维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2003)02-0131-04

抗坏血酸对糖尿病大鼠肾脏 TIMP-1mRNA 和蛋白表达的影响

肖 谦,汪恕萍

(重庆医科大学临床学院内分泌科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨抗坏血酸对糖尿病大鼠肾脏金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)mRNA 和蛋白表达的影响。方法:实验大鼠随机分为 3 组:对照组(C 组)、糖尿病组(D 组)、糖尿病+抗坏血酸 90mg/kg/d(DT 组),实验第 9 周检测血浆、肾脏抗坏血酸水平和醛糖还原酶(AR)活性,同时用原位杂交和 Western-blot 检测 TIMP-1mRNA 和蛋白表达水平。结果:与正常对照组比较,糖尿病组血浆、肾脏抗坏血酸水平显著下降($P<0.05$),肾脏 AR 活性明显升高,TIMP-1mRNA 和蛋白表达明显增加(P 均<0.01)。抗坏血酸治疗组血浆、肾脏抗坏血酸水平和正常对照组比较差异无显著性,AR 活性、TIMP-1mRNA 和蛋白表达水平较糖尿病组明显降低(P 均<0.01)。结论:补充抗坏血酸可显著增加糖尿病大鼠血浆、肾脏抗坏血酸水平,明显降低糖尿病大鼠肾皮质 AR 活性、TIMP-1mRNA 和蛋白表达水平;多元醇途径可能部分介导了糖尿病大鼠肾脏 TIMP-1m RNA 和蛋白表达。

【关键词】抗坏血酸;醛糖还原酶;金属蛋白酶组织抑制因子-1;糖尿病肾病

【中国图书分类法分类号】R587.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-07-25

The effects of ascorbic acid on the expressions of TIMP-1 mRNA and protein in kidney of diabetic rats

XIAO Qian, et al

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

【Abstract】 *Objective*: To explore the effects of ascorbic acid on the expressions of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) mRNA and protein in renal cortex in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Methods*: 30 male Wistar rats(195±20g) were randomly divided into following groups: group C(control rats); group D(diabetic rats); and group DT(diabetic rats treated with ascorbic acid 90mg/kg·d). The concentrations of ascorbic acid and activity of aldose reductase (AR) in plasma and renal cortex were assayed at 9 weeks. In addition, the protein expression of TIMP-1 in renal cortex was determined by Western-blot and the mRNA expression of TIMP-1 was measured by hybridization in situ. *Results*: Compared with group C, the levels of ascorbic acid in plasma and kidney decreased significantly in group D($P<0.01$). The activity of aldose reductase, and the expressions of TIMP-1 mRNA and protein increased markedly ($P<0.01$, respectively). The concentrations of ascorbic acid in plasma and kidney increased to normal level, and the others were markedly ameliorated after 8 weeks treatment with ascorbic acid in group DT. *Conclusion*: The findings suggest that administration of ascorbic acid can increase the levels of ascorbic acid and lower the expressions of TIMP-1 mRNA and protein in renal cortex in rats with streptozotocin-induced diabetes, and diabetes-induced expressions of TIMP-1 mRNA and protein may be mediated in part by polyol pathway.

【Key words】 Ascorbic acid; Aldose reductase; Tissue inhibitor of metalloproteinase-1; Diabetic nephropathy;

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)的病理学特征包括肾小球系膜区无细胞性增宽和肾小球基底膜(glomerular basement membrance, GBM)弥漫性增厚,这种变化的组织学基础即是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)积聚。研究显示,高血糖可增加 ECM 多种成分的合成,同时干扰降解过程而致 ECM 过多堆积。既往对 ECM 生成机制研究颇多,降解机制直到近年才逐渐引起重视。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是降解 ECM 的主要酶系,而金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP)是 MMPs 的天然抑制物,二者的相对水平对 ECM 的降解有重要意义。有研究显示,醛糖还原酶抑制剂

作者介绍:肖 谦(1956-),男,副教授,博士,
主要研究方向:糖尿病慢性并发症发病机制及防治。

维普资讯 http://www.cqvip.com

(sorbinil)可抑制人肾脏近曲小管细胞 TIMP－1mRNA 和蛋白表达[1]；抗坏血酸(维生素 C)对醛糖还原酶有直接抑制作用[2]。但尚未见有关抗坏血酸与 TIMP－1 关系的报道。本研究通过链脲菌素糖尿病大鼠模型，观察抗坏血酸对肾脏 TIMP－1mRNA 和蛋白表达的影响，旨在进一步探讨 DN 的发病机制，为 DN 的临床防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂和仪器

