

自发性糖尿病长爪沙鼠 *Rxra* 在 6 种组织中的表达水平分析

龚菁菁, 王存龙, 李银银, 李小红, 杜小燕, 陈振文

(首都医科大学基础医学院, 北京 100069)

【摘要】 目的 分析糖尿病长爪沙鼠 *Rxra* 基因在 6 种组织中的表达水平, 以期探索长爪沙鼠糖尿病发生的分子机制。**方法** 选取糖尿病长爪沙鼠和正常沙鼠各 6 只, 分别采集动物的骨骼肌、肝脏、脂肪、肾脏、心脏和脑组织, 用 Real-time PCR 和 Western blotting 检测 *Rxra* 基因在各组织中 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** Real-time PCR 的结果表明, *Rxra* 基因的 mRNA 水平在糖尿病组动物骨骼肌和脂肪中显著降低, 在肝脏中无差异, 而在肾脏、心脏和脑组织中则有高表达趋势。Western blotting 结果显示, 糖尿病组 RXRA 的蛋白水平在骨骼肌组织中显著降低, 在脂肪组织几乎检测不到, 在其他各组织表达情况有所不同, 但没有统计学差异。**结论** *Rxra* 在糖尿病长爪沙鼠骨骼肌和脂肪组织中低表达, 在其他 4 种组织中表达水平无差异, 说明 *Rxra* 对长爪沙鼠糖尿病的影响主要发生在骨骼肌和脂肪组织中。

【关键词】 长爪沙鼠; 2 型糖尿病; *Rxra*; 实时定量荧光 PCR; Western blot;

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 02-0059-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 02. 011

Analysis of *Rxra* expression in 6 tissues from spontaneous diabetic Mongolian gerbils

GONG Jing-jing, WANG Cun-long, LI Yin-yin, LI Xiao-hong,

DU Xiao-yan, CHEN Zhen-wen

(School of Basic Medical Sciences, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China)

【Abstract】 Objective To analyze the *Rxra* expression level in 6 tissues of diabetic gerbils and explore the molecular mechanism of diabetes in Mongolian gerbils. **Methods** We collected 6 tissues including skeletal muscle, liver, adipose tissue, kidney, heart and brain from 6 diabetic gerbils and 6 control animals, respectively. *Rxra* mRNA and protein expression level in the 6 tissues were separately detected using real-time PCR and western blotting. **Results** The real-time PCR showed that compared with control animal, mRNA expression of *Rxra* in skeletal muscle and adipose tissue was significantly decreased in the diabetic group. However, there were no significant differences in the liver between the two groups. The relative expression level in diabetic group exhibited uptrend compared with the control in kidney, heart and brain. According to the results of western blotting, RXRA protein in skeletal muscle was significantly decreased in the diabetes group. RXRA protein was almost undetectable in adipose tissue. Varying expression was observed in other tissues,

【基金项目】 国家科技支撑计划 (编号: 2015BAI09B01); 国家自然科学基金 (编号: 31272393 和 31572348); 北京市自然科学基金 (编号: 7141002)。

【作者简介】 龚菁菁 (1991 -), 女, 硕士研究生, 专业: 遗传学。Email: gongjjing@126.com。

【通讯作者】 陈振文 (1959 -), 男, 博士, 教授。主要从事实验动物教学和研究。Email: czwteam@163.com。

but there was no significant difference. **Conclusions** Lower expression of *Rxra* is observed in the skeletal muscle and adipose tissue of diabetic gerbils. There is no significant difference in other four tissues between the two groups. The results illustrate that the effect of *Rxra* mainly occurs in skeletal muscle and adipose tissue in this diabetic model.

