维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)03－0267－03

糖尿病大鼠视网膜血管蛋白激酶 C 同工酶表达模式

周　波[1]，汪恕萍[1]，蒋　涛[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教研室，重庆　400016)

【摘　要】目的：探讨糖尿病大鼠视网膜血管蛋白激酶 C(PKC)活性变化及其同工酶表达特性。方法：采用渗透休克法获取正常及链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠视网膜血管。原位 PKC 催化活性分析法测定两组大鼠视网膜血管 PKC 活性，α、β、γ、δ、ε、ζ－PKC 同工酶表达水平则采用 Western blot 法。结果：病程 2 月时糖尿病大鼠视网膜血管 PKC 活性为 346±18.1Pmoles Pi min^{-1}·mgprotein $^{-1}$(单位下同)较正常对照组 131±10.5 显著为高($P<0.05$)。α、β、δ、ζ－PKC 分布于正常和糖尿病大鼠血管细胞浆、膜部，而 γ、ε 则无信号，α、β、ζ 同工酶在糖尿病大鼠视网膜血管膜部较正常对照大鼠显著为高($P<0.05$)，尤以 α、β 为著，光密度(OD)值分别为对照的 282%±32%、340%±26%、187%±14%。而糖尿病大鼠视网膜血管浆部 α、β、ζ－PKC 同工酶表达则较对照组显著为低($P<0.05$)，其 OD 值分别为对照的 71%±11%、63%±8%、84%±6%。但 δ－PKC 浆部则较对照组显著增高，其 OD 值为正常对照之 208%±13%，但膜部 δ－PKC 与正常对照相比较无显著性差异。结论：糖尿病视网膜病变(DR)靶组织——视网膜血管中 PKC 显著激活，呈 α、β、ζ 同工酶从胞浆至胞膜，而 δ－PKC 则从胞膜至胞浆移位激活特征。

【关键词】蛋白激酶 C；同工酶；血管；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】2002－06－11

Pattern of protein kinase C isoforms expression in retinal vasculature of diabetic rats

ZHOU Bo, et al

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

【Abstract】 *Objective*: To clarify the characteristics of protein kinase C(PKC) activity and its isoforms expression pattern in retinal vessels in diabetic rats. *Methods*: Osmotic shock method was used to isolate the retinal vessels of rats; in situ PKC catalytic activity was determined after 2 mo follow－up; α、β、γ、δ、ε、ζ－PKC in the membrane and cytosolic fraction were determined by western blot. *Results*: Diabetes result in＞180% elevation of PKC activity in the retinal vasculature. α、β、δ、ζ, except γ、ε distributed in the membrane and cytosolic fraction in retinal vessels in normal or diabetic rats, the expression of α、β、ζ－PKC significantly increase in the membrane pool OD Value 282%±32%、340%±26%、187%±14% respectively, but α、β、ζ－PKC expression significantly decrease in cytosolic pool in retinal vessels of diabetic rats compared with nondiabetic rats, OD value 71%±11%、63%±8%、84%±6%, respectively, however δ isoenzym expression in cytosolic pool significantly increase 208%±6%, compared with normal rats. *Conclusion*: Diabetes can induce the translocation of α、β、ζ－PKC from cytosol to membrane pool, but δ isoform translocated from membrane to cytosol pool in retinal vessels of diabetic rats.

【Key words】 Protein Kinase C; Isoenzyme; Vessel; Diabetes mellitus

业已证实，蛋白激酶 C(PKC)激活是糖尿病诱导的视网膜血管重塑的重要媒介[1]。目前已知 PKC 是由细胞定位、激活剂和生物效应等不尽相同的三类同工酶构成[5,7]，即：经典型($cPKC_s$)包括 α、β_1、β_2、γ；新型($nPKC_s$)包括 δ、ε、η、(L)、θ、和不典性型($aPKC_s$)ζ、λ/τ、μ。虽然 shiba 等[3]已初步观察了 α、β_1、β_2、γ－PKC 在糖尿病大鼠视网膜中的变化，但视网膜是由起源于外胚层的神经组织和源于中胚层的血管组织构成，鉴于神经组织和血管组织在糖尿病状态下 PKC 活性的不一致变化[1]，为此本文研究

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(00－2026)

维普资讯 http://www.cqvip.com

了糖尿病大鼠视网膜血管 PKC 活性，并观察 PKC 同工酶中分布广泛、含量丰富的 α、β、γ、δ、ε、ζ 六种异构酶在视网膜血管中的表达规律。

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 1%链脲菌素(用 pH 4.5 的 0.1 mol/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≥16.7 mmol/L 即为糖尿病大鼠，共 28 只(D 组)。

