

肾素原受体在糖尿病视网膜病变中的作用及其机制研究

王 玮 梁 坤 蒋正轩 彭 畅 陶黎明

摘要 目的 观察糖尿病视网膜病变发生过程中肾素原受体(PRR)及血管紧张素Ⅱ受体2(AT2R)的表达水平及视网膜神经细胞凋亡情况,阐明PRR与糖尿病视网膜神经细胞凋亡的关系。方法 建立链脲佐菌素诱导的糖尿病SD大鼠模型,建模成功后分别在4周、8周和12周用免疫组化法检测CD14及8-羟脱氧鸟苷分子的表达,检测糖尿病及对照组视网膜AT2R、PRR mRNA的表达及细胞外信号调节激酶(ERK1/2)、磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2)蛋白的表达。结果

各病程SD大鼠视网膜AT2R和PRR的mRNA表达水平较对照组明显升高($P < 0.05$)。随病程的延长表达量随之增多。病程越长糖尿病组大鼠视网膜组织凋亡细胞数量越多,各阶段病程CD14染色未见明显新生血管。通过相关性分析显示,PRR和AT2R表达水平与神经节细胞凋亡相关。各病程大鼠视网膜ERK1/2、p-ERK1/2蛋白的表达量显著高于对照组。结论 糖尿病视网膜病变中PRR和AT2R的表达与大鼠糖尿病视网膜病变的神经节细胞凋亡相关,可能通过增加ERK的磷酸化水平发挥功能作用。

关键词 糖尿病视网膜病变;肾素血管紧张素系统;ERK信号通路

中图分类号 R 587.26

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0761-05

糖尿病性视网膜病(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病性微血管病变中最常见的并发症,也是糖尿病最严重的并发症之一。糖尿病视网膜病变的病因复杂,至今发病机制不明。糖尿病视网膜病变主要以氧化作用造成视网膜的损伤,8-羟脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG)可以标记氧化应激损伤,通过免疫组化法可以检测出8-OHdG的表达。研究^[1]显示,肾素血管紧张素系统(rennin-angiotensin system, RAS)的激活是DR发生发展的风险因素,阻断RAS系统可以抑制糖尿病视网膜病变的发展。慢性高血糖可以激活RAS在眼内发挥作

用从而导致DR的进一步发展。血管紧张素Ⅱ是RAS的主要效应分子,其通过收缩血管的作用强效升高全身和局部血压,研究^[2]显示血管紧张素Ⅱ受体(angiotensin Ⅱ receptors2, AT2R)也存在于视网膜及其他眼内组织。肾素原受体[(pro) rennin receptor, PRR]为RAS系统成员之一。细胞外调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)分为ERK1和ERK2,统称为ERK1/2,被激活后进入细胞核促进某些基因的转录和表达,与细胞的增殖分化有关。CD14和8-OHdG免疫组化染色了解新生血管的产生和视网膜神经细胞的凋亡的情况,该实验旨在通过观察不同病程糖尿病视网膜病变大鼠视网膜中AT2R的含量以及ERK1/2、磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2)蛋白的表达及CD14、8-OHdG的表达,了解RAS系统在糖尿病视网膜病变中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性SD大鼠50只,普通级,2月龄,190±20 g,由安徽医科大学实验动物中心提供,随机分为正常组(10只)和糖尿病组(38只)。实验期间各组大鼠均自由饮水和进食(普通饲料喂养)。

1.2 主要试剂及仪器 链脲佐菌素(streptozocin, STZ)购自美国Sigma公司;ERK1/2单抗和兔抗磷酸化ERK1/2多抗购自美国Santa Cruz公司;TR-IZOL、MMLV购自美国Gibco BRL公司;内参β-actin单抗购自武汉博士德公司;ECL化学发光试剂盒购自美国Pierce公司。

1.3 糖尿病大鼠模型建立 适应性饲养1周,1周后将(200±20)g的48只大鼠作为研究对象,血糖检测均正常。依据文献^[3],大鼠一次性单剂量腹腔注射STZ 50 mg/kg溶于柠檬酸盐缓冲液中(临用前以1:1混合柠檬酸与柠檬酸钠, pH 4.5),对照组给予等剂量柠檬酸盐缓冲液;48 h后采用罗氏血糖仪测定尾静脉血糖,血糖≥16.9 mmol/L认为糖尿病模型建立成功。模型建立后观察1周后测量血糖,将血糖稳定在16.9 mmol/L以上作为糖尿病组,此时开始计算糖尿病鼠病程。