【Key words】 Mongolian gerbils; Type 2 diabetes; *Rxra*; Real-time PCR; Western blotting

根据国际糖尿病联盟 (IDF) 统计,2015 年全球糖尿病患者为 4.15 亿,预计到 2040 年糖尿病人数将达到 6.42 亿^[1]。目前,中国糖尿病患者人群已达到 1.096 亿,并且发病率呈现上升趋势,其中 2 型糖尿病 (T2DM) 患者占 90% 以上^[2],2 型糖尿病是由遗传因素和环境因素共同作用导致的复杂遗传病,以葡萄糖耐量降低、胰岛素抵抗为主要特征^[3]。本课题组前期利用自行培育的近交系长爪沙鼠糖尿病模型为实验材料,通过抑制消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 的方法从同窝的高血糖和正常血糖长爪沙鼠骨骼肌中发现维甲酸类受体 α (retinoid X receptor α , *Rxra*) 差异表达。但其在糖尿病动物不同组织中的表达水平如何还不得而知。为了探明 *Rxra* 发挥效应的组织器官,本文研究了 *Rxra* 在糖尿病沙鼠和正常沙鼠的骨骼肌、肝脏、肾脏、脂肪、心脏和脑组织中 mRNA 和蛋白水平的表达情况,以期寻找自发性糖尿病长爪沙鼠致病机制中该基因作用的靶器官,为研究 2 型糖尿病长爪沙鼠新模型的发生机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取近交系糖尿病模型长爪沙鼠和正常对照组沙鼠各 6 只,12~15 周龄,雌雄各半。所有长爪沙鼠均来自首都医科大学实验动物部,饲养于控制温湿度的普通环境中【SYXK(京)2013-0005】。

1.2 样品采集

动物过量麻醉安乐死后,解剖采集新鲜组织后立即置于液氮中。样品包括患糖尿病和正常长爪沙鼠的骨骼肌、肝脏、腹部脂肪、肾脏、心脏、脑组织。

1.3 RNA 提取及 cDNA 的制备

从液氮中取出冻存的长爪沙鼠 6 种组织约 30

mg,分别加入 TRIzol 试剂 (Invitrogen, USA),剪碎后用均质器将组织彻底打碎,于室温放置 1 min,然后加入 1/5 体积的三氯甲烷,震荡混匀后,4℃ 放置 15 min,4℃ 14 000 r/min 离心 15 min,将上层水相转移至另一离心管,加入等倍体积异丙醇,振摇混匀后 4℃ 静置 10 min,4℃ 14000 r/min 离心 15 min,弃上清。加入 70% 乙醇,颠倒离心管洗涤沉淀,4℃ 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。重复以上步骤 1 次。室温自然干燥,加入适量的 RNA-free 水溶解得到总 RNA。脂肪组织的总 RNA 提取用脂肪 RNA 提取试剂盒 (Qiagen, USA)。采用 Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, USA) 分析 RNA 浓度和纯度。cDNA 的制备按照快速反转录试剂盒 (天根生化科技有限公司,北京) 对上述总 RNA 样品进行逆转录,得到相应的 cDNA。

1.4 Real-time PCR

按照 SSH 得到的基因片段序列设计引物,利用 Primer Premier 5.0 设计 PCR 扩增引物多对。除肌肉选取 *Gapdh* 基因作为内参外,其他组织选取 β -actin 基因作为内参基因并设计引物。引物序列如表 1 所示,均由北京天一辉远生物科技有限公司合成。

采用 real-time PCR 法在 Bio-Rad CFX96 Manager System 上对 *Rxra* 和内参基因的 mRNA 水平进行检测。所用试剂为实时定量 PCR 试剂盒 (天根),反应体系为 20 μ L 体系。反应条件如下:Q-PCR Master Mix 10 μ L,上游引物 0.6 μ L,下游引物 0.6 μ L,模板 DNA 1 μ L,ddH₂O 7.8 μ L。反应程序均为:95℃ 预变性 15 min,之后 95℃ 10 s,58℃ 35 s,共扩增 40 个循环,每个循环结束时检测荧光;熔解曲线分析从 60℃ 到 95℃,每 0.5℃ 检测 1 次。

表 1 *Rxra* 和内参基因 Real-time PCR 引物序列
Tab. 1 Primer sequence of *Rxra* and internal control genes for Q-PCR

基因名称 Gene symbol	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
<i>Gapdh</i>	5' GCCATCAATGACCCC 3'	5' TCCCGTTCTCAGCCT 3'
β -actin	5' AGAGGGAAATCGTGCGTGAC 3'	5' CAATAGTGATGACCTGGCCGT 3'
<i>Rxra</i>	5' ATGGCGTCCTCAAGGTTC 3'	5' TCGGCAGGTGTAGGTCAG 3'

