

白介素-18 及信号转导和转录激活因子 5 在糖尿病大鼠视网膜的表达

梅妍 周鸿鹰 李爱冬 卢友光 羊惠君

【摘要】 目的 观察白介素-18(IL-18)及信号转导和转录激活因子 5(STAT5)在 4~24 周糖尿病大鼠视网膜的表达,初步探讨其在糖尿病视网膜病变(DR)中可能的分子机制。方法 用限制性片段差异显示聚合酶链反应(RFDD-PCR)技术,建立正常大鼠和糖尿病 8 周大鼠视网膜基因表达谱。以生物信息学分析两者差异,筛选出候选基因 IL-18 及 STAT5。以半定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)观察 IL-18 及 STAT5 在 4、8、24 周糖尿病大鼠视网膜的表达。结果 RFDD-PCR 结果显示,正常组 IL-18 表达明显强于糖尿病组;正常组 STAT5 无表达,糖尿病组较强表达。RT-PCR 结果显示,与正常相比,糖尿病 4 周时,视网膜高表达 IL-18,8 周 IL-18 表达降低,24 周表达最低。STAT5 在正常及糖尿病 4 周视网膜未见表达;8 周开始表达,24 周时最强。结论 IL-18 表达变化及 STAT5 的活化与 DR 发生有关。IL-18 的表达不依赖于 STAT5 的活化。

【关键词】 糖尿病视网膜病; 白细胞介素-18; 聚合酶链反应; 模型,动物;
信号转导和转录激活因子 5

中图分类号:R446 R587.26

Expression of interleukin-18 and signal transducers and activators of transcription 5 in retina of diabetic rats MEI Yan, ZHOU Hong-ying, LI Ai-dong, et al. Department of Anatomy, School of Preclinical & Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China
Corresponding author: YANG Hui-jun, Email: he500209@mail.sc.cninfo.net

【Abstract】 Objective To investigate the expression of interleukin-18(IL-18) and signal transducers and activators of transcription 5(STAT5) in retina of 4-24-week-old diabetic rats, and explore the potential molecular mechanisms involved in diabetic retinopathy (DR). **Methods** Retinal gene expression profile of healthy and 8-week-old diabetic rats was established with restriction fragment differential display-polymerase chain reaction (RFDD-PCR), and the differences was analyzed by bioinformatics. IL-18 and STAT5 were filtrated as the candidate genes of DR. The expression of IL-18 and STAT5 in retina of diabetic rats with the age of 4, 8, and 24 weeks was observed by semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The result of RFDD-PCR showed; expression of IL-18 was higher in healthy retina than that in diabetic one; expression of STAT5 was not found in healthy rats but in diabetic ones. The result of RT-PCR showed; compared with the normal, high expression of IL-18 was found in 4-week diabetic retina, reduced in 8-week one, and decreased to the lowest in 24-week one. The expression of STAT5 was not observed in healthy or 4-week diabetic retina, but occurred in 8-week one, and increased in 24-week one. **Conclusion** The expression of IL-18 and the activation of STAT5 may relate to the occurrence of DR. The expression of IL-18 doesn't depend on the activation of STAT5.

【Key words】 Diabetic retinopathy; Interleukin-18; Polymerase chain reaction;
Models, animal; STAT5

糖尿病视网膜病变(DR)是严重的致盲性眼病,至今发病的分子机制仍然不清。现有的研究表明 DR 是一个多基因多步骤疾病,其病理改变涉及了代谢酶、炎症、细胞周期、细胞生长、细胞增生、信号传导、细胞外基质及离子通道等相关基因的变化^[1]。我们采用限制性片段差异显示聚合酶链反应(RFDD-PCR)技术建

立正常大鼠及 8 周糖尿病大鼠视网膜基因表达谱。通过生物信息学分析其表达差异,初步确定白介素-18(IL-18)及信号转导和转录激活因子 5(STAT5)为 DR 相关基因。进一步以半定量反转录多聚酶链反应(RT-PCR)观察其在糖尿病不同病程(4、8 和 24 周)的表达情况,初步探讨其在 DR 发生中可能的分子作用机制。

