

[文章编号] 1000- 4718(2005)01- 0175- 04

雌激素和高胰岛素调节胰岛素受体底物- 1, 2 表达机制研究*

谢平, 刘美莲, 曾卫民, 黄建军, 陈淑华, 卢瑾, 徐霞, 宋惠萍[△]

(中南大学湘雅医学院生物化学教研室, 湖南长沙 410078)

[摘要] 目的: 研究雌激素和高浓度胰岛素对胰岛素受体底物(IRS)- 1 和- 2 表达的分子机理。方法: 将 IRS- 1, 2 基因 5' 调控区克隆至含荧光素酶表达载体 pGL3 质粒, 转染 HeLa 细胞, 加雌激素(1 nmol/L) 或高浓度胰岛素(100 nmol/L) 培养, 检测 IRS- 1, 2 基因 5' 调控区相对转录活性。结果: 高浓度胰岛素刺激细胞 48 h, IRS- 2 基因 5' 调控区相对转录活性减低, IRS- 1 无明显差异; 雌激素处理显著增加 IRS- 1, 2 基因 5' 调控区的相对转录活性。结论: 高胰岛素可能通过作用于 IRS- 2 基因 5' 调控区中胰岛素作用元件, 使其转录活性降低。而雌激素则通过作用于 IRS- 1, 2 基因 5' 调控序列, 使其转录活性提高, 增强其表达。

[关键词] 雌激素类; 胰岛素; 受体, 胰岛素

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

临床调查显示, 40% - 60% 的绝经后妇女出现胰岛素抵抗, 雌激素替代治疗可缓解胰岛素抵抗症状, 维持糖脂代谢平衡。高胰岛素血症是 2 型糖尿病患者常见症状, 已被证实可进一步加重胰岛素抵抗状态^[1]。实验证明^[2], 高浓度胰岛素长期刺激可导致肝细胞胰岛素受体底物- 2(insulin receptor substrate- 2, IRS- 2) 的表达下调, 出现胰岛素抵抗现象; 雌激素则可提高抵抗细胞 IRS- 1, 2 的表达, 增加细胞对胰岛素敏感性, 有效缓解胰岛素抵抗。本研究利用荧光素酶表达质粒观察雌激素促进 IRS- 1, 2 表达和胰岛素抑制 IRS- 2 表达的分子机理。

材 料 和 方 法

1 材料

HeLa 细胞由湘雅医学院细胞中心提供, DMED 培养基、Opti- MEM 无血清培养基购自 Gibco 生物工程公司, 胰岛素和水溶性雌激素购自 Sigma 公司。PyrobestTM DNA 聚合酶、Kpn I 内切酶、Bgl II 内切酶为大连宝生物工程公司产品。荧光素酶报告载体 pGL3- control vector, pGL3- Basic vector, pSV- β - galactosidase control vector, Φ X174 DNA/Hae III DNA 标准为 Promega 公司产品。其它试剂均为市售分析纯

试剂。

含 hIRS- 2 启动子的 pGL3- hIRS- 2 质粒由 Ludger 教授(德国 Tumorforschung 大学)惠赠; 表达雌激素受体质粒 pE0 质粒由 Chambon 教授(CNRS/INSERM/Universite Louis Pasteur/College de France, Strasbourg, France)惠赠。

2 含 hIRS- 1 基因 5' 端调控区 pGL3- hIRS- 1 报告基因载体克隆

2.1 hIRS- 1 基因 5' 端调控区 PCR 扩增 以正常人血液中提取出来的基因组为模板, 采用高保真 PyrobestTM DNA 聚合酶扩增, 远端引物 5' - gggatac gatcgcagtacgaagaagcgtttgtg- 3' (- 925) 含 Bgl II 酶切位点, 近端引物 5' - gggaaggtaccaggaggaggaggagaagtaac- 3' (+ 97) 含 Kpn I 酶切位点。PCR 扩增条件 94 °C 预变性 3 min, 反应条件为变性 94 °C 60 s, 复性 62 °C 60 s, 延伸 72 °C 60 s, 30 个循环后, 继续延伸 10 min。PCR 产物于 1% 的琼脂糖凝胶电泳确定长度。