1.2 视网膜血管的获取

系采用 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_c(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 100,000g30min，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 60min100,000g，弃上清，沉淀加入 0.3mL 含 0.25% Triton X－100 的缓冲液悬浮，于 0℃摇动孵育 1h，离心 60min(100,000g)，上清液为 PKC 检测的细胞膜成份。

1.4 原位 PKC 活性分析

系改良 Kowluru 法[4]视而建立。取新鲜视网膜血管与穿细胞缓冲液 37℃ 孵育 10min。此缓冲液由 50μg/ml 地高辛精、137mmol/LNacl、5.4mmol/Lkcl、10mmol/L$Mgcl_2$、20mmol/LHEPES、100μ mol/L－[^{32}P]ATP(北京亚辉公司)、100μmol/L 八肽底物 RKRTLRRL(Amersh 公司)和 400μml/1 组蛋白Ⅲs(sigma 公司)构成。4℃ 25%三氯乙酸终止反应。离心取上清点于磷酸纤维素滤纸上，直径约 2.5cm。负压下 75mmol/L 磷酸冲洗 3 次。自然干燥后闪烁液中，2h 后于闪烁计数仪上测定^{32}P 由 γ－[^{32}P]ATP 转移至八肽和组蛋白Ⅲ、底物的放射活性，即单位为：PmolPi. min^{-1}. $mgproten^{-1}$。结果以三次检测均值表示，检测变异系数为 6.5%。

1.5 Western 印迹检测

(1)SDS－PAGE：5%浓缩胶、10%分离胶(2)电转移：200mA 转移 2h(3)免疫学检测：一抗为兔抗鼠 α、β、γ、δ、ε、ζ－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 α、β、γ、δ、ε、ζ－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。

1.6 其它

糖化血红蛋白(HbA_{Ic})微柱法；蛋白定量采用 Lowry 法，以牛血清白蛋白为标准。

1.7 统计学处理

结果以均数±标准误(或差)表示，两组间比较用 t' 检验。

2 结 果

2.1 两组大鼠代谢参数及 PKC 活性变化

成模 2 月时，糖尿病大鼠组血糖(21.3±4.1mmol/L)、HbA_{Ic}(10.6%±1.8%)较正常对照组血糖(5.2±0.3mmol/L)、HbA_{Ic}(4.4%±0.8%)显著为高，且糖尿病大鼠视网膜血管 PKC 活性为 346±18.1PmolPi. min^{-1}. $mgproten^{-1}$较对照组(131±10.5PmolPi. min^{-1}. $mgproten^{-1}$)亦显著增高($P<0.05$)，说明糖尿病大鼠视网膜血管 PKC 显著活化。

2.2 PKC 同工酶在正常大鼠视网膜血管中的分布

采有特异性抗体免疫印迹显示 α、β、δ、ζ－PKC 异构酶存在于视网膜血管浆、膜部，但未检出 γ、ε－PKC 同工酶条带。如附表所示：红蛋白修正后比较 PKC 同工酶膜、浆部表达比率发现 α－PKC 浆、膜部几乎相同。与之不同 β、ζ 主要存在于膜部。而 δ 以浆中为主。定量分析膜/浆之比 β310%±80%、ζ120%±90%、而浆/膜之比 δ 为 220%±120%，偶尔可见 ζ 在 50kD、30kD 处。所有这些带均可由亚型特异性合成肽与一抗共孵育时消失，而显示反应特异性。

2.3 糖尿病大鼠视网膜血管 PKC 同工酶表达模式

本文探讨了糖尿病对大鼠视网膜血管 PKC 表达的影响，结果显示：同非糖尿病正常大鼠一样，PKC 同工酶 α、β、δ、ζ 在糖尿病大鼠视网膜血管表达。免疫印迹结果显示此 α、β、ζ 同工酶在糖尿病大鼠视网膜血管膜部较正常大鼠显著为高($P<0.05$)，尤以 α、β 为著(见表 1)。光密度(OD)值分别为对照鼠的 282%±32%、340%±26%、187%±14%。而浆部较正常大鼠显著为低($P<0.05$)，定量分析 OD 值为 71%±11%、63%±8%、84%±6%，但 δ－PKC 浆部则较正常大鼠显著为高($P<0.05$)，其 OD 值为正常对照之 208%±13%，但 δ－PKC 膜部在两者间则无显著性差异($P<0.05$)。表明 α、β、ζ－PKC 同工酶在糖尿病大鼠视网膜血管存

