

· 论 著 ·

基因芯片技术筛选 2 型糖尿病胰岛素抵抗脂肪代谢相关差异表达基因

郑骄阳¹, 陆斌², 刘志民^{1*}

(1. 第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003; 2. 第二军医大学国际合作肿瘤研究所, 上海 200433)

[摘要] **目的:**应用基因芯片技术比较 2 型糖尿病胰岛素抵抗(IR)患者和正常人大网膜组织脂肪代谢相关基因表达谱的差异,探讨 IR 可能的发病机制。**方法:**分别用 Cy5 和 Cy3 两种不同的荧光染料通过逆转录反应将 IR 组($n=5$)和正常对照组($n=5$)脂肪组织的 mRNA 标记成探针,并与载有一组靶基因的基因表达谱芯片进行杂交,通过扫描荧光强度,计算机软件分析,寻找两组差异表达基因。然后对芯片筛选结果中差异表达的 FOXC2 基因用 Northern 印迹法进行验证。**结果:**IR 组和正常对照组之间共筛选出 82 条差异表达已知基因;其中脂肪代谢相关基因 10 条,表达增加的基因 5 条,表达降低的基因 5 条。Northern 印迹证实 IR 组 FOXC2 mRNA 表达明显升高,与基因芯片检测结果一致。**结论:**IR 的发病与脂肪代谢相关,FOXC2 可能是 2 型糖尿病 IR 的候选基因。

[关键词] 寡核苷酸序列分析;胰岛素抵抗;糖尿病,2 型;FOXC2 基因

[中图分类号] R 587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)05-0493-04

cDNA microarray in screening of differentially expressed genes associated with lipid metabolism in adipose tissues of patients with insulin resistant type 2 diabetes mellitus

ZHENG Jiao-yang¹, LU Bin², LIU Zhi-min^{1*} (1. Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. International Joint Cancer Institute, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the differentially expressed genes associated with lipid metabolism in adipose tissues of patients with insulin resistant (IR) type 2 diabetes mellitus (T2DM), in an effort to explore the mechanism of IR. **Methods:** mRNA from the omental adipose tissues of T2DM patients ($n=5$) and normal controls ($n=5$) were reversely transcribed into cDNAs with the incorporation of fluorescent dUTP (cy-5 or cy-3) to prepare hybridization probes. The mixed probes were hybridized with a cDNA microarray containing the target genes. The results were scanned and subjected to computer analysis to search for the difference between the gene spectrum of T2DM patients and normal controls. The differentially expressed gene, FOXC2, was verified by Northern blot. **Results:** Eighty-two differentially expressed genes were identified between these 2 groups, with 10 associated with lipid metabolism, including 5 upregulated ones and 5 downregulated ones. Northern blotting confirmed that the expression of FOXC2 mRNA was increased in IR group, which was in accordance with the result of cDNA microarray analysis. **Conclusion:** The pathogenesis of IR is related with lipid metabolism and the FOXC2 gene may be a candidate gene of IR.

[KEY WORDS] oligonucleotide array sequence analysis; insulin resistance; diabetes mellitus, type 2; FOXC2 gene

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(5): 493-496]

2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一种复杂的多基因遗传疾病,胰岛 β 细胞胰岛素分泌不足和(或)胰岛素靶组织细胞发生胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是其致病原因。近年来分子生物学技术的应用使得在 IR 病因研究方面取得了显著的进展。目前已证实脂肪组织在 IR 发生的过程中发挥着重要作用,在脂肪细胞中陆续发现了一些与 2 型糖尿病 IR 发病有关的基因,如脂肪酸结合蛋白(FABP)、过氧化物酶增殖体激活受体 γ (PPAR γ)、CAAT/增强子结合蛋白 α 等^[1],但其确切的发病机制目前尚未阐明。本研究应用基因芯片技术分析 IR 患者与正常人大网膜组织基因表达谱

的差异,探讨 T2DM IR 可能的发病机制,为寻找新的治疗靶点提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料 10 例大网膜组织取自我院外科手术患者,IR 患者(IR 组)和正常人(对照组)各 5 例,两组

[基金项目] 上海市卫生局科技发展基金[2001ZD002(3)]. Supported by Science Development Grant of Shanghai Health Bureau [2001ZD002(3)].

