

• 基础实验研究论著 •

环指蛋白 6 对胰岛素受体底物 1 泛素化作用的研究*

朱 丽¹, 谈介凡^{1△}, 周丽艳²

(上海市第二人民医院:1. 检验科;2. 同位素室, 上海 200011)

摘要:目的 构建环指蛋白 6(RNF6)真核表达载体,并探讨其对胰岛素受体底物 1(IRS-1)的泛素化作用。方法 以人 cDNA 为模板,PCR 扩增 RNF6 全长编码基因,并将其克隆至载体质粒 pcDNA3.1-CHA 中,将重组质粒转染肝癌细胞株 HepG2,利用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)、免疫印迹(Western blot)检测细胞内 IRS-1 mRNA 水平及其蛋白表达水平。结果 携带 RNF6 目的基因的质粒转染 HepG2 细胞 48 h 后 IRS-1 的 mRNA 表达水平降低,为对照组的 69%,显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 RNF6 引起 IRS-1 的表达下调,这一泛素化过程可能导致胰岛素信号转导障碍。

关键词:胰岛素受体底物-1; 泛素化; 环指蛋白 6; 胰岛素

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.11.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)11-1382-03

Study of the ubiquitination of RNF6 on insulin receptor substrate-1*

Zhu Li¹, Tan Jiefan^{1△}, Zhou Liyan²

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Isotope Laboratory, the Second People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200011, China)

Abstract: **Objective** To construct an eukaryotic expression vector of ring finger protein 6 (RNF6) and to investigate its ubiquitylation on insulin receptor substrate-1(IRS-1). **Methods** Human RNF6 coding sequence was amplified by polymerase chain reaction (PCR) method with human cDNA as template. The pcDNA3.1-CHA-RNF6 was constructed with routine molecular methods and transfected into hepatocarcinoma cell HepG2. Relative quantification of IRS-1 mRNA was preformed by real-time reverse transcription PCR. Western blot was applied to detect the expression levels of IRS-1. **Results** 48 h after the plasmid carrying RNF6 gene transfected HepG2 cells, the mRNA level of IRS-1 gene reduced to 69% of control group. The expression of IRS-1 was markedly lower than control group ($P < 0.01$). **Conclusion** The expression of IRS-1 is markedly down-regulated in HepG2 and enhancement of the ubiquitylation level of IRS-1 contribute to the disorder in insulin signal transferring.

Key words: insulin receptor substrate-1; ubiquitin; ring finger protein 6; insulin

全世界每年新发肝癌患者约 60 万,居恶性肿瘤的第 5 位。肝源性糖尿病是其常见的并发症,外周胰岛素抵抗导致肝源性糖尿病的主要原因^[1]。胰岛素与其受体结合后,磷酸化细胞内胰岛素受体底物(IRS),从而产生一系列生理生化反应^[2]。IRS-1 的相对分子质量为 185×10^3 ^[3],作为一种船坞蛋白在胰岛素/类胰岛素生长因子信号通路中发挥非常重要的作用^[4]。胰岛素受体底物蛋白是胰岛素经典信号通路中的一个关键因子,参与调控胰岛素受体后水平的许多生理过程。泛素化是细胞内蛋白质转录后修饰的重要方式,整个细胞质膜系统(从细胞膜、内质网到核膜等)都存在泛素化底物及其降解过程^[5]。有研究表明,细胞内蛋白质去泛素化与泛素化过程与恶性肿瘤发生有密切关系^[6-7],认识、理解此降解过程与分子机制,对治疗由泛素系统功能紊乱引起的各种疾病具有重要作用。泛素活化酶 E1、泛素结合酶 E2 和泛素连接酶 E3 共同介导细胞内泛素化反应,其中连接酶 E3 能特异识别相关底物,由此决定泛素-蛋白酶体系统(UPS)蛋白降解的特异性,所以连接酶 E3 引起科研工作者的广泛关注^[8]。环指蛋白 6(RNF6)作为泛素连接酶 E3,结合 E2 从而降解相应靶蛋白^[8]。因此,本研究构建人 RNF6 全长基因的真核表达载体,转染肝癌细胞 HepG2 研究 RNF6 对 IRS-1 表达的调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料 人肝癌细胞株 HepG2 由中科院上海生命科学研

