

17 β -雌二醇和孕酮对人成骨细胞胰岛素受体底物家族的作用

黄秋霞 周后德 廖二元 杜巍

摘要: 目的 观察 17 β -雌二醇和孕酮对人成骨细胞和人成骨肉瘤 MG-63 细胞胰岛素受体底物家族 (insulin receptor substrate IRS) 表达的影响。探讨雌、孕激素对骨的作用机制。方法 从正常骨折病人骨组织中分离正常人成骨细胞, 经纯化和培养后, 用 Van Gieson 行 I 型胶原染色、钙钴法行碱性磷酸酶染色、茜素红行钙化结节染色进行成骨细胞鉴定。用半定量 RT-PCR 检测细胞 IRS-1、-2、-3 mRNA 表达量。结果 分离和培养的细胞具有正常人成骨细胞的形态, 能分泌 I 型胶原、碱性磷酸酶并形成钙化结节。17 β -雌二醇和/或孕酮均不影响人成骨细胞和 MG-63 细胞 IRS-1mRNA 的表达 ($P>0.05$), 可诱导人成骨细胞和 MG-63 细胞 IRS-2 mRNA 的表达上调 ($P<0.05$), IRS-3 mRNA 的表达下调 ($P<0.05$)。二者联合干预时作用明显加强 ($P<0.01$)。结论 17 β -雌二醇和孕酮均不影响 IRS-1 mRNA 的表达, 但可使人成骨细胞和 MC-63 细胞 IRS-2 mRNA 的表达上调, IRS-3mRNA 的表达下调, 二者联合干预具有正性协同效应。不同的 IRS 家族成员对同一细胞具有效应的多样性。

关键词: 成骨细胞; 人成骨肉瘤 MG-63 细胞; 胰岛素受体底物; 17 β -雌二醇; 孕酮

Effects of 17 β -estradiol and progesterone on insulin receptor substrate family in human osteoblasts
HUANG Qiuxia, ZHOU Houde, LIAO Eryuan, et al. Institute of Endocrinology & Metabolism, the Second Xiangya Hospital, Central South Medical University, Changsha 410011, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of 17 β -estradiol (E_2) and progesterone (P) on the expression gene of insulin receptor substrate (IRS) family in cultured normal human osteoblast-like cells (HOB) and human osteosarcoma cell line MG-63 and its mechanism. **Methods** Human osteoblasts were isolated from bone tissues in subjects free of osteoporotic fractures. Alkaline phosphatase, mineralized nodes, and type I collagen in osteoblasts were tested by modified staining techniques of Gomori's, alizarin red, and Van Gieson, respectively. Semi-quantitative RT-PCR was used to measure on the expression of E_2 and P mRNA of IRS family. **Results** No influence was found of E_2 and P on IRS-1 mRNA expression in MG-63 cells or HOB. The expression of IRS-2 mRNA ($P<0.05$) was increased and the expression of IRS-3 mRNA was decreased by E_2 and/or P ($P<0.05$). This effect became more significant with the combination of E_2 and P. **Conclusions** E_2 and P have no effects on the expression of IRS-1 mRNA in MG-63 cells and HOB, but could up-regulate the expression of IRS-2 mRNA and down-regulate the expression of IRS-3 mRNA. Combined intervention with E_2 and P can positively create synergistic effects on expressions of IRS-2 and IRS-3.

Key words: Insulin receptor substrate; Human osteosarcoma cell line MG-63; Human osteoblasts; 17 β -estradiol; Progesterone

IRS 是胰岛素受体 (insulin receptor IR) 和胰岛素样生长因子-1 受体 (insulin like growth-1 receptor IGF-1R) 酪氨酸蛋白激酶的主要细胞内底

物。主要连接 IR、IGF-1R 和多种效应分子, 并直接或间接介导了细胞对胰岛素、胰岛素样生长因子-1、白介素、干扰素、肿瘤坏死因子等的反应^[1,2]。最近发现 IRS 是骨代谢的调节因子, 在骨的发育、成熟和代谢转换中起着重要作用。IRS-1 仅在成骨细胞上表达, 而 IRS-2 在成骨及破骨细胞都有表达。IRS-1 由成骨细胞分泌, 通过成骨细胞与破骨细胞