2015-03-16 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81300755);安徽高校省级自然科学基金重点项目(编号:KJ2013A147)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院眼科,合肥 230601

作者简介:王 玮,女,硕士研究生;

陶黎明,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: taolim-ingchina@163.com;

蒋正轩,男,医师,责任作者, E-mail: jzx1287@163.com

1.4 样本制备 于病程 4、8、12 周分别处死大鼠, 对照组各 3 只及糖尿病组各 7 只, 10% 水合氯醛麻醉 5 ml/kg, 放血处死, 取其双眼, 快速在显微镜下冰上分离视网膜组织, EP 管冻存于 -80°C 2 只眼分开保存。

1.5 免疫组化染色 使用免疫组化三步法: 石蜡切片脱蜡至水。3% H_2O_2 室温孵育 5 ~ 10 min 以消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 2 次, 每次 5 min。5% ~ 10% 正常山羊血清 (PBS 稀释) 封闭, 室温孵育 10 min, 倾去血清, 勿洗。滴加一抗工作液, 37°C 孵育 1 ~ 2 h 或 4°C 过夜。PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。滴加适量生物素标记二抗工作液, 37°C 孵育 30 min。PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。滴加适量的辣根酶标记的链霉卵白素工作液, 37°C 孵育 30 min。PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。DBA 稀释 50 倍显色 10 min, 自来水充分冲洗、复染、脱水、透明、封片。采用激光共聚焦显微镜进行观察, Image Pro Plus 6.0 软件分析图像, 以上切片每组随机抽取 10 张切片进行光密度分析, 记录每张片子的光密度 (optical density, OD) 值。

1.6 检测 AT2R 受体 mRNA 表达 由基因库查得大鼠 AT2R 的 mRNA 核苷酸序列, 取视网膜组织 100 mg, 加液氮研碎后, 用 TRIzol 提取总 RNA。实验组和对照组分别取 1 μg 总 RNA 以 MMLV 为逆转录酶作逆转录反应。cDNA 产物保存于 -20°C 。优化扩增条件, 使 PCR 扩增在对数期内进行。在 DNA 扩增仪上进行 AT2R 的 PCR 扩增 30 个循环。AT2R 的退火温度为 62°C 。取 PCR 扩增产物 5 μl 在 1.5% 琼脂糖中电泳, Imagemaster VDS 成像系统摄影存盘后应用计算机图像分析软件 (Totalab V 1.01) 行灰度扫描分析。以目的基因与 β -actin 的 PCR 产物条带灰度体积之比作为反映目的基因 mRNA 水平的相对指标。

1.7 ERK 信号通路检测 配 10% 的 Tris-甘氨酸 SDS 聚丙烯酰胺胶, 放入电泳槽, 槽中加满 Tris-甘氨酸, 样品孔中加样, 电压积层胶 8 V/cm (40 ~ 60 V), 分离胶 18 V/cm (100 V), 当溴酚蓝到底部停止, 取出胶板, 把分离胶放入转移缓冲液中平衡 10 min, 裁取适当大小的硝酸纤维素膜, 放入转移缓冲液平衡 10 min。转膜, 电压 110 V, 1.5 h; 放入 5% 脱脂奶粉的 TBS 封闭液中平衡 2.5 h; 滴加一抗, 在室温下翻转摇床上作用 2 h, 4°C 过夜; TBST 漂洗 3 次, 每次 15 min; 滴加二抗, 室温下翻转摇床上作用 1 h; TBST 漂洗 3 次, 每次 15 min; ECL 荧光显影液

反应、曝光、显影和定影。 β -action 为内参照, 计算待测蛋白条带积分吸光度 (integrated absorbance, IA) 与 β -action 的比值, 表示待测蛋白的相对表达水平。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 两组数据比较用 t 检验, 相关指标采用多元线性回归分析。

2 结果

2.1 两组大鼠的血糖水平及比较 结果显示, 糖尿病组的大鼠的血糖水平自第 4 周开始明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 实验组与正常组大鼠不同时间点的血糖值及比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	正常组	糖尿病组	P 值
实验开始	4.71 ± 0.86	4.94 ± 0.68	0.78
4 周	5.11 ± 0.94	21.66 ± 1.94	< 0.01
8 周	5.88 ± 0.71	22.90 ± 1.75	< 0.01
12 周	6.35 ± 0.47	19.73 ± 2.17	< 0.01

