

# 基质金属蛋白酶及其组织抑制物在 db/db 小鼠 糖尿病肾病中的表达和活性

姜宗培<sup>1</sup>, 杨念生<sup>1</sup>, 韩东哲<sup>2</sup>, 陈雄辉<sup>1</sup>, 余学清<sup>1</sup>, 李熙渤<sup>2</sup>

(1. 中山大学附属第一医院肾内科 卫生部肾脏病临床研究重点实验室, 广东 广州 510080;

2. 顺天乡大学玄岩肾脏研究所, 汉城 140-743, 韩国)

**摘要:**【目的】探讨基质金属蛋白酶(MMP-s)和基质金属蛋白酶抑制物(TIMPs)在 db/db 小鼠糖尿病肾病发病机制中的作用。【方法】6例 db/db 小鼠肾组织标本,用蛋白质印迹法检测 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 蛋白的表达,用白明胶酶谱法检测 MMP-2 和 MMP-9 活性。【结果】与 db/m 小鼠相比,db/db 小鼠肾脏 MMP-2、MMP-9 蛋白质的表达分别下降了 55.4% 和 30.1% ( $P < 0.05$ ); 而 TIMP-1 和 TIMP-2 蛋白质表达分别上升了 272.5% 和 48.8% ( $P < 0.01$ )。db/db 小鼠肾脏 MMP-9 的活性较 db/m 小鼠明显下降(85.9%,  $P < 0.001$ ); MMP-2 的活性在 db/db 小鼠和 db/m 小鼠肾脏中均检测不到。【结论】db/db 小鼠肾脏中 MMP-s- 蛋白表达和活性下降,而 TIMPs 蛋白表达上升,使细胞外基质降解减少,积聚增多,是 db/db 小鼠糖尿病肾病主要发病机制之一。

**关键词:**糖尿病肾病; 细胞外基质; 金属蛋白酶类; 金属蛋白酶类组织抑制剂

中图分类号:R587.1

文献标识码:A

文章编号:1000-257X(2003)02-0140-03

## Expression and Activity of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases in the Kidney of db/db Mice

JIANG Zong-pei<sup>1</sup>, YANG Nian-sheng<sup>1</sup>, HAN Dong-cheol<sup>2</sup>, CHEN Xiong-hui<sup>1</sup>,

YU Xue-qing<sup>1</sup>, LEE Hi-bahl<sup>2</sup>

(1. Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Hyonam Kidney Laboratory, Soon Chun Hyang University, Seoul 140-743, Korea)

**Abstract:** 【Objective】To study the pathogenic role of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in diabetic nephropathy by evaluating the expression and activity of MMPs- and TIMPs in the kidney of db/db mice. 【Methods】Kidney tissues from 6 diabetic db/db mice were investigated. Protein expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 was analyzed by western blot. The activity of MMP-2 and MMP-9 was measured by zymography. 【Results】Protein expression of MMP-2 and MMP-9 in kidney of db/db mice was significantly lower than that in kidney of db/m mice (55.4% and 30.1% lower respectively,  $P < 0.05$ ). The expression of both TIMP-1 and TIMP-2 proteins in kidney of db/db mice was significantly higher than that in db/m mice (272.5% and 48.8% higher, respectively,  $P < 0.01$ ). The activity of MMP-9 in kidney of db/db mice was significantly lower than that in db/m mice (85.9% lower,  $P < 0.001$ ). The activity of MMP-2 was not detectable either in the kidney of db/db mice or db/m mice. 【Conclusion】Decreased expression and activity of MMPs- and increased expression of TIMPs might contribute to the mesangial expansion characteristic of diabetic nephropathy in the kidney of db/db mice by decreasing extracellular matrix (ECM) degradation.

