维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)02－0121－03

蛋白激酶 C 同工酶 β、δ 与糖尿病视网膜病变关系的实验研究

周　波[1]，汪恕萍[1]，曾昭淳[2]

(1. 重庆医科大学临床学院内分泌科；2. 重庆医科大学基础医学院生化研究室，重庆　400016)

【摘　要】目的：探讨糖尿病视网膜病变(DR)发病过程中视网膜血管蛋白激酶 C(PKC)同工酶 β、δ 表达变化及其与 DR 发生、发展的关系。方法：将实验动物随机分为正常对照组及链脲菌素诱导的糖尿病组。采用渗透休克法获取大鼠视网膜血管。在成模后 2 周、2 月、4 月、6 月，采用 Westernblot 法检测视网膜血管 PKC 同工酶 β、δ 表达情况。毛细血管床形态立体定量评估 DR。结果：PKC－β 在糖尿病大鼠视网膜血管 2 周、2 月、4 月、6 月时呈胞膜至胞浆部移位激活，而 PKC－δ 在糖尿病大鼠视网膜血管 2 周、2 月、4 月、6 月时呈胞膜至胞浆部移位激活。成模 6 月后，视网膜深层毛细血管呈现周细胞减少、基底膜增厚的特征性改变，而成模 4 月时，电镜显示糖尿病大鼠深层毛细血管基底膜增厚。结论：在 DR 发病过程中的不同阶段，PKC 同工酶 β、δ 在视网膜血管的变化不同，对 DR 的发生、发展有着不同的调控效应。

【关键词】蛋白激酶 C；同工酶；视网膜；糖尿病

【中国图书分类法分类号】R797.9　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－08－01

Experimental study on the relationship between protein kinase C isoforms β、δ and diabetic retinopathy

ZHOU Bo, et al

(*Department of Endocrinology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of protein kinase C (PKC) isoforms β, δ in diabetic rats and evaluate the relation between altered PKC β, δ expression and the pathogenesis of diabetic retinopathy (DR). *Methods*: Wistar rats were randomly divided into control group and diabetic group induced by streptozotocin; osmotic shock method was used to isolate the retinal vessels of rats; and PKC isoforms β, δ espression were determined after 2 weeks, 2 months, 4 months and 6 months follw－up. DR was assessed by quantitative morphometry of capillary bed. *Results*: Diabetes could induce the translocation of PKC isoform β from cytosol to membrane pool after 2 weeks, 2 months, 4 months and 6 months, but δ isoform translocated from membrane to cytosol pool in retinal vessels of diabetic rats after 2 weeks, 2 months, 4 months and 6 months. Diabetic rats showed pericyte decrease and capillary basement thickening in deep capillary bed of retina after 6 months follow－up. *Conclusion*: The expression of PKC isoforms β, δ varies in different stages of DR, and the effect of PKC isoforms on the pathogenesis of DR is different.

【Key words】Protein kinase C; Isoforms; Vessel; Diabetes Mellitus

已证实糖尿病诱导的蛋白激酶 C(PKC)激活在糖尿病视网膜病变(DR)发生，发展中起重要作用[1]。离体实验发现，在不同基因编码的 11 种 PKC 同工酶中，高葡萄预处理主要诱导视网膜血管细胞 PKC 同工酶 β、δ 活化[2]。本文采用免疫印迹技术检测 PKC 同工酶 β、δ 在正常 Wistar 大鼠以及 DR 发病过程中不同阶段大鼠视网膜血管中的表达变化，并探讨 PKC 同工酶的表达变化与 DR 发生、发展的关系。

1　材料与方法

1.1　糖尿病大鼠模型的制备

采用健康雄性 Wistar 大鼠，2 月龄，体重 195～215g，共 44 只(重庆医科大学动物中心提供)。留取正常对照鼠 14 只(C 组)，其余禁食过夜后，按 65mg/kg 左下腹腔内注射