1.5 Western blotting

取液氮冻存的长爪沙鼠骨骼肌、肝脏、肾脏、脂肪、心脏和脑组织,剪碎后用组织蛋白提取试剂盒(康为世纪)提取总蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白进行定量。取 30 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,电转蛋白至 NC 膜。以 TBS (25 mmol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.2) 含 5% 脱脂牛奶和 0.05% Tween-20 封闭过夜。将膜与 *Rxra* 抗体(1:1000 稀释, CST, USA) 4℃ 孵育过夜, TBST 洗 3 次,与二抗(辣根过氧化物酶联的抗兔血清)室温孵育 1 h, TBST 洗膜后用化学发光法显色。骨骼肌、肝脏、肾脏、心脏和脑组织做免疫印迹时内参基因选用 *Gapdh* 作为内参基因。最后用凝胶图像分析系统(Bio-Rad)扫描蛋白质印迹条带灰度。

1.6 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。两组间比较采用独立样本 *t* 检验方法分析。以 *P* < 0.05 差异有统计学意义。

2 结果

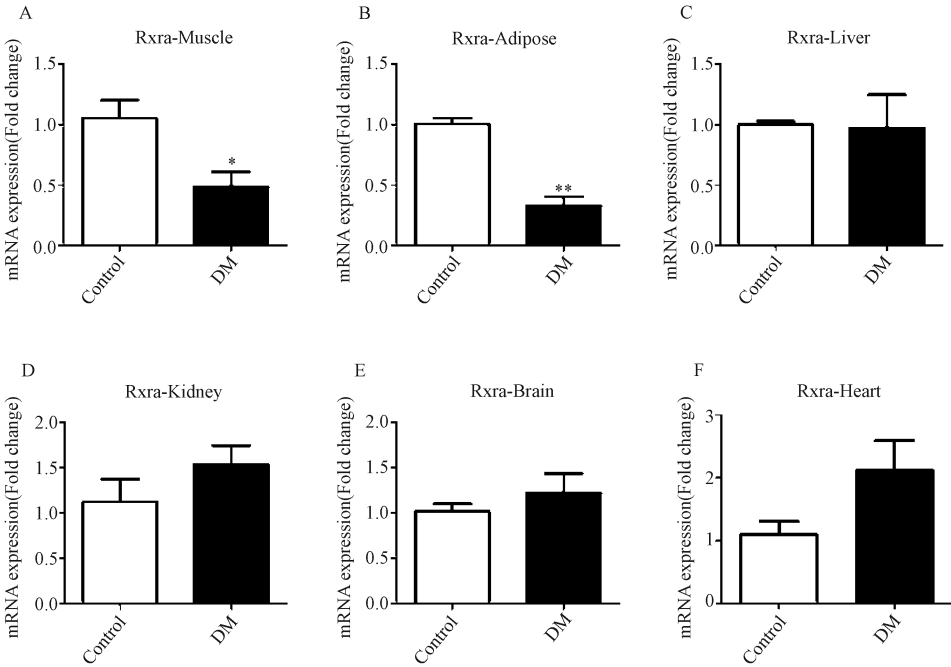
2.1 *Rxra* 在糖尿病沙鼠和对照组动物 6 种组织中

mRNA 表达的差异

Rxra 是糖尿病长爪沙鼠骨骼肌抑制消减杂交筛选出的一个重要基因,它在 6 种组织中 mRNA 的表达水平各不相同(图 1)。在骨骼肌中, *Rxra* 在糖尿病组 mRNA 表达水平显著低于对照组,与抑制消减杂交结果一致。在脂肪组织中, *Rxra* 显著低表达。在肾脏、心脏和脑组织中,糖尿病组 *Rxra* 的表达量略高于对照组,但没有统计学差异。肝脏组织中两组间 mRNA 表达水平基本相同。