**Key words:** diabetic nephropathies; extracellular matrix; metalloproteinases; tissue inhibitor of metalloproteinases

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(2): 140 ~ 142, 153]

收稿日期:2002-08-26

作者简介:姜宗培(1964-),男,广东广州人,医学博士,副教授。

肾小球肥大、基底膜增厚、系膜增生以及细胞外基质聚积是糖尿病肾病的主要病理特征。正常细胞外基质水平取决于其合成及降解代谢间的平衡。糖尿病肾病肾小球细胞外基质合成增加<sup>[1]</sup>,降解减少<sup>[2]</sup>。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases MMPs)及金属蛋白酶组织抑制物(tissue inhibitor of metalloproteinases TIMPs)在细胞外基质降解系统中起关键作用。体外实验证实高浓度葡萄糖可导致 MMPs 和 TIMPs 表达和活性变化<sup>[3]</sup>,但体内研究报道不多。大部分观察是在 1 型糖尿病模型上进行,在 2 型糖尿病模型的研究很少。为此,我们研究 MMPs 及 TIMPs 在 2 型糖尿病动物模型 db/db 小鼠肾脏中的变化,并探讨其在糖尿病肾病发病机制中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 标本

6 只 3 个月龄大雄性 db/db 糖尿病小鼠,6 只同龄雄性 db/m 非糖尿病小鼠作为正常对照,取出肾脏后分离皮质,加入适量细胞裂解液(含 1 g/L 抑肽酶和 1 g/L 亮肽素),用超声粉碎仪离散组织块,4 ℃ 高速离心,取上清液,按 Bio-Rad 蛋白测定方法(Bio-Rad Laboratories, USA)测定蛋白质浓度,分装,-70 ℃ 保存。

### 1.2 蛋白质印迹法(Western blot)

肾组织蛋白质标本中 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1、TIMP-2 的含量采用蛋白质印迹法进行检测。方法简述如下<sup>[4]</sup>:50 μg 的肾组织蛋白质标本,在 100~150 g/L 的聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶上电泳,然后转移至尼龙膜,50 g/L 脱脂奶粉溶液封闭 1 h,分别加入一抗(抗 MMP-2 单克隆抗体,购自 Neomarkers; 抗 MMP-9 多克隆抗体,购自 Chemicon International Inc; 抗 TIMP-1 单克隆抗体和抗 TIMP-2 单克隆抗体,购自 Oncogene Research Products),浓度为 1:1 000,4 ℃ 孵育过夜。加入相应辣根过氧化物酶标记的第二抗体(Santa Cruz),室温孵育 2 h, ECL 试剂(Amersham Pharmacia Biotech, UK)显色并曝光成像。扫描图像并作计算机信号密度分析。

### 1.3 白明胶酶谱法(zymography)

肾组织蛋白质标本中 MMP-2 和 MMP-9 的活性采用白明胶酶谱法进行检测。方法见文献[5],简

述如下:30 μg 的肾组织蛋白质标本,加入等容积标本缓冲液(60.5 g/L Tris-HCl pH6.8, 100 g/L SDS, 1 g/L 溴酚蓝, 0.1 L/L 甘油)。在含 1 g/L 白明胶的 100 g/L SDS-PAGE 凝胶上电泳;用含 25 mL/L Triton X-100 的洗涤溶液室温下浸洗 30 min。换显影缓冲液(6.06 g/L Tris, 11.6 g/L NaCl, 0.56 g/L CaCl<sub>2</sub>, 100 mL/L Triton X-100)浸洗 30 min,换新鲜显影缓冲液 37 ℃ 下浸洗过夜。应用 5 g/L 考马斯蓝染色凝胶 1~2 h,见到清晰信号后应用去染色溶液(含 0.5 L/L 甲醇和 0.75 L/L 乙酸)浸洗数小时或过夜。凝胶扫描或照片成像,计算机信号密度分析。

### 1.4 资料统计分析

计算机信号密度分析采用单位面积计算机图象扫描值减去背景值的均数±标准差(OD/mm<sup>2</sup>)表示,均数的比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 MMPs 和 TIMPs 蛋白质在 db/db 小鼠肾的表达

MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 和 TIMP-2 蛋白质在 db/db 小鼠肾的表达如表 1 所示。由表 1 可见,db/db 小鼠肾脏 MMP-2 和 MMP-9 蛋白质表达较 db/m 小鼠肾脏分别减少 55.4% 和 30.1% ( $P < 0.05$ ),而 TIMP-1 和 TIMP-2 蛋白质的表达分别较 db/m 小鼠肾脏上升了 272.5% ( $P < 0.05$ ) 和 48.8% ( $P < 0.01$ )。

### 2.2 db/db 小鼠肾脏中 MMPs 的活性

表 1 MMPs、TIMPs 在 db/db 大鼠肾脏中的表达

Table 1 MMPs、TIMPs expression in kidney of db/db mice

	$\bar{x} \pm s$ (OD/mm <sup>2</sup> )		<i>P</i>
	db/m ( <i>n</i> = 6)	db/db ( <i>n</i> = 6)	
MMP-2	2 079 ± 277	927 ± 303	0.019
MMP-9	1 697 ± 131	1 186 ± 93	0.032
TIMP-1	584 ± 112	2 175 ± 416	0.028
TIMP-2	1 296 ± 66	1 929 ± 90	0.003

db/db 小鼠肾组织 MMP-2、MMP-9 的活性检测结果如图 1 所示。肿瘤细胞株 NIH3T3 细胞培养液作为 MMP-2 和 MMP-9 活性的阳性对照。db/db 糖尿病小鼠肾脏 MMP-9 活性密度为 (11 670 ± 70) OD/mm<sup>2</sup>,与 db/m 小鼠 (164 ± 13) OD/mm<sup>2</sup> 相比下降了 85.9% ( $P < 0.001$ );而 MMP-2 活性在 db/

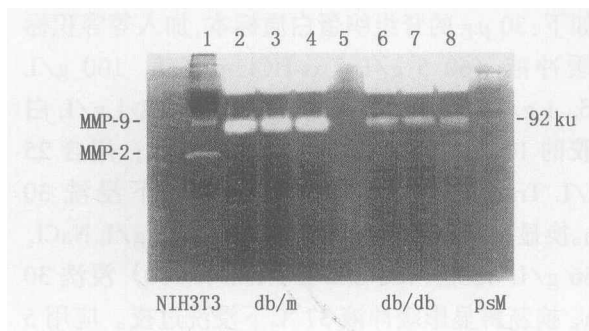


图 1 白明胶酶谱法方法检测 MMP2、MMP9 活性

Fig. 1 MMP9-2 and MMP-9 activities analyzed by gelatin zymography

Lane 1: MMPs activity in NIH3T3 cell culture media; Lane 2 ~ 4: MMPs activity in db/m mice kidney; Lane 5 ~ 7: MMPs activity in db/db mice kidney; Lane 8: marker

m 小鼠肾脏和 db/db 小鼠肾脏均检测不到。

### 3 讨论

MMPs 是一个依赖金属离子的蛋白酶大家族。每一种 MMP 具有其特异的分解底物,根据它们主要酶解的底物不同, MMPs 又可粗略地划分为间质胶原酶, stromelysin, 膜型 MMPs, 白明胶酶 (MMP-2、MMP-9) 等。将所有的 MMP 加在一起,可分解几乎所有组成细胞外基质的成分<sup>[6]</sup>。

MMP-2 和 MMP-9 同属白明胶酶, 可降解如胶原 4、5、7、10 白明胶、纤维连接蛋白和层黏蛋白等多种细胞外基质成分。许多研究发现,白明胶酶在糖尿病肾病的发病机制中扮演了重要的角色。在高糖条件下培养的肾小球系膜细胞合成细胞外基质增多,伴有 MMP-2 和 MMP-9 活性下降<sup>[7]</sup>。在体内实验中,链脲霉素 (streptozotocin) 诱导的糖尿病大鼠模型的肾也发现 MMP-2 表达下调<sup>[8]</sup>及 TIMP-2 表达的升高<sup>[9]</sup>。本实验中,db/db 糖尿病小鼠肾表达 MMP-2 和 MMP-9 蛋白质均较 db/m 对照组减少, MMP-9 的活性也明显较对照组下降。显示 MMP-2 和 MMP-9 的表达和活性的下降可能在 db/db 小鼠的肾脏病变中发挥重要作用。