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30400218)

作者单位: 410011 长沙, 中南大学湘雅二医院内分泌研究所 (第一作者现在广东省东莞市人民医院内分泌研究所)

通讯作者: 廖二元, Email: houde.zhou@xysm.met

之间的偶联而维持破骨细胞的形成与骨吸收, IRS-2 在骨形成方面起着主导作用, 两者之间的平衡可能在骨矿化与骨转换中起着重要作用^[3,4]。雌、孕激素对骨的作用机制尚未完全阐明。我们通过研究具有正常人成骨细胞表型特征的人成骨肉瘤 MG-63 细胞株和人成骨细胞 IRS 家族的表达及 17 β -雌二醇和孕酮对其表达影响, 旨在探讨雌激素和孕激素对人成骨细胞胰岛素受体底物基因表达的影响及作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人成骨肉瘤 MG-63 细胞株为本所细胞库保存 (ATCC 号: CRL-1427), 细胞株为 100~110 代的细胞。人成骨肉瘤 MG-63 细胞株用无酚红的 MEM 培养液 (Sigma 公司) 培养, 含 10% FBS、抗坏血酸 50 μ g/ml、青霉素 50U/ml、庆大霉素 50 μ g/ml。每 3d 换液 1 次, 细胞汇片后用 0.25% 胰酶-EDTA 消化, 按 5×10^5 个细胞/瓶接种至 25cm² 培养瓶中。

外科手术取正常成人 (30~50 岁无骨代谢疾病的骨折患者) 松质骨 (髌骨、股骨头和肋骨), 去除周围结缔组织, 剪成 1mm $\times$ 1mm $\times$ 1mm 大小碎粒, PBS 冲洗振荡 3 次, 加入 1mg/ml IV 型胶原酶 (Sigma 公司) 37 $^{\circ}$ C 震荡消化, 待松质骨变白并呈蜂窝状, 加入含 20% FBS 的 MEM 终止消化, 再用含 10% FBS 的 MEM 洗涤 3 次, 待洗液中不含细胞时, 将骨片贴于 25cm² 培养瓶, 加入 MEM 培养液 (含 15% FBS、抗坏血酸 50 μ g/ml、青霉素 50U/ml、庆大霉素 50 μ g/ml), 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养。2d 后换液, 以后每 3d 换液 1 次。培养约 15d 后, 可见细胞游出, 约 25d 后达汇片, 用 0.25% 胰酶-EDTA 消化, 再接种 25cm² 培养瓶, 细胞数为 5×10^5 个/瓶。用于细胞功能鉴定及进一步研究的细胞均为第二、三代细胞。

1.2 正常人成骨细胞功能鉴定

原代正常人成骨细胞汇片后, 用 0.25% 胰酶-EDTA 消化液消化, 以 3×10^5 /ml 密度接种于 6 孔板中, 每隔两日用 MEM 培养液 (含 15% FBS、抗坏血酸 50 μ g/ml) 换液。用于观察矿化结节形成的细胞, 在接种后第 6d 开始, 每次换液时, 在上述 MEM 培养液中另加入 10mM β -磷酸甘油钠 (β -sodium glycerophosphate)^[7]。第 20d 时进行细胞功能鉴定。

1.2.1 I 型胶原染色: 细胞用 PBS 洗 3 次, 4% 多

聚甲醛固定 10min, Weigert 铁苏木素染液染色 5min, Van Gieson 苦味酸酸性复红染液染色 5min, 95% 乙醇快速分化、脱水, 倒置显微镜下观察并摄像。

1.2.2 碱性磷酸酶染色: 细胞固定后入孵育液 (0.5% β -磷酸甘油、0.5% 巴比妥钠、0.9% 氯化钙、0.04% 硫酸镁), 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 6h, 2% 硝酸钴 (cobaltous nitrate) 作用 5min, 1% 硫化胺处理 1min, 乙醇脱水, 镜下观察并摄像

