离心 5 min。去上清, 用适量的预冷基质胶重悬沉淀, 然后接板(注: 复苏的过程中加入 ROCK 抑制剂 Y-27632 (Selleck 公司, 美国)能够显著提高类器官的存活率)。

1.5 类器官培养基的配制

基础培养基(basal medium): 45 mL 的 ADMEM (Gibco 公司, 美国)中加入 500 μL 的双抗, 终浓度为 5 mmol/L 的 HEPES 及谷氨酰胺(Sigma 公司, 德国), 终浓度为 1 mmol/L 的 N-乙酰半胱氨酸(Sigma 公司, 德国), 500 μL N2(Invitrogen 公司, 美国), 1000 μL B27 (Invitrogen 公司, 美国), 用 ADMEM 定容至 50 mL, 配好后用 0.22 μm 的细胞滤器过滤后分装置于 4℃ 冰箱备用。

完全培养基(complete medium): 在基础培养基的基础上加入终浓度为 500 ng/mL 的 Wnt 激动剂 R-spondin1 (PeproTech 公司, 美国), 100 ng/mL 的 BMP 抑制剂 Noggin (PeproTech 公司, 美国), 以及 50 ng/mL 的表皮生长因子 EGF (PeproTech 公司,

美国), 配制好后用 0.22 μm 的细胞滤器过滤后置于 -20°C 冰箱备用。若需要将类器官中的大部分细胞变为干细胞, 可以在完全培养基的基础上加入 40 ng/mL WNT 配体 Wnt3a (PeproTech 公司, 美国) 和 5 $\mu\text{mol/L}$ GSK3 β 的抑制剂 CHIR-99021 (Selleck 公司, 美国)。

1.6 慢病毒感染小肠类器官

在完全培养基中加入 Wnt3a (40 ng/mL) 和 CHIR-99021 (5 $\mu\text{mol/L}$) 培养类器官, 2~3 d 后, 类器官大部分变为由干细胞构成的圆形结构。弃上清, 加 1 mL 的 DMEM, 用大枪头搅碎基质胶, 悬液转移至 1.5 mL 离心管, 用大枪吹打悬浮液 30~50 次, 直到所有类器官被吹散(可取少许悬液在显微镜下观察)。室温 900 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 500 μL 的 TrypLE™ Express (Thermo Fisher 公司, 美国) 重悬沉淀, 37°C 孵育 5 min, 镜检观察类器官消化情况, 如消化不充分可每次增加 2 min 的消化时间, 直到类器官大部分消化为单细胞为止, 随后加入 500 μL 的完全培养基终止消化(消化过程中可以加入适量的 DNA 酶来去除死亡细胞的 DNA)。消化完成后, 室温 900 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入适量浓缩病毒液重悬, 然后加入到 48 孔板中, 充分混匀, 用封口膜封好, 在离心机中以 32°C , 600 \times g 离心 1 h, 移除封口膜, 将类器官在 37°C 培养箱中孵育 6 h (在病毒感染的过程中可以加入 8 $\mu\text{g/mL}$ 的 polybrene (Sigma 公司, 德国) 来提高慢病毒的感染能力, 此外也可以添加 Y-27632 来提高类器官的生存率)。将感染好的类器官转移至 1.5 mL 离心管, 室温 900 r/min 离心 5 min, 弃上清, 冰上放置 5 min, 加入适量的基质胶, 混匀, 随后接板, 最后用含有 Wnt3a、CHIR-99021 和 Y-27632 的完全培养基培养感染后的类器官, 2~3 天后将培养基更换为完全培养基。在荧光显微镜下观察类器官的感染效率。

1.7 酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

接种类器官, 待类器官出芽较多时, 弃上清, 用 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 加入 500 μL 的 PBS, 在 37°C 培养箱中放置 6 h, 取上清保存于 -20°C 冰箱用于后续实验。本研究购买了美国 Millipore 公司的

Glucagon Like Peptide-1 (Active) ELISA Kit 并按照其中的说明书来检测类器官中活性 GLP-1 的含量。

1.8 腹腔内糖耐受实验(intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT)

为了进行腹腔内糖耐受实验, 小鼠需经过 16 h 的饥饿处理。称量每只小鼠体重, 计算 2.5 g/kg 体重的葡萄糖剂量, 提前配置浓度为 250 mg/mL 的葡萄糖溶液。通过尾静脉取血来测定 0 min 时的血糖浓度, 在断尾之前, 将尾巴末端浸入 0.25% 布比卡因进行局部麻醉, 以减轻疼痛。随后腹腔注射小鼠体重 $\times 10 \mu\text{L}$ 的 250 mg/mL 的葡萄糖溶液和 400 μL 收集的类器官上清液或者 PBS, 在葡萄糖注射后的 15、30、45、60、75、90、120 min 后测量血糖浓度。