雄性 Wistar 大鼠 30 只，由重庆第三军医大学大坪医院动物中心提供，鼠龄 80 天，体重 180～220g(195±20g)，适应性喂养 1 周后体重 195～270g(225±25g)。

羊抗鼠 TIMP－1 多克隆抗体(Santa Cruz 公司产品)，TIMP－1 原位杂交检测试剂盒和 Western Blot 检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)，链脲菌素(美国 Alexis 公司)，NADPH、DL－甘油醛(Sigma 公司)，抗坏血酸检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)；微型印迹电泳转移系统(BIO－RAD 公司)，Sure Step 血糖仪(美国强生公司)，UV－265 紫外分光光度仪(日本)，GM－2000B 生物医学图像分析系统(北京航空航天大学)。

1.2 动物分组及模型制备

雄性 Wistar 大鼠 30 只随机分为 3 组：正常对照组(C 组)，糖尿病组(D 组)，糖尿病＋抗坏血酸治疗组(DT 组)。链脲菌素(STZ)临用时溶于 0.1mmol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH4.0)，大鼠禁食 10h 后，按 60mg/kg 一次性腹腔注射 STZ。对照组用等体积缓冲液，每 24h 取尾静脉血用 Sure Step 血糖仪检测血糖，72h 后血糖＞17mmol/L 示造模成功，实验期间常规鼠饲料(重庆医科大学实验动物中心提供)喂养，大鼠自由摄食、饮水，自然昼夜采光，室温 18～28℃，相对湿度 60%～80%。

抗坏血酸按 9mg/ml 浓度每周 1 次用蒸馏水新鲜配制，每日上午 9:00～9:30 插管喂饲，C 组和 D 组给予同体积蒸馏水，为使 D、DT 组血糖(BG)、糖基化血红蛋白(HbA_{1C})基线水平无显著差异和避免酮症，每日上午 9:00～9:30 腹腔注射鱼精蛋白锌胰岛素 1 次，每次 2～4U，剂量根据血糖水平调整，每周 1 次上午 8:30～9:00 采尾静脉血，Sure Step 血糖仪检测血糖水平，若血糖波动大，增加监测频率。

1.3 标本采集

实验第 9 周按 1mg/kg 腹腔注射 10%水合氯醛麻醉，心腔穿刺抽血，肝素抗凝用于血浆抗坏血酸、血糖和糖化血红蛋白检测。4℃生理盐水经主动脉彻底灌流后取一侧肾脏用于肾组织抗坏血酸、醛糖还原酶检测和 Western－blot；然后用含 1/1000DEPC 之 4%多聚甲醛/0.1mol/L PBS 经主动脉灌注作内固定，取下肾脏后置上述固定液中 22h，蒸馏水冲洗后置蒸馏水中浸泡过夜(12h)，其间换蒸馏水 1,2 次。最后置 70%酒精中保存，石蜡包埋后切成 5μm 厚组织片，粘贴于 APES 包被的玻片上。

1.4 血糖测定用葡萄糖氧化酶法，糖基化血红蛋白测定用微柱法，血浆和肾脏抗坏血酸测定严格按试剂盒说明操作，组织匀浆蛋白质含量测定以牛血清白蛋白为标准，用 Lowry 法。

1.5 肾组织醛糖还原酶检测

采用 Das[3]等的方法。取 80～100mg 肾脏皮质部分组织，按 1:5(W/V)加入组织匀浆液(0.1 mol/L PBS，pH7.2，5mmol/L β－巯基乙醇)，玻璃匀浆管制成组织匀浆，超声破碎仪处理 3 次，每次 10s，间隔 30s，然后经低温离心机 10000g 离心 1h，上清即为粗酶提取液，吸取待测，整个标本处理过程均在 4℃进行。