2.2 RXRA 在糖尿病沙鼠 6 种组织中蛋白的表达水平

RXRA 在 6 种组织中 Western blotting 的结果显示(图 2),骨骼肌中 RXRA 在糖尿病动物中蛋白表达显著低于对照组,与 SSH 和 real-time PCR 的结果一致。在肝脏、肾脏、脑和心脏组织中 RXRA 在两组之间的蛋白表达没有显著性变化,但趋势有所不同。在肝脏和肾脏组织中,糖尿病组 RXRA 的蛋白表达量高于对照组,相反在脑和心脏中,糖尿病组该蛋白的表达量降低。肾脏和心脏组织中 RXRA 蛋白总体表达量低,脂肪组织中没有检测到 RXRA 蛋白。



A-F 分别为 *Rxra* 在肌肉、脂肪、肝脏、肾脏、脑和心脏中 mRNA 在糖尿病和对照组中的表达情况。

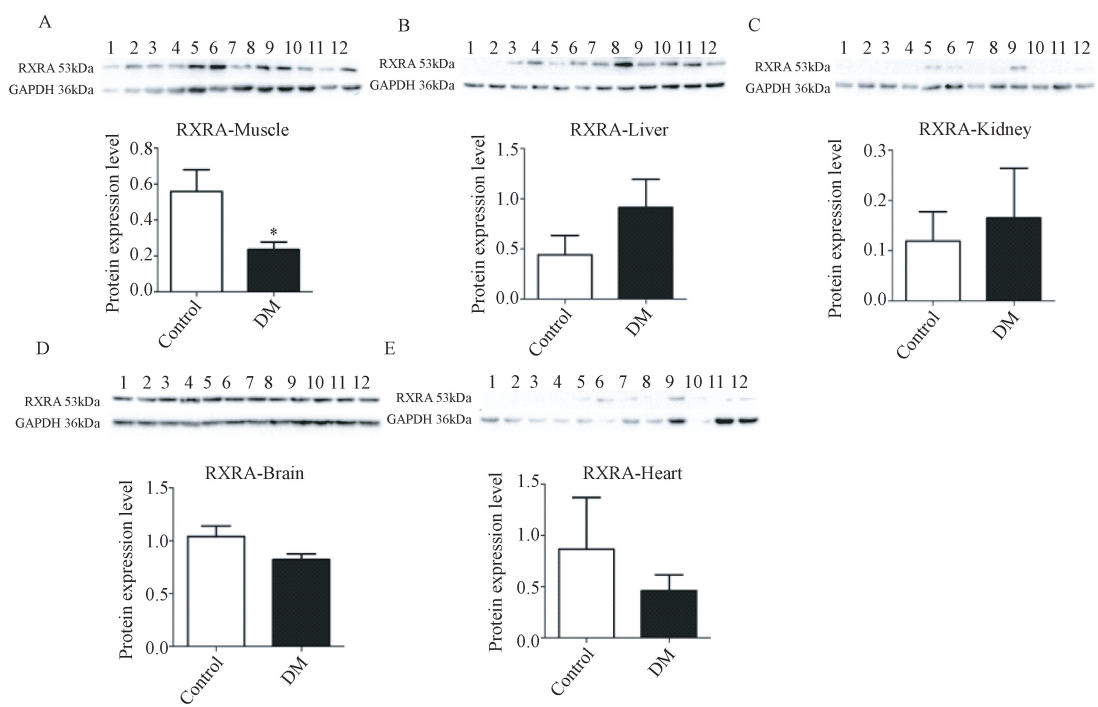
用 β -actin 为内参基因进行相对定量。(n = 6, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01)

图 1 *Rxra* 在糖尿病沙鼠 6 种组织中 mRNA 的表达情况

A-F: The relative mRNA expression levels of *Rxra* in 6 tissues (muscle, adipose, liver, kidney, brain and heart)

between the control and diabetic gerbils. Results were normalized to the housekeeping gene β -actin. (n = 6, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01)

Fig. 1 mRNA expression level of *Rxra* in 6 tissues in the diabetic and control gerbils



A-E 分别为 RXRA 在肌肉、肝脏、肾脏、脑和心脏组织的蛋白表达情况。上半部分为曝光后的条带图，其中 1-6 为对照组，7-12 为糖尿病组，下方是对条带图进行灰度扫描后的统计图。(n=6, *P<0.05)

