

· 论 著 ·

人类重组免疫球蛋白λ轻链 022 与 TOM1 基因在 2 型糖尿病胰岛素抵抗患者网膜脂肪组织的表达

赵卫民^{1,2}, 邹俊杰², 石勇铨², 邹秀兰¹, 郑骄阳², 刘志民^{2*}

(1. 湖北省宜昌市第一人民医院内分泌科, 宜昌 443000; 2. 第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003)

[摘要] **目的:**探讨人类重组免疫球蛋白λ轻链(HSIGVL)022和 TOM1 基因在 2 型糖尿病胰岛素抵抗(T2DM-IR)患者网膜脂肪组织表达水平并鉴定 HSIGVL022 蛋白表达。**方法:**取 2 型糖尿病伴胰岛素抵抗(T2DM-IR 组)与非糖尿病无胰岛素抵抗者(对照组)网膜脂肪组织,用荧光定量 RT-PCR 技术测定 HSIGVL022 和 TOM1 mRNA 的表达量,用免疫组化方法鉴定 HSIGVL022 蛋白表达。**结果:**荧光定量 RT-PCR 显示 HSIGVL022 和 TOM1 mRNA 的表达量 T2DM-IR 组和对照组分别为(34 140±6 160)、(4 440±617)和(5 930±661)、(1 360±82)拷贝/每百万看家基因($P<0.05$);HSIGVL022 较 TOM1 表达量高($P<0.01$),且与 HOMA-IR 呈直线相关($P<0.05$);免疫组化显示 HSIGVL022 蛋白在 T2DM-IR 组和对照组阳性率分别为(12.43±2.41)%、(2.31±0.48)%,强阳性率分别为(6.62±1.69)%、(2.12±0.34)%, $P<0.05$ 。**结论:**HSIGVL022 和 TOM1 在人网膜脂肪组织中均有表达,HSIGVL022 表达量较高;在 T2DM-IR 者中均呈上调表达,HSIGVL022 蛋白表达相应增高;HSIGVL022 mRNA 表达量与 HOMA-IR 呈直线相关;这 2 条基因可能与 T2DM-IR 有关。

[关键词] 糖尿病,2 型;胰岛素抵抗;脂肪组织;免疫球蛋白类,λ 链;TOM1

[中图分类号] R 587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)09-0953-04

Expression of recombinant human immunoglobulin λ light chain 022 and TOM1 mRNA in omental adipose tissues of patients with type 2 diabetes and insulin resistance

ZHAO Wei-min^{1,2}, ZOU Jun-jie², SHI Yong-quan², ZOU Xiu-lan¹, ZHENG Jiao-yang², LIU Zhi-min^{2*} (1. Department of Endocrinology, the First People's Hospital of Yichang, Yichang 443000, China; 2. Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression of recombinant human immunoglobulin λ light chain 022 and TOM1 gene and to determine the protein expression of HSIGVL022 in omental adipose tissues of patients with type 2 diabetes and insulin resistance(T2DM-IR). **Methods:** Fat tissues from greater omentum of T2DM-IR patients and normal controls were obtained. The mRNA levels of recombinant human immunoglobulin λ light chain 022 and TOM1 were measured by fluorescent quantitative RT-PCR; expression of HSIGVL022 protein was identified by immunohistochemistry. **Results:** The mRNA levels of HSIGVL022 and TOM1 in T2DM-IR patients were (34 140±6 160) copy/million house-keeping genes and (4 440±617) copy/million house-keeping genes, respectively; those in control group were (5 930±661) copy/million house-keeping genes and (1 360±82) copy/million house-keeping genes, respectively. There were significant difference between the 2 groups($P<0.05$). The mRNA level of HSIGVL022 was significantly higher than that of TOM1($P<0.01$) and was linearly correlated with homeostatic model assessment-insulin resistance(HOMA-IR) index($P<0.05$). The positive rates of HSIGVL022 protein in T2DM-IR and control group were (12.43±2.41)% and (2.31±0.48)%, respectively; the strong positive rates were (6.62±1.69)% and (2.12±0.34)%, respectively($P<0.05$). **Conclusion:** Both HSIGVL022 and TOM1 are expressed in the fat tissues of greater omentum, with the level of HSIGVL022 higher than that of TOM1. The 2 genes are up-regulated in patients with insulin resistance and the HSIGVL022 protein increases correspondingly. The mRNA level of HSIGVL022 is linearly correlated with HOMA-IR index. The 2 genes are possibly related with insulin resistance in type 2 diabetes.

