

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.27.006

降低 TGF β 1 表达后对大鼠糖尿病症状改变的研究*

田燕燕 杨 焱 张园园 俞 睿 朱 佳 肖拉提 朱 筠[△]

(新疆医科大学第一附属医院内分泌科 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要 目的:探讨降低 TGF β 1 的表达后,对大鼠糖尿病模型病症的改变情况,为研究 TGF β 1 与糖尿病发病之间提供实验数据。**方法:**采用腹腔注射链脲佐菌素,建立糖尿病大鼠模型,慢病毒包装 TGF β 1-shRNA 干扰载体,优选后皮下注射大鼠模型,以慢病毒空载 shRNA 注射大鼠模型作对照;检测 1-5 周左右两组大鼠体重和血糖变化;摘取大鼠胰腺,HE 染色光学镜下观察组织形态学改变情况。**结果:**用 RNAi 沉默 TGF β 1 表达后,与对照组相比,干扰组大鼠体重下降较缓,血糖持续下降;HE 染色可见干扰组大鼠胰岛形态较空载组稍好,分泌细胞数量稍多。**结论:**TGF β 1 对糖尿病的发病和进展起促进作用,当抑制 TGF β 1 表达后,可延缓糖尿病的进展。

关键词:TGF β 1;慢病毒;糖尿病

中图分类号:Q95-3;R587.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)27-5217-03

The Research of Knock down TGF β 1 Expression Altered Diabetes Symptoms Change*

TIAN Yan-yan, YANG Ye, ZHANG Yuan-yuan, YU Rui, ZHU Jia, XIAO La-ti, ZHU Jun[△]

(Department of endocrinology, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830011, China)

ABSTRACT Objective: To research the changes of SD rat Diabetes symptoms via knocking down TGF β 1 expression, to observe the relationship between TGF β 1 and Diabetes process. **Methods:** Intraperitoneal injection of drug STZ was used to set up Diabetic SD rat model, Packaging TGF β 1-shRNA lentiviral vectors were injected subcutaneously into SD rat model while shRNA was injected in control groups. the change of SD rat body weight and blood glucose levels were detected. **Results:** After TGF β 1 were silenced by RNAi, compared with the control group, the disturbance of SD rat weight loss was slower, blood sugar levels continued to decline; HE dyed showed that in interference group, SD rat pancreas islet had a slightly better morphology, presenting slightly more secretory cells. **Conclusion:** TGF β 1 was a stimulus to the onset and progress of diabetes, it can delay the progress of diabetes after the inhibition of the expression of TGF beta 1.

Key words: TGF β 1; Lentiviral Vectors; Diabetes

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R587.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)27-5217-03

前言

TGF β 超家族的功能主要与炎症、细胞通路和胚胎发育等方面有关^[1-4]。而转化生成因子 β 1 (transforming growth factor β 1, TGF β 1)可以促进成纤维细胞的生长,促进细胞外基质表达并抑制其降解^[5],此外,TGF β 1 还可诱导一些原癌基因的表达,与肿瘤的发生发展关系密切^[6]。糖尿病是一组以糖代谢紊乱为主要表现的临床综合症,它的发生和进展被认为与多种因素有关,多种因子参与其中^[7,8]。基于 TGF β 1 的生理学功能,我们认为它可能与糖尿病的发生和发展之间存在一定的关联,因此,本实验构建 TGF β 1 的干扰慢病毒载体,皮下注射到糖尿病大鼠模型,观察对大鼠体重和血糖浓度的影响,并摘取大鼠胰腺,HE 染色观察组织形态学改变情况,探讨 TGF β 1 对糖尿病发生

发展的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 清洁级 SD 大鼠 54 只,12-14 周龄左右,全部雄性,体重 280 ± 10 g,购自新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心,动物生产和使用许可证号分别为:scxk(新)2011-0001 和 syxk(新)2011-0002,本研究经本院伦理委员会同意。

1.1.2 主要试剂 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ),购自 sigma 公司;HEK293 细胞本实验室提供;TGF β 1-shRNA 三条慢病毒载体,TGF β 1 过表达载体 pLVX-TGF β 1 由吉凯公司构建;Trizol 总 RNA 提取试剂盒,qPCR 试剂盒购自 invitrogen 公司;HE 染色等一些试剂购自博士德公司。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81160116)

