

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

第四型介白素於第二型糖尿病致病機轉中所扮演的角色

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2314-B-040-025-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系

計畫主持人：張懿欣

共同主持人：黃建寧

計畫參與人員：張懿欣，黃建寧

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 12 日

行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

第四型介白素於第二型糖尿病致病機轉中所扮演的角色 (2/3)

Role of interleuin-4 in type 2 diabetic pathogenesis (2/3)

計劃編號：NSC93-2314-B-040-025

執行期限：93年8月1日至94年7月31日

主持人：張懿欣 中山醫學大學醫技系

共同主持人：黃建寧 中山醫學大學附設醫院新陳代謝科

一、中文摘要

糖尿病 (DM) 是常見的內分泌疾病，其致病機轉仍然未知。許多因素可能會導致 DM，其中以和遺傳與環境因子相關的研究最多。本實驗希望以為期 3 年之計劃從遺傳學、細胞與動物模式等角度循序漸進的深入探討 IL-4 在第二型 DM 致病機轉中所扮演的角色。首先我們在第一年執行期間 (92 年計劃，NSC92-2314-B-040-032) 鑑定第二型 DM 患者與健康個體之 IL-4 啟動子-34, -81 與 -285 基因多型性，我們發現 IL-4 啟動子-34 ($p=0.048$) 與-589 ($p=0.005$) 基因多型性在第二型 DM 與健康個體之分佈有顯著差異，而且此兩個位置的對偶基因分佈在此兩種族群差異更為顯著 ($p=0.017$ for -34, $p=0.001$ for -589)。此外，我們也在第一年計劃中發現第二型 DM 患者與健康個體週邊血液單核細胞 IL-4 的分泌能力有差異。我們在本年度計劃 (第二年) 中，以 streptozotocin (STZ) 誘導會分泌高量 IL-4 之 BALB/c 老鼠與低量 IL-4 之 C57BL/6 老鼠產生第二型 DM，比較此兩種品系 DM 發病之時間與症狀嚴重程度，進一步探討 IL-4 在 *in vivo* 環境中對第二型 DM 發病過程的影響。我們相信本計畫從遺傳學、細胞與動物模式等角度循序漸進的研

究不但可使我們了解 IL-4 在第二型 DM 致病機轉中的角色，也提供了未來發展糖尿病療法的嶄新線索。

關鍵詞：第四型介白素、第二型糖尿病

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a common endocrine disease with unknown etiology. Many factors can lead to the onset of DM, however, host genetic factors and environmental factors are the focus of discussion. We design to study the role and involvement of IL-4 in type 2 diabetic development in the genetic, animal and cellular study sequentially in this 3-year project. First of all, we characterized promoter polymorphisms of IL-4 gene at positions -34, -81 and -285 among our subjects as well as analyzed the correlation between these genotypes with type 2 DM in the first project year (NSC92-2314-B-040-032). In the first project year, the distribution of not only IL-4 -34 ($p=0.048$) and -589 ($p=0.005$) genotypes, but also the alleles ($p=0.017$ for -34 and $p=0.001$ for -589) in these 2 positions, was significantly different

between type 2 DM and control individuals. In addition, a higher IL-4 secreting ability in type 2 DM subjects was also identified. Our results in the first project year demonstrated that IL-4 plays certain roles in the pathogenesis of type 2 DM. In the second project year (this year), we further characterized the *in vivo* involvement of IL-4 to type 2 diabetic development in high IL-4 secreting BALB/c mice and low IL-4 producing C57BL/6 mice induced by streptozotocin. We believe the completion of the genetic, cellular and animal studies sequentially can lead to not only significant further understanding of the involvement of this cytokine in the development of type 2 DM but also provide a putative clue for future designing of type 2 diabetic treatment.