[KEY WORDS] diabetes mellitus, type 2; insulin resistance; adipose tissue; immunoglobulins lambda-chain; TOM1

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(9): 953-956]

胰岛素抵抗为 2 型糖尿病(T2DM)的基本病理生理改变,脂肪细胞能表达和分泌多种细胞因子,在 T2DM 胰岛素抵抗(T2DM-IR)的病理中发挥着错综复杂的作用。我实验室郑骄阳等^[1]应用基因芯片技术观察到 T2DM-IR 患者脂肪组织免疫相关基因

[基金项目] 上海市卫生局医学发展基金重点项目[2001 ZD002(3)]. Supported by Key Subject for Medical Science Development of Health Department of Shanghai Municipal Government[2001 ZD002(3)].

[作者简介] 赵卫民,副主任医师,第二军医大学高级临床医师研修班学员. E-mail: zzy-9a@163.com

* Corresponding author. E-mail: lzm @163.com

如人类重组免疫球蛋白λ轻链(HSIGVL)022(GenBank; X57812) mRNA 和 TOM1 (GenBank; NM-004588) mRNA 表达明显增高,有望成为 T2DM-IR 的候选基因。本研究初步观察了上述两基因在人网膜脂肪组织中的表达,以进一步探讨其与 T2DM-IR 的关系。

1 材料和方法

1.1 研究对象 选择自 2004 年 10 月至 2005 年 3 月我院普外科慢性胆囊炎择期手术的患者,年龄 40~60 岁,2 型糖尿病患者要求病程<3 年,口服降糖药治疗,空腹血糖<8 mmol/L, HbA1c<8.0%。2 型糖尿病胰岛素抵抗患者均符合 1999 年 WHO

糖尿病诊断标准且胰岛素抵抗 HOMA-IR>4.00。排除急性炎症;恶性肿瘤;严重肝、肾疾病;胰岛素增敏剂(双胍类或噻唑烷二酮类)或胰岛素治疗;有家族性遗传病史者。均签署知情同意书。研究对象分为 2 型糖尿病胰岛素抵抗组(T2DM-IR 组)和非糖尿病非胰岛素抵抗(对照组),每组 7 男 9 女,年龄、体质量指数(BMI)、腰臀比(WHR)均相似,而空腹血糖、空腹胰岛素与 HOMA-IR 存在显著性差异(表 1),用药情况为 T2DM-IR 组(二甲双胍 6 例、磺脲类 10 例),对照组不用药。用放免法测血清胰岛素;葡萄糖氧化酶法测血浆血糖;HOMA-IR 为空腹血浆胰岛素(μU/ml)×空腹血糖(mmol/L)/22.5。脂肪组织离体后置入液氮冻存。

表 1 2 型糖尿病胰岛素抵抗患者与对照组一般特征的比较

Tab 1 Comparison of general characteristics between type 2 diabetes patients with insulin resistance and normal control

(n=16, $\bar{x} \pm s$)

Group	Age(year)	BMI (kg/m ²)	WHR	FBS (CB/mmol·L ⁻¹)	FINS (zB/μU·ml ⁻¹)	HbA1c (%)	HOMA-IR
T2DM-IR	54.0±8.5	25.8±1.1	0.93±0.04	7.2±0.5*	16.5±2.0*	7.03±0.43*	5.29±0.60*
Control	49.5±8.8	25.4±0.9	0.94±0.05	4.7±0.4	9.4±0.5	4.78±0.19	1.94±0.19

* P<0.05 vs control group

1.2 试剂及仪器 引物由上海生工生物工程公司合成。总 RNA 抽提试剂盒购于 Gibco BRL 公司,荧光定量 RT-PCR 试剂盒、免疫组化试剂盒购于 TaKaRa 公司,免疫球蛋白λ轻链单克隆抗体购于美国 Neo Merkers 公司。荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),台式离心机(SORVALL pico 公司),移液枪(SORVALL pico 公司),Axioplan 2 imaging 显微图像分析系统(德国 ZEISS 公司)。

