

猪胰岛素启动子调控 EGFP 表达载体的 优化及体外验证

于淑珍^{1,2}, 冯冲¹, 石宁宁¹, 宋小凤¹, 潘登科¹

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所农业部畜禽遗传资源与种质创新重点实验室, 北京 100193;
2. 四川农业大学动物科技学院, 四川 雅安 625014)

【摘要】 目的 获得猪胰岛素启动子调控外源基因的高效表达载体, 为制备转基因猪胰岛特异性表达目的基因奠定基础。方法 利用猪胰岛素启动子(PIP, 包含5'调控区、第一外显子、第一内含子及第二外显子 ATG 前的序列共 1.5 kb) 构建表达载体, 连接 PIP 和 EGFP 的酶切位点 *Hind* III 设计在起始密码子前, 命名为 PIP-*Hind* III-EGFP。鉴于酶切位点的插入位置可能会影响外源基因的表达效率, 对载体进行了优化: 将 *Hind* III 酶切位点删除, 实现 PIP 和 EGFP 无缝连接, 载体命名 PIP-EGFP; 将第一内含子 3'端的内含子剪接受体位点(splicing acceptor site, SA)突变为 *Hind* III 内切酶识别位点, 命名为 PIP-SA(M)-EGFP。三种载体分别电转染小鼠胰岛素瘤 β 细胞株 MIN-6 细胞、猪耳成纤维细胞以及猪肾细胞, 48 h 后通过荧光强度、流式分析、RT-PCR 及 Western blot 检测, 验证载体的表达效率。结果 转染细胞后, 三种载体都仅在 MIN-6 胰岛 β 细胞表达绿色荧光。RT-PCR 及其产物测序结果显示三种载体的胰岛素启动子第一内含子的剪切存在差异: 载体 PIP-*Hind* III-EGFP 和 PIP-EGFP 的内含子存在剪切和不剪切两种情况, 剪切不稳定; 载体 PIP-SA(M)-EGFP 的 SA 位点突变后内含子不剪切, 流式细胞及 Western blot 检测显示, 与另外两种载体相比, 该载体目的蛋白的表达量最高。结论 通过突变胰岛素启动子第一内含子的 3'端的剪接受体位点, 成功获得了胰岛 β 细胞的高效表达载体, 可用于制备胰岛特异表达外源基因的转基因猪。

【关键词】 胰岛素启动子 PIP; 特异性表达; 小鼠胰岛素瘤 β 细胞株 MIN-6 细胞; EGFP; 五指山小型猪

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 06-0034-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.06.006

Optimization and *in vitro* validation of EGFP expression controlled by porcine insulin promoter

YU Shu-zhen^{1,2}, FENG Chong¹, SHI Ning-ning¹, SONG Xiao-feng¹, PAN Deng-ke¹

(1. Key Laboratory of Farm Animal Genetic Resource and Germplasm Innovation of Ministry of Agriculture,
Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;
2. Faculty of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014)

【Abstract】 Objective Getting the robust exogenous gene expression vector under the control of porcine insulin promoter, and to lay the foundation for pancreatic β-cells specific transgene expressing pigs. **Method** Using porcine insulin promoter (PIP, 1500 bp of the 5'UTR from the porcine INS gene including the first exon and the first intron) to construct expression vector, the *Hind* III restriction site which connected the sequences of PIP and EGFP was designed before ATG, named PIP-*Hind* III-EGFP. Considering that the different location of restriction site may affect the expression efficiency of the transgene, we optimized the expression vector. Firstly the *Hind* III restriction site was deleted to realize the seamless connection of PIP and EGFP, the vector was named PIP-EGFP. Also we mutated the 3' intron splicing acceptor site (SA) of the first intron into *Hind* III restriction site, named as PIP-SA(M)-EGFP. Three different EGFP expression vectors were

【基金项目】 转基因生物新品种培育重大专项(2013ZX08006-004), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2012yq-2)。