2.1 糖尿病大鼠的视网膜神经细胞的凋亡及新生血管的情况 通过凋亡染色, 高倍视野下进行光密度分析, 结果显示与对照组相比, 4 周、8 周及 12 周病程的糖尿病组大鼠视网膜组织中 8-OHdG 的表达随着病程延长增加 [(0.182 7 $\pm$ 0.025) vs (0.198 7 $\pm$ 0.021) vs (0.242 5 $\pm$ 0.314) vs (0.252 0 $\pm$ 0.028)], 各组 CD14 染色未见明显新生血管的出现, 各组 CD14 染色差异无统计学意义。见图 1。

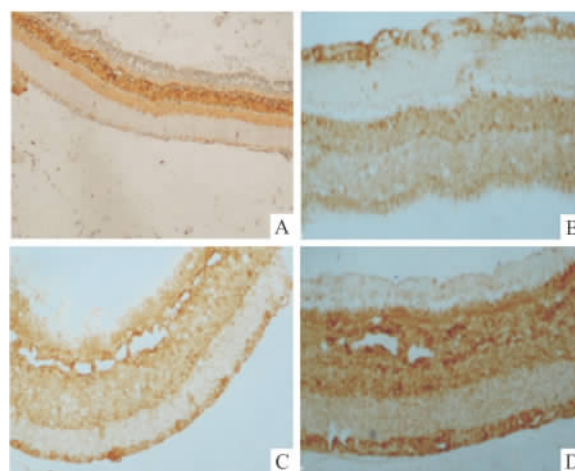


图 1 正常组及各病程糖尿病组大鼠的 8-OHdG 表达 DAB

A: 正常组 $\times 200$; B: 糖尿病组 4 周 $\times 400$; C: 糖尿病组 8 周 $\times 400$; D: 糖尿病组 12 周 $\times 400$

2.2 RAS 系统关键分子 PRR 和 AT2R 表达水平

4周、8周和12周糖尿病大鼠视网膜组织中 PRR 及 AT2R 含量明显比正常大鼠高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);进一步进行组间比较,结果显示,12周病程大鼠 PRR 及 AT2R mRNA 水平比8周病程大鼠显著升高,8周病程大鼠 PRR 及 AT2R mRNA 水平较4周病程大鼠有明显升高且组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图2。

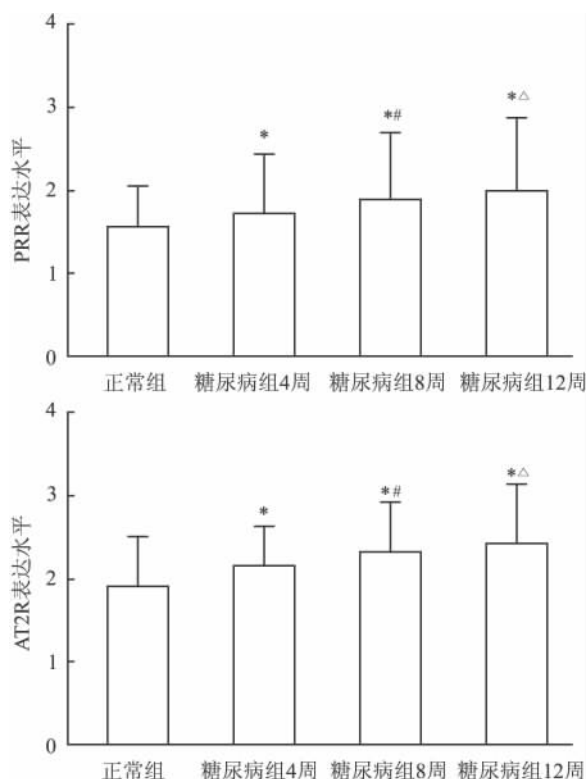


图2 正常组与各病程糖尿病组大鼠 PRR、AT2R 的表达

与正常组比较: * $P < 0.05$; 与糖尿病组4周比较: # $P < 0.05$; 与糖尿病组8周比较: Δ $P < 0.05$

2.3 PRR 及 AT2R 与视网膜神经细胞凋亡的关系

进一步分析 AT2R 与 PRR 的表达水平与 8-OHdG 水平是否存在一定的关系。通过多元线性回归分析显示,随着病程时间的延长 AT2R 及 PRR 的表达水平与细胞凋亡水平均呈正相关性 ($P < 0.05$)。见表2。