作者介绍：周　波(1968－　)，男，主治医师，博士，主要研究方向：糖尿病慢性并发症的防治

基金项目：重庆市卫生局科研基金资助(00－2026)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1%链脲菌素(用 pH 4.5 的 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液冰浴中配制)。用 one Touch Ⅱ 血糖仪测大鼠尾静脉血血糖,72h 后血糖≥16.7mmol/L 即为糖尿病大鼠,共 28 只(D 组)。

1.2 视网膜血管的获取

采用 Cuthberson 渗透休克法加以改良[4]:大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 15mg/100g 进行麻醉,摘除眼球,去除眼前节,冰浴中细心分离视网膜。置入含 25μg/ml leupeptin、2.0mmol/L PMSF 的缓冲液室温 1h,继之与 DNA 酶(2mg/ml)孵育 5min,在解剖显微镜下用不同梯度口径的巴氏吸管反复吸打,即可获取视网膜血管。

1.3 血管胞膜和胞浆池的分离[3]

血管经上述缓冲液洗涤 2 次后,于冰浴中制成匀浆,离心 100000g30s,上清液为 PKC 检测的细胞浆部分。沉淀用缓冲液再悬浮和洗涤,离心后,弃上清,沉淀加入 0.3ml 含 0.25% TritonX-100 的缓冲液悬浮,于 0℃ 摇动孵育 1h,离心后,上清液为 PKC 检测的细胞膜成份。

1.4 Western 印迹检测

(1)SDS-PAGE:5%浓缩胶、10%分离胶。取视网膜血管浆或膜部液 lml,加上样缓冲液加热变性后,75V 电泳至分离胶后换 3W 强度,电泳 3~4h。(2)转膜:采用电转移装置,200mA 转移 2h,取下凝胶和膜,前者置考马期亮蓝染色后,再经脱色,漂洗后确定转移效果,后者剪下标准蛋白条带置丽春红液染色,余膜行免疫检查。(3)免疫学检测:杂交反应性(5%脱脂奶粉,0.1% Tween20),一抗为兔抗鼠 β、δ-PKC 多克隆抗体(GIBCOBRL 公司);NBT/BCIP 显色底物(Boehinger Mannbeim 公司)。(4)有效性检测:与 β、δ-PKC 合成多肽(GIBCOBRI 公司)共孵育检验条带的特异性。(5)结果以条带吸光度-背景吸光度与面积乘积定量。

1.5 电镜观察

常规固定、脱水、包埋、染色,按 chakrabarti 法随机选取外丛状层和内核层毛细血管为深层毛细血管床,采用栅格行立体定量。(1)面积测定采用点分析法:纵横交叉为测试点,每个点代表一个小方格面积,若其面积为 a,则 p 个点的面积 $A = a \times p$。(2)基底膜厚度 $T_h = \frac{8}{3\pi} W_h$。W_h 为调和均数 $\frac{1}{W_h} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\frac{1}{W_i}$ 选取每个栅格测试线与基底膜内皮细胞相交叉点为起点,向基底周细胞侧作垂线,测量两侧间垂直长度 W_i。