1.2.3 矿化结节染色: 细胞固定后, 用 0.1% 茜素红 (alizarin red-S) 染色 5min, 蒸馏水洗 3 次, 乙醇脱水, 镜下观察并照像。

1.3 细胞干预实验

人成骨肉瘤 MG-63 细胞株细胞培养于 25cm $\times$ 25cm 培养瓶中用含 10% FBS 无酚红 MEM 培养液培养, 每 3d 换液 1 次, 满瓶贴壁后 6d 换 1% BSA 无酚红 MEM 培养液培养 2d, 再用干预培养液 17 β -雌二醇 10^{-8} mol/L、孕酮 10^{-8} mol/L、17 β -雌二醇 10^{-8} mol/L + 孕酮 10^{-8} mol/L (培养 24h, 均用 1% BSA 无酚红含 MEM 培养液配置)。空白对照用 1% BSA 无酚红 MEM 培养液培养。

正常人成骨细胞接种于 25cm² 培养瓶, 每 2d 换液 1 次, 细胞满底 6d 后 1% BSA 无酚红 MEM 培养液培养 2d, 再用干预培养液 17 β -雌二醇 10^{-8} mol/L、孕酮 10^{-8} mol/L、17 β -雌二醇 10^{-8} mol/L + 孕酮 10^{-8} mol/L (培养 24h)。空白对照用 1% BSA 无酚红 MEM 培养液培养。

1.4 引物设计

表 1 引物序列表

扩增基因	mRNA 引物序列 (5 $\rightarrow$ 3)	产物长度
IRS-1		
正向:	cttctgtcagggtgtccatcc	311bp
反向:	ctctgcagcaatgcctgtt	
IRS-2		
正向:	cctcacctgtagtgccttc	373bp
反向:	atgtagtcggagagcggaga	
IRS-3		
正向:	gcaaaggttcagagacagc	322bp
反向:	ggatttcatatgggtcggg	
β -actin		
正向:	cctgcctttgcgatcc	620bp
反向:	ggatcttatgaggtagtcagtc	

1.5 半定量 RT-PCR 测定细胞 IRS-1、IRS-2、-3m RNA

用 Trizol 按操作说明方法提取细胞总 RNA。用 Promage 公司的 RT-PCR 试剂盒, 在 Gene-

Amp2400PCR 扩增仪上进行 RT-PCR。引物序列及扩增条件由 Primer-3 在线引物软件设计。扩增条件为: IRS1: 25mmol MgCl_2 1.7 μl , 循环数 32, 在指数增长期内, 退火温度 57 $^{\circ}\text{C}$ 。IRS-2: 25mmol MgCl_2 1.8 μl , 循环数 35, 在指数增长期内, 退火温度 55 $^{\circ}\text{C}$ 。IRS-3: 25mmol MgCl_2 1.6 μl , 循环数 32, 在指数增长期内, 退火温度 56 $^{\circ}\text{C}$ 。同时扩增 β actin 基因作为内对照。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后拍照。

1.6 统计学方法

各实验独立重复 3 次以上, 重复性好。所选图表为重复实验的结果之一。数据表示用 $\bar{x} \pm s$, 数据结果采用 SPSS11.0 软件进行统计, 组间比较用 ANOVA 分析。

