

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

瘦體素抗糖尿作用於胰島素依賴性及非胰島素依賴性機轉
之研究(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-387-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學獸醫學系暨研究所

計畫主持人：郭應誠

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 11 月 25 日

瘦體素抗糖尿作用於胰島素依賴性及非胰島素依賴性機轉之研究(1/3)

瘦體素重組蛋白質與瘦體素單株抗體之製備

郭應誠

國立台灣大學獸醫學系

Ing-Cherng Guo

Department of Veterinary Medicine, National Taiwan
University, Taipei, Taiwan

Please address all correspondence to:

Dr. Ing-Cherng Guo,

Department of Veterinary Medicine, National Taiwan
University, Taipei, 106 Taiwan.

TEL: 886-2-2363 0231 ext 2761 ext 2202.

FAX: 886-2-2366 1475.

E-mail: igu@ccms.ntu.edu.tw.

This work was supported by Academia Sinica and by grants
from National Science Council, Republic of China,
NSC91-2313-B-002-387

摘要

糖尿病在人類醫學上是世界性的內分泌障礙疾病，主要原因為胰島素分泌或功能障礙所致。有報告認為瘦體素有似胰島素的功能，可以調控糖類代謝，促使細胞對糖的利用，也有研究指出瘦體素會抑制胰島素的分泌，體內高瘦體素患者會有胰島素抗性，因此瘦體素的抗糖尿作用仍有許多爭議。而本計畫欲探討瘦體素的抗糖尿作用、與胰島素的交互作用、以及這些作用的機轉。我們期望在確認瘦體素的效用後，能提供治療糖尿病症多一項有效的選擇；而瞭解其作用機轉後，在未來治療使用時，能提供藥理基礎，確立使用原則，避免不良副作用。現階段我們已製備出可專一辨識瘦體素單株抗體，將可利用於分析組織細胞分泌之瘦體素之，並建立免疫分析套組分析體液內之瘦體素之含量，配合本實驗室以建構完成之胰島素分析套組，可作為進一步研究瘦體素及胰島素之間相互關係之工具。

前言

糖尿病在人類醫學上是世界性的內分泌障礙疾病，開發程度越高之國家，發生率越高。1997 年的指出，全世界的糖尿病患超過兩億人口 (McCarty *et al.*, 1997) 在美國，糖尿病多年來高居十大死因，醫療費用高達每年 919 億美元 (約 3 兆新台幣) 平均每人每年約需支付 3300 美元的醫療費用。近年來，台灣已從開發中國家進入已開發國家，因此，糖尿病發生率逐年升高，自 1983 年後，糖尿病年醫療花費佔年總醫療費用 11.5% (約 300 億元)，而 1999 年因糖尿病死亡人數佔台灣總死亡人數之 7% 以上。但即使在先進國家，糖尿病的診斷率仍然偏低，不僅發現太晚，不利治療，而且隱性病患率在已開發國家達 50%，開發中國家高達 75%，第三世界國家則更是無從評估。在動物醫學，美國賓州 1993 至 1998 年間統計犬隻糖尿病發生率約 0.5% (Rebecka *et al.*, 2000)。而在 1980 至 1986 年間在美、加等地貓糖尿病發生率約 0.25% (Pancieria *et al.*, 1990)。不可諱言，動物醫學對糖尿病之診斷與治療相較於人類醫學要更原始，據此推論，隱性動物病患比率應該是相當高。顯然，不論在人類醫學或是在動物醫學，我們對糖尿病的了解仍然不足。除了對致病機轉仍待更多研究探討外，早期診斷的系統也需儘早建立，而糖尿病屬於慢性內分泌障礙疾病，尋求有效藥方，更是學者努力的地方。

