

胰岛素对大鼠载脂蛋白 AI, CII 和 CIII 基因表达的影响*

彭 腾 刘秉文

蓝天鹤

(华西医科大学生物化学与分子生物学研究所, 成都 610041)

提 要

以 Sprague-Dawley 大鼠为实验对象, 研究胰岛素对大鼠肝脏及小肠 apoAI、CII 和 CIII mRNA 相对含量的影响。RNA 斑点杂交技术分析表明, 注射胰岛素后 12h, 大鼠肝脏和小肠 apoAI 和 CII 以及肝脏 apoCIII mRNA 相对含量均显著下降, 小肠 apoCIII mRNA 相对含量无变化。

关键词 胰岛素, 载脂蛋白 AI, 载脂蛋白 CII, 载脂蛋白 CIII mRNA

刘秉文等研究表明, 高糖膳食可引起人血糖、血浆甘油三酯 (TG) 及胰岛素水平升高以及血浆载脂蛋白 (apo) AI, CI, CII 和 CIII 含量下降^[1,2]。作者等也观察到高糖膳食可引起大鼠血浆 TG 和胰岛素水平升高, cAMP 含量下降, 同时引起大鼠肝脏和小肠 apoAI, CII 和 CIII mRNA 相对含量下降。这些改变提示胰岛素可能在高糖膳食对 apo 基因表达以及血浆 apo 含量的影响中发挥调节作用。我们进行了胰岛素对 apoAI, CII 及 CIII 基因表达影响的研究。

1 材 料 和 方 法

1.1 动物分组和标本

Sprague-Dawley 大鼠, 雄性, 体重 130—150g, 由本校动物实验中心提供。随机分成 2 组, 其中 1 组腹腔注射一定量生理盐水作对照组。另 1 组按每公斤体重 1.5 单位剂量腹腔注射胰岛素作实验组。两组大鼠在注射 12h 后乙醚麻醉下处死, 取出肝脏和小肠组织速冻于液氮备用。

1.2 核酸探针

apoAI-101 重组质粒菌株由本室陈俊杰教授赠送; apo CII 重组质粒 DNA 由美国 Rockefeller 大学 Dr. J. L. Breslow 赠送。

apoCII 重组质粒 DNA 预先转化 *E. coli* HB₁₀₁, 并和 apoAI-101 重组质粒菌株分别用清亮裂解法^[3]制备 apoCII cDNA 和 apoAI cDNA 探针。apoCIII cDNA 探针的制备^[4], 首先用兔抗人 apoCIII 单价抗血清作抗体探针, 用免疫筛选法从正常人肝 cDNA 文库(克隆载体为 λ gt11) 筛选出 apoCIII cDNA 克隆, 然后大量制备 apoCIII cDNA- λ gt11 DNA 的重组体, 经对 apoCIII cDNA- λ gt11 DNA 的酶谱及 apoCIII cDNA 克隆表达产物的分析鉴定, 说明所制备的重组 DNA 可用来作为 apoCIII cDNA 探针。

1.3 RNA 斑点杂交分析

采用酸性盐酸胍-酚-氯仿法^[5]制备组织总 RNA。大鼠肝脏和小肠组织各取 0.4g 在 4ml 盐酸胍溶液 (8mol/L 盐酸胍; 20mmol/L 醋酸钠; 10mmol/L 二硫苏糖醇, pH7.5) 中制成匀浆, 用 0.4ml 2mol/L 醋酸钠溶液 (pH4.2) 将匀浆液调成酸性 (pH4.2), 然后用等体积饱和酚、氯仿-异戊醇 (49:1) 抽提。水相中加等体积的异丙醇, 离心沉淀 RNA。制得的 RNA 溶于 0.5% SDS 溶液中, 用紫外光吸收法测定其含量。分别将 10 μ g 对照组和 40 μ g 实验

* 国家“七五”重点科技攻关资助课题。

收稿日期: 1991-03-28 修回日期: 1990-08-15

组 RNA 样品点于硝酸纤维素薄膜上, 80℃ 烘烤 2h 后, 分别与 ^{32}P 标记的 apoAI、CII 和 CIII cDNA 探针进行斑点杂交分析。杂交条件采用甲酰胺系统。放射自显影的 X 光胶片, 于 590nm 波长作密度扫描, 并以对照组肝脏或小肠的每微克 RNA 的 OD_{590} 值为 100 计算注射胰岛素后其肝脏或小肠的 mRNA 相对含量

$$\left(\frac{\text{OD}_{590}(\text{实验组}) / \mu\text{g}}{\text{OD}_{590}(\text{对照组}) / \mu\text{g}} \times 100\% \right)。$$

