

# 应用基因表达谱芯片研究高果糖大鼠胰岛素抵抗相关基因

王波<sup>1,3</sup>, 李玉明<sup>2</sup>, 赵旭燕<sup>2</sup>, 蔡绍哲<sup>3</sup>

(1. 贵州师范学院化学与生命科学院, 贵州省贵阳市 550018; 2. 武警医学院附属医院心血管病研究所, 天津市 300162; 3. 重庆大学生物工程学院生物力学与组织工程教育部重点实验室, 重庆市 400044)

[关键词] 基因; 基因芯片; 表达谱; 胰岛素抵抗; 高果糖大鼠

[摘要] **目的** 比较正常大鼠和高果糖大鼠骨骼肌组织基因表达差异, 探讨胰岛素抵抗的发病分子机制。 **方法** 实验大鼠分为正常对照组和高果糖组; 从大鼠骨骼肌组织抽提 mRNA, 经逆转录分别用 Cy3、Cy5 荧光标记, 获得两组动物来源 cDNA 探针; cDNA 探针与 4096 条大鼠 cDNA 基因表达谱芯片杂交, 扫描, 重复 2 次实验, 通过计算机数据处理。 **结果** 筛选出胰岛素抵抗差异表达的基因共 140 条, 基因上调有 62 条, 基因下调有 78 条。 **结论** 从骨骼肌组织中筛选出大量的差异表达基因, 这些基因可能参加了胰岛素的发生发展过程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Study on Insulin Resistance-Associated Gene in Fructose-Fed Rats by cDNA Microarray

WANG Bo<sup>1,3</sup>, LI Yu-Ming<sup>2</sup>, ZHAO Xu-Yan<sup>2</sup>, and CAI Shao-Xi<sup>3</sup>

(1. School of Chemistry & Life Sciences, Guizhou Normal College, Guiyang, Guizhou 550018, China; 2. Institute of Cardiovascular Disease, The Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China; 3. Bioengineering College, Key Laboratory of Biomechanics & Tissue Engineering Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

[KEY WORDS] Gene; Cdna Microarray; Gene Expression Profile; Insulin Resistance; Fructose-Fed Rats

[ABSTRACT] **Aim** To study the expression of insulin resistance-associated gene and to elucidate the molecular mechanisms in skeletal muscle tissue between fructose-fed rats and normal rats with cDNA microarray. **Methods** The rats were divided into two groups, one was normal and the other was fructose-rich chow. The mRNA was isolated and purified from skeletal muscle tissue of two groups. The mRNA from two kinds of tissue was reverse transcribed to cDNA with Cy3-dUTP and Cy5-dUTP separately to prepare hybridization probes. The mixed probes were hybridized to cDNA microarray. The microarray was scanned, analyzed and repeated for two times. **Results** Among the total 4096 tested genes, 140 genes were differently expressed, 62 up-regulated, 78 down-regulated. **Conclusions** Gene expression profile is different from skeletal muscle tissue between fructose-fed rats and normal rats. The differential expression of genes may be related to the pathogenesis of insulin resistance.

1988 年 Reaven<sup>[1]</sup>将胰岛素抵抗、高胰岛素血症、糖耐量异常、高甘油三酯血症和高血压统称为“X 综合征”、“代谢性综合征”。代谢综合征的发生机制至今尚不十分清楚, 胰岛素从分泌到发挥效应的任何环节, 包括受体前、受体和受体后的任何一处缺陷均可导致胰岛素抵抗。胰岛素抵抗是多基

因、多环节共同作用的结果, 胰岛素抵抗和甘油三酯、血清抵抗素、血脂<sup>[2-4]</sup>等显著正相关。胰岛素抵抗中, 究竟哪些基因参与了胰岛素抵抗的发生发展, 其功能如何, 在调控体系中起什么作用尚未明确。

基因芯片 (gene chip) 又称 DNA 微阵列 (DNA

[收稿日期] 2011-12-13

[基金项目] 贵州省生物学重点支持学科建设基金资助 (2011231)

