

糖尿病肾病大鼠肾脏差异表达基因研究

张 茜 肖新华 黎 明 李文慧 于 森 张化冰 平 凡 杨国华

摘 要 **目的** 糖尿病肾病是糖尿病患者的重要死亡原因。本研究旨在探讨糖尿病肾病大鼠肾脏差异表达基因,以期揭示 DN 发病的机制。**方法** 将 5 周龄 SD 大鼠随机分为正常组和糖尿病肾病模型组。糖尿病肾病模型组给予高脂饲料喂养加腹腔注射链脲佐菌素诱导大鼠糖尿病肾病模型。每 4 周测定空腹血糖、体重、24h 尿白蛋白和尿肌酐水平。12 周时处死大鼠,取血样测定血肌酐和血清尿素氮水平。取肾脏进行表达谱基因芯片实验。反转录实时定量 PCR 方法对芯片结果进行验证。**结果** 糖尿病肾病组空腹血糖、24h 尿白蛋白、尿肌酐、血肌酐和尿素氮水平较正常组显著升高,而体重和尿肌酐显著降低。糖尿病肾病大鼠肾脏较正常组有 624 个基因差异表达,其中 495 个基因上调,129 个基因下调。real-time PCR 验证实验证实糖尿病肾病组 ATP 合成酶 β 亚基 (Atp5b)、胶原蛋白 1 型 $\alpha 1$ (Col1 $\alpha 1$)、细胞色素 c 氧化酶亚基 VIc (Cox6c)、NADH 脱氢酶 (辅酶 Q) 铁硫蛋白 3 (Ndufs3) 和转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 显著上调。**结论** 氧化磷酸化通路和 TGF- $\beta 1$ 介导的细胞外基质 (ECM) 受体相互作用通路的激活可能与糖尿病肾病发生有关。

关键词 高血糖 糖尿病肾病 基因芯片

中图分类号 R285

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.06.006

Gene Expression of Diabetic Nephropathy Rats in Kidney. Zhang Qian, Xiao Xinhua, Li Ming, et al. Department of Endocrinology, Peking Union Medical College Hospital, Key Laboratory of Endocrinology, Ministry of Health, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Abstract **Objective** To investigate the gene expression of diabetic nephropathy (DN) rats in kidney. Methods SD rats were divided into control group and DN model group. Fasting blood glucose, body weight, 24h urinary albumin and urinary creatine were measured. On the 12th week, blood samples were taken to measure creatinine and urea nitrogen. Kidneys were taken to perform gene array. Real time PCR was performed to verify the result of gene array. **Results** Fasting blood glucose, 24h urinary albumin, urinary creatine, serum creatinine and urea nitrogen were significantly increased, body weight and urinary creatinine were significantly decreased in DN group. Kidney from diabetic rats had 624 genes with significantly changed expression (495 increased, 129 decreased). Real time PCR verified that ATP5b (F1-ATPase beta subunit), Col1 $\alpha 1$ (collagen type 1 alpha 1), Cox6c (cytochrome c oxidase subunit VIc), Ndufs3 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] Fe-S protein 3) and TGF- $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$) increased in the DN model group. **Conclusion** Oxidative phosphorylation pathway, extracellular matrix (ECM) receptor interaction and TGF- β pathway may involved in the development of DN.

Key words Hyperglycemia; Diabetic nephropathy; Gene array

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是由多种病因引起的以高血糖、胰岛素分泌和 (或) 功能异常为主要特征,可引起多种并发症。糖尿病肾病 (diabetic ne-

phropathy, DN) 是 DM 的主要死亡原因之一。DN 已经成为终末期肾病的首要原发病^[1]。至今, DN 发病机制仍不十分清楚,直接影响到 DN 的治疗。早期糖尿病肾病主要表现为肾小球高滤过,肾小球和小管肥大,晚期出现大量蛋白尿,肾小球滤过率 (glomerular filtration rate, GFR) 降低。近年来,很多研究使用基因芯片技术来探讨疾病相关的生物学信号通路。本研究使用 Illumina 大鼠表达谱芯片来探讨 DN 大鼠差异表达基因,以期揭示 DN 发病原因。

材料与方法

1. DN 大鼠模型的建立: 5 周龄雄性 SD 大鼠 (购自中国医学科学院实验动物研究所) 随机分为 DN 模型组和对照组

基金项目: 国家临床重点专科建设项目 (WDYZ2011-873); 国家自然科学基金资助项目 (面上项目) (81170736); 国家自然科学基金 (青年基金) 资助项目 (81300649); 中央高校基本科研业务费专项基金资助项目; 中华医学会临床医学科研专项基金-默沙东糖尿病研究项目 (12030450345); 北京协和医院基金资助项目 (2006119); 北京协和医院中青年基金资助项目; 协和青年基金资助项目 (33320140022)