本研究用白明胶酶谱法方法不能够检测到 db/db 鼠或 db/m 鼠肾脏有 MMP-2 活性,原因有待进一步研究。MMP-2 在 MMP 家族中是一个特例,一系列的蛋白酶(如纤维蛋白溶酶等)都不能激活它,其激活主要靠膜型 MMPs,特别是膜

型 1-MMP<sup>[10]</sup>。db/db 和 db/m 小鼠肾表达膜型 MMPs 尚未见报道,在本研究中 db/db 鼠或 db/m 鼠肾均检测不到 MMP-2 活性,是否与膜型 MMPs 表达状况有关尚待进一步观察。

TIMPs 通过与 MMPs 分子中血红素结合蛋白区域 (hemopexin domain) 结合而抑制 MMPs 的活性。TIMP-1 和 TIMP-2 虽然可抑制几乎所有种类 MMPs,但由于 TIMP-1 和 TIMP-2 可分别特异性抑制 MMP-9 可 MMP-2 前体,因而分别对抑制 MMP-9 和 MMP-2 的活性具有特异性<sup>[11]</sup>。在本实验中,db/db 糖尿病小鼠肾在 MMP-2 和 MMP-9 表达和活性下调的同时, TIMP-2 和 TIMP-1 蛋白质的表达均较 db/m 小鼠对照组明显升高。

MMPs 和 TIMPs 之间保持稳定的比例水平是维持正常细胞外基质的关键,一旦这种平衡遭到破坏,表现为 MMPs 表达和活性下降和/或 TIMPs 表达和活性升高,将造成细胞外基质聚积和肾小球硬化。综上所述, MMPs 和 TIMPs 的表达或活性的异常可能在 db/db 糖尿病小鼠的糖尿病肾病肾小球硬化的发生和发展中起重要作用。

#### 参考文献:

- [1] Kreisberg J I, Ayo S H. The glomerular mesangium in diabetes mellitus [J]. *Kid Int*, 1993, 43(1): 109.
- [2] McLennan S, Fisher E, Yue D K, *et al*. High glucose concentration causes a decreases in mesangium degradation [J]. *Diabetes*, 1994, 43(8): 1041.
- [3] McLennan S, Yue D K, Turtle J R. Effect of glucose on matrix metalloproteinase activity in mesangial cells[J]. *Nephron*, 1998, 79(3): 293.
- [4] Piedagnel R, Murphy G, Ronco P M, *et al*. Matrix metalloproteinase 2(MMP-2) and MMP-9 are produced by kidney collecting duct principal cells but are differentially regulated by SV40 large-T, arginine vasopressin, and epidermal growth factor[J]. *J Bio Chem*, 1999, 274(3): 1614.
- [5] Elliot S J, Striker L J, Stetler-Stevenson W G, *et al*. Pentosan polysulfate decreases proliferation and net extracellular matrix production in mouse mesangial cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10(1): 62.
- [6] Lenz O, Elliot S J, Stetler-Stevenson W G. Matrix metalloproteinases in renal development and disease[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(3): 574.

(下转第 153 页 to page 153)

3 个月常规采外周血检测 PP65 抗原, 阳性 362 例 (均使用丙氧鸟苷预防治疗), 其中 42 例 (12%) 发展成巨细胞病毒肺炎伴急性呼吸窘迫综合征, 提示肾移植术后巨细胞病毒肺炎伴急性呼吸窘迫综合征发病率不低。

经作者多年观察, 巨细胞病毒肺炎伴急性呼吸窘迫综合征治疗不满意, 关键是术后应用免疫抑制剂致免疫力低下。本文中 74% 的巨细胞病毒肺炎患者白细胞分类中淋巴细胞低, 仅为 5% ~ 10%, 提示机体免疫功能低下。本组 26 例因巨细胞病毒肺炎死亡的患者中, 20 例肾功能正常或接近正常, 提示在严重巨细胞病毒肺炎肾移植患者中短期停用免疫抑制剂并不增加急性排斥发生率。

