维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)04-0391-03

糖尿病大鼠肾脏TGF-β受体蛋白表达的实验研究

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：探讨持续高血糖对糖尿病大鼠肾脏转化生长因子β I型受体(TGF β R I)和转化生长因子β II型受体(TGF β RII)蛋白表达的影响。方法：雄性Wistar大鼠20只随机分为正常对照组（C组）和糖尿病组（D组），实验第9周用免疫组化和图像分析系统检测两组肾脏TGF β RI和TGF β RII蛋白表达水平。结果：与对照组相比，糖尿病组TGF β RI和TGF β II蛋白表达分别增加100%和118%（$P<0.01$）。结论：持续高血糖显著增加糖尿病大鼠肾脏TGF β RI和TGF β RII受体蛋白表达，可能对糖尿病肾病的发生发展发挥重要作用。

【关键词】糖尿病肾病；转化生长因子-β I型受体；转化生长因子-β II型受体
【中国图书分类法分类号】R392.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-03-10

An experimental study of TGF-beta receptor expression in kidney of diabetic rats

XIAO Qian, et al
(Department of Endocrinology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the influence of sustained hyperglycemia on protein expression of transforming growth factor β type I receptor (TGF β RI) and transforming growth factor β type II receptor (TGF β RII) in kidney of diabetic rats. *Methods*: 20 male Wistar rats were randomly divided into two groups: control group (group C) and streptozotozin-induced diabetic rats (group D). The rats of two groups were used to study protein expression of TGF β RI and TGF β RII with immunohistochemistry and image analysis at 9 weeks. *Results*: Compared with group C, the protein expression of TGF β RI and TGF β RII in group D had increased by 100% and 118%, respectively. *Conclusion*: Sustained hyperglycemia can significantly increase protein expression of TGF β RI and TGF β RII in kidney of diabetic rats. It may play an important role in the progression of diabetic nephropathy.

【Key words】Diabetic nephropathy; Transforming growth factor- β type I receptor; Transforming growth factor- β type II receptor

转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF β)在糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)发生发展中的作用已得到广泛认同。研究表明，TGF β可通过自分泌和旁分泌途径，诱导肾脏多种细胞肥大[1]，促进细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分如I、III、IV型胶原，纤维连接蛋白等合成[2,3]，抑制基质金属蛋白酶（MMP）表达和活化，上调基质金属蛋白酶组织抑制物（TIMP）、纤溶酶原激活物抑制剂（PAI）等蛋白酶抑制因子表达，阻碍ECM降解[4]，直接导致肾脏肥大，系膜区扩张和肾小球基底膜增厚等DN的组织形态学改变。TGF－β通过与细胞表面特异性受体结合发挥其生物学作用，其中与转化生长因子β I型受体(transforming growth factor β type I receptor, TGF β RI)和转化生长因子II型受体(transforming growth factor β type II receptor, TGF β RII)共同构成配体－受体三元复合物是实现TGF β胞内效应的关键。既往的研究偏重于TGF β在DN发生发展中的机制，而对糖尿病时转化生长因子β受体(transforming growth factor β receptor, TGF β R）表达情况研究甚少。研究观察了糖尿病大鼠肾脏TGF β RI和TGF β RII的表达，旨在从新的角度了解DN发生发展的可能机制。

1 材料和方法

1.1 试制及仪器

STZ购自美国AIEXIS公司，兔抗鼠TGF β RI多克隆抗体，兔抗鼠TGF β RII多克隆抗体均为美国Santa Cruz公司产品，SABC免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公

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

维普资讯 http://www.cqvip.com

司。

光学显微镜为日本Olympus产品，CM-2000B生物医学图像分析系统系北京航空航天大学产品。Sure Step 血糖仪为美国强生公司产品。

1.2 动物分组及糖尿病模型制备

雄性Wistar大鼠20只，由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供，鼠龄80天，体重180～220g（195±20g），适应性喂养一周后体重195～270g（225±25g）。实验大鼠随机分为二组：(1)正常对照组（C组）；(2)糖尿病组（D组）。糖尿病模型制备，链脲菌素(STZ)临用时溶于0.1mmol/L枸橼酸盐缓冲液(pH=4.0)，针头式滤器(0.2μm)除菌，大鼠禁食10h后，按60mg/kg一次性腹腔注射STZ，对照组用同体积缓冲液，每24h一次取尾静脉血用Sure Step血糖仪检测血糖，72h后血糖>17mmol/L示造模成功。实验期间常规商用鼠饲料（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%，为避免酮症和防止血糖过高，实验期间糖尿病组每日上午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，实验终点时共死亡大鼠7只，其中对照组3只，糖尿病组4只。