1.9 小肠类器官的原位移植

小肠类器官收集到 1.5 mL 离心管中, 基质胶重悬, 置于冰上待用。腹腔注射适量的阿佛丁麻醉小鼠, 随后用灭菌胶带将小鼠固定在塑料板上, 剃除小鼠腹部的毛发。用剪刀在小鼠腹部剪开约 0.5 cm 的口子, 用镊子撑开约 1 cm, 随后将小鼠的小肠缓慢拉出摆放在生理盐水润湿的纱布上, 接着用 1 mL 注射器吸取约 50 μL 的类器官悬液, 缓慢地将其注射到小肠的肠壁中。将小肠放回到小鼠腹腔中, 清理并缝合伤口。最后将小鼠放在 37°C 的加热器上直至苏醒。移植一周后, 解剖小鼠, 取小肠在荧光显微镜下观测类器官的整合情况。

2 结果与分析

2.1 GLP-1/Fc 载体的构建, 慢病毒的包装及验证

GLP-1/Fc 过表达的慢病毒载体构建如图 1A 所示, 将 GLP-1/Fc 置于 CMV 启动子后, 通过 IRES2 与 ZsGreen 连接, ZsGreen 的荧光强度能够体现 GLP-1/Fc 的表达情况。经 Sanger 测序验证, pLenti-CMV-GLP-1/Fc-IRES2-ZsGreen 质粒构建成功, 随后将该质粒转染到 293T 细胞中, 48 h 后, 在荧光显微镜下观察到绿色荧光的表达(图 1B)。接着将 pLenti-CMV-GLP-1/Fc-IRES2-ZsGreen, pMD2.G 和 psPAX2

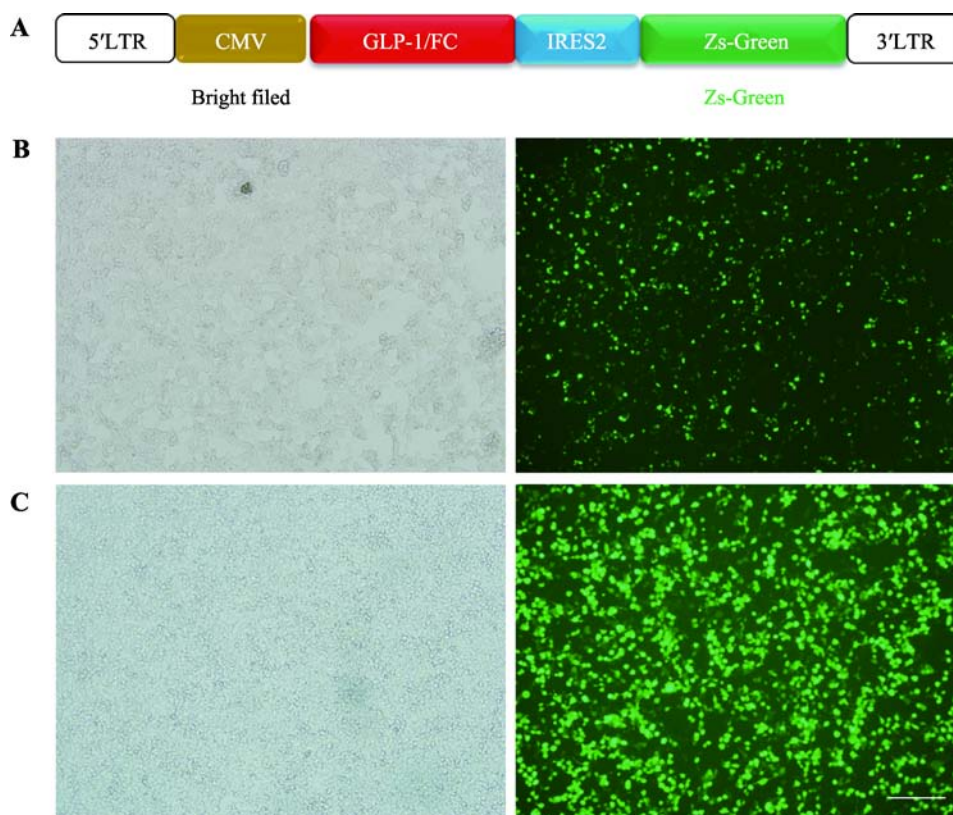


图 1 GLP-1/Fc 慢病毒的包装及验证

Fig. 1 Packaging and validation of GLP-1/Fc lentivirus

A: GLP-1/Fc 过表达载体构建示意图; B: GLP-1/Fc 过表达质粒感染 293T 48 h 后 Zs-Green 表达情况; C: GLP-1/Fc 慢病毒感染 293T 48 h 后 Zs-Green 表达情况, 标尺=200 μm 。