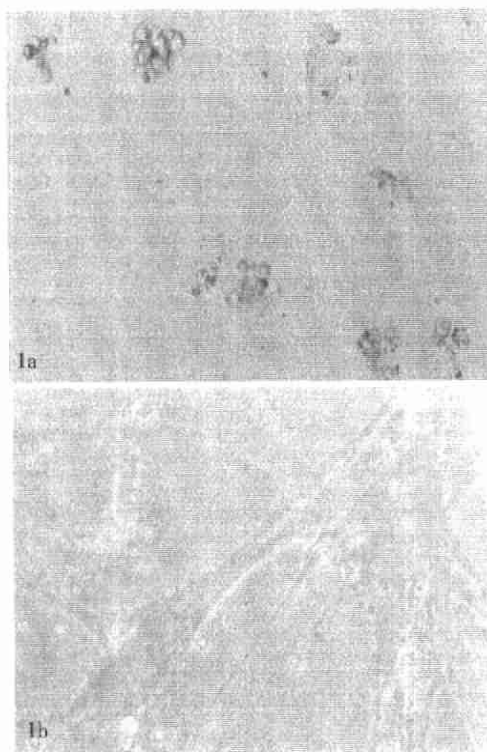


图 1 人成骨细胞的镜下形态 1a $\times 100$
1b $\times 200$

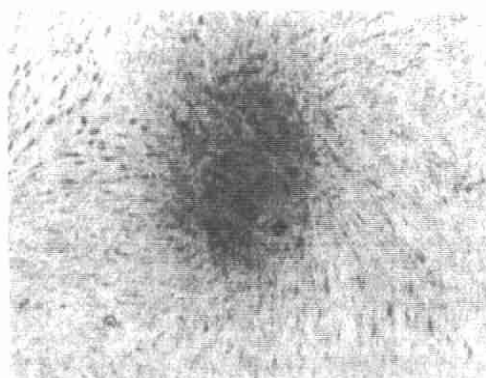


图 2 I 型胶原染色 $\times 100$

2 结果

2.1 正常人成骨细胞功能鉴定

用改良的胰酶—胶原酶序贯消化后的骨碎片接种在培养瓶中, 一周可见骨碎片周围有细胞游出, 三周细胞汇片可传代。镜下观察细胞呈类梭形、多边形、纺锤形、立方型, 核呈圆形。符合成骨细胞形态特征 (见图 1)。在成骨细胞的增殖期, 细胞合成 I 型胶原, 然后开始矿化。Van Gieson 苦味酸酸性复红染液染色呈棕红色, 这说明细胞保持了合成基质蛋白的功能 (见图 2)。用改良的钙钴法 (Gomori 法) 染色显示细胞内棕黑细微颗粒, 说明细胞能够合成碱性磷酸酶 (见图 3)。成骨细胞 ALP 活性增高表明骨基质的成熟。成骨细胞在维生素 C、 β -磷酸甘油钠作用下可使胞外基质矿化, 形成多个矿化结节, 进入骨基质的矿化阶段。茜素红染色呈棕红色。矿化功能是成骨细胞完全分化成熟的标志 (见图 4)。

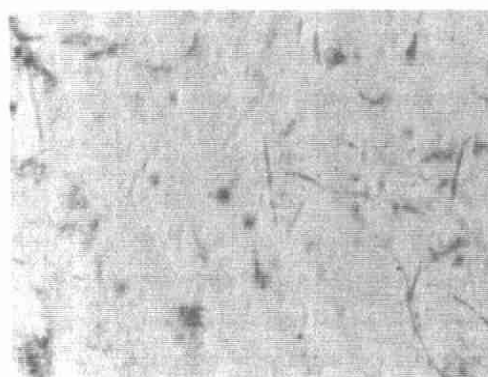


图 3 碱性磷酸酶染色 $\times 100$

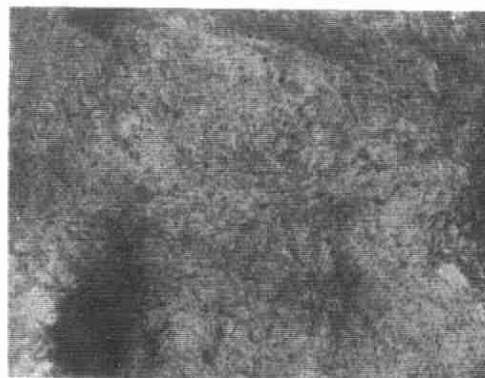
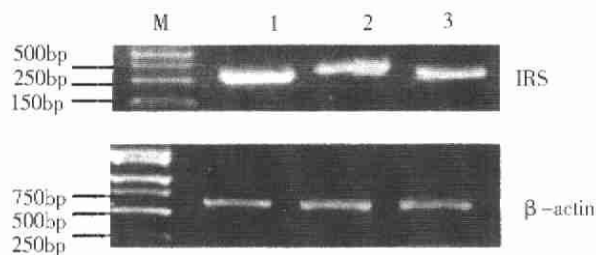


