

静脉注射核因子NF-E2相关因子表达质粒 减轻糖尿病小鼠肾小球氧化应激损伤的实验研究

李航^{1,3} 曹延萍² 冯红⁴ 任韞卓³ 刘青娟³ 刘荣惠⁵ 张连珊^{3*}

(¹河北医科大学组织学与胚胎学教研室, 石家庄 050017; ²河北省中医院病理科, 石家庄 050017; ³河北医科大学病理教研室, 石家庄 050017; ⁴石家庄市第二医院肾内科, 石家庄 050000; ⁵石家庄市中心医院肾内科, 石家庄 050011)

摘要 该实验旨在研究经小鼠尾静脉快速注射核因子NF-E2相关因子(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)表达质粒对链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病小鼠肾小球氧化应激损伤的保护作用。采用腹腔注射STZ诱发糖尿病小鼠模型, 自成模后第3天开始, 尾静脉快速注射pcDNA3/mNrf2质粒。4周后收取标本, 检测动物肾小球丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量, 纤维连接蛋白(fibronectin, FN)以及Nrf2、 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -glutamylcysteine synthetase, γ -GCS)在肾小球的表达。实验结果表明, 尾静脉注射可以将Nrf2表达质粒转染入小鼠肾小球。此方法可以降低糖尿病小鼠肾小球MDA浓度, 减轻FN在肾小球的表达, 增加Nrf2在肾小球细胞核的积聚以及 γ -GCS的转录和表达。该研究证明, 应用尾静脉注射Nrf2表达质粒的方法可以减轻糖尿病小鼠肾小球氧化应激损伤, 减少细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积, 其机制部分是通过激活Nrf2-ARE信号通路而实现的。

关键词 静脉注射; 糖尿病肾病; 氧化应激; Nrf2; γ -GCS

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病常见的微血管并发症, 也是糖尿病致死、致残的重要原因。DN早期病理特征是肾小球肥大、基底膜增厚和系膜扩张, 晚期则表现为肾小球硬化和间质纤维化。其中, 细胞外基质(ECM)过度积聚是其共同的病理生理基础。研究表明, 氧化应激(oxidative stress)在DN发病中起重要作用, 高糖状态下产生过多的活性氧(reactive oxygen species, ROS)不但激活了几乎所有已知的与糖尿病微血管并发症发生发展有关的信号传导通路, 如PKC通路、多元醇通路、氨基己糖通路及AGEs形成, 还可激活NF- κ B上调黏附分子及炎症因子的基因转录, 这是糖尿病微血管并发症发病的共同机制^[1]。以上异常情况的长期存在使肾小球系膜基质及基底膜合成增加、降解减少, 导致DN的发生发展^[2]。

机体在应对自由基损害时形成了一套复杂的氧化应激应答系统, 当暴露于活性氧时, 机体自身能诱导出一系列保护性蛋白, 以缓解细胞所受的伤害^[3]。这一协调反应是由这些保护性基因上游调节区的抗氧化反应元件(antioxidant responsive element, ARE)来调控的^[4]。近年来的研究发现, Nrf2是ARE的激活因子, Nrf2-ARE通路是迄今为止发现的最为重要的

内源性抗氧化应激通路^[5]。

静脉快速注射质粒方法是一种体内基因转染新方法, 该方法是将纯化的质粒溶于较大体积的缓冲液中, 然后经静脉快速注入体内, 利用液体产生巨大的压力, 通过静脉反流入肝、肾等组织, 使质粒在与血流混合被降解之前就导入到组织中, 所以此方法也叫液压转基因技术。许多学者用该方法在肝脏成功地实施基因转染^[6-8], 但将此方法用于肾脏的基因转染报道较少。

本研究建立I型糖尿病小鼠模型, 以尾静脉快速注射方法将Nrf2表达质粒转染入小鼠体内, 在模型建立4周后收集标本, 以筛网法分离肾小球, 观察此方法在小鼠肾小球组织的转染效率以及对肾小球氧化应激损伤的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与药物

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ): Sigma公司; 兔

收稿日期: 2011-01-04 接受日期: 2011-03-01

河北省自然科学基金石药集团医药联合研究基金(No.C2011206171)和河北省自然科学基金(No.C2010000477)资助项目

*通讯作者。Tel: 0311-86265734, E-mail: 13230472127@163.com

抗鼠Nrf2多克隆抗体: Abcam公司; 兔抗鼠 γ -GCS多克隆抗体、兔抗鼠FN多克隆抗体、兔抗鼠Histon-H1多克隆抗体: Santa Cruz公司; 核蛋白及胞浆蛋白提取试剂盒: 南京凯基生物工程有限公司; MDA测定试剂盒: 南京建成生物工程有限公司; RT-PCR试剂盒: Promega公司; 免疫组化试剂盒: 北京中杉金桥生物有限公司; 无内毒素质粒大提试剂盒: 天根公司; 质粒注射溶剂: Mirus Bio公司。pcDNA3/mNrf2(野生型): Dr. Ken Itoh (Hirosaki University, Japan)惠赠; pcDNA3: 本室冻存。PCR引物: Promega公司。