质粒共转到 293T 细胞中, 72 h 后收集病毒上清。经检测, 上清中病毒滴度为 $2.62 \times 10^6/\text{mL}$ 。用该病毒感染 293T, 发现感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 100, 48 h 后也检测到了绿色荧光的表达(图 1B)。以上结果说明本研究成功构建了具有感染能力的 GLP-1/Fc 过表达慢病毒, 可用于后续类器官的感染实验。

2.2 慢病毒感染类器官条件的优化

利用上述 GLP-1/Fc 慢病毒感染类器官, 当 MOI 为 100, 48 h 后未能检测到绿色荧光的表达(图 2A)。这提示类器官可能较难被慢病毒感染, 因此需要对类器官的感染条件进行优化。通过查阅文献发现, 在培养基中添加 polybrene(8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)以及在 600 \times g 离心力的作用下, 慢病毒的感染率能显著提高^[20,21]。在上述条件下, MOI 为 100, 再次感染类器官, 48 h 后依然未能检测到大量绿色荧光的表达(图 2B)。为

此本研究将病毒上清进行浓缩, 得到 $3.28 \times 10^8/\text{mL}$ 的高滴度病毒, 随后用该浓缩病毒感染类器官, MOI 分别为 200、500、1000、2000, 结果显示 MOI 为 200 和 500 时类器官也不能被有效感染(图 2, C 和 D)。当 MOI 提升到 1000 时, 感染 48 h 后大部分类器官都表达绿色荧光(图 2E), 当将感染复数提高到 2000 时, 类器官全部凋亡(图 2F)。上述结果表明 MOI 为 1000 时, 慢病毒对类器官的感染效果最佳。

2.3 GLP-1/FC 过表达类器官的构建及验证

利用前文中优化的慢病毒感染体系, 本研究成功构建了表达 Zs-Green 的类器官, 在荧光显微镜下挑选出绿色荧光表达较强的类器官传代, 经过两次传代之后的类器官依然能表达较强的绿色荧光(图 3, A 和 B), 这一结果证明能够持续稳定表达 GLP-1/Fc-IRES2-ZsGreen 的类器官构建成功。为了验证类器官分泌的 GLP-1/Fc 是否具有活性, 取类器官上清进行