AR 活性测定以 DL－甘油醛为底物，用紫外分光光度计记录 NADPH 在 340nm 处吸光值的下降表示 AR 活性，不加底物为空白对照。反应体系含：50mmol/L KH_2PO_4－K_2HPO_4 缓冲液 (pH6.2)，0.4mmol/L 硫酸锂，5mmol/Lβ－巯基乙醇，10mmol/L DL－甘油醛，0.1mmol/L NADPH，0.1ml 酶提取液，总体积 1ml。反应自加入 NADPH 开始，37℃反应 4min。AR 单位定义为每毫克蛋白质每分钟消耗 1μmol NADPH[μmol/mgpro·min]

1.6 原位杂交检测 TIMP－1mRNA 表达

经地高辛标记的针对大鼠 TIMP－1 寡核苷酸探针序列为：5′－ACAGC AACAA CAGGA TGCCA GAAGC CAGGG－3′，5′－TCTCC ATGGC TGGGG TGTAG ACGAA CCGGA－3′，5′－ACAAG CAATG AGTGC CACTC TGCAG TTTGC－3′。检测操作严格按试剂盒说明进行。

1.7 TIMP－1 蛋白 Western－blot 检测

样品处理、聚丙烯酰胺凝胶电泳、电转移、免疫学检测均参照文献[4]和严格按试剂盒说明操作。

1.8 数据和统计学处理

原位杂交用北航 CM－2000B 生物医学图像分析系统作半定量分析，每张标本按顺序选 5 个视野，计算每个视野酶反应物平均光密度。用同系统对 Western－blot 目的条带进行密度分析，结果用积分光密度表示，分析结果时以每张膜各条带与正常对照的相对值(%)进行统计分析，以避免不同批次杂交形成的条件差异，显色长短不一产生的误差。

结果以 $\bar{x}\pm s$，采用 Oxstate 程序进行统计分析(方差分析，q 检验等)，检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 各组实验终点时 BG、HbA_{1C}、血浆和肾脏抗坏血酸水平，肾皮质 AR 活性测定结果

由表 1 可见，D、DT 组间 BG、HbA_1c 水平无

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 各组实验终点时血糖(BG)、糖基化血红蛋白(HbA_{1c})、血浆抗坏血酸、肾脏抗坏血酸、AR 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	BG(mmol/L)	HbA_{1c}(%)	血浆抗坏血酸 (μg/ml)	肾脏抗坏血酸 (μg/mgpro)	AR (μmol/mgpro·min)
C	7	5.63±1.28	4.66±0.58	24.4±4.27	1.54±0.25	0.165±0.042
D	6	24.40±4.01#	10.60±1.44#	18.6±2.31△	1.12±0.21△	0.512±0.125#
DT	6	20.30±0.73#	10.20±1.03#	24.5±2.58*	1.55±0.35*	0.225±0.089**

与 C 组比较△ $P<0.05$ # $P<0.01$;与 D 组比较 * $P<0.05$ ** $P<0.01$

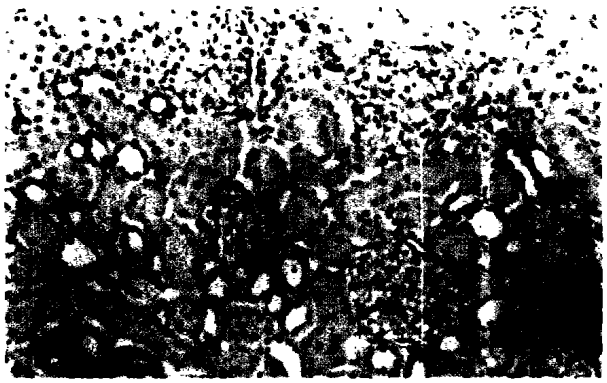


图 1 正常大鼠肾脏皮质部 TIMP-1mRNA 表达(×400)

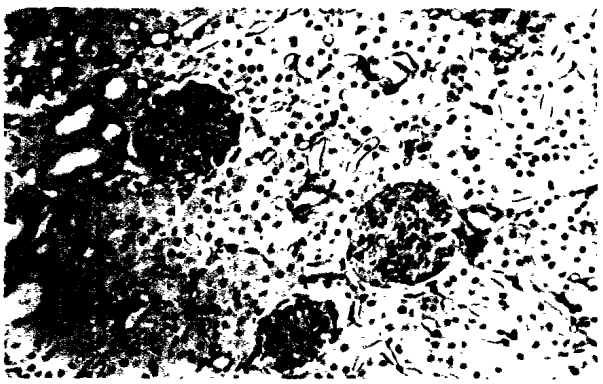


图 2 8 周病程糖尿病大鼠肾脏皮质部 TIMP-1mRNA 表达(×400)

