基础研究 文章编号:0253-3626(2009)08-1011-03

糖尿病仓鼠肾脏 chymase mRNA 表达及酶活性与 Ang Ⅱ 和肾脏病变关系的实验研究

程 黎[1],肖 谦[1],蒲 霞[1],李龙英[2],赵柯湘[1],高 原[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院老年病科,重庆 400016;2.四川省成都市金牛区成都铁路中心医院内分泌科,成都 610081)

【摘 要】目的:探讨糖尿病仓鼠肾脏 chymase mRNA 表达及酶活性与血管紧张素Ⅱ(Angiotensin Ⅱ,Ang Ⅱ)水平和肾脏病变的关系。方法:30 只 8 周龄雄性仓鼠随机分为正常对照组(n=10)和糖尿病组(n=20),腹腔内注射链脲菌素制备糖尿病仓鼠模型,电镜观察肾脏超微结构,反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 chymase mRNA 水平,放射免疫分析法测定肾脏 chymase、血管紧张素转换酶(Angiotensin-convertion enzyme,ACE)活性和 Ang Ⅱ 含量。结果:(1)糖尿病组 24 h 尿白蛋白含量高于对照组,(2.32 ± 0.18) mg vs (0.11 ± 0.01) mg,P<0.01,透射电镜发现糖尿病组肾小球毛细血管基底膜增厚,系膜细胞间细胞外基质沉积;(2)与对照组相比,糖尿病组肾脏 chymase mRNA 表达水平明显增高(4.90 ± 0.79 vs 1.81 ± 0.09,P<0.01),酶活性也明显增高,(0.82 ± 0.05) U vs (0.49 ± 0.03) U,P<0.01,Ang Ⅱ 含量明显增高,(88.6 ± 17.5) pg/mg vs (48.2 ± 15.3) pg/mg,P<0.01,ACE 活性无差异(P>0.05)。结论:糖尿病仓鼠肾脏 chymase mRNA 表达水平和酶活性明显增高可能是 Ang Ⅱ 水平升高的主要原因,chymase 可能有关于糖尿病肾病(Diabetic nephropathy,DN)的发生。

【关键词】Chymase;糖尿病肾病;血管紧张素Ⅱ

【中国图书分类法分类号】R587.2 【文献标识号】A 【收稿日期】2008-11-07

Relationship of gene expression and activity of chymase and Ang Ⅱ, nephropathy in streptozotocin-induced diabetic hamsters

CHENG Li, et al

(*Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the relationship of gene expression and activity of chymase and Ang Ⅱ with nephropathy in the streptozotocin (STZ)-induced diabetic hamsters. *Methods*: Thirty male hamsters were randomly divided into two groups: normal controls and diabetic rats. Diabetes mellitus was induced in rats by intraperitoneal streptozotocin injection. The nephritic ultrastructure was observed with electron microscope. The levels of blood glucose, lipoprotein were measured by biochemical methods. The level of angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ) and the activity of chymase and angiotensin-convertion enzyme (ACE) were measured by radioimmuno assay. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to determine chymase gene expression (corrected by β-actin). *Results*: Chymase activity in DN group was much higher than that in the control group (0.82 ± 0.05) U vs (0.49 ± 0.03) U, P<0.01. This was accompanied by increased angiotensin Ⅱ (88.6 ± 17.5) pg/mg tissue vs (48.2 ± 15.3) pg/mg tissue, P<0.01 and chymase mRNA (1.81 ± 0.09) vs (4.90 ± 0.79), P<0.01. But the activity of ACE was unchanged, indicating an alternative non-ACE dependent way of angiotensin Ⅱ generating. *Conclusion*: In diabetic hamsters, the gene expression and activity of chymase are much higher than those in the control group, accompanying higher level of angiotensin Ⅱ. This reflects another mechanism was involved except for the classic ACE pathway to activate the intrarenal RAS in the progress of diabetic nephropathy (DN).

