

糖尿病性高血压大鼠肾损害相关基因 cDNA 片段的克隆与初步鉴定

张芳林^{1)*} 李 果¹⁾ 叶传忠²⁾ 丁 伟¹⁾ 刘优萍¹⁾ 谢 超¹⁾ 张 迪¹⁾ 孙卫华¹⁾ 罗 敏¹⁾

(¹⁾上海第二医科大学附属瑞金医院, 上海市内分泌研究所, 上海 200025;

²⁾复旦大学附属中山医院泌尿外科, 上海 200032)

摘要 为筛选大鼠糖尿病性高血压病所致的肾损害相关基因, 自发性高血压大鼠以 STZ 50 mg/kg 一次性尾静脉注射, 建立糖尿病性高血压大鼠模型, 4 周后该模型大鼠尿蛋白持续阳性, 电镜观察到肾小球基质增生、足突融合或扁平。应用荧光标记的差异显示反转录聚合酶链反应 (DDRT-PCR) 及 RNA 印迹技术, 比较两种模型大鼠肾皮质的基因表达差异, 并进行差异条带的 cDNA 序列生物信息学分析。其中 4 个差异条带与 Genbank 数据库比较, 2 个为未知基因, 2 个为已知基因, 即成淀粉样糖蛋白 (amyloidogenic glycoprotein, AGG)、CDK109, 两者可能与糖尿病性高血压肾损害的发生相关, 对它们的进一步研究将为肾损害发病机理的发现提供思路。

关键词 差异显示, 糖尿病性高血压, 肾, 生物信息学

学科分类号 R58

继发于糖尿病和高血压所致的肾损害, 分别占肾功能衰竭常见病因的 34% 和 28%, 该比率还有上升趋势。其中不乏原发性高血压并发糖尿病的患者, 他们的肾损害往往更加严重, 这与高血压状态下高血糖更易诱导肾脏组织某些基因的表达差异有关。目前对糖尿病性高血压肾损害分子机理的相关研究报道较少。本研究采用荧光标记的差异显示反转录聚合酶链反应 (fluorescence-labelled differential display reverse transcription polymerase chain reaction, DDRT-PCR) 技术, 对自发性高血压及高血压合并糖尿病模型大鼠的肾皮质进行差异表达分析, 筛查疾病相关基因, 为肾损害发病机理的研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器设备: Genomix LRS 荧光差异显示分析系统 (Beckman) [含 GenomixLR 电泳仪, 61 cm 凝胶板, Genomix SC 扫描系统, 切胶工作台及定位刻度仪], 分光光度仪 (Beckman DU650), 9700 型 PCR 仪 (PE), 377 自动测序仪 (PE), Fluor-sTM multimager 凝胶图象分析仪 (Biorad), 杂交炉 (Robbins Scientific 2000)。

1.1.2 主要试剂及动物: HIEROGLYPHTM mRNA Profile Kit (Beckman): 用于反转录的 4 个 T7 (dT12) 锚定引物 (Anchored Primer, AP) 序列为:

5' ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTAC 3';
5' ACGACTCACATGGGCTTTTTTTTTTTTAG 3';
5' ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTAT 3';
5' ACGACTCATATAGGGCTTTTTTTTTTTTCT 3'.

4 个 M13r 随机引物 (arbitrary primer, ARP) 序列为 5' ACAATTTACACAGGATAAGACTAGC 3'; 5' ACAATTTACACAGGAGATCTCAGAC 3'; 5' ACAATTTACACAGGAACGCTAGTGT 3'; 5' ACAATTTACACAGGAGTACTAAGG 3'. fluoro DDRT-PCR Kit (Beckman 公司), 含与上述锚定引物相应的荧光标记序列。RNA 抽提试剂盒 (Qiagen 公司), RNA RT-PCR 试剂盒 (TakaRa 公司), 柱离心质粒微量回收试剂盒 (Qiagen 公司), 柱离心琼脂糖凝胶回收试剂盒 (Qiagen 公司), PMD18-T Vector (TaKaRa 公司), 感受态细菌 *E. coli* XL-1 blue, 荧光自动测序试剂盒 (PE 公司), PCR 产物纯化试剂盒 (Qiagen 公司), RNA 印迹辣根过氧化物酶 (HRP) 标记及检测试剂盒 (Pierce 公司), 正电荷尼龙膜 (Millipore), 清洁级 8 周龄雌性自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR) 由上海市高血压研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立与标本采集: SHR 随机分