作者单位:610041 成都,四川大学基础与法医学院人体解剖教研室(梅妍、周鸿鹰、卢友光、羊惠君);成都医学院科研实验中心(李爱冬)
通讯作者:羊惠君,Email: he500209@mail.sc.cninfo.net

1 材料和方法

1.1 RFDD-PCR 建立大鼠视网膜基因表达谱

雌性 SD 大鼠 30 只(四川大学动物试验中心提供),体重 220~250 g。糖尿病大鼠模型建立方法及建模成功标准参照[2]。共成模 18 只大鼠。造模 8 周后,随机取糖尿病模型鼠及同笼饲养的正常雌性 SD 大鼠各 1 只,测量其血糖(分别为 28.4、5.9 mmol/L)及尿糖(分别为++++和-)后断颈处死,取视网膜。用 Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)按操作规程抽提总 RNA, DNA 酶(日本 Takara 公司)处理,纯化 RAN。紫外分光光度仪检测 RNA 含量及纯度。分别取正常大鼠及糖尿病 8 周大鼠视网膜总 RNA 各 1 μ g, 采用 displayPROFILE[®] kit(美国 Q-biogene 公司),按操作规程以 5'T25V-Anchored primer 进行 cDNA 合成^[3]。用 Taq I 限制性内切酶对 cDNA 进行消化,获得的表达基因转录片段以 T4 DNA 连接酶与特殊设计的两种不同的 DNA 接头连接(美国 displayPROFILE[®] kit, Q-biogene 公司)制备成差异显示模板^[3]。用 Cy5 标记的通用延伸引物,以及 64 个特异引物(美国 displayPROFILE[®] kit, Q-biogene 公司),分别在 64 个反应体系中,以“touch-down”PCR 对模板进行扩增^[3]。应用高电压垂直电泳系统(美国 Bio-Rad 公司),以 7% 尿素聚丙烯酰胺凝胶恒功率(60W)电泳,分离 64 个“表达窗”扩增片段(每一反应体系为一个“表达窗”)^[3]。用 Typhoon9200 成像系统(英国 Amersham 公司)扫描获得图像。运用图像分析软件 Image Tool,计算出所有片段在凝胶上的迁移距离。根据 DNA 分子量 Marker 的迁移距离(x 值)以及条带相对应的分子量大小[碱基对(bp)值,y 值],通过曲线拟合作出标准曲线方程。将所得片段的迁移距离(x 值)带入标准曲线,获得各片段的 bp 值(y 值)。以片断大小和所在“表达窗”作参数,按 2% 的容许误差从数据库(<http://www.qbio-gene.com/displayfit/>)中确定其所对应的基因。对其做初步筛选及归类分析^[3]。

1.2 半定量 RT-PCR 观察 IL-18 及 STAT5 的表达

4、8、24 周糖尿病模型鼠视网膜各 4 对, RNA 抽提、纯度和浓度检测如前所述。各样本取 5 μ g 总 RNA 逆转录为 cDNA,测 cDNA 260 nm 的吸光度(A)[旧称光密度(OD)]值($A_{260\text{ nm}}$)、及 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值。等量取 cDNA,采用两步法 RT-PCR(立陶宛 MBI Fermentase)对 IL-18 及 STAT5 片段进行扩增。引物委托 Takara 公司合成。引物序列:IL-18 上游:5'-

CAGACCACTTTGGCAGAC-3',下游:5'-GATTT-ATCCCCATTTTCAT-3',扩增产物 445 bp。STAT5 上游:5'-GATTACAGTGGCGAGATCCTGA-3',下游:5'-GACACGGACATGCTGTTGTAGT-3',扩增产物:491 bp。PCR 循环程序:预变性 95 C 1 min;变性 95 C 30 s,退火分别为 59、50 C 30 s,延伸 72 C 45 s,共 28 个循环;72 C 7 min 结束反应。1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离片段。

2 结果

2.1 大鼠视网膜基因表达谱的建立

正常组 RNA = 1.353 92 μ g/ μ l, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} = 1.89$;糖尿病组 RNA = 1.692 4 μ g/ μ l, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} = 1.86$ 。RNA 含量及纯度达到试验要求。