2.2 质粒和目的片段的酶切连接 pGL3- basic vector 和 IRS- 1 基因 5' 端调控序列 PCR 产物分别用内切酶 Kpn I、Bgl II 进行酶切, 然后在 T4 DNA 连接酶作用下, 连接载体与目的片段。

2.3 含目的片段的质粒转化及筛选鉴定 重组质粒以 TSS 法转化大肠杆菌 DH5 α ^[3], 转化质粒的菌液铺于含 100 mg/L 氨苄青霉素(ampicillin, Amp) 的 LB 琼脂平板上, 37 °C 培养过夜。从平板上挑取单个菌落, 接种于含 100 mg/L Amp 的 LB 液体培养基(1% 酪蛋白, 0.5% 酵母提取液, 0.5% NaCl) 中, 于 37 °C 温育

[收稿日期] 2003- 07- 01 [修回日期] 2003- 09- 10

* [基金项目] 湖南省卫生厅科学技术研究基金资助项目 (No. Y02- 007)

[△]通讯作者 Tel: 0731- 235515; E- mail: huiping_ song@ hot- mail. com

振荡培养过夜。收集细菌, 碱裂解法提取质粒 DNA 并纯化^[4]。提取的质粒 DNA 用 Kpn I / Bgl II 内切酶酶切, 酶切产物行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 确定目的片段长度, 将长度正确的片段用 DNA 自动测序仪 ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer 进行 DNA 序列分析, 测序证实克隆的目的片段为所需片段。

3 HeLa 细胞培养和质粒转染

HeLa 细胞用 RPMI- 1640+ 10% 小牛血清(活性炭去雌激素) 进行培养。于 6 孔细胞培养板中接种约 10⁵ 个细胞/ 孔, 37 °C, 5% 的 CO₂ 条件下培养至 60% 的细胞靠拢, 分别取 0.5 μg 重组质粒或阳性对照质粒与 0.5 μg pSV- β- galactosidase control vector (作为内标), 加或者不加 0.5 μg pE0 质粒, 与 5 μL 阳离子脂质体进行共转染。

4 细胞处理与裂解

转染细胞在更换正常培养基后, 按图示中说明加入高浓度胰岛素或雌激素处理。之后, 裂解细胞, 检测荧光素酶和 β- 半乳糖苷酶活性。

5 荧光素酶活性测定

于液闪管中加 100 μL 荧光素酶检测试剂, 然后加入 20 μL 细胞裂解液, 快速混匀, 20 s 后, 在液体闪烁测量仪中测定 counts•min⁻¹ 值, 测定时间为 1 min。

6 β- 半乳糖苷酶(β- galactosidase, β- Gal) 活性测定

取细胞裂解液 100 μL, 用 50 μL 裂解缓冲液稀释, 然后加入 150 μL 测定缓冲液, 混匀, 37 °C 温育 1 h, 加 500 μL 的 1 mol/L 的 NaHCO₃ 终止反应。于 420 nm 波长测定吸光度值(A₄₂₀), 同时绘制标准曲线。

7 相对转录活性计算

相对转录活性 = (S_{dpm} - B_{dpm}) ÷ (S_{β-G} - B_{β-G})。
S_{dpm} - 样品之 counts•min⁻¹ 值; B_{dpm} - 空白细胞之 counts•min⁻¹ 值; S_{β-G} - 样品之 β- 半乳糖苷酶活性; B_{β-G} - 空白细胞之 β- 半乳糖苷酶活性。

8 统计学处理

用 SPSS 统计学软件进行 One- way ANOVA 分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结 果

如图 1 和图 2 所示, 经雌激素处理 24 h 后, IRS- 1 和 IRS- 2 基因 5' 调控序列的相对转录活性显著增高(P < 0.05)。不同浓度雌激素对 IRS- 1 和 IRS- 2 基因 5' 调控序列转录活性的影响没有明显差异(P > 0.05)。共转染雌激素受体表达载体 pE0 的细

