

· 短篇论著 ·

# 实时荧光定量 PCR 检测糖尿病大鼠视网膜中转化生长因子 $\beta$ 受体 I 和受体 II 基因表达

## Fluorescent real-time PCR in quantitative detection of transforming growth factor type I receptor and type II receptor expression in retina of diabetic rats

曹丹, 柳林\*, 沈炜

(第二军医大学长海医院眼科, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:** 定量检测转化生长因子  $\beta$  I 型受体(T $\beta$ R I)和 II 型受体(T $\beta$ R II)编码基因在糖尿病大鼠视网膜中的表达, 以探讨转化生长因子  $\beta$  及转化生长因子  $\beta$  受体在糖尿病视网膜病变中的作用。**方法:** 选择健康成年 SD 大鼠 28 只, 随机分为正常对照组和糖尿病组。利用链尿佐菌素(STZ)诱导大鼠糖尿病视网膜病变模型, 制备 RNA 并逆转录, 实时荧光定量 PCR 技术分析 T $\beta$ R I 和 T $\beta$ R II 在 4 周、12 周时相对于内参照基因 18S 的相对 mRNA 含量。**结果:** 正常对照组 T $\beta$ R I 在 4 周、12 周时相对于 18S mRNA 含量分别为  $0.000\ 332 \pm 0.000\ 088$  和  $0.000\ 344 \pm 0.000\ 232$ , T $\beta$ R II 在 4 周、12 周时相对于 18S 的 mRNA 含量分别为  $0.000\ 099 \pm 0.000\ 031$ ,  $0.000\ 103 \pm 0.000\ 049$ 。糖尿病组 T $\beta$ R I 在 4 周、12 周时相对于 18S 的 mRNA 含量分别为  $0.000\ 493 \pm 0.000\ 133$  和  $0.000\ 608 \pm 0.000\ 232$ , T $\beta$ R II 在 4 周、12 周时相对于 18S 的 mRNA 含量分别为  $0.000\ 166 \pm 0.000\ 057$  和  $0.000\ 113 \pm 0.000\ 049$ ; T $\beta$ R I 基因表达水平随着病变进展呈上升趋势, T $\beta$ R II 在 4 周时表达量较正常增加, 到 12 周时表达量又减少, 逐渐恢复到正常水平。**结论:** T $\beta$ R I 和 T $\beta$ R II 基因表达量的改变可能与糖尿病视网膜病变的发生发展有关。

**[关键词]** 糖尿病视网膜病变; 转化生长因子  $\beta$ ; 受体, 转化生长因子  $\beta$ ; 实时荧光定量聚合酶链反应; 基因表达

**[中图分类号]** R 587.26 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2006)09-1033-03

糖尿病视网膜病变是糖尿病最常见的眼部微血管并发症<sup>[1]</sup>。其发病机制虽尚未完全阐明, 但 DR 的发生与多种因素有关。近年来的研究表明, 生长因子在 DR 的病理过程中发挥着重要作用。已有报道转化生长因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ )可能参与了糖尿病视网膜病变的病理过程<sup>[2,3]</sup>。TGF- $\beta$  只有通过与其受体结合才能转导其所有生物学效应, 包括促细胞移行及促增生作用。本实验采用实时荧光定量 PCR 对糖尿病大鼠视网膜中 TGF- $\beta$  受体的表达情况进行初步观察, 为探讨 TGF- $\beta$  及其受体是否参与了糖尿病视网膜病变病理过程提供实验依据。

### 1 材料和方法

1.1 实验动物及饲养 成年雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠(上海实验动物中心提供)28 只, 体质量 180~200 g。在通风良好, 氨浓度  $\leq 20 \times 10^6$  (体积分数), 相对湿度 40%~70%, 昼夜自然光照明, 室温 18~22℃ 环境中适应性饲养 2 周, 普通块状鼠饲料喂养, 自由进水食。

1.2 糖尿病动物模型的制备 大鼠随机分成正常对照组 12 只, 糖尿病组 16 只。正常对照组大鼠未做任何处理, 常规饲养。以 0.1 mol/L, pH 4.2 的柠檬酸盐缓冲液溶解链尿佐菌素(streptozotocin, STZ)配制成 1% STZ 溶液, 糖尿病组大鼠 STZ(55 mg/kg)一次性腹腔内注射, 24~48 h 后采尾血测血糖。血糖  $> 16.65$  mmol/L 者为糖尿病大鼠。糖尿病组死亡大鼠 1 只。此后定期检测血糖和体质量。