[作者简介] 王波, 博士, 副教授, 研究方向为生物技术与分子药理学, E-mail 为 wangbowg@yahoo.com.cn。通讯作者李玉明, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向为高血压与心血管病, E-mail 为 cardiolab@gmail.com。赵旭燕, 硕士, 主治医师, 研究方向为高血压防治, E-mail 为 zhaoxuyan76@126.com。

microarray)、DNA 芯片 (DNA chip) 等,是指用微阵列技术将预先设计好的寡核苷酸或基因片段,有序地、高密度地排在玻璃、硅片或尼龙膜等载体上,制成的高密度 DNA 微阵列。将待测样品 DNA/RNA 通过扩增、转录等技术渗入荧光标记分子后,和芯片上的探针杂交,通过激光共聚焦荧光扫描系统检测探针分子杂交信号强度,生物信息学综合分析后,获得大量的基因序列及表达信息。1995 年第一块以玻璃为载体的基因芯片在美国 Stanford 大学诞生<sup>[5]</sup>,从此基因芯片广泛地用于基因表达、基因功能分析、疾病诊断、药物筛选、突变体及多肽研究等多方面,基因芯片是近几年发展起来的一项前沿的生物技术<sup>[6,7]</sup>,综合了分子生物学、半导体微电子技术、激光、化学、计算机科学等众多领域的最新技术,对医学、生物学研究带来突破性的进展,具有大规模、高通量的特点。

## 1 材料与方法

### 1.1 胰岛素抵抗动物模型建立

雄性 Sprague-Dawley 大鼠 22 只,4~5 周龄,体重 130~140g,SPF 级,按 Reaven 的方法复制胰岛素抵抗高血压大鼠模型。正常对照组( $n=11$ )喂基础饲料,其中碳水化合物、脂肪和蛋白质占总热量的 60%、11%和 29%;高果糖组 11 只,喂高果糖饲料,其中果糖、脂肪和蛋白质占总热量的 60%、11%和 29%。两种饲料(中国医学科学院实验动物研究所提供)的总热量相似,电解质及一些微量元素经校正后含量接近,实验期间动物昼夜同期喂养,测定血压、空腹血糖(FBG)和胰岛素(FINS),胰岛素抵抗采用稳态模型(HOMA)评估法,计算胰岛素抵抗指数(IR),4 周后,空腹取血测定胰岛素和血糖,以胰岛素和胰岛素抵抗指数明显异常,表明已建立胰岛素抵抗模型,8 周后,处死大鼠,取出大鼠比目鱼肌,放入液氮中保存。

### 1.2 RNA 提取和探针标记

将液氮保存的正常对照组样本和高果糖组样本的比目鱼肌在液氮低温环境下分别研碎成粉末状,用 Gibco 公司 Trizol 试剂一步法抽提组织总 RNA,纯化,电泳分析总 RNA 质量,等量混合,参照 Schena<sup>[8,9]</sup>等方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化。用 Cy3-dUTP 标记正常对照组,Cy5-dUTP 标记高果糖组。

### 1.3 芯片杂交

实验所用芯片为大鼠表达谱芯片(BioStarR-

40s),由上海联合基因公司制备,将基因芯片和探针分别在 95℃ 水浴中变性 5 min,将探针加在基因芯片上,用盖玻片封片,置于 42℃ 杂交 16 h。冲洗盖玻片,分别用  $2\times\text{SSC}+0.2\%\text{SDS}$ 、 $0.1\%\times\text{SSC}+0.2\%\text{SDS}$ 、 $0.1\%\times\text{SSC}$  洗涤 10 min,室温晾干。