作者单位: 100730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院内分泌科、卫生部内分泌重点实验室

通讯作者: 肖新华, 主任医师, 博士生导师, 电子信箱: xiaoxinhua@medmail.com.cn

($n=10$)。DN 组给予 4 周高脂饲料喂养(猪油 10%,糖 20%,胆固醇 2.5%,胆酸盐 1%,常规鼠饲料 66.5%,购自中国医学科学院实验动物研究所)后,单次腹腔注射 1% 链脲佐菌素(STZ)30mg/kg(Sigma 公司)。1 周后检测空腹血糖(FBG), $FBG>16.7\text{mmol/L}$ 者入组。每 4 周测定 FBG、体重。12 周末,留尿测定 24h 尿白蛋白和尿肌酐,取血测定血清肌酐和尿素氮。取肾脏,立即放在液氮中保存。

2. 生化指标的测定:大鼠空腹 6h,取尾静脉血,测定 FBG,使用 BREEZE 2 (德国拜耳公司)血糖仪。12 周末,将大鼠放置于代谢笼,留取 24h 尿, $3000\times g$ 离心 10min,取上清,使用奥林巴斯 AU5400 分析仪测定 24h 尿白蛋白和尿肌酐。12 周末,眼球取血, $3000\times g$ 离心 10min,取上清,使用奥林巴斯 AU5400 分析仪测定血清肌酐和尿素氮。

3. RNA 的提取:DN 模型组和对照组各自取 3 个肾脏样

本进行基因芯片实验。Trizol 法提取 RNA。紫外吸收测定法和变性琼脂糖凝胶电泳对 RNA 含量和质量进行鉴定。

4. 基因芯片实验:本研究应用 Illumina 大鼠 RatRef-12 表达谱芯片,包含 22228 个大鼠基因。按照 Illumina TotalPrep RNA 扩增试剂盒操作程序进行 RNA 扩增。总 RNA 反转录得到第 1 链 cDNA,再合成第 2 链 cDNA。cDNA 纯化,体外转录合成 cRNA,cRNA 纯化、杂交、洗涤、染色、干燥进行芯片扫描。为了将差异基因按照生物学功能进行分类,使用 DAVID 软件和 KEGG 数据库进行分析。

5. real-time PCR 验证实验:为了验证基因芯片实验,挑选了 7 个基因进行 RT-PCR 实验。按照前面所述方法提取 RNA,反转录为 cDNA,引物设计见表 1。管家基因 GAPDH。实时定量 PCR 在 ABI 7000 系统上完成。

表 1 real-time PCR 验证实验引物设计

基因名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
Atp5b	ACCACCAAGAAGGGCTCGAT	GCATCCAAATGGGCAAAGG
Col1α1	TGGCAAGAACGGAGATGA	AGCTGTTCCAGGCAATCC
Cox6c	CAGTCTTTGTATAAGTTTCGTGTGG	AGCAGCCTTCCTCATCTCCT
Ndufs3	GGCTTCGAGGGACATCCTTT	CCFCTTCACCTCATCGTCAT
TGF-β1	ATACGCCTGAGTGGCTGTCT	TGGGACTGATCCCATTGATT
Gadph	GACCCCTTCATTGACCTCAAC	CGCTCCTGGAAGATGGTGATG

Atp5b. ATP 合成酶 β 亚基;Col1α1. 胶原蛋白 1 型 α1;Cox6c. 细胞色素 c 氧化酶亚基 VIc

6. 统计学方法:分析使用 SPSS 11.0 软件。所有结果采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)的形式表示。统计分析采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. DN 模型大鼠体重和 FBG:DN 模型大鼠较对

照组体重显著下降(1 个月时 $P<0.05$,2 个月和 3 个月时 $P<0.01$,表 2)。DN 模型大鼠 FBG 较对照大鼠显著升高(P 均 <0.01 ,表 3)。

表 2 DN 模型组大鼠体重显著降低($\bar{g},\bar{x}\pm s,n=8$)

组别	0 个月	1 个月	2 个月	3 个月
对照组	446.6±18.3	492.4±37.0	543.4±40.1	592.6±29.9
糖尿病肾病组	450.0±42.8	455.8±32.4*	452.8±30.0**	459.2±42.7**

与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

表 3 DN 模型空腹血糖显著升高($\text{mmol/L},\bar{x}\pm s,n=8$)

组别	1 周	1 个月	2 个月	3 个月
对照组	6.5±0.6	6.3±0.7	6.4±0.5	6.7±0.3
糖尿病肾病模型组	19.6±3.4*	18.9±4.1*	19.2±5.3*	19.4±6.0*