究院提供;pcDNA3.1 载体、DNA 连接酶、EcoR I 和 BamH I 均购自 TakaRa 公司;4×dNTP、Taq DNA 聚合酶购自美国 Promega 公司;Lipofecter 脂质体转染试剂购自碧云天;质粒提取、RNA 提取及胶回收试剂盒购自德国 QIAGEN 公司;Marker-DL2000 DNA 标记物购自上海生工;HRP 标记的 β -actin 内参购自上海康成生物;INSR 一抗购自英国 Abcam 公司;山羊抗兔 IgG 二抗购自美国 Southern Biotech 公司。

1.2 方法

1.2.1 真核表达质粒的构建 针对人 RNF6 的序列设计并合成 PCR 引物,在引物序列中分别添加 Hind III 酶切位点(引物 1:5'-ATC AAG CTT ATG AAT CAG TCT AGA TCG A-3')和 Sal I 酶切位点(引物 2:5'-ATC GTC GAC CCC ATT GTT TGC TAT GTT AG-3'),以人 cDNA 为模板扩增 RNF6。PCR 反应条件:98 ℃ 预变性 1 min;98 ℃ 变性 10 s,50 ℃ 复性 15 s,68 ℃ 延伸 15 s,30 个循环。将 PCR 产物和真核表达载体 pcDNA-CHA 分别用 Hind III、Sal I 双酶切,酶切产物凝胶回收纯化后用 T₄ DNA 连接酶 16 ℃ 连接过夜,连接液转化感受态大肠杆菌 DH 5 α 扩增,涂布于 LB 琼脂平板后 37 ℃ 培养过夜,挑取单克隆再在 LB 试管中 37 ℃ 振荡培养过夜。按试剂盒说明书抽提质粒,用 Hind III、Sal I 双酶切鉴定重组质粒,并送去上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.2.2 细胞培养与分组 在含 5% CO₂ 的 37 ℃ 恒温培养箱

* 基金项目:上海市黄浦区青年课题基金资助项目(2011HGG28)。 作者简介:朱丽,女,主管检验医师,主要从事检验医学方向研究。

△ 通讯作者,E-mail:tjf_jy2@163.com。

中,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养人肝癌细胞株 HepG2,每隔 1~2 d 传代 1 次。按转染试剂盒说明书进行转染。实验细胞分为 3 组:即空白对照组(不做任何处理的 HepG2)、转染空载质粒组、转染组(RNF6-4 组、RNF6-6 组)。

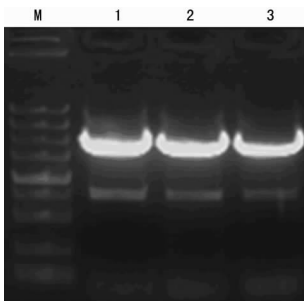
1.2.3 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 *IRS-1* mRNA 表达水平 收集转染 48 h 后的细胞及未转染细胞,用 Trizol 提取细胞总 RNA,使用 MMLV 逆转录酶逆转录为 cDNA 以各组 cDNA 为模板,加入缓冲液引物等进行 PCR,各样本重复 3 次。反应条件:95 ℃ 预变性 30 s;94 ℃ 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 1 min,40 个循环;72 ℃ 7 min。PCR 结束后加入上样缓冲液后对产物进行 1.5%琼脂糖电泳,凝胶成像系统观察结果。反应结束后根据 RT-PCR 的扩增曲线和溶解曲线分析相关基因的表达情况。

1.2.4 免疫印迹(Western blot)检测 *IRS-1* 蛋白表达水平 转染 48 h 后收集细胞及未转染细胞,用蛋白裂解液处理细胞提取蛋白样品,蛋白样品经 10%的 SDS-PAGE 分离后,恒流 200 mA 转移至 PVDF 膜上,用 5%脱脂奶粉封闭,TBST 洗膜,之后加入相应的一抗、二抗进行孵育并洗膜,ECL 试剂发光检测目标蛋白的表达情况。