表2 随病程的延长 8-OHdG 分别与 PRR 及 AT2R 相关性的多元回归分析

项目	回归系数	标准回归系数	t 值	P 值
AT2R	0.397	0.665	3.186	0.004
PRR	0.211	0.493	1.957	0.044

2.4 Western blot 分析结果 糖尿病组 p-ERK1/2 的表达水平明显比对照组高,并且随病程的延长糖

尿病组 p-ERK1/2 的表达水平、磷酸化水平升高。见图3。

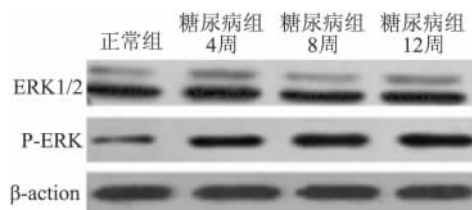


图3 各病程糖尿病组大鼠与对照组 ERK1/2 及 p-ERK 表达

3 讨论

糖尿病是一种由多种原因引起糖代谢紊乱的终身性内分泌疾病,目前世界范围内糖尿病患者人数约2.4亿,估计到2025年将达到3.5亿^[4]。随着糖尿病护理水平的提高,糖尿病视网膜病变的发展和流行有所下降^[5]。有统计学研究^[6]显示糖尿病病程和血压是影响糖尿病视网膜病变发生发展的重要因素。早期研究^[7]显示糖尿病视网膜病变患者血浆中肾素原会在发展为增殖性糖尿病视网膜病变时明显增高,血浆肾素原水平可能是糖尿病微血管并发症的敏感指标。

Wagner et al^[8]用反转录多聚酶链反应技术检测发现肾素 mRNA 阳性表达的组织中,血管紧张素原及血管紧张素转化酶两种基因也呈阳性表达,进一步从基因水平证实眼组织有独立合成 RAS 的能力。

糖尿病时,视网膜 RAS 活性增强,血管紧张素 II 参与内皮细胞功能的紊乱,使得血管内皮细胞上形成单细胞层,同时促进内皮细胞与白细胞的结合反应,并增加局部分泌细胞因子如组织坏死因子等,这些均可导致血管内皮功能紊乱、血管痉挛、血栓形成、视网膜组织缺血低氧、新生血管形成、出现增殖性病变。抑制 RAS 系统可以控制糖尿病视网膜病变的发展^[9-10]。

研究^[11]显示,糖尿病黄斑水肿患者伴有或不伴有玻璃体后脱离者玻璃体液中血管紧张素 II 浓度比非糖尿病患者及不伴有视网膜病变的糖尿病患者明显升高,提示 RAS 系统在糖尿病视网膜病变发生发展中起到一定作用。

Park et al^[12]指出氧化应激增强会导致糖尿病血管病变,8-OHdG 的水平标志了体内氧化应激导致的 DNA 损伤。Pan et al^[13]以血清 8-OHdG 为评价氧化应激的指标探测糖尿病视网膜病变的氧化应

激指标,得出糖尿病视网膜病变组比正常组显著增高。血清氧化应激产物 8-OHdG 增加将预测糖尿病性视网膜病变的结论。本实验利用免疫组化法检测不同病程阶段大鼠视网膜的凋亡因子 8-OHdG,发现随着病程的发展,视网膜神经细胞 8-OHdG 表达逐渐增多,且明显高于对照组,继而可以得出随着病程的发展,糖尿病视网膜病变大鼠视网膜细胞凋亡数量越多。