【Key words】Chymase; Diabetic nephropathy; Angiotensin Ⅱ

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy,DN)是终末期肾功能衰竭最常见的病因。糖尿病时,肾脏局部肾素-血管紧张素系统(Renin-angiotensin system,RAS)被不适当的激活,Ang Ⅱ 作为主要的效应物质通过促进细胞增生及细胞外基质过度沉积参与糖尿病肾病的发生发展[1]。chymase 是新近发现的特异

作者介绍:程 黎(1983-),女,硕士

研究方向:糖尿病慢性并发症的研究。

通讯作者:肖 谦,男,教授,E-mail:xiaoqian1956@126.com。

基金项目:重庆市卫生局课题(05-2-194)。

的蛋白酶,能将血管紧张素Ⅰ(Angiotensin Ⅰ,Ang Ⅰ)转化为 AngⅡ,并可能通过 AngⅡ以外的途径参与糖尿病肾病发病[2]。目前国内外对糖尿病肾脏局部 chymase 的表达、酶活性及其与糖尿病肾病关系的研究报道甚少。本实验旨在通过对糖尿病时肾脏 chymase mRNA 的表达、酶活性与 AngⅡ含量、糖尿病肾病关系的研究,探讨其在糖尿病肾病发病中的作用及可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 动物及分组 健康 8 周龄雄性仓鼠 30 只,体重 95~120 g,购自四川省医学科学院实验动物研究所。随机分为正常对照组(10 只)和糖尿病组(20 只)。

1.1.2 试剂 链脲菌素购自美国 Alexis 公司;TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;引物设计与合成均由北京天为时代有限公司完成。

1.2 方 法

1.2.1 糖尿病仓鼠模型的制备[3]及成模的判断标准 仓鼠禁食 12 h,腹腔内注射链脲菌素溶液(10 mg/ml),40 mg/(kg·d),对照组腹腔内注射 1 ml 生理盐水,连续 3 d。强生 ONE-TOUCH 指血糖仪检测尾尖血血糖,血糖>13.5 mmol/L,稳定 3 d 后判定成模入选糖尿病组。每 2 周检测尾血糖和体质量,18 周后糖尿病组仓鼠死亡 10 只,处死所有存活仓鼠,摘取肾脏,留静脉血样。

1.2.2 尿白蛋白量 于实验的第 4、8、12、16 周及处死前 1 天留取每只存活仓鼠的 24 h 尿液,计算 24 h 尿量,检测 24 hUAlb(24 hours urinary acbumin,24 hUAlb)。

1.2.3 血清学检测 测定血清甘油三酯(Triglyceride,TG)、总胆固醇(Total cholesterol,TC)、低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein cholesterol,LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein cholesterol,HDL-C)。

1.2.4 切片制备 3%戊二醛固定肾脏皮质组织,用超薄切片技术制成切片,电镜下观察细胞超微结构改变。

1.2.5 Chymase mRNA 水平 用 Trizol 试剂提取仓鼠肾脏总 RNA。反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)在 ThermoHybaid(P×2)PCR 仪(德国)进行,PCR 反应条件:94 ℃预变性 2 min,94 ℃ 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,30 循环;72℃再延伸 6 min;4℃保存。PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳,采用 Bio-RAD Qulity-one 凝胶成像系统扫描分析,计算 chymase/β-actin 比值。引物序列:chymase 5'-CCATCTAAGCACTGGGTCA-3',5'-TCTCCACGTCCATAAGATACA-3',β-actin5'-CCATCTAAG-CACTGGGTCA-3',5'-TCTCCACGTCCATAAGATACA-3'。

1.2.6 Chymase 及 ACE 活性测定采用酶抑制剂结合放免分析法,间接测定其酶活性[4]。用肾素活性放免分析药盒测定各样品中 Ang Ⅰ的含量,根据反应前后 Ang Ⅰ的减少量计算酶活力。每分钟降解 1 ng Ang Ⅰ所需酶量定义为 1 酶活力单位(U)。

1.2.7 肾脏 AngⅡ含量 用 AngⅡ放免分析测定盒测定肾脏 AngⅡ含量。

1.3 统计学方法

所有实验数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间数据比较采用 t 检验,应用 SPSS10.0 软件包分析,肾脏肥大指数(Kidney hypertrophy index,KHI)= 肾重/体重。