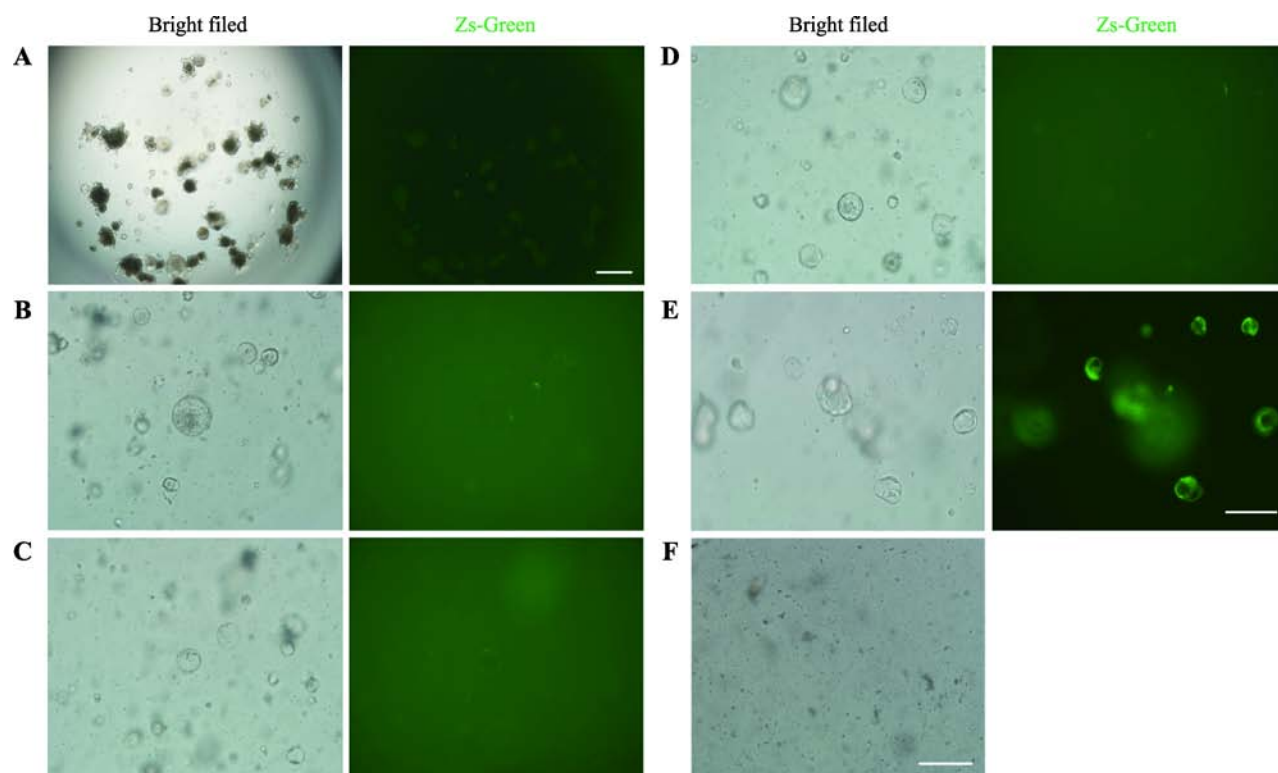


图 2 慢病毒感染类器官条件的优化

Fig. 2 Optimization of conditions for organoids' lentivirus infection

A: MOI=100 时, 病毒上清感染类器官 48 h 后 ZsGreen 的表达情况。标尺=200 μm 。B~E: 优化条件下, MOI=100、200、500、1000 时, 类器官感染病毒 48 h 后 ZsGreen 的表达情况。标尺=100 μm 。F: MOI=2000 时, 类器官基本全部死亡。标尺=100 μm 。

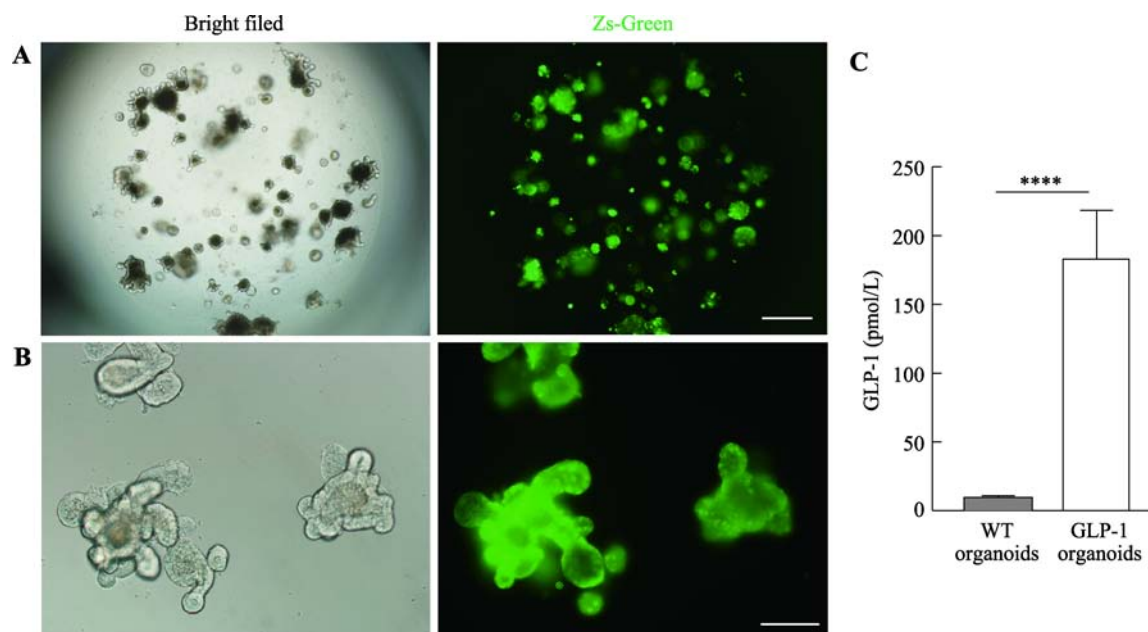


图 3 GLP-1/Fc 过表达类器官的构建

Fig. 3 Construction of GLP-1/Fc overexpression organoids

A: GLP-1/Fc 过表达类器官第一次传代 3 d 后 Zs-Green 的表达情况。标尺=200 μm 。B: GLP-1/Fc 过表达类器官第二次传代 3 d 后 Zs-Green 的表达情况。标尺=100 μm 。C: GLP-1/Fc 过表达类器官及野生型类器官上清中活性 GLP-1 浓度。****: $P < 0.0001$ 。

ELISA 检测, 结果发现 GLP-1/Fc 过表达类器官产生的上清中活性 GLP-1 浓度可达 180 pmol/L (图 3C), 相比 WT 提高了约 20 倍。

2.4 GLP-1/Fc 显著提升 WT 和糖尿病小鼠的糖耐受能力

为了进一步验证过表达类器官分泌的 GLP-1/Fc 活性, 本研究分别用 WT 和糖尿病小鼠进行了糖耐受实验。结果发现注射 GLP-1/Fc 过表达类器官上清的 WT 小鼠在葡萄糖注射 30 min 后血糖就能回复到正常水平, 而注射 PBS 的 WT 小鼠在葡萄糖注射 30 min 后血糖依然保持在较高水平(图 4A)。与此同

