

# 胰岛素受体底物 1 和 2 敲低对猪肝脏 细胞糖脂代谢的影响\*

黄天晴<sup>1</sup> 孔庆然<sup>1</sup> 李妍<sup>1</sup> 于淼<sup>2</sup> 刘忠华<sup>1\*\*</sup>

(1 东北农业大学胚胎工程实验室 哈尔滨 150030 2 哈尔滨职业技术学院 哈尔滨 150030)

**摘要** 目的:通过 shRNA 干扰高效敲低猪肝脏细胞中 *IRS1* 和 *IRS2* 基因的表达,进而验证其对于糖脂代谢相关基因表达的影响,为构建 2 型糖尿病模型猪奠定基础。方法:首先通过重叠 PCR 方法克隆了猪 *IRS1* 基因全部的 mRNA 序列(4 814bp)以及通过 3'RACE 方法克隆了猪 *IRS2* 基因的部分 3'非编码区(3-untranslated region, 3'UTR)。然后,通过 Real-time PCR 筛选获得了能显著敲低这两个基因的 shRNA 片段,并在同时敲低 *IRS1* 和 *IRS2* 的猪肝脏细胞中,检测糖脂代谢相关基因的表达。结果:猪肝脏细胞中 *IRS1* 和 *IRS2* 的表达被显著敲低,分别下降了 78% 和 64%。另外,糖异生作用酶磷酸烯醇丙酮酸激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)和果糖-1,6-二磷酸酶(fructose-1,6-bisphosphatase, *F-1,6-BP*)基因表达显著上升,并导致催化肝脏中糖酵解反应的葡糖激酶(glucokinase, *Gck*)基因表达的显著下降。同时,胆固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element-binding proteins, *SREBP-1*)基因的表达也显著上升以及胆固醇调节基因 *Abcg8*, *CYP7a1* 表达明显上调。结论:猪肝脏细胞中 *IRS1* 和 *IRS2* 基因的敲低可激活糖异生作用,并抑制糖酵解反应,从而导致糖代谢的异常,同时也能引起脂类代谢的异常。

**关键词** *IRS1* *IRS2* RNA 干扰 糖脂代谢 猪

**中图分类号** Q819

根据最新的流行病学研究,糖尿病正在成为全世界范围内的流行疾病,随着人口老龄化趋势,2 型糖尿病的发病率逐年上升<sup>[1]</sup>。2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)主要的发病机制为外周胰岛素抵抗与胰腺  $\beta$  细胞功能发生障碍<sup>[2]</sup>,而这些异常大部分是由遗传缺陷引起的<sup>[3]</sup>。胰岛素受体底物(insulin receptor substrates, IRSs)蛋白处于胰岛素信号通路的枢纽位置,通过自身磷酸化作用招募并结合下游的许多信号转导分子,将胰岛素信号传递、发散到下级网络,在维持细胞正常的生理功能上起到重要的作用<sup>[4]</sup>,*IRS1* 和 *IRS2* 基因的缺陷是 2 型糖尿病的主要发病机制<sup>[5]</sup>。有研究表明,敲除 *IRS1* 基因的小鼠表现出生长发育缓慢

以及一定的胰岛素抵抗现象<sup>[6-7]</sup>,敲除 *IRS2* 基因的小鼠出生后即表现为胰高血糖症,随着时间的增长还会出现  $\beta$  细胞分泌障碍<sup>[8]</sup>,而同时敲除 *IRS1* 和 *IRS2* 基因的小鼠出生前就会死亡<sup>[9]</sup>。但是,小鼠模型还是具有很多局限性,小鼠在遗传水平与表型上不能很好地模拟人类疾病,而且小鼠寿命较短,不能作为长期患病的研究目标。作为糖尿病的动物模型,小鼠对于葡糖以及胆固醇食物的反应与人类也存在较大差异<sup>[10]</sup>。

猪和人在解剖学、生理学以及代谢特点方面均有很大的相似性,包括心脏血管的功能与结构,脂蛋白的分布,体型,发胖的趋势以及杂食的习惯等<sup>[11]</sup>,并且患有糖尿病的猪与人显示出共同的代谢特点与并发症,因此建立有价值并且稳定的 2 型糖尿病猪模型是非常必需的。用一定浓度链脲霉素(streptozotocin, STZ)可诱导猪患有糖尿病相应的病理特征,主要是通过使  $\beta$  细胞失活来达到胰岛素分泌缺陷的目的,造成血糖水

收稿日期:2014-01-02 修回日期:2014-02-18

\* 国家“863”计划(2012AA020601)、国家转基因生物新品种培育重大专项(2013ZX08009003-006)资助项目

\*\*通讯作者,电子邮箱:liu086@126.com

平的异常<sup>[12]</sup>,这种方法虽然简便但却不能很好地研究发病机制。Renner 等<sup>[13]</sup>利用慢病毒包装的方法制作出 GIPR<sup>tm</sup>转基因猪,通过抑制促胰岛素多肽(glucose-dependent insulintropic polypeptide, GIP)与受体的结合来抑制 $\beta$ 细胞的增生,从而导致胰岛素分泌异常来引发葡糖耐量异常。为了探索胰岛素信号通路缺陷会在猪上引起那些代谢异常,本实验围绕着猪 *IRS1* 和 *IRS2* 基因展开研究。

据此,本实验在猪肝细胞中同时敲低 *IRS1* 和 *IRS2*,并检测了糖代谢以及胆固醇代谢相关基因的表达,希望为 2 型糖尿病模型猪的建立奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验所用的巴马仔猪均来自东北农业大学实验基地猪场,实验所用的菌株质粒包括干扰载体 pGenesil 1.0、猪胎儿原代成纤维细胞、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  均来自东北农业大学胚胎工程实验室。