* 通讯联系人。

Tel: 021-63050615, E-mail: zhang_fanglin@yahoo.com

收稿日期: 2001-08-13, 接受日期: 2001-09-12

为 SHR 组和 SHR-糖尿病 (diabetic mellitus, DM) 组 (每组分别为 6 只). 前者以 0.9% NaCl 1 ml 一次性尾静脉注射为对照组, 后者以链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 50 mg/kg 一次性尾静脉注射 (溶于 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液中, pH 4.5) 为实验组. 可观察到 SHR-DM 组 2 天后空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L, 确定模型建立, 尿蛋白 4 周后持续出现 (+~+++), 对照组空腹血糖 ≤ 10 mmol/L, 尿蛋白阴性. 实验第 6 周断头处死两组大鼠, 迅速分离肾皮质置液氮保存, 并留取 1 mm $\times$ 1 mm 组织块置 4℃ 预冷的戊二醛固定液备检.

1.2.2 肾皮质超微结构的观察: 经常规双固定、脱水、包埋、切片、铅铀双染色后透射电镜下观察肾小球超微结构改变.

1.2.3 样品总 RNA 的提取: 按试剂盒说明提取 RNA. 用紫外分光光度仪定量并进行 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性.

1.2.4 样品 RNA 的逆转录反应: 各组 RNA 样品以 T7 (dt12) AP 作为 3' 端引物, 进行逆转录反应, 反应体系 20 μ l: 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ l, 10 $\times$ PCR 缓冲液 2 μ l, 250 μ mol/L dNTP 2 μ l, RNase Inhibitor 0.5 μ l, 反转录酶 1 μ l, T7 (dt12) AP 各 4 μ l, 总 RNA 0.8 μ g. 反应条件如下: 42℃ 反应 5 min, 50℃ 反应 50 min, 70℃ 反应 15 min, 反应结束后 4℃ 保存.

1.2.5 DDRT-PCR 反应: 以 M13rARP 为随机引物, TMR-T7 (dt12) AP 为锚定引物, 对各组 cDNA 产物进行 DDRT-PCR. 反应体系如下: 10 $\times$ PCR 缓冲液 1.0 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ l, 250 mmol/L dNTPs 2.0 μ l, M13r-ARP 各 1.75 μ l, TMR-T7 (dt12) AP 各 0.7 μ l, 逆转录反应混合液 (RT mix) 1.0 μ l, EX Taq 酶 0.1 μ l. 条件如下:

95℃ 反应 2 min; 92℃ 反应 15 s, 50℃ 反应 30 s, 72℃ 反应 2 min, 4 循环; 92℃ 反应 15 s, 60℃ 反应 30 s, 72℃ 反应 2 min, 30 循环; 72℃ 反应 7 min; 4℃ 保存.

1.2.6 DDRT-PCR 产物变性聚丙烯酰胺凝胶电泳: 5.6% 变性 HR-1000 胶, 以电压 3 000 V 和功率 100 W 的条件进行电泳, 时间为 5 h.

1.2.7 差异片段的回收、扩增、克隆和鉴定: 据电泳差异条带的荧光扫描及定位标记, 分离含差异片段的凝胶; 分离产物重新进行 PCR 扩增, 通用引物为 T7 启动子 (22-mer), 5' gtaatacgactcactatagggc 和 M13reverse (24-mer), 5' agcgggataacaatttcacacagga; 纯化扩增产物, 与 PMD18-T vector 连接, 转化 *E. coli*. XL-1 Blue 感受态菌, 涂布含氨苄青霉素 (ampicillin) 和 IPTG/X-gal 的 LB 培养基上, 置 37℃, 培养 14 h~16 h, 挑选白色菌落震荡培养, 提取质粒, 用 *Eco*RI 和 *Hind*III 双酶切鉴定, 挑选含目的片段的克隆.

