

[文章编号] 1000-4718(2007)09-1791-05

# Decorin 基因转染抑制高糖培养的大鼠肾系膜细胞细胞外基质 mRNA 表达\*

朱 锋<sup>#</sup>, 李 红<sup>△</sup>, 吴 芳, 羊正纲

(浙江大学医学院附属邵逸夫医院内分泌科, 浙江 杭州 310016)

**[摘要]** 目的: 观察核心蛋白聚糖 II (DCN) 基因转染对高糖培养的大鼠肾系膜细胞 (RMCs) 细胞外基质 (ECM) mRNA 表达的影响。方法: 用已构建的 AD-DCN 腺病毒感染高糖环境培养的大鼠肾系膜细胞, 采用半定量 RT-PCR 测定 decorin、转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )、纤维粘连蛋白 (fibronectin) 和 IV 型胶原 (collagen IV) mRNA 水平。结果: 高糖培养的 RMCs 感染 AD-DCN 后, DCN mRNA 水平显著增高, 24 h 至第 7 d, 该组 DCN mRNA 水平始终显著高于高糖组及 AD-LacZ 感染组 ( $P < 0.05$ ), decorin mRNA 水平增高后表现出对 TGF- $\beta_1$  mRNA 水平的抑制作用, 在 mRNA 水平, AD-DCN 感染的 RMCs 细胞外基质 fibronectin 和 collagen IV 随 TGF- $\beta_1$  mRNA 水平下降而下降。结论: DCN 重组腺病毒感染大鼠肾系膜细胞后能高效表达目的基因 decorin 并拮抗 TGF- $\beta_1$  的生物活性, 其下调 ECM 成分 mRNA 水平的作用与使用 TGF- $\beta$  抗体的效果相似。

**[关键词]** 糖尿病肾病; 蛋白聚糖; 转化生长因子  $\beta$ ; 细胞外基质; 基因转染

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

## Effect of recombinant adenovirus vector of decorin on the expression of extracellular matrix molecules in rat mesangial cells

ZHU Feng, LI Hong, WU Fang, YANG Zheng-gang

(Department of Endocrinology, The Affiliated Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310016, China. E-mail: lihong@mail.hz.zj.cn)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the effect of adenovirus-mediated decorin gene transfer into rat mesangial cells (RMCs) on the expression of decorin, TGF- $\beta_1$  and the extracellular matrix (ECM) components. **METHODS:** Rat mesangial cells were transfected with recombinant adenovirus vector of decorin, the levels of mRNA for decorin, TGF- $\beta_1$ , collagen type IV and fibronectin were estimated by semi-quantitative RT-PCR. **RESULTS:** The transfection of AD-DCN significantly increased decorin mRNA expression compared with negative control ( $P < 0.05$ ). Increased decorin synthesis down-regulated the levels of mRNA for TGF- $\beta_1$ , collagen type IV and fibronectin. **CONCLUSION:** Transferred AD-DCN expresses biologically active decorin in RMCs. The function of AD-DCN on down-regulated TGF- $\beta_1$  and ECM component transcription is similar with the treatment of 30 mg/L anti-TGF- $\beta$  antibody.

**[KEY WORDS]** Diabetic nephropathies; Decorin; Transforming growth factor beta; Extracellular matrix; Gene transfection

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最主要的慢性并发症之一, 其确切的发病机制尚不明确<sup>[1]</sup>。DN 主要病理特点之一是肾小球基底膜增厚及以肾小球系膜区为主的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 积聚, 导致弥漫性或结节性肾小球硬化。转化生长因子- $\beta_1$  (transform growth factor-beta 1, TGF- $\beta_1$ ) 是促使肾脏局部 ECM 沉积的关键性细胞因子。内源存在的蛋白聚糖 II (decorin,