与对照组比较,* $P<0.01$

2. 生化指标:DN 模型组尿肌酐显著下降($P<0.05$),24h 尿白蛋白,血肌酐和血尿素氮显著升高

($P<0.05$,表 4)。

表 4 DN 模型生化指标

组别	24h 尿白蛋白 (mg/d)	尿肌酐 (mmol/L)	血肌酐 (μmol/L)	血尿素氮 (mmol/L)
对照组	24.9 ± 3.9	9.36 ± 1.52	49.4 ± 3.5	7.65 ± 1.74
糖尿病肾病组	72.6 ± 5.4 *	2.44 ± 0.57 *	81.0 ± 7.8 *	20.29 ± 2.57 *

与对照组比较, * $P < 0.05$

3. DN 大鼠基因差异表达: DN 组 624 个基因差异表达改变, 其中 495 个上调, 129 个下调。对差异表达的基因进行通路分析, 富集在 8 个通路(表 5)。

表 5 DN 大鼠差异表达基因 KEGG 通路分析

KEGG 分类号	通路名称	DN 组该通路上差异	该通路上的芯片	倍比值	FDR 值
		表达基因数量	表达基因总数		
Rno04512	细胞外基质受体相互作用通路	26	72	7.869	3.89×10^{-13}
Rno03010	核酸	22	81	6.498	7.49×10^{-9}
Rno04510	局部黏附	29	98	3.646	3.67×10^{-6}
Rno00190	氧化磷酸化	24	95	4.295	4.91×10^{-6}
Rno04350	TGF-β 信号通路	19	76	5.416	7.11×10^{-6}
Rno05012	帕金森病	22	97	3.798	2.35×10^{-4}
Rno05010	阿尔茨海默病	26	144	3.235	3.28×10^{-4}
Rno04614	肾素-血管紧张素系统	9	23	11.032	6.38×10^{-4}

FDR < 0.001, 倍比值 > 2.0

4. real-time PCR 验证实验结果: DN 模型组 Atp5b、Collα1、Cox6c、Ndufs3 和 TGF-β1 基因相对表达量显著升高(表 6)。

表 6 real-time PCR 验证实验结果

基因名称	倍比值(芯片)	倍比值(real-time PCR)	P
Atp5b	4.553	3.9	0.039
Collα1	4.833	4.3	0.003
Cox6c	7.127	7.2	0.004
Ndufs3	3.989	3.2	0.013
TGF-β1	2.907	3.1	0.001

Atp5b. ATP 合成酶 β 亚基; Collα1. 胶原蛋白 1 型 α1; Cox6c. 细胞色素 c 氧化酶亚基 VI c; Ndufs3. NADH 脱氢酶(辅酶 Q) 铁硫蛋白 3; TGF-β1. 转化生长因子-β1

讨 论

本研究发现, DN 模型组较正常组血糖、24h 尿白蛋白、血肌酐、血尿素氮显著升高, 体重和尿肌酐显著下降, 提示 DN 模型建立成功。

笔者发现 DN 模型组肾脏差异表达基因富集在 8 个通路。氧化应激通路为第 4 位。并且通过 real-time PCR 验证实验结果发现, 该通路上 Atp5b、Cox6c 和 Ndufs3 显著上调。ATP5B、COX6C 和 NDUFS3 是线粒体氧化磷酸化通路上的重要蛋白。以往大量的研究表明, 高糖引起的肾脏损害主要通过 4 条生化途径, 即糖基化终末产物形成增加, 蛋白激

酶 C 激活, 多元醇通路活性增高和己糖胺途径激活。然而这些途径间的相互联系和诱发因素尚不清楚^[2]。Brownlee 等^[3]提出了统一理论, 认为高糖环境下线粒体呼吸链过量产生的 ROS 是糖尿病并发症发生的启动因子, ROS 引起 DNA 链断裂, 激活与 DNA 修复有关的酶 PARP (ADP-核糖多聚酶); PARP 通过改变修饰 GAPDH 抑制其活性, 从而激活上述 4 条生化途径, 而这些途径也可进一步引起 ROS 的积聚, 激活血管内皮损伤通路, 导致细胞的损伤和凋亡, 从而造成多个器官的损伤。本研究提示氧化磷酸化通路激活是 DN 发生的机制之一。

另外, 笔者发现 DN 组差异表达最为显著的通路为细胞基质 (ECM) 受体相互作用通路。real-time PCR 验证实验显示 DN 模型组 Collα1 基因显著上调。Veiming 等^[4]和 Park 等发现 DN 患者肾小球胶原蛋白 IV 显著增加。本研究发现 DN 模型组 TGF-β1 基因显著上调。转移生长因子-β (TGF-β) 是激活素 (activin)/骨形成超家族成员, 其在凋亡, 损伤修复和细胞外基质形成中起重要作用^[5,6]。TGF-β 在糖尿病肾病的肾脏肥大, 纤维化/硬化表现中起到至关重要的作用^[7]。另外有研究发现 Collα1 等 ECM 基因受到 TGF-β 的调控^[8-10]。因此, 笔者推测 TGF-β 介导的 ECM 受体相互作用通路的激活可能参与了 DN 发生的机制。

