

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

計畫名稱：分析在 NIH3T3-L1 脂肪細胞與胰島素抗阻性相關基因-從基礎到臨床之研究

計畫編號：NSC 89-2314-B-002-065

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：莊立民

執行機構及單位名稱：臺大醫院、內科

一、中文摘要

吾等以 NIH3T3-L1 纖維母細胞分化成脂肪細胞模型，利用差別呈現法(differential display)尋找脂肪細胞分化與胰島素作用有關的基因，然而這些基因如何被調控或如何作用並不完全明白。在吾等已經找到之 60 個基因中，發現其中之 SH3P12 mRNA 會隨脂肪細胞分化而增加，目前瞭解 SH3P12 經由三個 SH3 domains 與胰島素受器、c-Cbl 與 focal adhesion kinase 有交互作用，顯示 SH3P12 在胰島素之信息傳遞作用有密切之關聯。

為瞭解 SH3P12 基因之功能，我們首先定位並分析人類 SH3P12 基因之結構，設計引子做 PCR 以分析 31 個 Exons 核甘酸序列之變異，從 30 個人之染色體 DNA 我們找到 15 個單一之核甘酸序列變異(single nucleotide polymorphism, SNP)，其中有 2 個核甘酸序列之變異會造成氨基酸之改變，分別是 R74W 及 T228A，接下來我們設計較簡單之 PCR/RFLP 及利用 heteroduplex 原理，在 202 個正常人、103 個肥胖、及 455 個糖尿病患分別分析 T228A 及 R74W，結果發現 R74W 與肥胖或糖尿病並無關聯，但是 T228A 則與肥胖或糖尿病有顯著之關聯，

SH3P12 基因有 T228A 之變異者較有保護之作用，對肥胖及糖尿病之相對危險係數分別是 0.466 (95% CI 0.265~0.821) 及 0.668 (95% CI 0.472~0.945)。結論，吾等從差別呈現法找到脂肪細胞分化有關的基因，部分可能與胰島素作用有關。部分基因可以在人類疾病之發生得到進一步之驗證。

關鍵詞：胰島素作用、胰島素抵抗性、糖尿病、肥胖、致病機轉

二、緣由與目的

糖尿病在國人十大死因中糖尿病現今排名第五位，而從過去流行病學之研究發現，國人糖尿病之盛行率也逐年上升，國人發生糖尿病之危險因子，以年齡〔老化〕、體型〔肥胖〕、和有糖尿病之家族史〔遺傳〕最為重要；目前對於大多數第二型糖尿病病人之基因變化，仍不清楚。但糖尿病之致病機轉已知有二，除了胰島素分泌不足之外，另外就是為胰島素抵抗性，意即胰島素在周邊組織上的作用不正常，胰島素抵抗性常發生在肥胖、糖尿病、與高血壓患者身上，因而可能與疾病之發生有關。

利用核糖核酸在正常人與糖尿病人在肌肉之差異表現，可以找出在糖尿病病人之肌肉有特異基因之表現，進一步可幫助瞭解第二型糖尿病之致病機轉；吾等以 NIH3T3-L1 纖維母細胞分化成脂肪細胞模型，利用差別呈現法(differential display)尋找脂肪細胞分化與胰島素作用有關的基因，然而這些基因如何作用或如何被調控並不完全明白。

Thiazolidinedione 一類藥物可以改善胰島素阻抗性而做為治療糖尿病之藥物，這類藥物主要是刺激一個細胞核內受器，叫做 peroxisome proliferator- activated receptor γ (PPAR γ)，來執行藥物之功能，因此研究由 PPAR γ 調控之基因，可以瞭解胰島素阻抗性之致病機轉。而在吾等已經找到之 60 個基因中，發現其中之 SH3P12 mRNA 會隨脂肪細胞分化而增加，目前瞭解 SH3P12 經由三個 SH3 domains 與胰島素受器、c-Cbl 與 focal adhesion kinase 有交互作用，顯示 SH3P12 在胰島素之信息傳遞作用有密切之關聯。而 SH3P12 mRNA 在 BRL49653 處理後有增加之情形，顯示此基因之表現受 PPAR γ 之調控。而 PPAR γ 之作用是與 retinoid X receptor (RXR) 形成 heterodimer 之型式來達成，可能 PPAR γ 與 RXR 對這些基因之調控有作用，但對胰島素促進葡萄糖輸送之作用是否有加成作用則尚待證明；吾等並擬以去除 SH3P12 功能之細胞，研究胰島素促進葡萄糖輸送之作用，透過這些研究可確定 SH3P12 在胰島素作用與胰島素阻

抗性之角色。

吾等預期找出影響胰島素作用或與胰島素阻抗性相關之基因後，在人類或動物肥胖或糖尿病研究這些基因於脂肪組織表現之改變，以增加胰島素阻抗性機制之瞭解，並進行基因突變之篩選，瞭解疾病發生的原因，以達到做為診斷和治療糖尿病之新方法。

三、研究結果與討論

吾等以 NIH3T3-L1 纖維母細胞分化成脂肪細胞模型，尋找脂肪細胞分化與胰島素作用有關的基因，其中 SH3P12 mRNA 在脂肪細胞分化後有顯著之增加，SH3P12 mRNA 並受到 Thiazolidinedione 一類藥物刺激細胞核內受器 (PPAR γ)，而上升。目前瞭解 SH3P12 經由三個 SH3 domains 與胰島素受器、c-Cbl 與 focal adhesion kinase 有交互作用，吾等亦首度發現 SH3P12 可與胰島素受器、c-Abl 有交互作用，顯示 SH3P12 在胰島素之信息傳遞作用有密切之關聯(此結果投稿 Genomics 中)。