1.3 方法

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，肝素抗凝用于血糖、糖化血红蛋白(HbA_{1C})测定，用含1/1000 DEPC的4%多聚甲醛/0.1M PBS经主动脉灌注作内固定，取下肾脏后置上述固定液中常规固定，石蜡包埋切片，厚度5μm，粘贴于APES包被的玻片上，

HbA_{1C}测定用微柱法，血糖测定用葡萄糖氧化酶法。

免疫组化用SABC法，严格按试剂盒操作。

1.4 数据和统计学处理

免疫组化结果用CM-2000B生物医学图像分析系统作半定量分析，每张切片按顺序选5个视野，计算每个视野酶反应产物的平均光密度，两组平均光密度数据以均值±标准差表示，组间比较用t检验，检验水准$\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 两组实验终点时血糖和HbA_{1C}水平

由表1可见，实验终点时糖尿病组血糖和HbA_{1C}明显升高，与正常对照组相比，差异有极显著性。

表1 两组实验终点时血糖、HbA1C水平（$\bar{x}\pm S$）

组别	n	血糖mmol/L	HbA1C(%)
C组	7	5.63±1.28	4.66±0.58
D组	6	24.40±4.01△	10.60±1.44△

△$P<0.01$

2.2 肾脏TGFβRI、TGFβRII蛋白表达

表2 实验终点时两组肾脏TGFβRI、TGFβII蛋白表达平均光密度值（$\bar{x}\pm S$）

组别	n	TGFβRI	TGFβRII
C组	7	0.114±0.023	0.088±0.016
D组	6	0.228±0.053△	0.192±0.031△

△$P<0.01$

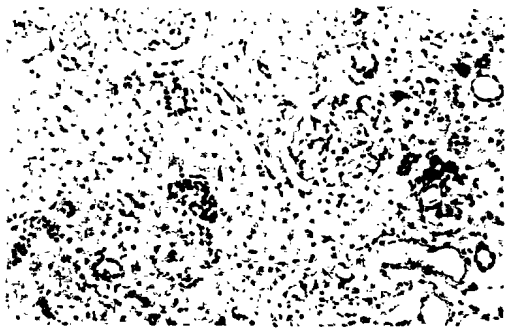


图1 正常大鼠肾脏皮质部TGFβRI蛋白表达（200×）

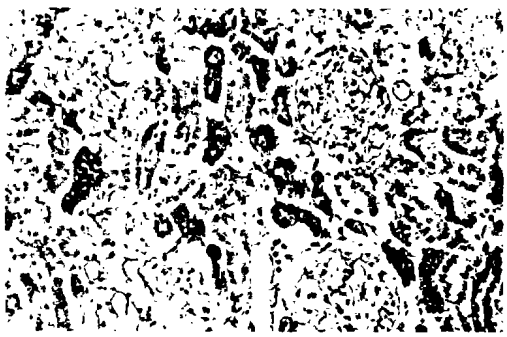


图2 8周病程糖尿病大鼠肾脏皮质部TGFβRI蛋白表达（200×）

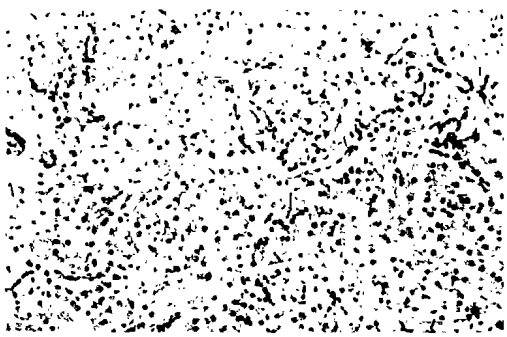


图3 正常大鼠肾脏皮质部TGFβRII蛋白表达（200×）

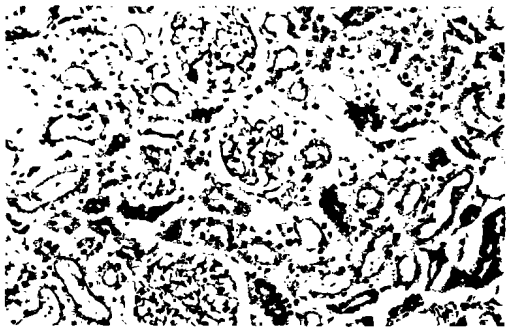


图4 8周病程糖尿病大鼠肾脏皮质部TGFβRII蛋白表达（200×）

维普资讯 http://www.cqvip.com

如表2，图1～4所示，实验第9周时，糖尿病组TGFβRI和TGFβRII蛋白表达显著高于正常对照组（$P<0.01$）。

3 讨 论

TGFβ生物学效应的发挥很大程度上取决于其与特异性受体的结合及相应的细胞内信号传导。已知体内有5种TGFβ受体，其中IV、V型受体作用目前尚不清楚，III型受体胞质区短，无信号传导活性，但能增加TGFβ与II型受体的结合[5]。而实验所涉及的I、II型受体为TGFβ信号传导所必需，缺一不可，二者的胞质区段有丝－苏氨酸激酶活性，与受体后细胞内通迅有关。TGFβ首先与TGFβRII受体结合，然后与TGFβRI呈配体依赖性结合，形成TGFβ－TGFβRII－TGFβRI三元复合物，TGFβRII胞质段激酶区使TGFβRI磷酸化，磷酸化的TFGβRI将信号放大传递给下游的Smad蛋白家族[6]。经一系列复杂的胞内信号传导过程，最终实现TGFβ的多种生物学效应。

研究免疫组化半定量分析发现，STZ糖尿病大鼠8周病程时，肾脏TGFβRI和TGFβRII蛋白表达较正常对照分别增加100%和118%，与国外报道有一定差距[7]。这可能与动物模型、检测时间和检测方法不同有关，有学者在自发性高血压大鼠中复制糖尿病模型，两周后用Western-blot方法检出TGFβRI和TGFβRII蛋白表达分别增加4倍和2倍，胰岛素控制血糖后肾脏两种TGFβR表达显著降低[7]。另有研究显示，自发性糖尿病BB鼠肾脏TGFβR表达上调[8]，提示高血糖可通过某种机制上调TGFβR表达，同时也排除了TGFβR表达增加是因为STZ对肾脏的毒性作用，但高血糖上调TGFβR表达的具体机制目前尚不清楚。