1.2.8 阳性克隆片段的测序及同源性分析: 将测序获得的 cDNA 序列与 Genbank+ EMBL+ DDBJ+ PDB 中已知序列进行同源性比较, 并用 GCG 软件包中 motif 软件进行蛋白质功能域查询.

1.2.9 RNA 印迹对克隆片段的再证实: a. 设计目的片段及内参照磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) 引物进行 PCR, 设计的引物见表 1. 反应体系如下: 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μ l, 2.5 μ mol/L dNTPs 2 μ l, 引物各 2 μ l, RT mix 1.5 μ l, EX Taq 酶 0.2 μ l. 95℃ 反应 3 min; 94℃ 反应 45 s, 56℃ 反应 45 s, 72℃ 反应 1 min, 28 循环; 72℃ 反应 7 min, 4℃ 保存.

Table 1 The design of the aimed primer

	upstream primer (5' $\rightarrow$ 3')	downstream primer (5' $\rightarrow$ 3')	length of PCR product/ bp
DHK1	gACTCAGTCATgCAGTTCgC	TTggAgATgAAgTTCAgCCA	164
DHK2	TTCAAAACAAGgTgCCATCA	ACACCGATgggTAgTgAAgC	298
DHK3	CAGgAgATCTCAGACgCAT	TCgTCTCCgAgCTCTgATTT	122
DHK4	AAgCTAAgAACCCCGAAACC	TTTTTgggCAACCAgCTATC	139
GAPDH	ATgATTCTACCCACggCAAg	TTCAgCTCTgggATgACCTT	529

b. 探针的标记: 取上述 PCR 产物按相关试剂盒说明进行纯化及标记.

c. 杂交及显色: 30 μ g RNA 变性甲醛凝胶电泳 (70 V, 4 h) 后采用毛细管洗脱法将 RNA 转移

至尼龙膜, 预杂交 (0.1 ml 杂交液每平方厘米尼龙膜) 15 min, 杂交 4 h, 温度 55℃ (具体操作见试剂手册), HRP 化学发光显色系统作用后曝光 1 min, 底片扫描, 并进行辉度比较.

2 结 果

2.1 肾小球超微结构的改变

高血压糖尿病组大鼠肾小球系膜基质增生, 部分足突融合、变扁平、甚至消失. 见图 1 和图 2.



Fig. 1 Increased thickness of glomerulus basement membrane
(× 8000)

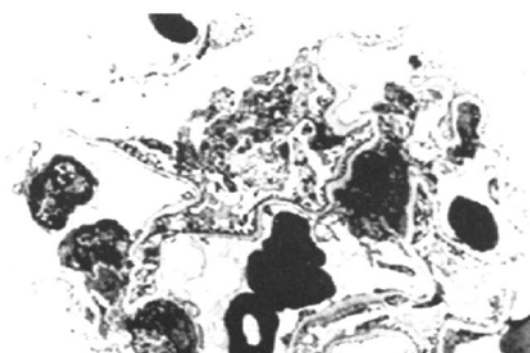


Fig. 2 Confluence and flatness of glomerulus foot processes
(× 4000)

2.2 RNA 完整性的检测

紫外分光光度计检测 A_{260}/A_{280} 均在 1.80~2.00 范围内, 进行的 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳结果见图 3.