时, 在糖尿病小鼠的糖耐受实验当中, 过表达类器官分泌的 GLP-1/Fc 上清也能够快速地降低血糖(图 4B)。这些结果表明, 过表达类器官分泌的 GLP-1/Fc 具有很强的活性, 能够显著提高 WT 和糖尿病小鼠的糖耐受能力。

2.5 类器官原位移植到小肠

为了探索 GLP-1/Fc 类器官原位移植到小肠从而治疗糖尿病的可能性, 本研究取 GFP 小鼠的小肠隐窝, 将其在体外培养形成能自发绿色荧光的类器官(图 5A), 随后通过原位移植的方式将 GFP 类器官注射到小鼠肠壁中(图 5B)。移植一周后, 取移植小

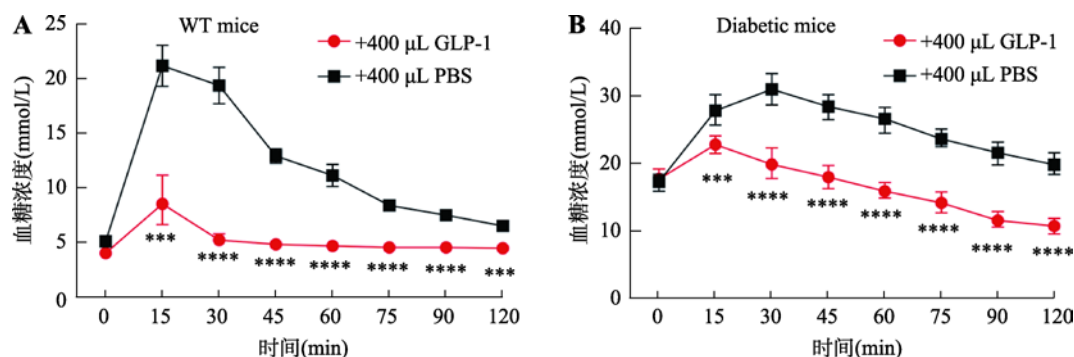


图 4 GLP-1/Fc 在糖耐受实验中能快速回复 WT 和糖尿病小鼠血糖平衡

Fig. 4 GLP-1/Fc can quickly restore blood glucose balance in WT and diabetic mice in glucose tolerance test

A: WT 小鼠的腹腔内糖耐受实验。n=6, 其中曲线下面积(area under curve, AUC)GLP-1 组为 38.57, PBS 组为 87.17。B: 糖尿病小鼠的腹腔内糖耐受实验。n=6, AUC: GLP-1 组为 116.6, PBS 组为 177.6。***: $P<0.001$, ****: $P<0.0001$ 。

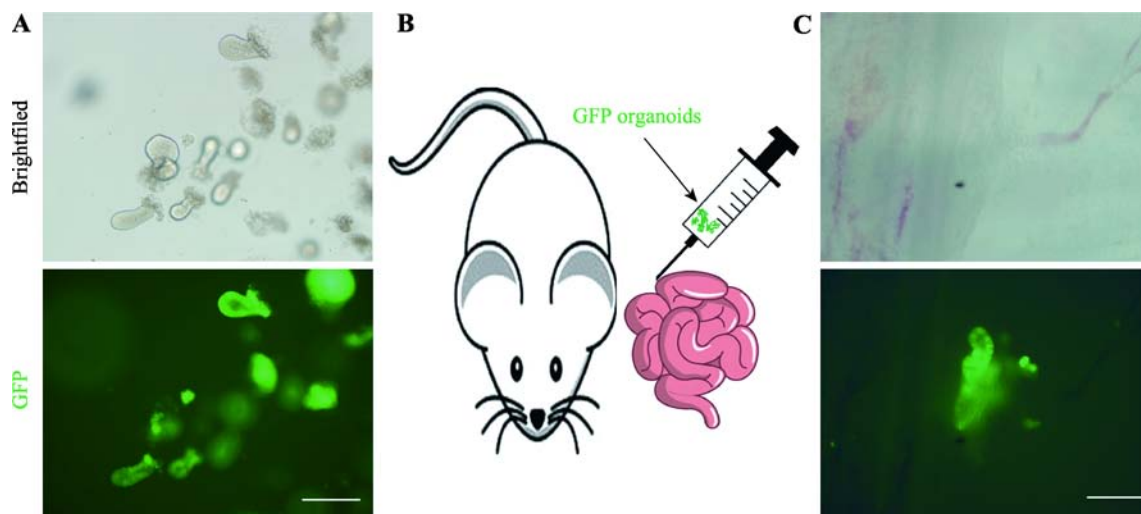


图 5 GFP 类器官原位移植到小鼠小肠

Fig. 5 GFP-organoids were orthotopically transplanted into the small intestine of mice

