

胰岛素受体底物在宫内发育迟缓大鼠
胰腺组织中的表达

李瑶¹ 辛颖²

(1. 沈阳市儿童医院, 辽宁 沈阳 110032; 2. 中国医科大学附属盛京医院儿科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 研究胰岛素受体底物1(IRS-1)和胰岛素受体底物2(IRS-2)在宫内发育迟缓(IUGR)大鼠生后0周、3周和8周胰腺组织中的表达,探讨IUGR个体易患代谢综合征的分子机制。方法 采用母孕期低蛋白饮食法建立IUGR大鼠模型,应用RT-PCR技术检测子鼠在生后0周、3周、8周胰腺组织中IRS-1和IRS-2 mRNA水平。采用Western杂交检测IRS-1和IRS-2蛋白的表达。母孕期得到正常饮食的子鼠作为对照组。结果 IUGR组0周、3周、8周胰腺组织IRS-2 mRNA和蛋白表达水平均显著低于对照组($P < 0.05$),IRS-1 mRNA和蛋白表达水平与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 IUGR子鼠生后0周、3周和8周胰腺组织中IRS-2 mRNA和蛋白水平显著下降,可能是IUGR个体易患代谢综合征的分子机制之一。

[中国当代儿科杂志,2010,12(12):972-975]

[关键词] 宫内发育迟缓;胰岛素受体底物;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)12-0972-04

Expression of insulin receptor substrates in pancreas of rats with intrauterine growth retardation

LI Yao, XIN Ying. Shenyang Children's Hospital, Shenyang 110032, China (Xin Y, Email: xin.ying168@live.cn)

Abstract: Objective To study the expression of insulin receptor substrate-1(IRS-1) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) in pancreas of rats with intrauterine growth retardation (IUGR). **Methods** An IUGR rat model was prepared by protein malnutrition during pregnancy. The pancreas samples of the IUGR pups were obtained at birth, and 3 weeks and 8 weeks of age. The expression of IRS-1 and IRS-2 mRNA were ascertained by RT-PCR. Western blot was used to measure the protein expression of IRS-1 and IRS-2. The rat pups born from the mother rats who received normal diet during pregnancy severed as the control group. **Results** The expression levels of IRS-2 mRNA and protein in pancreas of the IUGR group were significantly lower than those in the control group at all three time points ($P < 0.05$). There were no significant differences in the expression levels of IRS-1 mRNA and protein in pancreas between the IUGR and the control groups. **Conclusions** The IRS-2 expression levels in pancreas in IUGR rats decrease significantly at birth, and 3 weeks and 8 weeks of age. This might be one of the molecular mechanisms for the development of metabolic syndrome in later life in IUGR individuals. **[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (12):972-975]**

Key words: Intrauterine growth retardation; Insulin receptor substrate; Rats

宫内发育迟缓(intrauterine growth retardation, IUGR),一般指出生体重(birth weight, BW)低于同胎龄、同性别平均体重的第10百分位数以下或同胎龄、同性别平均体重2个标准差以下的新生儿^[1]。近10年来的流行病学调查证明,出生时体格大小与成年后的疾病如冠心病、高血压、2型糖尿病等有密切关系。2型糖尿病和高血压常常同时发病,并与脂代谢异常、肥胖和胰岛素抵抗密切相关,

它们被称为代谢综合征,代谢综合征的中心环节是胰岛素抵抗^[2]。许多研究发现,胰岛素受体底物(IRS-1、IRS-2)的表达低下可导致胰岛素抵抗。本研究通过孕期蛋白质营养不良法建立IUGR模型^[3],采用RT-PCR和Western杂交技术检测IUGR鼠生后0周、3周、8周时胰腺组织中IRS-1、IRS-2 mRNA和蛋白表达水平,探讨IUGR个体产生胰岛素抵抗的分子机制,为代谢综合征的早期防治提供

[收稿日期]2010-04-13;[修回日期]2010-06-08
[基金项目] 辽宁省教育厅高等学校科研项目计划(No. 208847),沈阳市科学技术计划项目(No. 080520)。
[作者简介] 李瑶,女,硕士,副主任医师。
[通信作者] 辛颖,主任医师。