### 1.4 检测与分析

用 Axon 公司的 Gene Pix 4100 扫描,用 Gene Pix 4.0 软件分析 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号的强度和比值。用管家基因进行 Cy3 和 Cy5 均衡。用以下 2 个条件为判断基因差异表达的标准:①Cy5 和 Cy3 信号比值  $>2.0$  为表达上调, $<0.5$  为表达下调, $0.5\sim2.0$  为不存在显著表达差异。②Cy3 和 Cy5 信号比值其中之一必须大于 200。③相同基因点有两次相同的差异表达才被采用,否则被剔除。

### 1.5 定量 RT-PCR 验证

选取比目鱼肌中差异表达的基因糖皮质激素诱导亮氨酸拉链蛋白(GILZ),根据 GenBank 序列号获取全长 cDNA 序列,应用 PrimerPremier5.0 引物设计软件自行设计,由上海生工生物工程技术有限公司合成。上游引物:5'-CGGGATCCAGCCATGAACACCGAAAT-3',下游引物:5'-GCTCTAGAGC-CACCTTACACCGCAGA-3',退火温度 72℃,产物长度 592 bp,RT-PCR 半定量分析 GILZ mRNA 表达水平。

## 2 结果

### 2.1 胰岛素抵抗大鼠模型的建立

高果糖组与正常对照组比较,空腹胰岛素(FINS)、胰岛素抵抗指数(IR)、血压(SBP)差异均有显著性,表明模型建立成功(表 1)。

表 1. 两组大鼠有关指标测定( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 1. Determination of relevant indicators of the two groups of rats

指 标	正常对照组( $n=11$ )	高果糖组( $n=11$ )
SBP(mmHg)	118 $\pm$ 4	135 $\pm$ 5 <sup>b</sup>
FBG(mmol/L)	7.62 $\pm$ 1.02	7.63 $\pm$ 0.99
FINS( $\mu$ g/L)	1.10 $\pm$ 0.64	2.52 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>
HOMA-IR	10.37 $\pm$ 3.52	20.53 $\pm$ 5.31 <sup>a</sup>

a 为  $P<0.05$ ,b 为  $P<0.01$ ,与正常对照组比较。

### 2.2 总 RNA 抽提结果

所提组织 RNA OD<sub>206</sub>/OD<sub>280</sub> 值为 2.00~2.20 之间,1% 琼脂糖凝胶电泳 28 S 和 18 S 带清晰,且亮度

28 S 是 18 S 的 2 倍,无 DNA 杂带,证明已抽提得到高纯度的总 RNA(图 1)。

2.3 芯片杂交信号散点图

芯片杂交所用的双探针分别是正常对照组和高果糖组为模板合成,正常对照组以 Cy3 标记,高果糖组以 Cy5 标记,X 轴以 Cy3 荧光强度值(信号值-背景值)为坐标,Y 轴以 Cy5 荧光强度值(信号值-背景值)为坐标,每一个点表示芯片上一个基因点的杂交信号。斜率 1.0 附近的信号表示无表达差异,斜率超过 2.0 和小于 0.5 的点为差异表达的基因,超过 2.0 的点位于上方,意味着基因表达上调,小于 0.5 的点意味着基因下调(图 2)。