### 1.2 试剂

反转录试剂盒、LA Taq 酶、SYBR 荧光实时定量 PCR 试剂盒、T4 连接酶、PMD-18T 载体、3'RACE 试剂盒、质粒大提试剂盒均购自 TaKaRa 试剂公司;胶回收试剂盒购自 Axygen 公司;质粒小量试剂盒购自天根生物有限公司、DNA marker 购自 Transgene 公司;胎牛血清、DMEM 培养基、非必需氨基酸、谷氨酰胺、Lipofectamin LTX and plus 均购自 Gibico 公司;DNA 测序由上海立菲生物技术有限公司完成。

### 1.3 猪 *IRS1* 基因的克隆

根据已知得到的猪 *IRS1* 基因序列,设计 4 对引物(表 1),利用重叠 PCR 方法,克隆猪的 *IRS1* 全长基因。其中第 1,2,4 对引物为外显子区域,并且不跨内含子,直接以巴马猪的基因组为模板进行 PCR 扩增,第 3 对引物位于内含子区域,以巴马猪肝脏 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,总体积为 50  $\mu$ l。PCR 反应体系包括:LA Taq 1  $\mu$ l, 10  $\times$  LA Taq Buffer 5  $\mu$ l, dNTPs 4  $\mu$ l, 模板 1  $\mu$ l, Forward Primer 2  $\mu$ l, Reverse Primer 2  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O 35  $\mu$ l。PCR 反应参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳中观察结果,将目的条带胶回收,连接 PMD-18T 克隆载体进行测序。

测序分别得到 4 段无突变序列之后,各自从质粒

上 PCR 扩增下来,并进行胶回收,为了防止发生非特异性扩增,将胶回收片段进行末端补平,PCR 总反应体系 25  $\mu$ l,包括:Blunting Enzyme Mix 1  $\mu$ l, Quick Blunting Kit Buffer 2.5  $\mu$ l, dNTPs 2.5  $\mu$ l, 胶回收片段 10  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O 9  $\mu$ l。PCR 反应程序为:25 $^{\circ}$ C 1 h, 16 $^{\circ}$ C 30 min。得到了 4 段目的片段,分别为 *IRS1-1*, *IRS1-2*, *IRS1-3*, *IRS1-4*, 作为重叠 PCR 的模板。首先将 *IRS1-1* 与 *IRS1-2* 重叠,PCR 总反应体系 50  $\mu$ l,反应体系包括:*IRS1-1* 10  $\mu$ l, *IRS1-2* 10  $\mu$ l, 引物 4  $\mu$ l(*IRS1-F1* 2  $\mu$ l, *IRS1-R2* 2  $\mu$ l), LA Taq 1  $\mu$ l, 10  $\times$  LA Taq Buffer 5  $\mu$ l, dNTPs 4  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O 16  $\mu$ l;将 *IRS1-3* 与 *IRS1-4* 重叠,PCR 总反应体系 50  $\mu$ l,反应体系包括:*IRS1-3* 10  $\mu$ l, *IRS1-4* 10  $\mu$ l, 引物 4  $\mu$ l(*IRS1-F3* 2  $\mu$ l, *IRS1-R4* 2  $\mu$ l), LA Taq 1  $\mu$ l, 10  $\times$  LA Taq Buffer 5  $\mu$ l, dNTPs 4  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O 16  $\mu$ l。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 40 个循环;72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳中观察结果,将目的条带胶回收,连接 PMD-18T 克隆载体进行测序,得到无突变的 *IRS1-12* 与 *IRS1-34* 片段,从质粒扩增下来之后,进行末端补平,补平实验体系如上,最终以 *IRS1-12* 与 *IRS1-34* 为模板,重叠 PCR 得到猪 *IRS1* 基因全长。PCR 总反应体系为 50  $\mu$ l,包括:*IRS1-12* 10  $\mu$ l, *IRS1-34* 10  $\mu$ l, 引物 4  $\mu$ l(*IRS1-F1* 2  $\mu$ l, *IRS1-R4* 2  $\mu$ l), LA Taq 1  $\mu$ l, 10  $\times$  LA Taq Buffer 5  $\mu$ l, dNTPs 4  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O 16  $\mu$ l。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min 30 s, 40 个循环;72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。

### 1.4 检测 *IRS1* 和 *IRS2* 基因分别在猪各组织器官中的表达情况

Real-time PCR 方法检测巴马猪不同组织器官中 *IRS1* 和 *IRS2* 基因的表达。用 Trizol 试剂提取 2d 巴马猪的甲状腺、肺、肌肉、胎盘、肾上腺、胸腺、肝脏、气管、胰腺、垂体、大脑、海马体、舌、睾丸和十二指肠组织的 RNA,并反转录为 cDNA。Real-time PCR 检测各种组织中 *IRS1* 和 *IRS2* 基因的表达量。反应体系为 20  $\mu$ l: Forward Primer 0.4  $\mu$ l, Reverse Primer 0.4  $\mu$ l, SYBR Mix 10  $\mu$ l, cDNA 1  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O 7.8  $\mu$ l。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。