RAS 的生理作用主要通过血管紧张素 II 与其受体(AT1R 和 AT2R)的结合来实现,利用 RT-PCR 法检测糖尿病大鼠视网膜 PRR 及 AT2R mRNA 的表达,了解不同病程糖尿病大鼠和正常大鼠 RAS 系统的表达水平以及变化趋势。结果显示 4 周、8 周和 12 周糖尿病大鼠视网膜组织中 PRR 及 AT2R 含量明显比正常大鼠高。说明在发病后糖尿病大鼠视网膜组织中 RAS 系统被明显激活,并且随着病程的发展 RAS 系统作用增强。PRR 及 AT2R 的表达也随着病程的发展逐渐增多,通过统计学分析显示 8-OHdG 的表达与 PRR 及 AT2R 的表达有一定相关性,由此可以得出在糖尿病视网膜病变中 RAS 系统与细胞凋亡有相关性,同时也进一步证实了 RAS 与糖尿病视网膜病变的发展相关。

利用 Western blot 法检测不同病程糖尿病大鼠和正常大鼠视网膜中 ERK1/2 和 p-ERK1/2 的表达,了解到 ERK 信号通路在糖尿病视网膜病变中被激活,并且在随着病情的发展 ERK 信号通路活性增强。提示糖尿病视网膜病变 RAS 系统的激活与 ERK 信号通路有关。

由于 CD14 可以标记新生血管的产生,本实验中通过免疫组化法检测各病程中 CD14 的表达,各阶段病程中对照组及实验组未见明显 CD14 分子表达,显示无明显新生血管生成。糖尿病视网膜病变实验病程中均未发现新生血管,可能与实验设计有关,本实验大鼠糖尿病视网膜病变病程较局限,并未包含糖尿病视网膜病变的全部病程。

本研究显示糖尿病视网膜病变的发生发展与 RAS 系统的激活有一定相关性,而 RAS 系统对组织的作用可能与 ERK 信号通路的激活相关,RAS 系统

对新生血管生成的作用还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 陈晨,王育璠,彭永德. 肾素-血管紧张素阻断剂对糖尿病视网膜病变的影响[J]. 世界临床药物,2012,33(8):449-59.
- [2] Kida T, Ikeda T, Nishimura M, et al. Renin-angiotensin system in proliferative diabetic retinopathy and its gene expression in cultured human müller cells[J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2003, 47(1):36-41.
- [3] 高玉,吴晋晖,柳林. 链脲佐菌素诱发性糖尿病大鼠早期视网膜病变模型的建立[J]. 第二军医大学学报,2010,31(10):1053-59.
- [4] Morley J E. Diabetes and aging: epidemiologic overview[J]. *Clin Geriatr Med*, 2008, 24(3):395-405.
- [5] Klein R, Klein B E. Are individuals with diabetes seeing better?: a long-term epidemiological perspective[J]. *Diabetes*, 2010, 59(8):1853-60.
- [6] 雷远,潘天荣,胡迪,等. 2 型糖尿病视网膜病变相关因素分析[J]. 安徽医科大学学报,2011,46(12):1285-7.
- [7] Wilkinson-Berka J L. Angiotensin and diabetic retinopathy[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38(5-6):752-65.
- [8] Wagner J, Jan Danser A H, Derkx F H, et al. Demonstration of rennin mRNA, angiotensinogen mRNA, and angiotensin converting enzyme mRNA expression in the human eye: evidence for an intraocular renin-angiotensin system[J]. *Br J Ophthalmol*, 1996, 80(2):159-63.
- [9] Kim J H, Kim J H, Yu Y S, et al. Blockade of angiotensin II attenuates VEGF-mediated blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(3):621-8.
- [10] 张媛媛,陈蕾,柳力敏,等. 卡托普利对早期糖尿病视网膜病变的防治效果[J]. 眼科新进展,2011,31(6):552-4.
- [11] Funatsu H, Yamashita H, Sakata K, et al. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and intercellular adhesion molecule 1 are related to diabetic macular edema[J]. *Ophthalmol*, 2005, 112(5):806-16.
- [12] Park K S, Kim J H, Kim M S, et al. Effect of insulin and antioxidant on plasma 8-hydroxyguanine and tissue 8-hydroxydeoxyguanosine in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Diabetes*, 2001, 50(12):2837-41.
- [13] Pan H Z, Zhang H, Chang D, et al. The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy[J]. *Br J Ophthalmol*, 2008, 92(4):548-51.

