

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)17-1570-03

## 基质金属蛋白酶 MMP-2 mRNA 在糖尿病苍鼠视网膜中的表达

彭 惠<sup>1</sup> 洪苏玲<sup>2</sup> 陶永贤<sup>1</sup> 彭 彦<sup>3</sup> 姜 蓉<sup>3</sup>(重庆医科大学<sup>1</sup> 附属第一医院眼科, <sup>2</sup>附属第一医院耳鼻喉科, <sup>3</sup>组织胚胎学教研室 重庆 400016)

### Expression of matrix metalloproteinase-2 mRNA in retina of diabetic hamster

PENG Hui<sup>1</sup>, HONG Su-Ling<sup>2</sup>, TAO Yong-Xian<sup>1</sup>, PENG Yan<sup>3</sup>, JIANG Rong<sup>3</sup><sup>1</sup>Department of Ophthalmology, <sup>2</sup>Department of Otorhinolaryngology, First Affiliated Hospital, <sup>3</sup>Department of Histology and Cyemology, School of Preclinical Medicine, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China

**【Abstract】** AIM: To explore the role of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the development of diabetic retinopathy (DR). **METHODS:** Hamsters were used to establish diabetic models by Streptozotocin (40 mg/kg). Total RNA of retina was collected. The expression of MMP-2 mRNA in retina were observed by using semi-quantitative RT-PCR. Morphologic characteristics and changes of retina was observed by HE staining. The changes of TG, TC were tested serologically and insulin was tested by electrochemiluminescence. **RESULTS:** Diabetic hamster displayed not only hyperglycaemia, but also hyperlipemia. The expression of MMP-2 mRNA in retina showed a increasing tendency. **CONCLUSION:** MMP-2 may contribute to the pathogenesis of DR.

**【Keywords】** diabetic retinopathy; RT-PCR; matrix metalloproteinases; diabetic hamster

**【摘要】**目的 探讨基质金属蛋白酶(MMP-2)在糖尿病视网膜病变(DR)发生发展中的作用及其机制。方法:用链脲佐菌素(STZ)诱导苍鼠糖尿病模型,提取视网膜中总RNA,半定量RT-PCR观察视网膜中MMP-2 mRNA表达情况,HE染色观察光镜下视网膜的形态特征及变化,血清学检测苍鼠血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)和电化学发光法检测胰岛素水平等变化。结果:糖尿病苍鼠不仅表现为高血糖,还表现为高TG血症。视网膜中MMP-2 mRNA表达呈升高趋势,与正常对照组相比于造模后16 wk末时即差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:此为研究基质金属蛋白酶参与DR的发病机制提供了依据。

**【关键词】**糖尿病视网膜病变; RT-PCR; 基质金属蛋白酶; 糖尿病苍鼠

**【中图分类号】** R774.1 **【文献标识码】** A

收稿日期 2006-04-01; 接受日期 2006-06-15

作者简介:彭 惠, 博士生(导师洪苏玲), 副教授。Tel: (023) 89011021 Email: peng9@sina.com

### 0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的发生机制至今尚未完全阐明,细胞外基质(ECM,包括基底膜)的代谢异常被认为是发生DR时血管功能障碍的病理学基础。基质金属蛋白酶(MMPs)是一类Zn<sup>2+</sup>依赖的蛋白水解酶,参与ECM的降解代谢。本研究应用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导苍鼠糖尿病模型,观察视网膜中MMP-2表达情况,为研究其在DR中的作用提供依据。

### 1 材料和方法

**1.1 STZ 诱导苍鼠糖尿病模型** 8 wk 雄性仓鼠,体质量110~130 g,禁食12 h后,腹腔注射STZ溶液40 mg/kg体质量,连续3 d。德国拜耳公司快速血糖仪测定尾尖血空腹血糖(氧化酶试纸法),血糖稳定7 d后,选用血糖>13.5 mmol/L的仓鼠为糖尿病(DM)仓鼠(13只)。实验持续16 wk,每2 wk测仓鼠体质量、血糖。正常对照组(NC)仓鼠(10只)予腹腔注射等体积柠檬酸钠-柠檬酸缓冲液。

