维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2007年第16卷第5期
J Regional Anat & Operative Surg, 2007, Vol. 16, No. 5

·论 著·

骨形成蛋白-9于2型糖尿病时在肝组织中的表达

郑宏庭,方 芳,邓华聪,陈 卫 (第三军医大学附属新桥医院内分泌科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 研究2型糖尿病鼠肝组织骨形成蛋白-9(bone morphogenetic proteins-9,BMP-9)基因转录及蛋白表达的变化。**方法** 将大鼠随机分为2型糖尿病模型组与正常对照组,分别于造模后5、10、20 d处死,以RT-PCR及Western-blot对肝组织BMP-9基因转录及蛋白表达水平进行检测与分析。**结果** 2型糖尿病模型组BMP-9基因转录及蛋白表达水平与正常组相比均显著性降低($P<0.05$);并且2型糖尿病大鼠5、10、20 d处死组BMP-9基因转录及蛋白表达水平呈逐步下降趋势。**结论** 2型糖尿病大鼠肝组织BMP-9基因转录及蛋白表达水平较正常显著降低,这一变化可能与2型糖尿病的发生发展相关。

[关键词] 骨形成蛋白-9;2型糖尿病;肝组织
[中图分类号] R587.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2007)05-0299-03

Expressions of bone morphogenetic proteins-9 in liver tissue of type 2 diabetic rats

ZHENG Hong-ting, FANG Fang, DENG Hua-cong, CHEN Wei (Department of Endocrinology, Xinqiao Hospital, Third Millitary Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study changes of bone morphogenetic proteins (BMP)-9 gene transcription and protein expression in liver of type 2 diabetic rats. **Methods** Totally 20 Wistar rats were selected and randomly devided into type 2 diabetic model group and normal control group. Rats were killed at corresponding time point, and then BMP-9 gene transcription and protein expression in liver were detected by RT-PCR and Western-blot analysis. **Results** BMP-9 gene transcription and protein expression in type 2 diabetic model group were significantly lower than that in the normal control group($P<0.05$). **Conclusion** The BMP-9 gene transcription and protein expression in liver of type 2 diabetic rats are significantly lower. These changes may be associated with the production and progression of type 2 diabetes mellitus.

Keywords: bone morphogenetic proteins-9; type 2 diabetes mellitus; liver tissue

糖尿病以胰岛素绝对或相对缺乏引致各种代谢紊乱为主要特征,其病因尚未完全阐明。随着研究的逐步深入,越来越多的致病因素纳入了研究者的视野。近期,通过高通量功能基因组筛选,Groop等发现骨形成蛋白-9(bone morphogenetic proteins-9,BMP-9)与糖、脂代谢过程中某些关键酶的表达调控相关,提示BMP-9可能是一种新的代谢调节因子[1]。据此推测,BMP-9编码基因也许是糖尿病发生过程中被忽略的又一重要因素,研究其与糖尿病的关联具有重要的意义。本研究以2型糖尿病大鼠为模型,初步探讨2型糖尿病鼠肝脏中BMP-9基因表达的变化及其意义。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂

Wistar大鼠购自第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所实验动物中心,雄性20只,清洁级,年龄6~8周,质量180~220 g。链脲佐菌素(streptozotocin,STZ,Sigma公司)、TriPure TM Isolation Reagent Kit(Boehringer Mannheim公司)、BIO-RAD凝胶电泳装置及凝胶扫描分析系统(美国)、抗大鼠BMP-9单克隆抗体(Dr. Harvery惠赠)、二抗购自Southern Biotechnology公司。

1.2 模型制备

Wister大鼠分为2型糖尿病模型组15只与正常对照组5只。所有大鼠实验前均经适应性饲养1周,并按屏蔽环境内动物实验观察与操作规范进行实验[2]。2型糖尿病模型建立参照郭啸华等人方法[3]:先以高热量饲料(基础饲料加蔗糖、炼猪油等混合而成,总热量18.9 kJ/g,脂肪17.63%,碳水化合物50.64%,蛋白质13%)喂养4周,而后按30 mg/kg体重剂量予以STZ(柠檬酸钠缓冲液配成0.25%)腹腔注射,继续饲以高热量饲料4周,以随机血糖大于11.1 mmol/L作为糖尿病成模标准。15只模型组大鼠均满足上述标准,制模成功后随机分为5 d处死组、10 d处死组与20 d处死组,每组5只,于相应时间分别予以处死,取肝组织用于实验。正常对照组则予以相同剂量生理盐水腹腔注射,饲以普通饲料,并于20 d时处死,取肝组织用于实验。

1.3 血糖测定

上午10:00采大鼠尾静脉血用LifeScan血糖仪测定血糖。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30070356)
[作者简介] 郑宏庭(1974-),男,重庆市人,讲师,博士,主要从事糖尿病及其并发症方面的研究。电话:(023)68774625
[收稿日期] 2007-06-15 [修回日期] 2007-08-25