### 1.5 猪 *IRS2* 基因 3'UTR 区域的克隆

人的 *IRS2* 基因序列为已知的,将人 *IRS2* 基因与猪的基因组进行比对,根据保守区域序列设计引物,以 2d

表 1 引物序列及扩增片段长度  
Table1 The primer sequences and amplified fragment length

Primer name		Primer sequence(5'-3')	Length (bp)
<i>IRS1</i>	F1	ATGGCGAGCCCTCCCGA	2 113
<i>IRS1</i>	R1	CCCCTACCCCATTTGTCCATAAC	
<i>IRS1</i>	F2	CATCAGACGCCACCCCCAG	1 612
<i>IRS1</i>	R2	GTCTTGACCAAATCCAGGTCTATGTA	
<i>IRS1</i>	F3	CTCCGAGACCTTCTCCTCGACAC	593
<i>IRS1</i>	R3	GTGTAAAGTAAACAACTGAAATGGATGC	
<i>IRS1</i>	F4	AATGAAGACCTAAATGACCTCAGCAAA	1 106
<i>IRS1</i>	R4	AATGGTGCCAATGGAACAGGAA	
<i>IRS1</i> Real-time	Forward	GAATCTCAGTCCCAACCGCAAC	102
	Reverse	CTGGGTGTCGAGGAGAAGGTCTC	
<i>IRS2</i> Conserved sequence	Forward	ATTCATTGGAGATATGAGTTGGGC	181
	Reverse	CGTTTGCAATTGCGATTAAATAGATT	
3'RACE	Outer	TTCATTGGAGATATGAGTTGGGC	862
	inner	AAATGAGGCTTTTCTAGAGGAAGAC	
<i>IRS2</i> Real-time	Forward	ACAGACTAAATACAACGCACGACTC	142
	Reverse	GAAGTATATTTCTGGCTCTTGGGAC	
hU6 promoter	Forward	TACGTA CAAGGTCGGGCAGGAAGA	277
	Reverse	GCTAGC GATCCCGCGTCCTTC	
<i>Nr5a2</i> Real-time	Forward	CTCTGTCTGTGTGTGGAGATAAAG	157
	Reverse	GCTTTCTCTGTGTTTGTCAATCTG	
<i>PEPCK</i> Real-time	Forward	GGAGATGGCGACTTCGTCAAG	194
	Reverse	CGAAGGGCAAAGCACTTCTTG	
<i>F-1,6-BP</i> Real-time	Forward	CTCTCCAATGACCTGGTTATTAACG	197
	Reverse	TTTCTGTAGATGCCAAAGATGGTTC	
<i>Gck</i> Real-time	Forward	GGCTGGAGACCCACGAAGAG	181
	Reverse	TGGTGCTTGGTCTTCACACTCC	
<i>SREBP-1</i> Real-time	Forward	TGACCGACATCGAAGACATGC	126
	Reverse	GGGAGCTGGCATCAGGACTG	
<i>LXRA</i> Real-time	Forward	ATCCGCCTGAAGAACTGAAGC	177
	Reverse	CTGGTCTGAAAAGGAGCGTCTG	
<i>Abcg8</i> Real-time	Forward	AGGTCTCACCTACCAGGTGGACATG	144
	Reverse	TTGTCCGCTCCTCACTCTGAAGC	
<i>CYP7a1</i> Real-time	Forward	CCGCTTCTGATACCTGTGACTTAG	148
	Reverse	CGTCACAACAGAGGCTCCAGC	

巴马猪肝脏组织 cDNA 为模板,克隆得到猪 *IRS2* 基因的保守序列,PCR 反应体系 20 μl;cDNA 0.5 μl,引物 2 μl,*rTaq* 0.5 μl,10 × PCR Buffer 2.5 μl,dNTPs 2 μl,dH<sub>2</sub>O 17.5 μl。PCR 反应程序为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,59.3℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物在 1%的琼脂糖凝胶电泳中观察结果,将目的条带胶回收,连接 PMD-18T 克隆载体进行测序。得到无突变序列进行 3'RACE 扩增,标准操作按照 TaKaRa 公司试剂盒说明书进行。

1.6 p-Genesil-sh*IRS1*/sh*IRS2* 干扰载体的构建

根据克隆获得猪 *IRS1* 以及 *IRS2* 序列,通过 Ambion 网站分别设计 4 对干扰片段(表 2),分别合成带有 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点的单链 shRNA 干扰片段,复性成双链后,连接到经过 *Bam*H I 和 *Hind* III 线性化的 p-Genesil 1.0 载体。经过测序正确之后,构建成功的载体为 p-Genesil-sh*IRS1*-1-4 和 p-Genesil-sh*IRS2*-1-4。

sh*IRS1*-1 和 sh*IRS2*-1 分别为筛选出的有效干扰片

段,重新合成带有 *Nhe* I 和 *Xho* I 酶切位点的单链 *shIRS2* 干扰片段,复性成双链后,连接到筛选出有效的经过 *Nhe* I 和 *Xho* I 线性化的 p-Genesil-*shIRS1* 载体。之后 PCR 扩增 hU6 启动子,带有 *Sna*B I 与 *Nhe* I 酶切

位点,连入有两个基因干扰片段的线性化载体,经过测序鉴定以后,序列正确的载体即为 p-Genesil-*shIRS1/shIRS2* 干扰载体。

表 2 猪 *IRS1* 以及 *IRS2* 基因的干扰片段序列

Table 2 The shRNA sequences of porcine *IRS1* and *IRS2* gene

shRNA	shRNA sequences(5'-3')
sh <i>IRS1</i> -1	GCAGTAGTGGCAAGCTCTTGTGCTGTGCTGCCACAAGAGCTTGCCACTACTGC
sh <i>IRS1</i> -2	GCAGAAGATTCTGCTCATCCGTGCTGTCCGGATGACGACGAATCTTCTGC
sh <i>IRS1</i> -3	GCCTATGCCAGCATCAGTTTCGTGCTGTCCGAAACTGATGCTGGCATAGGC
sh <i>IRS1</i> -4	GGTACCCAGACTCTATTTCAGTGTGCTGTCTGAAATAGACTCTGGGTACCC
sh <i>IRS2</i> -1	GGTTCTGGAGATGGAGATGCCGTGCTGTCCGCATCTCCATCTCCAGAAACC
sh <i>IRS2</i> -2	GGAGATGCCAAGTATATTTCTGTGCTGTCCAGAAATATACTTCGCATCTCC
sh <i>IRS2</i> -3	CGGAGAGTCGTGCGTTGTATTGTGCTGTCCAATACAACGCACGACTCTCGC
sh <i>IRS2</i> -4	GCTCTTCTTAATAGCCATATGTGCTGTCCCATATGGCTATTAAGAAGAGC