图 2 RXRA 在糖尿病沙鼠 5 种组织中蛋白的表达情况

A-E: The relative protein expression levels of RXRA in the muscle, liver, kidney, brain and heart between control and diabetic gerbils. 1 to 6 are control groups, 7 to 12 are diabetes groups. Below the bands of gray scan, semi-quantitation of data shown corresponding statistics determined using Image J. (n=6, *P<0.05)

Fig. 2 Protein expression level of RXRA in 5 tissues in the diabetic and control gerbils

3 讨论与结论

糖尿病是当前威胁全球人类健康最重要的非传染性疾病之一^[4]。2 型糖尿病是糖尿病最主要的形式,是多基因参与的复杂性疾病,其机制一直是人们研究的热点,目前对 T2DM 的病因和关键基因的筛选还远远不够。糖尿病动物模型已成为研究 2 型糖尿病机制重要的手段,自发性动物模型是研究糖尿病遗传相关分子机制的关键载体,与人类相关疾病有相似之处。目前已经有多种自发性糖尿病模型被开发使用^[5]。本课题组在培育长爪沙鼠 (Mongolian gerbil) 近交系的过程中,偶然发现了一个分支动物的血糖较高,经过 3 年的培育逐步形成了长爪沙鼠糖尿病模型群体,其生化指标和病理组织形态均符合 2 型糖尿病标准,且这些性状具有遗传性,成为研究 2 型糖尿病的病理生理特点以及致病机制的理想动物模型材料。

由于 2 型糖尿病会影响一些外周组织和核心器官的代谢和功能,我们选取了骨骼肌、肝脏、脂肪、

肾脏、心脏和脑组织进行分析。骨骼肌作为最大的葡萄糖吸收和脂肪酸氧化的器官,对全身糖代谢起到非常重要的作用^[6]。肝脏是体内物质代谢的重要器官,参与糖代谢并对机体血糖的储存、分布和调节具有重要意义。脂肪组织可以储存和分泌脂肪酸,还具有复杂的内分泌功能,产生多种激素和细胞因子包括瘦素和脂联素,广泛参与糖代谢、脂代谢、炎症等病理过程,影响肌肉、肝脏、血管和脑等组织器官的代谢功能^[7]。糖尿病患者血浆葡萄糖代谢紊乱是造成机体某些器官损害的原因之一,在持续高糖状态下,脑内线粒体利用葡萄糖产生大量活性氧导致机体发生氧化应激,影响脑部电生理和病理状态^[8]。而肾脏中糖尿病相关的血糖紊乱、微血管病变可致慢性肾功能不全、蛋白尿以及肾小球病变^[9]。糖尿病时机体的病生理改变,比如持续性高血糖状态、氧化应激、内皮功能失调和血脂代谢功能异常等,都会导致冠心病和动脉粥样硬化病变的出现和恶化,直接影响心脏功能^[10]。由此可见,糖尿病会造成上述 6 种器官的代谢和功能紊乱,

因此,我们选取这些组织来研究 *Rxra* 的表达。

维甲类 X 受体 α (*Rxra*) 是一个独特的核受体超家族成员,在癌症、代谢紊乱和神经退行性疾病的药物干预和治疗中是一个有趣和不寻常的靶点。肝脏能广泛表达 *Rxra*,一些碳水化合物和氨基酸代谢可受肝脏 *Rxra* 调节,*Rxra* 调控相关通路能很大程度上影响肝脏健康同时调节一些疾病过程^[11],肝脏中 *Rxra* 及其下游通路是介导维甲酸调控脂代谢通路的重要因子^[12]。*Rxra* 在脂肪细胞代谢中也发挥重要作用,一些维甲酸受体结合物参与调节脂代谢。*Rxra* 是胆固醇生成和代谢的关键调节因子,当敲除小鼠肝脏中的 *Rxra* 时,血清中的胆固醇和甘油三酯水平会升高。*Rxra* 的变异还能通过影响脑组织的胆固醇代谢成为阿尔兹海默症的一个风险因子^[13]。同时,*Rxr* 可通过自身形成同源二聚体或与其他核受体形成异二聚体,参与细胞的信号转导,比如 *Rxra* 可与过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG) 形成异质二聚体调节葡萄糖和脂质稳态^[14]。