DCN) 通过拮抗 TGF- $\beta_1$  的活性, 调控细胞的增殖、分化, 调节基质形成及胶原纤维的结构和生成速度, 发挥抗纤维化的作用<sup>[2-4]</sup>。糖尿病时肾脏局部 TGF- $\beta_1$  过度表达和 decorin 相对不足导致细胞外基质沉积是促进肾组织纤维化, 最终发展为肾功能衰竭的关键因素之一<sup>[5]</sup>。外源性补充 decorin 阻断 TGF- $\beta_1$  增高所致的纤维化过程在 DN 治疗中的作用日益受到重视。

[收稿日期] 2005-12-15 [修回日期] 2006-05-30

\* [基金项目] 浙江省自然科学基金资助项目 (No. Y204145); 浙江省科技厅基金资助项目 (No. 2003C33005)

<sup>△</sup>通讯作者 Tel: 0571-87236874; E-mail: lihong@mail.hz.zj.cn

<sup>#</sup> 现工作单位: 浙江中医药大学附属第一医院内分泌科

本研究将 decorin 重组腺病毒感染高糖培养的大鼠肾系膜细胞,观察感染后不同时间,decorin mRNA 水平变化及其对 TGF-β<sub>1</sub> 和细胞外基质 fibronectin 与 collagen IV mRNA 表达水平的影响,探讨高血糖时,高水平表达的 decorin 调节 TGF-β<sub>1</sub>、抑制 ECM 积聚的作用。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

大鼠肾小球系膜细胞(rat mesangium cells,RMCs;武汉细胞生物研究所),293 细胞(Stratagene),DMEM 细胞培养基和胰蛋白酶(Gibco),胎牛血清(Hyclone),TGF-β 中和抗体(R&D),Trizol 和 M-MuLV 逆转录酶(Invitrogen),DNA 聚合酶(北京鼎国公司),PCR 引物由上海生工生物工程公司合成。携带大鼠 decorin 基因的重组腺病毒(AD-DCN)和携带 LacZ 基因的外源基因对照重组腺病毒(AD-LacZ)构建和鉴定已由本课题组完成。

### 2 方法

**2.1 293 细胞扩增重组腺病毒** 293 细胞长至 50% - 70% 融合率时弃培养基以病毒原液进行大量扩增,当 90% 的细胞出现病变效应时,收获病毒,-70℃ - 37℃ 反复冻融 3 次,剧烈振荡。4℃、12 000 r/min 离心 10 min。取上清得到高滴度的病毒。病毒液过滤,用病毒空斑形成试验检测病毒的滴度,并用 PBS 调整腺病毒浓度至 1 × 10<sup>12</sup> pfu/L,置于 -70℃ 备用。

**2.2 细胞培养** 采用胰蛋白酶消化法培养 RMCs。细胞复苏后用含 5% FCS 的 1 g/L 葡萄糖的低糖 DMEM(low glucose, LG) 培养传代,计数后在 6 孔板上接种 2 × 10<sup>5</sup> cells/well,用含 5% FCS 的 4.5 g/L 葡萄糖的高糖 DMEM(high glucose, HG) 培养,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 24 h 后进行分组,详见表 1,每组设复孔 3 个。

**2.3 重组腺病毒感染 RMCs** AD-DCN 感染组: RMCs 吸去培养液,加入 AD-DCN 病毒液,感染复数为 50,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱孵育 2 h,吸弃含病毒的培养基,换以含 5% FCS 的 DMEM(HG) 继续孵育。AD-LacZ 感染组: RMCs 加入 AD-LacZ 病毒液,余条件同高糖 AD-DCN 感染组。阳性对照组 RMCs 换以添加 TGF-β 中和抗体(30 mg/L)的含 5% FCS 的 DMEM(HG) 继续孵育。阴性对照组 RMCs 用含 5% FCS 的 DMEM(HG) 孵育。设正常对照组,始终用含 5% FCS 的 DMEM(LG) 培养 RMCs,见表 1。

表 1 大鼠肾小球系膜细胞分组

Tab 1 The divided RMC groups

	High glucose	High glucose +AD-DCN	High glucose +AD-LacZ	High glucose +anti-TGF-β	Normal glucose
Glucose (mmol/L)	24.975	24.975	24.975	24.975	24.975
AD-DCN (MIO=50)	-	+	-	-	-
AD-LacZ (MIO=50)	-	-	+	-	-
TGF-β Ab	-	-	-	+	-

