

# 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：NSC92-2314-B-040-032-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：中山醫學大學醫事技術學系

計畫主持人：張懿欣

共同主持人：黃建寧

計畫參與人員：邱嚴之

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 9 月 20 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 (1/3)

### Role of interleuin-4 in type 2 diabetic pathogenesis (1/3)

計劃編號：NSC92-2314-B-040-032

執行期限：92 年 8 月 1 日至 93 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。本實驗室發現第二型 DM 患者與健康個體之第四型介白素(interleukin-4, IL-4)基因啟動子 C-589T 基因多型性有顯著差異。較多的第二型 DM 患者帶有轉錄活性較高的-589\*T 基因型，這代表第二型 DM 患者可能會分泌較多的 IL-4；此結果顯示 IL-4 C-589T 基因多型性與 IL-4 分泌能力可能與第二型 DM 形成有關。本實驗基於上述 IL-4 與第二型 DM 相關性之嶄新發現，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。首先在第一年計畫執行期間內鑑定第二型 DM 患者與健康個體之 IL-4 啟動子 -34, -81 與 -285 基因多型性，並分析上述多型性與第二型 DM 的關聯性。此外，因為 IL-4 基因的轉錄活性是調控 IL-4 分泌量的重要因子，我們也分析第二型 DM 患者與健康個體週邊血液單核細胞 IL-4 的分泌能力是否有差異。第二年計劃期間，我們將利用脂肪細胞探討 IL-4 對胰島素分泌、葡萄糖運送蛋白之表現與調控和胰島素抗

性之影響。第三年計劃中，我們將以 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，以進一步探討 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. Our preliminary study demonstrated that distribution of IL-4 C-589T genotypes was significantly different between type 2 diabetic patients and control subjects. The results suggested that IL-4 promoter C-589T polymorphism and IL-4 secreting ability were associated

with type 2 diabetes mellitus. We think the above observation is a good start for further elucidation of the role of IL-4 in type 2 DM pathogenesis since this is the first report of the significant association between IL-4 C-589T polymorphism and type 2 DM. Therefore, we design to study the role and involvement of IL-4 in type 2 diabetic development in the genetic, cellular and animal study sequentially in this 3-year project. In the first project year, we characterized promoter polymorphisms of IL-4 gene at positions -34, -81 and -285 among our subjects as well as to analyze the correlation between these genotypes with type 2 DM. In addition, since the production of IL-4 is tightly controlled at the transcription level, we also examined if there is any difference in the IL-4 secreting ability of peripheral blood mononuclear cells between subjects of type 2 DM and healthy control. In the second project year, we will investigate the effect of IL-4 to background and glucose-stimulated insulin release as well as the expression and translocation of glucose transporters and induction of insulin-resistant phenotypes in adipocytes. In the third year, we will further characterize 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 to further characterize the putative importance of IL-4 in the development of type 2 DM. 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<sup>1</sup>，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。

Pickup<sup>2</sup> 和 Crook<sup>3</sup> 等學者首先提出第二型糖尿病患者血漿中急性發炎反應物的濃度有上升現象的說法。近年來學者更發現第二型糖尿病是一個先天性免疫反應的疾病，包括 CRP 和血脂醇等急性期反應指標，以及 IL-1、IL-6 及  $\alpha$  型腫瘤壞死因子 (TNF- $\alpha$ ) 等幾個主要反應的細胞激素調節物質，在第二型糖尿病患者中皆有上升的現象。

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。由於細胞激素分泌量的高低與基因轉錄的活性相關，這促使我們想了解這些 T<sub>H</sub>2 的細胞激素，其基因多型性的分佈所造成之細胞激素分泌量的影響與第二型糖尿病病情的關聯。

IL-4 基因的啟動子有四個位置具有基因多型性，分別位於 -589 C/T、-285 C/T、-81 A/G 及 -34 C/T，其中 -589 T 對偶基因能增加 IL-4 啟動子的強度<sup>4,5</sup>。而在 IL-4 啟動子 -285 C 與 -81 A 轉變為 -285 T 與 -81 G 的基因多型性變異也可以改變啟動子的強度，使 IL-4 的基因表現量提高八倍<sup>5</sup>。本研究發現第二型糖尿病患者 IL-4 啟動子 -589 的位置具有較多的 T 對偶基因，此基因型也代表著有較高 IL-4 的分泌能力；個體生化值的比較也發現 IL-4 C/C 的基因型血液中有較低的高密度脂蛋白。這結果也使我們更想進一步了解鑑定第二型 DM 患者與健康個體之 IL-4 啟動子 -34、-81 與 -285 基因多型性，並分析上述多型性與第二型 DM 的關聯性。此外，因為 IL-4 基因的轉錄活性是調控 IL-4 分泌量的重要因子，我們也進一步分析第二型 DM 患者與健康個體週邊血液單核細胞 IL-4 的分泌能力的差異。