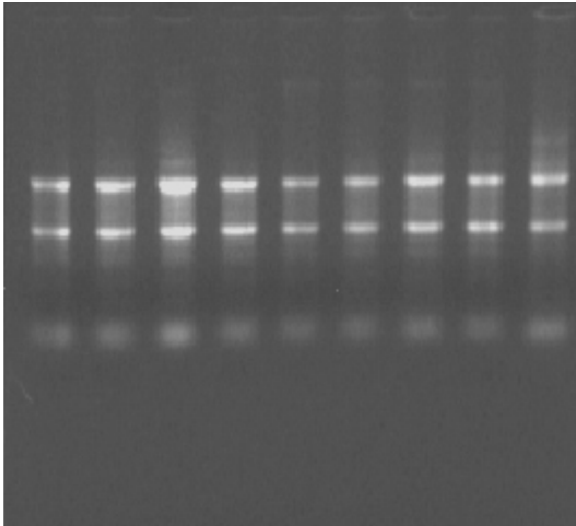


图 1. 总 RNA 电泳图  
Figure 1. The picture of total RNA electrophoresis

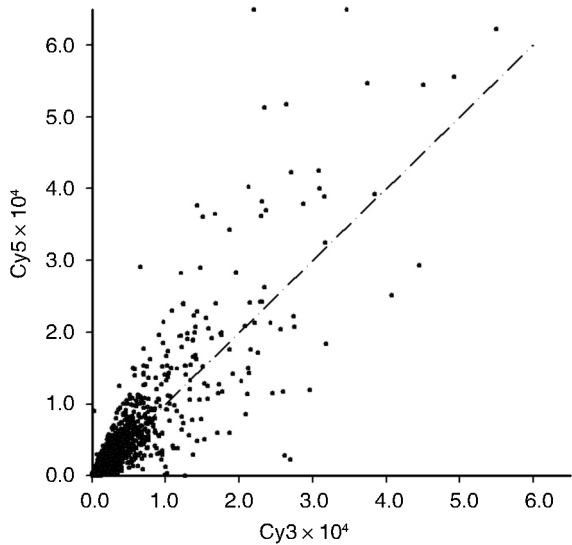


图 2. 基因芯片杂交信号散点图  
Figure 2. The scatter plots of hybridizing signals on gene chip

2.4 杂交扫描图

图 3 为 Cy5 标记的杂交扫描图;图 4 为 Cy3 标记的杂交扫描图;图 5 为不同比目鱼肌组织(高果糖组/正常对照组)双色荧光标记叠加图,如果 Cy3 信号较强,该点显绿色,下调趋势;如果 Cy5 信号较强,该点显红色,上调趋势;如果强度相似,显黄色。

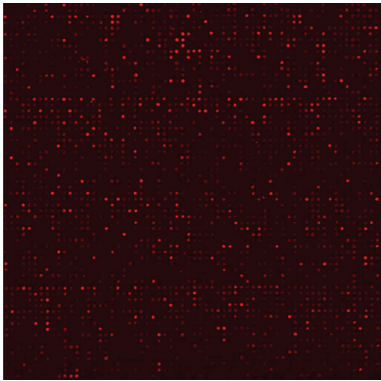


图 3. Cy5 标记扫描图  
Figure 3. Scanning image of test group (Cy5- labeled)

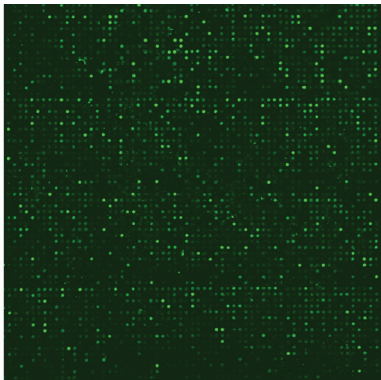


图 4. Cy3 标记扫描图  
Figure 4. Scanning image of control group (Cy3 -labeled)

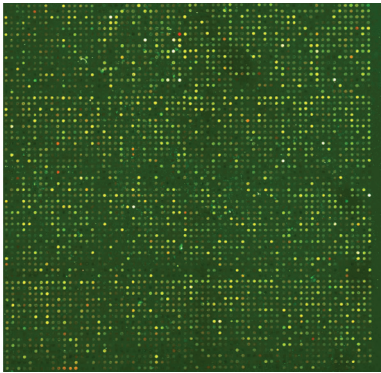


图 5. Cy5、Cy3 叠加图  
Figure 5. Scanning results of hybridizing signals high ex-  
pression (red) ,low expression (blue) , no change expression ( yellow) .