**2.4 RT-PCR 法测定各目的基因 mRNA 的表达** 各组分别于第 1 d(即细胞感染腺病毒载体后 24 h,以此类推)至第 7 d 收集细胞,采用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA,取 2 μL 测定 RNA 纯度和量。用 M-MuLV 逆转录酶按照说明合成第 1 条 cDNA 链。

各目的基因引物序列见表 2。

以 RNA 逆转录后合成的第 1 条 cDNA 链为模板,进行 PCR 扩增。反应体系包括:10 × PCR 缓冲液 2.5 μL,10 mmol/L dNTP 0.5 μL,10 μmol/L 的上下游引物各 2 μL,cDNA 模板 1 μL,聚合酶 1 U,添加双蒸水至反应总体积为 25 μL。各目的基因反应条件见表 3。

表 2 目的基因引物序列

Tab 2 Primers used for RT-PCR

Gene		Sequences 5' - 3'	Size
Decorin	Upstream	5' - CCG CAT CTC AGA CAC CAA CAT A - 3'	477 bp
	Downstream	5' - TTC CCA AGT TGA ATG GTA GAG C - 3'	
TGF-β <sub>1</sub>	Upstream	5' - ACTA CGC CAA AGA AGT CAC CC - 3'	362 bp
	Downstream	5' - AAG CCC TGT ATT CCG TCT CC - 3'	
Fibronectin	Upstream	5' - AGT CCA CCG CCA CCA TCA A - 3'	450 bp
	Downstream	5' - CAT CAG TGA ATG CCA GTC CTT T - 3'	
Collagen IV	Upstream	5' - GAG CCA ACG CTT CAG CAG G - 3'	178 bp
	Downstream	5' - CCT CCA GCT CCG ATC CAA CC - 3'	
GAPDH	Upstream	5' - TGG TGA AGG TCG GTG TGA AC - 3'	305 bp
	Downstream	5' - GGT GGT GAA GAC GCC AGT AG - 3'	

表3 各目的基因 RT-PCR 反应条件  
Tab 3 Condition for semiquantitative RT-PCR

	Force - denaturation	Denaturation	Renaturation	Extension	Cycle	Final extension
Decorin	94 °C × 3 min	94 °C × 30 s	58 °C × 1 min	72 °C × 30 s	28	72 °C × 10 min
TGF - β <sub>1</sub>	94 °C × 3 min	94 °C × 30 s	57 °C × 1 min	72 °C × 30 s	28	72 °C × 10 min
Fibronectin	94 °C × 3 min	94 °C × 30 s	60 °C × 1 min	72 °C × 30 s	30	72 °C × 10 min
Collagen IV	94 °C × 3 min	94 °C × 30 s	62 °C × 1 min	72 °C × 30 s	35	72 °C × 10 min
GAPDH	94 °C × 3 min	94 °C × 30 s	58 °C × 1 min	72 °C × 30 s	25	72 °C × 10 min

取各 PCR 产物 5 μL 在含溴化乙锭的 2.0% 琼脂糖凝胶电泳, IS-1000 多功能数字凝胶成像系统测定各产物的图像密度值 (image density value, IDV)。目的基因的 mRNA 水平 = 目的基因 mRNA 的 IDV 值/GAPDH 基因 mRNA 的 IDV 值。

### 3 统计学处理

实验数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 使用 SPSS 10.0 for windows 统计软件, 多个样本均数之间的比较采用方差分析 (ANOVA), 两样本均数之间的比较采用 *t* 检验。

## 结 果

### 1 正常对照组及阴性对照组 decorin、TGF - β<sub>1</sub> 及各 ECM 成分表达情况

正常对照组 (低糖组) RMCs 中 decorin、TGF - β<sub>1</sub>、fibronectin 和 collagen IV 的 mRNA 均有低水平表达。阴性对照组 (高糖组) RMCs 的 decorin、TGF - β<sub>1</sub>、fibronectin 和 collagen IV mRNA 水平在各观察时点均显著高于正常对照组 ( $P < 0.05$ ), 组内比较, 两组的各观察时点间均差异无显著。