### 三、結果與討論

#### 1. IL-4 啟動子的基因多型性分析

##### (1) -34 C/T 與 -589 C/T 基因多型性

先前文獻的敘述，當 IL-4 啟動子 -589 的位置是 T/T 時，IL-4 啟動子 -34 的位置也會是 T/T<sup>4</sup>，同時 T 的基因型能使 IL-4 的分泌量提高。我們首先分析 IL-4 啟動子 -34 位置的基因多型性是否與 IL-4 啟動子 -589 一致。經由聚合酶連鎖反應結果顯示健康個體和

第二型糖尿病病患在 IL-4 啟動子 -589 基因型的分佈有顯著的差異 ( $p = 0.013$ )。此外，結果顯示健康個體和第二型糖尿病病患在 IL-4 啟動子 -34 基因型的分佈也有差異 ( $p = 0.05$ )。

而在對偶基因型的部份，實驗結果顯示健康個體和第二型糖尿病病患在 IL-4 啟動子 -589 對偶基因型的分佈有顯著的差異 ( $p = 0.002$ )；表示第二型糖尿病病患中，有較多 T 基因型的分佈。而在 IL-4 啟動子 -34 對偶基因型的分佈結果顯示健康個體和第二型糖尿病病患在 IL-4 啟動子 -34 對偶基因型的分佈有顯著的差異 ( $p = 0.024$ )；表示第二型糖尿病病患擁有較多的 T 基因型分佈。我們也發現個體的 IL-4 啟動子 -34 基因型與 IL-4 啟動子 -589 的基因型是近乎一致的，這情況也吻合之前文獻所發現的現象<sup>6</sup>。

##### (2) -285C/T 與 -81A/G

由於 IL-4 -285 T 與 -81 G 基因多型性的變異可以改變啟動子的強度，使 IL-4 的基因表現提高八倍<sup>5</sup>，因此本研究也觀察 IL-4 啟動子 -285 與 -81 兩個位置的基因多型性。我們實驗結果在台灣人 IL-4 啟動子 -285 與 -81 兩個位置目前尚未觀察到基因的多型性有變異性的出現。

#### 2. 第二型糖尿病病患的 PBMC 所分泌的 IL-4 較健康個體高

我們收集正常個體與糖尿病病患的血液檢體，利用 Con A 刺激從血液檢體分離出來的週邊血液單核細胞 (PBMC)，再利用酵素免疫分析法測得刺激前後細胞培養液中的 IL-4 濃度，觀察健康個體和第二型糖尿病病患

PBMC所分泌的IL-4濃度差異。實驗結果顯示第二型糖尿病病患的周邊血液單核細胞IL-4分泌的濃度(19.01 pg/mL, SE=1.27)比健康個體的周邊血液單核細胞所分泌的量(5.44 pg/mL, SE=1.42)高，具有顯著的統計差異( $p < 0.001$ )。這也與我們在基因多型性的研究中，具有IL-4 T/T基因型的第二型糖尿病病患，其IL-4有較強之基因轉錄能力的結論吻合。

### 3. IL-4 RNA的表現

上述實驗結果發現第二型糖尿病個體的IL-4濃度的確較健康的受試者來的高，但是此現象是否是因為PBMC受到了Con A刺激，使得細胞內IL-4的RNA大量表現並轉譯成蛋白質的結果？因此我們亦利用RT-PCR的技術，來觀察第二型糖尿病病患與健康個體的周邊血液單核細胞在Con A刺激之後所產生的IL-4 RNA的表現量。實驗結果顯示第二型糖尿病病患未經由Con A刺激的PBMC IL-4 RNA較Con A刺激後的PBMC IL-4 RNA少，健康個體的組別也有相同的情況。這也說明了ELISA所測得的IL-4濃度上升是由於PBMC接受到了Con A的刺激，進而轉譯IL-4蛋白質；而Con A刺激的樣本產物會較未受Con A刺激的樣本產物來的多。此外，經由數位化初步的定量比較，我們仍能在固定RNA量並合出IL-4 cDNA後看到第二型糖尿病患IL-4 cDNA的表現量較健康個體高。這也暗示著IL-4的上升與第二型糖尿病病程有著密切的關聯。

### 4. 結論

基於以上實驗結果，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；因此我們推論帶有較高IL-4分泌能力基因型之個體可能是糖尿病的高危險群。

### 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。我們將在接下來的實驗中將進入動物實驗模式，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, Kusuhara K, Nishima S, Hara T. *J Hum Genet* 1999; **44**:352-353.