【作者简介】 于淑珍(1988-), 女, 硕士, 从事基因工程研究, Email: yushuzhen1988@126.com

【通讯作者】 潘登科(1972-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 遗传修饰猪高效创建及其应用, E-mail: pandengke2002@163.com

respectively transfected MIN-6 mouse pancreatic β -cells, pig ear fibroblasts and kidney cells. The transfected cells were cultured for 48 h and harvested for RT-PCR, flow cytometry and Western blot analysis, to analyze and compare the expression efficiency of vectors. **Results** After transfection, green fluorescence was observed only in MIN-6 mouse pancreatic β -cells. RT-PCR analysis and product sequencing showed that the three expression vectors did have different stability with intron splicing. The PIP-HindIII-EGFP construct and PIP-EGFP vector produced two kinds of mRNA with the first intron spliced and no spliced, indicating the instability of intron splicing. Mutation of the PIP splice site would cause the first intron not spliced, while flow cytometry and Western blot displayed that the mutation induced a most efficient expression of the downstream gene. **Conclusions** A robust and specific β -cells expression vector has been successfully generated by mutating the intron splicing acceptor site of the porcine insulin promoter. It provides the foundation for preparation of pigs with pancreatic β -cells specifically expressing the transgene.

【Key words】 Porcine insulin promoter; Specific expression; MIN-6 mouse pancreatic β -cell; EGFP; Wuzhishan miniature pig

目前,糖尿病已成为威胁全人类健康的重要疾病之一。根据国际糖尿病联盟(IDF)最新统计,2013年全球糖尿病的成人患病率为8.3%,高达3.82亿,其中我国患病人数为9840万,居全球首位^[1]。在对糖尿病的发病机理和发展规律的研究中,基因修饰的动物模型已成为一种重要的手段和工具^[2,3]。

基因修饰的小鼠模型对糖尿病的病理生理学研究做出了很大的贡献,其中最重要的技术是外源基因在胰岛 β 细胞中的特异性表达。大鼠^[4,5]、小鼠^[5]以及人类^[7,8]的胰岛素启动子已用于介导致癌基因、报告基因及CRE重组酶^[9,10]等在转基因小鼠胰岛 β 细胞特异性表达,发现大鼠胰岛素启动子调控的目的基因除了在胰岛 β 细胞表达,在大脑中特定的区域也检测到了表达^[9,11]。小鼠模型在胰岛 β 细胞病理生理学基础研究中发挥了重要作用,而猪和人类的解剖结构、消化代谢、饮食习惯及基因结构等方面具有更大的相似性,使其比小鼠在糖尿病治疗研究中具有更重要的作用。由于启动子的活性受到其调控元件和因子间相互作用的影响,在制备转基因猪的过程中,鉴于猪体内的调控因子可能对异源启动子的调控存在差异,选择其直系同源的猪胰岛素启动子将会比人类和小鼠的启动子发挥更好的调控作用。

猪完整的前胰岛素原cDNA及其5'侧翼区序列已被准确地克隆和研究。猪的胰岛素基因有3个外显子,2个内含子,在其5'侧翼序列区含有高度保守的顺式作用元件,包括多个E结合区、A结合区以及cAMP反应结合元件(CRE)。本研究利用1.5kb的猪胰岛素启动子(包括第一外显子和第一内含子),针对是否插入酶切位点及其插入位置不同,构建了三种胰岛特异性表达载体,比较分析后获得了

最高效稳定的胰岛 β 细胞特异性表达载体,为制备胰岛特异性表达目的基因的转基因猪奠定了基础,对获得糖尿病动物模型以及糖尿病研究治疗具有重大意义。

1 材料与方法

1.1 细胞、菌株与质粒

小鼠胰岛素瘤 β 细胞株MIN-6细胞由解放军总医院内分泌实验室母义明教授惠赠;五指山小型猪耳成纤维细胞及肾细胞由本实验室建立;Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell、pEASY-T1 Simple Cloning Kit购自北京全式金生物技术有限公司;质粒载体pcDNA3.1/Hygro和pBluescript II SK(-)来自Invitrogen公司(美国);质粒载体pIRES-EGFP来自Clontech公司(美国)。