1.3 统计学处理 相关数据处理运用 SPSS17.0,以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

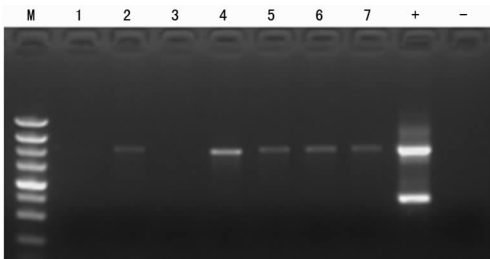
2 结 果

2.1 目的片段的获取 经 PCR 扩增后,用 1.5%琼脂糖凝胶电泳进行产物鉴定,目的片段大小与预期扩增的基因片段大小一致,见图 1。



M:DNA 标记物,从上到下分别为 5 000、3 000、2 000、1 500、1 000、750、500、250、100 bp;1~3:RNF6 扩增条带,在约 2 000 bp 有目的条带。

图 1 目的基因 RNF6 的 PCR 扩增

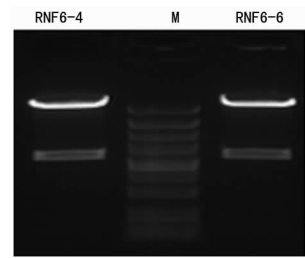


M:DNA 标记物,从上到下分别为 5 000、3 000、2 000、1 500、1 000、750、500、250、100 bp;1~7:pcDNA-CHA-RNF6 重组子菌落 PCR 扩增产物;+:阳性对照;-:阴性对照。

图 2 pcDNA-CHA-RNF6 重组载体菌落 PCR 鉴定

2.2 载体 pcDNA3.1-CHA-RNF6 的构建及鉴定 构建好的重组质粒转化 *E. coli* DH5 α ,通过菌落 PCR 初步筛选阳性克隆后,抽提阳性克隆的质粒进行 PCR 鉴定(图 2)和 *Hind*Ⅲ 和 *Sal* I 双酶切的鉴定(图 3),空载体 pcDNA-CHA 质粒的 PCR

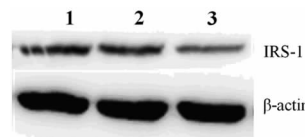
结果为阴性,7 个重组质粒的菌落 PCR 结果出现目的条带,2 个重组质粒双酶切后产生目的条带和 pcDNA-CHA 载体部分条带,这些结果证明人 RNF6 的 cDNA 序列已插入表达载体 pcDNA-CHA 中。



RNF6-4:pcDNA-CHA-RNF6-4 重组子酶切鉴定;M:DNA 标记物,从上到下分别为 5 000、3 000、2 000、1 500、1 000、750、500、250、100 bp;RNF6-6:pcDNA-CHA-RNF6-6 重组子酶切鉴定。

图 3 pcDNA-CHA-RNF6 重组载体双酶切鉴定

2.3 RT-PCR、免疫印迹法检测 *IRS-1* 的表达情况 携带 RNF6 的重组质粒转染 48 h 后 HepG2 细胞中 *IRS-1* 的 mRNA 表达明显下降($P < 0.01$),为对照组的 69%。蛋白表达情况见图 4,在 RNF6 转染细胞中,*IRS-1* 蛋白表达减少,空白对照与空载质粒 *IRS-1* 表达不变。



1:空白对照;2:转染空载质粒;3:转染 RNF6。

图 4 免疫印迹法检测 *IRS-1* 蛋白表达

3 讨 论

RNF6 是泛素-蛋白酶体系统中的一种 E3 连接酶,基因序列全长 2 058 bp,能编码 685 个氨基酸,包括 C 端的 RING-H2 指结构和 N 端的螺旋结构域。研究表明^[9],RNF6 通过 C 端的 RING-H2 指结构诱发肾上腺受体(AR)的非水解泛素化而稳定 AR,进而招募 ARA54 上调 AR 介导的基因转录活性。在糖尿病、胰岛素抵抗时,肝脏、胰腺、肌肉和脂肪组织均出现异常的信号转导^[10]。有研究表明^[11-13],细胞内蛋白降解除溶酶体途径外,还有细胞凋亡过程中的 Caspases 途径,以及降解大部分短周期寿命蛋白的泛素-蛋白酶体系统;选择性降解某种蛋白能够调节细胞增殖与分化、基因转录、细胞周期调控、抗原呈递及信号转导等各种生命过程;胰岛素信号相关蛋白的异常降解在糖尿病发病机制中发挥至关重要的作用。