Hill[8]观察了1型和2型糖尿病模型30天时肾脏TGFβRII表达，发现虽然肾脏TGFβmRNA表达增加，但都不能检测出相应的蛋白表达，而此时TGFβRII蛋白表达显著增加，表明TGFβRII可不依赖配体而独立表达，该学者还发现糖尿病时肾脏TGFβR与TGFβ的结合率下降，但由于其数量明显上升，净效应还是增加了与配体的结合[8]。此与糖尿病时TGFβ介导了多种肾损害代谢途径的状况相符。I、II型TGFβR还可通过不同比例的表达，发挥不同的生物学效应，McCaffery[9]发现TGFβRI／TGFβRII比例增加可导致动脉粥样损伤处血管平滑肌细胞胶原合成增加，提示TGFβR不仅是被动的与TGFβ结合，其独立于配体的表达机制以及其在下游胞内信号传递的复杂过程可能才是TGFβ生物学作用复杂多样的原因所在。

研究结果提示，糖尿病肾病时，除TGFβ表达模式改变外，TGFβRI和TGFβRII蛋白表达上调可能是糖尿病肾病发生发展的重要原因。

参 考 文 献

[1] Choi ME, Kim E, Huamg Q, et al. Rat mesangial cell hypertrophy is response to transforming growth factor- β [J]. Kidney Int, 1993;44:948-959.

[2] Park IS, Kiyomoto H, Abboud SL, et al. Expression of transforming growth factor- β and type IV collagen in early streptozotocin induced diabetes[J]. Diabetes, 1997;47:473-480.

[3] Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF β_1: Regulation of extracellular matrix[J]. Kidney Int, 1992;41:557-559.

[4] Yokoyama H, Deckert T. Central role of TGF- β in the pathogenesis of diabetic nephropathy and macrovascular complications[J]. Diabet Med, 1996;13:313-320.

[5] Massague J. Receptors for the TGF- β family[J]. Cell, 1992; 69:1067-1070.

[6] Schiffer M, Gersdorff GV, Bitzer M, et al. Smad protein and transforming growth factor- β signaling[J]. Kidney Int, 2000;58 (Suppl 77):S45-S52.

[7] Kang MJ, Lngram A, Ly H, et al. Effects of diabetes and hypertension on glomerular transforming growth factor- β receptor expression[J]. Kidney Int, 2000;58:1677-1685.

[8] Hill C, Flyvbjerg A, Grxnbaek H, et al. The renal expression of transforming growth factor- β isoform and their receptors in acute and chronic experimental diabetes in rats[J]. Endocrinology, 2000;141:1196-1208.

[9] McCaffery TA, Consigli S, Du B, et al. Decreased type II/ type I TGF-beta receptor ratio in cell derived from human atherosclerotic lesions: Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF- β [J]. J Clin Invest, 1995;96:2667-2675.