1.3 网膜脂肪组织总 RNA 的抽提和 mRNA 纯化 RNA 抽提:在液氮中将组织研磨后转移到匀浆器,每 25 g 组织加 10 ml TRIzol;加 200 μl 氯仿/异戊醇(24:1),振荡混匀 30 s,放置 5 min;高速冷冻离心机离心 8 min(12 000 r/min);将上清液小心转移到 RNase-free 离心管里,加入与上清液等体积的异丙醇和 3.0 μl 的糖原,室温下放置 5 min;离心 10 min(12 000 r/min);小心移去上清液,防止沉淀丢失;用 70%乙醇洗涤 2 次;尽可能彻底吸出上清液,防止丢失 RNA 沉淀;真空离心干燥 5 min;沉淀用 50 μl DEPC-H₂O 溶解。mRNA 纯化:反应体系 20 μl;0.1 mmol/L DTT 2 μl,40 U/μl RNasin 0.5 μl,10 mmol/L dNTP 1.0 μl,随机引物 1.0 μl,5×1st Strand Buffer 4.0 μl,5 U/μl DNase I 1.0 μl,RNA 10.5 μl。反应程序为 37℃ 30 min;75℃

10 min。

1.4 荧光定量 RT-PCR 测定 逆转录:(1)立即冰浴 5 min,再加入 40 U/μl 的 RNasin 0.5 μl,200 U/μl 的 SSII 0.5 μl。(2)反应程序:25℃ 10 min;42℃ 1 h;52℃ 15 min;70℃ 15 min;4℃ 保存。荧光定量 PCR:(1)HSIGVL022 引物序列为正义 5'-TGT GCT GGT CGT CTA TGG TG-3',反义 5'-AGG GCG GGA ACA GAG TGA-3';TOM1 引物序列为正义 5'-CAC TGG CTG ACC AAC GGA A-3',反义 5'-GGT GAC CCC CTT AGG CTC TT-3';看家基因引物序列为正义 5'-AAG GTC GGA GTC AAC GGA TT -3',反义 5'-AAG GTC GGA GTC AAC GGA TT-3'。(2)反应体系(25 μl):5×R-PCR Buffer 5.0 μl;250 mmol/L Mg²⁺ 0.3 μl;10 mmol/L dNTP 0.75 μl;10 μmol/L 引物 1.0 μl;25×SYBR Green I 1.0 μl;10⁻³×Calibration 1.0 μl;5 U/μl Taq-E 0.25 μl;ddH₂O 13.7 μl;模板 2.0 μl;(3)反应程序:95℃ 90 s;95℃ 5 s,60℃ 30 s(×40 个循环);95℃ 1 min;55℃ 1 min;55℃ 10 s+0.5℃/循环×80 个循环;4℃ 保存。60℃ 30 s 为荧光信号监测点。

1.5 免疫组化染色 (1)涂片准备及抗原修复:取新鲜网膜脂肪组织,10%甲醛固定;石蜡包埋;每标

本切片3张,涂片;60℃恒温干燥箱20 min;二甲苯浸泡10 min;梯度、乙醇浸泡各5 min;蒸馏水冲洗5 min;PBS洗片3×5 min;常温孵育10 min;PBS洗片3×5 min。抗原修复为37℃胰酶30 min;PBS洗片3×5 min;(2)免疫组织化学染色:常温孵育5 min;PBS洗片5 min;加一抗免疫球蛋白λ轻链单克隆抗体,10%山羊血清封闭液稀释1:100,4℃过夜;PBS洗片3×5 min;加二抗,抗小鼠抗体,37℃30 min;PBS洗片3×5 min;加亲和素,37℃30 min;PBS洗片3×5 min;DAB显色;流水冲洗;苏木精复染1 min;盐酸乙醇分化;梯度乙醇脱水各5 min;二甲苯浸泡10 min;中性树胶封固;烘干、显微镜下观察、摄片、分析显色强度。通过Axioskop2 plus显微镜及图像分析系统分析所有切片,计算阳性率、强阳性率。

1.6 统计学处理 正态分布用 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据采用SPSS 10.0软件包进行统计分析,进行正态及方差齐性检验,HOMA-IR呈偏态分布,取自然对数转为正态分布资料,进行 t 检验、 χ^2 检验、回归与相关分析。

2 结果

2.1 荧光定量RT-PCR结果

2.1.1 标准曲线 根据不同浓度的标准品测得的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数(CT值)绘制标准曲线,这2条基因的标准曲线相关性均良好($Y=-3.983X+44.272, r=0.996, P<0.01$),达到荧光定量RT-PCR的要求,故测定的mRNA表达量结果可信。