瘦體素與胰島素的關係十分密切，許多實驗指出兩者間可能有加乘或拮抗的作用，如缺乏瘦體素基因小鼠，會有嚴重的高血糖、胰島素抗性。有報告認為瘦體素有似胰島素的功能，可以調控糖類代謝，促使細胞對糖的利用，也有研究指出瘦體素會抑制胰島素的分泌，體內高瘦體素患者會有胰島素抗性，因此瘦體素的抗糖尿作用仍有許多爭議。本計畫即將以新的小鼠模式與研究方法，嘗試求證瘦體素的抗糖尿效用及其機轉。若瘦體素可作為有效的糖尿病治療藥物，可以

提供糖尿病患者多一項選擇，尤其是當胰島素治療已無法發揮其效用，多一項有效的藥物可以延長患者的生命，等待新藥的研發，不論在獸醫或人醫，都將具體造福病患。

材料與方法

IPTG 誘導之時程效應與劑量反應 (Time-course and dose-response of IPTG induction)

自選定的宿主菌株中挑單一菌落培養於 2ml 含 50 μ g/ml Kanamycin 的 LB 培養液中，於 37 $^{\circ}$ C 培養箱中以每小時 200 轉的轉速過夜培養，第二天取適量菌液添加在 100ml 含 50 μ g/ml 之 Kanamycin 的 LB 培養液，以每小時 200 轉的轉速在 37 $^{\circ}$ C 培養箱中繼續培養，至菌液的 O.D.₅₉₀ 達 0.6-0.8 後再分別添加 0.1、1、10mM IPTG 繼續培養 6 小時，並在 0、1、2、3、4、5、6 小時等七個時間點收集菌液，取 20 μ l 進行進行 12%SDS-PAGE 電泳分析，評估最適當之 IPTG 劑量及處理時程。

包含體溶解試驗 (Solubility of inclusion body)

自選定的宿主菌株挑單一菌落培養於 1.5L 含有 50 μ g/ml 之 Kanamycin 的 LB 培養液培養，並以 0.1mM IPTG 誘導表現 6 小時後，將菌液以 1100xg 離心，去除上清液，將菌體以 lysozyme 在 4 $^{\circ}$ C 作用 2 小時以上，再以超音波震碎菌體，經離心分成上清液及沈澱物，上清液收取保存後，將沈澱物以含 6M 尿素而 pH7.0、8.0、9.0，及 9M 尿素 pH9.0 的變性溶液進行清洗，然後將各個清洗後的上清液及最後剩下的沈澱物進行 12%SDS-PAGE 電泳分析，來判斷包含體中重組蛋白質的溶解情形。

重組蛋白之純化

將 His-bind resin 混合均勻，取 3 哩裝填於管柱，靜置使液體自然流出。以 6ml 之無菌水、10 ml NiSO₄ 及 6ml binding buffer 依序清洗管柱，取重組蛋白之尿素溶解液通過管柱，使樹脂充分吸附重組蛋白，再以 binding buffer 及 washing buffer 將非專一性蛋白洗除，最後以 elution buffer 純化出重組蛋白。

單株抗體的製備：

取重組蛋白為免疫原免疫之小鼠脾臟細胞與小鼠骨髓瘤細胞 NS-1 進行細胞融合，經過二週 HAT 培養液的選拔(selection)後，再使用 ELISA 進行專一性融合瘤的篩選(screening)，挑選正反應最強的融合瘤細胞，使用限數稀釋法(limiting dilution)進行單株化，以獲得單株融合瘤細胞。以獲得分泌抗瘦體素抗體。

酵素免疫分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA)：

於 96 孔免疫分析盤加入每孔 100 μ L 以吸附液稀釋之重組蛋白。將免疫分析盤以膠膜密封，置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱吸附抗體至少一天，同時可儲存於 4 $^{\circ}$ C 冰箱中。分析樣品前 30 分鐘，先將吸附抗原的免疫分析盤取出回溫。以清洗液沖洗三次