Note: the sense sequence and antisense are both 21 bp and the loop is 11 bp

### 1.7 猪肝脏原代细胞的培养

猪肝脏原代细胞的培养主要参照 Farrell 等<sup>[14]</sup>的方法。具体为:取 1 d 巴马猪肝脏组织约 0.5 cm<sup>3</sup> 放置含有双抗的生理盐水中,对组织进行清洗,剥离肝脏表面系膜,剔除血液等杂物,清洗至肝脏组织呈鲜红色,洗液无明显杂物。将组织移置培养皿之后,用手术剪将其剪碎。添加 5 ml 胶原酶放入 37℃ 培养箱内进行消化 15 min。加入培养液进行终止。将组织吹散,将此混合物添加到离心管中进行离心,1 200 r/min,3 min。离心后弃上清,加入 3ml 培养液重悬。接种到 3 个大皿中并移置到 37℃ 培养箱中培养。隔天观察细胞有组织块贴壁,换成新鲜的培养液。4~5 天后在组织块周围有细胞长出待密度达到 60% 以上进行传代标记为 P1 代,将 P1 代培养至密度达到 100% 时,进行冻存。

### 1.8 Real-time PCR 检测糖代谢与脂类相关基因的表达

根据 NCBI 网站上提供的基因序列,设计猪 *PEPCK*, *G6Pase*, *F-1,6-BP*, *Gck*, *SREBP*, *LXRA*, *Abcg8* 和 *CYP7a1* 基因的 Real-time PCR 引物,每个基因设计 2 对引物,经过 RT-PCR 方法验证特异性后,通过 Real-time PCR 检测猪肝脏细胞在分别转染 p-Genesil-*shIRS1*、p-Genesil-*shIRS2* 以及 p-Genesil-*shIRS1/shIRS2* 干扰载体之后,上述基因表达量的变化情况。Real-time PCR 反应体系为 20 μl; Forward Primer 0.4 μl, Reverse Primer 0.4 μl, SYBR Mix 10 μl, cDNA 1 μl, dH<sub>2</sub>O 7.8 μl。反应程序为:95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40 个循环; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。Real-time PCR 反应

仪器的型号为 ABI 7500。

## 2 结果与分析

### 2.1 猪 *IRS1* 基因的克隆及有效干扰片段的筛选

PCR 分 4 段扩增猪 *IRS1* 基因,通过重叠 PCR 的方法得到 *IRS1* 的全长基因。经过测序分析,克隆的 *IRS1* 基因与已知序列的氨基酸序列相似性为 100% (Gene ID:100512686)。猪 *IRS1* 基因 mRNA 全长为 4 814 bp,由两个外显子组成,第一外显子为 3 747 bp,第二外显子为 1 068 bp, CDS 区序列为 3 726 bp, 3'-UTR 序列为 215 bp(图 1)。

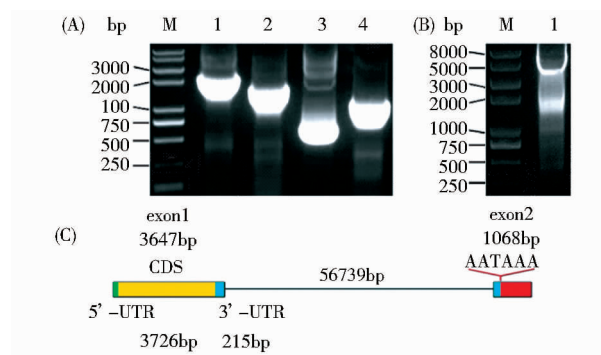


图 1 猪 *IRS1* 基因的克隆

Fig. 1 The cloning of porcine *IRS1* gene

(A) The four fragments of *IRS1* gene amplified by PCR (B) The full length of the *IRS1* gene cloning by overlapping PCR M: DNA marker; 1: 2 113 bp; 2: 1 612 bp; 3: 593 bp; 4: 1 106 bp (C) The structure of porcine *IRS1* gene

Real-time PCR 检测 *IRS1* 基因在猪各组织中的表达情况,结果表明,猪肝脏组织中 *IRS1* 的表达量显著高于其它组织( $P < 0.01$ ) (图 2A)。接下来,我们在猪肝脏细胞中筛选 *IRS1* 基因的干扰片段。我们采用了 Farrell 等<sup>[14]</sup>的方法培养猪肝脏细胞,其中肝实质细胞为主要组成部分,有研究报道表明, *Nr5a2* 基因在肝实质细胞中高量表达,可作为鉴定肝实质细胞的标志<sup>[15]</sup>。经 Real-time PCR 检测,在我们获得的猪肝脏细胞中 *Nr5a2* 基因也高量表达,表明我们培养的猪肝脏细胞中大部分为肝实质细胞 (图 2B)。将 p-Genesil-sh*IRS1*-1-4 转染猪肝脏细胞,对照组不转染干扰载体, Real-time PCR 检测干扰效率。实验结果表明, sh*IRS1*-1 显著敲低了 *IRS1* 基因的表达,干扰效率达到 61% (图 2C)。

2.2 猪 *IRS2* 基因 3'UTR 序列的克隆以及有效干扰片段的筛选

我们调取猪 *IRS2* 基因的 3'UTR 序列,从而设计 shRNA 干扰片段,进行 *IRS2* 基因的敲低。我们获得的片段为 950 bp,具有 PolyA 结构,位于猪 11 号染色体,不编码氨基酸,与人 *IRS2* 基因 3'UTR 序列的相似性达到了 73.08% (图 3A)。Real-time PCR 检测 *IRS2* 基因在猪各组织中的表达情况,结果表明,猪肝脏组织中 *IRS2* 的表达量同样显著高于其它组织 (图 3B)。将 p-Genesil-sh*IRS2*-1-4 转染猪肝脏细胞, Real-time PCR 检测干扰效率。实验结果表明, sh*IRS2*-1 显著敲低了 *IRS2*