图 4 矿化结节染色 $\times 100$

2.2 人成骨肉瘤 MG-63 细胞和正常人成骨细胞 IRS mRNA 的表达

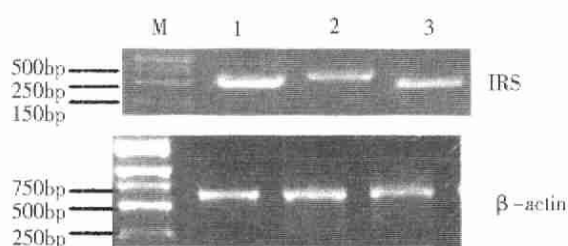
RTP-CR 结果显示人成骨肉瘤 MG-63 细胞和正常人成骨细胞均有 IRS-1、-2、-3 mRNA 的表达,

以 IRS-1 表达丰度最高, IRS-3 表达丰度最低。其中 IRS-1、-2、-3 在 MG-63 细胞中表达丰度较在正常人成骨细胞中的表达丰度稍高 (见图 5, 6)。



M 为分子量标准, 下同; 1 为 IRS-1; 2 为 IRS-2; 3 为 IRS-3

图 5 IRS mRNA 在 MG-63 细胞的表达



1: IRS-1; 2: IRS-2; 3: IRS-3

图 6 IRS mRNA 在 HOB 中的表达

2.3 17β-雌二醇和孕酮对人成骨肉瘤 MG-63 细胞和人成骨细胞 IRS mRNA 的影响

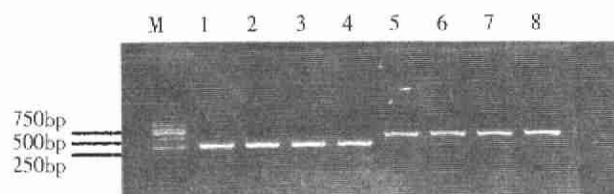
用 10^{-8} mol/L 17β-雌二醇和 10^{-8} mol/L 孕酮干预人成骨肉瘤 MG-63 细胞和人成骨细胞, 结果显示: 不管是 17β-雌二醇和孕酮单独或联合干预均不影响人成骨肉瘤 MG-63 细胞和正常人成骨细胞 IRS-1mRNA 的表达 (见图 7, 8)。



1 和 5 为对照组; 2 和 6 为 E_2 组; 3 和 7 为 P 组; 4 和 8 为 P+ E_2 组; 1、2、3、4 为 IRS-1mRNA 组; 5、6、7、8 为 β-actin mRNA 组

图 7 17β-雌二醇 10^{-8} mol/L 和孕酮 10^{-8} mol/L 对

MG-63 IRS-1 mRNA 表达的影响



1 和 5 为对照组; 2 和 6 为 E_2 组; 3 和 7 为 P 组; 4 和 8 为 P+ E_2 组; 1、2、3、4 为 IRS-1 mRNA 组; 5、6、7、8 为 β-actin mRNA 组