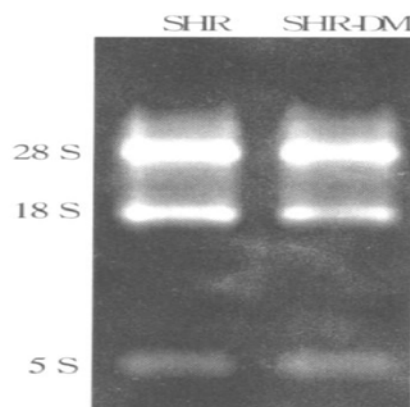


Fig. 3 The test of complete RNA by formaldehyde agarose gel electrophoresis

2.3 DDRT-PCR 结果

每一种引物组合在单一电泳泳道可稳定显示数十个条带. 大多数基因表达相同, 共分离并克隆 17 条差异条带, 经过筛选选择其中 4 条差异条带进行分析, 分别命名为糖尿病性高血压肾病相关片段 1~4 (diabetic hypertension kidney related gene, DHK). 其中 DHK1 和 DHK4 在病变肾组织中的表达减弱, 其余为上调表达. 对 4 个差异片段进行测序, 获得了其碱基序列.

DHK1 (319 bp): 5' GTAATACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTAGTTGGGATATGCTTTATTGTAACGTTGTTTGACTATGAACAAAATAAAAATAGACACAGAGACATCTGGTGACTCAGTCATGCACTTCGCACACGTGGGTACTGGTATCCACTCTCTTTTGCTTGGCCAGCTCTTGGATGGTTGCTATCTCTCGAGCAGTAACTTCGGAGTGAGAGTCACATTGTCATAATCAAAGTCTTCATCAAGAAAGAATGGCTGAACCTCATCTCCAAGTATCTCTTCAGTTTGCGTCTGAGATCTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT3';

DHK2 (602 bp): 5' AGCGGATAACAATTTACACAGGAGATCTCAGACGTGAAGATGGATGCGGAGTTCGGACATGATTCAAGCTTCGAAGTCCGCCATCAAAAACCTGGTGTCTTTGCAGAAGATGTGGGTTGAAACAAAGGTGCCATCATTGGACCCATGGTGGGTGGCGTTGTCATAGCAACAGTGATTGTCATCACGTTGGTGATGCTGGAGAAGAAACAGTACACATCCATCCATCATGGCGTGGTGGAGGTTGACGCTGCTGTGACCCCGGAGGAGCGCCACCTCTCCAAGATGCAGCAGAATGGATATGAGAATCCAACATACAAGTTCTCTGAGCAGATGCAGAACTAAACCCCGCCCCCGCCACAGCAGCGGCCTCTGAACCTGGACAGCAAAACCATTGCTTCACTACCCATCGGTGTTCAATTTATAAAATAACGTGGAAAGAAACAAACCCGTCTGTTTATTTACTCACCCCTCGGCTTTTGACAGCTGTGCTGTAAACACAAGTAGATGCCTGAACCTCGAATTAATATACAAATCAATAATGTATTCTCTCTTTCTCTCTTTACATTCTGGCTCTACACTACATTATTAATGGGTTTTGGGACTG3';

DHK3 (624 bp): 5' AGCGGATAACAATTTACACAGGAGATCTCAGACGGCATAAAGTGAGAGTTAATAAGAGGGAGAGAATCTTTACCTGGTTAATATTTATACTTGAAAAGTTTCAGTTAGAAACCTCGTT-

CAAAATCAGAGCTCGGAGACGAACCGCATTGATAATCATACGCCGCACTGGCGCTGGGCAAGCCCAG-TTCCTTAGCCAGTGTGGCTGGGCTTTGTGTCCACATCACTGGTTGTTGCAGTTAAACTCATATTAAG-ATAGCTCTGTGTGGTAGGTGAGAGATGGCAACGGTGGTTACTGCCGGCTTGTTGAGCCCCAGAGTCC-CCACAGTCACCATGCAGCCAGCCCACCAAGGGAGGGACGTCGCCAGCTGTAGTGCTGCTAGGGGACA-ATCGCCTATGAAGCAATTTGATCCTGAAGTGCAATTGATGTGAAACAGTGTCTCTTGTCCCCCAGAC-ACAATCTTGTAACCAACCTTGCTACCTTTTTTAAAGACTTTGTAAACCTGTCTTTTCTTTGGGGAG-TGGCCATCCAATGGATATCTTAACTGCCACTTTGTTATACATAAAAAATATGTCCAACCTGGAAAAAA-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA3';