2.5 高果糖组和正常对照组基因表达差异的比较

用基因芯片筛选高果糖组和正常对照组的差异表达基因,发现存在差异表达的基因,其中重复 2 次差异表达的基因有 140 条;表达上调的基因 62 条,表达下调的基因 78 条。表达差异的已知部分基因见表 2。

表 2. 筛选表达差异基因的部分数据

Table 2. Results of selected datas

Genebank ID	Gene name	Ratio1 ( Cy5/Cy3 )	Ratio2 ( Cy5/Cy3 )	Average ratio ( Cy5/Cy3 )
NM_023103	alpha(1)-inhibitor 3, variant I	3.62	2.05	2.83
NM_012488	Alpha-2-macroglobulin	6.30	2.70	4.50
Y00350	uroporphyrinogen decarboxylase	3.43	2.31	2.87
NM_022392	growth response protein (CL-6)	4.43	3.05	3.74
BI275676	ESTs, Weakly similar to T12688 hypothetical protein 63B12.2-fruit	7.31	3.62	5.46
NM_022635	fly putative N-acetyltransferase Camello 4	6.68	13.52	10.10
NM_031510	Isocitrate dehydrogenase 1, soluble	4.07	3.30	3.68
NM_017030	Propionyl Coenzyme A carboxylase, beta polypeptide	4.41	2.50	3.45
NM_021664	deoxyribonuclease DLAD	2.99	2.19	2.59
U51017	Rattus norvegicus kallistatin mRNA, complete cds	2.6	3.31	2.96
NM_053348	fetuin beta	4.7	4.67	4.68
AF051943	nucleoside diphosphate kinase type 6	2.11	2.98	2.54
NM_031756	gamma-glutamyl carboxylase	2.74	3.31	3.02
NM_031684	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1	2.22	2.03	2.12
NM_019140	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	2.13	2.14	2.14
NM_031345	glucocorticoid-induced leucine zipper Prostaglandin D synthase	2.6	2.21	2.41
NM_013015	ESTs, Moderately similar to A61209	0.44	0.37	0.41
BG373566	hypertension-associated protein SA - rat	0.47	0.39	0.43
AB003726	RuvB-like protein 1	0.46	0.40	0.43
NM_053796	junctional adhesion molecule 1	0.45	0.38	0.42
X56228	Thiosulfate sulphurtransferase (rhodanese)	0.36	0.46	0.41
NM_019381	Testis enhanced gene transcript	0.39	0.32	0.36
AJ277747	MASP-2 protein	0.42	0.47	0.45
NM_017314	ubiquitin C	0.42	0.40	0.41
NM_017005	Fumarate hydratase	0.39	0.50	0.45
AF330051	Rattus norvegicus retinoid-inducible serine carboxypeptidase precursor (Risc) mRNA, complete cds	0.49	0.37	0.43
AB028626	RAS p21 protein activator 3	0.45	0.45	0.45
AF276940	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	0.40	0.41	0.41
NM_022539	initiation factor 2 associated 67 kDa protein	0.49	0.48	0.49



2.6 差异表达基因 PCR 结果与基因芯片结果比较
差异表达基因用基因芯片和 PCR 两种方法比
较,表达结果一致(表 3)。

表 3. 差异表达基因 RT- PCR 结果与基因芯片结果的比较

Table 3. Comparison of differentially expressed genes by RT-PCR and microarray

Genebank ID	Gene name	基因芯片			RT- PCR		
		Ratio1Cy5/Cy3	Ratio2Cy5/Cy3	Average ratio	Ratio1	Ratio2	Average ratio
NM_031345	glucocorticoid-induced leu- cine zipper	2. 60	2. 21	2. 41	3. 15	3. 34	3. 25

3 讨 论

本实验借助基因表达谱芯片这一大规模、高通量的生物技术,研究了胰岛素抵抗大鼠与正常大鼠骨骼肌基因表达的差异,发现了胰岛素抵抗大鼠中存在着大量的差异表达基因,在深入研究中,发现 140 个差异表达的基因,其中表达上调的有 62 条基因,表达下调的有 78 条基因,已知基因有 72 条基因,大多数与细胞信号、代谢、DNA 结合、转录和转录因子有关。68 条基因功能不清楚。本实验中, NM\_019140, NM\_031345 等为表达上调的基因, NM\_013015, BG373566 等为表达下调的基因。