1.3 视网膜中总 RNA 制备和 cDNA 第 1 链制备 实验动

物于第 4、12 周在测体质量及空腹血糖后摘除眼球, 剥离视网膜, 立即放入液氮中保存。TRIzol reagent (美国 Invitrogen 公司)提取总 RNA, 测定纯度和含量, 1% 甲醛变性凝胶电泳测定其完整性。5  $\mu$ g 总 RNA 样品用 SuperScript II-RTase 1  $\mu$ l 逆转录 cDNA 第 1 链。

1.4 引物设计 根据标准 RTQ-PCR 引物设计原则, Taq-Man 荧光探针选择 6-羧基荧光素(FAM)作为荧光报告基团, 6-羧基-四甲基-罗丹明(TAMRA)作为淬灭基团, 针对大鼠 T $\beta$ R I 和 T $\beta$ R II 及 18S 基因 PCR 引物和 TaqMan 探针序列, 合成引物序列如下: T $\beta$ R I-F: 5'-ACC TTC TGA TCC ATC CGT T-3', T $\beta$ R I-R: 5'-CGC AAA GCT GTC AGC CTA G-3', T $\beta$ R I-TM: FAM 5'-CAG AGC TGT GAG GCC TTG AGA GTG-3' TAMRA, T $\beta$ R II-F: 5'-CCC TAC TCT GTC TGT GGA TGA-3', T $\beta$ R II-R: 5'-GAC GTC ATT TCC CAG AGT AC-3', T $\beta$ R II-TM: FAM 5'-CAG GTG GGA ACA GCG AGA TAC ATG G-3' TAMRA, 18S-F: 5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3', 18S-R: 5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3', 18S-TM: FAM 5'-ATG

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30271391); 上海市卫生局科研资助项目(034124)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30271391); Fund of Science Committee of Health Department of Shanghai Municipal Government(034124)。

**[作者简介]** 曹丹, 硕士生。E-mail: dancao\_xs@163.com

\* Corresponding author. E-mail: linliu@sh163.net

GGG ATC GGG GAT TGC AAT-3' TAMRA,

1.5 定量 PCR 反应和数据分析 依照文献<sup>[4]</sup>的方法进行定量 PCR 检测和分析。用荧光值曲线和  $C_t$  值计算不同时相点同一组织中 T $\beta$ R I 和 T $\beta$ R II 分别与 18S 的比值。

1.6 统计学处理 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用两样本均数  $t$  检验。

### 2 结果

2.1 一般状况观察 实验组各实验大鼠血糖含量均在

16.65 mmol/L 以上,实验期间表现出多饮、多食、尿量明显增多,体质量逐渐下降等症状,与对照组相比,糖尿病大鼠动作明显迟缓、懒惰、无进攻性、易感染。

2.2 各组 SD 大鼠不同时相点血糖及体质量的变化 各时相点糖尿病大鼠体质量与正常对照组相比,差异非常显著 ( $P < 0.01$ )。正常对照组大鼠血糖平稳,各时相点比较,差异无显著意义 ( $P > 0.05$ )。糖尿病组大鼠血糖维持在高水平,与正常对照组比较,差异非常显著 ( $P < 0.01$ )。

见表 1。

表 1 糖尿病组与正常对照组大鼠不同时相点的体质量和血糖水平

( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | n  | 体质量( $m_B/g$ )       |                      | 血糖( $z_B/mm\text{ol} \cdot L^{-1}$ ) |                    |
|-------|----|----------------------|----------------------|--------------------------------------|--------------------|
|       |    | 4周                   | 12周                  | 4周                                   | 12周                |
| 正常对照组 | 12 | 292.00 $\pm$ 29.50   | 375.83 $\pm$ 13.57   | 4.94 $\pm$ 0.97                      | 4.42 $\pm$ 0.27    |
| 糖尿病组  | 16 | 177.86 $\pm$ 14.39** | 167.50 $\pm$ 14.64** | 21.09 $\pm$ 4.09**                   | 25.20 $\pm$ 3.24** |

\*\*  $P < 0.01$  与正常对照组比较

2.3 不同时相点 T $\beta$ R I 和 T $\beta$ R II 的 mRNA 表达 电泳鉴定 RNA 无明显降解。图 1 为转化生长因子受体大鼠视网膜上表达的实时荧光 RT-PCR 定量检测曲线。结果显示,在正常大鼠视网膜中 4 周时 T $\beta$ R I 表达量为 0.000 332  $\pm$  0.000 088,12 周时为 0.000 344  $\pm$  0.000 232;4 周时 T $\beta$ R II 表达量为 0.000 099  $\pm$  0.000 031,12 周时为 0.000 103  $\pm$  0.000 049。在糖尿病大鼠视网膜中 4 周时 T $\beta$ R I 表达量为