**1.2 石蜡切片 HE 染色与观察** 取眼球固定后标本常规脱水,石蜡包埋,做5 μm连续切片,按HE染色常规操作进行,观察每组视网膜在光镜下的形态特征及其变化。

**1.3 血清学检测** 全自动生化分析仪测定仓鼠静脉血血清甘油三酯(TG)和总胆固醇(TC)。电化学发光法检测胰岛素水平。

**1.4 视网膜中总 RNA 制备** 实验动物于16 wk在测体质量及空腹血糖后摘除眼球,剥离视网膜,液氮保存。Trizo(美国Invitrogen公司)提取总RNA,测定纯度和含量,10 g/L甲醛变性凝胶电泳测其完整性。

**1.5 半定量 RT-PCR** 总RNA 5 μg用逆转录酶 Superscript<sup>TM</sup>11RT(美国Invitrogen公司)合成cDNA第一链:MMP-2上游和下游引物为5' TGACCTTGAC-CAGAACAC 3'和5' GGCATCATCCACTGTCTC 3';β-肌动蛋白上游和下游引物为5' GTGGGGCGCCCCG-GCACCA 3'和5' CTCCTTAATGTCACGCACGATTT 3'。

扩增条件为:MMP-2 94℃预变性5 min,94℃ 1

min, 49℃ 50 s, 72℃ 45 s 共 27 个循环, 72℃ 延伸 5 min 扩增产物长度为 169 bp.  $\beta$ -肌动蛋白引物在扩增 5 个循环后加入, 长度为 500 bp. 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, Bio-RAD 凝胶成像系统照相, SXimage 软件分析, MMP-2 mRNA 含量用 MMP-2 与  $\beta$ -肌动蛋白吸光度  $\times$  面积的比值表示.

统计学处理 本研究数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用两样本均数比较的  $t$  检验进行统计学分析.

## 2 结果

2.1 两组血糖及体质量的变化 实验开始时, NC 组和 DM 组仓鼠体质量分别为 (123  $\pm$  6) g 和 (125  $\pm$  5) g, 两组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ). 实验结束时, NC 组体质量 (133  $\pm$  10) g 与实验开始时无显著变化 ( $P > 0.05$ ), 而 DM 组仓鼠体质量在实验第 16 wk 时降至 (98  $\pm$  15) g, 前后差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ). 实验开始和结束时, DM 组血糖水平均明显高于 NC 组 ( $P < 0.01$ ); 实验 16 wk 时胰岛素水平显著低于 NC 组 ( $P < 0.01$ , 表 1).

表 1 正常对照组和糖尿病苍鼠组的体质量、胰岛素和血糖水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	体质量(g)	胰岛素(mU/L)	血糖(mmol/L)	
			开始时	结束时
NC	135 $\pm$ 10	15.1 $\pm$ 5.1	5.12 $\pm$ 0.48	4.59 $\pm$ 0.23
DM	98 $\pm$ 15 <sup>b</sup>	5.2 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	18.75 $\pm$ 3.42 <sup>b</sup>	23.87 $\pm$ 2.58 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs NC.

2.2 正常对照组和糖尿病鼠视网膜在光镜下的形态特征和变化 见图 1~3.

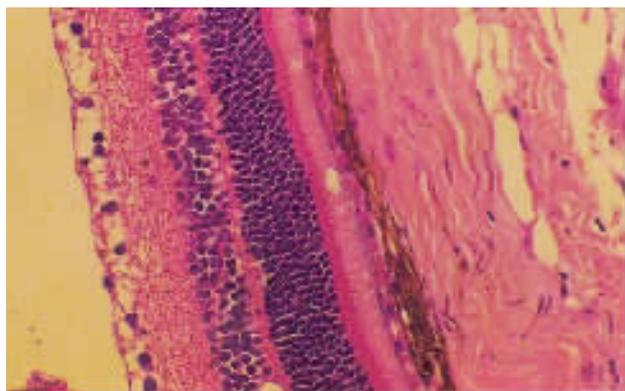


图 1 视网膜各层结构清晰, 层次分明, 细胞形态结构未见异常 HE  $\times$  40

2.3 仓鼠血脂变化 正常对照组 TG, TC 水平分别为 (1.77  $\pm$  0.21), (3.56  $\pm$  0.37) mmol/L; 糖尿病组

TG 为 6.54  $\pm$  2.04, 明显高于正常对照组 ( $P < 0.01$ ); 而 TC 水平 (5.21  $\pm$  2.07) mmol/L 与正常对照组的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ).