2 结 果

注射胰岛素后 12h 大鼠肝脏和小肠 apoAI、CII 和 CIIImRNA 相对含量的变化见表 1, 2, 3 及图 1。

表 1 胰岛素对大鼠载脂蛋白 AI mRNA 相对含量的影响

Table 1 The effects of insulin on the apoAI mRNA relative abundances of rat

编 号 No	肝脏(%) Liver(%)		小肠(%) Intestine(%)	
	对照组 Control	胰岛素组 Insulin	对照组 Control	胰岛素组 Insulin
1	100	44	100	52
2	100	86	100	33
3	100	50	100	25
4	100	20	100	47
5	100	25	100	17
$\bar{x} \pm \text{SD}$	100 $\pm$ 0	45 $\pm$ 23	100 $\pm$ 0	35 $\pm$ 13
P	<0.01		<0.01	

表 2 胰岛素对大鼠载脂蛋白 CII mRNA 相对含量的影响

Table 2 The effects of insulin on the apoCII mRNA relative abundances of rat

编 号 No	肝脏(%) Liver(%)		小肠(%) Intestine(%)	
	对照组 Control	胰岛素组 Insulin	对照组 Control	胰岛素组 Insulin
1	100	44	100	32
2	100	69	100	65
3	100	81	100	54
4	100	40	100	22
5	100	22	100	20
$\bar{x} \pm \text{SD}$	100 $\pm$ 0	51 $\pm$ 21	100 $\pm$ 0	37 $\pm$ 20
P	<0.01		<0.01	

表 3 胰岛素对大鼠载脂蛋白 CIII mRNA 相对含量的影响

Table 3 The effects of insulin on the apoCIII mRNA relative abundances of rat

编 号 No	肝脏(%) Liver(%)		小肠(%) Intestine(%)	
	对照组 Control	胰岛素组 Insulin	对照组 Control	胰岛素组 Insulin
1	100	129	100	129
2	100	101	100	190
3	100	13	100	25
4	100	16	100	20
5	100	11	100	15
$\bar{x} \pm \text{SD}$	100 $\pm$ 0	54 $\pm$ 50	100 $\pm$ 0	76 $\pm$ 71
P	<0.01		>0.05	

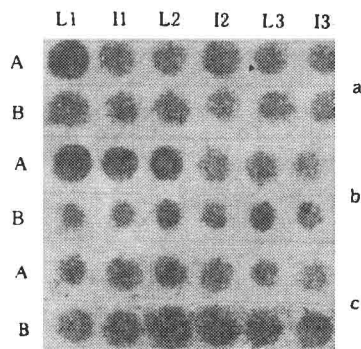


图 1 斑点杂交分析大鼠组织 RNA

Fig. 1 Dot blot analysis of the tissue RNA from rat injected with insulin

A: 胰岛素组 (RNA 为 40 μg) B: 对照组 (RNA 为 10 μg) L: 肝脏 I: 小肠
a: 载脂蛋白 AI b: 载脂蛋白 CII c: 载脂蛋白 CIII
A: Insulin (RNA: 40 μg) B: Control (RNA: 10 μg) L: Liver I: Intestine
a: apoAI b: apoCII c: apoCIII

注射胰岛素 12h 后大鼠肝脏 apoAI、CII 和 CIII mRNA 相对含量均显著下降 ($P < 0.01$), 其相对含量分别为 45%, 51% 和 54%。小肠 apoAI 和 CII mRNA 相对含量也显著下降 ($P < 0.01$), 其相对含量分别为 35% 和 37%。小肠 apoCIII mRNA 相对含量无显著性差异。

3 讨 论

本研究是在预试的基础上进行的。在预试中, 观察了注射胰岛素 6, 12 和 24h 后, 大鼠肝脏和小肠 apoAI, CII 和 CIII mRNA 相对含

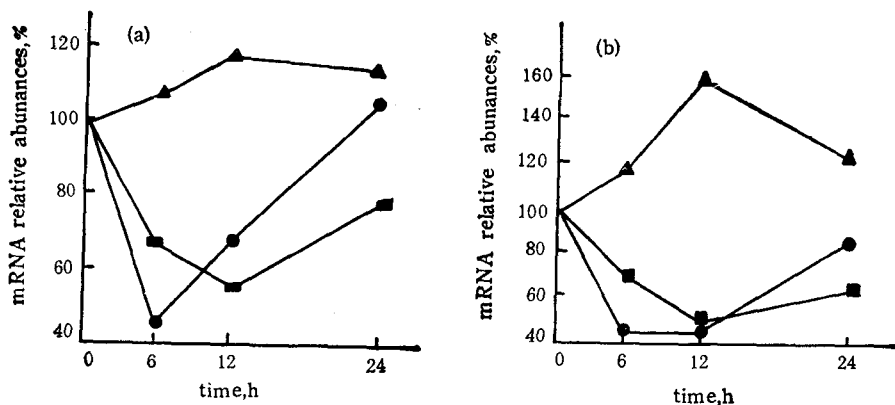


图2 胰岛素对大鼠肝脏 (a) 和小肠 (b) apoAI、CII 和 CIII mRNA 相对含量的影响
Fig. 2 Effects of insulin on the relative abundances of apoAI, CII and CIII mRNA of rat liver (a) and intestine (b)