2 结 果

2.1 仓鼠血糖、血脂、尿白蛋白含量和 KHI

糖尿病组血糖、总胆固醇、甘油三酯、LDL-C、尿蛋白含量升高,以甘油三酯升高明显,HDL-C 降低,KHI 升高,见表 1。

2.2 透射电镜下可观察到糖尿病组仓鼠肾脏肾小球毛细血管基底膜增厚,系膜细胞间细胞外基质沉积及足突融合,见图 1~3。

2.3 仓鼠肾脏 chymase mRNA、chymase 和 ACE 活性、AngⅡ含量变化

糖尿病组仓鼠肾脏 chymase mRNA 水平及酶活性明显高于对照组,AngⅡ含量增加;而 ACE 活性两组无差异,见表 2。

3 讨 论

Chymase 是一种丝氨酸蛋白酶,在肾脏中主要由肥大细胞、血管平滑肌细胞、系膜细胞合成贮存表达,能高效特异的将 Ang Ⅰ转化为 AngⅡ,参与局部组织中 AngⅡ的生成,这种作用具有种族和器官差

表 1 糖尿病组和对照组仓鼠血糖、血脂、KHI($\bar{x} \pm s$)

组别	仓鼠数	血糖		总胆固醇	三酰甘油	HDL-C	LDL-C	24 hUAlb	KHI
	(只)	实验开始	实验终止	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)	(mg)	(mg/g)
对照组	10	6.60±1.56	5.08±0.72	3.28±0.68	2.11±0.44	2.20±0.42	0.69±0.12	0.11±0.01	2.26±0.12
糖尿病组	10	19.74±3.14[a]	27.59±3.38[a]	4.90±0.65[a]	6.24±0.18[a]	1.13±0.11[a]	1.32±0.22[b]	2.32±0.18[a]	4.23±0.14[a]

注:与对照组比较,[a]$P<0.01$,[b]$P<0.05$

表 2 糖尿病组和对照组 chymase 及 ACE 活性、Ang Ⅱ含量和 chymase mRNA 表达

组别	Chymase 活性(U)	ACE 活性(U)	Ang Ⅱ (pg/mg)	Chymase mRNA(chymase/β-actin)
对照组	0.49 ± 0.03	0.63 ± 0.11	48.2 ± 15.3	1.81 ± 0.09
糖尿病组	0.82 ± 0.05[a]	0.70 ± 0.13[c]	88.6 ± 17.5[a]	4.90 ± 0.73[a]

注:与对照组比较,[a]$P<0.01$,[c]$P>0.05$



图 1 糖尿病组肾脏毛细血管基底膜增厚 透射电镜(×6 000)

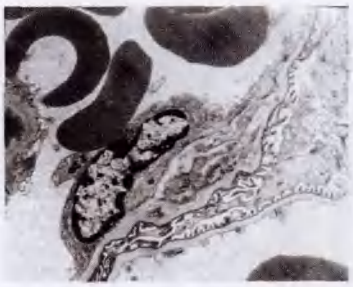


图 2 糖尿病组肾脏毛细血管基底膜增厚及系膜细胞间细胞外基质沉积透射电镜(×6 000)

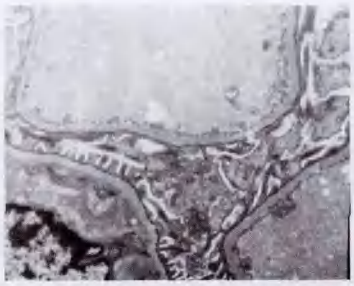


图 3 糖尿病组肾脏系膜细胞足突融合透射电镜(×10 000)

异,其中仓鼠 chymase 与人类最为类似[5]。正常状态下,肾脏中 chymase 表达微弱。国外有研究发现多种肾脏病变如 IgA 肾病、膜性肾病等病理状态下,肾脏局部 chymase 阳性的肥大细胞的数量明显增多[6]。