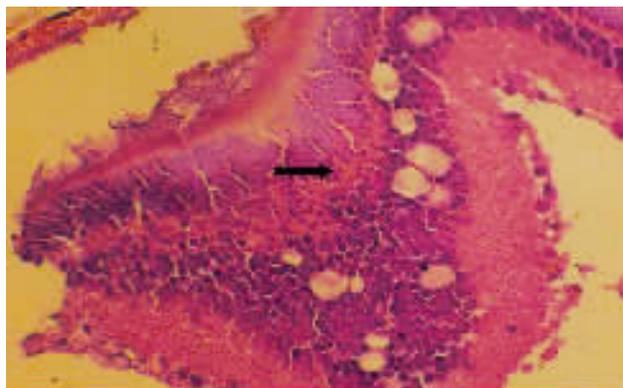


图 2 外核层细胞有溶解, 内核层细胞增殖并有脂肪滴形成空泡 HE  $\times$  40

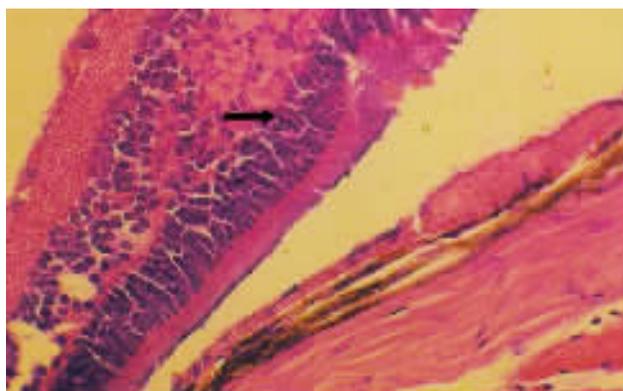


图 3 内核层细胞增殖凸起并融合 HE  $\times$  40

2.4 糖尿病组 MMP-2 mRNA 的表达 电泳鉴定 RNA 无明显降解.  $A_{260/280}$  比值为 1.8~2.0, 实际浓度 0.4~1.0 g/L, 与正常对照组相比, 糖尿病组苍鼠视网膜中 MMP-2 mRNA 表达呈升高趋势(图 4),  $t$  值为 23.12, 差异有统计学意义(表 2).

表 2 NC 组和 DM 组苍鼠 MMP-2 mRNA 表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

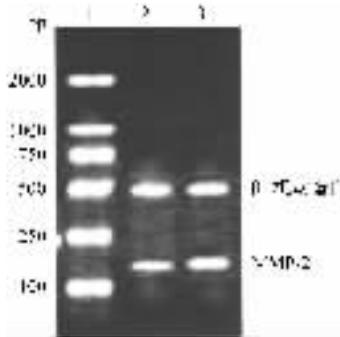
组别	16 wk
正常对照	0.588 $\pm$ 0.007
糖尿病	0.981 $\pm$ 0.034 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ .

## 3 讨论

STZ 是一种胰岛  $\beta$  细胞毒性物质, 可选择性诱导  $\beta$  细胞凋亡, 使葡萄糖-胰岛素分泌耦联失调. 本文显示注射 STZ 成模后, 多数病鼠血糖升高, 胰岛素下降, 观察期间出现多饮、多食、多尿及活动减弱等现

象。但也有部分病鼠血糖渐恢复正常。此与四氧嘧啶糖尿病模型长期随访观察的结果相一致<sup>[1]</sup>。因此,长期观察的实验中,应注意随访血糖。本实验选用仓鼠作为实验动物,因为仓鼠在脂质代谢等方面与人类相似,且 Simionescu 等<sup>[2]</sup>给雄性 Syrian 仓鼠注射 STZ 成功诱发了糖尿病模型,本实验观察到,糖尿病仓鼠不仅表现为高血糖,还表现为高 TG 血症。