1.2 试验试剂及材料

限制性内切酶(New England Biolabs,美国);质粒提取试剂盒(Qiagen,德国);LA Taq酶、T4 DNA Ligase(TaKaRa,日本);抗GFP标签兔多克隆抗体(ComWin Biotech,北京);抗 β -actin抗体(Abcam,英国);转染仪AmaxaNucleofector II及转染试剂盒(Lonza,瑞士);细胞培养相关耗材(BD Falcon,美国)。

1.3 胰岛特异性表达载体的构建

参考GenBank中猪胰岛素基因序列(登录号:AY-242105.1),设计引物扩增猪胰岛素启动子(porcine insulin promoter,PIP);参考载体pcDNA3.1/Hygro的牛生长激素PolyA(bovine growth hormone polyadenylation signal, bGHPA)以及潮霉素抗性基因(hygromycin, Hyg)序列信息,设计引物扩增目的片段;增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的序列从载体pIRES-EGFP中扩

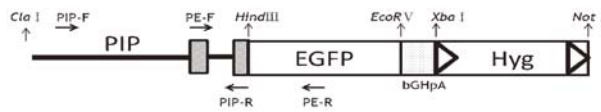
增得到。以上使用的 4 对引物都使用 Primer 5.0 软件设计,由中美泰和公司合成。

PCR 扩增产物回收纯化后连接 pEASY-T1 Simple 载体,构建重组质粒,并转化大肠杆菌 Trans1-T1 菌株,经 PCR 扩增鉴定为阳性的菌液送中美泰和公司测序。为了后续改造与分析载体,将测序鉴定后的重组质粒用限制性内切酶双酶切后回收目的片段,将回收的酶切产物 bGHPA、EGFP、PIP 和 Hyg 依次连入骨架载体 pBluescript II SK(-),构建了表达载体 PIP-Hind III-EGFP,该载体中 HindIII 酶切位点在 EGFP 的起始密码子 ATG 前。载体经过 PCR 和

酶切鉴定正确后用于后续实验,载体信息详见图 1 (A)。

以表达载体 PIP-Hind III-EGFP 为对照载体,针对 Hind III 酶切位点的位置,对载体进行优化,改造构建了另外两种载体。一种为:把第一内含子 3' 端的内含子剪接受体位点(SA)核酸序列 GGTCCT 突变为 HindIII 内切酶识别位点,构建成表达载体 PIP-SA(M)-EGFP;另一种为:直接删除 HindIII 识别位点实现 PIP 和 EGFP 无缝连接,构建表达载体 PIP-EGFP。载体由于酶切位点位置不同导致的序列差异见表 1。

(A)



(B)

```
CAGGCGCTATAAAGCCGGCTGGGCCAGCCGCCAGCCCTCTGGGACCAGCTGTGTTCCAGGCCACC
GGCAAGCAGGTCTGTCCCCCTGGGCTCCCGTCAGCTGGGTCTGGGCTGTCTGTGGGGCCAGGGCATCT
CGGCAGGAGGACGTGGGCTCTCTCTCGGAGCCCTTGGGGGTGAGGCTGGTGGGGCTGCAGGTGCC
CTGGCTGGCTCAAGCCGCCCGTCCCCAGTCTCACCCCCGCCATG
```

注:A. 表达载体主要由猪胰岛素基因 5'UTR 的 1500bp 序列(猪胰岛素启动子,PIP,包含第一外显子和第一内含子)和牛生长激素 3'UTR 及其 Poly A 序列组成。B. PIP 启动子翻译起始位点 ATG 上游的少部分序列,灰色阴影分别表示第一外显子和第二外显子。

图 1 表达载体结构示意图和对应的酶切位点

Note. A. The expression cassette containing 1500 bp of the 5'UTR from the porcine INS gene (porcine insulin promoter, PIP, including the first exon and the first intron) and the 3'UTR of the bovine growth hormone gene (bGHPA). B. Some upstream nucleotide sequences of the porcine insulin promoter translation initiation site ATG. The nucleotide sequence exon1 and exon2 is highlighted in grey.

Fig. 1 Schematic representation of the construct including the position of relevant restriction sites.