為瞭解 SH3P12 基因之功能，我們可以用正常人與肥胖及糖尿病患之基因型分析以瞭解 SH3P12 基因是否與疾病有相關，在基因功能未完全明白以前可以先建立此基因在疾病扮演之角色。因此，我們首度分析人類 SH3P12 基因之結構，並利用 PCR 定序從 30 個中國人之染色體 DNA 找到 15 個單一之核苷酸

序列變異 (single nucleotide polymorphism, SNP)，代表這些變異是人類基因常見之變異，而有利於分子遺傳學之研究，除了 9 個在 introns，6 個在 exons，其中有 2 個核苷酸序列之變異造成氨基酸之改變，分別是 R74W 及 T228A，為了進行大規模之遺傳學之研究，我們設計 PCR/RFLP 分析 T228A 之變異，及利用 heteroduplex 原理，在 WAVE 儀器分析 R74W 之變異。我們共分析 202 個正常人、103 個肥胖、及 455 個糖尿病患者，結果發現 R74W 在正常人與肥胖或糖尿病並無差異，但是 T228A 基因型在正常人與肥胖或糖尿病則顯著之差異，A-allele 在三組人之頻率分別為 14.9%，7.5%，10.4%，統計學上為有顯著之差異。顯示有 T228A 之變異者較有保護之作用，對肥胖及糖尿病之相對危險係數分別是 0.466 (95% CI 0.265~0.821) 及 0.668 (95% CI 0.472~0.945)。結論是吾等從利用差別呈現法(differential display)找到脂肪細胞分化有關的基因，可能與胰島素作用有關。並在人類疾病之發生得到進一步之驗證。(此結果準備投稿中)。

除了 SH3P12 基因之外，我們也陸續分析其他可能與疾病相關之基因，如 Adiponectin 基因，此基因之 mRNA 在受到 Thiazolidinedione 一類藥物刺激會上升。結果可再加以討論如下：

Adiponectin, an adipose tissue-specific plasma protein was shown to modulate many biological processes. Low plasma levels of adiponectin

were documented in subjects with obesity, diabetes mellitus or coronary artery disease. Therefore, adiponectin might be a genetic factor influencing body mass index (BMI) and insulin sensitivity.

We found and developed a PCR-RFLP to determine a T/G polymorphism at nucleotide 94 in exon 2 of human adiponectin gene. Among 245 non-diabetic Taiwanese subjects, we analyzed the correlation between genotypes and clinical phenotypes such as BMI and plasma levels of fasting and two-hour post-glucose load insulin (FPI & 2h PI) and glucose.

The frequency of the variant G-allele of the adiponectin gene was approximately 0.363. Its presence was inversely correlated with BMI, both FPI and 2h PI, and insulin resistance index (IR). In a linear regression model using BMI as the dependent variable, adiponectin genotype was significantly ($\beta = -1.47$, $p = 0.02$) related to this outcome while adjusted for age and sex. Likewise, adiponectin genotype was also significantly related to FPI, 2h PI and IR. However, they failed to remain significant after adjusting BMI. In subjects with higher BMI (≥ 26.9), there was less G allele ($p = 0.043$ by chi-square). The odds ratio for higher BMI was 0.65 with G allele (95% CI: 0.42-0.99). In multivariate logistic regression analysis, the adjusted odds ratio for higher BMI was 0.54 among subjects with G/T genotype ($p = 0.028$, 95% CI: 0.30-0.97).

In conclusion, our results suggest that adiponectin may be an important

and common genetic factor in controlling body weight, whereas its effects on insulin sensitivity may be mediated by BMI.

四、研究結果自評

對於從 NIH3T3-L1 纖維母細胞分化成脂肪細胞來尋找脂肪細胞分化與胰島素作用有關的基因，現在已有一些例子(如 adipoQ/adiponectin)在文獻中報告出來。在本研究我們也發現其中之 SH3P12 與 adiponectin 也和肥胖或糖尿病之發生有密切之關聯。在基因之功能尚未完全明瞭時，本研究之發現可以提供其在疾病發生之角色，但要證明這些基因之變異如何引起疾病之發生，則吾等認為進一步生化方面之研究是必須的，略討論如下：

1. **Construction of expression plasmid containing SH3P12 variants (e.g. R74W and T228A).** We now try to clone the human SH3P12 full length cDNA containing the genetic variants for further molecular study.
2. **Assay insulin-dependent function of SH3P12.** To further illustrate its role in insulin action/insulin resistance, we then have to set up the in vitro system to demonstrate whether there is any change in insulin-stimulated functions. Therefore, we can transfect the wild-type or mutant SH3P12 to study the effect on insulin-stimulated glucose uptake.
3. **To isolate SH3P12-associated proteins to understand the**

downstream effects. We tried to develop 2-D gel electrophoresis to fractionate the multiple isoforms of SH3P12 and their associated proteins after insulin stimulation.

4. **To study the effect of genetic variants on protein phosphorylation.** We suspected that a modification after insulin stimulation was due to multiple phosphorylation on Ser/Thr sites. In our finding that the variant of T228A resulted in a substitution of threonine by alanine might predict a change in the phosphorylation pattern of SH3P12.