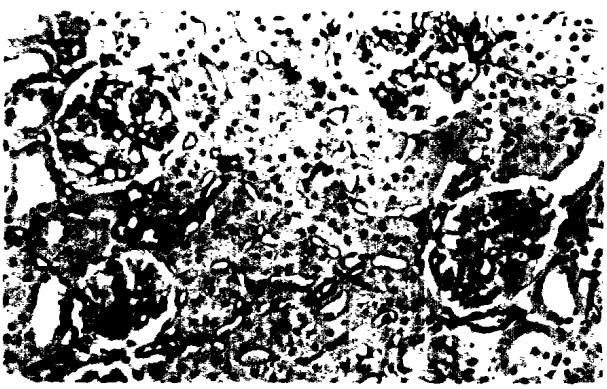


图 3 抗坏血酸治疗 8 周后糖尿病大鼠肾脏皮质部 TIMP-1mRNA 表达(×400)

表 2 各组 TIMP-1mRNA 表达平均光密度值($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TIMP-1
C	7	0.048±0.008
D	6	0.12±0.018**
DT	6	0.082±0.019*#

与 C 组比较 * $P<0.05$ ** $P<0.01$;与 D 组比较 # $P<0.01$

显著差异($P>0.05$),D 组血浆、肾脏抗坏血酸水平较 C 组显著降低($P<0.05$),AR 活性明显升高($P<0.01$),与 D 组相比,DT 组血浆抗坏血酸、肾脏抗坏血酸水平明显升高($P<0.05$),AR 活性显著降低($P<0.01$)。C、DT 组间血浆、肾脏抗坏血酸水平差异无显著性($P>0.05$)。

2.2 TIMP-1 原位杂交检测

从表 2 和图 1～3 可见,TIMP-1mRNA 主要表达于肾小球系膜细胞、内皮细胞、上皮细胞。原位杂交半定量结果表示,D 组 TIMP-1mRNA 表达水平显著高于 C 组($P<0.01$),DT 组 TIMP-mRNA 表达水平较 D 组明显下调($P<0.01$),但仍显著高于 C 组($P<0.05$)。

2.3 各组 TIMP-1 Western blot 结果

见表 3,病程 8 周时,D 组 TIMP-1 蛋白水平较 C 组明显升高($P<0.01$),DT 组 TIMP-1 蛋白水平较 D 组明显降低($P<0.05$),但仍高于 C 组($P<0.05$)。

表 3 各组 TIMP-1 蛋白表达积分光密度值($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TIMP-1
C	7	276.6±69.14
D	6	1064.3±283.9**
DT	6	560.3±88.45*#

与 C 组比较 * $P<0.05$ ** $P<0.01$;与 D 组比较 # $P<0.05$

3 讨 论

TIMP-1 是肾脏表达的主要 TIMP 家族成员,对 MMP 家族有特异而广泛的抑制作用。一般认

维普资讯 http://www.cqvip.com

为,高血糖效应以诱导各种 ECM 成份合成为主,但 Phillips[1]等用 RT－PCR 发现高糖环境中人近曲小管上皮细胞 IV 型胶原、纤维连接蛋白(FN)mRNA 表达无显著变化,同时发现 TIMP－1 表达显著上调,对基质金属蛋白酶－2(MMP－2)抑制作用明显增加。Silbiger[5]等甚至发现长期暴露于高糖环境中肾脏系膜细胞合成胶原反而减少。越来越多的研究表明,糖尿病时机体肾脏 TIMP－1mRNA 和蛋白表达上调、ECM 降解过程被抑制是 DN 结构和功能改变的重要机制之一。

本研究显示,与对照组比较,8 周病程时糖尿病组大鼠血浆和肾脏抗坏血酸水平显著下降,肾脏 TIMP－1mRNA 和蛋白表达明显上调;抗坏血酸治疗组血浆和肾脏抗坏血酸水平与对照组比较无明显差异,肾脏 TIMP－1mRNA 和蛋白表达较糖尿病组明显下调,这种血浆和肾脏组织抗坏血酸水平、TIMP－1mRNA 和蛋白表达变化的一致性,提示体内抗坏血酸水平改变与 TIMP－1mRNA 和蛋白表达之间存在某种内在联系。