基因的表达,干扰效率达到 60% (图 3C)。

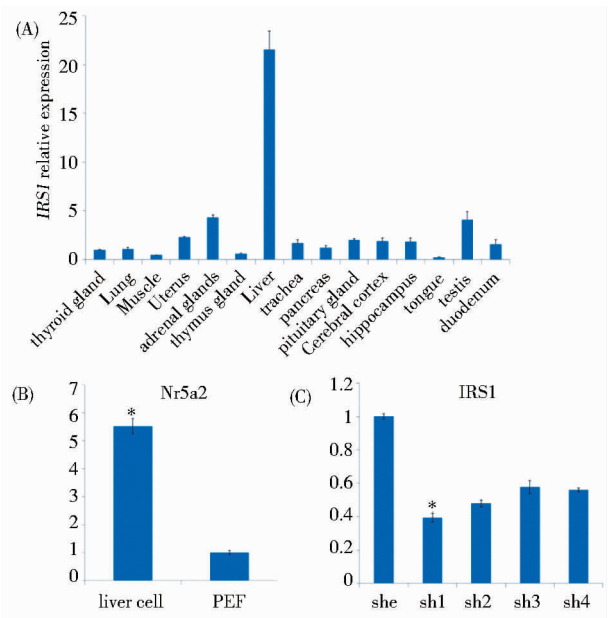


图 2 猪 *IRS1* 基因有效干扰片段的筛选

Fig.2 Screening the effective interference shRNA fragment with the knockdown of *IRS1*

(A) *IRS1* gene expression in tissues of pig (B) *Nr5a2* gene expression in liver cells and porcine embryonic fibroblasts (PEF) (\*  $P < 0.05$  vs PEF) (C) Screen of effective interference fragment by Real-time PCR (\*  $P < 0.05$  vs shcontrol)

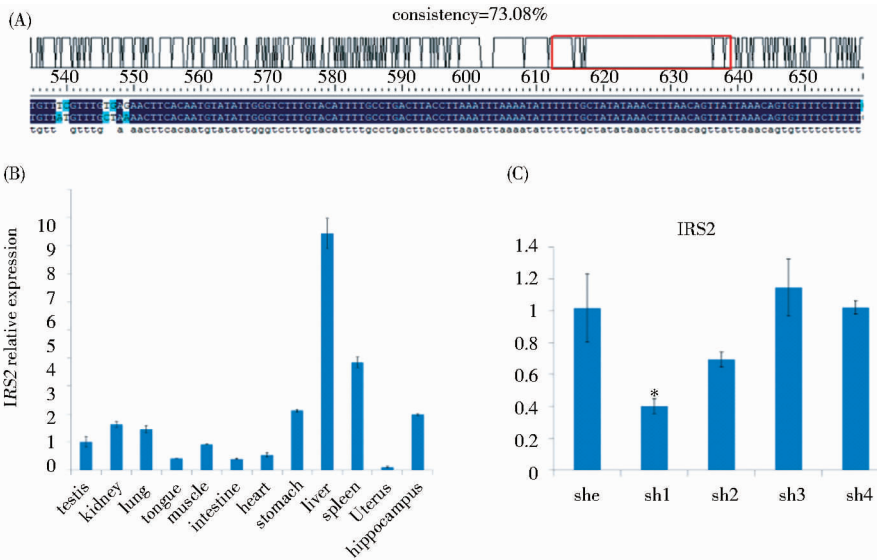


图 3 猪 *IRS2* 基因 3'UTR 克隆以及有效干扰片段的筛选

Fig.3 The 3'UTR cloning of porcine *IRS2* gene and screening the effective interference shRNA fragment

(A) Multiple sequences alignment result of *IRS2* gene between human and pig (B) *IRS2* gene expression in tissues of pig (C) Screen of effective interference fragment by Real-time PCR (\*  $P < 0.05$  vs shcontrol)

### 2.3 猪肝脏细胞中同时敲低 *IRS1* 和 *IRS2* 基因对糖代谢的影响

将 p-Genesil-sh*IRS1*/sh*IRS2* 转染猪肝脏细胞, Real-

time PCR 验证 *IRS1* 基因的表达下降了 78%, *IRS2* 基因的表达下降了 64% (图 4)。进一步, 我们采用 Real-time PCR 检测了糖代谢相关基因的表达变化。