●—●: 载脂蛋白 AI ■—■: 载脂蛋白 CII ▲—▲: 载脂蛋白 CIII
●—●: apo AI ■—■: apo CII ▲—▲: apo CIII

量的变化(图2)。由于注射胰岛素12h后,上述变化较大,所以选择注射胰岛素12h后作为最佳时间观察肝脏和小肠 apoAI、CII 和 CIII mRNA 相对含量的变化。

注射胰岛素12h后,大鼠肝脏 apoAI、CII 和 CIII mRNA 相对含量及小肠 apoAI 和 CII mRNA 相对含量均显著下降,小肠 apoCIII mRNA 相对含量无显著变化。说明胰岛素可影响 apo mRNA 含量。本研究中,肝脏和小肠 apo CIII mRNA 相对含量的批内差异较大,这可能与 apo CIII- λ gt11 重组 DNA 探针中载体部分太大有一定关系。结合文献报道^[6], Sprague-Dawley 大鼠注射胰岛素(1.5单位/kg)后,血清 apoAI 浓度显著降低。说明胰岛素使血清 apoAI 浓度降低与其合成降低有关。并且本实验结果与高糖膳食对大鼠 apoAI、CII 和 CIII mRNA 相对含量影响的结果基本一致。apoCII 可激活脂蛋白脂肪酶活性,促进 VLDL 分解代谢;apoAI 为 HDL 的主要组成蛋白质,参与调节 VLDL 的分解代谢。胰岛素可使 apoAI 和 CII mRNA 相对含量降低,使血浆 apoAI 和 CII 含量降低。我们认为胰岛素可

能通过影响 apo 基因表达,影响某些关键酶的活性或影响某些脂蛋白受体的功能,从而抑制 VLDL 的分解代谢,促进高甘油三酯血症的形成。

研究表明胰岛素可改变 cAMP 含量^[7,8],而 cAMP 在许多基因表达的调控中起重要作用^[9,10]。我们在观察高糖膳食对 apo mRNA 相对含量的影响时也发现胰岛素和 cAMP 水平有相应改变。胰岛素可能在高糖膳食影响 apo 基因表达时发挥重要作用,而其作用可能是通过 cAMP 介导的。

参 考 文 献

- 1 刘秉文等. 华西医科大学学报,1990;21: 145
- 2 刘秉文等. 华西医科大学学报,1990;21: 349
- 3 侯云德等. 病毒基因工程原理和方法. 北京: 人民出版社,1985: 88—161
- 4 彭 腾等. 华西医科大学学报,1990;21: 345
- 5 Chomczynski P *et al.* *Anal Biochem*, 1987; 162: 156
- 6 汪 渊等. 生物化学与生物物理进展,1987;19: 311
- 7 彭 腾等. 生物化学与生物物理进展,1988;15: 317
- 8 Houslay M D *et al.* *TIBS*, 1983; 8: 449
- 9 Hod Y *et al.* *J Biol Chem*, 1988; 263: 7747
- 10 Roesler W J *et al.* *J Biol Chem*, 1988; 263: 9063

EFFECTS OF INSULIN ON RAT APOLIPOPROTEINS AI, CII AND CIII GENE EXPRESSIONS

Peng Teng, Liu Bingwen, Lan Tianhe

*(Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Department of Biochemistry,
West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041)*

ABSTRACT

Sprague-Dawley rats were used to study the effects of insulin on the apo AI, CII and CIII gene expressions. Using ^{32}P -labelled apo AI, CII and CIII recombinant DNA as probes, we determined the mRNA amounts of apo AI, CII and CIII in the liver and intestine of rat injected with insulin (1.5U/Kg weight of rat) by dot blot hybridization method. After injecting insulin, the mRNA amounts of apo AI in liver and intestine were obviously decreased, to a lowest level (42%) at 6 h interval and restored to that of control group at 24h interval. Also, after injecting insulin, the mRNA amounts of apo CII in liver and intestine were declined remarkably, to a lowest level (57%) at 12h interval, still lower than that of the control group (79%) at 24h interval. But the mRNA amounts of apo CIII showed no significant changes after injecting insulin both in liver and intestine when compared with the control group ($P > 0.05$).

The experiment was repeated. 12h after injecting insulin, the mRNA amounts of apo AI, CII and CIII in liver and apo AI and CII in intestine were obviously decreased (45%, 51% and 54%, 35% and 37%, respectively, $P < 0.01$, $n = 5$) and the mRNA amounts of apo CIII in intestine remained unchange ($P > 0.05$, $n = 5$). These results revealed that insulin could evidently affect the gene expression of apolipoproteins.

Key words Insulin, Apo AI, CII and CIII, mRNA amounts