1: Marker( DL 2000 ); 2: NC 组; 3: DM 组。

图4 MMP-2  $\beta$ -肌动蛋白 RT-PCR 产物电泳图

DR 是糖尿病的严重并发症之一,表现为微循环结构及功能上的紊乱,最终新生血管的形成。而在血管内皮细胞迁移和增殖过程中,内皮细胞周围的 ECM 必须有选择地降解,控制这一活动主要的就是 MMPs 家族。MMPs 是一族参与 ECM 降解、其活性依赖金属离子  $Zn^{2+}$  的复杂蛋白酶家系。主要分为 4 大类:①胶原酶:包括 MMP-1 和神经胶原 MMP-8,作用基质为纤维性胶原 I, II 和 III;②明胶酶:主要包括 MMP-2 和 MMP-9,是血管内皮下基质 IV 型胶原降解的关键蛋白水解酶,对血管内皮细胞的游走起重要作用;③基质溶解素:MMP-3 和 MMP-7,作用底物广泛包括蛋白多糖、层粘蛋白、弹性蛋白、明胶和前胶原前肽;④膜型基质蛋白酶:MT-MMP<sup>[3]</sup>。它的主要功能是降解细胞外基质膜有效成分、调节粘着、作用于细胞外组分其他蛋白成分而启动潜在的生物学功能、直接或间接参与胚胎发育、组织模型再塑及创伤修复等正常生理过程。显然本实验结果可以证实 MMP-2 参与了早期糖尿病模型视网膜结构的重塑,对新生血管的发生可能有重要作用。DR MMPs 表达随病程进展升高,这可能是由于随着视网膜毛细血管基底膜的不断增厚,可致视网膜毛细血管大量狭窄甚至闭塞,导致视网膜缺血、缺氧,由于缺氧可促使血管内皮细胞在局部释放细胞因子(如  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1$ )和血管活性物质(VEGF)诱导了 MMPs 的表达升高,使视网膜毛细血管基底膜的加速降解,允许内皮细胞发生迁移,随着增殖的内皮细胞接触新的 ECM 可能产生的 MMPs

的类型和或水平也就不同了<sup>[4-5]</sup>。

目前国外的研究多集中于对 DR 晚期阶段( proliferative diabetic retinopathy, PDR )已形成的新生血管膜进行分析,而在此时细胞外基质的活动性生长和重塑早已启动。这主要是因为新生血管的形成包括毛细血管内皮层下基底膜降解,内皮细胞迁移和增殖,新生血管形成和新的基底膜形成等一系列过程。视网膜毛细血管内皮细胞的基底膜增厚及壁内周细胞的丧失是几乎所有的 DR 早期组织学改变的一个标志,基底膜的增厚能影响许多功能如血管通透性,细胞粘附、增殖分化及基因表达等,其成分的改变必然引起血管功能异常<sup>[8]</sup>。在形成细胞外基质的两大部分(即基底膜和间质)中以 IV 型胶原为主要成分的基底膜构成一道阻滞屏障,IV 型胶原酶( MMP-2 )可以作为血管内皮细胞的“开路先锋”降解基底膜。体外实验研究也证实了 IV 型胶原酶参与微血管基底膜的降解代谢过程<sup>[6]</sup>。因此 Bishop<sup>[7]</sup>就指出如果我们能加深对 IV 型胶原即基底膜胶原的降解等血管形成的早期活动的理解将会更有可能给我们提示以找到新的治疗方法。

#### 【参考文献】

- [1] Kern TS, Engerman RL. Comparison of retinal lesions in alloxan-diabetic rats and galactose-fed rats[ J ]. *Curr Eye Res*, 1994, 13: 863 - 867.
- [2] Simionescu M, Popov D, Sima A, et al. Pathobiochemistry combined diabetes and atherosclerosis studied on novel animal: The hyperlipemic-hyperglycemia hamster[ J ]. *Am J Pathol*, 1996, 148: 997 - 1014.
- [3] 郭立新, 汪怒萍. 基质金属蛋白酶与糖尿病血管病变[ J ]. 国外医学内分泌分册 2000 20(3): 120 - 122.
- [4] Sethi CS, Bailey TA, Luthert PJ, et al. Matrix metalloproteinase biology applied to vitreo retinal disorders[ J ]. *Br J Ophthalmol*, 2000, 6(84): 654 - 666.
- [5] Salzman J, Limb GA, Khaw PT, et al. Matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy[ J ]. *Br J Ophthalmol*, 2000, 10(84): 1091 - 1096.
- [6] Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, et al. Vascular endothelial growth factor increase release of gelatinase A and decrease release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells *in vitro*[ J ]. *Microvas Res*, 1998, 55(1): 29 - 42.
- [7] Bishop P. Matrix metalloproteinases and their natural inhibitors[ J ]. *Br J Ophthalmol*, 2000, 10(84): 1087 - 1093.
- [8] Noda K, Ishida S, Inoue M, et al. Production and activation of matrix metalloproteinase-2 in proliferative diabetic retinopathy[ J ]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 4(5): 2163 - 2170.