作者简介:田燕燕(1985-),女,硕士研究生,从事糖尿病及代谢疾病的防治方面的研究,E-mail:tianyanyan022@126.com

[△] 通讯作者:朱筠(1966-),女,硕士,主任医师,从事糖尿病及并发症基础与临床方面的研究

(收稿日期:2014-03-23 接受日期:2014-04-21)

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物建模 SD 雄性大鼠体重 $280 \pm 10\text{g}$, 饲以高脂高糖饲料 6 周(饲料配方:10%炼猪油,20%蔗糖,2%胆固醇,8%蛋黄粉,60%普通饲料),适应性喂养一周,之后空腹 12 小时,给予小剂量 STZ 腹腔注射(STZ 按体重 30mg/kg 溶于 pH 为 4.5 的柠檬酸缓冲液),注射 1 周后,测随机血糖,血糖值 $\geq 16.7\text{mmol/L}$ 者为 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)大鼠模型。

1.2.2 建模动物分组 建模成功的糖尿病大鼠,随机分为两组,分别命名为糖尿病对照组和糖尿病 TGF β 1 沉默表达组,大鼠按常规(高脂高糖)方法饲养,自由饮水。

1.2.3 慢病毒 TGF β 1 干扰片段设计 根据 TGF β 1(CDS Length:1173pbs) 的 CDS 按干扰片段在线软件设计 shRNA 干扰片段,干扰序列分别为:RNAi1 5'-GCAGAGTACACACAGCATATA-3';RNAi2 5'-GCAACAATTCCTGGCGATACC-3';RNAi3 5'-GACTCGCCAGAGTGGTTATCT-3',构建入载体 pLVX。

1.2.4 最佳干扰质粒的筛选 上述已构建的三个慢病毒干扰质粒,与 pLVX-TGF β 1 过表达质粒,按 3:1 的比例,共转染 293T 细胞,48hour 后收集细胞,提取总 RNA,以 β -actin 为内参做 qPCR,筛选最佳干扰质粒。

1.2.5 体重和血糖测量 将 1.2.4 步筛选的最佳干扰慢病毒质粒和 pLVX-Con-shRNA,分别皮下注射糖尿病 TGF β 1 沉默表达组和糖尿病对照组,连续注射三日后,从注射最后一日计算起,按 3 日、14 日和 37 日测量两组大鼠模型的体重和血糖浓度。

1.2.6 HE 染色观察胰腺组织 慢病毒感染 8 周后,将大鼠处死摘取胰腺,用 5%的多聚甲醛固定,石蜡包埋后行 HE 染色,光镜下行胰腺组织形态学观察。

1.3 统计学处理

数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS18.0 软件,行方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 采用 RNAi 技术沉默 TGF β 1 表达的效果比较

根据 RNAi 干扰片段的设计原则,我们设计了针对 TGF β 1 的三条干扰片段,分别命名为 pLVX-TGF β 1-shRNA1、pLVX-TGF β 1-shRNA2 和 pLVX-TGF β 1-shRNA3,此外,吉凯公司提供干扰空载对照质粒,命名为 pLVX-Con-shRNA。共转染 293T 后,48hour 收集细胞提总 RNA,以 β -actin 为内参,通过 qPCR 检测干扰效果,结果显示,三条干扰质粒都有效果,其中以 pLVX-TGF β 1-shRNA2 效果最佳(图 1)。 β -actin 的 qPCR 引物序列 F:5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3',R:5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3';TGF β 1 的 qPCR 引物序列 F:5'-AAGTGGACATCAACGGGTTC-3',R:5'-TGCGGAAGTCAATGTACAGC-3'。

2.2 pLVX-Con-shRNA 和 pLVX-TGF β 1-shRNA2 分别注射糖尿病对照组和糖尿病 TGF β 1 沉默表达组后对大鼠体重和血糖浓度的影响