图 8 17β-雌二醇 10^{-8} mol/L 和孕酮 10^{-8} mol/L 对

HOB IRS-1 mRNA 表达的影响

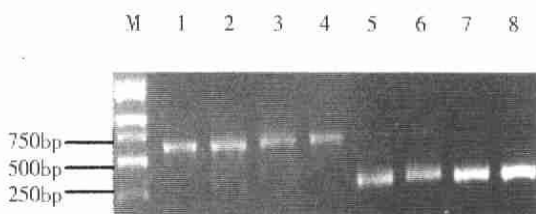
17β-雌二醇和孕酮可使 MG-63 细胞 IRS-2mRNA 的表达上调, 分别为对照组的 $(421 \pm 68)\%$ ($P < 0.05$), $(327 \pm 54)\%$ ($P < 0.05$)。两者联合干预具有正性协同效应, 为对照组的 $(494 \pm 72)\%$ ($P < 0.01$)。(见图 9)。17β-雌二醇和孕酮干预人成骨细胞, IRS-2mRNA 的表达分别为对照组的 $(386 \pm 48)\%$ ($P < 0.05$), $(319 \pm 37)\%$ ($P < 0.05$)。两者联合干预具有正性协同效应, 为对照组的 $(452 \pm 58)\%$ ($P < 0.01$)。(见图 10)。



1 和 5 为对照组; 2 和 6 为 E_2 组; 3 和 7 为 P 组; 4 和 8 为 P+ E_2 组; 1、2、3、4 为 β-actin mRNA 组; 5、6、7、8 为 IRS-2mRNA 组

图 9 17β-雌二醇 10^{-8} mol/L 和孕酮 10^{-8} mol/L

对 MG-63 IRS-2 mRNA 表达的影响



1 和 5 为对照组; 2 和 6 为 E_2 组; 3 和 7 为 P 组; 4 和 8 为 P+ E_2 组; 1、2、3、4 为 β-actin mRNA 组; 5、6、7、8 为 IRS-2mRNA 组

图 10 17β-雌二醇 10^{-8} mol/L 和孕酮 10^{-8} mol/L

对 HOB IRS-2 mRNA 表达的影响

17β-雌二醇和孕酮可使 MG-63 细胞 IRS-3mRNA 的表达下调, 分别为对照组的 $(64.7 \pm 7.5)\%$ ($P < 0.05$), $(55.2 \pm 6.4)\%$ ($P < 0.05$)。二者联合干预为对照组的 $(36.8 \pm 5.4)\%$ ($P < 0.01$) (见图 11)。17β-雌二醇和孕酮干预人成骨细胞, IRS-2mRNA 的表达分别为对照组的 $(56.8 \pm 6.4)\%$ ($P < 0.05$), $(47.6 \pm 5.4)\%$ ($P < 0.05$), 联合干预为对照组的 $(36.8 \pm 3.7)\%$ ($P < 0.01$) (见图 12)。