胰岛素抵抗受体 (INSR) 与胰岛素结合后, 首先使受体自身的酪氨酸被磷酸化, INSR 的 PTK 进而被激活, 之后其底物蛋白, 如 IRS-1 等借其 SH-2 区与 INSR 分子含磷酸化 Tyr 的序列结合, 在受体 PTK 的作用下被磷酸化, 由此启动磷酸化的极联反应并导致信号的进一步转导。NM\_019140 编码蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTPase), PTPase 是 INSR 的靶酶, PTPase 分为两大类, 一类位于细胞外的非受体型, 有一单独的 PTPase 区域, 有特定功能的蛋白片断 (如 PTP1B); 另一类是跨膜的受体型, 位于细胞外区域膜受体一样有相同的结构, 有单一的跨膜片断, 有 1 到 2 个 PTPase 活化区域 (如 LAR)<sup>[10]</sup>。在正常状况下, PTPaseLAR 在细胞外和胰岛素受体结合很弱, 胰岛素和受体连接后, 酪氨酸激酶胰岛素受体诱导自动磷酸化, 增强了酪氨酸激酶的活性, 活化的酪氨酸激酶胰岛素受体使底物和 LAR 磷酸化, LAR 酪氨酸磷酸化可能使 PTPases D1 and/or D2 构象发生改变, 导致和 LAR PTPase 区域 2 紧紧相连, 通过 PTPase D1 活性变化, 胰岛素受体酪氨酸残基脱去磷酸化, 磷酸化的 LAR 残基也可以由于 PTPase D1 活性的变化脱去磷酸到先前的活化状态, 从而使信号发生转导<sup>[11]</sup>。PTP1B 和 PTPaseLAR 在胰岛素信号转导过程中, 起负反馈作用<sup>[12-13]</sup>, 并被认为是治疗肥

胖和糖尿病的新药靶<sup>[14-15]</sup>。活化的 PTPase 却催化了 INSR 的脱磷酸化, 使 SH-2 序列蛋白无法被 INSR 激活, 抑制了信号的转导作用, 由于 PTPase 高表达, 抑制了胰岛素和受体的连接, 使信号转导受阻, 产生胰岛素抵抗。NM\_031345 编码糖皮质激素诱导亮氨酸拉链蛋白 (glucocorticoid-induced leucine-zipper protein, GILZ), 是从胸腺减少文库作为地塞米松响应基因第一次提取<sup>[16]</sup>。糖皮质激素诱导的亮氨酸拉链 (GILZ) 蛋白由 137 个氨基酸残基组成, 具有 N 端区 (1. 75 位氨基酸残基)、亮氨酸拉链区 (76. 97 位氨基酸残基)、和富含脯氨酸和谷氨酸残基的 C 端区 (98. 137 位氨基酸残基)。GILZ 过度表达抑制 NF-κB 核酸转录因子<sup>[17-18]</sup>, GILZ 连接着胰岛素受体信号转导的两个途径之一有丝分裂的蛋白激酶 (MAPK), 对 Raf-1 有抑制作用, 影响下游的极联反应。GILZ 过度表达抑制 ERK-1/2, MEK 和 Raf-1 磷酸化作用, 但是对 JNK 没有此作用<sup>[19]</sup>。本实验中 GILZ 过度表达, 抑制了有丝分裂的蛋白激酶 (MAPK) 途经, 导致胰岛素信号转到受阻, 产生胰岛素抵抗。我们认为 GILZ 在胰岛素抵抗中, 也是一个相关的基因。在实验中我们发现许多已知和未知基因表达异常, 如 CD36, Ptgds 等等, 这些基因有些和胰岛素抵抗有关, 有些和代谢有关, 具体的路径如何, 相互之间的关系如何, 还待以后继续研究。

胰岛素抵抗的发病机制非常复杂, 至今尚未阐明。本实验的结果为胰岛素抵抗分子机制的研究提供了十分有用的线索, 进一步对差异表达基因功能的研究将有助于揭示复杂调控网络在胰岛素抵抗发生发展的作用, 明确胰岛素抵抗的发病机制。

[参考文献]

[1] Reaven GM. Banting Lecture 1988: Role of insulin resistance in human disease [J]. Diabetes, 1988, 37 (12): 1 595-607.