[作者简介] 郑骄阳,博士,主治医师。

* Corresponding author. E-mail: lzm@sh163.com

性别相同,年龄、体质量指数(BMI)接近,空腹血糖(FPG)、空腹胰岛素(FINS)和稳态模式评估法的胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)有显著性差异($P < 0.05$),详见表1。标本切除后15~20 min置于液氮内速冻,并储存于-80℃备用。术前予口服降糖药物治疗,FPG控制在8 mmol/L,糖化血红蛋白(HbA1c) $< 7.5\%$ 。以HOMA-IR^[2]评价IR($HOMA-IR = FPG \times FINS / 22.5$)。采用放射免疫法测定血清胰岛素,葡萄糖氧化酶法测定血糖,应用DCA2000分析仪测定HbA1c。

表1 两组一般资料比较

Tab 1 Comparison of general data of 2 groups

Index	IR	Control
Age(year)	62.4 ± 5.6	61.6 ± 6.3
BMI	25.4 ± 2.2	25.9 ± 1.9
WHR	0.91 ± 0.12	0.89 ± 0.13
FPG($c_B / mmol \cdot L^{-1}$)	7.8 ± 1.3*	4.4 ± 0.2
FINS($\mu_B / mU \cdot L^{-1}$)	13.9 ± 2.3*	5.8 ± 0.7
HOMA-IR	4.66 ± 0.64*	1.33 ± 0.15

BMI: Body mass index; WHR: Waist-to-hip ratio; FPG: Fasting plasma glucose; FINS: Fasting insulin; HOMA-IR: Homeostatic model approach-insulin resistance; * $P < 0.05$ vs control group

1.2 芯片制备 基因芯片由上海博星基因芯片有限公司提供,BiostarH-40s 2张(人源4 096点克隆,为监控芯片制备和杂交的整个过程,在每块芯片上设定几个阴性对照:8个水稻U2RNA基因,8个HCV外壳蛋白基因和32个空白点样液),靶基因以通用引物进行PCR扩增,PCR产物长度为1 000~3 000 bp.PCR及其产物纯化按照标准方法进行,通过琼脂糖凝胶电泳监测PCR质量。靶基因扩增后溶解于3×SSC溶液,用Cartesian公司的7500点样仪及TeleChem公司的硅烷化玻片进行点样。点样后玻片进行水合2 h,室温干燥0.5 h,紫外交联(能量值为65 mJ/cm),再分别以0.2%十二烷基磺酸钠(SDS)、水及0.2%硼氢化钠溶液处理10 min,晾干备用。

1.3 探针制备 将IR组和对照组大网膜组织mRNA逆转录成cDNA后作为探针与基因芯片杂交。探针合成采用Superscript II逆转录酶,以及Cy5(IR组大网膜组织)和Cy3(对照组大网膜组织)标记的dUTP将mRNA逆转录成cDNA。乙醇沉淀后溶解在20 μl的5×SSC和0.2%SDS杂交液中。

1.4 芯片杂交 将基因芯片和杂交探针分别在95℃水浴中变性5 min,将探针加在芯片上,用盖玻片封片,置于60℃杂交箱。杂交15~17 h。然后揭开盖玻片,分别以2×SSC和0.2%SDS、0.1×SSC和0.2%SDS、0.1×SSC洗涤10 min,室温晾干。

1.5 检测与分析 应用General Scanning公司的ScanArray 4 000扫描芯片,用GenePix Pro 3.0软件分析Cy5和Cy3两种荧光信号的强度和比值。用124个管家基因进行均衡。以下2个条件为判定基因差异表达的标准: Cy5和Cy3的比值(Ratio) > 2.0 或 < 0.5 (基因的表达变化在2倍以上); Cy5和Cy3信号其中之一必须 > 800 或二者均 > 200 。同时要求显性表达数据在所有样本中能够重复。