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.4 RT-PCR

大鼠肝组织总RNA提取采用TriPure TM Isolation Reagent Kit,按试剂盒说明书进行,所有反应均以β-actin为内参照,并处于同一扩增条件下。引物序列如下:β-actin上游5'-GCATGGGTCAGAAGGAT-3',下游5'-AAGGAAGGCTGGAAGAG-3';BMP-9上游5'-TCCCCACCGACTTGTTCTTC-3',下游5'-GAGAGTCAGCTGGGAGCTTGA-3'。反应产物于15 g/L琼脂糖凝胶电泳,BIO-RAD凝胶扫描分析,以目的基因与β-actin扩增产物电泳条带亮度面密度比值定量BMP-9基因转录水平。

1.5 Western-blot

经SDS-PAGE,电转移至PVDF膜,用封闭液封闭2 h,加入适量抗鼠BMP-9单克隆抗体(稀释度1:2 000),室温反应2 h,弃封闭液与抗体,TTBS洗3次,每次10 min,加适量二抗(稀释度1:5 000),室温反应1 h,TBS洗4次,每次5 min,ECL显色。

1.6 统计学分析

采用SPSS 10.0分析软件,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析及均数间比较,显著性差异标准$P<0.05$。

2 结果

2.1 一般情况

20只大鼠实验过程中均未死亡,全部进入结果分析。

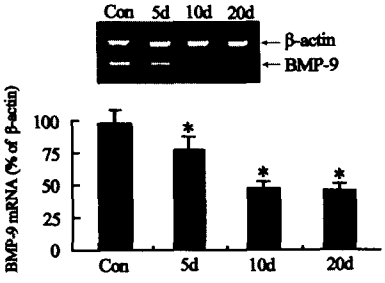
2.2 血糖水平变化

各组大鼠不同时期血糖水平见表1。由表1可见,与造模前比较,正常对照组造模后和处死前血糖均未升高,差异无显著性意义($P>0.05$);5、10、20 d处死组造模后和处死前血糖均升高,差异有显著性意义($P<0.05$)。可认为2型糖尿病模型组在造模后不同时期血糖水平与造模前比较均有显著性差异,且均高于11.1 mmol/L。

表1 各组大鼠血糖水平变化($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	n	造模前	造模后	处死前
正常对照组	5	6.3±0.6	6.4±1.0	6.6±0.8
5 d处死组	5	6.2±0.5	13.3±2.0*	14.2±0.6*
10 d处死组	5	6.3±0.4	15.7±3.5*	18.7±4.2*
20 d处死组	5	6.4±0.8	14.1±2.1*	20.5±2.8*

*:与造模前比较,$P<0.05$



Con:正常对照组;5 d、10 d、20 d:5 d、10 d、20 d处死组;*:与正常对照组比较,$P<0.05$

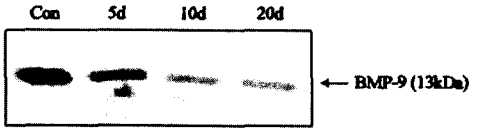
图1 BMP-9 mRNA水平变化

2.3 BMP-9 mRNA水平变化

RT-PCR结果见图1,BMP-9、β-actin RT-PCR产物大小分别为275、613 bp。可见,5、10、20 d处死组的BMP-9 mRNA水平较正常对照组均明显降低,差异有显著性意义($P<0.05$)。

2.4 BMP-9蛋白水平变化

Western-blot结果见图2,正常对照组在13 kDa处可见一条清晰的BMP-9特异条带,而在5、10、20 d处死组BMP-9蛋白表达明显减弱。



Con:正常对照组;5 d、10 d、20 d:5 d、10 d、20 d处死组

图2 BMP-9蛋白水平变化

3 讨论

骨形成蛋白(BMPs)属转化生长因子β超家族成员,因具强烈的骨诱导活性而受到关注,目前研究多集中在其与骨疾患的关系及其调控骨再生的应用上[4-5]。而事实上,BMPs在众多生命活动中均扮演着重要角色,其触发神经干细胞向神经原分化、维持肾小管上皮细胞形态、调控造血干细胞数量等功能逐一得到阐明[6-8]。近期发现,BMP-9与糖、脂代谢中多个关键转变环节有直接相关性,提示BMP-9还可能是一种新的糖、脂代谢调节因子[1]。BMP-9主要在肝脏表达,可通过内分泌、旁分泌或自分泌方式发挥其效应[9]。Chen等的研究发现,BMP-9能阻遏磷酸烯醇式丙酮激酶(P-enolpyruvate carboxykinase, PEPCK)合成并激活丝/苏氨酸激酶Akt,从而可能抑制肝内糖异生并促进肌糖原合成以降低血糖;同时,BMP-9还能调控苹果酸酶(malic enzyme, ME)与脂酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)的转录,这两个酶均为涉及肝脂肪酸代谢的关键酶。虽然,上述研究仅仅针对的是BMP-9对细胞水平的调节,但在代谢调节三级水平中,细胞水平调节是基础,激素水平及整体水平调节都是通过细胞水平调节而实现的。因此,BMP-9可能通过对这些关键酶的调控而在糖、脂代谢中发挥重要作用。在随后的动物实验中,BMP-9不仅显示出与胰岛素相似的促进肌细胞将葡萄糖向细胞内转运、抑制肝细胞生糖(IC_{50}=81pM)等作用,还能直接刺激糖负荷后(主要为第一时相)的胰岛素分泌(340%~388%)[10]。显然,BMP-9具有部分类似胰岛素的糖代谢调节作用,并与β细胞