### 2 AD-DCN 组和 AD-LacZ 组 decorin、TGF - β<sub>1</sub> 及各 ECM 成分表达情况

RMCs 感染 AD-DCN 后, DCN mRNA 水平在各观察时点均显著高于阴性对照组 (高糖组) ( $P < 0.05$ ), 以 24 h 时的水平最高, 是阴性对照组 24 h 时的 2.24 倍。48 h 起略有下降, 至 72 h 后其水平保持稳定 (图 1、2, 表 4)。Decorin mRNA 水平增高后表现出对 TGF - β<sub>1</sub> mRNA 水平的抑制作用。48 h 起, AD-DCN 组 TGF - β<sub>1</sub> mRNA 水平开始显著低于阴性对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 1), 72 h 后与正常对照组之间差异无显著意义 ( $P > 0.05$ ) (图 2、表 5)。与 TGF - β<sub>1</sub> mRNA 水平一致, 细胞外基质 fibronectin 和 collagen IV mRNA 水平也逐日下降 (图 1、2, 表 6、7)。从 72 h 起的各观察时点, AD-DCN 组 fibronectin 和 collagen IV mRNA 水平显著低于阴性对照组 ( $P < 0.05$ ); 在 96 h 及其后的各观察时点, fibronectin 和 collagen IV mRNA 水平均接近正常对照组水平, 两组间差异无显著 ( $P > 0.05$ )。

与阴性对照组 (高糖组) 比较, RMCs 感染 AD-LacZ 重组腺病毒后, 在 mRNA 水平, decorin、TGF - β<sub>1</sub>、

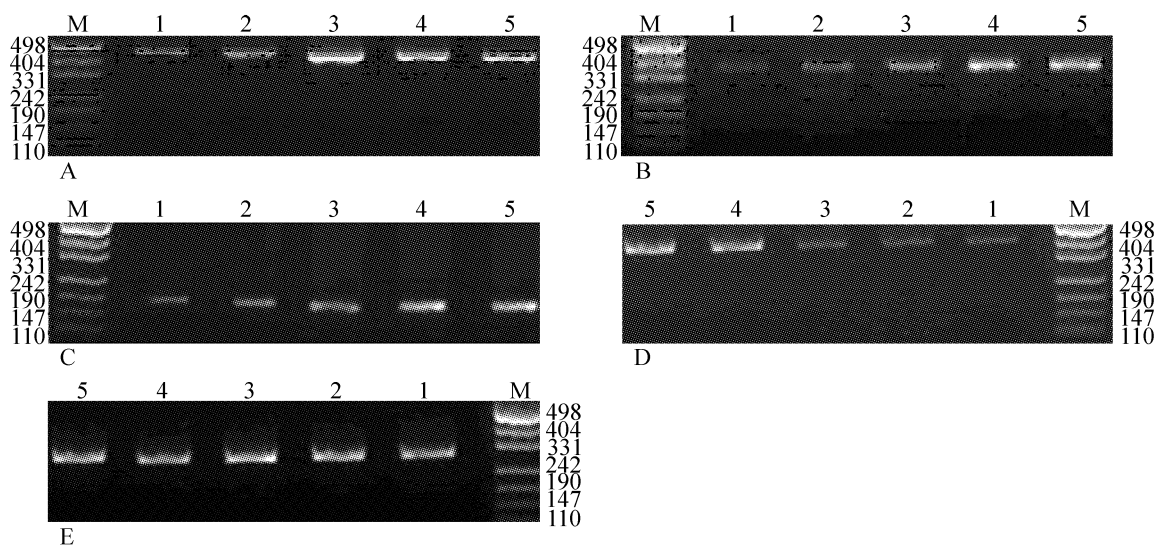


Fig 1 The expression of ECM mRNA in RMCs at 48 h. M: marker; 1: normal control; 2: positive control; 3: AD - decorin; 4: high glucose; 5: AD - LacZ. A: decorin mRNA; B: TGF - β<sub>1</sub> mRNA; C: fibronectin; D: collagen IV; E: GAPDH mRNA.