1.6 Northern印迹法验证差异表达基因 选取表达谱中Ratio值差异较大的1条上调基因FOXC2。在5例IR患者和5例正常人大网膜组织中,采用Northern印迹法进行验证。将FOXC2基因的PCR重扩增产物纯化后,用 $\alpha^{32}P$ 标记(TaKaRa随机引物标记试剂盒)制成DNA探针。取IR组和对照组脂肪组织总RNA各约30 μg,在1.2%甲醛变性琼脂糖凝胶中电泳后,转移到正电荷尼龙膜上,并进一步交联固定。然后将其放入SDS杂交缓冲液于42℃预杂交3 h。标记的DNA探针于100℃变性10 min后与含有RNA的尼龙膜在42℃杂交过夜。洗膜条件为2×SSC,0.5%SDS室温洗涤30 min,0.1×SSC,0.5%SDS洗液50℃洗涤2次,各30 min,-70℃放射自显影。

1.7 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 差异表达基因 在用基因芯片检测的5对标本中,IR组和对照组的大网膜组织共有82条已知基因,其表达的变化在2倍以上。其中脂肪代谢相关差异表达基因10条,表达增加的基因5条,表达降低的基因5条。详见表2、表3。

2.2 Northern印迹结果分析 在两组大网膜组织中,由于1对标本mRNA受到了降解,对余下的4对标本进行了检验,利用Northern印迹法对FOXC2基因进行了验证,结果与基因表达谱芯片的结果吻合,即IR组FOXC2表达水平明显高于对照组($P < 0.05$)。详见图1。

表 2 脂肪组织表达下调的代谢相关基因

Tab 2 Downregulated genes related with metabolism in adipose tissues

GenBank ID	Description	Symbol	Average ratio
BC012142	Clone MGC:20253 IMAGE:4647654	-	0.298
NM_Q19101	Apolipoprotein M	G3A	0.320
NM_Q22977	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, transcript variant 2	ACSL4	0.424
NM_Q01444	Fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	FABP5	0.449
NM_Q00237	Lipoprotein lipase	LPL	0.778

表 3 脂肪组织表达上调的代谢相关基因

Tab 3 Upregulated genes related with metabolism in adipose tissues

GenBank ID	Description	Symbol	Average ratio
NM_Q04092	Enoyl coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial, nuclear gene encoding mitochondrial protein	ECHS1	2.425
NM_Q00270	Nucleoside phosphorylase	NP	2.618
NM_Q05251	Forkhead box c2	FOXC2	2.890
NM_Q01354	Aldo-keto reductase family 1, member C2	AKR1C2	3.372
U00238	Glutamine PRPP amidotransferase, complete cds	GPAT	6.734

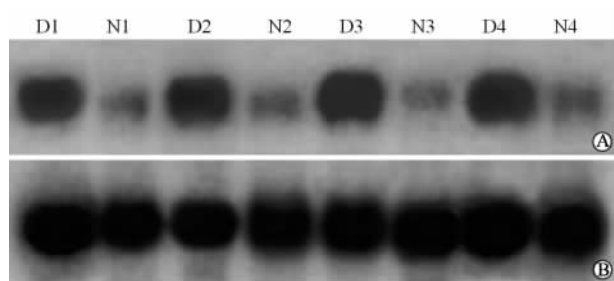


图 1 大网膜组织 FOXC2 基因 Northern 印迹图谱

Fig 1 Northern blotting analysis of FOXC2 gene in omental tissue

A: Expression levels of FOXC2 gene in omental tissue; B: Expression levels of GAPDH gene in omental tissue as an internal control; D1-D4 represent omental adipose tissues of IR; N1-N4 represent normal omental adipose tissues

3 讨论

目前认为,脂肪细胞数量的减少和体积的增大均对胰岛素抵抗的产生具有重要意义。脂肪细胞分化障碍导致不能产生足够数量的成熟脂肪细胞来容纳过多的能量,引发脂肪细胞体积增大,导致脂肪细胞发生 IR,使生脂压力转移至肝、肌肉等其他器官,造成脂肪的异位沉积,进而诱发糖尿病^[3]。因此,脂肪细胞的分化和脂代谢相关基因的表达差异可能与 2 型糖尿病胰岛素抵抗有一定的关联。