2.1.2 T2DM-IR组与对照组HSIGVL022 mRNA和TOM1 mRNA表达量比较 在大网膜脂肪组织中,T2DM-IR组HSIGVL022 mRNA和TOM1 mRNA的表达量(拷贝/每百万看家基因)分别为($34\ 140\pm 6\ 160$)、($4\ 440\pm 617$),对照组分别为($5\ 930\pm 661$)、($1\ 360\pm 82$),T2DM-IR组较对照组显著性增加($P<0.05$);在T2DM-IR组和对照组中,HSIGVL022 mRNA在大网膜脂肪组织中的表达量均较TOM1 mRNA的表达量显著性高($P<0.01$)。

2.1.3 HOMA指数与HSIGVL022 mRNA及TOM1 mRNA表达量相关性分析 发现HSIGVL022 mRNA表达量与HOMA-IR呈直线相关(图1),回归方程为 $Y=-18\ 381.4+9\ 796.6X$ ($r=0.891, P<0.05$)。

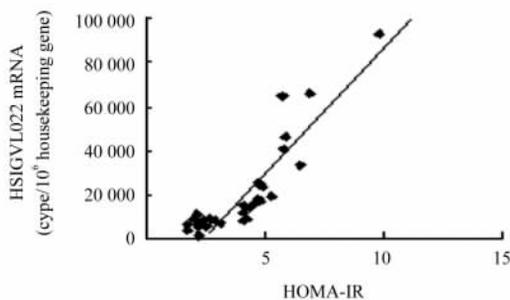


图1 HSIGVL022 mRNA表达量与HOMA-IR相关性分析

Fig 1 HSIGVL022 mRNA level was linearly correlated with HOMA-IR

2.2 免疫组化结果 HSIGVL022大量沉积在脂肪组织中,呈棕黄色,而正常对照组可见少量的HSIGVL022表达(图2)。HSIGVL022在T2DM-IR组中表达的阳性率及强阳性率分别为(12.43 ± 2.41)%、(6.62 ± 1.69)%。在对照组分别为(2.31 ± 0.48)%、(2.12 ± 0.34)%,统计学分析认为具有显著性差异($P<0.05$)。

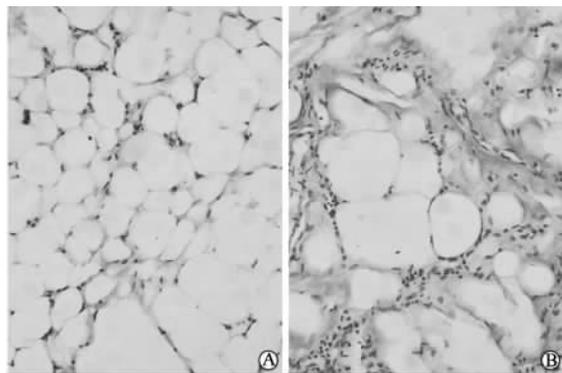


图2 HSIGVL022蛋白在网膜脂肪组织中的表达

Fig 2 HSIGVL022 protein expression in omentum fat tissues (Caesalpinia sappan refined dyeing, ×400)

A: Control group; B: T2DM-IR group

3 讨论

2型糖尿病患者最显著的病理生理学特征之一即是胰岛素抵抗,脂肪组织不仅仅是贮存脂肪、调节能量摄入和能量消耗、脂类和碳水化合物代谢的作用,还能分泌多种细胞因子,在2型糖尿病胰岛素抵抗的病理中发挥着错综复杂的作用。

人类λ轻链基因,位于22号染色体22q11.1-q11.2,含50~100个复杂的可变区(Vλ)基因,HSIGVL022基因是Vλ022号基因。Dugoujon

等^[2]研究发现作为免疫球蛋白同种异型体标志(GM与KM)与糖尿病有关联,GM可能为糖尿病遗传标志,GM出现的频次是糖尿病病因学的重要危险因素。最近又有研究发现人类免疫球蛋白轻链基因表达的调节通过核转录因子NF- κ B协同作用进行的^[3]。在2型糖尿病、胰岛素抵抗、肥胖症、动脉粥样硬化发病机制中氧化应激是共同的土壤,而氧化应激激活了核转录因子NF- κ B的活性,推测NF- κ B的激活可能增加了免疫球蛋白轻链的基因表达。