1.6 其它

(1)蛋白定量:Lowry 法,以牛血清白蛋白为标准蛋白。(2)血糖:葡萄糖氧化酶法。(3)糖化血红蛋白(HbAlc),微柱法。

1.7 统计学处理

所有数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验法进行组间资料的比较。

2 结 果

2.1 两组大鼠代谢参数变化

糖尿病大鼠 2 周、2 月、4 月、6 月血糖明显增高;而体重减轻,尿量增多。HbAlc 在糖尿病大鼠 2 月、4 月、6 月均较正常对照组为高(表 1)。

2.2 两组大鼠 PKC 同工酶 β、δ 动态变化

动态观察 PKC 同工酶 β、δ 在糖尿病大鼠视网膜血管中的变化规律,发现初发糖尿病 2 周时,PKCβ 浆部表达较正常对照组低 26.3% ± 5.6%。而膜部表达则较正常大鼠高 173.4% ± 24.6%,而此时 PKCδ 浆部、膜部表达均与正常对照组无显著性差异($P > 0.05$),表明糖尿病状态下 PKCβ 优先被激活。糖尿病病程 2 月时,PKC δ 浆部表达则较正常大鼠为高,而 PKCβ 膜部表达虽较正常大鼠增高,但较病程 2 周时有所回落,说明 PKCδ 呈从膜部至浆部移位激活时,PKCβ 呈轻度调整改变。此后,随病程延长,糖尿病大鼠视网膜血管 PKCβ 膜部表达显著上升,呈递增趋势,而浆部表达则呈弟减趋势。与之不同随病程延长 PKCδ 浆部表达显著上升,是递增趋势,而膜部表达则呈递减趋势,但 PKCβ、PKCδ 浆膜部表达总和均较正常对照组增加,呈递增趋势。说明糖尿病状态下 PKCβ、PKCδ 持续激活,且表达量增加,见表 2。

2.3 电镜动态观察大鼠视网膜深层毛细血管床变化

电镜定量观察显示:病程 4 月时,糖尿病大鼠深层毛细血管床基底膜厚度较对照组显著增加($P < 0.05$),但与 2 月病程病鼠相比无统计学意义。病程 6 月时,病鼠毛细血管基底膜厚度为对照组的 1.6 倍。周细胞数在病鼠 4 月时虽较对照组为少,但无统计与意义,而病程 6 月时,病鼠周细胞数目则较正常对照组显著为低($P < 0.01$)。观察期间,内皮细胞数在糖尿病鼠和对照鼠间差异均无显著性($P < 0.03$)。随病程延长,糖尿病鼠周细胞截面积、内皮细胞截面积均逐渐增大,至病程 6 月时,周细胞截面积、内皮细胞截面积均较对照鼠显著增大,见表 3。

3 讨 论

研究表明,PKC 是一个具有 11 种同工酶的大家族,不同的同工酶显示了不同的酶学特征,不同的组织表达及特定的细胞定位,在一系列细胞对外来

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 两组大鼠代谢参数变化

病程	组别	体重(g)	血糖(mmol/L)	HbAlc(%)	尿量(ml/d)
2 周	糖尿病组	169.3±7.5*	22.3±7.6*	6.3±1.1	65.7±9.2*
	正常对照组	195.8±13.4	5.2±0.3	4.6±0.8	8.7±1.3
2 月	糖尿病组	195.0±18.2*	23.2±4.2*	10.6±1.7*	67.6±6.9*
	正常对照组	262.8±18.7*	5.3±0.3	4.5±0.8	9.0±7.3
4 月	糖水病组	412.2±12.6	21.6±2.3*	10.7±2.3*	79.4±7.8*
	正常对照组	295.0±8.2*	4.9±0.8	4.6±0.8	9.8±1.0
6 月	糖尿病组	295.0±8.2	23.9±3.0*	11.6±1.6*	91.4±8.7*
	正常对照组	483.5±9.7	5.2±0.4	4.6±1.0	9.5±6.9

*:与正常对照组比较 $P<0.05$

表 2 两组大鼠视网膜血管 PKC β、δ 免疫印迹灰度扫描比较

病程	PKC 同工酶	浆部		膜部	
		对照组	糖尿病组	对照组	糖尿病组
2 周	β	19000±2100	14000±1600*	50100±2000	137000±5600△
	δ	30600±3300	36000±1200	13000±2100	14600±1500
2 月	β	18000±2500	15000±1700	55800±2100	119000±6300△
	δ	30800±3600	64000±1100*	14000±2000	12900±1600
4 月	β	18600±2300	12000±1600*	52400±2100	185000±6500△
	δ	30900±3100	78000±2100*	13600±2400	10100±1700△
6 月	β	18800±2300	10600±1300*	51600±3200	216000±5800△
	δ	30600±3200	96400±3300*	13400±2500	9800±2100△