後，每孔添加 200 μ L 填充液，於 37 $^{\circ}$ C 填塞一小時。沖洗三次，再每孔加入 100 μ L 經適度稀釋過之的融合細胞培養液，此抗原抗體結合反應於 37 $^{\circ}$ C 下避光進行反應 30 分鐘。之後沖洗三次，加入二次抗體作用 1 小時，之後沖洗三次，每孔加入 200 μ L OPD 溶液（10 mg OPD 溶於 25 mL 之 PB6.0，於添加前加入 2.5 μ L 之 33 % H_2O_2 ），於室溫下避光進行呈色反應 15 分鐘。再以 50 μ L 6N H_2SO_4 溶液終止反應，於 490 波長下測吸光值。

西方墨點法（Western Blotting Assay）：

將均質化組織或細胞懸浮液(cell lysate)加入等體積 2x sample buffer(4% SDS,125mM Tris-HCl pH6.8, 20% glycerol, 10% B-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue)混合均勻，在 100 $^{\circ}$ C 煮五分鐘後，注入 10% SDS-PAGE 明膠，以 60 伏特解析。取下明膠，以電泳將膠上已解析的蛋白轉印至 NC 紙上。已染印蛋白之 NC 紙浸於含有 5%脫脂奶粉的 PBST 溶液中填塞二小時，之後以 PBST 清洗三次，再與含專一性抗體之 PBST 液體中浸漬二小時，再用 PBST 清洗三次，以含有 35 S 標識的蛋白質 A 的 PBST 浸漬一小時，最後用 PBST 清洗三次，烘乾後再行自動放射顯像。

結果與討論

一. IPTG 誘導的時程效應

用 1mM 的 IPTG 誘導大腸桿菌過量表現瘦體素重組蛋白質，並在開始誘導後從不同時間點收取菌液，經超音波震盪、離心及煮沸處理後，進行 12% SDS-PAGE 電泳分析，發現 IPTG 的誘導效果隨著時間點的增長而增加，其中以五小時的誘導表現量最大（圖一）。

二. 瘦體素重組蛋白質的溶解試驗

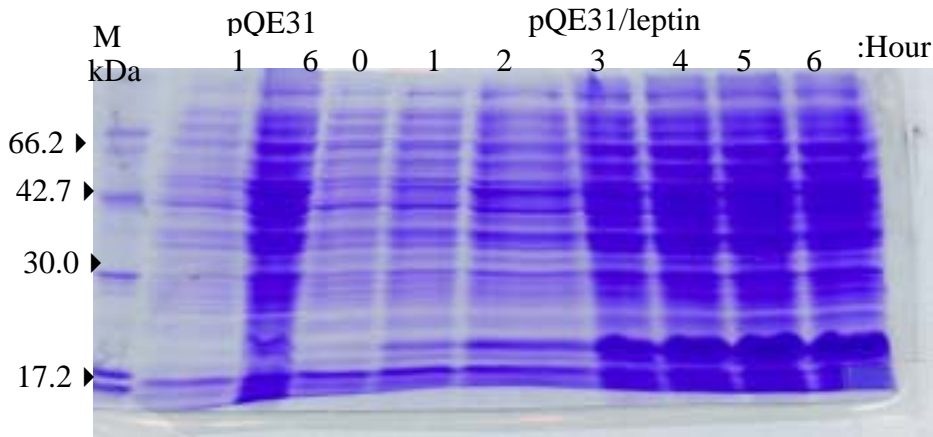
由於瘦體素蛋白質以包含體的形態存在，並不溶於一般的水溶液，為了利於進行蛋白質的純化工作，乃使用不同尿素濃度的變性溶液嘗試溶解包含體中的重組蛋白質，結果發現這些變性溶液能溶出瘦體素重組蛋白質，經過這些變性溶液的清洗，卻使得包含體中瘦體素重組蛋白質的純度越來越高（圖二）。