本研究通过基因芯片技术筛选 IR 患者和正常人的大网膜脂肪组织脂代谢相关基因表达谱的变化,在基因水平对脂肪细胞分化和脂代谢与 IR 关系进行探讨。结果发现,IR 大网膜脂肪组织差异表达基因主要集中于脂肪细胞分化和脂代谢方面,这些

基因与 IR 的发生可能存在一定的相关性。

3.1 脂代谢相关基因 本研究发现与脂代谢相关的差异表达基因主要有上调的醛酮还原酶家族 1C2 (AKR1C2)。这个家族依赖 NADPH,催化各种羰基化合物,如碳水化合物、脂肪类、芳香醛以及类固醇,使其合成减少^[4]。而该家族另一成员 AKR1B 在糖尿病血管和神经并发症中发挥着重要的作用。在血管平滑肌细胞中,抑制 AKR1B 可以防止血管平滑肌细胞生长并减少内膜增生和再狭窄^[5]。应用醛糖还原酶抑制剂可以增加糖酵解和葡萄糖氧化,减少缺血性损伤,对缺血性心脏病有一定的保护作用。由于 AKR1B 的功能与醛酮还原酶超家族的关系十分密切,故可以推测醛酮还原酶家族其他成员也可能与糖尿病的发生发展相关,尤其与糖尿病神经和血管等慢性并发症有密切关联。

有研究表明血中游离脂肪酸水平增高,超过脂肪组织的储存能力和各组织对游离脂肪酸的氧化能力时,将使过多的游离脂肪酸以三酰甘油的形式在胰岛素作用的靶组织如肝脏、肌肉中过度沉积,从而造成 IR。本研究芯片结果中与脂代谢相关表达下调的基因有酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4),它能将游离的长链脂肪酸转化为脂肪酰基辅酶 A 酯,从而在脂质合成和脂肪酸降解过程中发挥关键作用。三酰甘油水平的改变与酰基辅酶 A 合成酶的变化相平行。有报道 ACSL4 表达降低引起酰基辅酶 A 合成酶表达的减少可直接导致脂肪酸合成三酰甘油的减少,从而引起游离脂肪酸增加,最终导致胰岛素抵抗的发生^[6]。芯片结果进一步证实 ACSL4 作为负调控子,是调控 IR 的关键分子。

另一个表达减少的基因 LPL 编码脂蛋白脂肪酶,它水解乳糜颗粒和极低密度脂蛋白中的三酰甘油,这个过程是将游离脂肪酸释放到肌肉和脂肪组织的限速环节。通过对脂肪酸释放到肌肉这个环节的控制,LPL 可以通过影响肌细胞内脂质水平来改变胰岛素敏感性^[7]。在 2 型糖尿病胰岛素抵抗的患者和糖尿病动物模型中,LPL 的表达都是降低的^[8]。这与本研究结果相符。脂蛋白脂肪酶的缺乏可以导致空腹及餐后血浆中三酰甘油的脂蛋白清除减少以及高密度脂蛋白颗粒生成减少,从而增加空腹及餐后血浆三酰甘油的脂蛋白的浓度,增加低密度脂蛋白颗粒和减少高密度脂蛋白颗粒。所有这些异常都是促使胰岛素抵抗患者心血管疾病发生的重要危险因素^[9]。