二、緣由與目的

糖尿病(diabetes mellitus)是指胰島素分泌不足或功能作用減低，而引起高血糖的一種慢性的新陳代謝異常疾病¹，發病原因主要是受遺傳基因和環境因素的影響。肥胖、情緒壓力、懷孕、藥物、營養失調、感染或內分泌等因素都會促使糖尿病發病。糖尿病主要分為人體不能自行分泌胰島素的第一型糖尿病和細胞對胰島素反應不佳的第二型糖尿病。第二型糖尿病是一個多因子的疾病，患者的胰臟通常能製造出足夠量或過量的胰島素，但其組織細胞卻抵抗胰島素的作用而不能有效地利用葡萄

糖作為能量的來源。

有鑑於第二型糖尿病與許多的發炎前期的細胞激素皆有密切的關聯，因此本研究室著手進行IL-4、IL-6及IL-10等發炎前期的細胞激素之研究。本實驗首先我們在第一年執行期間(92年計劃，NSC92-2314-B-040-032)發現IL-4 啟動子 -34 ($p=0.048$) 與 -589 ($p=0.005$)基因多型性在第二型DM與健康個體之分佈有顯著差異，而且此兩個位置的對偶基因分佈在此兩種族群差異更為顯著($p=0.017$ for -34, $p=0.001$ for -589)。此外，我們也在第一年計劃中發現第二型DM患者與健康個體週邊血液單核細胞IL-4的分泌能力有差異。

本年度計劃(第二年)中，以streptozotocin (STZ)誘導會分泌高量IL-4之BALB/c 老鼠與低量IL-4之C57BL/6老鼠產生第二型DM，比較此兩種品系DM發病之時間與症狀嚴重程度，進一步探討IL-4在*in vivo* 環境中對第二型DM發病過程的影響。

三、結果與討論

我們於第一年研究中觀察到第二型糖尿病患者的IL-4分泌能力較強。由於IL-4分泌能力與第二型糖尿病的相關性，使我們想了解是否由於體內高IL-4的濃度而影響到了胰臟的 β cell，進而形成第二型糖尿病。因此，我們藉著動物實驗，選擇了高IL-4(BALB/c母鼠)與低IL-4(C57BL/6母鼠)分泌的兩種品系之小鼠，來了解IL-4與第二型糖尿病的關聯。

1. 經STZ藥物誘發後，BALB/c母鼠較

C57BL/6母鼠易形成糖尿病

實驗組利用STZ 100 mg/kg的劑量腹腔注射(i.p.)，控制組則腹腔注射打入0.05 M citrate buffer (pH 4.5)後，每隔十天眼窩採血，利用血糖試紙(SureStep test strip，購自LIFESCAN公司)及血糖測試機來觀察BALB/c與C57BL/6兩種鼠別的血糖變化。實驗發現，在十天後實驗組的BALB/c母鼠血糖值便明顯的升高(306 mg/dL, SE=58.35)，相較於控制組的BALB/c母鼠與C57BL/6兩個組別的母鼠，血糖值皆與實驗前的血糖一樣維持在正常值的範圍。持續觀察至第七十天，實驗組BALB/c母鼠的血糖值仍處於高血糖(341.5 mg/dL, SE=70.9)，而其控制組與C57BL/6母鼠的兩組血糖值依然是維持在正常的範圍內。由於BALB/c母鼠體內IL-4分泌量較C57BL/6母鼠的IL-4分泌量高，因此，藉由動物實驗的結果，我們推測在高IL-4分泌的個體能較容易誘發糖尿病的產生。

2. BALB/c母鼠葡萄糖耐受性較差

在透過STZ刺激後，利用血糖試紙來觀察各組小鼠的血糖變化，發現高IL-4分泌的BALB/c母鼠誘發形成糖尿病，而低IL-4分泌的C57BL/6母鼠在我們實驗中，並未發現有受到STZ的誘發而形成糖尿病。由於我們可以在糖尿病的臨床症狀上，觀察到病患對葡萄糖的不耐性，因此本研究室也藉此觀察受STZ處理的BALB/c母鼠對葡萄糖的耐受性是否與其他組別的母鼠有所差異。我們發現，只有形成糖尿病的BALB/c母鼠在30分鐘時血糖升至最高點，其餘組別的小鼠皆在20分鐘時血糖便升至最高點。觀察60分鐘至120分