表 1 三种载体的 HindIII 酶切位点

Tab. 1 The HindIII restriction sites of the three kinds of expression vectors

表达载体 Expression vector	酶切位点位置 Location of the Hind III restriction sites
PIP-Hind III-EGFP	CCCCCAG <u>GTCCTCACCCCGCCCAAGCTT</u> ATG GTGAGC
PIP-SA(M)-EGFP	CCCCCA <u>AAGCTT</u> CACCCCGCCCATG GTGAGC
PIP-EGFP	CCCCCAG <u>GTCCTCACCCCGCCCATG</u> GTGAGC

注:灰色阴影标注的为第二外显子序列,上下游分别是第一内含子和 EGFP 的序列,下划线标记的为 Hind III 识别位点 AAGCTT。

Note. The nucleotide sequence exon2 is highlighted in grey, upstream and downstream sequences are respectively the first intron and EGFP sequence, underlined nucleotide sequence AAGCTT is HindIII restriction site.

1.4 细胞培养

五指山小型猪耳成纤维细胞和猪肾细胞用高糖 DMEM 培养基(含 15% 胎牛血清,3.7 g/L 碳酸氢钠,66 mg/L 青霉素,100 mg/L 链霉素,3.57 g/L HEPES),在 37℃,5% CO₂ 中培养至细胞 ≥80% 融合时消化,进行传代、冻存或实验。

小鼠胰岛素瘤 β 细胞株 MIN-6 细胞在 37℃,5% CO₂ 培养箱,高糖 DMEM 培养基中(需添加 64

μmol /L β-巯基乙醇)培养至细胞 ≥80% 融合时消化,进行传代、冻存或实验^[12]。

1.5 载体的体外转染验证及表达检测

载体使用无内毒素大提试剂盒提取后,分别转染 MIN-6 胰岛 β 细胞,五指山小型猪耳成纤维细胞和肾细胞。用转染试剂重悬细胞,加入 8 μg 的表达载体进行电转染,培养 48 h 后倒置荧光显微镜下观察细胞 EGFP 的荧光,随后收集细胞,分别进行细胞

裂解 PCR, 半定量 RT-PCR, β 细胞进行细胞流式分析及 Western blot 检测, 且载体转染 MIN-6 胰岛 β 细胞的 RT-PCR 产物进行克隆后测序分析。

体外 PCR 检测试验中共使用 3 对引物。PIP-F/R(引物位置见图 1) 分别设计在猪胰岛素启动子的 3' 端和 5' 端, 用于检测 cDNA 模板中是否有基因组 DNA 污染, 产物大小为 1.5 kb; PE-F/R(引物位置见图 1) 引物跨 PIP 的第一内含子设计, PE-F 在猪胰岛素启动子 PIP 第一外显子序列上, PE-R 设计在 EGFP 序列上, 用于检测目的基因的表达; β -actin 为管家基因, 产物长 188 bp。

2 结果与分析

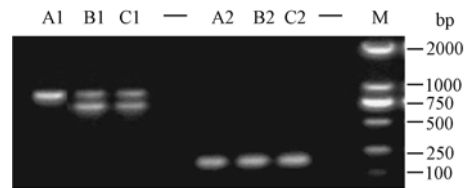
2.1 表达载体的活性及特异性分析

三种载体转染细胞 2 d 后, 在倒置荧光显微镜下进行荧光观察发现: MIN-6 胰岛 β 细胞均可见明显的绿色荧光, 猪耳成纤维细胞及肾细胞中未观察到绿色荧光。表达载体 PIP-SA(M)-EGFP 转染后细胞荧光见图 2(彩插 5)。裂解细胞进行 DNA 检测, PCR 扩增结果表明质粒均整合到了三种细胞中, 说明本实验中使用的胰岛素启动子可以成功地调控下游基因在胰岛 β 细胞中特异性表达。

2.2 RT-PCR 检测及测序分析

三种载体转染 MIN-6 胰岛 β 细胞的 RT-PCR 产物经电泳检测显示, PIP-F/R 没有扩增出目的条带, 表明反转录得到的 cDNA 中不存在基因组 DNA 污染; 对照载体 PIP-HindIII-EGFP 和改造载体 PIP-EGFP 引物 PE-F/R 的产物存在 2 条扩增条带 872 bp 和 711bp, 而载体 PIP-SA(M)-EGFP 只有一条 872 bp 的条带(见图 3)。将 RT-PCR 产物 T-A 克隆后测序, 序列比对分析表明 872 bp 条带的核酸序列 PIP