抗坏血酸水平与 TIMP－1mRNA 和蛋白表达确切关系目前还不清楚,推测可能与葡萄糖的多元醇代谢途径[1]和转化生长因子 β(TGF－β)有关[6]。多元醇代谢途径在糖尿病肾病(DN)发病机制中的作用已得到广泛认同,醛糖还原酶(AR)作为该代谢途径的限速酶自然倍受关注。研究表明,糖尿病时机体红细胞和组织 AR 活性增加与抗坏血酸水平下降有关。多元醇代谢途径激活后使细胞内二脂酰甘油(DAG)从头合成(de novo)增加[7],而后者是蛋白激酶 C(PKC)天然激活物[8],PKC 激活后可诱导 c－fos、c－jun 原癌基因转录[9],形成异二聚体活化蛋白－1(activator－binding protein－1,AP－1),AP－1 可识别 DNA 特殊序列并与之结合,发挥转录水平的调控作用。已经发现 TGF－β 基因启动区存在 AP－1 结合序列[10],多元醇代谢途径活化后可经上述机制使 TGF－β 基因表达上调,而在 TIMP－1mRNA 和蛋白表达的各种调控因素中,尤以 TGF－β 对 TIMP－1 的上调作用最为重要[11]。本实验显示,补充抗坏血酸可显著降低糖尿病大鼠肾脏 AR 活性,支持国外有关抗坏血酸可直接抑制 AR 活性,明显降低红细胞内 AR 催化产物——山梨醇水平的报道。Vincent[2]等发现生理范畴的抗坏血酸可降低人红细胞山梨醇含量 20%～25%,由于肾脏等组织抗坏血酸含量较红细胞更高,推测在这些组织中山梨醇含量有可能下降 50%。因此,有学者认为抗坏血酸即是一种 AR 抑制剂[12]。我们的实验也表明,抗坏血酸可能正是通过抑制 AR 活性,减少 DAG 从头合成和 PKC 活化,下调 TGF－β 表达,最终实现对 TIMP－1 的负向调控。

本实验结果提示,多元醇途径可能部分介导了糖尿病大鼠肾脏 TIMP－1mRNA 和蛋白表达。补充抗坏血酸抑制 AR 活性、下调 TIMP－1mRNA 和蛋白表达可能是早期干预 DN 的靶点之一。但抗坏血酸抑制 AR 后对 TIMP－1mRNA 和蛋白表达的调节水平和具体机制仍有待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Phillips AO, Steadman R, Morrisey K, et al. Exposure of human renal proximal tubular cell to glucose leads to accumulation of type IV collagen and fibronectin by decreased degradation [J]. Kidney Int, 1997;52:973－998.

[2] Vincent JE, Mendiratta S, May JM. Inhibition of aldose reductase in human erythrocyte by vitamin C[J]. Diabetes Res Clin Pract, 1999;43:1－8.

[3] Das B, Srivastava SK. Purification and properties of aldose reductase and aldehyde reductase II from human erythrocyte [J]. Arch Biochem Biophys, 1985;238:670－679.

[4] 汪家政,范 明. 蛋白质技术手册[M]. 第 1 版,北京:科学技术出版社,2000,80－89.

[5] Silbiger S, Crowley S, Shan Z, et al. Nonenzymatic glycation of mesangial matrix and prolonged exposure of mesangial matrix to elevated glucose reduces collagen synthesis and proeoglycan charge [J]. Kidney Int, 1993;43:853－864.

[6] Bruijn JA, Ross AR, De Geus B, et al. TGF－β and the glomerular extracellular matrix in renal pathology [J]. J Lab Clin Med, 1994;123:34－37.

[7] Ayo SH, Radnik R, Garoni JA, et al. High glucose increases diacylglycerol mass and activates protein kinase C in mesangial cell cultures [J]. Am J Physiol, 1991;261:F571－F577.

[8] King GL, Ishii H, Koya D. Diabetic vascular dysfunction: A model of excessive activation of protein kinase C [J]. Kidney Int, 1997;52(60):S77－S85.