之前建模好的糖尿病 SD 大鼠模型,随机分为两组:即糖

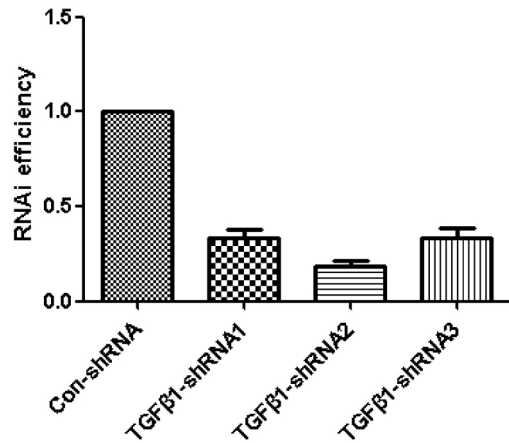


图 1 三条干扰片段对 TGF β 1 表达的沉默检测情况分析结果

Fig. 1 Analysis results of silence detection of three interference fragments on the expression of TGF β 1

尿病对照组和糖尿病 TGF β 1 沉默表达组,两种慢病毒质粒包装后通过皮下分别注射两组模型大鼠,连续注射 3 日,从注射最后一日计算起,按 3 日、14 日和 37 日测量两组大鼠模型的空腹体重和空腹血糖。与对照组相比,糖尿病 TGF β 1 沉默表达组 SD 大鼠的体重,在沉默 TGF β 1 表达后下降趋势减缓(图 2A),而空腹血糖浓度有较明显的下降趋势(图 2B)。

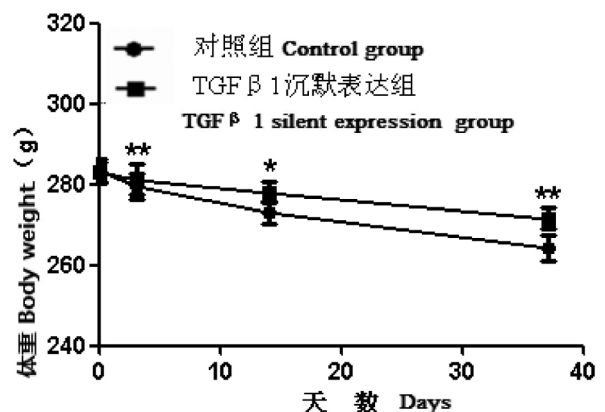


图 2A 糖尿病模型大鼠空腹体重变化情况

Fig. 2A Body weight change of diabetic model rats in fasting condition

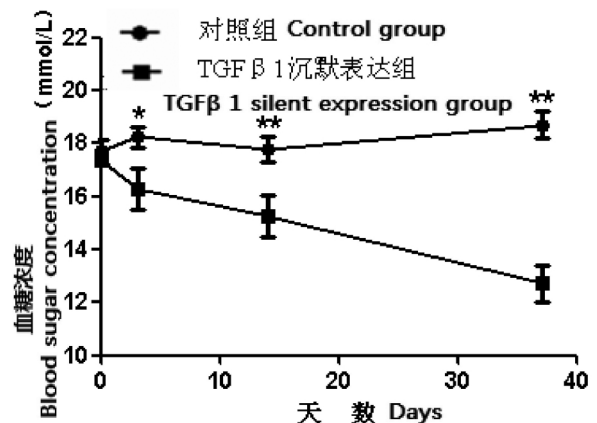
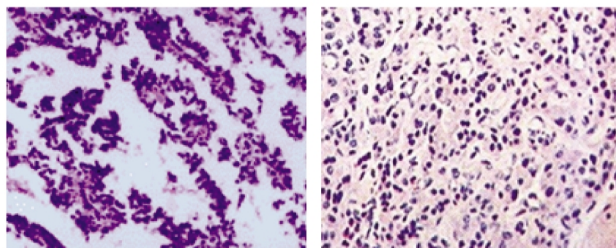