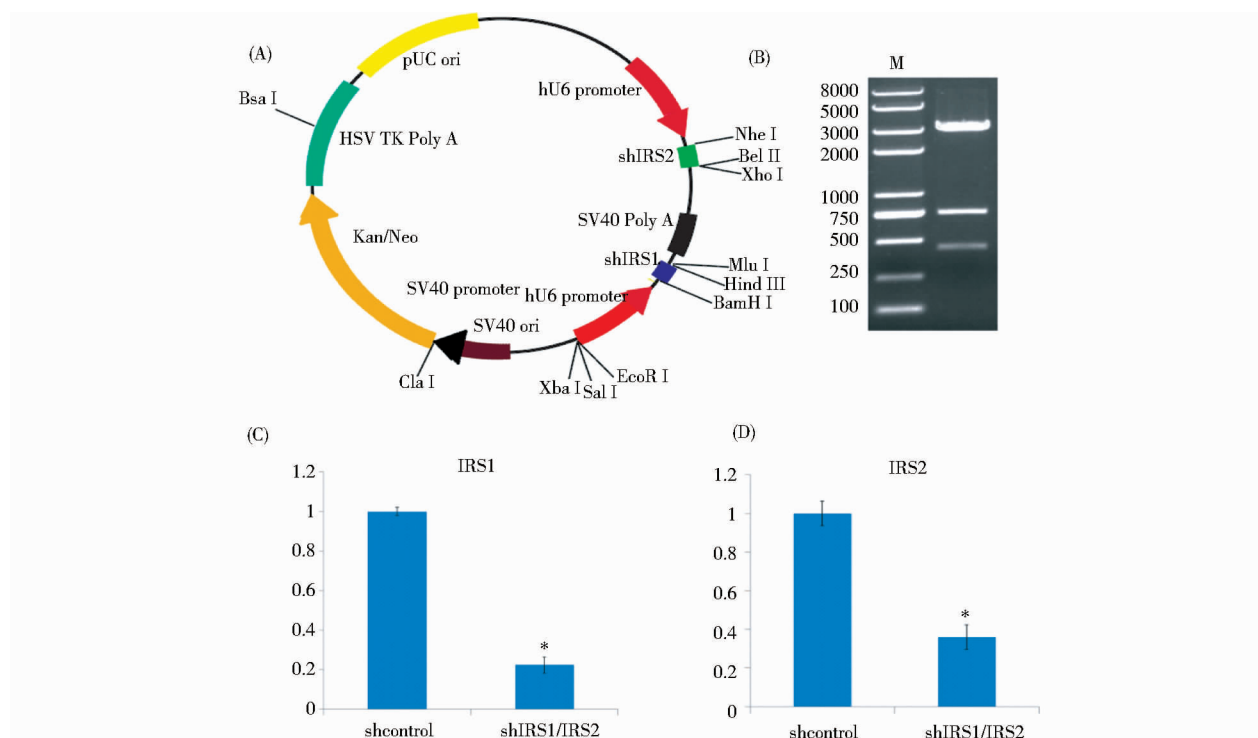


图 4 p-Genesil-sh*IRS1*/sh*IRS2* 载体干扰 *IRS1* 和 *IRS2* 基因的表达

Fig. 4 The knockdown of *IRS1* and *IRS2* by p-Genesil-sh*IRS1*/sh*IRS2*

(A) Structure of p-Genesil-sh*IRS1*/sh*IRS2* vector (B) Identification of plasmid p-Genesil-sh*IRS1*/sh*IRS2* by Ase I digestion (C) (D) Real-time PCR detected the knockdown of *IRS1* and *IRS2* by p-Genesil-sh*IRS1*/sh*IRS2* (\*  $P < 0.05$  vs shcontrol)

磷酸烯醇丙酮酸激酶 (PEPCK), 果糖-1,6-二磷酸酶 (F-1,6-BP) 是糖异生作用的两种关键酶, 不适当地激活这些酶表达会使糖异生作用增强, 从而增加了血浆中葡萄糖含量。在同时干扰 *IRS1* 和 *IRS2* 基因时, 猪肝脏细胞中 PEPCK 与 F-1,6-BP 基因的表达分别为对照组的 2.46 倍与 2.96 倍。而单独干扰时, 这两种基因的表达没有显著变化 (图 5A、图 5B)。

葡萄糖激酶 (*Gck*) 是催化肝脏中糖酵解的第一步反应的关键酶, 多存在于动物肝脏中。若基因表达被抑制, 会影响糖酵解作用降低, 血浆中葡萄糖含量会升高。本实验在猪肝脏细胞中单独敲低 *IRS1* 基因时, *Gck* 表达下降了 79%, 单独干扰 *IRS2* 基因之后, 该基因表达无明显差异, 同时敲低 *IRS1* 和 *IRS2* 时, *Gck* 基因表达下降了 36% (图 5C)。

通过这些结果我们可以推测, 当 *IRS1* 和 *IRS2* 基因的表达同时受到抑制时, 可能会增加细胞中的糖异生

作用以及会抑制葡萄糖激酶的表达, 从而导致血糖水平的上升。

### 2.4 猪肝脏细胞中敲低 *IRS1* 和 *IRS2* 基因对胆固醇代谢的影响

不恰当地激活糖异生作用, 往往会导致肝脏脂类代谢的异常, 在同时敲低 *IRS1* 和 *IRS2* 基因的猪肝脏细胞中我们检测了胆固醇代谢关键基因的表达。胆固醇调节元件结合蛋白 (*SREBP-1*) 为胆固醇敏感器, 可调节胆固醇代谢以及血浆中胆固醇水平。 *SREBP-1* 基因表达升高, 可直接反映胆固醇水平升高。单独在猪肝脏细胞中敲低 *IRS1* 或 *IRS2* 时, 该基因表达无明显变化, 同时敲低这两个基因时, *SREBP-1* 基因表达显著上升, 为对照组 3.0 倍 (图 6A)。胰岛素还可以通过激活肝脏 X 受体 (liver X receptor A, *LXRA*) 来调节脂类代谢。本实验证明, 只有当单独敲低 *IRS2* 基因时, *LXRA* 基因的表达会显著上升, 为对照组的 1.6 倍 (图 6B)。



我们进一步验证了 *LXRA* 下游与之相结合的一系列调节胆固醇代谢的基因,包括 *Abcg8* 以及 *CYP7a1*。实验结果表明,在单独敲低 *IRS2* 基因以及同时敲低 *IRS1* 和 *IRS2* 基因时,*Abcg8* 基因的表达均显著上升,为对照组的

的 4.6 和 4.8 倍,*CYP7a1* 基因的表达也显著上升,为对照组的 6.0 和 8.3 倍(图 6C)。以上结果表明,敲低 *IRS1* 和 *IRS2* 基因,会引起猪肝脏细胞胆固醇代谢的异常。

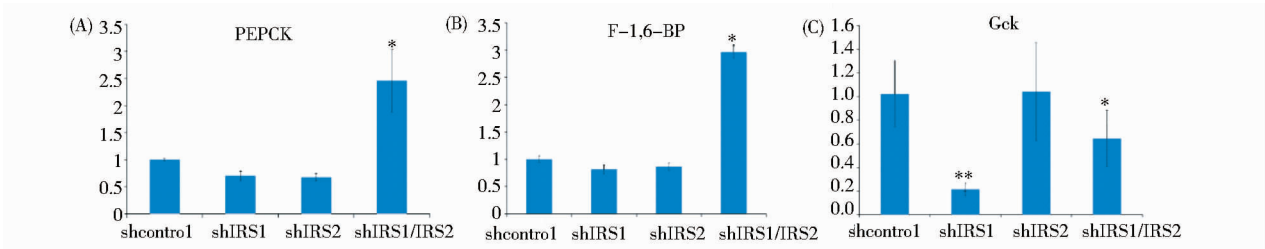


图 5 干扰 *IRS1* 和 *IRS2* 对糖代谢相关基因表达的影响

Fig. 5 The effect of *IRS1* and *IRS2* knockdown on glucose metabolism genes

( \*  $P < 0.05$  vs shcontrol; \*\*  $P < 0.01$  vs shcontrol)