图1 48 h 时各组 decorin 和 TGF - β<sub>1</sub> mRNA 水平的表达

fibronectin 和 collagen IV 没有明显变化,各基因 mRNA 水平在 AD - LacZ 组与阴性对照组之间无显著差异。

### 3 添加 anti - TGFβ 中和抗体的阳性对照组 decorin、TGF - β<sub>1</sub> 及各 ECM 成分表达情况

阳性对照组细胞在添加 TGF - β 中和抗体后 48 h, decorin、TGF - β<sub>1</sub>、fibronectin 和 collagen IV mRNA 水平低于高糖组,72 h 后接近正常对照组水平,

其下降速度快于 AD - DCN 感染组。与 AD - DCN 感染组比较,TGF - β<sub>1</sub> 从 72 h 起, collagen IV 自 96 h 起两组间 mRNA 水平差异无显著( $P > 0.05$ )。

## 讨 论

本研究结果提示高糖促进大鼠肾系膜细胞 decorin、TGF - β<sub>1</sub>、fibronectin 和 collagen IV mRNA 水

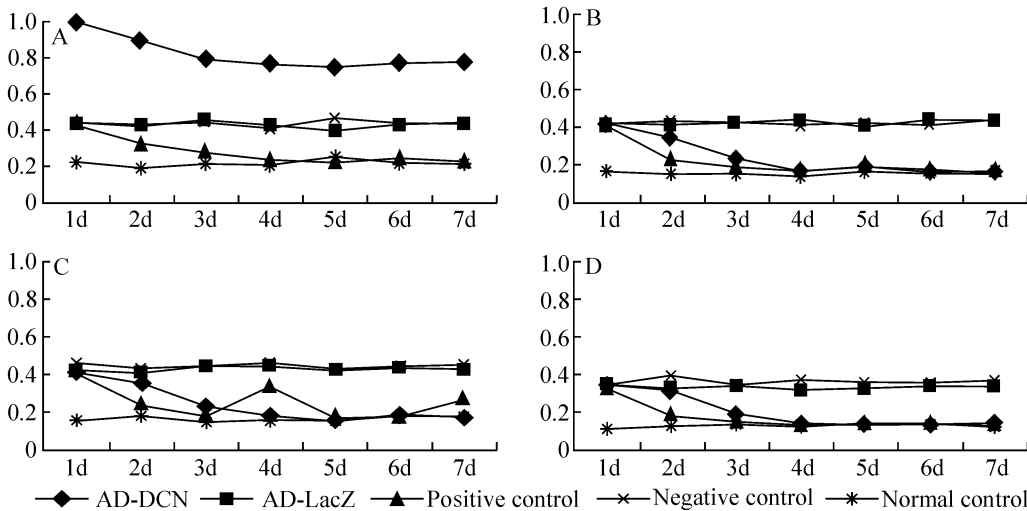


Fig 2 The expression of ECM mRNA. A: decorin; B: TGF - β<sub>1</sub>; C: fibronectin; D: collagen IV.