鐘時，未誘發形成糖尿病的小鼠血糖值皆已回歸到正常血糖值範圍，反觀形成糖尿病的BALB/c母鼠，其血糖仍維持在高血糖值。這也說明了在形成糖尿病的BALB/c母鼠，其胰島素的分泌與運用明顯比其餘未誘發形成糖尿病的小鼠來的差。

3. 免疫組織染色法証實 BALB/c 母鼠經藥物誘發形成第二型糖尿病

將實驗組及對照組的 BALB/c 和 C57BL/6 母鼠的胰臟組織切片後，利用免疫組織染色法來觀察各組之間胰臟型態的差異。我們在以 anti-insulin antibody 染色後，胰臟組織中 β -cell 的細胞質能被染成棕褐色，其餘的部位則為藍紫色的背景染色；而且觀察染成棕褐色的細胞型態，其細胞核較小且較聚集。在 C57BL/6 母鼠實驗組、對照組及 BALB/c 母鼠對照組的胰臟組織型態之比較，雖然其中實驗組的 C57BL/6 母鼠有以 STZ 藥物處理過，但是其組織上的型態仍舊與另外兩個對照組的組織型態相似；而在 BALB/c 母鼠實驗組的胰臟切片中，雖然也觀察到有 β -cell 的存在，但是在 β -cell 的個數上就比其他組別來的少。這也証實了 BALB/c 母鼠對於 STZ 藥物的影響較為敏感，因此 β -cell 受到破壞而使個數減少；所誘發而形成的糖尿病即為第二型糖尿病。

4. 結論

基於以上第一年與第二年的實驗結果，因為第二型糖尿病患與健康對照組之 IL-4 啟動子基因型有明顯差異，而且第二型糖尿病患之 PBMC 在經過刺激後的 IL-4 RNA 與蛋白質分泌

能力都比健康對照組高；再加上帶有較高 IL-4 分泌能力基因型的老鼠不但比帶有較低 IL-4 分泌能力基因型的老鼠較容易由藥物誘發罹患糖尿病，而且葡萄糖耐受性也較差。因此綜合上述數據，我們推測帶有較高 IL-4 分泌能力基因型而 IL-4 分泌量較高之個體可能是糖尿病的高危險群。

Kusuhara K, Nishima S, Hara T. *J Hum Genet* 1999;**44**:352-353.

四、計劃成果自評

總而言之，本研究延續了先前對 IL-4 基因多型性的發現，並對 IL-4 更深入探討。目前研究進度符合計劃中所規劃的研究目的，證實 IL-4 的基因多型性與第二型糖尿病有顯著相關。我們相信本計畫從遺傳學、細胞與動物模式等角度循序漸進的研究不但可使我們了解 IL-4 在第二型 DM 致病機轉中的角色，也提供了未來發展糖尿病療法的嶄新線索。進一步證實 IL-4 在第二型糖尿病中所參與的角色。

五、參考文獻

1. Schuster DP, Duvuuri V. *Clin Podiatr Med Surg* 2002;**19**:79-107.
2. Pickup JC, Crook MA. *Diabetologia* 1998;**41**:1241-1248.
3. Crook MA, Tutt P, Pickup JC. *Diabetes Care* 1993;**16**:57-60.
4. Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK. *Clin Exp Allergy* 1995;**25**:74.
5. Song Z, Casolaro V, Chen R, Georas SN, Monos D, Ono SJ. *J Immunol* 1996;**156**:424-429.
6. Takabayashi A, Ihara K, Sasaki Y,