1.2 质粒制备

分别转化pcDNA3空质粒和pcDNA3/mNrf2质粒, 按照质粒大提试剂盒步骤提取大量质粒, 吸取1 μ L抽提的DNA在Nanodrop1000上测定DNA浓度和纯度, 以Nuclease free water做空白对照, 若提取质粒 D_{260}/D_{280} 在1.80~2.00之间, 视为合格质粒, -20°C 冰箱保存备用。

1.3 动物模型及分组

选取体重为20~25 g的雄性CD-1小鼠(购自北京维通利华实验动物技术公司, 合格证编号: 0126327)。将小鼠随机分为四组: 溶剂对照组(C组); 糖尿病组(DM组); 糖尿病+pcDNA3空质粒注射组(DM+V组); 糖尿病+pcDNA3/mNrf2质粒注射组(DM+N组)。糖尿病动物模型小鼠按130 mg/kg腹腔注射STZ(溶于0.1 mol/L枸橼酸缓冲液中, pH4.5), 72 h后尾尖取血测定血糖, 留尿测尿糖。以血糖 ≥ 16.7 mol/L、尿糖(+++)~(++++)作为DM模型成功的标志。C组注射等体积枸橼酸缓冲液。DM+V组与DM+N组小鼠从成模后第3天开始, 分别给予尾静脉快速注射pcDNA3质粒或pcDNA3/mNrf2质粒(1 mg/kg, 溶于2 mL注射溶剂中), 此后每周注射2次。实验期间动物自由进食、饮水, 不使用胰岛素及其他降糖药物。

1.4 标本收集

各组于注射STZ或枸橼酸缓冲液后4周后各取6只小鼠, 称重后分别用代谢笼收集24 h尿; 切取肾脏, 置冰台上去掉被膜, 滤纸吸干血迹后称重; 取部分肾皮质置于4%多聚甲醛(0.01 mol/L PBS配制)用于光镜观察及免疫组化检测; 其余肾皮质先后通过100、75、50、36目不锈钢筛网, 收集50目筛网上物质, 光镜下观察, 96%为肾小球, 证明分离的为肾小球组织^[9]。取部分肾小球组织提取总蛋白及核蛋白, 用于Western blot检测; 部分肾小球匀浆测定MDA浓度; 部分肾小球组织提取总RNA, 用于反转录-多聚酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)。以上组织标本 -80°C 保存备用。

1.5 尿白蛋白检测

西门子IMMULIPE1000全自动免疫发光分析仪检测尿白蛋白浓度。

1.6 MDA浓度的检测

10%肾组织匀浆50 μ L, 根据试剂盒说明书, 采用硫代巴比妥酸法测定MDA的含量^[10], 考马斯亮蓝法进行蛋白定量。MDA浓度以nmol/mg_{prot}表示。

1.7 免疫组化染色

切片厚4 μ m, 常规脱蜡入水, 方法为SP法。一抗为兔抗鼠FN多克隆抗体(1:100稀释)、兔抗鼠Nrf2(1:50稀释)、兔抗 γ -GCS(1:50稀释)多克隆抗体, 二抗为生物素标记山羊抗兔IgG, 以PBS代替一抗作阴性对照, DAB显色, 光镜观察阳性信号。

肾小球FN免疫组化染色半定量评分: 每组镜下观察6例切片, 每张切片观察25个大小相近的肾小球, 根据下述计分标准^[11], 确定每个肾小球免疫组化阳性积分值, 用中位数代表每张切片的平均积分值。

0级: 肾小球内无着色, 计分为0;

1级: 肾小球内呈略淡棕色或散在的点状/丝状着色, 小于肾小球总面积的25%, 计分为1;

2级: 肾小球内呈节段性团块状/线状棕色, 小于肾小球总面积的50%, 计分为2;

3级: 肾小球内呈广泛深棕色, 小于肾小球总面积的75%, 计分为3;

4级: 肾小球呈强而深棕色, 小于肾小球总面积的75%, 计分为4。

1.8 Western blot分析

分离各组小鼠的肾小球组织, 加入RIPA裂解缓冲液(SDS, Triton X-100, 5-去氧胆酸钠, 100 mg/L苯甲基磺酰氟等), 冰浴1 h, 4°C 、14 000 r/min离心, 取上清为组织总蛋白; 严格按照凯基生物核蛋白提取试剂盒说明书提取肾小球核蛋白, 以Histon-H1检测核蛋白纯度。考马斯亮蓝法进行蛋白定量。总蛋白上样量为100 μ g, 核蛋白上样量为60 μ g, 8%十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至PVDF膜; 5%脱脂奶粉封闭PVDF膜5 h, 加入用5%脱脂奶粉稀释的兔抗鼠Nrf2(1:500)、 γ -GCS(1:200)多克隆抗体及标准内参 β -actin(1:1 000)、Histon H1(1:1 000), 4°C 过夜。再度洗膜后加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体(1:5 000稀释), 37°C 孵育2 h; 洗膜后加ECL试剂, 然后将PVDF膜放入X光片暗盒,