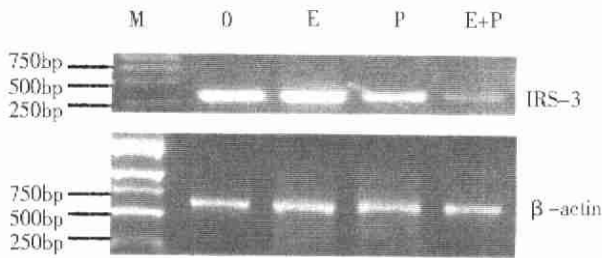


图 11 17 β -雌二醇 10^{-8} mol/L 和孕酮 10^{-5} mol/L 对 MG-63 IRS-3 mRNA 表达的影响

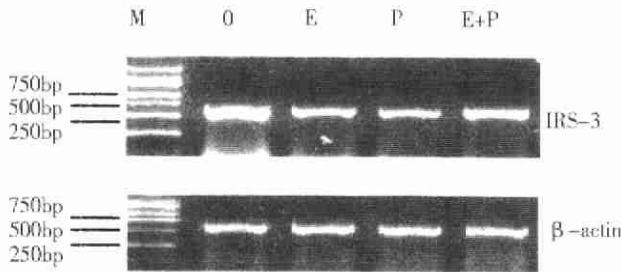


图 12 17 β -雌二醇 10^{-8} mol/L 和孕酮 10^{-5} mol/L 对 HOB IRS-3 mRNA 表达的影响

3 讨论

成骨细胞体外培养实验显示, 成骨样细胞在分化过程中能从增殖活跃细胞分化为周围有矿化骨基质的成熟成骨细胞。成骨细胞分化分为 3 个阶段: 细胞增殖、骨基质成熟与骨基质矿化阶段^[5,6]。在细胞增殖阶段, 细胞合成大量 I 型胶原, 为骨基质成熟与骨基质矿化提供基质网架。骨基质成熟期, ALP 活性最高, 表明骨基质的成熟。骨基质矿化阶段, BGP 基因的表达明显增加, 细胞有多个骨结节形成, 进入骨基质矿化阶段。I 型胶原、ALP 的合成以及矿化结节的形成是成骨细胞的表型特征, 这也是我们进行细胞鉴定的依据。本实验直接取材正常成人的髌骨、股骨头和肋骨的松质骨, 采用胶原酶法获得人的成骨细胞, 进行细胞形态、碱性磷酸酶染色、I 型胶原染色和钙化结节染色鉴定, 结果显示我们所分离、培养的细胞具有成骨细胞的表型特征, 符合研究的需要。

据 IRS 分布、表达及功能不同, 目前发现哺乳动物的 IRS 家族主要有 3 个成员: IRS-1, IRS-2, IRS-3^[7]。我们应用 PT-PCR 技术首次发现正常人成骨细胞和 MG-63 细胞上均存在 IRS-1、-2、-3mRNA 的表达, 其中以 IRS-1mRNA 的表达丰度最高, IRS-3mRNA 的表达丰度最低。这说明 MG-63 细胞可作为正常人成骨细胞模型来研究成骨细胞的基因调控及功能特点。且在分化早期的成骨细胞株 MC-63 细胞上, IRS-1、-2、-3mRNA 表达丰度均大于正常人成骨细胞

的表达丰度。说明 IRS 家族还可能在成骨细胞的发育过程中起着重要作用, 其表达量与成骨细胞分化、发育的不同阶段相关。

本实验中我们发现雌激素、孕激素可上调人成骨细胞 IRS-2 mRNA 的表达。人成骨细胞上存在雌激素、孕激素核受体。IRS-2 基因增强子上存在孕激素可诱导性反应元件, 因而 IRS-2 基因可作为孕激素直接的靶基因。孕激素通过孕激素核受体与位于靶基因启动子或增强子上的孕激素反应元件结合, 通过在基因转录过程中起主要作用的 RNA 聚合酶 II 而刺激靶基因的转录^[8]。IRS-2 基因启动子含有多个转录因子的结合位点, 能够与广泛表达的转录因子 SP-1 因子 (stressprotein-1)、AP-2 因子 (activatorprotein-2)、CCAAT 盒结合。雌激素通过对 SP-1 因子、AP-2 因子、CCAAT 盒转录因子的调节, 这些反式作用因子再分别与 IRS-2 基因上游启动子中的多个 GGGCGG 序列、CCSCRGGC 序列、CCAAT 序列结合, 从而启动 IRS-2 基因的转录^[9]。我们推测雌、孕激素通过两种不同的途径来诱导成骨细胞 IRS-2 mRNA 表达上调是雌、孕激素具有正性协同效应的主要原因。

在本实验中我们还发现成骨细胞 IRS-1mRNA 的转录水平不受雌、孕激素影响。尽管 IRS-1 和 IRS-2 属于 IRS 家族, 它们可在许多细胞上共同表达, 存在结构和功能上某些的一致^[10-11], 但它们还有许多结构和功能上的差别。在 IRS 基因家族中, 赋予诱导功能的调节元件在进化过程中没有完全保持一致。IRS-1 基因的调控区没有发现孕激素反应元件。虽然成骨细胞 IRS-1 基因上存在雌激素转录因子 AP-1 及与孕激素启动子高度同源域, 但雌、孕激素受体占领 IRS-1 基因上的反应元件不足以有效地诱导 IRS-1 的转录^[12]。

本研究还显示雌激素、孕激素可下调人成骨细胞 IRS-3 mRNA 的表达, 两者联合干预具有正性协同效应。IRS-3 能够核移位, 具有转录活性。IRS-3 酪氨酸磷酸化结合区第 192-223 位氨基酸残基对核异位起着关键的作用。我们推测雌激素、孕激素通过其核受体调节 IRS-3 基因的表达^[13]。但具体机制还有待进一步研究。