理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

PCR 扩增仪(日本 TakaRaTP-600 型),电泳仪(美国 BIORAD-PAC300 型), Tanon CERTIFIED MAILGIS-2020 数码图像扫描分析系统(上海), UP200H 型组织超声匀浆器(德国),深低温冰箱、组织蛋白提取试剂盒(南京凯基生物公司),总蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程研究所),IRS-1、IRS-2 兔抗大鼠 IgG(Santa Cruz 美国),碱性磷酸标记山羊抗兔 IgG(Sigma,美国),大鼠 IRS-1、IRS-2 和 β -actin 引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

1.2 实验动物

健康 Wistar 大鼠 15 只,体重 230 ~ 280 g,雄性 3 只,雌性 12 只,大鼠由中国医科大学实验动物中心提供[动物合格证号 SYXK(辽)2003-0019],大鼠按雌:雄 4:1 比例合笼,次晨 8 ~ 9 时涂片,以镜下见精子作为受孕第 1 天。大鼠按受孕顺序随机分成低蛋白组和正常对照组,每组 6 只。正常对照组孕鼠饲以标准饲料(热卡为 15.83 kJ/g,蛋白质含量为 23%);低蛋白组孕鼠自妊娠第 1 天起饲以低蛋白饲料(热卡为 15.58 kJ/g,蛋白质含量为 8%),饲料均由中国医学科学院实验动物研究所配制。所有孕鼠均自然分娩,称量 12 h 内新生子鼠体重精确到 0.01 g。IUGR 诊断标准:新生鼠出生体重低于正常对照组出生平均体重的 2 个标准差^[1]。符合 IUGR 诊断标准的子鼠保留,不符合诊断标准的子鼠舍弃。

1.3 标本采集

分娩后母乳喂养,两组母鼠都饲以标准饲料,IUGR 组和正常对照组幼鼠满 3 周后断乳,分笼饲养,都饲以标准饲料,观察两组子鼠的发育情况,记录每周体重。以生后 0 周、3 周、8 周为时间点,每个时间点上随机选取 8 只鼠为实验对象,0 周组新生鼠出生后立即处死并留取胰腺,迅速置 -70℃ 冰箱冻存;3 周及 8 周鼠处死前禁食 12 h,标本留取同上。

1.4 实验方法

1.4.1 引物设计 大鼠 IRS-1、IRS-2 和内参照 β -actin 引物参照 GenBank 中的基因序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计,由北京六合华大基因科技股份有限公司合成,序列见表 1。

1.4.2 胰腺总 RNA 提取和逆转录 每组随机取 8 只鼠,称取 100 mg 胰腺组织,用 Trizol 试剂抽

表 1 目的基因引物序列

目的基因	序列	片段长度(bp)
IRS-1	5'-TGGACAAACGGAGTAGGG-3'	341
	5'-CTGGTGGAAAGAGGAGGAA-3'	
IRS-2	5'-CCCCTCTGGGTCGGATT-3'	807
	5'-TCACTCGGGCACCTTCTGG-3'	
β -actin	5'-GCC AACCGTGAAAAGATG-3'	701
	5'-CCAGGATAGAGCCACCAAT-3'	

提,紫外分光光度计测定总 RNA 的 260 nm 和 280 nm 处的光密度值(单位:OD),以 OD 260/OD 280 比值检验纯度,逆转录试剂采用 RNA PCR kit(大连 TakaRa 公司),反应按照试剂说明书进行。

1.4.3 目的基因的 PCR 及产物检测 IRS-1、IRS-2 PCR 扩增条件:IRS-1、IRS-2 94℃ 2 min 预变性,94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 45 s,30 个循环,72℃ 7 min 延伸。 β -actin PCR 扩增条件:94℃ 2 min 预变性,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,30 个循环,72℃ 5 min 延伸。RT-PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后,紫外灯下观察结果并拍照。用 GIS-2020 数码凝胶扫描图像及分析系统进行电泳条带分析 IRS-1、IRS-2 基因的 mRNA 表达水平(以其与内参照的相对表达量来计算)。