压片, 显影, 定影。用Image J软件对Western条带进行定量分析, 读取积分光密度值(IOD), 目的蛋白条带的IOD值除以内参条带的IOD值作为最终结果进行统计分析。

1.9 RT-PCR检测

Trizol试剂提取小鼠肾小球总RNA。在逆转录酶(MLV)催化下合成cDNA, 反应条件: 42 °C, 45 min → 95 °C, 5 min → 4 °C 2 h, -20 °C保存。以cDNA为模板在TaqDNA聚合酶催化下进行PCR扩增。Nrf2引物(5'-3')上游: CAC ATT CCC AAA CAA GAT GC; 下游: TCT TTT TCC AGC GAG GAG AT, 扩增片段长度为374 bp; γ -GCS引物(5'-3')上游: TTA CCG A GG CTA CGT GTC AG; 下游: CAA AAA GGG TGA GTG GGT CT, 扩增片段长度为296 bp; 18S rRNA引物(5'-3')上游: ACA CGG ACA GGA TTG ACA GA; 下游: GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA, 扩增片段长度为238 bp。

扩增条件为: 预变性, 95 °C, 5 min; 进入循环, 94 °C, 1 min → 退火55 °C, 1 min → 72 °C, 1 min, 32个循环后, 72 °C终末延伸8 min。将PCR产物在2%琼脂糖凝胶中进行电泳, 然后置于凝胶图像分析系统(UVP公司, 美国)进行吸光度扫描, 以18S rRNA作为内参照校正, 用目的基因的吸光度与18S rRNA吸光度的比值代表目的基因的相对表达含量。

1.10 统计学处理

采用SPSS13.0统计软件对数据进行单因素方差分析, 数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)示, $P < 0.05$ 有统计学意义。

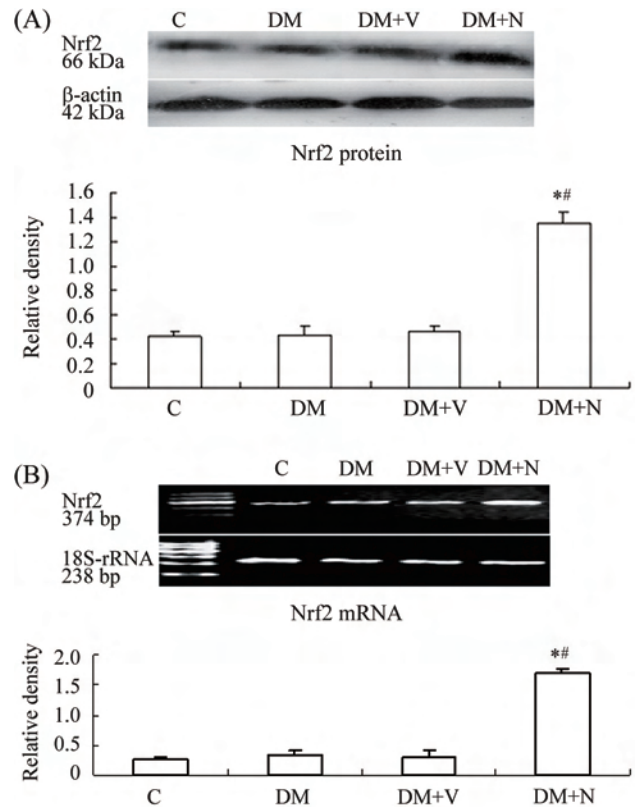
2 结果

2.1 小鼠肾小球转染效率的测定

Western blot及RT-PCR对肾小球Nrf2表达的检测均表明, DM+N组Nrf2在蛋白及mRNA水平均远高于DM组和DM+V组, 而DM和DM+V组Nrf2表达与C组无显著性差异。此结果说明应用液压转基因技术可以经小鼠尾静脉将Nrf2表达质粒转染入肾小球(图1A、图1B)。

2.2 肾小球匀浆MDA含量测定结果

MDA是细胞内脂质过氧化作用的产物之一, 它的产生还能加剧膜的损伤。因此, MDA产生数量的多少能够代表脂质氧化损伤的程度。实验结果表明, 与C组相比, DM和DM+V组肾小球匀浆MDA浓度明显增高, DM+N组MDA浓度明显低于DM组和DM+V组, 说明应用液压转基因技术经小鼠尾静脉将Nrf2表达质粒转染入肾小球可以减轻肾小球的脂