胞组, 相对转录活性稍高于未转染 pE0 质粒的细胞组, 但无明显差异(P > 0.05)。加入雌激素刺激后, 它们的相对转录活性都明显升高(P < 0.05)。

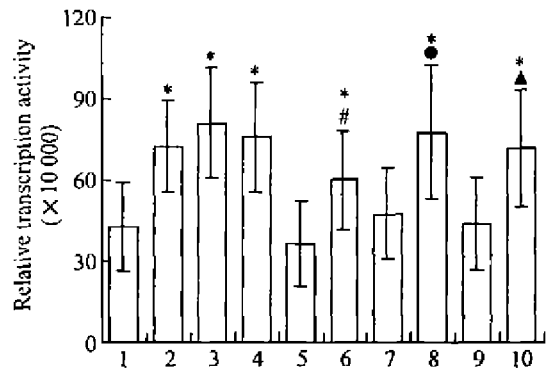


Fig 1 Effect of estrogen and insulin on activity of 5' - regulatory region of hIRS- 1 gene. Lane 1- 4: cells were cotransfected with pGL3- hIRS- 1, pSV- β- Gal and pE0, then treated with 0, 1, 10, 100 nmol/L estrogen for 24 h separately; Lane 5- 6: cells were cotransfected with pGL3- hIRS- 1 and pSV- β- Gal only, then treated with 0 and 1 nmol/L estrogen for 24 h. Lane 7- 10: cells were cotransfected with pGL3- hIRS- 1, pSV- β- Gal and pE0, and precubated with 1, 1, 100 and 100 nmol/L of insulin for 24 h, then treated with 0, 1, 0 and 1 nmol/L estrogen for 24 h. All values were expressed as $\bar{x} \pm s$. n = 7. * P < 0.05 vs group 1; # P < 0.01 vs group 5; • P < 0.01 vs group 7; ▲ P < 0.01 vs Group 9.

图 1 雌激素、胰岛素对胰岛素受体底物- 1 的 5' 调控区转录活性的影响

细胞转染质粒之后, 高浓度胰岛素处理 48 h, IRS- 2 基因 5' 调控序列的相对转录活性显著下降(P < 0.05)(图 2), 而 IRS- 1 基因 5' 调控序列的相对转录活性则没有明显改变(P > 0.05)(图 1)。在高浓度胰岛素处理转染后的细胞 24 h, 再加入雌激素继续培养 24 h, IRS- 1, 2 基因 5' 调控序列的相对转录活性比高浓度胰岛素组明显升高(P < 0.05)。

讨 论

IRS- 1 和 IRS- 2 分子是胰岛素信号传递过程中非常重要的信息分子。剔除 IRS- 1 或 IRS- 2 基因的小鼠表现出糖耐量降低、糖转运能力减弱、糖脂代谢紊乱以及生长迟缓等胰岛素抵抗症状^[5,6]。体外实验发现, 雌激素可提高肝细胞 IRS- 1 和 IRS- 2 的转录和翻译水平, 增强细胞胰岛素敏感性。而高浓度胰岛素则可以使肝细胞 IRS- 2 的表达显著下调, 并伴随糖代谢关键酶活性的降低等胰岛素抵抗