A: GFP 小鼠的隐窝在体外培养 3 d 后形成类器官及绿色荧光表达情况。标尺=100 μ m。B: GFP 类器官原位移植到小肠示意图。C: 移植 7 d 后检测 GFP 类器官的整合情况。标尺=200 μ m。

鼠的小肠在荧光显微镜下观察,结果显示 GFP 类器官成功整合到了受体小鼠的小肠中(图 5C)。以上结果说明通过原位移植 GLP-1/Fc 类器官治疗糖尿病具有一定的可行性。

3 讨论

GLP-1 主要是由肠道的 L 细胞分泌,而葡萄糖则是促进 L 细胞分泌 GLP-1 的高效刺激物。已经有研究表明肠道 L 细胞内存在多种可能的葡萄糖感应机制,包括甜味受体的激活^[22],钠偶联葡萄糖转运体(sodium coupled glucose transporters, SGLTs)的电活性改变^[23]以及代谢依赖的钾通道(K_{ATP})的关闭^[24,25]等。其中研究的最为清楚的是葡萄糖通过改变 L 细胞中 SGLTs 的电活性从而促进 GLP-1 的释放。其中, SGLT1 是负责小肠刷状缘顶端葡萄糖吸收的转运体,通过在每个葡萄糖分子耦合两个钠离子后内流实现逆浓度梯度的葡萄糖运输。在富含碳水化合物或游离糖的膳食或者注射葡萄糖之后, L 细胞内通过 SGLT1 转运的葡萄糖增多,而与之偶联的钠离子内流则足以驱动细胞膜去极化从而导致 GLP-1 的释放^[23]。因此,在葡萄糖摄入几分钟之内就可以检测到血浆中 GLP-1 的升高^[26]。GLP-1 通过 GLP-1 受体发挥作用,而 GLP-1 受体在许多组织中表达,包括胰岛、肝脏、平滑肌,以及中枢神经系统等,所以 GLP-1 可以通过多种途径降低血糖。

在胰岛中, GLP-1 与胰岛 β 细胞中的 GLP-1 受体结合后导致腺苷酸环化酶的激活和 cAMP 的产生。随后通过以下几种机制刺激胰岛素分泌: (1)抑制 K_{ATP} 通道,导致细胞膜去极化; (2)提高细胞内钙离子浓度; (3)促进线粒体 ATP 合成增加,导致细胞膜的进一步去极化; (4)关闭电压依赖性钾离子通道防止胰岛 β 细胞的再次极化; (5)促进胰岛 β 细胞中胰岛素储存颗粒的胞吐^[27]。此外, GLP-1 还与葡萄糖协同作用,促进胰岛素基因转录、mRNA 稳定和生物合成,从而补充胰岛 β 细胞中胰岛素储备,防止胰岛 β 细胞储备的耗尽^[28]。还有研究报道 GLP-1 能抑制胰高血糖素的分泌^[29]。

除了影响胰岛, GLP-1 对其他组织也有显著作用。GLP-1 是回肠制动的重要介质,回肠制动是一

种反馈回路,当营养物质到达远端肠道时,抑制胃排空,确保食物离开胃的速度不超过近端小肠的消化吸收能力,从而维持血糖的正常^[30]。在大脑中, GLP-1 通过激活下丘脑和脑干中的 GLP-1 受体促进饱腹感,从而减少食物摄入。在肝脏与肌肉中, GLP-1 能促进葡萄糖转变为肝糖原与肌糖原并增强葡萄糖的代谢^[27]。

2 型糖尿病患者 GLP-1 分泌不足,这提示 GLP-1 在这一高发疾病的发病机制中发挥作用,因此 GLP-1 及其类似物在 2 型糖尿病的治疗中被广泛应用^[31]。但是目前注射或者口服 GLP-1 相关药物的治疗方式只能暂时将血糖维持在正常水平。通过 293T 过表达 GLP-1 的细胞治疗方式也存在一定局限性,比如细胞存活周期短,不能原位表达等^[7,9]。因此,构建一种 GLP-1 过表达小鼠小肠类器官可以有效弥补以上不足之处。

本研究首先构建了 GLP-1/Fc 过表达的慢病毒载体,并包装了具有感染能力的慢病毒。随后,优化了慢病毒感染类器官的方法,发现当感染复数为 1000 时,病毒可以高效地感染类器官。通过 WT 和糖尿病小鼠的糖耐受实验发现 GLP-1/Fc 过表达类器官分泌的活性 GLP-1 可以显著提高小鼠的糖耐受能力。最后,本研究还验证了原位移植类器官到小肠的可行性。总的来说,本研究为 2 型糖尿病提供了一种潜在的治疗方法。