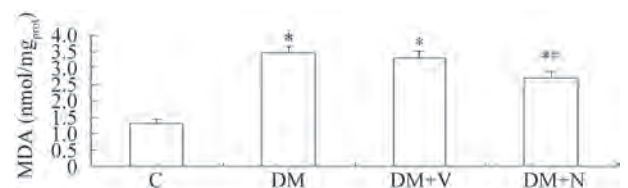


各组小鼠肾小球Nrf2表达采用检测Western blot及RT-PCR方法进行检测, 并进行半定量分析。数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。A: Western blot法检测Nrf2蛋白的表达; B: RT-PCR法检测Nrf2 mRNA的表达; 与对照组比较, $*P < 0.05$; 与糖尿病组比较, $^{#}P < 0.05$ 。

The relative levels of Nrf2 proteins to β -actin and mRNA transcripts to 18S rRNA in the glomeruli of individual mice were characterized by Western blot assays and RT-PCR, and quantitatively analyzed by densitometry scanning. Data shown are $\bar{x} \pm s$ of each group ($n=6$ per group) from five independent experiments. A: Western blot analysis of Nrf2 protein expression at 4 weeks post treatment; B: RT-PCR analysis at 4 weeks post treatment; $*P < 0.05$ vs C group; $^{#}P < 0.05$ vs DM group.

图1 各组小鼠肾小球Nrf2的表达

Fig.1 Expression of Nrf2 in glomeruli of different groups



硫代巴比妥法检测各组小鼠肾小球MDA含量。与对照组比较, $*P < 0.05$; 与糖尿病组比较, $^{#}P < 0.05$ 。

The concentrations of glomerular MDA in individual mice determined by ethiobarbituric acid (TBA) method, $*P < 0.05$ vs C group; $^{#}P < 0.05$ vs DM group.

图2 各组小鼠肾小球MDA含量分析

Fig.2 MDA concentration in glomeruli of different groups

质过氧化损伤, 增强组织的抗氧化损伤能力(图2)。

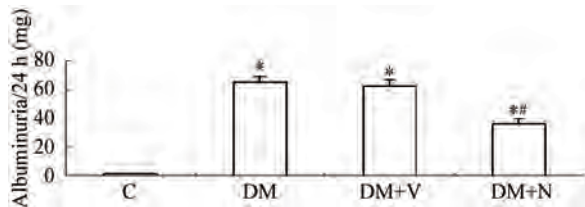
2.3 24 h尿白蛋白定量检测

与C组相比, DM和DM+V组24 h尿白蛋白总量明显升高, DM+N组能明显减轻由STZ诱导的尿白蛋

白渗出(图3)。

2.4 FN在肾小球中的表达及定量检测

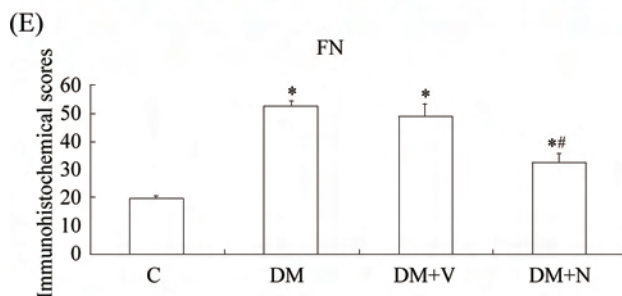
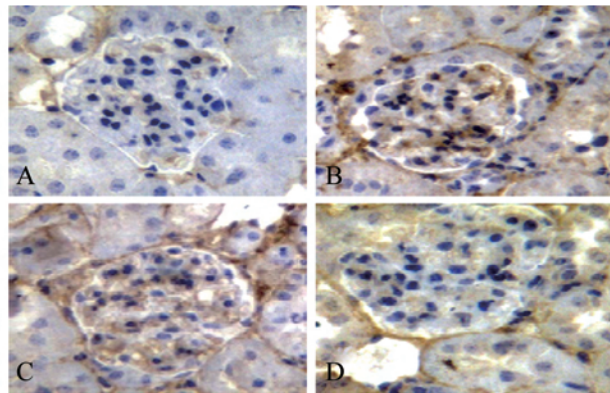
C组FN于肾小球系膜区、毛细血管基膜、肾小囊壁和肾小管基底膜有少量表达; 在DM组, FN在这些部位的表达明显增加, DM+N组上述明显增加的表达受到显著抑制。DM组和DM+V组FN表达无



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与糖尿病组比较, # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs C group; # $P < 0.05$ vs DM group.