维普资讯 http://www.cqvip.com

的胰岛素分泌有直接相关性，而糖代谢紊乱与第一时相胰岛素分泌缺陷又是2型糖尿病的主要特征。因此可以推测BMP-9与2型糖尿病的发生可能存在联系。研究这一联系，不仅对深入理解2型糖尿病代谢紊乱的发生机理具有重要意义，还可能为2型糖尿病的治疗提供新的思路。

本研究通过建立2型糖尿病大鼠模型，经RT-PCR、Western-blot检测其肝组织中BMP-9基因的转录与表达，证实2型糖尿病时BMP-9基因的转录及表达水平均显著降低。虽然这一改变与糖尿病的发生谁因谁果目前尚难以定论，但这项结果无疑提示BMP-9基因表达下降可能与糖尿病的进展有着密切的联系，补足这一缺失，也许能成为治疗糖尿病的一条可行途径。因此，无论从病因或替代治疗的角度出发，本研究均进一步证实BMP-9基因有可能成为糖尿病治疗又一新的靶点，这为开展糖尿病的BMP-9基因治疗研究提供了新的依据。

[参考文献]

[1] Groop L. Bringing diabetes therapeutics to the big screen[J]. Nat Biotechnol, 2003,21(3):240-241.
[2] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京：人民卫生出版社，2001. 197-211.
[3] 郭啸华，刘志红，李 恒，等. 实验性2型糖尿病大鼠模型的建立[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志，2000,9(4):351-355.
[4] Mishina Y, Starbuck MW, Gentile MA, et al. Bone morphogenetic protein type IA receptor signaling regulates postnatal osteoblast function and bone remodeling[J]. J Biol Chem, 2004, 279(26):27560-27566.
[5] Mbalaviele G, Sheikh S, Stains JP, et al. Beta-catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation [J]. J Cell Biochem, 2005,94(2):403-418.
[6] Chang MY, Son H, Lee YS, et al. Neurons and astrocytes secrete factors that cause stem cells to differentiate into neurons and astrocytes, respectively[J]. Mol Cell Neurosci, 2003,23(3):414-426.
[7] Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney[J]. J Biol Chem, 2005,280(9):8094-8100.
[8] Karlsson S. Stem cell expansion: success and complexities[J]. Blood, 2004,104(8):2210-2211.
[9] Miller AF, Harvey SA, Thies RS, et al. Bone morphogenetic protein 9. An autocrine /paracrine cytokine in the liver[J]. J Biol Chem, 2000,275(24):17937-17945.
[10] Chen C, Grzegorzewski KJ, Barash S, et al. An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis[J]. J Nat Biotechnol, 2003,21(3):294-301.

（编辑：余汇洋）

介绍一种体外循环管道附壁小气泡排气小窍门

李桂花 （第三军医大学附属西南医院手术室，重庆 400038）

[关键词] 心脏；体外循环；手术
[中图分类号] R654.1 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2007)05-0301-01

在体外循环手术中，建立体外循环时需用无菌管道将血液引流出体外，再经体外循环机氧合后泵入体内。安装体外循环管道时，管壁上常出现少量附壁小气泡，传统的排气方法是用注水或敲打管壁，但均难以排尽，且浪费手术时间。从2000年以来本文采用小圆针扎孔排气，骨蜡密封的方法在500余例体外循环手术中取得良好的效果，现报告如下。

1 材料与方法

常规准备无菌弧圆缝针1颗，骨蜡少许，纱布1块。建立体外循环时，连接好管道后，在管道上找到残余附壁的气泡，将小圆针对准气泡扎入，利用管内液体的压力将小气泡挤出管道外，迅速用干纱布擦净随气泡排出的少量液体，用骨蜡涂抹密封。

2 结果与讨论

在体外循环手术中，建立体外循环时各接头处要含接牢固，接头不能有渗漏，所有管道都要保持通畅，避免管道扭曲。然而在连接管道时，这些附壁的小气泡难以排出。本文采用小圆针扎孔排气，骨蜡密封的方法在500余例体外循环手术中取得良好的效果。作者体会到：由于体外循环管道直径较粗，传统使用的向管道内注水或敲打的方法难以将附壁的小气泡排出。而使用小圆针扎孔排气，由于小圆针扎孔小，气泡排出率好且容易封闭。封闭物骨蜡质地柔软，粘性好，涂抹于管道上不易脱落，能保证其安全性，而且取材方便。体外循环手术常规均备有弧圆缝针和骨蜡，可就地取材，节约成本。方法简单，操作方便，有效缩短体外循环时间。

（编辑：蒋登金）

[收稿日期] 2007-05-05 [修回日期] 2007-07-20