*:与正常大鼠浆部比较 $P<0.01$ △:与正常大鼠膜部比较 $P<0.01$

表 3 各组大鼠毛细血管床形态参数动态变化

病程	组别	每毛细血管周细胞数(n)	每毛细血管内皮细胞数(n)	周细胞截面积(nm^2)	内皮细胞截面积(nm^2)	基底膜厚度(nm)
2 月	对照组	2.9±0.4	1.9±0.05	10.0±1.4	23.1±4.9	81.2±5.8
	糖尿组	2.7±0.5	1.85±0.12	12.4±1.2	28.2±3.8	90.2±5.9
4 月	对照组	3.0±0.9	1.9±0.05	10.6±2.1	23.7±4.0	86.2±6.1
	糖尿组	2.6±0.5	2.1±0.1	13.6±1.4	29.9±3.7	120.2±7.2*
6 月	对照组	3.0±0.5	1.9±0.06	9.9±2.1	23.6±3.6	88.1±3.4
	糖尿组	2.2±0.7*	2.1±0.04	16.2±2.2*	32.3±5.1	149.3±5.6*

*:与对照组比较 $P<0.05$ 或 0.01

信号刺激的应答反应的调控作用中发挥着不同的生理功能。我们和国外学者曾报道糖尿病状态可诱导视网膜血管 PKC 同工酶 α、β、γ、ζ 移位激活[2]，其中尤以 β、δ 为著。本文结果显示初发糖尿病大鼠视网膜血管 PKCβ 即被激活，其后经一个活性调整过程，至特征性 DR 阶段 PKCβ、δ 活化进一步增加。目前已知 PKC 激活后，可在蛋白水解酶的作用下，PKC 及其活性快速下调，PKC 活性的持续增强需要 PKC 表达的持续上调和/或 PKC 蛋白稳定性的增加[5]，因此我们推测不同 PKC 同工酶持续活化的原因可能与糖尿病状态下，PKC 各同工酶的基因表达或稳定性对调控信号的反应性有所不同有关。

本文结果显示，在 DR 的不同阶段，视网膜血管 PKC 同工酶的表达各不相同。PKCβ 在糖尿病发病后 2 周、2 月、4 月、6 月时表达显著上调。有研究证实在 PKC11 个同工酶中 PKCβ 在大鼠视网膜血管中含量最高，且优先被激活。Ishii 等[6]采用特异性 PKCβ 抑制剂 LY333531 治疗链脲菌素诱导的糖尿病大鼠，发现可抑制视网膜原位 PKC 活性，改善视网膜微循环血流动力学效应。另有作者提出，PKCβ 激活与高糖诱导的 PKC 其它同工酶活化所介导的胞内信号传递有关。PKCβ 激活后，通过磷酸化 raf-1，启动丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)信号转导系统，改善毛细血管渗漏。MAPK 系统激活后，尚可进一步调节 C-fos 和 C-Jun 表达形成，形成活化蛋白-1，促进细胞外基质基因表达。本文结果显示，糖尿病大鼠 2 月、4 月、6 月视网膜深层毛细血管基底膜逐渐增厚，且此与 PKCβ 动态(下转第 137 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

[2] Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death[J]. Nature, 1990; 348(6299): 334-336.

[3] Phelp E, Wu P, Bretz J, et al. Thyroid cell apoptosis: A new understanding of thyroid autoimmunity[J]. Endocrinology & Metabolism Clinic of North America, 2000; 29(2): 375-389.

[4] Tanjmoto C, Hirakawa S, Kawasaki H, et al. Apoptosis in thyroid diseases: A histochemical study[J]. Endocrine Journal, 1995; 42(2): 193-201.