Rxra 在代谢疾病中的这些作用提示它可能与糖尿病发生的分子机制有关。本实验中,我们检测了 *Rxra* 在糖尿病长爪沙鼠 6 种组织中的表达水平,*Rxra* 的 Q-PCR 和 Western blotting 结果均显示,在骨骼肌组织中,该基因在糖尿病组的 mRNA 表达量和蛋白水平均显著低于对照组。*Rxra* 是在糖尿病动物骨骼肌组织中经 SSH 筛选出来的基因,本研究的结果与 SSH 结果一致,证明了 SSH 结果的可靠性,也首次阐释了 *Rxra* 基因在糖尿病动物肌肉组织中的低表达特征。在脂肪组织中,该基因 mRNA 水平在糖尿病组中显著降低,但用 Western blotting 方法几乎检测不到 RXRA 蛋白,这说明可能有一些调控机制除了抑制其在糖尿病动物脂肪组织的转录,更进一步抑制了它的翻译;也可能是免疫印迹的方法不够灵敏。在肝脏组织中,无论 mRNA 还是蛋白,虽然表达水平都很高,但两组表达均无差异,进一步说明 *Rxra* 基因在肝脏中的高表达^[15]。在肾脏、心脏和脑组织中糖尿病组 mRNA 表达量均部分低于对照组,蛋白水平检测也发现在这些组织中表达情况各异,但都没有显著性差异。这些结果说明,RXRA 基因与长爪沙鼠糖尿病的发生相关,且其靶器官可能是肌肉。

总之,在长爪沙鼠糖尿病模型中,我们发现

Rxra 可能与糖尿病的发生发展有关,特别是在肌肉和脂肪组织中。这为研究糖尿病及糖代谢调控的具体分子机制以及模型动物的推广应用奠定了基础。

参考文献:

- [1] International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 7th edition [M]. Belgium, Brussels, 2015. 12–15.
- [2] 赵永梅,李敬华,李贺. 外源性胰岛素对 2 型糖尿病内皮功能影响的研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25 (4): 448–450.
- [3] Ashcroft FM, Rorsman P. Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years [J]. Cell, 2012, 148(6): 1160–1171.
- [4] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版) [J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 22(10): 26–89
- [5] 李聪然,游雪甫,蒋建东. 糖尿病动物模型及研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(1): 59–63.
- [6] Jin W, Patti ME. Genetic determinants and molecular pathways in the pathogenesis of type 2 diabetes [J]. Clin Sci (Lond), 2009, 116(2): 99–111.
- [7] 王捷思,张雯. 脂肪组织功能紊乱与肥胖和糖尿病 [J]. 云南师范大学学报:自然科学版, 2013, 33(6): 21–28.
- [8] 陈金梁,孙悦,赵宇星等. 糖尿病脑病的现代认识 [J]. 重庆医科大学学报, 2015, 40(11): 1390–1394.
- [9] 廖群,陈芳华. 尿蛋白、微量白蛋白及尿蛋白电泳联合检测诊断糖尿病早期肾损害 [J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(11): 1944–1945.
- [10] 宋利华,崔英杰,李静. 简析糖尿病和心脏疾病之间的关系及影响 [J]. 糖尿病新世界, 2014(9): 75–75.
- [11] He Y, Gong L, Fang Y, et al. The role of retinoic acid in hepatic lipid homeostasis defined by genomic binding and transcriptome profiling [J]. BMC Genomics, 2013, 28(14): 575–585.
- [12] 詹琪,聂玉强,李瑜元. 肝脏异维甲酸受体 α 调控脂代谢通路的基因组靶点分析 [J]. 广东医学, 2015, 36(2): 178–181.
- [13] Kölsch H, Lütjohann D, Jessen F, et al. RXRA gene variations influence Alzheimer's disease risk and cholesterol metabolism [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(3): 589–98.
- [14] Hegele RA, Cao H. Single nucleotide polymorphisms of RXRA encoding retinoid X receptor alpha [J]. J Hum Genet, 2001, 46 (7): 423–425.
- [15] Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, et al. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid [J]. Genes Dev, 1992, 6(3): 329–344.

[修回日期]2016–08–30