The role of the RAS system in diabetic retinopathy

Wang Wei, Liang Kun, Jiang Zhengxuan, et al

(Dept of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective Observing the pattern recognition receptor (PRR) and angiotensin II receptors2(AT2R)

大鼠 DDH 关节软骨早期退变和 X 型胶原、基质金属蛋白酶 13 表达相关性的研究

张思成,袁亮,宁波,孙军

摘要 目的 检测 X 型胶原、基质金属蛋白酶 13 (MMP-13) 在发育性髋关节发育不良 (DDH) 大鼠模型不同时期关节软骨中表达的改变情况,探讨 X 型胶原、MMP-13 与软骨早期退变的相关性。方法 选取新生 Wistar 大鼠 80 只,随机均等分成 DDH 组和对照组。DDH 组新生大鼠后肢髋臼位固定 10 d 后解除固定继续饲养,分别于鼠的 2、4、6、8 周龄处死,离断髋关节,观察髋关节软骨的大体形态。用免疫组化和 qRT-PCR 法检测 X 型胶原、MMP-13 的表达。结果 DDH 模型鼠的尸体解剖样本显示关节囊增厚,髋臼表面呈不规则、不平整,股骨头扁平且发育较小,头臼包容差,尤其 4 周后更明显;与对照组相比,在髋关节软骨浅表区域有较高的 X 型胶原和 MMP-13 表达 ($P < 0.05$),并且这种增长是随着年龄增长而增长的。X 型胶原和 MMP-13 的 mRNA 表达显示出相似的结果 ($P < 0.05$)。结论 DDH 模型鼠在较早阶段出现软骨退化,随着年龄逐渐加重;X 型胶原和 MMP-13 表达与 DDH 软骨早期退变有密切的关系。

关键词 发育性髋关节发育不良;关节软骨退变;大鼠;骨性关节炎

中图分类号 R 726.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0765-05

发育性髋关节发育不良 (developmental dysplasia of the hip, DDH) 是最常见的儿童畸形之一^[1],随着年龄的增长,许多患者出现典型的骨性关节炎表现,部分患者甚至中年前即需要行髋关节置换。尽管在早期给予充分适当的治疗,其远期退化性骨性关节炎的发病率仍明显高于正常人群^[2]。推测 DDH 早期关节软骨可能发生了退变。有研究^[3]表明, X 型胶原的表达异常与骨性关节炎发生可能有相关性。基质金属蛋白酶 13 (matrix metalloproteinases-13, MMP-13) 是降解软骨细胞外基质主要酶系^[4],有文献^[5]报道胶原蛋白 II 主要是被 MMP-13 分解。该研究主要观察 DDH 大鼠模型髋关节不同时期软骨形态改变及软骨中 X 型胶原、MMP-13 的表达改变,探讨 DDH 早期软骨是否发生了退变及与 X 型胶原和 MMP-13 之间是否有关。

1 材料与方法

1.1 材料 实验 Wistar 新生大鼠 (安徽医科大学

2015-04-08 接收

基金项目:安徽省自然科学基金 (编号:1408085QH153)

作者单位:安徽医科大学儿科临床学院 (安徽省儿童医院) 骨科,合肥 230022

作者简介:张思成,男,硕士研究生;

孙军,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: sunjun500@aliyun.com

expression level in rennin-angiotensin system, and retinal nerve cells apoptosis in the process of diabetic retinopathy, in order to explore the relationship between the PRR receptor and retinal nerve cells apoptosis in diabetic rats.

Methods First, we built the diabetic rat model by using streptozocin. Second, the expressions of CD14 and 8-OHdG were detected by immunohistochemical. Third, the mRNA expressions of AT2R and PRR after 4, 8 and 12 weeks of diabetes and normal control group were detected, respectively. Last, the levels of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, p-ERK1/2 proteins were measured by Western blot. **Results** AT2R and PRR mRNA expression levels in diabetes groups were higher than the control group significantly, and the expression level was increasing with the extension of the course ($P < 0.05$). The longer the course of the disease, the more rats retinal cells apoptosis in diabetes group. There were less new blood vessels in diabetes group as the CD14 dyeing was negative. Through correlation analysis, PRR and AT2R expression levels were associated with the ganglion cell apoptosis. In diabetes groups ERK1/2, p-ERK1/2 protein expressions were significantly higher than the control group. **Conclusion** AT2R and PRR mRNA expression levels are related with the cell apoptosis of rats with diabetic retinopathy. RAS may play a key role in diabetic retinopathy through increasing the phosphorylation of ERK level.

Key words diabetic retinopathy; renin-angiotensin system; ERK signal path