图 2B 糖尿病模型大鼠空腹血糖变化情况

Fig. 2B Changes of blood glucose of diabetic model rats in fasting condition

2.3 糖尿病对照组和糖尿病 TGFβ1 沉默表达组的胰腺形态学变化情况

pLVX-Con-shRNA 和 pLVX-TGFβ1-shRNA2 分别注射糖尿病对照组和糖尿病 TGFβ1 沉默表达组 8 周后, 处死模型大鼠摘取胰腺, 按常规 HE 染色观察胰腺组织形态学改变情况。结果显示, 对照组 SD 大鼠的胰腺组织光镜下胰岛呈现皱缩, 形态不整, 而 TGF-β1 沉默表达组大鼠胰腺组织形态相对较好, 胰岛细胞较为规则, 内分泌细胞较多(图 3)。



对照组 (Control group) TGFβ1 沉默组 (TGFβ1 silent group)

图 3 糖尿病模型大鼠胰腺组织形态学改变情况

Fig. 3 Change of pancreatic tissue morphology of diabetic model rats

3 讨论

TGFβ1 在机体内广泛表达, 影响多条信号通路的传递, 是 TGFβ 家族中表达最丰富的亚型^[8-10], 与许多疾病的发病进程相关^[5,11]。近年来, 随着生活水平的提高和不良的生活饮食习惯, 糖尿病发病率持续上升^[12,13], 但由于医疗水平的限制, 有一半的糖尿病患者初次就诊时, 已经合并有体内血管病变^[14-17]。糖尿病的发展对临床治疗造成极大的困难, 因此, 如何延缓糖尿病的发展就显得尤为重要^[19,20]。我们将 TGFβ1 与糖尿病的进程联系起来, 通过动物建模, 试图从中探讨 TGFβ1 对糖尿病发病进程的影响。

我们构建了针对 TGFβ1 的慢病毒干扰质粒, 和 TGFβ1 过表达质粒一起, 共转染 293T 细胞, 48h 后收集细胞提总 RNA, 通过 qPCR 检测, 结果显示, 三条干扰片段都有效果, 其中以 pLVX-TGFβ1-shRNA2 干扰效果最高, 达到 80% 以上(见图 1)。因此, 我们优选 pLVX-TGFβ1-shRNA2 来沉默 TGFβ1 在糖尿病大鼠模型中的表达。之后, 我们采用 STZ 建造糖尿病大鼠模型, 通过皮下注射的方法, 在连续注射 3 日, 从注射最后一日计算按 3 日、14 日和 37 日测量两组大鼠模型的空腹体重和空腹血糖浓度, 结果显示, 与糖尿病对照组相比, 糖尿病 TGFβ1 沉默表达组的大鼠空腹体重下降减缓(见图 2A), 而空腹血糖有下降趋势, 在 37 日后, 血糖浓度下降趋势最明显(见图 2B), 证明 TGFβ1 对糖尿病的进程有促进作用。接下来我们摘取了各组大鼠的胰腺, 石蜡包埋, 切片做 HE 常规染色, 结果显示, 对照组大鼠的胰腺组织光镜下胰岛体积皱缩明显, 形态不规则, 胰岛内分泌细胞较少, 聚集成团, 结构模糊, 而 TGFβ1 沉默表达组大鼠胰腺组织形态有所修复, 胰岛较为规则, 内分泌细胞较多且分布较匀(见图 3)。

综合以上实验, 我们认为, 降低 TGFβ1 在糖尿病大鼠中的表达, 有利于延缓糖尿病发病的进程, 有关其具体的作用机制, 还有待于我们进一步深入研究。

参考文献 (References)