[2] 胡 晖 杨希立 李健民, 等. 冠心病患者血脂异常与胰岛

- 素抵抗的关系[J]. 中国现代医学杂志, 2002, 12(10): 65-66.
- [3] 赵旭燕, 李玉明, 王波. 胰岛素抵抗高血压大鼠胰岛素抵抗和血清瘦素水平对血脂的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(6): 656-658.
- [4] 张雅中, 房辉, 田金莉, 等. 2型糖尿病家系胰岛素抵抗与血清抵抗素水平的相关性研究[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(1): 42-44.
- [5] Schena M, Shalon D, Dais R W, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[J]. Science, 1995, 270(20): 467-470.
- [6] Collins FS. Shattuck lecture-medical and societal consequences of the human genome project[J]. N Engl J Med, 1999, 341(1): 28-37.
- [7] 顾菲菲, 高炜, 蒋捷. 基因芯片在同型半胱氨酸诱导动脉粥样硬化基因表达谱变化中的应用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(4): 433-437.
- [8] Schena M, Shalon D, Dais R W, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[J]. Science, 1995, 270(20): 467.
- [9] Schena M, Shalon D, Heller R, et al. Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes[J]. Proc Natl Sci USA, 1996, 93(20): 10614-619.
- [10] Goldstein BJ. Protein-tyrosine phosphatases: emerging targets for therapeutic intervention in type 2 diabetes and related states of insulin resistance[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(6): 2474-480.
- [11] Tsujikawa K, Kawakami N, Uchino Y, et al. Distinct functions of the two protein tyrosine phosphatase domains of LAR (leukocyte common antigen-related) on tyrosine dephosphorylation of insulin receptor. Mol Endocrinol [J]. 2001, 15(2): 271-280.
- [12] Hirata AE, Alvarez-Rojas F, Carvalheira JB, et al. Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats[J]. Life Sci, 2003, 73(11): 1369-381.
- [13] Liu G. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibition: opportunities and challenges[J]. Curr Med Chem, 2003, 10(15): 1407-421.
- [14] Mooney RA, LeVea CM. The leukocyte common antigen-related protein LAR: candidate PTP for inhibitory targeting[J]. Curr Top Med Chem, 2003, 3(7): 809-819.
- [15] Ramachandran C, Kennedy BP. Protein tyrosine phosphatase 1B: a novel target for type 2 diabetes and obesity[J]. Curr Top Med Chem, 2003, 3(7): 749-757.
- [16] D'Adamio F, Zollo, Moraca R, et al. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death[J]. Immunity, 1997, 7(6): 803-812.
- [17] Soundararajan R, Wang J, Melters D, et al. Glucocorticoid-induced Leucine zipper 1 stimulates the epithelial sodium channel by regulating serum- and glucocorticoid-induced kinase 1 stability and subcellular localization[J]. J Biol Chem, 2010, 285(51): 39905-913.
- [18] Joha S, Nagues AL, Hétiuin D, et al. GILZ inhibits the mTORC2/AKT pathway in BCR-ABL(+) cells Oncogene[J]. 2011, Aug 1. doi: 10.1038/onc.2011.328.
- [19] Nader N, Ng SS, Lambrou GI, et al. AMPK regulates metabolic actions of glucocorticoids by phosphorylating the glucocorticoid receptor through p38 MAPK[J]. Mol Endocrinol, 2010, 24(9): 1748-764.
- (此文编辑 李小玲)