图3 各组小鼠24小时尿蛋白定量分析
Fig.3 Albumin/24 h of different groups

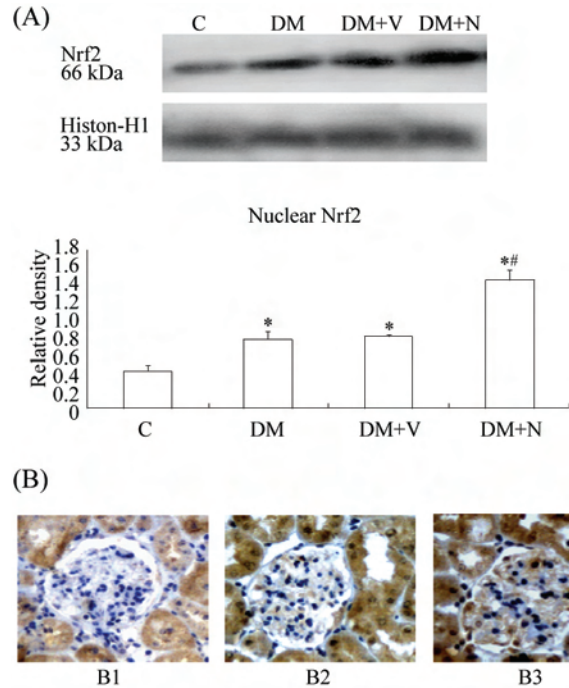


各组小鼠肾小球FN的表达采用免疫组化检测并进行半定量分析。A: 对照组(C组); B: 糖尿病组(DM组); C: 糖尿病+pcDNA3空质粒注射组(DM+V组); D: 糖尿病+pcDNA3/mNrf2质粒注射组(DM+N组); E: 肾小球FN免疫组化染色半定量评分。数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与糖尿病组比较, # $P < 0.05$; 放大倍数 $\times 400$ 。

The levels of FN expression in the glomeruli of different groups were analyzed by immunohistochemistry assay. Data shown are representative images of each group ($n=6$ per group) from three separate experiments (magnification $\times 400$). A: C group; B: DM group; C: DM+V group; D: DM+N group; E: semi-quantitative analysis of FN expression. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ of each group. * $P < 0.05$ vs control mice; # $P < 0.05$ vs diabetic mice.

图4 免疫组织化学法对FN在各组肾小球的表达检测

Fig.4 Immunohistochemical analysis of the expression of FN in the glomeruli



A: 各组小鼠Nrf2蛋白在肾小球细胞核的表达采用检测Western blot方法进行, 并进行半定量分析。数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与糖尿病组比较, # $P < 0.05$; B: 免疫组化检测各组小鼠肾小球Nrf2的表达。B1: 对照组(C组); B2: 糖尿病组(DM组); B3: 糖尿病+pcDNA3/mNrf2质粒注射组(DM+N组)。

A: the relative levels of Nrf2 proteins to Histone-H1 characterized by Western blot assays and semi-quantitatively analyzed by densitometry scanning. Data shown are $\bar{x} \pm s$ of each group ($n=6$ per group) from five independent experiments; * $P < 0.05$ vs C group; # $P < 0.05$ vs DM group; B: immunohistochemistry assay of Nrf2 expression in the glomeruli of different groups. B1: C group; B2: DM group; B3: DM+N group.

图5 Nrf2蛋白在各组肾小球细胞核的表达

Fig.5 Expression of Nrf2 in glomerular nuclear of different groups

明显差异(图4)。

2.5 Nrf2蛋白在各组肾小球细胞核的表达

Western blot结果显示, DM组肾小球Nrf2核蛋白表达明显高于C组; DM+N组肾小球Nrf2核蛋白表达明显高于DM组; DM组和DM+V组肾小球Nrf2核蛋白表达无明显差异(图5A); 免疫组化结果支持Western blot结果, Nrf2蛋白的阳性表达定位于肾小球固有细胞的胞浆和胞核, 呈棕黄色颗粒。在C组肾小球细胞胞浆及胞核内可见少量基础表达(图5B-1), 与C组相比, DM组Nrf2蛋白表达在细胞浆和细胞核明显增强(图5B-2), 而DM+N组肾小球Nrf2蛋白在细胞浆和细胞核表达较DM组明显增强(图5B-3)。DM组和DM+V组肾小球Nrf2蛋白表达在细胞核和细胞浆均无明显差异(图片未显示)。