症状。

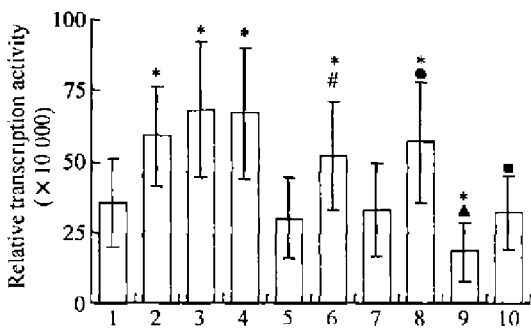


Fig 2 Effect of estrogen and insulin on activity of 5' - regulatory region of hIRS- 2 gene. Lane 1- 4: cells were cotransfected with pGL3- hIRS- 2, pSV- β - Gal and pE0, then treated with 0, 1, 10, 100 nmol/L estrogen for 24 h separately. Lane 5- 6: cells were cotransfected with pGL3- hIRS- 2 and pSV- β - Gal only, then treated with 0 and 1 nmol/L estrogen for 24 h separately. Lane 7- 10: cells were cotransfected with pGL3- hIRS- 2, pSV- β - Gal and pE0, and precubated with 1, 100 and 100 nmol/L of insulin for 24 h, then treated with 0, 10, and 1 nmol/L estrogen for 24 h separately. All values were expressed as $\bar{x} \pm s$. $n = 7$. * $P < 0.05$ vs group 1; # $P < 0.01$ vs group 5; • $P < 0.01$ vs group 7; ▲ $P < 0.01$ vs group 7; ■ $P < 0.01$ vs group 9.

图 2 雌激素、胰岛素对胰岛素受体底物- 2 的 5' 调控区转录活性的影响

雌激素与雌激素受体复合物, 作为反式作用因子, 可调节多种基因表达^[7]。本研究采用报告基因研究雌激素对 IRS- 1 和 IRS- 2 基因 5' 调控区转录效率的影响发现, 雌激素显著提高含 IRS- 1 和 IRS- 2 基因 5' 调控区的报告基因的相对转录活性, 说明雌激素可能作用于 IRS- 1 和 IRS- 2 基因 5' 调控区增强两者基因表达。雌激素- 雌激素受体复合物可通过多种途径和方式调节基因转录翻译。一方面通过与靶基因 5' 调控区的雌激素反应元件 (GGT-CANNNTGACC) 结合, 直接调节基因表达^[8]; 另一方面通过其它途径介导 (如一氧化氮、p42/p44 MAPK 途径、cAMP 反应元件和 AP1 反应元件), 间接调控基因表达^[9, 10]。尽管 IRS- 1 和 IRS- 2 基因 5' 调控区没有发现雌激素受体结合元件, 但存在与雌激素受体半结合元件 (GGTCA) 相似的 DNA 序列 (GCTCA), 而且其 5' 调控区还存在与雌激素调节基因转录密切相关的辅转录因子 AP1 和 SPI^[11, 12], 因此, 雌激素- 雌激素受体复合物可能通过这些元件, 上调 IRS- 1 和 IRS- 2 基因表达。

由于雌激素对基因表达调控主要是通过雌激素

- 雌激素受体复合物起作用。因此, 在转染时, 采用加或者不加雌激素受体表达载体进行共转染。加雌激素受体表达载体实验组的基因相对转录活性较未共转染雌激素受体表达载体组高, 提示雌激素是通过与其受体结合, 上调了 IRS- 1 和 IRS- 2 的表达, 但由于雌激素受体在亚细胞中的定位非局限于细胞核, 胞浆中也存在^[13], 所以加或不加雌激素表达载体没有造成显著差异。现已证实雌激素可以通过作用于 IRS- 1 和 IRS- 2 基因 5' 调控区增加其表达, 但雌激素- 雌激素受体复合物与调控区具体结合部位, 以及与辅转录因子如何共同调节 IRS- 1 和 IRS- 2 基因表达仍需进一步的研究。

另外, 研究证实高浓度胰岛素降低了含 IRS- 2 基因 5' 调控区报告基因相对转录活性。从 IRS- 2 基因 5' 调控区序列分析发现, 在该区域存在有胰岛素反应元件 (TGTTTGTG), 该元件与胰岛素结合后, 表现出增强或减弱不同的基因转录调节效应^[14]。高浓度胰岛素可能通过与胰岛素反应元件结合后, 下调 IRS- 2 基因表达, 导致细胞产生胰岛素抵抗。前述研究已证明^[2], 雌激素可以减轻高浓度胰岛素诱导的 IRS- 2 表达下降。为此, 高浓度胰岛素刺激之后, 加入雌激素刺激, 发现含 IRS- 2 基因 5' 调控区报告基因相对转录活性较高浓度胰岛素刺激后有明显提高。进一步说明雌激素可以逆转高浓度胰岛素造成的 IRS- 2 基因表达下降, 缓解胰岛素抵抗。

[参 考 文 献]

[1] Falkner B, Sherif K, Sumner A, et al. Hyperinsulinism and sex hormone in young adult African Americans [J]. Metabolism, 1999, 48(1): 107- 112.