总之,氧化磷酸化通路和 TGF- β 1 介导的细胞外基质 (ECM) 受体相互作用通路的激活可能与糖尿病肾病发生有关。

参考文献

- 1 National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. US Renal Data Systems: USRDS 2010 annual data report: Atlas of End Stage Renal Disease in the United States. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 2010
- 2 肖力,孙林,刘伏友. 糖尿病肾脏疾病蛋白尿形成机制新进展[J]. 中华肾脏病杂志,2010,26(6):478-480
- 3 Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism[J]. Diabetes,2005,54(6):1615-1625
- 4 Vleming LJ, Baelde JJ, Westendorp RW, et al. The glomerular deposition of PAS positive material correlates with renal function in human kidney diseases[J]. Clin Nephrol, 1997, 47(3):158-167
- 5 Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus[J]. Cell, 2003, 113(6):685-700
- 6 Hoyer BA, Howe PH. Analysis of TGF- β mediated synthesis

- of extracellular matrix components [J]. Methods Mol Biol, 2000, 142:55-65
- 7 Sharma K, Ziyadeh FN. Hyperglycemia and diabetic kidney disease: the case for transforming growth factor- β as a key mediator[J]. Diabetes, 1995, 44(10):1139-1146
- 8 Kato M, Arce L, Wang M, et al. A microRNA circuit mediates transforming growth factor- β 1 autoregulation in renal glomerular mesangial cells[J]. Kidney Int,2011,80(4):358-368
- 9 Kato M, Zhang J, Wang M, et al. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF- β induced collagen expression via inhibition of E-box repressors[J]. Proc Nat Acad Sci USA,2007,104(9):3432-3437
- 10 Wang JY, Gao YB, Zhang N, et al. miR-21 overexpression enhances TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition by target smad7 and aggravates renal damage in diabetic nephropathy [J]. Mol Cell Endocrinol,2014,392(1-2):163-172

(收稿日期:2014-11-08)

(修回日期:2014-11-25)

结核分枝杆菌抗原 Lppx 和 MT0322 人 T 细胞抗原表位的多态性研究

郑玉红 刘海灿 赵秀芹 蒋毅 万康林

摘要 **目的** 探讨中国结核分枝杆菌抗原 Lppx 和 MT0322 的多态性及其对 T 细胞抗原表位的影响。**方法** 选取中国多省的 173 株临床分离株,采用 L-J 培养基对菌株进行培养,PCR 扩增 Lppx 和 MT0322 基因序列,Bioedit 软件进行比对,比较其 T 细胞抗原表位区与非表位区的多态性。最后用 Mega5 软件分别计算同义突变率 (dS) 和非同义突变率 (dN) 及其比值。**结果** 在 173 株菌株中,基因 Lppx 表现为 4 个非同义突变和 1 个同义突变位点,基因 MT0322 出现了 3 个非同义突变和 1 个同义突变位点。其中,有 9 株菌在 Lppx152 位的氨基酸和在 MT0322 的 159 位分别发生了 1 个同义突变和 1 个非同义突变,表现较高的多态性。Lppx 有 15 个 T 细胞抗原表位中有 6 个发生了改变,而在 MT0322 中,2 个表位中有 1 个发生了 1 个氨基酸的改变。Lppx 的 dN/dS 值为 0.19,MT0322 的 dN/dS 值达到了 3.69。MT0322 的表位区的 dN/dS 值高于非表位区。**结论** 结核分枝杆菌基因 Lppx 和 MT0322 序列具有多态性,并可能反映了这两个抗原参与了逃避宿主免疫的分化选择。

关键词 结核分枝杆菌 Lppx MT0322 多态性

中图分类号 R1 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.06.007

Investigation on Human T Cell Eitopes Polymorphisms of Antigens Lppx and MT0322 in *Mycobacterium Tuberculosis*. Zheng Yuhong, Liu Haican, Zhao Xiuqin, et al. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Abstract Objective To study polymorphisms of antigens Lppx and MT0322 in *mycobacterium tuberculosis* and the effect on T cell epitopes of these two genes. **Methods** We selected 173 strains from China, cultured them by L-J medium and amplified gene sequences of antigens Lppx and MT0322 by PCR. The sequences were compared and sliced by Bioedit and the dN/dS values were calculated

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81401647);国家科技重大专项基金资助项目(2013ZX10003006-002-001)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

通讯作者:蒋毅,电子信箱:jiangyi@icdc.cn;万康林,电子信箱:wankanglin@icdc.cn