然而,本研究依然存在部分有待完善的地方。首先,虽然本研究初步验证了类器官原位移植的可能,但是原位移植多少 GLP-1 过表达类器官才能起到治疗糖尿病的效果还需要进一步的实验探究。其次,虽然有研究表明 GLP-1 的降血糖作用是血糖依赖型的^[32],但是 GLP-1 在体内的持续表达是否会产生副作用也需要进一步的探究,因此可能的解决方案是设计一套血糖响应的 GLP-1 过表达体系,只有当血糖升高时才启动 GLP-1 的表达,反之则 GLP-1 表达关闭。最后,考虑到肠类器官中就有 L 细胞及 GLP-1 的表达^[13,14],此外也已经有研究表明在培养基中加入胆酸或者 G 蛋白偶联胆汁酸受体 1 (G-protein-coupled bile acid receptor 1)激动剂可以导致类器官中 L 细胞增多^[15],那么是否能够通过类似的方法增加糖尿病小鼠体内的 L 细胞,从而治疗糖尿病,这些有意思的想法都值得进一步去探究、求证。

参考文献(References):

- [1] Kieffer TJ, Habener JF. The glucagon-like peptides. *Endocr Rev*, 1999, 20(6): 876–913. [DOI]
- [2] Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, Allen RC, Eaton RP, Ebert R, Creutzfeldt W. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986, 63(2): 492–498. [DOI]
- [3] Perley MJ, Kipnis DM. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest*, 1967, 46(12): 1954–1962. [DOI]
- [4] Meier JJ, Nauck MA, Kranz D, Holst JJ, Deacon CF, Gaeckler D, Schmidt WE, Gallwitz B. Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects. *Diabetes*, 2004, 53(3): 654–662. [DOI]
- [5] Hui HX, Farilla L, Merkel P, Perfetti R. The short half-life of glucagon-like peptide-1 in plasma does not reflect its long-lasting beneficial effects. *Eur J Endocrinol*, 2002, 146(6): 863–869. [DOI]
- [6] Kumar M, Hunag Y, Glinka Y, Prud'homme GJ, Wang Q. Gene therapy of diabetes using a novel GLP-1/IgG1-Fc fusion construct normalizes glucose levels in db/db mice. *Gene Ther*, 2007, 14(2): 162–172. [DOI]
- [7] Soltani N, Kumar M, Glinka Y, Prud'homme GJ, Wang Q. In vivo expression of GLP-1/IgG-Fc fusion protein enhances beta-cell mass and protects against streptozotocin-induced diabetes. *Gene Ther*, 2007, 14(12): 981–988. [DOI]
- [8] Shao JW, Xue S, Yu GL, Yu YH, Yang XP, Bai Y, Zhu SC, Yang LF, Yin JL, Wang YD, Liao SY, Guo SW, Xie MQ, Fussenegger M, Ye HF. Smartphone-controlled optogenetically engineered cells enable semiautomatic glucose homeostasis in diabetic mice. *Sci Transl Med*, 2017, 9(387): eaal2298. [DOI]
- [9] Ye HF, Daoud-El Baba M, Peng RW, Fussenegger M. A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice. *Science*, 2011, 332(6037): 1565–1568. [DOI]
- [10] Clevers H. Modeling development and disease with organoids. *Cell*, 2016, 165(7): 1586–1597. [DOI]
- [11] Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, Clevers H. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1762–1772. [DOI]
- [12] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature*, 2009, 459(7244): 262–265. [DOI]
- [13] Petersen N, Reimann F, Bartfeld S, Farin HF, Ringnald FC, Vries RGJ, van den Brink S, Clevers H, Gribble FM, de Koning EJP. Generation of L cells in mouse and human small intestine organoids. *Diabetes*, 2014, 63(2): 410–420. [DOI]
- [14] Goldspink DA, Lu VB, Miedzybrodzka EL, Smith CA, Foreman RE, Billing LJ, Kay RG, Reimann F, Gribble FM. Labeling and characterization of human GLP-1-secreting L-cells in primary ileal organoid culture. *Cell Rep*, 2020, 31(13): 107833. [DOI]
- [15] Lund ML, Sorrentino G, Egerod KL, Kroone C, Mortensen B, Knop FK, Reimann F, Gribble FM, Drucker DJ, de Koning EJP, Schoonjans K, Bäckhed F, Schwartz TW, Petersen N. L-Cell differentiation is induced by bile acids through GPBAR1 and paracrine GLP-1 and serotonin signaling. *Diabetes*, 2020, 69(4): 614–623. [DOI]
- [16] Goldspink DA, Lu VB, Billing LJ, Larraufie P, Tolhurst G, Gribble FM, Reimann F. Mechanistic insights into the detection of free fatty and bile acids by ileal glucagon-like peptide-1 secreting cells. *Mol Metab*, 2018, 7: 90–101. [DOI]
- [17] Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H, Watanabe M. Functional engraftment of colon epithelium expanded *in vitro* from a single adult Lgr5⁺ stem cell. *Nat Med*, 2012, 18(4): 618–623. [DOI]
- [18] Fukuda M, Mizutani T, Mochizuki W, Matsumoto T, Nozaki K, Sakamaki Y, Ichinose S, Okada Y, Tanaka T, Watanabe M, Nakamura T. Small intestinal stem cell identity is maintained with functional Paneth cells in heterotopically grafted epithelium onto the colon. *Genes Dev*, 2014, 28(16): 1752–1757. [DOI]
- [19] O'Rourke KP, Loizou E, Livshits G, Schatoff EM, Baslan T, Manchado E, Simon J, Romesser PB, Leach B, Han T, Pauli C, Beltran H, Rubin MA, Dow LE, Lowe SW. Transplantation of engineered organoids enables rapid generation of metastatic mouse models of colorectal cancer. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(6): 577–582. [DOI]
- [20] Koo BK, Stange DE, Sato T, Karthaus W, Farin HF, Huch M, van Es JH, Clevers H. Controlled gene expression in primary Lgr5 organoid cultures. *Nat Methods*, 2011, 9(1): 81–83. [DOI]