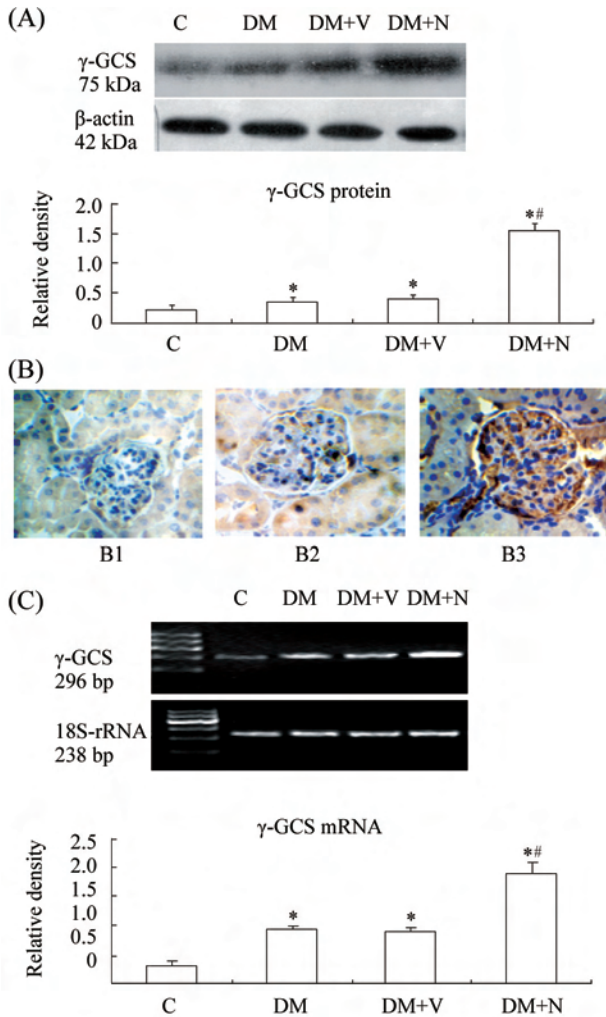
2.6 γ -GCS 在各组肾小球的表达

Western blot结果显示, DM组肾小球匀浆 γ -GCS

蛋白表达明显高于C组; DM+N组肾小球 γ -GCS蛋白表达明显高于DM组(图6A); γ -GCS免疫组化结果支持Western blot结果, γ -GCS蛋白的阳性表达定位于肾小球固有细胞的胞浆, 呈棕黄色颗粒。在C组肾小球细胞胞浆内可见少量基础表达(图6B-1), 与C组相比, DM组 γ -GCS蛋白表达明显增强(图6B-2), 而

DM+N组肾小球 γ -GCS蛋白表达较DM组明显增强(图6B-3)。DM组和DM+V组肾小球Nrf2蛋白表达无明显差异(图片未显示)。

γ -GCS mRNA在各组肾小球的表达与其蛋白表达趋势基本一致(图6C); DM组和DM+V组 γ -GCS表达在蛋白和mRNA水平无明显差异。



各组小鼠肾小球 γ -GCS表达采用检测Western blot及RT-PCR方法进行, 并进行半定量分析。数据均以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。A: Western blot法检测 γ -GCS蛋白的表达; B: 免疫组化检测各组小鼠肾小球 γ -GCS的表达。B1: 对照组(C组); B2: 糖尿病组(DM组); B3: 糖尿病+pcDNA3/mNrf2质粒注射组(DM+N组); C: RT-PCR法检测 γ -GCS mRNA的表达。与对照组比较, * $P<0.05$; 与糖尿病组比较, # $P<0.05$ 。

The relative levels of γ -GCS proteins to β -actin (A) and mRNA transcripts to 18S rRNA (C) in the glomeruli of individual mice were characterized by Western blot assays and RT-PCR and semi-quantitatively analyzed by densitometry scanning. Data shown are $\bar{x}\pm s$ of each group ($n=6$ per group) from five independent experiments. * $P<0.05$ vs C group; # $P<0.05$ vs DM group; B: immunohistochemistry assay of γ -GCS expression in the glomeruli of different groups. B1: C group; B2: DM group; B3: DM+N group.

图6 γ -GCS在各组肾小球的表达

Fig.6 Expression of γ -GCS in glomeruli of different groups

3 讨论

液压转基因技术的具体原理还不是很明确,目前的普遍观点认为,在短时间内将大体积的液体(体重的10%)注射到小鼠体内,可以引起小鼠血流动力学改变,使大量血液自下腔静脉进入靶器官,增加肝肾等器官摄取质粒的机会^[6]。肝脏是摄取外来基因最活跃的器官,我们实验室前期的研究结果表明,利用整体转染试剂,尾静脉注射质粒能够使外源基因SOCS-1在肾脏较长时间表达^[12]。为了增加目的基因在小鼠肾脏的表达,我们采取了每周2次,连续注射4周的方法。我们的研究结果表明,此方法可使Nrf2在肾小球内保持较高水平的表达。