[5] Hammond LJ, Lowdell MW, Cerrano PG, et al. Analysis of apoptosis in relation to tissue destruction associated with Hashimoto's autoimmune thyroiditis[J]. Journal of Pathology, 1997; 182(2): 138-144.

[6] Mitslades N, Poulaki V, Kotoula V, et al. Fas/FasL ligand up-regulation and BcL-2 down-regulation may be significant in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis[J]. Journal of Clinic Endocrinology and Metabolism, 1998; 83(6): 2199-2203.

[7] Hiromatsu Y, Hoshino T, Yagita H, et al. Functional Fas ligand expression in thyrocytes from patients with Graves' disease[J]. The Journal of Clinic Endocrinology & Metabolism, 1999; 84(8): 2896-2901.

[8] Patricia L, Arscott and James R, Baker Jr. Apoptosis and thyroiditis[J]. Clinical immunology and immunopathology, 1998; 87(3): 207-217.

[9] J Muller-Hocker. Expression of BcL-2, Bax and Fas in oxyphil cells of Hoshimoto thyroiditris[J]. Virchows Arch, 2000; 436(6): 602-607.

(上接第 123 页)变化相一致。结合国内外文献，我们认为 PKCβ 表达的逐渐增高可能是 DR 发生与发展的重要因素。

本文观察了糖尿病大鼠视网膜血管重建规律，发现周细胞数逐渐减少，残留周细胞影。Lee 等采用 DNA 断端标记技术(TUNEL)观察了糖尿病背景型视网膜病变患者视网膜消化铺片，发现周细胞呈 TUNEL 阳性，认为细胞凋亡是因细胞退化的原因[7]。本文结果进一步显示糖尿病大鼠视网膜血管周细胞消失与 PKCβ、δ 动态变化相一致。有研究表明糖尿病大鼠主动脉 PKCβ、δ 激活，PKCδ 超表达的同时，$PKC\beta_2$ 膜部表达迹上调，此是否提示 PKCδ 是 DR 发展中的主导因素尚不清楚，视网膜血管 PKC 同工酶 β、δ 超表达转基因动物模型可能为阐明 PKCβ、δ 在 DR 中的作用提供有力证据。

综上所述，糖尿病状态下，PKC 同工酶 β、δ 不仅被激活，且表达规律各异，PKC 同工酶 β、δ 在 DR 发生、发展中发挥不同的作用，其具体机制有待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Lorinzi M, Gerhardinger C. Early cellular and molecular changes induced by diabetes in retina[J]. Diabetologia, 2001; 44(7): 791-796.

[2] Park JY, Takahara N, Gabriele A, et al. Induction of endothelin-1 Expression by glucose. An effect of protein kinase c activity[J]. Diabetes, 2000; 49(1): 1239-1248.

[3] Shiba T, Inoguchi T, Sportsman JR, et al. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat to retinal circulation[J]. Am J physiol, 1993; 54(5): E785-E793.

[4] Kowlum RA, Jirousek MR, Stramm L, et al. abnormalities of retinal metabolism indiabetes or experimental galactosemia V Relationship between protein kinae C and ATP ase[J]. Diabetes, 1998; 47(9): 464-469.

[5] Kang NL, Alexander G, Park JK, et al. Differential expression of protein kinase c isoforms in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Kidney Int, 1999; 56: 1737-1750.

[6] Ishii H, Jirousek MR, Kaya D, et al. Ameloration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC 13 inhibitor [J]. Science, 1996; 272: 708-731.

[7] Lee W, Liu x, Yanoff M, et al. Cultured retinal capillary Pericyte die by apoptosis after an abrupt fluctation from high glucose levels: a comparative study with endothelial cells [J]. Diabetologia, 1996; 39: 537-541.

[8] Deacon EM, Pongrac ZJ, Griffiths G, et al. Isoenzymes of protein kinase c differential involvement in apoptosis and pathogenesis[J]. J clin Pathol Mol Pathol, 1997; 50: 124-131.