三、瘦體素重組蛋白之純化

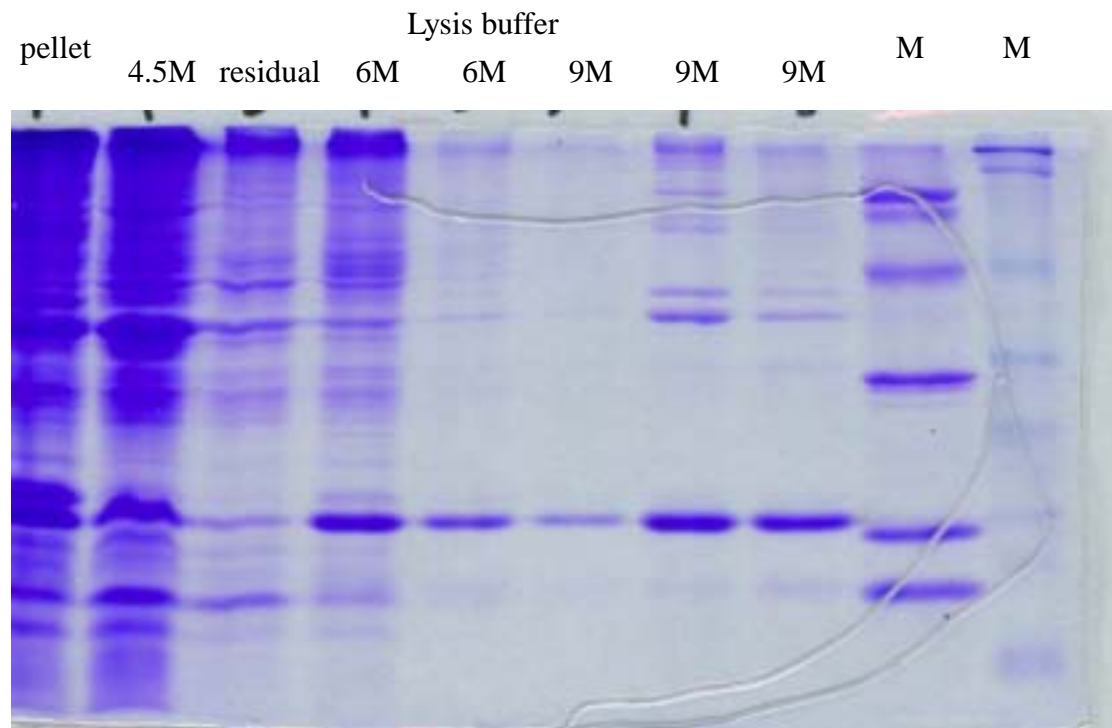
將上述以 6M 及 9M 尿素溶解液溶出之重組蛋白，以 Ni-NTA 親和管柱進行純化的工作，再以 SDS-PAGE 檢查純化之結果，其純化效果佳且可在第二個 fraction 獲得大量之純化蛋白（圖三）。

四、抗瘦體素單株抗體之生產

利用純化之瘦體素重組蛋白免疫小鼠生產可分泌抗瘦體素抗體之融合細胞瘤，利用西方墨點法進行確認，所獲得 4H7 單株抗體可有效地辨認市售之人類及小鼠之瘦體素蛋白，大小為 16KD（圖四）。

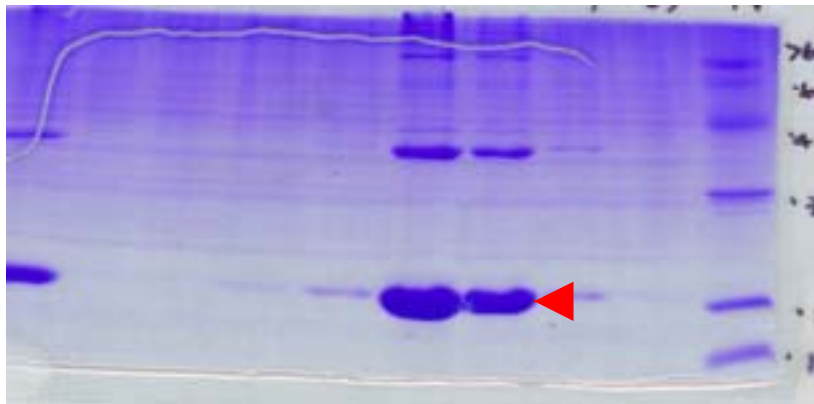


圖一: IPTG 誘導的時程效應。利用大腸桿菌株 JM109 表現的瘦體素重組蛋白質 (20kDa) 在七個時間點(0、1、2、3、4、5、6 小時)的 IPTG 誘導後的表現情形。
 pQE31: pQE31 載體 ; pQE31/leptin 瘦體素表現質體 ; M: 蛋白質標尺。