DHK4 (396 bp): 5' AGCGGATAACAATTTACACAGGAGGTAAGGGAATGGTGAAAGACTAATT-TAAAGTAAAAATAAGCAAAGATTAACCTTGTACCTTTTGCATAATGAATTAAGTAACTAGAAAATCCTT-AACAAAAAGAATTTAAGCTAAGAACCCCGAAACCAACGAGCTACCTAAAAACAATTTATGAATCA-ACCCGTCTATGTAGCAAAATAGTGGGAAGATTTTTAGGTAGAGGTGAAAAGCCTATCGAGCTTGGT-GATAGCTGGTTGCCCAAAAAAGAATTTCACTTTAAGCTTACCATCAGAACAACAAATCAA-AATGTAACTTAAAAATATAACCAAAAGAGGGACAGCTCTTTAGTAAAAAAAAAAAAAGCCCTATAGT-GAGTCGTATTAC3'.

2.4 对克隆片段的序列分析

经与数据库已登录的核苷酸序列作同源比较, 4 个差异条带中, DHK1、DHK3 为未知基因, DHK2、DHK4 为已知基因, 分别是: 成淀粉样糖蛋白 (amyloidogenic glycoprotein, AGG) (同源性 98%)、CDK109 (同源性 100%)。

2.5 RNA 印迹结果

如图 4 所示, 目的片段 DHK1~4 与内参照 GAPDH 组织中 mRNA 杂交辉度扫描平均比值见表 2, 其中在 SHR-DM 组大鼠肾皮质 mRNA 水平表达上调的有 DHK2、DHK3, 下调的有 DHK1、DHK4。

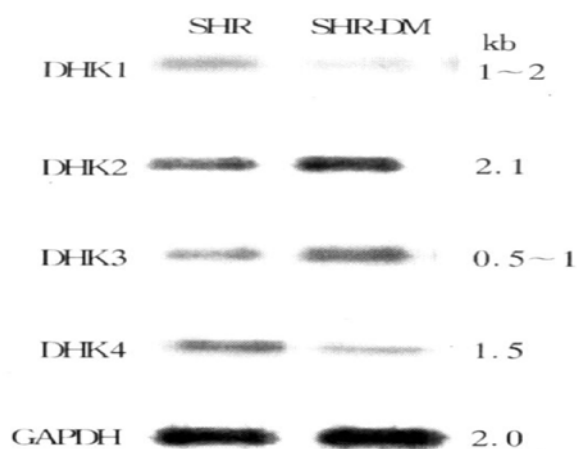


Fig. 4 Northern blot analysis of differentially expressed genes in SHR and SHR-DM renal cortex

Table 2 Different expression of the aimed sequences verified by Northern blot

	SHR	SHR-DM
DHK1: GAPDH	0.296 ± 0.023	0.150 ± 0.012
DHK2: GAPDH	0.420 ± 0.121	0.723 ± 0.241
DHK3: GAPDH	0.223 ± 0.067	0.468 ± 0.213
DHK4: GAPDH	0.356 ± 0.211	0.195 ± 0.079

3 讨 论

糖尿病性高血压较为常见, 该病所致的终末期肾病的患病率正逐步上升^[1], 引起的社会经济消耗也在迅速增加, 因此愈加受到关注. 其肾脏病理改变包括肾小球高灌注、毛细血管基底膜增厚、系膜细胞增生和基质分泌增多, 在肾损害早期即可观察到肾小球系膜细胞的自限性增殖, 继而是肥大改变. 如何确定这种改变的易感因素, 对易感者及早采取针对性的防治措施是当前肾病研究的重要课题. 发生糖尿病的大鼠在原有高血压的基础上更易诱导某些疾病相关基因的表达差异, 有利于更好对疾病相关基因进行初步筛查. 本研究采用 STZ 诱导自发性高血压大鼠糖尿病的发生, 它与四氧嘧啶都可造成胰岛 B 细胞损伤从而诱发糖尿病的发生, 这两种化学物质应用于大鼠糖尿病模型制作已得到国内外同行的普遍认同. 然而四氧嘧啶对动物的肝肾有一定的毒性作用, 而大剂量的 STZ 也具有