本实验结果显示,糖尿病仓鼠血糖明显高于对照组,并在整个实验过程保持高水平,总胆固醇、甘油三酯、LDL-C 明显增高,HDL-C 降低,KHI 明显增高,24 hUAlb 含量增多;肾脏毛细血管基底膜增厚,系膜细胞间细胞外基质沉积,表明该模型糖、脂质代谢和肾脏局部病理和功能改变与人类极为相似,可以作为研究糖尿病肾病的模型。与对照组比,糖尿病组肾脏 chymase 活性明显增高,Ang Ⅱ含量增多明显,ACE 活性虽略有增高,但两组数据无统计学差异,提示增多的 Ang Ⅱ主要来源于被激活的 chymase 途径。本实验结果还显示糖尿病时肾脏 chymase mRNA 表达水平及酶活性均增高,表明机体可能通过上调 chymase mRNA 表达水平,升高 chymase 活性,最终促使 Ang Ⅱ生成增多。

RAS 被认为是 Ang Ⅱ产生的经典途径,既往研究已表明,肾脏局部 RAS 激活及其效应产物 Ang Ⅱ增加与糖尿病肾病的发生发展密切相关。目前临床广泛应用血管紧张素转换酶抑制剂(Angiotensin-convertion enzyme inhibitor,ACEI)及血管紧张素受体拮抗剂 (Angiotensin Ⅱ receptor blocker, ARB)减少 Ang Ⅱ的生成,阻断 Ang Ⅱ与其受体结合,减少尿蛋白含量,能获得一定的肾脏保护作用,但尚不能完全阻断或逆转糖尿病肾病的发生发展。提示存在 Ang Ⅱ产生的非经典途径和 RAS 以外的机制参与其中。有研究表明,chymase 除催化 Ang Ⅰ生成 Ang Ⅱ外,还可以通过下述其他途径参与糖尿病肾病发生发展:①激活转化生长因子(Transforming growth factor-beta , TGF-β)。Yao 等[7]发现 chymase 可直接激活转化生长因子(Transforming growth factor-beta, TGF-β),而后者可促进肾脏细胞肥大和细胞外基质沉积, 应用特异性 chymase 抑制剂能降低 TGF-β mRNA 的表达,有效改善肾小球硬化。②上调血管内皮生长因子的表达。国外有研究报道,chymase 可上调血管内皮生长因子的表达[8]。而 VEGF 可介导继发的内皮细胞增殖、肾小球和肾间质纤维化,加快 DN 进展。③促进内皮素 1-31(Endothelins1-31, ETs1-31)的合成。最新研究发现病理状态下,chymase 可水解掉内皮素原末位的甘氨酸合成 ETs1-31[9]。ETs1-31 能促进细胞外基质增生, 抑制基质金属蛋白酶-2,从而减少细胞外基质降解;还能促进 Ang Ⅱ、TGF-B、血小板源性生长因子等细胞因子的合成释放,致细胞外基质沉积、基底膜增厚、通透性增加及新生血管形成。

我们的实验结果表明糖尿病仓鼠成模 18 周时 chymase mRNA 表达水平及酶活性均增高,表明机体可能通过上调 chymase mRNA 表达水平,升高 chymase 活性。但糖尿病肾病时机体上调 chymase 表达的机制尚不明了,可能与高血糖状态下肾脏局部糖基化终末产物(Advanced glycation end products, AGEs)沉积、AGEs 受体上调有关。最新研究还发现,chymase 基因存在单核苷酸基因多态性, 其中 GA 基因型中 G>A(-1903)的人群更易患糖尿病肾病[10],

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)08-1014-05

CD4、CD8 和 γ 受体在色素性紫癜性皮肤病 T 细胞中的表达

刘 婷[1],李 惠[1],周维康[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院皮肤科,重庆 400016;2. 重庆市第三人民医院,重庆 400014)