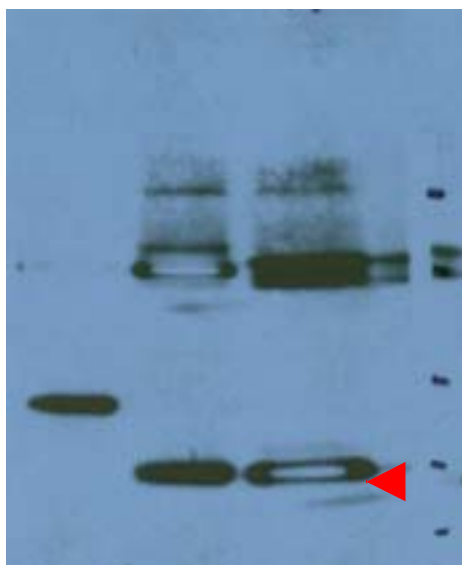
圖二: 瘦體素重組蛋白質的溶解試驗。所使用的溶解液包括: 分解液(lysis buffer) 及含 4.5 M、6M 及 9M 尿素 pH 7.0 的變性溶液。P: 沈澱物 ; M: 蛋白質標尺。

Crude pass bind wash Elution fraction M
 1 2 3 4 5



圖三：利用 Ni-NTA 親和力層析管柱純化重組蛋白。將 6M 及 9M Urea 溶解液進行純化，可獲得一較純瘦體素重組蛋白。

S M H Marker



圖四：以西方墨點法偵測以重組蛋白免疫小鼠生產出之單株抗體辨識瘦體素之能力。4H7 單株抗體可專一辨識豬隻、人類及小鼠之瘦體素。

參考文獻

1. 陳國群。糖尿病治療藥物。台北市：藝軒，1999。
2. Ahren B, Larsson H. Leptin-a regulator of islet function? Its plasma levels correlate with glucagons and insulin secretion in healthy women. *Metabolism*. 46: 1477-1481, 1997.
3. Ahren B, Havel PJ. Leptin inhibits insulin secretion induced by cellular cAMP in INS-1 cells. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 277: R959-966, 1999.
4. Ashima RS, Flier JS. Leptin. *Annu. Rev. Physiol*. 62: 413-437, 2000.
5. Barzilai N, Wang J, Massillon D, Vuguin P, Hawkins M, Rossetti L. Leptin sselectivellly decreases visceral adiposity and enhances insulin action. *J. Clin. Invest*. 100: 3105-3110, 1998.
6. Bell GI, Polonsky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in b-cell function. *Nature* 414: 788-791, 2001.
7. Boden G, Chen X, Kolaczynski JW, Polansky M. Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects. *J. Clin. Invest*. 100:107-113, 1997.
8. Brownlee M. Biochemical and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813-820, 2001
9. Cases JA, Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Michaeli T, Fleischer N. Physiological increase in plasma leptin markedly inhibits secretion in vivo. *Diabetes* 50: 348-352, 1999
10. Ceddia RB, William WN, Curi R. Comparing effects of leptin and insulin on glucose metabolism in skeletal muscle: evidance for an effect of leptin on glucose uptake and decarboxylation. *Intern. J. Obesity* 23 (1): 75-82, 1999.
11. Chinookoswong N, Wang JL, Shi ZQ. Leptin restores euglycemia and normalizes glucose turnover in insulin-deficient diabetes in the rat. *Diabetes* 48: 1487-1492,1999.
12. Chua SC, Chung WK, Wu-Peng XS. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* 271: 994-996, 1996.
13. Cohen N, *et al*. Oral vanadyl sulohate improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest*. 95: 2501-2509, 1995.
14. Ehrhart EJ, Segarini P, Tsang MLS, Carroll AG, Barcellos-hoff MH. Latent transforming groeth factor b1 activation in situ: quantitative and fuctional evidence after low-dose g-irradiation. *FASEB J* 11:991-1002, 1995.
15. Elchebly M, *et al*. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283: 1544-1548, 1999.
16. Elliott MJ, Maini RN, Feldman M, Long-Fox A, Charles P, Biji H, Woody JN. Repeated therapy with monoclonal antibody to tumor necrosis factor a (cA2) in patients with rheumatoid arithritis. *Lancet* 344: 1125-1127, 1995.
17. Falchuk KR, Conlin D. The intestinal and liver complication of diabetes mellitus. *Adv Intern Med* 38: 269-286, 1993.
18. Falchuk K, Fiske S, Haggitt R. Peripheral hepatic fibrosis and intracellular hyaline in diabeettes mellitus. *Gastroenterology* 78: 535-541, 1980.
19. Fehmman HC, Peiser C, Bode HP, Stamm M, Staats C, Hedetoft C, Lang RE, Goke B. Leptin: a potent inhibitor of insulin secretion. *Peptide* 18: 1267-1273, 1997.