近年来,越来越多的研究证明,氧化应激是糖尿病急慢性并发症的重要发病机制之一^[1]。糖尿病肾脏易受氧化应激攻击,导致肾组织细胞破损,基质重构,组织纤维化和信号通路的异常,促进糖尿病肾病的发生发展。丙二醛(MDA)是评价机体氧化应激最常用的指标。机体内过多的活性氧能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用,并因此形成脂质过氧化物如MDA,因此测试MDA的含量能够代表脂质氧化损伤的程度,也可间接反映组织的抗氧化能力的强弱^[13]。本实验DM+N组肾小球组织匀浆MDA浓度明显低于DM组及DM+V组,说明Nrf2质粒转染能够明显减轻糖尿病小鼠肾小球的氧化应激损伤,增强机体抗氧化应激能力。

细胞外基质在肾小球过度沉积是糖尿病肾病的特征之一,其沉积数量取决于其合成与降解的平衡。已证实,ROS可以通过激活血管紧张素II-TGF- β 1-Smad信号途径诱导系膜细胞分泌过量的TGF- β 1,促进ECM的沉积,减少ECM降解^[14]。作为细胞外基质的成分之一,本实验以FN在肾小球的表达水平来衡量细胞外基质的沉积水平。FN免疫组化半定量结果和24 h尿白蛋白定量均表明: Nrf2质粒转染可以减少糖尿病小鼠肾小球ECM的沉积,减轻尿白蛋白分泌,保护肾脏功能。

为了进一步研究Nrf2质粒转染保护糖尿病小鼠肾脏免受氧化应激损伤的机制,我们检测了Nrf2以及其下游抗氧化蛋白 γ -GCS在肾小球的表达。通常认为,Nrf2-ARE信号通路是这样被激活的:在正常情况下,Nrf2定位于细胞质中,与细胞质中抑制蛋白Keap1结合且通过泛素蛋白酶体途径迅速降解;当受到来源于ROS信号攻击后,Nrf2从Keap1中解离,然后转位进入细胞核,与靶基因中的ARE序列结合,启动下游抗氧化蛋白的转录、提高细胞抗氧化应激的能力^[15]。所以说,Nrf2进入细胞核是Nrf2-ARE信号通路激活并发挥转录活性的关键步骤。Nrf2-ARE通路之所以重要是因为其激活后能够启动下游多种保护性基因的表达。到目前为止,已证实经Nrf2-ARE信号路径调节的可编码内源性保护基因超过200个^[16-17]。 γ -GCS就是受其转录调节的靶基因之一。 γ -GCS是体内还原型谷胱甘肽(GSH)合成的限速酶,增加 γ -GCS的含量和活性,可以促进GSH的合成,增强组织细胞抗氧化应激的能力。我们的研究结果表明,糖尿病状态下可以激活机体内源性抗氧化应激蛋白Nrf2在肾小球细胞核的表达进而增加其下游抗氧化基因 γ -GCS的表达,此结果与Jiang等^[18]的研究结果相同。而在Nrf2质粒注射组,伴随着Nrf2在肾小球细胞核表达的进一步增加, γ -GCS在mRNA和蛋白水平的表达也较糖尿病组显著增加,增强了肾小球抗氧化应激能力,减轻了肾小球氧化应激损伤。

我们的研究结果表明,利用液压转基因技术经尾静脉注射可以将Nrf2表达质粒转染入小鼠肾小球。此方法可以减轻糖尿病小鼠肾小球的脂质过氧化损伤及细胞外基质的沉积,其机制可能是通过激活Nrf2-ARE信号通路启动抗氧化蛋白 γ -GCS的转录和表达而实现的。此结果为体内转基因治疗糖尿病提供了有力的实验依据。但是在实验中我们也观察到,在短时间内快速注射达小鼠体重10%的质粒和注射溶剂,容易引起小鼠突发心衰而致死亡。如何更加安全地应用此方法,在临床上如何将质粒有效地转染入人体,将是我们下一步的研究内容。

参考文献(References)