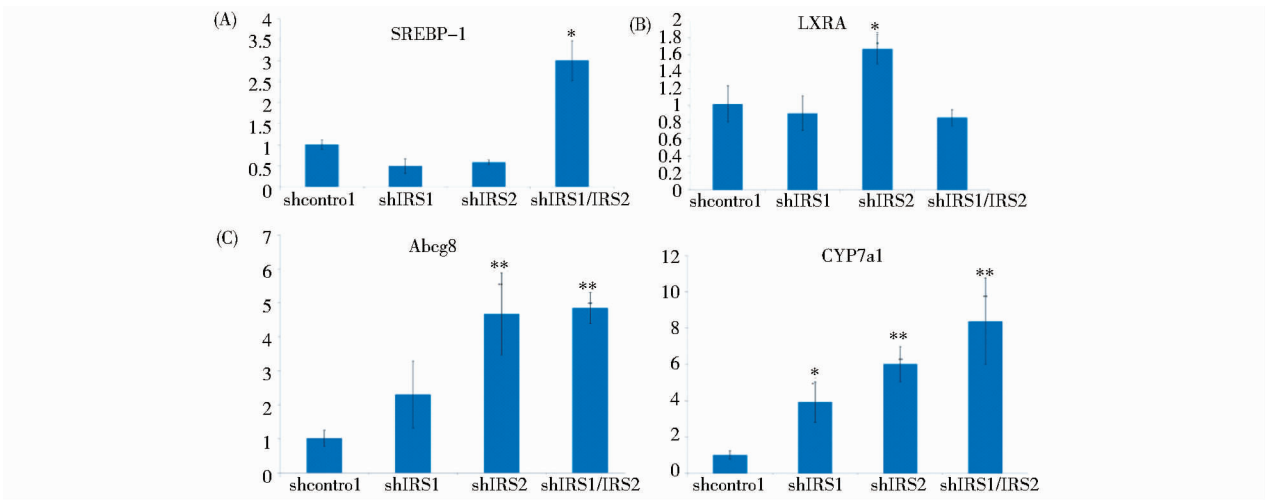


图 6 干扰 *IRS1* 和 *IRS2* 对胆固醇相关基因表达的影响

Fig. 6 The effect of *IRS1* and *IRS2* knockdown on cholesterol metabolism genes

( \*  $P < 0.05$  vs shcontrol; \*\*  $P < 0.01$  vs shcontrol)

3 讨论

克隆获得了猪 *IRS1* 基因 mRNA 全长,并调取了猪 *IRS2* 基因的部分 3'UTR 序列,通过对 2 d 巴马猪各组织中 *IRS1* 和 *IRS2* 基因表达情况分析,猪 *IRS1* 和 *IRS2* 基因在肝脏组织中的表达均显著高于其它组织。根据克隆获得的猪 *IRS1* 和 *IRS2* 基因序列分别设计干扰片段,分别转染猪肝脏细胞筛选获得了高效干扰片段。并构建了同时敲低猪 *IRS1* 和 *IRS2* 基因的干扰载体,检测了猪肝脏细胞中同时敲低 *IRS1* 和 *IRS2* 基因对于糖脂代谢的影响,从而为后续获得 2 型糖尿病模型猪奠定了基础。

之前有人通过将小鼠的 *IRS1* 基因 mRNA 序列与猪基因组进行比对,得到保守片段,然后通过基因步移的方法得到猪 *IRS1* 基因的编码区序列,并将基因定位于猪 15 号染色体的 q25。*IRS1* 基因在不同种属间的氨基酸序列甚至编码区的核苷酸序列都有很高的同源性。*IRS1* 蛋白的 NH<sub>2</sub> 端有磷酸化结构域,位于第 7 到第 115 位氨基酸之间,此功能结构域是 *IRS1* 蛋白中最为保守的部分,在人、小鼠、猪之间均有高度同源性<sup>[16]</sup>。本实验根据此已知序列,通过重叠 PCR 法克隆了猪 *IRS1* 基因的 mRNA 全长序列。但是,对于猪 *IRS2* 基因的研究很少,本实验通过将人 *IRS2* 基因与猪基因组序列进行比对,得到保守片段后进行 3'RACE 扩增,获得

了猪 *IRS2* 基因的部分 3'UTR 序列,由于 shRNA 主要结合到基因的 3'UTR 区域,达到降解目的 mRNA 的作用,从而使基因的表达受到抑制,所以调取全长序列对于后续实验没有很大意义,我们只调取了猪 *IRS2* 基因的部分 3'UTR 序列。接下来,我们验证了 *IRS1* 和 *IRS2* 基因在猪各组织中的表达,得知 *IRS1* 和 *IRS2* 基因在猪肝脏中的表达均显著高于其它组织。这个结果与相应的研究报道是吻合的,即 *IRS1* 和 *IRS2* 基因在普通动物个体的肝脏组织中是高表达的,而患有糖尿病的动物和人的肝脏组织中两基因的表达会有不同程度的降低<sup>[17]</sup>。我们根据克隆获得的猪 *IRS1* 和 *IRS2* 基因序列,分别设计 shRNA 干扰片段,通过转染猪肝脏细胞分别筛选出有效干扰片段。肝脏是调节营养物质代谢的中心器官,可以将餐后的葡糖转化为肝糖元储存起来,也能将多余的葡糖转换为脂肪酸,而在饥饿时又可以通过氧化脂肪酸来为糖异生提供能量<sup>[18]</sup>。肝脏胰岛素信号通路是调节糖类与脂肪代谢的重要通路,通过传递胰岛素信号来激活下游 MAPK/Akt/Foxo1 等通路,从而达到激活葡糖转运以及脂肪酸氧化的作用<sup>[19-20]</sup>。本实验将 *IRS1* 和 *IRS2* 基因的表达同时敲低,导致胰岛素信号传递受到阻碍,引起糖类与脂类代谢的异常。我们的研究发现基础状态下在猪肝脏细胞中同时敲低 *IRS1* 和 *IRS2* 基因可导致糖异生关键作用酶 *PEPCK* 与 *F-1,6-BP* 被显著激活,然而 *Gck* 的表达却得到了显著的抑制,可推测出当同时敲低两基因以后,可能会不恰当地激活糖异生作用,而糖酵解反应也会受到抑制,所以会导致血糖水平的升高。与此同时,我们也发现 *SREBP-1* 基因的表达显著升高,以及其他调节胆固醇代谢基因表达的升高,证明了在糖代谢异常的同时也会引起脂类代谢的异常,也更加证明了 *IRS1* 和 *IRS2* 基因对于维持肝脏正常的生理代谢都是必需的。