20. Flier JS. The missing link with obesity? *Nature*. 409: 292-293, 2001.
21. Goldstein BJ, Li PM, Ding WD, Ahmad F, Zhang WR. In: Litwack J, ed. *Vitamins and hormones- Advances in research and applications* Vol. 54. Academic. San Diego. 67-96, 1998.
22. Harris RBS. Leptin-much more than a satiety signal. *Annu. Rev. Nutr.* 20: 21-44, 2000.
23. Hotamisligil GS. The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med* 245: 621-625, 1998.
24. Johnson KH, O'Brien TD, Betsholtz C. Impaired glucose tolerance is associated with increased islet amyloid polypeptide (IAPP) immunoreactivity in pancreatic beta cells. *Am J Pathol* 135: 245, 1989.
25. Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 389: 374-377, 1997.
26. Karlsson E, Stridsberg M, Sandler S. Leptin regulation of islet amyloid polypeptide secretion from mouse pancreatic islet. *Biochem Pharmacol.* 56: 1339-1346, 1998.
27. Kennedy JW, Hirshman MF, Gervino EV, Ocel JV, Forse RA, Hoenig SJ, Aronson D, Goodyear LJ, Horton ES. Acute exercise induces GLUT4 translocation in skeletal muscle of normal human subjects and subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 48: 1192-1197, 1999.
28. Kim JB, Sarraf P, Wright M, Mueller E, Lowell BB, Spiegelman BM. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest* 101: 1-9, 1998.
29. Koopmans SJ, Frolich M, Gribnau EH, Westendorp RG, DeFronzo RA. Effect of hyperinsulinemia on plasma leptin concentrations and food intake in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 274: E998-1001, 1998.
30. Lee GH, Proenca R and Montez JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379:632,1996.
31. Mathis S, Vence L, Benoist C. b-cell death during progression to diabetes. *Nature* 414: 792-798, 2001.
32. Mayfield J. Diagnosis and classification of diabetes mellitus: new criteria. *Am. Fam. Phys.:* 1355-1362, 1998.
33. Mizuno A, Murakami T, Doi T, Shima K. Effect of leptin on insulin sensitivity in the Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat. *Regulatory peptides* 99: 41-44, 2001.
34. Moller DE. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414: 821-827, 2001.
35. Nelson RW. Diabetes mellitus. In: Ettinger SJ, Feldman EC, ed. *Textbook of veterinary internal medicine*, 5thed. USA, Saunders, 1438-1460, 1995.
36. O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP. Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *J Pathol* 178: 176-181. 1996.
37. Ookuma M, Ookuma K, York DA. Effects of leptin on insulin secretion from isolated rat pancreatic islets. *Diabetes* 47: 219-223, 1998.
38. Paik SG, Fleischer N and Shin S. Insulin-dependent diabetes mellitus induced by subdiabetogenic doses of streptozotocin: obligatory role of cell-mediated autoimmune processes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6129, 1980.
39. Poytout V, Rouault C, Guerre-millo M, Briaud I, Reach G. inhibition of insulin secretion by leptin in normal redent islets of Langerhans. *Endocrinology* 139(3):