[2] Ping X, Mei LL, Ya PG, et al. Oestrogen improves glucose metabolism and insulin signal transduction in HepG2 cells[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2003, 30(9): 643- 648.

[3] Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One- step preparation of competent Escherichia Coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(7): 2172- 2175.

[4] Ausel FM, Brent R, Kingston RE, et al. Short protocols in molecular biology[M]. 3rd ed. Maryland: John & Sons, Inc, 1995. 1- 16.

[5] Tamemoto H, Kadowaki T, Toke K, et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate- 1[J]. Nature, 1994, 372(6502): 182- 186.

[6] Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, et al. Disruption of IRS- 2 causes type 2 diabetes in mice[J]. Nature, 1998, 391

- (6670): 900– 904.
- [7] 谈智, 王庭槐. 雌激素作用分子机制研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(10): 1422– 1426.
- [8] Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(14): 2905– 2919.
- [9] Dos Santos EG, Dieudonne MN, Pecquery R, et al. Rapid nongenomic E2 effects on p42/p44 MAPK, activator protein-1, and cAMP response element binding protein in rat white adipocytes [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(3): 930– 940.
- [10] Paech K, Webb P, Kuiper G, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ER and ER β at AP-1 sites [J]. *Science*, 1997, 277(5331): 1508– 1510.
- [11] Araki E, Haag BL, Matsuda K, et al. Characterization and regulation of the insulin receptor substrate gene promoter [J]. *Mol Endocrinol*, 1995, 9(10): 1367– 1379.
- [12] Vassen L, Wegrzyn W, Klein-Hitpass L. Human insulin receptor substrate-2: gene organization and promoter characterization [J]. *Diabetes*, 1999, 48(9): 1877– 1880.
- [13] Martin PM, Sheridam PJ. Intracellular localization of steroid hormone receptors. A challenging problem. Autoradiographic and biochemical study [J]. *Ann Pathol*, 1986, 6(2): 115– 129.
- [14] O'brien RM, Streeper RS, Ayala JE, et al. Insulin-regulated gene expression [J]. *Biochem Soc Trans*, 2001, 29(Pt 4): 552– 558.

Regulatory mechanism in expression of IRS- 1 and 2 by estrogen and high concentration of insulin

XIE Ping, LIU Mei-lian, ZENG Wei-min, HUANG Jian-jun, CHEN Shu-hua,
LU Jin, XU Xia, SONG Hui-ping
(*Department of Biochemistry, Xiangya School of Medicine, Central Southern University, Changsha 410078, China*)

[**ABSTRACT**] **AIM:** To study the molecular mechanism in modulation of expression of insulin receptor substrate - 1 and - 2 (IRS- 1, - 2) by estrogen and high concentration of insulin. **METHODS:** The 5' - regulatory regions of IRS- 1 and IRS- 2 gene were cloned into the pGL3 plasmid with luciferase reporter, and the clones were transfected into HeLa cells. The cells were incubated with estradiol (1 nmol/L) and high concentration of insulin (100 nmol/L). The relatively transcriptional activity of the 5' - regulatory regions of IRS- 1 and IRS- 2 gene was detected. **RESULTS:** It was found that the relatively transcriptional activity of the 5' - modulatory regions of IRS- 2 reduced markedly after cells were incubated with 100 nmol/L insulin ($P < 0.05$), but that of IRS- 1 was not affected. Estradiol increased the relatively transcriptional activity of the 5' - regulatory regions of IRS- 1 and - 2 distinctly ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** High concentration of insulin decreases the expression of IRS- 2 by acting on its insulin reactive element, and estradiol elevates the expression of IRS- 1 and - 2 by acting on their 5' - modulatory regions.

[**KEY WORDS**] Estrogens; Insulin; Receptor, insulin