图 2 各目的基因 mRNA 表达水平的动态变化

表 4 Decorin mRNA 表达水平的动态变化

Tab 4 Expression of decorin mRNA ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Group	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
AD - DCN	0.990 ± 0.113 <sup>**</sup>	0.895 ± 0.059 <sup>**</sup>	0.790 ± 0.053 <sup>**</sup>	0.763 ± 0.081 <sup>**</sup>	0.745 ± 0.078 <sup>**</sup>	0.772 ± 0.009 <sup>**</sup>	0.778 ± 0.052 <sup>**</sup>
AD - LacZ	0.429 ± 0.021 <sup>#</sup>	0.420 ± 0.004 <sup>#</sup>	0.452 ± 0.024 <sup>#</sup>	0.423 ± 0.012 <sup>#</sup>	0.400 ± 0.016 <sup>#</sup>	0.428 ± 0.018 <sup>#</sup>	0.438 ± 0.021 <sup>#</sup>
Positive control	0.436 ± 0.010 <sup>#</sup>	0.332 ± 0.045 <sup>**</sup>	0.281 ± 0.053 <sup>*</sup>	0.238 ± 0.095 <sup>*</sup>	0.231 ± 0.097 <sup>*</sup>	0.249 ± 0.092 <sup>*</sup>	0.232 ± 0.043 <sup>*</sup>
Negative control	0.443 ± 0.023 <sup>#</sup>	0.432 ± 0.016 <sup>#</sup>	0.443 ± 0.023 <sup>#</sup>	0.403 ± 0.016 <sup>#</sup>	0.464 ± 0.022 <sup>#</sup>	0.439 ± 0.016 <sup>#</sup>	0.435 ± 0.020 <sup>#</sup>
Normal control	0.223 ± 0.031	0.193 ± 0.032	0.217 ± 0.024	0.211 ± 0.025	0.248 ± 0.023	0.204 ± 0.025	0.218 ± 0.031

\*  $P < 0.05$  vs negative control; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs normal control.

表 5 TGF - β<sub>1</sub> mRNA 表达水平的动态变化

Tab 5 Expression of TGF - β<sub>1</sub> mRNA ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Group	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
AD - DCN	0.427 ± 0.011 <sup>#</sup>	0.347 ± 0.039 <sup>**</sup>	0.231 ± 0.037 <sup>**</sup>	0.168 ± 0.035 <sup>*</sup>	0.186 ± 0.024 <sup>*</sup>	0.167 ± 0.029 <sup>*</sup>	0.163 ± 0.009 <sup>*</sup>
AD - LacZ	0.427 ± 0.026 <sup>#</sup>	0.419 ± 0.133 <sup>#</sup>	0.424 ± 0.022 <sup>#</sup>	0.438 ± 0.012 <sup>#</sup>	0.409 ± 0.021 <sup>#</sup>	0.442 ± 0.021 <sup>#</sup>	0.433 ± 0.006 <sup>#</sup>
Positive control	0.420 ± 0.005 <sup>#</sup>	0.236 ± 0.049 <sup>**</sup>	0.193 ± 0.041 <sup>*</sup>	0.173 ± 0.021 <sup>*</sup>	0.186 ± 0.016 <sup>*</sup>	0.175 ± 0.011 <sup>*</sup>	0.166 ± 0.004 <sup>*</sup>
Negative control	0.426 ± 0.006 <sup>#</sup>	0.436 ± 0.011 <sup>#</sup>	0.428 ± 0.016 <sup>#</sup>	0.418 ± 0.015 <sup>#</sup>	0.432 ± 0.014 <sup>#</sup>	0.419 ± 0.021 <sup>#</sup>	0.433 ± 0.020 <sup>#</sup>
Normal control	0.167 ± 0.006	0.152 ± 0.010	0.161 ± 0.007	0.149 ± 0.012	0.169 ± 0.014	0.155 ± 0.007	0.162 ± 0.022

\*  $P < 0.05$  vs negative control; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs normal control.