1.4.4 Western blot 检测 IRS-1、IRS-2 蛋白表达

取 100 mg 胰腺组织,加入裂解液(含 2 mM EDTA,10 mM EGTA,20 mM Tris/HCL, pH 7.5, 2 mM PMSF,0.25 mM 蔗糖)提取总蛋白,按 Bradford 法测定总蛋白浓度,取 50 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,并将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,再用 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h,NC 膜在 IRS-1、IRS-2 兔抗大鼠 IgG(1:100)溶液中 4℃ 过液杂交。洗膜后加碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG(1:1 000)中杂交反应 2 h,充分洗膜后加显色液,显色至条带清晰呈现后终止染色,用 GIS-2020 数码图像分析系统 IRS-1、IRS-2 蛋白杂交带进行扫描分析密度值。

1.5 统计学分析

所有数据均以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学处理。两组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 孕期低蛋白饮食对子鼠生长发育的影响

IUGR 组和对照组平均孕期均为 21.5 d(21 ~ 22 d),平均产仔数也无差别。低蛋白组 IUGR 发生

率为 54% (27/50 只),明显高于对照组的 4% (2/48 只)($P<0.01$)。与对照组出生体重相比,低蛋白组出生体重明显降低($P<0.01$)。自哺乳期 IUGR 组就出现生长追赶,3 周时 IUGR 组平均体重仍低于对照组,8 周时 IUGR 组体重超过对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),说明已出现肥胖倾向。见表 2。

表 2 两组子鼠的不同发育阶段的体重 ($\bar{x}\pm s$, g)				
组别	鼠数	0 周	3 周	8 周
对照组	8	4.93±0.32	35.14±4.24	139.37±7.74
IUGR 组	8	3.92±0.22	27.26±3.95	160.38±16.79
t 值		7.36	3.94	3.21
P 值		0.001	0.01	0.01

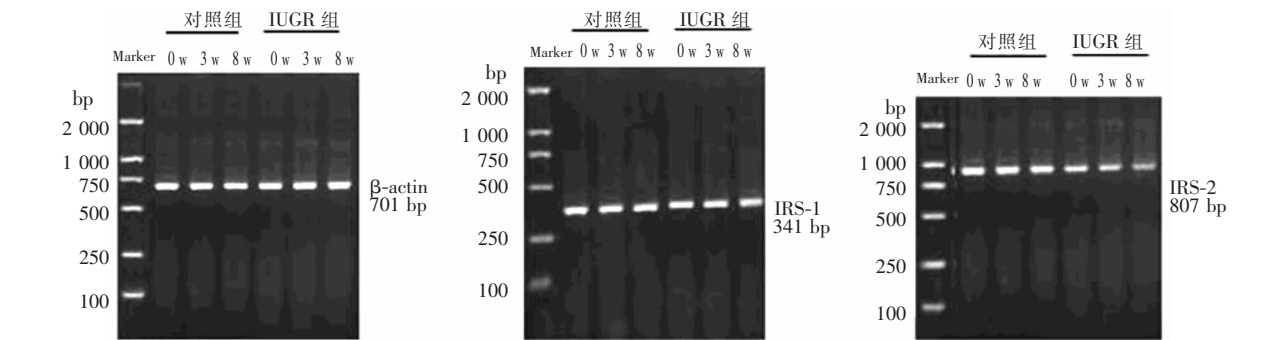


图 1 0 周、3 周、8 周胰腺组织 IRS-1、IRS-2 mRNA 表达 (RT-PCR)

表 3 两组胰腺组织 IRS-1 及 IRS-2 mRNA 相对表达水平 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IRS-1 mRNA			IRS-2 mRNA		
		0 周	3 周	8 周	0 周	3 周	8 周
对照组	8	1.04±0.08	1.03±0.08	1.03±0.08	1.13±0.08	1.11±0.09	1.08±0.06
IUGR 组	8	1.00±0.07	0.96±0.07	1.02±0.07	0.98±0.07	0.83±0.06	0.79±0.06
t 值		1.033	0.75	0.4	4	7.36	9.93
P 值		0.1	0.4	0.5	0.002	0.001	0.001