第一内含子没有被剪接, 711 bp 是内含子剪接后的条带, 说明改造的载体 PIP-SA(M)-EGFP 转录后 PIP 第一内含子不剪切; 改造载体 PIP-EGFP 和对照载体 PIP-HindIII-EGFP 一样, 第一内含子发生剪切, 但剪切不稳定; 并且测序比对结果显示, 对照载体 PIP-HindIII-EGFP 条带 872 bp 的核酸序列中还存在另一种剪切情况, 剪接体序列为 CCCCCAGGTCCT-CAGCCCCGGCC AAGCTT ATGGTGAGC(删除线表示剪切掉的序列, 灰色突出表示 HindIII 识别序列)。



注: A. PIP-SA(M)-EGFP; B. PIP-EGFP; C. PIP-HindIII-EGFP; 1. PE-F/R; 2. β -actin-F/R; -: 空白对照; M: DNA marker。

图 3 细胞体外表达 EGFP 的 RT-PCR 检测

Note. A. PIP-SA(M)-EGFP; B. PIP-EGFP; C. PIP-HindIII-EGFP; 1. PE-F/R; 2. β -actin-F/R; -: blank control; M: DNA marker.

Fig. 3 RT-PCR detection of EGFP expressed by cells *in vitro*

2.3 Western blot 检测 EGFP 的表达

改造的两种载体和对照载体转染 MIN-6 胰岛 β 细胞, 2 d 后收集细胞提取蛋白, 酶标测定浓度后以总蛋白量 30 μ g 上样, Western blot 检测结果显示: 改造的两种载体 EGFP 的蛋白表达量水平明显高于对照载体, 且改造载体 PIP-SA(M)-EGFP 的 EGFP 蛋白表达量明显最高(见图 4)。

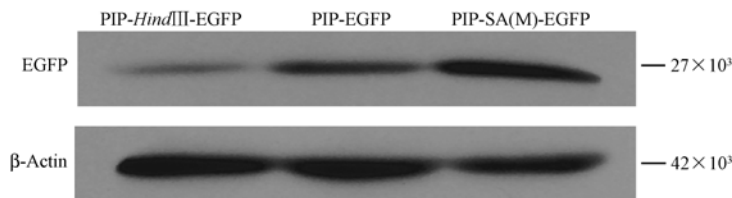


图 4 MIN-6 β 细胞体外表达 EGFP 的 Western blot 检测

Fig. 4 Western blot analysis of the expression of EGFP expressed in MIN-6 β cells *in vitro*

2.4 细胞流式分析

载体转染 1×10^6 个 MIN-6 胰岛 β 细胞, 2 d 后, 采用 0.1% 的胰蛋白酶消化, 然后用高糖 DMEM 培养液重悬, 过 70 μ m 细胞筛后, 进行细胞流式分析,

结果表明: 载体 PIP-HindIII-EGFP、PIP-EGFP、PIP-SA(M)-EGFP 转染后细胞的平均荧光强度分别为 9.68、12.97、28.62, 载体 PIP-SA(M)-EGFP 转染的细胞 EGFP 平均荧光强度极显著高于另外两个载体