3.2 脂肪细胞分化相关基因 脂肪细胞的分化是在多种转录因子的精细调控下完成的^[10]。FOXC2 又称间叶细胞叉头 1(MFH1),属翼状螺旋/叉头转录因子家族。有报道^[11] FOXC2 转基因小鼠白色脂肪组织明显减少,表明 FOXC2 可能抑制白色脂肪细胞形成。Davis 等^[12] 研究发现 3T3-L1 前脂肪细胞表达 FOXC2 后,脂肪形成衰减,表明 FOXC2 可抑制前脂肪细胞的分化,其机制可能是通过作用于转录复合物中一个或多个成分,间接抑制 PPAR γ 活性,或者直接抑制 PPAR γ 靶基因的表达,导致 C/EBP α 、脂联素、以及脂肪酸结合蛋白 FABP4/aP2 等一系列促进脂肪细胞分化的基因表达减少作用的结果。同时 Nadler 等^[13] 发现许多在脂肪细胞分化过程中表达增加的基因,在肥胖及糖尿病小鼠脂肪细胞中表达却明显下降。最近 Kim 等^[14] 发现脂肪组织中过度表达 FOXC2 能够阻止因饮食诱发的骨骼肌和肝脏的胰岛素抵抗,并且认为与肌肉内脂肪酸代谢产物的减少有关。而本研究通过对芯片结果的分析,发现与脂肪细胞分化相关的转录因子 FOXC2 基因在 IR 患者大网膜组织却是高表达的;对 FOXC2 基因进行了 Northern 印迹的验证,结果证实了基因芯片的结果。因此,可以推测 FOXC2 基因可能仅在糖尿病胰岛素抵抗发病初期发挥作用,即增强胰岛素的敏感性,而在疾病后期该作用减弱或消失。我们将在下一步工作中对 FOXC2 基因在胰岛素抵抗发生发展过程中的具体作用加以研究。

综上所述,在 IR 发生的过程中许多编码脂肪代谢的相关基因水平发生了明显的改变,这一结果从基因表达水平上提示脂肪细胞分化和脂代谢可能与

IR 发生有关,表明脂肪细胞正常的分化及维持糖脂代谢平衡对预防 IR 的发生是必需的。本研究获取了大量的基因数据,下一步将对基因芯片的结果进行深入研究,以便更好地分析脂肪细胞在胰岛素抵抗中的作用,阐明胰岛素抵抗可能的发生机制。

[参考文献]

- [1] Lopez IP, Marti A, Milagro FI, et al. DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria) obese rats[J]. *Obes Res*, 2003, 11:188-194.
- [2] Haffner SM, Miettinen H, Stern MP. The homeostasis model in the San Antonio Heart Study[J]. *Diabetes Care*, 1997, 20: 1087-1092.
- [3] Danforth E. Failure of adipocyte differentiation cause type II diabetes mellitus[J]. *Nat Genet*, 2000, 26:13-16.
- [4] Crosas B, Hyndman DJ, Gallego O, et al. Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: consequences for retinoid metabolism[J]. *Biochem J*, 2003, 373(Pt 3):973-979.
- [5] Bhatnagar A, Ruef J, Liu S, et al. Regulation of vascular smooth muscle cell growth by aldose reductase[J]. *Chem Biol Interact*, 2001, 130-132(1-3):627-636.
- [6] Ikemoto S, Takahashi M, Tsunoda N, et al. Cholate inhibits high-fat diet-induced hyperglycemia and obesity with acyl-CoA synthetase mRNA decrease[J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(1 Pt 1):E37-E45.
- [7] Boden G, Lebed B, Schatz M, et al. Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects[J]. *Diabetes*, 2001, 50:1612-1617.
- [8] Eckel RH, Yost TJ, Jensen DR. Alterations in lipoprotein lipase in insulin resistance[J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1995, 19(Suppl 1):S16-S21.
- [9] Ruotolo G, Howard BV. Dyslipidemia of the metabolic syndrome[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2002, 4:494-500.
- [10] MacDougald OA, Mandrup S. Adipogenesis: forces that tip the scales[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2002, 13:5-11.
- [11] Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family[J]. *Int J Oncol*, 2004, 25:1495-1500.
- [12] Davis KE, Moldes M, Farmer SR. The forkhead transcription factor FoxC2 inhibits white adipocyte differentiation[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279:42453-42461.
- [13] Nadler ST, Stoechr JP, Schueler KL, et al. The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:11371-11376.
- [14] Kim JK, Kim HJ, Park SY, et al. Adipocyte-specific overexpression of FOXC2 prevents diet-induced increases in intramuscular fatty acyl CoA and insulin resistance[J]. *Diabetes*, 2005, 54: 1657-1663.

[收稿日期] 2005-12-12

[修回日期] 2006-03-15

[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群