TOM1最初作为一个致癌基因*v-myb*特殊的靶基因被鉴定^[4]。TOM1属于包含VHS区域蛋白质家族成员,它除在N端VHS区域之外,中央区还有一个GAT区域。在胞内体通路中起到间接的转运和分选作用的接头蛋白如Hrs/Vps27、STAM、GGA和泛肽,均含有VHS区域,认为VHS区域是这些蛋白发挥作用的关键部位^[5~7]。并且TOM1与Tollip相互作用,都能单独与泛肽复合物蛋白链和网格蛋白结合^[8]。在衰老模型人类胚胎肺二倍体成纤维细胞株中TOM1基因表达明显增加,表示TOM1基因在2BS细胞的过度表达能延迟衰老的进展^[9]。Yamakami等^[10]发现过度表达TOM1能抑制通过IL-1 β 或肿瘤坏死因子- α 诱导的对NF- κ B和AP-1等核转录因子的激活。最近又有研究证实泛肽蛋白酶体通路是一个新的控制胰岛素信号通路^[11]。

研究显示人类免疫球蛋白 λ 轻链和TOM1基因在人网膜脂肪组织中均有表达,HSIGVL022 mRNA的表达量较TOM1 mRNA表达高;HSIGVL022和TOM1基因在T2DM-IR患者网膜脂肪组织中均呈过度表达,且HSIGVL022 mRNA的表达量与HOMA-IR呈直线相关;免疫组化提示HSIGVL022蛋白表达量在T2DM-IR患者网膜脂肪组织中呈上调表达,从蛋白水平进一步证实了HSIGVL022 mRNA的表达。从而说明这HSIGVL022 mRNA和TOM1基因过度表达可能参与了脂肪组织胰岛素抵抗和糖尿病的发生及发展。但是对于HSIGVL022和TOM1基因在T2DM-IR的发生、发展过程中所起的作用还需要进一步探讨。

本实验为横断面研究,不能证明它们之间的因果联系,样本量较小,只能得出上述的初步结论,拟进一步扩大样本量和更为细致地分组以进行更为深入的研究;检测基因编码的蛋白,建立胰岛素抵抗检测的生化指标,作为诊断和治疗T2DM-IR的新靶点;用基因敲除技术,观察相关基因编码蛋白的外周生物学效应并探明其调控因子,进一步明确这些蛋白的信号转导机制,阐明人类是否由于这两种蛋白基因或其受体后转导的异常导致个体胰岛素敏感性和2型糖尿病易感性的差异。

[参考文献]

- [1] 郑骄阳,刘志民. 应用基因芯片技术观察2型糖尿病胰岛素抵抗患者的脂肪组织受体及信号转导相关基因的改变[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24:572.
- [2] Dugoujon JM, Guitard E, Se'ne'gas MT, et al. Genetic markers of immunoglobulins and diabetes mellitus in the multiracial population of New Caledonia[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2000, 47: 209-215.
- [3] Combriato G, Klobeck HG. Regulation of human Ig λ light chain gene expression by NF- κ B[J]. J Immunol, 2002, 168: 1259-1266.
- [4] Burk O, Worpenberg S, Haenig B, et al. Tom-1, a novel v-Myb target gene expressed in AMV- and E26-transformed myelomonocytic cells[J]. EMBO J, 1997, 16: 1371-1380.
- [5] Robinson MS, Bonifacino JS. Adaptor-related proteins[J]. Curr Opin Cell Biol, 2001, 13: 444-453.
- [6] Hofmann K, Falquet L. A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems[J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26: 347-350.
- [7] Lohi O, Poussu A, Mao Y, et al. VHS domain — a longshoreman of vesicle lines[J]. FEBS Lett, 2002, 513: 19-23.
- [8] Burns K, Clatworthy J, Martin L, et al. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor[J]. Nat Cell Biol, 2000, 2: 346-351.
- [9] Guo S, Zhang Z, Tong T. Cloning and characterization of cellular senescence-associated genes in human fibroblasts by suppression subtractive hybridization[J]. Exp Cell Res, 2004, 298: 465-472.
- [10] Yamakami M, Yokosawa H. Tom1 (target of Myb 1) is a novel negative regulator of interleukin-1- and tumor necrosis factor-induced signaling pathways[J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27:564-566.
- [11] Rome S, Meugnier E, Vidal H. The ubiquitin-proteasome pathway is a new partner for the control of insulin signaling[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2004, 7: 249-254.

[收稿日期] 2006-01-20

[修回日期] 2006-07-25

[本文编辑] 孙岩