($P \leq 0.01$, 图 5), 该结果与 Western blot 检测的结果一致, 细胞流式分析散点图见图 6。

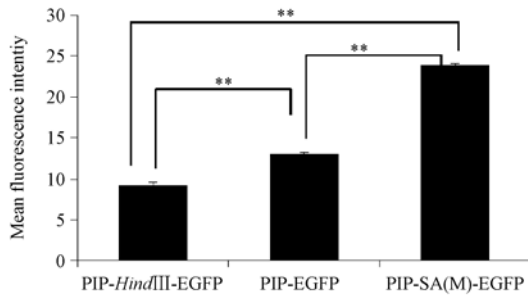


图 5 MIN-6 胰岛 β 细胞流式分析的平均荧光强度

Fig. 5 Mean fluorescence intensity of MIN-6 β cells detected by flow cytometry

3 讨论

本研究利用猪胰岛素基因启动子序列构建 EGFP 表达载体, 针对限制性内切酶 *Hind* III 识别位点在

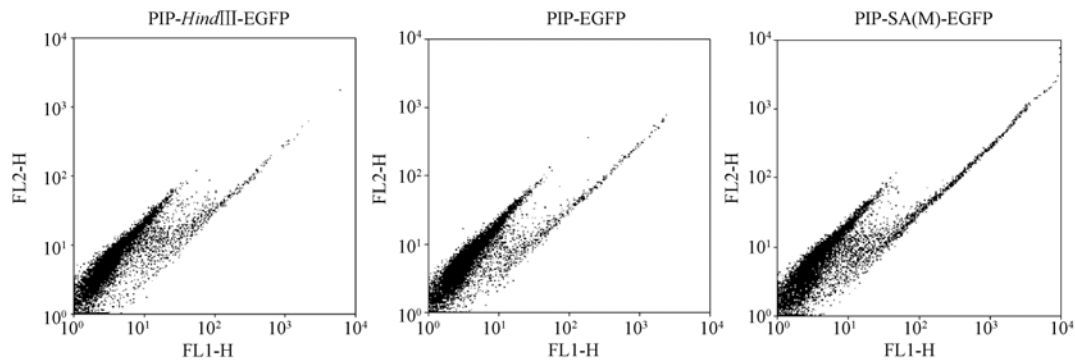


图 6 MIN-6 胰岛 β 细胞流式分析

Fig. 6 Flow cytometry analysis of MIN-6 β cells

真核生物基因的表达翻译在很大程度上依赖其翻译起始位点周围的 Kozak 结构。Kozak 序列在翻译起始中发挥重要的识别作用, 借助 Kozak 序列搜索识别起始密码子并启动翻译。Kozak 序列的简并形式表示为 NN(G/A)NNATGG, 已广泛应用于真核基因表达载体的构建和表达, 且不影响目的蛋白的性质和功能。本研究中发现原胰岛素外显子 2 的起始密码子前包含了 Kozak 调控序列, 载体 PIP-HindIII-EGFP 中 *Hind* III 酶切位点插入在起始密码子 ATG 之前, 破坏了 Kozak 序列, 而另两种表达载体的设计保存了 Kozak 序列的完整, 因此载体 PIP-HindIII-EGFP 调控的 EGFP 的荧光明显最弱, 蛋白翻译效率最低。

本实验通过表达载体的体外表达验证发现, 载

载体启动子中的位置不同构建了三种表达载体, 结果表明三种载体都能调控外源基因在胰岛 β 细胞内特异性表达。然而研究发现, 在载体构建中引入的 *Hind* III 酶切位点序列对 mRNA 的转录及翻译造成了影响。

RNA 拼接在真核生物基因表达过程中具有非常重要的作用, 前体 RNA 经过内含子的剪切和拼接以后形成具有编码信息功能的 mRNA。RNA 的剪接位置主要依赖于剪接位点的识别和 GT-AG 规则, 载体 PIP-HindIII-EGFP 测序结果发现了异常的内含子剪接, 可能是由于 *Hind* III 酶切位点位置刚好产生了一个新的内含子剪接位点 5'-GU...A...AG-3', 在内含子剪接过程中拼接位点不能正确识别, 从而导致内含子剪接紊乱的现象。而载体 PIP-SA(M)-EGFP 中用 *Hind* III 位点对第一内含子 3'端拼接位点进行了突变, 使第一内含子不剪接, 形成稳定的表达。

体构建过程中导入的酶切位点对 PIP 内含子的剪切造成影响, 从而影响了蛋白翻译效率, 这与以往研究结果一致。Watanabe 等^[13] 利用猪胰岛素启动子构建载体, 其载体的设计与本研究中的载体 PIP-EGFP 相似, 即将载体构建中连接 PIP 和目的基因的酶切位点删除, 实现启动子和下游基因间的无缝连接, 值得关注的是, Watanabe 构建的载体在体外细胞实验中实现了胰岛 β 细胞特异性表达, 但是在其制备的转基因小鼠中却未能检测到目的基因的表达。针对这一结果, 本研究对载体中内含子拼接位点进行了突变, 从而提高了翻译效率。Grzech 等^[14,15] 构建的胰岛 β 细胞特异性表达载体, 将 PIP 第一内含子的剪接受体位点 (SA) 突变成了 *Hind* III 酶切位点, 此载体的构建与本研究载体 PIP-SA(M)-EGFP 相