表 6 Fibronectin mRNA 表达水平的动态变化

Tab 6 Expression of fibronectin mRNA ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Group	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
AD - DCN	0.416 ± 0.031 <sup>#</sup>	0.363 ± 0.023 <sup>**</sup>	0.232 ± 0.006 <sup>**</sup>	0.183 ± 0.023 <sup>*</sup>	0.161 ± 0.025 <sup>*</sup>	0.193 ± 0.022 <sup>*</sup>	0.175 ± 0.011 <sup>*</sup>
AD - LacZ	0.426 ± 0.024 <sup>#</sup>	0.418 ± 0.030 <sup>#</sup>	0.443 ± 0.012 <sup>#</sup>	0.448 ± 0.016 <sup>#</sup>	0.426 ± 0.021 <sup>#</sup>	0.437 ± 0.008 <sup>#</sup>	0.429 ± 0.053 <sup>#</sup>
Positive control	0.419 ± 0.028 <sup>#</sup>	0.241 ± 0.026 <sup>**</sup>	0.181 ± 0.024 <sup>*</sup>	0.340 ± 0.019 <sup>**</sup>	0.177 ± 0.023 <sup>**</sup>	0.185 ± 0.015 <sup>*</sup>	0.279 ± 0.018 <sup>*</sup>
Negative control	0.465 ± 0.026 <sup>#</sup>	0.437 ± 0.008 <sup>#</sup>	0.450 ± 0.019 <sup>#</sup>	0.464 ± 0.015 <sup>#</sup>	0.434 ± 0.012 <sup>#</sup>	0.446 ± 0.022 <sup>#</sup>	0.457 ± 0.020 <sup>#</sup>
Normal control	0.163 ± 0.034	0.177 ± 0.016	0.151 ± 0.016	0.165 ± 0.013	0.159 ± 0.014	0.176 ± 0.022	0.175 ± 0.013

\*  $P < 0.05$  vs negative control; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs normal control.

表 7 IV 型胶原 mRNA 表达水平的动态变化

Tab 7 Expression of collagen IV mRNA ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Group	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
AD-DCN	0.342 ± 0.018 <sup>#</sup>	0.316 ± 0.011 <sup>**</sup>	0.201 ± 0.017 <sup>**</sup>	0.143 ± 0.018 <sup>*</sup>	0.128 ± 0.006 <sup>*</sup>	0.136 ± 0.022 <sup>*</sup>	0.142 ± 0.015 <sup>*</sup>
AD-LacZ	0.346 ± 0.019 <sup>#</sup>	0.327 ± 0.020 <sup>**</sup>	0.337 ± 0.012 <sup>#</sup>	0.314 ± 0.017 <sup>**</sup>	0.327 ± 0.016 <sup>#</sup>	0.336 ± 0.016 <sup>#</sup>	0.341 ± 0.021 <sup>#</sup>
Positive control	0.330 ± 0.011 <sup>#</sup>	0.180 ± 0.018 <sup>**</sup>	0.153 ± 0.006 <sup>*</sup>	0.132 ± 0.003 <sup>*</sup>	0.145 ± 0.017 <sup>*</sup>	0.138 ± 0.019 <sup>*</sup>	0.142 ± 0.013 <sup>*</sup>
Negative control	0.349 ± 0.025 <sup>#</sup>	0.385 ± 0.013 <sup>#</sup>	0.351 ± 0.016 <sup>#</sup>	0.373 ± 0.035 <sup>#</sup>	0.353 ± 0.025 <sup>#</sup>	0.358 ± 0.004 <sup>#</sup>	0.370 ± 0.021 <sup>#</sup>
Normal control	0.111 ± 0.025	0.126 ± 0.004	0.138 ± 0.010	0.126 ± 0.014	0.135 ± 0.009	0.140 ± 0.013	0.121 ± 0.013

\*  $P < 0.05$  vs negative control; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs normal control.

平升高,细胞内存在 TGF- $\beta_1$  过度表达和 decorin 相对不足的情况。DCN 重组腺病毒载体感染大鼠肾系膜细胞后能高效表达目的基因 decorin 并拮抗高糖环境下 TGF- $\beta_1$  增高刺激 ECM 成分合成增加的生物活性, fibronectin 和 collagen IV mRNA 水平随着 TGF- $\beta_1$  mRNA 水平的降低而接近正常对照组水平。感染 DCN 重组腺病毒提高 DCN mRNA 水平后下调各测定的 ECM 成分 mRNA 水平的作用与使用 TGF- $\beta$  抗体的效果相似。结果中 anti-TGF- $\beta$  中和抗体组的 fibronectin mRNA 在 96h 和第 7 d 仍有较高表达水平,可能与高糖刺激 fibronectin 合成增加并不单纯依赖于 TGF- $\beta_1$  途径相关<sup>[6]</sup>。AD-LacZ 感染组未显示相应变化,提示单纯感染重组腺病毒对高糖环境下 RMCs 表达 decorin、TGF- $\beta_1$ 、fibronectin 和 collagen IV mRNA 的水平没有显著影响。