IRS-1 主要在维持骨转换中起重要作用。IRS-1 鼠的成骨细胞酪氨酸蛋白不能磷酸化, 影响成骨细胞的增殖和分化, 使成骨能力下降。IRS-1 成骨细胞上破骨细胞的分化活化因子-核因子 κ B 活化因子受体配体 (receptor activator of nuclear factor-Bligand RANKL) 也不能被诱导, 从而影响破骨细胞形成与

分化。IRS-1. 鼠出现骨转换率下降的低骨量, 它的骨形成和骨吸收都下降^[3]。而 IRS-2 在促进骨形成、抑制骨吸收中起重要作用。IRS-2 小鼠的骨形成下降。骨基质合成受影响, 如 I 型胶原酶、碱性磷酸酶、骨钙素、骨桥蛋白等水平都是下降的, RANKL 和基质金属蛋白酶-13 (matrix metalloproteinase-13 MM P-13) 是增加的, 使骨吸收增加。IRS-2. 鼠出现骨转换增加的低骨量, 骨形成下降而骨吸收增加^[4]。IRS-3 对骨代谢的作用目前还不清楚, 但 IRS 之间还存在相互作用, IRS-3 通过抑制 IRS-1 和 IRS-2 的功能而成为 IGF-1 的负向调节因子^[14]。IRS-3 可能通过对 IRS-1 及 IRS-2 的相互影响而对骨代谢发挥作用。

综上所述, 17 β -雌二醇和孕酮对骨代谢的调节可能主要是通过上调 MG-63 细胞和正常人成骨细胞 IRS-2 基因的表达, 从而影响 RANKL 的诱导, 促进骨的形成, 抑制骨的吸收, 两者联合干预具有正性协同效应。这可能是雌、孕激素联合治疗防治绝经后骨质疏松的又一新的作用机理。

【参 考 文 献】

- [1] Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, et al. White MF Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 1998, 391 (6670): 900-994.
- [2] Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR, et al. Protein-protein interaction in insulinsignaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, 1999, 103 (7): 931-943.
- [3] Ogata N, Chikazu D, Kubota N, et al. Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. *J Clin Invest*, 2000, 105 (7): 935-943.
- [4] Akune T, Ogata N, Hoshi K, et al. Insulin receptor substrate-2 maintains predominance of anabolic function over catabolic function of osteoblasts. *J Cell Biol*, 2002, 159 (1): 147-156.
- [5] Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev*, 1993, 14 (4): 424-422.
- [6] Aubin JE, Liu F, Bilezikian JP, et al. Principles of Bone Biology. Academic Press, San Diego, 1996, 51-68.
- [7] Sesti G, Federici M, Hribal ML. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB*, 2001, 15 (12): 2099-2111.
- [8] Vassen L, Wegrzyn W, Klein-Hitpass L. Human insulin receptor substrate-2 (IRS-2) is a primary progesterone response gene. *Mol Endocrinol*, 1999, 13: 485-494.
- [9] Vassen L, Wegrzyn W, Klein-Hitpass L, et al. Human insulin receptor substrate-2: gene organization and promoter characterization. *Diabetes*, 1999, 48 (9): 1877-1880.
- [10] Sun XJ, Pons S, Wang LM, et al. The IRS-2 gene on murine chromosome 8 encodes a unique signaling adapter for insulin and cytokine action. *Mol Endocrinol*, 1997, 11: 251-622.
- [11] Bernal D, Almind K, Yenush L, et al. Insulin receptor substrate-2 amino acid polymorphisms are not associated with random type 2 diabetes among Caucasians. *Diabetes*, 1998, 47: 976-979.
- [12] Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR, et al. Protein-protein interaction in insulinsignaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, 1999, 103: 931-943.
- [13] Kabuta T, Hakuno F, Asano T. Insulin receptor substrate-3 functions as transcriptional activator in the nucleus. *J Biol Chem*, 2002, 277: 6846-6851.
- [14] Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM. Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4. impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 26-38.