正常大鼠及 8 周糖尿病大鼠视网膜基因表达谱中,共获得有意义的片段 3 639 个,其中包括正常组的 1 813 个,糖尿病组的 1 826 个。有表达差异的 840 个。以生物信息学方法对部分差异基因进行初步比对分析,发现 1 号表达窗 56 bp、5 号表达窗 117 bp 的 IL-18 片段,正常组表达明显强于糖尿病组。44 号表达窗 387 bp 的 STAT5 片段,正常组无表达,糖尿病组较强表达。

2.2 IL-18 及 STAT5 的表达

IL-18:正常视网膜表达较强,糖尿病 4 周视网膜表达最强,8 周表达低于正常,24 周表达最低。STAT5:正常及糖尿病 4 周视网膜未见表达,8 周时可见表达,24 周表达最强。

3 讨论

IL-18 又称为 γ 干扰素诱导因子,是一个涉及到机体先天及后天获得性免疫反应的多效细胞因子^[4]。近年来,IL-18 在糖尿病发生机制中的作用受到人们的关注。研究发现 IL-18 与动物糖尿病的发生和发展有关^[5]。高血糖导致的血 IL-18 急剧升高,提示 IL-18 与糖尿病患者循环系统的异常有关^[6,7]。虽然目前未见 IL-18 与 DR 有关的报道,但是 IL-18 前体裂解酶-caspase-1 在糖尿病视网膜组织中的活化^[8]提示 IL-18 在 DR 发生中可能起一定的作用。Renhai 等^[9]发现,IL-18 可特异性抑制碱性成纤维生长因子(bFGF)诱导的毛细血管内皮细胞增生和鼠角膜新生血管形成。Qiao 等^[10]报道,IL-18 敲除后的新生小鼠有视网膜血管扩展及渗漏,以及血管内皮生长因子(VEGF)、血小板源性生长因子(PDGF)、bFGF 和色素上皮源性生长因子(PEDF)过表达。提示 IL-18 对血管生成因子

有抑制作用。我们的实验结果显示,与正常对照组相比,IL-18 在 4 周糖尿病模型鼠视网膜表达升高,而 8 周时下调,到 24 周时下调更为明显。结合我们以往的研究:8~20 周糖尿病大鼠视网膜血管内皮细胞强烈表达 VEGF、胰岛素样生长因子-I(IGF-I)、bFGF 及其受体,而对照组和病程少于 8 周的糖尿病大鼠视网膜无这 3 种生长因子及其受体表达^[11]。我们推测,IL-18 在糖尿病不同病程中所起作用不同。在早期视网膜 IL-18 可能通过促炎症作用或免疫调节机制参与炎症应答反应。而随后则可能与其血管生成的抑制作用有关。IL-18 下调,对 VEGF、IGF-I、bFGF 抑制作用减弱,导致血管内皮细胞增生。

STAT5 是信号传导与转录活化因子家族成员,在细胞增生、分化、发育、炎症及凋亡中起着重要的作用。研究证实 STAT5 具有促进细胞生存的作用^[12],其上调可引起细胞增生,与人类许多肿瘤的发生相关^[13]。Brizzi^[14]研究发现 II 型糖尿病患者的低密度脂蛋白(LDL)可激活血管内皮细胞 STAT5 的转录活性,糖化的 LDL 也可通过活化的终末糖基化产物受体,激活 STAT5。而正常人的 LDL 却无此作用。因此认为 STAT5 是糖尿病相关血管性疾病基因表达的调节子^[15]。STAT5 在 DR 中的作用至今未见报道。本试验结果显示,正常视网膜无 STAT5 表达,糖尿病 8 周后视网膜可见 STAT5 的表达。结合我们先前的研究,STAT5 的表达与促血管生成因子的表达同步^[11]。因此我们推测,STAT5 的活化可能与血管内皮细胞的增生有关。

DNA 蛋白结合试验提示,激活的 STAT5 可以特异结合于人 IL-18 基因启动子区,而诱导 IL-18 基因的活化^[16]。但本试验结果却显示两者的时空表达是相反的。我们推测在糖尿病视网膜膜病变的发生中 IL-18 的表达并不依赖于 STAT5 的活化。但 IL-18 及