综上所述,本实验克隆了猪 *IRS1* 基因的全序列和 *IRS2* 基因的部分 3'UTR,通过 shRNA 干扰技术显著敲低了这两个基因,并检测了在同时敲低 *IRS1* 和 *IRS2* 基因的猪肝脏细胞中糖脂代谢基因的表达,证明其可能通过激活糖异生作用并使糖酵解反应受到抑制来导致糖代谢的异常,同时胆固醇水平的升高也可初步证明脂类代谢的异常,从而为后续将干扰载体转染猪成纤维细胞,通过体细胞核移植获得 2 型糖尿病转基因模型猪奠定了基础。

### 参考文献

[ 1 ] Zimmet P, Alberti K G, Shaw J, Global and societal implications

of the diabetes epidemic. *Nature*, 2001, 414(6865):782-787.

- [ 2 ] Kadowaki T, Miyake Y, Hagura R. Risk factors for worsening to diabetes in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetologia*, 1984, 26(1):44-49.
- [ 3 ] Moller D E. Transgenic approaches to the pathogenesis of NIDDM. *Diabetes*, 1994, 43(12):1394-1401.
- [ 4 ] White M F, Kahn C R. The insulin signaling system. *J Biol Chem*, 1994, 269(1):1-4.
- [ 5 ] Kido Y, et al. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, *IRS-1*, and *IRS-2*. *J Clin Invest*, 2000, 105(2):199-205.
- [ 6 ] Araki E, et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the *IRS-1* gene. *Nature*, 1994, 372(6502):186-190.
- [ 7 ] Tamemoto H, et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*, 1994, 372(6502):182-186.
- [ 8 ] Withers D J, et al. Disruption of *IRS-2* causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 1998, 391(6670):900-904.
- [ 9 ] Withers D J, et al. *Irs-2* coordinates *Igf-1* receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet*, 1999, 23(1):32-40.
- [ 10 ] Hastay A H, et al. Severe hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and atherosclerosis in mice lacking both leptin and the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*, 2001, 276(40):37402-37408.
- [ 11 ] Schook L, et al. Swine in biomedical research: creating the building blocks of animal models. *Anim Biotechnol*, 2005, 16(2):183-190.
- [ 12 ] von Wilmsky C, et al. Establishment of a streptozotocin induced diabetic domestic pig model and a systematic evaluation of pathological changes in the hard and soft tissue over a 12-month period. *Clin Oral Implants Res*, 2010, 21(7):709-717.
- [ 13 ] Renner S, et al. Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes*, 2010, 59(5):1228-1238.
- [ 14 ] Farrell G C, et al. Research workshop: techniques for primary culture of liver cells. *J Gastroenterol Hepatol*, 1998, 13:842.
- [ 15 ] Zhang C K, Lin W, Cai Y N. Characterization of the genomic structure and tissue-specific promoter of the human nuclear receptor *NR5A2 (hB1F)* gene. *Gene*, 2001, 273(2):239-249.
- [ 16 ] Niu P X, Huang Z, Li C C. Cloning, chromosomal localization, SNP detection and association analysis of the porcine *IRS-1* gene. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(8):2087-2092.
- [ 17 ] Kerouz N J, Horsch D, Pons S. Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (*IRS-1* and *IRS-2*) and



- phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (*ob/ob*) mouse. J Clin Invest, 1997, 100(12): 3164-3172.
- [18] Gribble F M. Metabolism: a higher power for insulin. Nature, 2005, 434(7036):965-966.
- [19] Taniguchi C M, Ueki K, Kahn R. Complementary roles of *IRS-1* and *IRS-2* in the hepatic regulation of metabolism. J Clin Invest, 2005, 115(3):718-727.
- [20] Fisher S J, Kahn C R. Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production. J Clin Invest, 2003, 111(4):463-468.

## The Effect of Insulin Receptor Substrates 1 and 2 Knockdown on Porcine Hepatic Glucolipid Metabolism

HUANG Tian-qing<sup>1</sup> KONG Qing-ran<sup>1</sup> LI Yan<sup>1</sup> YU Miao<sup>2</sup> LIU Zhong-hua<sup>1</sup>

(1 Laboratory of Embryo Engineering, Department of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

(2 Harbin Power Vocational Technology College, Harbin 150030, China)

**Abstract** Objective: Through efficient shRNA interference to knockdown simultaneously *IRS1* and *IRS2* in porcine liver cells, and verify its effects on genes expression related to glucolipid metabolism, which may lay a solid foundation for producing the type2 diabetes mellitus model pigs. Method: First of all, cloning porcine *IRS1* gene and the partial 3-untranslated region sequence of *IRS2* gene by Overlap PCR and 3'RACE respectively. Then screening the most effective interference shRNA fragments of *IRS1* and *IRS2* by Real-time PCR. Finally, the glucolipid metabolism related genes experssion were detected in the porcine liver cells of both knocking down *IRS1* and *IRS2*. Result: The knockdown of both *IRS1* and *IRS2* resulted in significant upregulation of gluconeogenic enzymes *PEPCK* and *F-1,6-BP*, as well as a decrease in *Gck* expression, at the same time, also led to the upregulation of lipogenic enzymes *SREBP-1*, *Abcg8* and *CYP7a1*. Conclusion: The knockdown of both *IRS1* and *IRS2* may lead to an increasing level of blood glucose and also can cause a disorder of cholesterol metabolism. Therefore, *IRS1* and *IRS2* have important roles in the regulation of hepatic glucolipid metabolism.

**Key words** *IRS1* *IRS2* RNA interference Glucolipid metabolism Pig