似, Grzech 利用其构建的载体获得了外源基因能够在胰岛中特异表达的转基因小鼠和猪, 但并没有对拼接位点的改变进行相关研究。本试验结果明确表明将内含子剪接受体位点突变为 *HindIII* 序列对 mRNA 的转录及翻译产生了影响, 我们对这种结果的原因进行了分析。总之, 本研究通过突变胰岛素启动子第一内含子的 3' 端的剪接受体位点, 成功获得了胰岛 β 细胞的高效表达载体, 为后续目的基因在转基因猪胰岛中特异表达奠定了基础, 对糖尿病小型猪模型的建立及糖尿病研究和治疗具有重大的意义。

(本文图 2 见彩插 5。)

参 考 文 献

- [1] Guariguata L, Whiting D, Hambleton I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035 for the IDF Diabetes Atlas [J]. *Diabetes Res Clin Pr*, 2014, 103(2):137-149.
- [2] Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, et al. β -Cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the β -cell phenotype and maturity onset diabetes [J]. *Gene Dev*, 1998, 12(12):1763-1768.
- [3] 张芳林, 李果. 2 型糖尿病大鼠模型的建立及其糖代谢特征分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2002, 10(1):16-20.
- [4] Dahl U, Sjodin A, Semb H. Cadherins regulate aggregation of pancreatic beta-cells in vivo [J]. *Development*, 1996, 122(9):2895-2902.
- [5] Vasavada RC, Cavaliere C, D'Ercole AJ, et al. Overexpression of parathyroid hormone-related protein in the pancreatic islets of transgenic mice causes islet hyperplasia, hyperinsulinemia, and hypoglycemia [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(2):1200-1208.
- [6] Hara M, Wang X, Kawamura T, et al. Transgenic mice with green fluorescent protein-labeled pancreatic β -cells [J]. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*, 2003, 284(1):E177-E183.
- [7] Hotta M, Tashiro F, Ikegami H, et al. Pancreatic β cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes [J]. *J Exp Med*, 1998, 188(8):1445-1451.
- [8] Krakowski ML, Kritzik M, Jones E, et al. Transgenic expression of epidermal growth factor and keratinocyte growth factor in beta-cells results in substantial morphological changes [J]. *J Endocrinol*, 1999, 162(2):167-175.
- [9] Gannon M, Shiota C, Postic C, et al. Analysis of the Cre-mediated recombination driven by rat insulin promoter in embryonic and adult mouse pancreas [J]. *Genesis*, 2000, 26(2):139-142.
- [10] Dor Y, Brown J, Martinez OI, et al. Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation [J]. *Nature*, 2004, 429(6987):41-46.
- [11] Martín J, Hunt SL, Dubus P, et al. Genetic rescue of *Cdk4* null mice restores pancreatic β -cell proliferation but not homeostatic cell number [J]. *Oncogene*, 2003, 22(34):5261-5269.
- [12] 李琳, 刘瑜, 李春霖, 等. 不同葡萄糖浓度对小鼠胰岛 β 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *军医进修学院学报*, 2011, 32(6):629-631.
- [13] Watanabe M, Umeyama K, Kawano H, et al. The production of a diabetic mouse using constructs encoding porcine insulin promoter-driven mutant human hepatocyte nuclear factor-1alpha [J]. *J Reprod Develop*, 2007, 53(2):189-200.
- [14] Grzech M, Dahlhoff M, Herbach N, et al. Specific transgene expression in mouse pancreatic β -cells under the control of the porcine insulin promoter [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 315(1):219-224.
- [15] Klymiuk N, Van Buerck L, Bähr A, et al. Xenografted islet cell clusters from INSLEA29Y transgenic pigs rescue diabetes and prevent immune rejection in humanized mice [J]. *Diabetes*, 2012, 61(6):1527-1532.

[收稿日期] 2014-04-23