已有学者通过将 DCN 的 cDNA 注入大鼠骨骼肌或将携带 decorin 基因的肾系膜细胞为载体,经肾动脉输入大鼠肾小球内来减少肾脏局部 TGF- $\beta_1$  及其它测定的 ECM 成分 mRNA 和蛋白表达<sup>[7,8]</sup>,但尚未有在糖尿病动物模型中或高糖培养下的肾系膜细胞中进行的实验报告。本研究利用腺病毒转移基因还具有转染效率高,感染基因表达高效且不与宿主基因组整合等优点。

目前,DCN 抑制 TGF- $\beta_1$  生物学功能的具体机制尚不十分清楚。DCN 的核心蛋白不仅能结合并中和 TGF- $\beta_1$  的活性,而且能抑制 TGF- $\beta_1$  mRNA 转录和翻译,减少 TGF- $\beta_1$  蛋白的表达<sup>[9]</sup>。DCN 可能除中和 TGF- $\beta_1$  活性外,还能激活  $Ca^{2+}$  信号通道,促使 Smad2 重要调节区亮氨酸-240 磷酸化,干扰 Smad 信号转导通路<sup>[10]</sup>。DCN 还能抑制如 Wnt-1 诱导的分泌蛋白 1 (Wnt-1 induced secreted protein 1, WISP-1) 等多种致纤维化细胞因子<sup>[11]</sup>,影响依赖于细胞周期蛋白的激酶抑制剂的表达,减少细胞凋亡和单核细胞浸润,抑制肾脏纤维化进程,但具体的机制尚有待进一步研究。

#### [参 考 文 献]

[1] 龙海波,钟娟,魏连波,等. 厄贝沙坦对早期糖尿病

肾病大鼠足细胞 nephrin 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(6): 1176-1180.

- [2] Davies Cde L, Melder RJ, Munn LL, et al. Decorin inhibits endothelial migration and tube-like structure formation; role of thrombospondin-1 [J]. *Microvasc Res*, 2001, 62(1): 26-42.
- [3] Manoranjan S, Inge E, Renato VI, et al. An anti-oncogenic role for decorin [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(45): 35153-35161.
- [4] Batbayar T, Nomura Y, Ishii Y, et al. Affinity of placental decorin for collagen [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(11): 2478-2481.
- [5] Mogyrosi A, Ziyadeh FN. What is the role of decorin in diabetic kidney disease [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1999, 14(5): 1078-1081.
- [6] Weigert C, Brodbeck K, Brosius FC 3rd, et al. Evidence for a novel TGF-beta 1-independent mechanism of fibronectin production in mesangial cells overexpressing glucose transporters [J]. *Diabetes*, 2003, 52(2): 527-535.
- [7] Isaka Y, Brees DK, Ikegaya K, et al. New paradigm of gene therapy: skeletal-muscle-targeting gene therapy for kidney disease [J]. *Nephron*, 1999, 83(4): 296-300.
- [8] Wang H, Chen L, Zhang Z, et al. Ex vivo transfer of the decorin gene into rat glomerulus via a mesangial cell vector suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis [J]. *Exp Mol Pathol*, 2005, 78(1): 17-24.
- [9] Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, et al. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases; identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-1 release [J]. *Biochem J*, 1997, 322(pt 3): 809-814.
- [10] Wahab NA, Wicks SJ, Mason RM, et al. Decorin suppresses transforming growth factor-beta-induced expression of PAI-1 in human mesangial cells through a mechanism that involves  $Ca^{2+}$ -independent phosphorylation of Smad2 at serine-240 [J]. *Biochem J*, 2002, 362(pt3): 643-649.
- [11] Desnoyers L, Arnott D, Pennica D. WISP-1 binds to decorin and biglycan [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(50): 47599-47607.