表 4 两组胰腺组织 IRS-1 和 IRS-2 蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IRS-1			IRS-2		
		0 周	3 周	8 周	0 周	3 周	8 周
对照组	8	101±8	104±8	105±8	155±11	151±11	155±13
IUGR 组	8	99±7	102±8	104±8	138±10	121±9	110±8
t 值		0.52	0.5	0.25	3.32	6	8.57
P 值		0.5	0.5	0.5	0.005	0.001	0.001

2.2 胰腺组织 IRS-1、IRS-2 mRNA 表达水平

RT-PCR 结果显示,IUGR 组 0 周、3 周、8 周鼠 IRS-1 mRNA 相对表达量与对照组比较差异无统计学意义,IRS-2 mRNA 相对表达量低于对照组($P<0.05$, $P<0.01$)。见图 1,表 3。

2.3 胰腺组织 IRS-1、IRS-2 蛋白表达水平的变化

IUGR 组 0 周、3 周、8 周鼠 IRS-1 蛋白的表达量与对照组比较差异无统计学意义,IRS-2 蛋白的表达量低于对照组($P<0.01$)。见表 4,图 2。

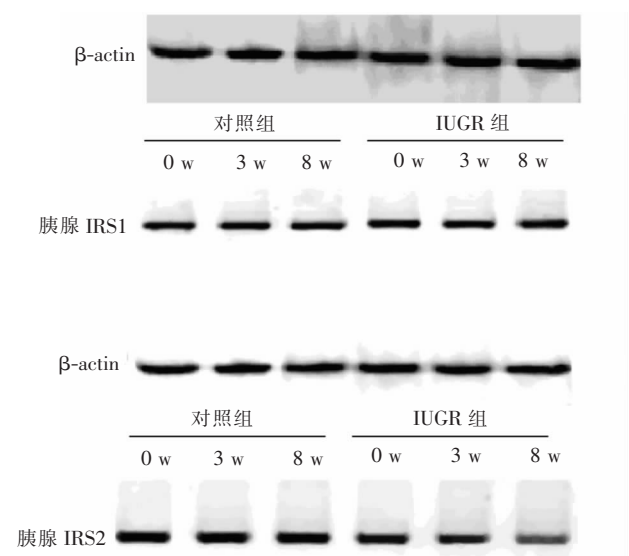


图2 0周、3周、8周鼠胰腺组织 IRS-1 和 IRS-2 蛋白表达 (Western blot)

3 讨论

1993 年 Godfrey 等^[4]最先提出了有关胎儿生长迟缓远期不良的影响。他们通过研究发现,发育早期的关键阶段宫内不良环境的刺激可引起人体结构和功能的持续改变,这一改变是一个漫长的程序化的过程,动物实验和人群研究表明宫内环境的异常将对脂肪组织和胰腺 β 细胞功能产生长期的影响。

胰岛 β 细胞主要通过分泌胰岛素起调节血糖、血脂作用,胎儿宫内后期及新生儿期,胰岛细胞分裂加快,数量增多,这一增殖过程受营养物质的调节。因此,早期营养不良可能会造成胰岛 β 细胞结构和功能的永久性损害,降低产生胰岛素的能力^[5]。

目前在多个国家和种族中的流行病学调查都证实,胎儿发育迟缓是糖耐量异常和成年 2 型糖尿病的独立危险因素^[6]。这些疾病的共同特点是胰岛素抵抗。细胞水平的胰岛素抵抗,表现为细胞表面的胰岛素受体数目减少和或受体后缺陷。在胰岛素敏感的组织细胞内存在两种胰岛素受体底物—IRS-1 和 IRS-2,它们是传递胰岛素各种生物作用的信号蛋白。二者比较,在胰岛素代谢效应方面,促进肌肉、脂肪组织摄取利用葡萄糖,以 IRS-1 为主;而促进肝脏糖原合成和抑制肝葡萄糖输出,以 IRS-2 为主;作为调节 β 细胞功能的重要信号分子,IRS-1 主要调节胰岛素分泌过程,IRS-2 则主要调节 β 细胞增殖、生长、存活^[7]。IRS-2 信号通路的重要组成部分包括胰岛素样生长因子-1 受体、胰岛素受体、IRS-2、磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-ki-