维普资讯 http://www.cqvip.com

在从胞浆至胞膜的移位激活。而 δ－PKC 则为从胞膜至胞浆之移位激活。

表 1 两组大鼠视网膜血管 PKC 同工酶免疫印迹灰度扫描的光密度比较

蛋白激酶 c 同工酶	鼠数	浆部(Cytosolic fraction)		膜部(Membrane fraction)	
PKC isoforms	n	对照组(Control)	糖尿病组(Diabetes)	对照组(Control)	糖尿病组(Diabetes)
α	10	21000 ± 1300	15000 ± 1400$^{\triangle}$	20600 ± 900	58200 ± 4600*
β	12	18000 ± 2500	13000 ± 1700$^{\triangle}$	55800 ± 2100^{S}	189000 ± 6300*
δ	12	30800 ± 3600^{S}	64000 ± 1100$^{\triangle}$	14000 ± 2000	12900 ± 1600
ζ	10	6400 ± 300	5400 ± 200$^{\triangle}$	7700 ± 300^{S}	14400 ± 1100*

*：与糖尿病鼠膜部比较 $P<0.05$ $^{\triangle}$：与糖尿病鼠浆部比较 $P<0.05$ ^{S}：与正常大鼠浆部比较 $P<0.05$

3 讨 论

3.1 糖尿病大鼠视网膜血管 PKC 活性变化

尽管检眼镜可以直接窥视糖尿病患者视网膜微循环，但其代谢改变却因血管不易获取而知之甚少。经典的胰酶消化法、清水自溶法尚有复杂、费时、且易损伤膜蛋白之缺陷。本实验采用渗透休克法观察了糖尿病大鼠视网膜血管原位 PKC 活性，发现其 PKC 活性较正常对照组增加近 2 倍，说明 DR 的靶位点——视网膜血管 PKC 活化，此与文献在高葡萄负荷的视网膜血管细胞中的报导的结果相一致[2]。

3.2 PKC 同工酶在正常大鼠视网膜血管中的表达

以脑型 PKC 同工酶分子量为基准，本文免疫印迹结果显示正常大鼠视网膜血管 PKCα、β、δ、ζ 浆膜均呈阳性表达，尤以膜(或浆)为高。而 PKCγ、ε 浆膜均未检出印迹条带的免疫反应信号。虽然 β(β_1、β_2)和 γ 同工酶分子量相近(约 80kD)，但同工酶特异性重组多肽证实抗体间无交叉反应。本文检出多条 PKCζ 带，所有这些印迹条带均可为 ζ 特异性重组多肽所封闭。研究表明[5]，ζ 同工酶易为蛋白酶水解，在诸多细胞系中均可见低分子量亚型分布。Southen 杂交[7]显示 PKCγ 主要存在于大脑、海马和小脑蒲肯野纤维，而肾上腺亦可有弱杂交信号。本文结果显示大鼠视网膜血管无 γ－PKC 表达，此支持 Nishizuka 认为[5] γ－PKC 主要存在于起源于神经冠的细胞而非血管细胞的观点。

3.3 糖尿病大鼠视网膜 PKC 同工酶表达模式

静息时，PKC 锚定于失活 C 激酶受体(RICK)而存在于细胞浆亚细胞结构中，其活性部位为假性底物片段所遮闭。当受到环境刺激时，PKC 空间构型发生变化，假性底物片段从活性部位脱位，同时活化 C 激酶受体(RACK)位点暴露，使 PKC 移于粘附或插入胞膜，此即所谓的 PKC 移位活化(translocation)[7]。故检测浆、膜部 PKC 同工酶蛋白表达水平是反映其活化状态的客观指标。本实验整体水平首次发现糖尿病大鼠视网膜血管膜部 α、β、ζ－PKC 同工酶表达水平较正常大鼠显著为高，而浆部则显著为低，但 δ－PKC 浆部则为糖尿病大鼠较正常鼠为高，表明糖尿病大鼠视网膜血管 α、β、δ、ζ－PKC 激活。Shiba 等[3]采用 Western 印迹技术发现葡萄糖预处理的牛视网膜内皮细胞、周细胞均仅表达 α－PKC、β_1－PKC 和 β_2－PKC 增多。但 Haller 等[8]采用共聚焦镜证实高葡萄糖可诱导血管平滑肌细胞(与周细胞胚胎起源相同，表型特征相似)移位激活 PKCα、β、δ、ζ。分子构型研究表明[5,7]，α、β、δ－PKC 同工酶的 C_1 区氨基酸序列高度保守，均含有由 6 个半胱氨酸重复序列构成“锌指”结构域，表现为二脂酰甘油(DAG)依赖活化方式，目前已知，糖尿病时高葡萄糖可循从头途径合成 DAG 增多[1,2]，故可诱导 α、β、δ－PKC 同工酶移位激活。至于 ζ－PKC 活化机理尚不清楚，推测可能与葡萄糖代谢其它途径产物(如反应性氧类或晚期糖化终产物形成增多)有关[8]。

总之，本文结果显示 DR 靶位点—视网膜血管 PKC 显著激活，呈现 α、β、δ、ζ 同工酶移位活化模式，深入研究 PKC 同工酶与下游事件的关系将有助于进一步阐明 DR 发生、发展的信号机制及其干预靶点。

参 考 文 献

[1] Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications[J]. Diabetes, 1998; 47(6): 859－866.