本实验从 cDNA 文库中扩增出人 RNF6 基因的全长序列,并将其构建到 pcDNA3.1-CHA 真核表达载体中,重组质粒转染到 HepG2 细胞中,RT-PCR 检测到 *IRS-1* 基因的 mRNA 水平明显降低。有研究表明,机体内胰岛素高浓度或长期高水平表达,可通过胰岛素生长因子-1 受体活化丝氨酸激酶,磷酸化 Ser/Thr,进而抑制酪氨酸激酶活性磷酸化 Tyr^[14]。Pederson 等^[15]研究证实,Ser/Thr 磷酸化后的 *IRS-1*,空间构象改变易与泛素共价结合,进而被蛋白酶体降解。本研究结果显示,免疫印迹法验证泛素连接酶 RNF6 的 RING-H2 指结构行使降解功能,下调靶蛋白 *IRS-1* 水平。*IRS-1* 的泛素化可能导致胰岛素信号通路障碍,是导致 2 型糖尿病发生的分子机制,泛素化相关信号蛋白将是研究糖尿病治疗药物的新靶点。

(下转第 1386 页)

病肾病的新指标。本研究证实 UO 组, 24 h 尿液 KIM-1 的水平、肾组织 KIM-1 的相对表达量与肾小管间质损伤指数呈同方向性变化, 相关性分析示 24 h 尿液及肾组织 KIM-1 的水平与 TDI 呈正相关, KIM-1 除了早期预测急性肾损伤, 有望成为早期预测肾间质纤维化损伤的新指标。本研究发现, 24 h 尿液 KIM-1 的水平与肾组织 KIM-1 的相对表达量呈同向性变化, 并且均与 TDI 呈正相关, 尿液标本具有留取方便, 无创性等优点, 成为各项实验室检查的常用标本之一, 因此可以选用 24 h 尿液 KIM-1 水平来间接反映肾组织 KIM-1 的表达量, 从而判断肾间质纤维化的病情进展, 为早期、方便评估肾脏疾病进展提供新的诊断思路。

柚皮素是一类天然黄酮类化合物, 具有调节血压、降低血糖、调节血脂、抗菌、抗病毒、抑制肿瘤细胞生长等广泛药理作用^[11], 既往研究证实, 柚皮素对于乙醇诱导的肝脏纤维化有一定的抑制作用^[12]。本实验发现柚皮素可抑制 KIM-1 在 UO 大鼠尿液及肾组织的表达, 延缓肾小管损伤及间质纤维化的进展。

综上所述, 肾间质纤维化时尿液和肾组织中 KIM-1 的表达同向性增多, 尿液 KIM-1 有望成为早期、方便检测肾间质纤维化的新的生物学标志物, 柚皮素对于肾间质纤维化有一定的抑制作用, 但其确切分子机制尚有待于进一步研究。

参考文献

[1] Yamaguchi I, Tchao BN, Burger ML, et al. Vascular endothelial cadherin modulates renal interstitial fibrosis[J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2012, 120(1): e20-31.

[2] Prozialeck WC, Edwards JR, Lamar PC, et al. Expression of kidney injury molecule-1(Kim-1) in relation to necrosis and apoptosis during the early stages of Cd-induced proximal tubule injury[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 238(3): 306-314.

[3] Vinken P, Starckx S, Barale-Thomas E, et al. Tissue Kim-1 and urinary clusterin as early indicators of cisplatin-induced acute kidney injury in rats[J]. *Toxicol Pathol*, 2012, 40(7): 1049-1062.

[4] 王芳, 张岩, 庄垟垟, 等. 雷帕霉素对双侧输尿管梗阻再通大鼠肾脏的保护作用[J]. *医学研究杂志*, 2013, 42(3): 45-49.