[9] Messina JL, Standaert ML, Ishizuka T, et al. Role of protein kinase C in insulin's regulation of c－fos transcription [J]. J Biol Chem, 1992;267:9223－9228.

[10] Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, et al. Autoinduction of transforming growth factor β_1 is mediated by the AP－1 complex [J]. Mol Cell Biol, 1990;10:1492－1497.

(下转第 158 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

机会增高。增殖细胞核抗原(PCNA)作为 DNA 聚合酶的辅助性蛋白,直接参与细胞增殖过程的 DNA 复制。其表达程度反应了细胞的增殖活性[3]。本实验无复发乳腺癌组和多原发乳腺癌组 PCNA 阳性表达率较乳腺纤维腺瘤组显著增高,说明癌组织细胞增殖水平较良性病变组织细胞高。多原发乳腺癌 PCNA 表达程度较无复发乳癌组高,但无显著差异。表明多原发乳癌的第一原发癌较无复发乳腺癌有较多的增殖活跃细胞,但预测第二原发癌发生的价值不能肯定。

表皮生长因子受体(EGFR)蛋白,是一种导致酪氨酸激酶的细胞受体,与相应的配体 FGF,TGF 结合后,激活受体的酪氨酸激酶致受体本身及细胞内酪氨酸磷酸化,引起细胞过度分裂,增殖及恶变[4]。这种肿瘤自分泌 EGF、TGF 细胞生长因子作用于肿瘤细胞本身使肿瘤细胞增殖,已被认为是肿瘤发生、增殖失控的原因,已有较多文献报道 EGFR 阴性乳腺癌无复发生存率高,认为是对乳腺癌预后有关的因素。本实验无复发乳腺癌和多原发乳腺癌 EGFR 阳性表达率较乳腺纤维腺瘤组显著增高,说明癌细胞增殖活性高。多原发乳腺癌 EGFR 表达程度较无复发乳腺癌显著增强。提示 EGFR 表达程度高在预测第二原发癌的发生可能具有一定价值。

C－erbB$_2$ 基因编码酪氨酸激酶受体,与 EGFR 具有高度同源性。C－erbB$_2$ 的过表达与乳腺癌的发生,生物学行为,预后有关[5]。Gasparini 用免疫组化法检测 167 例乳腺癌中 52%有表达,其中 27%有 30%以上细胞染色,25%为灶性染色;并发现 C－erbB$_2$ 阳性者复发危险性高。C－erbB$_2$ 过表达的乳腺癌常表现出对蒽环类化疗药物及三苯氧胺治疗的抗拒。重组人抗 C－erbB$_2$ 抗体与泰素联合应用,可增强化疗药的疗效。本实验无复发乳腺癌组和多原发乳腺癌组 C－erbB$_2$ 阳性表达率较乳腺纤维瘤组显著增高。但多原发乳腺癌组 C－erbB$_2$ 的阳性表达程度较无复发乳腺癌组高,且有显著差异。表明癌组织细胞较良性病变组织细胞增殖活跃。C－erbB$_2$ 基因蛋白过表达与多原发癌第二原发癌的发生可能有关。

参 考 文 献

[1] 刘复生,刘彤华.肿瘤病理学[M].第 1 版,北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997;1599－1663.

[2] Leis HP Jr. Bilateral breast cancer [J]. Surg Clin N Amer,1987;58:833－837.

[3] Steven R, Donna S, Neuberg N, et al. Prediction of early relapse and shortened survival in patient with breast cancer by proliferating cell nuclear antigen score [J]. Cancer, 1993; 71: 3552－3559.

[4] 曹世龙.肿瘤学新理论与新技术[M].第 1 版,上海:上海科技教育出版社,1997;733－734.

[5] Christianson TA, Doherty JK, Liny J. NH2－terminally truncated HER－2/neu protein relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer [J]. Cancer Res,1998;58:5123－5129.

(上接第 134 页)[11] Bruijn JA, Ross AR, De Geus B, et al. TGF－β and the glomerular extracellular matrix in renal pathology [J]. J Lab Clin Med,1994;123:34－37.

[12] Cunningham JJ, Mearkle PL, Brown RG. Vitamin C an aldose reductase inhibitor that normalizes erythrocyte sorbitol in insulin－dependent diabetes mellitus [J]. J Am Coll Nutr, 1994;13:344－350.