- [1] Kim HJ, Kim JG, Moon MY, et al. IκB Kinase γ/Nuclear Factor-κB-Essential Modulator (IKKγ/NEMO) Facilitates RhoA GTPase Activation, which, in Turn, Activates Rho-associated Kinase (ROCK) to Phosphorylate IKKβ in Response to Transforming Growth Factor (TGF)-β1[J]. J Biol Chem, 2014,289(3):1429-1440
- [2] Chung H, Ramachandran R, Hollenberg MD, et al. Proteinase-activated receptor-2 transactivation of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-β receptor signaling pathways contributes to renal fibrosis[J]. J Biol Chem, 2013,288(52):37319-37331
- [3] Chalise J, Narendra S, Paudyal B, et al. Interferon alpha inhibits antigen-specific production of proinflammatory cytokines and enhances antigen-specific transforming growth factor beta production in antigen-induced arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2013,15(5):R143
- [4] 郑艳生, 郑世民, 高雪丽, 等. p53 和 TGF-β 在细胞生长调控中的相互作用及其与疾病的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2012,39(4):73-76
- [5] Zheng Yan-sheng, Zheng Shi-min, Gao Xue-li, et al. Research on Interaction and Diseases between p53 and TGF-β in Regulation of Cell Growth [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2012,39(4):73-76
- [6] 刘佳琦. Wnt/β-catenin 信号通路在 TGF-β1 诱导的真皮成纤维细胞向肌成纤维细胞表型转化中作用和机制的研究 [D]. 第四军医大学, 2012:43-38
- [7] Liu Jia-qi. Wnt/β-catenin signaling pathway in the study of TGF-β1 induced dermal into effect and mechanism of fiber cell phenotype conversion in fiber cells into muscle [D]. Fourth Military Medical University, 2012:43-38
- [8] 方海飞, 沈美萍, 徐银峰, 等. 甲状腺乳头状癌 TGF-β1、CD31 表达与肿瘤转移的关系[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2007,27(5):472-475, 插 2
- [9] Fang Hai-fei, Shen Mei-ping, Xu Yin-feng, et al. Study on the expressions of TGF-β1, CD31 in human papillary thyroid cancer and the correlation with lymph node metastasis [J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing, 2007,27(5):472-475,2
- [10] 楼旭丹, 汪海东, 夏世金, 等. 白细胞介素 17 在糖尿病大血管中的表达及白藜芦醇的干预机制 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2013,29(8):700-704
- [11] Lou Xu-dan, Wang Hai-dong, Xia Shi-jin, et al. Expression of interleukin-17 in diabetic macroangiopathy and the mechanism of intervention with resveratrol [J]. Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism, 2013,29(8):700-704
- [12] Yang HB, Yang HB, Tian C, et al. Effect of overexpressed VEGF165 and TGFβ1 on the regeneration of dentin-like tissue in rat [J]. Shanghai Journal of Stomatology, 2013,22(6):649-654
- [13] Uchida C, Haas TL. Endothelial cell TIMP-1 is upregulated by shear stress via Sp-1 and the TGFβ1 signaling pathways [J]. Biochem Cell Biol, 2014,92(1):77-83
- [14] Wang E, Wang Z, Liu S. Polymorphisms of VEGF, TGFβ1, TGFβR2 and conotruncal heart defects in a Chinese population [J]. Mol Biol Rep, 2014
- [15] El Gzaerly H, Elbardisey DM, Eltokhy HM, et al. Effect of transforming growth factor Beta 1 on wound healing in induced diabetic rats[J]. Int J Health Sci (Qassim), 2013,7(2):160-172