抗病毒治疗是治疗巨细胞病毒肺炎的重要手段, 但抗巨细胞病毒药物治疗只能抑制巨细胞病毒在体内复制, 体内巨细胞病毒消失仍依赖机体免疫功能恢复, 尤其细胞免疫功能恢复才能实现。本文 42 例患者总存活率为 38% (16/42), 给予胸腺肽治疗的 12 例患者 10 例存活 (83%), 没有接受胸腺肽治疗的 30 例患者 6 例存活 (20%), 提示巨细胞病毒肺炎伴急性呼吸窘迫综合征患者单纯给予停用或减少主要免疫抑制剂、抗病毒治疗效果欠佳, 免疫增强剂胸腺肽可能改善其预后。12 例胸腺肽治疗的患者中, 1 例发生急性排斥反应, 提示应严密监测接受胸腺肽治疗患者的肾功能。胸腺肽可促进 T 细胞的成熟, 增强细胞毒 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞的活性, 促使 T 细胞分泌合成各种细胞因子如  $\alpha$ -干扰素、 $\gamma$ -干扰素、白细胞介素 2 等, 增加白细胞介素 2 与其受体的亲和力, 从而提高机体的免疫

功能, 增强杀灭病毒的能力, 抑制和减少病毒的复制和增殖。

对于巨细胞病毒肺炎并急性呼吸窘迫综合征的肾移植患者及早行辅助呼吸改善缺氧状态, 是保持生命体征稳定的重要措施; 全静脉营养及丙种球蛋白对病情恢复, 提高抗病力, 预防其他细菌感染也是重要的; 同时, 需积极治疗细菌、真菌感染等合并症。

#### 参考文献:

- [1] Bilgin N, Karakayashi H, Moray G, *et al.* Incidence of cytomegalovirus infection in kidney recipients[J]. *Transplant Proc*, 1996, 28(4): 2314.
- [2] Farrugia E, Schwab T R. Management and prevention of cytomegalovirus disease infection after renal transplantation [J]. *Mayo Clinic Proc*, 1992, 67(9): 879.
- [3] 郑克立, 吴培根, 朱兰英, 等. 尸体肾移植术后活动性 HCMV 感染的预防性治疗[J]. *中山医科大学学报*, 1999, 20(4): 248.
- [4] 郑克立, 吴培根, 朱兰英, 等. 尸肾移植术后 HCMV 病的防治[J]. *中华泌尿外科杂志*, 1999, 20 (8): 483.
- [5] 陈灏珠. 内科学[M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 53 ~ 55.
- [6] Morris D J. Opportunites for diagnosing cytomegalovirus in pulmonary infections[J]. *Thorax*, 1995, 50(1): 3.
- [7] Von - Willebrand E, Pettersson E, Ahoner J, *et al.* CMV infection, Class II Antigen expressin, and human kidney allograft rejection[J]. *Transplantation*, 1986, 42(4): 364.

(编辑 黄小廷)

(上接第 142 页 from page 142)

- [7] Anderson S S, Wu K, Nagase H, *et al.* Effect of matrix glycation on expression of type IV collagen, MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 by human mesangial cells[J]. *Cell Adhes Commun*, 1996, 4(2): 89.
- [8] Reckelhoff J F, Tygart V L, Mitias M M, *et al.* STZ-induced diabetes results in decreased activity of glomerular cathepsin and metalloproteinase in rats[J]. *Diabetes*, 1993, 42(10): 1425.
- [9] 宛霞, 黄湖辉, 李劲高. 氯沙坦对糖尿病大鼠肾组织 TIMP-2 mRNA 表达的影响. *中山医科大学学报*, 2002, 23(3): 190.
- [10] Sato H, Takino T, Kinoshita T, *et al.* Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase[J]. *FEBS Lett*, 1996, 385(3): 238.
- [11] Murphy G, Stanton H, Cowell S, *et al.* Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation[J]. *APMIS*, 1999, 107(1): 38.

(编辑 黄小廷)