- 1 Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414(6865): 813-20.
- 2 Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care* 2003; 26(5): 1589-96.
- 3 Talalay P, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD. Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis. *Adv Enzyme Regul* 2003; 43: 121-34.
- 4 Friling RS, Bensimon S, Tichauer Y, Daniel V. Xenobiotic-inducible expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(16): 6258-62.
- 5 Koh K, Cha Y, Kim S. tBHQ inhibits LPS-induced microglial activation via Nrf2-mediated suppression of p38 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 380(3): 449-53.
- 6 Rossmann W, Chabicovsky M, Herkner K, Schulte-Hermann R. Cellular gene dose and kinetics of gene expression in mouse livers transfected by high-volume tail-vein injection of naked DNA. *DNA Cell Biol* 2002; 21(11): 847-53.
- 7 Tsuyama Y, Kitajima M, Miyano-Kurosaki N, Takaku H. Anti-tumor effects of naked plasmid DNA using a hydrodynamics-based procedure. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 2004; 48: 239-40.
- 8 Yeikilis R, Gal S, Kopeiko N, Paizi M, Pines M, Braet F, *et al.* Hydrodynamics based transfection in normal and fibrotic rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12(38): 6149-55.
- 9 Johnson RJ, Garcia RL, Pritzl P, Alpers CE. Platelets mediate glomerular cell proliferation in immune complex nephritis induced by anti-mesangial cell antibodies in the rat. *Am J Pathol* 1990; 136(2): 369-74.
- 10 Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9(6): 515-40.
- 11 Chen HC, Guh JY, Lai YH. Alterations of glomerular and extracellular glutathione peroxidase levels in patients and rats with focal segmental glomerulosclerosis. *J Lab Clin Med* 2001; 137(4): 279-83.
- 12 Shi Y, Du C, Zhang Y, Ren Y, Hao J, Zhao S, *et al.* Suppressor of cytokine signaling-1 ameliorates expression of MCP-1 in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 2010; 31(5): 380-8.
- 13 Yamazaki T, Tanimoto M, Gohda T, Ohara I, Hagiwara S, Murakoshi M, *et al.* Combination effects of enalapril and losartan on lipid peroxidation in the kidneys of KK-Ay/Ta mice. *Nephron Exp Nephrol* 2009; 113(2): 66-76.
- 14 Rhyu DY, Yang Y, Ha H, Lee GT, Song JS, Uh ST, *et al.* Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(3): 667-75.
- 15 Luo Y, Egler AL, Liu D, Liu G, Mesecar AD, van Breemen RB. Sites of alkylation of human Keap1 by natural chemoprevention agents. *J Am Soc Mass Spectrom* 2007; 18(12): 2226-32.
- 16 Kim SK, Yang JW, Kim MR, Roh SH, Kim HG, Lee KY, *et al.* Increased expression of Nrf2-ARE-dependent anti-oxidant proteins in tamoxifen resistant breast cancer cells. *Free Radic Biol Med* 2008; 45(4): 537-46.

17 辛 爱, 唐修文. Nrf2-ARE信号通路与肿瘤发生及耐药性的关系. 细胞生物学杂志 2009; 30(3): 319-24.

18 Jiang T, Huang Z, Lin Y, Zhang Z, Fang D, Zhang DD. The protective role of Nrf2 in streptozotocin-induced diabetic nephropathy.

Intravenous Injection of Nrf2 Plasmid Attenuates Glomerular ROS Injury of Diabetic Mice

Li Hang^{1,3}, Cao Yanping², Feng Hong⁴, Ren Yunzhuo³, Liu Qingjuan³, Liu Ronghui⁵, Zhang Lianshan^{3*}

(¹Department of Histology and Embryology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; ²Department of Pathology, Traditional medicine hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050017, China; ³Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; ⁴Department of Nephropathy, Shijiazhuang 2nd Hospital, Shijiazhuang 050000, China; ⁵Department of Nephropathy, Shijiazhuang Central Hospital, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract This study aimed at examining the effects of treatment with streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice by intravenous injection with Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) plasmid via mouse tail vein on diabetic nephropathy (DN) and the potential mechanisms underlying the action of Nrf2. Male CD-1 mice were randomly assigned to four groups: control group (group C); diabetes mellitus group (group DM); diabetes+pcDNA3 plasmid injection group (group DM+V); diabetes+pcDNA3/mNrf2 plasmid injection group (group DM+N). The model of DM was induced by single-dose intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). Mice of group DM+V and group DM+N were injected with a shot of pcDNA3 plasmid or pcDNA3/mNrf2 plasmid via mouse tail vein three days after model establishment, respectively. Four weeks later, malondialdehyde (MDA) contents, the expressions of fibronectin (FN), Nrf2, γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) in the glomeruli were detected. We found that Nrf2 could be up-expressed in renal glomeruli by intravenous injection with Nrf2 plasmid; intravenous injection with Nrf2 plasmid significantly reduced the levels of glomerular MDA concentration; mitigated the expression of FN, enhanced Nrf2 nuclear accumulation and target antioxidant gene γ -GCS expression in the glomeruli of diabetic mice. All these results indicated that intravenous injection with Nrf2 plasmid could attenuate the hyperglycaemia-induced glomerular oxidative stress injury and reduce the extracellular matrix (ECM) deposition in diabetic mice. It could be useful for the further gene therapy study of diabetes *in vivo*.

Key words intravenous injection; diabetic nephropathy; oxidative stress; Nrf2; γ -GCS

Received: January 4, 2011 Accepted: March 1, 2011

This work was supported by Hebei Provincial Natural Science Foundation of Chian Shijiazhuang Pharmaceutical Group Foundation (No. C2011206171) and Hebei Provincial Natural Science Foundation (No.C2010000477)

*Corresponding author. Tel: 86-311-86265734, E-mail: 13230472127@163.com