[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.

(下转第 306 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

异[5]。大多文献报告,采用含 10% DMSO 的冻存液悬浮肝细胞分装后液氮保存方法,肝细胞存活率可达 80%～90%左右,细胞的形态完整性、白蛋白合成能力以及多种酶活性均保存完好[7～9]。但上述方法均存在不同程度的缺点,如冻存步骤复杂、冻存条件要求较高、肝细胞悬液冻存体积小、冻存时间较短以及冻存后肝细胞存活率较低等。为了妥善地解决上述问题,以原代大鼠肝细胞为模型进行探索,有下面几点收获:(1)含 2% DMSO 与 10% DMSO 冻存液保护作用相同;(2)含 2% DMSO 冻存液悬浮肝细胞冻存于 -70℃ 与液氮效果均良好;(3)冻存于 -70℃ 与液氮 1w 至 2m 肝细胞均保存了良好的生物学性状;(4)于 -70℃ 冰库,1ml - 10ml 体积肝细胞悬液均保持了较高的肝细胞存活率。通过对比研究而探索到了一个简化的原代肝细胞冻存方法,即采用含 2% DMSO 冻存液悬浮肝细胞于 -70℃ 冰库保存,期限可达 2m 甚至更长,尤其是冻存体积可以较大,能为体外生物人工肝支持系统或临床肝细胞移植技术[10]提供方便。因此,该方法不仅为原代肝细胞,尤其是原代人肝细胞的经济、高效利用奠定了基础,而且将会为原代肝细胞分离培养技术在生物医学领域基础理论研究和临床医学研究中的实际应用起到积极的推动作用。

参 考 文 献

[1] Liddle C, Goodwin BJ and Tapner M. Culture and transfection of mammalian primary hepatocytes and hepatocyte - derived cell lines[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1998; 13: 855 - 862.

[2] Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells[J]. Methods in Cell Biol, 1976; 13: 29 - 35.

[3] Alpini G, Phillips JO, Vroman B, et al. Recent Advances in the Isolation of Liver Cells[J]. Hepatol, 1994; 20: 494 - 506.

[4] Samarasinghe DA and Farrell GC. The Central Role of Sinusoidal Endothelial Cells in Hepatic Hypoxia - Reoxygenation Injury in the Rat[J]. Hepatol, 1996; 24: 1230 - 1242.

[5] Koebe HG, Muhling B, Deglmann CJ, et al. Cryopreserved porcine hepatocyte cultures[J]. Chem Biol Interact, 1999; 121: 99 - 115.

[6] Li AP, Gorycki PD, Hengstler JG, et al. Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel[J]. Chem Biol Interact, 1999; 121: 117 - 123.

[7] Swales NJ, Utesch D. Metabolic activity of fresh and cryopreserved dog hepatocyte suspensions[J]. Xenobiotica, 1998; 28: 937 - 948.

[8] Hengstler JG, Utesch D, Steinberg P, et al. Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction[J]. Drug Metab Rev, 2000; 32: 81 - 118.

[9] Hewitt NJ, Fischer T, Zuehlke U, et al. Metabolic activity of fresh and cryopreserved cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) hepatocytes[J]. Xenobiotica, 2000; 30: 665 - 681.

[10] Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease[J]. Semin Liver Dis, 1999; 19: 39 - 48.

(上接第 269 页)

[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] Kowluru RA, Jirousek MR, Stramm L et al. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia V Relationship between protein kinase C and ATP_{ase} [J]. Diabetes, 1998; 47(9): 464 - 469.

[5] Nishzuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phosphorlipids and activation of protein kinase C[J]. Science, 1992; 258(3): 607 - 613.

[6] Haller H. Baur E, Quass P et al. Hign glucose concentration and protein kinase C isoforms in vascular smooth muscle [J]. Kidney Internat, 1995; 47(9): 1057 - 1067.

[7] Deacon EM, Pongrac J, Griffiths et al. Isoenzymes of protein kinase C differential involvment in apoptosis and pathogenesis[J]. J Clin Mol Pathol 1997; 50(6): 124 - 131.

[8] Yamanchi T, Igarshi M, Brownlee M, et al. Activation of diacylglycerol and protein kinase C in aortic smooth muscles by oxidants and advanced glycation production products [J]. Diabetes, 1998; A372: 1435.