STAT5 在 DR 中的确切作用机理,以及两者间的确切关系有待我们进一步的探讨。

4 参考文献

- 1 Antonia MJ, Sui H, Vassiliki P, et al. In vivo retinal gene expression in early diabetes. *IOVS*, 2001, 42: 3047-3057.
- 2 李爱冬,羊惠君,韦纯义,等. 1~16 周糖尿病大鼠视网膜血管内皮细胞凋亡、增生变化的观察. *中华眼底病杂志*, 1999, 15: 157-159.
- 3 周红鹰,梅妍,卢友光,等. RFDD-PCR 建立人类疾病差异表达谱方法研究. *中华医学遗传学杂志*, 2005, 22: 293-296.
- 4 McInnes IB, Gracie JA, Leung BP, et al. Interleukin 18; a pleiotropic participant in chronic inflammation. *Immunol Today*, 2000, 21: 312-315.
- 5 Tahara H, Oikawa Y, Shimada A, et al. Systemic Administration of IL-18 promotes diabetes development in young nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 2003, 171: 5865-5875.
- 6 Esposito K, Nappo F, Giugliano F, et al. Cytokine milieu tends toward inflammation in type 2 diabetes (Letter). *Diabetes Care*, 2003, 26: 1647.
- 7 Aso Y, Okumura KI, Takebayashi K, et al. Relationships of plasma interleukin-18 concentrations to hyperhomocysteinemia and carotid intima-media wall thickness in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2003, 26: 2622-2627.
- 8 Mohr S. Potential new strategies to prevent the development of diabetic retinopathy. *Expert Opin Investig Drugs*, 2004, 13: 189-98.
- 9 Renhai C, Jacob F, Masashi K, et al. Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor. *The FASEB Journal*, 1999, 13: 2195-2202.
- 10 Qiao H, Sonoda KH, Sassa Y, et al. Abnormal retinal vascular development in IL-18 knockout mice. *Lab Invest*, 2004, 84: 973-80.
- 11 李爱冬,张晓,羊惠君,等. 糖尿病大鼠视网膜血管内皮细胞 p53、bcl-2 及生长因子的表达与细胞周期阻滞. *中华眼底病杂志*, 2003, 19: 29-33.
- 12 Debierre-Grockiego F. Anti-apoptotic role of STAT5 in haematopoietic cells and in the pathogenesis of malignancies. *Apoptosis*, 2004, 9: 717-28.
- 13 Buitenhuis M, Coffey PJ, Koenderman L, et al. Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5). *Int J Biochem Cell Biol*. 2004, 36: 2120-4.
- 14 Brizzi MF. Diabetic LDL inhibits cell-cycle progression via STAT5B and p21(waf). *J Clin Invest*, 2002, 109: 111-119.
- 15 Maria FB. STAT5 activation induced by diabetic LDL depends on LDL glycation and occurs via src kinase activity. *Diabetes*, 2002, 51: 3311-3317.
- 16 Kalina U, Ballas K, Koyama N, et al. Genomic organization and regulation of the human interleukin-18 gene. *Scand J Immunol*, 2000, 52: 525-530.

(收稿日期:2005-02-23)

(本文编辑:朱敏)

· 消息 ·

视网膜脱离手术治疗课程和眼科新进展学习班通知

浙江大学医学院附属第一医院眼科中心和德国海得堡大学曼海姆临床医学系眼科联合举办“视网膜脱离手术治疗课程和眼科新进展学习班(国家级)”,将于 2005 年 10 月 30 日~11 月 2 日在杭州市举行。届时将有来自中国、德国和美国的多位著名眼科专家结合自己的临床实践经验,对视网膜脱离的诊断、各种手术治疗方法作深入浅出地讲解。课程进行中组织互动式讨论,配合手术录像演示。全程配备中文同声翻译,中英文对照多媒体投影,以保证学习效果。课程结束颁发国家级 I 类继续教育学分证书。

联系地址:杭州市庆春路 79 号浙江大学医学院第一附属医院浙益眼科中心(邮政编码:310003),联系人:陈华、潘京。电话:0571-87214083,传真:87214128, Email: zvec@mail.hzzj.cn。