- [21] Andersson-Rolf A, Fink J, Mustata RC, Koo BK. A video protocol of retroviral infection in primary intestinal organoid culture. *J Vis Exp*, 2014, (90): e51765. [DOI]
- [22] Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim BJ, Zhou J, Kim HH, Xu XR, Chan SL, Juhaszova M, Bernier M, Mosinger B, Margolskee RF, Egan JM. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(38): 15069–15074. [DOI]
- [23] Gorboulev V, Schürmann A, Vallon V, Kipp H, Jaschke A, Klessen D, Friedrich A, Scherneck S, Rieg T, Cunard R, Veyhl-Wichmann M, Srinivasan A, Balen D, Breljak D, Rexhepaj R, Parker HE, Gribble FM, Reimann F, Lang F, Wiese S, Sabolic I, Sendtner M, Koepsell H. Na(+)-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. *Diabetes*, 2012, 61(1): 187–196. [DOI]
- [24] Reimann F, Gribble FM. Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells. *Diabetes*, 2002, 51(9): 2757–2763. [DOI]
- [25] Parker HE, Adriaenssens A, Rogers G, Richards P, Koepsell H, Reimann F, Gribble FM. Predominant role of active versus facilitative glucose transport for glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetologia*, 2012, 55(9): 2445–2455. [DOI]
- [26] Sonne DP, Rehfeld JF, Holst JJ, Vilsboll T, Knop FK. Postprandial gallbladder emptying in patients with type 2 diabetes: potential implications for bile-induced secretion of glucagon-like peptide 1. *Eur J Endocrinol*, 2014, 171(4): 407–419. [DOI]
- [27] Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, 2007, 132(6): 2131–2157. [DOI]
- [28] Holman RR, Bethel MA, Mentz RJ, Thompson VP, Lokhnygina Y, Buse JB, Chan JC, Choi J, Gustavson SM, Iqbal N, Maggioni AP, Marso SP, Öhman P, Pagidipati NJ, Poulter N, Ramachandran A, Zinman B, Hernandez AF, Group ES. Effects of once-weekly exenatide on cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 2017, 377(13): 1228–1239. [DOI]
- [29] Wadden TA, Hollander P, Klein S, Niswender K, Woo V, Hale PM, Aronne L, Investigators NN. weight maintenance and additional weight loss with liraglutide after low-calorie-diet-induced weight loss: the scale maintenance randomized study. *Int J Obes (Lond)*, 2013, 37(11): 1443–1451. [DOI]
- [30] Nauck MA, Niedereichholz U, Ettler R, Holst JJ, Orskov C, Ritzel R, Schmiegel WH. Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am J Physiol*, 1997, 273(5): E981–E988. [DOI]
- [31] Müller TD, Finan B, Bloom SR, D'Alessio D, Drucker DJ, Flatt PR, Fritsche A, Gribble F, Grill HJ, Habener JF, Holst JJ, Langhans W, Meier JJ, Nauck MA, Perez-Tilve D, Pocai A, Reimann F, Sandoval DA, Schwartz TW, Seeley RJ, Stemmer K, Tang-Christensen M, Woods SC, DiMarchi RD, Tschöp MH. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Mol Metab*, 2019, 30: 72–130. [DOI]
- [32] Parsons GB, Souza DW, Wu H, Yu D, Wadsworth SG, Gregory RJ, Armentano D. Ectopic expression of glucagon-like peptide 1 for gene therapy of type II diabetes. *Gene Ther*, 2007, 14(1): 38–48. [DOI]

(责任编辑: 林鑫华)