- [8] Wang C, Yuan Y, Li L, et al. Effects of resveratrol on the morphology of lipid droplets and the expression of lipid droplet-associated proteins in mouse primary hepatocytes [J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2012, 28(9): 911-914
- [9] Folch J, Lees M, Sloane Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues[J]. J Biol Chem, 1957, 226(1): 497-509
- [10] Murphy D J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms[J]. Prog Lipid Res, 2001, 40(5): 325-438
- [11] Liu M F. The progress of adipose differentiation-related protein[J]. Progress in Physiological Sciences, 2012, 43(4): 241-246
- [12] Gao J, Serrero G. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake[J]. J Biol Chem, 1999, 274(24): 16825-16830
- [13] Listenberger L L, Ostermeyer-Fay A G, Goldberg E B, et al. Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover[J]. J Lipid Res, 2007, 48(12): 2751-2761
- [14] Magnusson B, Asp L, Bostrom P, et al. Adipocyte differentiation-related protein promotes fatty acid storage in cytosolic triglycerides and inhibits secretion of very low-density lipoproteins[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(7): 1566-1571
- [15] Chang B H, Li L, Paul A, et al. Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(3): 1063-1076
- [16] Ohsaki Y., Cheng J., Suzuki M., et al. Lipid droplets are arrested in the ER membrane by tight binding of lipidated apolipoprotein B-100 [J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 14): 2415-2422
- [17] Fingar D. C., Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression[J]. Oncogene, 2004, 23(18): 3151-3171
- [18] Wheler J., Hong D., Swisher S. G., et al. Thymoma patients treated in a phase I clinic at MD Anderson Cancer Center: responses to mTOR inhibitors and molecular analyses[J]. Oncotarget, 2013, 4(6): 890-898
- [19] Cho H. J, Park J, Lee H W, et al. Regulation of adipocyte differentiation and insulin action with rapamycin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 321(4): 942-948
- [20] Kim J E, Chen J. regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis[J]. Diabetes, 2004, 53(11): 2748-2756
- [21] Brown E. J., Albers M. W., Shin T. B., et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex [J]. Nature, 1994, 369(6483): 756-758
- [22] Chakrabarti P., English T., Shi J., et al. Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage[J]. Diabetes, 2010, 59(4): 775-781
- [23] 张利军. OXPAT 对原代培养肝细胞脂滴形态的影响[D]. 西安: 第四军医大学基础部病理学与病理生理学教研室, 2008
- Zhang Li-jun. The Effect of OXPAT on the Morphology of Lipid Droplet in Primary Cultured Mouse Hepatocytes [D]. Xi'an: Department of Pathology & Pathophysiology, Fourth Military Medical University, 2008
- [24] 李航. LSDP5 在肝脏脂肪和脂滴代谢中的作用及机制研究[D]. 西安: 第四军医大学基础部病理学与病理生理学教研室, 2011
- Li Hang. The role and mechanism of LSDP5 in lipid droplet and lipid metabolism of liver[D]. Xi'an: Department of Pathology & Pathophysiology, Fourth Military Medical University, 2011
- [25] 刘芳. LSDP5 在脂肪代谢中功能的初步研究[D]. 西安: 第四军医大学基础部病理学与病理生理学教研室, 2009
- Liu Fang. The Preliminary Studies on the Function of LSDP5 in Lipid Metabolism [D]. Xi'an: Department of Pathology & Pathophysiology, Fourth Military Medical University, 2009

(上接第 5219 页)

- [12] 刘江月, 张代娟, 刘同美, 等. TtR, sTtR 表达与 2 型糖尿病大鼠大血管病变的关系[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(18): 4494-4495
- Liu Jiang-yue, Zhang Dai-juan, Liu Tong-mei, et al. The relationship between TtR, sTtR expression in rats with type 2 diabetes macroangiopathy [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2013, 33(18): 4494-4495
- [13] Jayaraman A, Pike CJ. Alzheimer's disease and type 2 diabetes: multiple mechanisms contribute to interactions [J]. Curr Diab Rep, 2014, 14(4): 476
- [14] Hanyu H. Diabetes mellitus and dementia [J]. Brain Nerve, 2014, 66(2): 129-134
- [15] Kleophas W, Dellanna F. Interdisciplinary interaction in vascular diseases of the eye, diabetes and diabetic retinopathy [J]. Ophthalmology, 2014, 111(1): 19-22
- [16] Kadoğlu NP, Sailer N, Fotiadis G, et al. The Impact of Type 2 Diabetes and Atorvastatin Treatment on Serum Levels of MMP-7 and MMP-8[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2014, 122(1): 44-49
- [17] Zeadin MG, Petlura CI, Werstuck GH. Molecular Mechanisms Linking Diabetes to the Accelerated Development of Atherosclerosis [J]. Can J Diabetes, 2013, 37(5): 345-350
- [18] Xu R, Yang R, Hu H, et al. Diabetes alters the expression of partial vasoactivators in cerebral vascular disease susceptible regions of the diabetic rat[J]. Diabetol Metab Syndr, 2013, 5(1): 63
- [19] Almagrouk TA, Ewart MA, Salt IP, et al. Perivascular fat, AMP-activated protein kinase and vascular diseases [J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(3): 595-617
- [20] Li RP, Xue FS, Cheng Y, et al. Assessing association between type 2 diabetes and cardiac complications after vascular surgery [J]. Anaesth Intensive Care, 2014, 42(1): 137