0.000 493  $\pm$  0.000 133,12 周时为 0.000 608  $\pm$  0.000 232, T $\beta$ R I 基因表达水平随着病变进展呈上升趋势,差异显著 ( $P < 0.05$ )。而 T $\beta$ R II 在 4 周时表达量为 0.000 166  $\pm$  0.000 057,12 周时为 0.000 113  $\pm$  0.000 049,T $\beta$ R II 在 4 周时表达量较正常增加,有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),到 12 周时表达量又减少,逐渐恢复到正常水平。

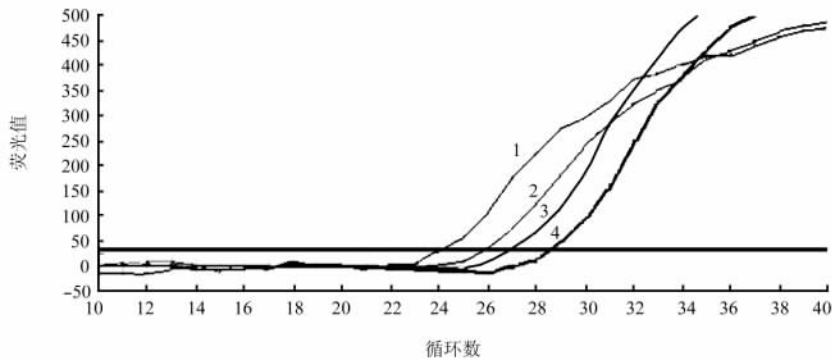


图 1 T $\beta$ R I / II 在正常及糖尿病大鼠视网膜上表达的实时荧光 RT-PCR 的定量检测

1:糖尿病大鼠视网膜中 T $\beta$ R I 的表达曲线;2:正常大鼠视网膜中 T $\beta$ R I 的表达曲线;3:糖尿病大鼠视网膜中 T $\beta$ R II 的表达曲线;4:正常大鼠视网膜中 T $\beta$ R II 的表达曲线

### 3 讨论

糖尿病视网膜病变是糖尿病微血管并发症中最重要的并发症之一。增殖性糖尿病视网膜病变以视网膜新生血管和纤维化为特征。随着分子生物学技术发展,研究发现糖尿病视网膜病变的发生发展与细胞增殖调控失常有关,有多种生长因子与视网膜细胞生长增殖有密切关系,TGF- $\beta$  是其中一个重要因子<sup>[2,5]</sup>。TGF- $\beta$  有 5 个异构体,视网膜中主要表

达 TGF- $\beta$ 2。以往研究表明,增生性糖尿病视网膜病变玻璃体内 TGF- $\beta$ 2 含量明显高于无增生性的糖尿病视网膜病变者<sup>[3]</sup>。在 TGF- $\beta$  等细胞因子的作用下,视网膜色素上皮细胞、视网膜神经胶质细胞迁移至玻璃体和视网膜下,并刺激活化的巨噬细胞和成纤维细胞,产生胶原和纤维连接蛋白(FN)等物质,使毛细血管基底膜增厚,促进毛细血管管腔形成,导致增生性糖尿病视网膜病变<sup>[6]</sup>。

由于 TGF- $\beta$  必须和其特定受体结合并通过中介分子

Smads蛋白将胞外信号传递入胞核才能发挥生物学效应<sup>[7]</sup>,因此,研究TGF- $\beta$ 在疾病过程中发生作用的同时,也应观察相应受体的基因表达水平。

T $\beta$ R是一种细胞膜表面受体,包括T $\beta$ R I、T $\beta$ R II和T $\beta$ R III 3种,其中T $\beta$ R I和T $\beta$ R II是TGF- $\beta$ 信号转导系统中两个重要受体,是TGF- $\beta$ 产生作用的基础,目前认为T $\beta$ R I、T $\beta$ R II是TGF- $\beta$ 信号转导所必需的<sup>[8]</sup>。TGF- $\beta$  I型和II型受体都是丝氨酸/苏氨酸激酶受体,它们共同启动TGF- $\beta$ 在胞质的信号。Yamanaka等<sup>[9]</sup>研究表明用免疫组织化学和原位分子杂交等方法检测到在正常大鼠视网膜及视网膜新生血管疾病中的视网膜色素上皮细胞及神经胶质细胞上皆有T $\beta$ R I、T $\beta$ R II表达。但由于免疫组织化学和原位分子杂交方法都是定位及半定量检测基因表达水平,而实时荧光定量PCR能够针对性地从转录水平上精确定量分析极少量组织,例如大鼠视网膜组织中的基因表达量。