【摘 要】目的:根据 T 细胞表面抗原 CD4、CD8 和受体 γ 的表达分析色素性紫癜性皮肤病(Pigmented purpuric dermatoses,PPD)和蕈样肉芽肿(Mycosis fungoides,MF)的关系,探讨前者能否被视为一种皮肤淋巴样疾病(Cutaneous lymphoid dyscrasia,CLD)。方法:免疫组化技术检测 23 例确诊 PPD 患者皮损表皮和真皮 T 淋巴细胞表面抗原 CD4、CD8 的表达情况,PCR 测定 T 细胞受体 γ(T cell receptor γ,TCR γ)单克隆基因重排。设立 20 例 MF 皮损、20 例正常人皮肤组织为对照。结果:23 例 PPD 中的 15 例有淋巴细胞向表皮的明显迁移,其中的 5 例和 20 例 MF 皮损可见淋巴细胞亲表皮现象,正常组未见此现象;18 例 PPD、20 例 MF 和 6 例正常皮肤免疫染色以 $CD4^+$T 为主;PPD 和 MF 两组在真皮中的 $CD4^+$T 数分别为 38.2 ± 30.6 和 68.8 ± 47.6(P<0.017),$CD4^+/CD8^+$ 值分别为 1.7 ± 1.1 和 2.6 ± 0.8 (P<0.05),PPD 组数值小于 MF 组,有显著差异;其余表皮和真皮中两组间的 $CD4^+$T、$CD8^+$T 计数和 $CD4^+/CD8^+$ 值均较接近。TCR γ 的 PCR 扩增结果显示 23 例 PPD 中 10 例阳性,20 例 MF 中 16 例阳性,正常组无 1 例阳性。其中 7 例阳性 PPD 标本见淋巴细胞向表皮的明显迁移(包括 3 例有亲表皮现象的 PPD),8 例以 $CD4^+$T 细胞为主,9 例表现为除双小腿以外的其它部位也存在皮疹。结论:PPD 在 T 细胞表面抗原和受体的表达上有部分类似蕈样肉芽肿的特征,可能系一种皮肤淋巴样疾病。对于皮损分布广泛,治疗效果欠佳,免疫表型和分子学特征类似蕈样肉芽肿的病例在诊疗上应尤为重视,加强随访。

【关键词】色素性紫癜性皮肤病;蕈样肉芽肿;CD4;CD8;TCR-γ

【中国图书分类法分类号】R75 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-05

作者介绍:刘 婷(1982-),女,硕士,
研究方向:皮肤免疫与变态反应性疾病。

通讯作者:李 惠,女,教授,E-mail:lihui131128@vip.163.com。

这可能与此基因型的改变所致 chymase mRNA 表达增高或蛋白活性增强有关。总之,chymase 致糖尿病肾脏病变及机体上调 chymase 表达的具体机制都还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Durvasula R V,Shankland S J.Activation of a local renin angiotensin system in podocytes by glucose[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2008,294(4):830-839.

[2] Ritz E.Chymase:a potential culprit in diabetic nephropathy[J]? Am J Soc Nephrol, 2003,14(7):1952-1954.

[3] Saini K S,Thompson C,Winterford C M,et al.Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in a routine pancreatic beta cell line[J]. Biochem Mol Biol Int,1996,39(6):1229-1236.

[4] Chen LY,Li P,He Q,et al.Transgenic study of the function of chymase in heart remodeling[J]. J Hypertens,2002, 20(10):1943-1944.

[5] Huang XR, Chen WY, Truong LD,et al. Chymase is upregulated in diabetic nephropathy: implications for an alternative pathway of angiotensin II-mediated diabetic renal and vascular disease [J]. Am J Soc Nephrol, 2003, 14(7):1738-1747.

[6] Rangan GK, Harris DC. A blast from the mast[J]? Kindney Int, 2003,64:1134-1135.

[7] Yao L, Takai S, Nagai Y, et al. Contribution of chymase to the activation of the transforming growth factor-beta/smad 2 pathway and renal injury in dahl salt-sensitive hypertensive rats[J]. Hypertension, 2004, 44(4): 551.

[8] Katada J, Muramatsu M, Hayashi I,et al. Significance of vascular endothelial cell growth factor up-regulation mediated via a chymase-angiotensin-dependent pathyway during angiogenesis in hamster sponge granulomas[J]. J Pharmacol Exp Ther ,2002,302(3):949-956.

[9] Doggrell SA, Wanstall JC. Vascular chymase:pathophysiological role and therapeutic potential of inhibition[J]. Cardiovasc Res,2004,61(4):653-662.

[10] Prasad P,Tiwari A K,Kumar K M,et al. Chronic renal insufficiency among Asian Indians with type 2 diabetes: I. Role of RAAS gene polymorphisms[J]. BMC Med Genet,2006,7:42.

(责任编辑:关蕴良)