[5] 陈香美, 王海燕. 提高慢性肾脏病的知晓率、治疗率和控制率减轻对国民健康的危害[J]. *中华内科杂志*, 2006, 45(6): 441-442.

[6] Xiao HB, Liu RH, Ling GH, et al. HSP47 regulates ECM accumulation in renal proximal tubular cells induced by TGF- β 1; 1 through ERK1/2 and JNK MAPK pathways[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 303(5): 757-765.

[7] Kinugasa F, Noto T, Matsuoka H, et al. Prevention of renal interstitial fibrosis via histone deacetylase inhibition in rats with unilateral ureteral obstruction[J]. *Transpl Immunol*, 2010, 23(1/2): 18-23.

[8] Hoffmann D, Bijol V, Krishnamoorthy A, et al. Fibrinogen excretion in the urine and immunoreactivity in the kidney serves as a translational biomarker for acute kidney injury[J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(3): 818-828.

[9] 孙骅, 刘志红, 王生余, 等. 马兜铃酸诱导肾小管上皮细胞损伤中 Ngal 和 Kim-1 的变化及其意义[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2007, 16(4): 340-344.

[10] 同静. 联合检测尿 KIM-1, mALB, β 2-MG 在 2 型糖尿病早期肾损伤诊断中的价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(13): 1578-1579.

[11] 杨宏亮, 田珩, 李沛波, 等. 柚皮苷及柚皮素的生物活性研究[J]. *中药材*, 2007, 30(6): 752-754.

[12] Jayaraman J, Jesudoss VA, Menon VP, et al. Anti-inflammatory role of naringenin in rats with ethanol induced liver injury[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2012, 22(7): 568-576.

(收稿日期: 2014-01-12)

(上接第 1383 页)

参考文献

[1] Yen SL, Chiu TY, Lin YC, et al. Obesity and hepatitis B infection are associated with increased risk of metabolic syndrome in university freshmen[J]. *Int J Obes (Lond)*, 2008, 32(3): 474-480.

[2] Pagliassotti MJ, Kang J, Thresher JS, et al. Elevated basal PI₃-kinase activity and reduced insulin signalling in sucrose-induced hepatic insulin resistance[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 282(1): 170-176.

[3] Myer MG Jr, Sun XJ, White MF. The IRS-1 signaling system[J]. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19(7): 289-293.

[4] Wiedmann M, Tamaki S, Silberman R, et al. Constitutive over-expression of the insulin receptor substrate-1 causes functional up-regulation of Fas receptor[J]. *J Hepatol*, 2003, 38(6): 803-810.

[5] Ham YM, Mahoney SJ. Compensation of the AKT signaling by ERK signaling in transgenic mice hearts overexpressing TRIM72[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(10): 1451-1462.

[6] Banker GA, Cowan WM. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture[J]. *Brain Res*, 1977, 126(3): 397-442.

[7] Banker GA, Cowan WM. Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell culture[J]. *J Comp Neurol*, 1979, 187(3): 469-493.

[8] Zhu L, Tong G, Chen J, et al. Cloning and identification of a novel

RNF6 transcriptional splice variant Spg2 in human development[J]. *Sci China C Life Sci*, 2008, 51(4): 302-307.

[9] Xu K, Shimelis H, Linn DE, et al. Regulation of androgen receptor transcriptional activity and specificity by RNF6-induced ubiquitination[J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(4): 270-282.

[10] Rome S, Meugnier E, Vidal H. The ubiquitin-proteasome pathway is a new partner for the control of insulin signaling[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2004, 7(3): 249-254.

[11] Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction[J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(2): 373-428.

[12] Kornitzer D, Ciechanover A. Modes of regulation of ubiquitin mediated protein degradation[J]. *J Cell Physiol*, 2000, 182(1): 1-11.

[13] Groll M, Huber R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35(5): 606-616.

[14] Rhodes CJ. Type 2 diabetes a matter of beta cell life and death[J]. *Science*, 2005, 307(5708): 380-384.

[15] Pederson TM, Kramer DL, Rondinone CM. Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation[J]. *Diabetes*, 2001, 50(1): 24-31.

(收稿日期: 2014-01-12)