- 822-826, 1998.
40. Popovic V, Micic D, Danjanovic S, Zoric S, Djurovic M, Obradovic S, Pettakov M, Dieguez C, Casanueva FF. Serum leptin and insulin concentrations in patients with insulinoma before and after surgery. *Eur J Endocrinol* 138: 86-88, 1998.
 41. Pozzilli P, Signore A and William AJK. NOD mouse model of insulin dependent diabetes: as good as it gets? *Nat Med* 51: 601, 1999.
 42. Quian H, Azani MJ, Compton MM, Hartzell D, Hausman GH, Baile CA. Brain administration of leptin cause deletion of adipocytes by apoptosis. *Endocrinology* 139: 791-794, 1998.
 43. Richards MP, Caperna TJ, Elsasser TH, Ashwell CM, McMurtry JP. Design and application of a polyclonal peptide antiserum for the universal detection of leptin protein. *J Biochem Biophys Methods* 45:147-156, 1999.
 44. Roduit R, Thorens B. Inhibition of glucose-induced insulin secretion by long term preexposure of pancreatic islets to leptin. *FEBS Lett.* 415: 179-182, 1997.
 45. Saini KS, Thompson C, Winterford CM, Walker NI, Cameron DP. Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in a murine pancreatic cell line, INS-1. *Biochem Mol Biol Int* 39: 1229-1236, 1996.
 46. Saltiel AR, Kahn R. insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806, 2001.
 47. Seufert J, Kieffer TJ, Habener JF. Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient *ob/ob* mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 674-679, 1999.
 48. Shi ZQ, Nelson A, Whitcomb L, Wang JL, Cohen AM. Intracerebroventricular administration of leptin markedly stimulated glucose turnover in the normal rat. *Metabolism* 47: 1-8, 1998.
 49. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104: 531-543, 2001.
 50. Steinberg GR, Dyck DJ. Development of leptin resistance in rat soleus muscle in response to high-fat diets. *Am J Physiol endocrinol metab* 279: E1374-E1382, 2000.
 51. Steppan CM, Balley S, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307-312, 2001.
 52. Takaya K, Ogawa Y, Hiraoka J, Hosoda K, Yamori Y. Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. *Nat. Genet.* 14: 130-131, 1996.
 53. Wang JL, Chinookoswong N, Scully S, Qi M, Shi ZQ. Differential effects of leptin in regulation of tissue glucose utilization in vivo. *Endocrinol.* 140: 2117-2124, 1999.
 54. Winter WE. Type I insulin-dependent diabetes mellitus: a model for autoimmune polygenic disorders. *Adv Dent Res* 10(1): 81-87, 1998.
 55. White DW, Wang DW, Chua SC Jr, Morgenstern JP, Leibel RL. Constitutive and impaired signaling of leptin receptors containing the Gln-Pro extracellular domain mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10657-10662, 1997.
 56. Wolf G. Insulin resistance associated with leptin deficiency in mice: a possible model for noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Nutrition reviews* 59(6): 177-182, 2000.
 57. Ye JM, Doyle P, Iglesias M, Watson AG, Cooney G, Kraegen EW. Peroxisome

- proliferator-activated receptor (PPAR)- α activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high fat-fed rats. *Diabetes* 50: 411-417, 2000.
58. Zhang B. Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science* 284: 974-977, 1999.
 59. Zhao AZ, Bornfeldt KE, Beavo JA. Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B. *J Clin Invest.* 102: 869-873, 1998.