nase, PI3K) 和 Ras 等,它们调节的下游信号包括蛋白激酶 B、丝裂原活化蛋白激酶等^[8]。有研究报道 IRS-2 丢失小鼠出现胰岛素抵抗且不能为增加的 β 细胞量代偿,其 β 细胞自发性凋亡, β 细胞数显著减少,随即出现糖尿病,提示 IRS-2 信号系统参与经典胰岛素靶组织反应和 β 细胞生理活动^[9]。此外,IRS-2 通过调节 β 细胞量影响其功能。研究表明,给予糖尿病大鼠 exendin-4 可通过 cAMP 依赖通路,提高其 IRS-2 水平,进而改善糖代谢^[10]。

本实验通过孕期低蛋白饮食证实宫内营养不良可致新生鼠发育受限,其出生后出现生长追赶,至成年期 IUGR 组体重超过对照组,已出现肥胖倾向,构成代谢综合征的表现之一;IUGR 0 周、3 周和 8 周鼠胰腺组织中 IRS-2 蛋白水平和 mRNA 相对水平显著低于对照组,而 IRS-1 蛋白水平和 mRNA 相对水平与对照组无显著差异,证实 IRS-2 是调控胰岛 β 细胞生长发育的主要受体物质;提示宫内发育迟缓个体从生后至成年期胰腺组织都存在 IRS-2 信号转导障碍,IRS-2 表达下降,可造成 β 细胞数量减少和功能缺陷,导致胰岛素分泌减少,进而产生胰岛素抵抗,构成 IUGR 个体易患代谢综合征的分子基础。

[参 考 文 献]

- [1] 应艳琴,罗小平. 小于胎龄儿生长相关异常及生长激素治疗[J]. 临床儿科杂志,2004,22(8): 559-561.
- [2] Arends NJ, Boonstra VH, Duivenvoorden HJ, Hofman PL, Cutfield WS, Hokken-Koelega ACS. Reduced insulin sensitivity and the presence of cardiovascular risk factors in short prepubertal children born small for gestational age (SGA) [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2005, 62(1): 44-50.
- [3] 周根来,陈才勇,王恬. 胎儿宫内发育迟缓的实验动物模型[J]. 中国比较医学杂志,2003,13(2): 117-120.
- [4] Godfrey KM, Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease[J]. Am J Clin Nutr, 2000, 71(5 Suppl): 1344s-1352s.
- [5] Bazaes RA, Alegría A, Pittaluga E, Avila A, Iniguez G, Mericq V. Determinants of insulin sensitivity and secretion in very-low-birth-weight children [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(3): 1267-1272.
- [6] Matharu K, Ozanne SE. The fetal origins of disease and associations with low birth weight [J]. NeoReviews, 2004, 5(12): 522-526.
- [7] 张妍,袁莉. β 细胞胰岛素受体信号系统与 β 细胞功能 [J]. 国外医学内分泌学分册,2005,25(4): 259-261.
- [8] 傅静奕,傅祖植. 胰岛素/胰岛素样生长因子信号转导通路与胰岛 β 细胞凋亡 [J]. 国际内分泌代谢杂志,2006,26(增刊): 36-38.
- [9] Lingohr MK, Briaud I, Dickson LM, McCuaig JF, Alárcon C, Wicksteed BL, et al. Specific regulation of IRS-2 expression by glucose in rat primary pancreatic islet beta-cells [J]. J Biol Chem, 2006, 281(23): 15884-15892.
- [10] Park S, Hong SM, Sung SR. Exendin-4 and exercise promotes beta-cell function and mass through IRS2 induction in islets of diabetic rats [J]. Life Sci, 2008, 82(9-10): 503-511.

(本文编辑:王霞)