本实验利用荧光定量PCR技术定量检测糖尿病大鼠视网膜中TGF- $\beta$ 的两种主要受体T $\beta$ R I、T $\beta$ R II基因的表达。结果发现,在糖尿病大鼠视网膜病变进展过程中T $\beta$ R I表达水平在4周和12周明显升高,而T $\beta$ R II基因水平随着病变进展在4周呈一定上升趋势,随后降至和正常水平相似。这说明在糖尿病视网膜病变发展过程中T $\beta$ R I的基因表达水平增加,而T $\beta$ R II升高似乎并不是持续现象。实验结果提示在糖尿病大鼠视网膜病变中T $\beta$ R表达水平上调为主,我们认为糖尿病视网膜病变可能与T $\beta$ R有密切的关系,这可能与T $\beta$ R I、T $\beta$ R II本身结构特点不同和在TGF- $\beta$ /Smads信号转导过程中起不同作用有关。在细胞膜的表面,TGF- $\beta$ 能和T $\beta$ R I和T $\beta$ R II结合形成一个异源性的复合物。T $\beta$ R II由于自身结构特点本身就具有激酶的活性,不需要激活,而T $\beta$ R I则没有这种固有的活性,复合物形成后T $\beta$ R I和T $\beta$ R II的激酶结构域相接近,被T $\beta$ R II激活,进而激活胞内Smads蛋白,把信号转导至细胞核,调节相关靶基因的转录。Takeuchi等<sup>[10]</sup>发现T $\beta$ R I与细胞外基质的合成有关,而T $\beta$ R II则与细胞增殖有关。我们结果提示在大鼠糖尿病视网膜病变中T $\beta$ R I和T $\beta$ R II表达水平改变,使得T $\beta$ R I、T $\beta$ R II含量比例改变,可能影响到TGF- $\beta$ /Smads信号转导过程,改变对靶细胞的调控作用,促使糖尿病视网膜病变的形成。

TGF- $\beta$ 2在糖尿病视网膜病变中的作用已引起了广泛关

注,本实验提示T $\beta$ R I、T $\beta$ R II可能在糖尿病视网膜病变中也发挥重要作用,为我们探讨针对TGF- $\beta$ 受体来预防和治疗糖尿病视网膜病变提供了新的方法和思路。

#### [参考文献]

- [1] Mario UD, Pugliese G. Pathogenetic mechanisms of diabetic microangiopathy[J]. Inter Congress Series, 2003, 1253: 171-182.
- [2] Hammes HP, Lin J, Renner O, et al. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. Diabetes, 2002, 51: 3107-3112.
- [3] Hirase K, Ikeda T, Sotozono C, et al. Transforming growth factor beta2 in the vitreous in proliferative diabetic retinopathy[J]. Arch Ophthalmol, 1999, 116: 738-741.
- [4] 满晓波, 唐亮, 邱秀华, 等. 激光纤维切割结合实时荧光定量检测肝脏中转化生长因子- $\beta$ 1和- $\beta$ 2的表达[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20: 890-892.
- [5] Spirin KS, Soghizadeh M, Lewin SL, et al. Basement membrane and growth factor gene expression in normal and diabetic human retinas[J]. Curr Eye Res, 1999, 18: 490-499.
- [6] Bochaton-Piallat ML, Kapetanios AD, Donati G, et al. TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ receptor II and ED-A fibronectin expression in myofibroblast of vitreoretinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41: 2336-2342.
- [7] ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF- $\beta$ -Smad signaling[J]. Trends Biochem Sci, 2004, 29: 265-273.
- [8] Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic protein[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 1998, 9: 49-61.
- [9] Yamanaka R, Ogata N, Yamamoto C, et al. Expression of transforming growth factor- $\beta$  receptors in normal rat retina and experimental choroidal neovascularization[J]. Jpn J Ophthalmol, 2002, 46: 525-532.
- [10] Takeuchi Y, Fukumoto S, Matsumoto T. Relationship between action of transforming growth factor-beta and cell surface expression of its receptors in clonal osteoblastic cells[J]. J Cell Physiol, 1995, 162: 315-321.

[收稿日期] 2006-02-20

[修回日期] 2006-06-06

[本文编辑] 曹静

## 《感音神经性听力损失、眩晕及耳鸣诊疗指南》已出版

钱永忠教授是国内著名耳鼻咽喉—头颈外科专家,从事耳科学、耳神经病学和耳神经外科学的临床实践和科研工作。本书通过编著者的长期临床实践,结合国内外文献及相关专著撰写而成,可供相关专业人员进修及实习医生参考。

由第二军医大学出版社出版、发行,ISBN 7-81060-522-6/R. 422,定价:80.00元。

订购电话:021-65493093,地址:上海市翔殷路800号 第二军医大学出版社发行科,邮编 200433