产生除破坏 B 细胞外的毒性,正是考虑到存在这个问题,同时也为了防止酮症酸中毒,国内外采用的 STZ 一般为 100 mg/kg 以下的剂量.本研究采用的 STZ 在实验过程中经过反复摸索,最终确定 50 mg/kg 这一适合本实验设计的剂量.该模型大鼠尿蛋白以及肾小球超微结构的改变证实肾损害的存在.国内外学者已注意到糖尿病和高血压所引起的肾脏改变,具有细胞增殖异常以及细胞外基质合成与降解失衡等此类疾病所共有的细胞生物学特征^[2],但其分子机制远未阐明.本研究着重分析具有表达差异的 cDNA 片段,对于肾脏病变的相关生化、病理指标不再赘述.

DDRT-PCR 技术是 1992 年 Liang 等^[3]建立的将 mRNA 反转录技术与 PCR 二者相互结合发展起来的一种 RNA 指纹图谱技术,能较好地比较不同细胞群之间差异基因的表达.它基于真核细胞中的每一种 mRNA 序列都可被特定的下游锚定核苷酸引物反转录成与其互补的 DNA,再利用多种上游随机引物对它进行扩增,通过 PCR 的高效扩增和 3' 及 5' 端引物的合理设计匹配,经高灵敏度的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和荧光扫描就可显示出存在于两种或多种类型细胞中表达有差异的基因片段.由于该技术样品用量少、敏感性高、同时可比较多个样品的优点,在一定程度上克服了传统差减杂交方法的不足,已推广用于分离鉴定组织特异性表达的基因.

应用差异显示 PCR 技术我们首次发现了 AGG 和 CDK109 在高血压合并糖尿病大鼠肾皮质中的差异表达. CDK109 还未有正式命名,为一新近发现的基因,其具体空间构象及功能尚未阐明.用 GCG 软件包中 motif 软件进行蛋白质功能域查询,可发现 CDK109 与血管紧张素 II 2 型受体 (angiotensin II TYPE 2 receptor, AT2) 存在相同的功能域,血管紧张素 II (angiotensin II, ANG II) 是一种强有力的缩血管物质,也是目前公认的重要促生长因子,它与血管紧张素 II 1 型受体 (angiotensin TYPE 1 receptor, AT1) 相互作用参与肾小球内细胞增生、细胞外基质蛋白的积累以及肾间质的纤维化,与肾硬化密切相关^[4]. AT2 与 AT1 作用恰好相反,它和 ANG II 的结合激活介导抗细胞增殖^[5].如果能进一步证实 CDK109 与 AT2 共有的结构域就是 Ang II 与 AT2 相互作用的功能域,那么 CDK109 在细胞周期网络调控中、在细胞增殖与静息状态的此消彼长中、进而在高血压

糖尿病肾病的发生中就可能起一定作用.这也为 AT2 配体治疗高血压,同时保护肾脏免受伤害提供了理论依据.

我们也首次发现 AGG 存在于大鼠肾脏,在此之前人们已发现它存在于大脑,与人类 A4 淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 同源. APP 降解产物就是近年来研究所证实的与 Alzheimer 病 (Alzheimer's disease, AD) 患者大脑皮层动脉和小动脉的血管淀粉样变性密切相关的 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, β -AP)^[6]. 后者的沉积^[7]除具有对神经元直接毒性外,还能促进自由基的细胞损伤,破坏细胞 Ca^{2+} 内环境平衡,提高其他物质如兴奋性氨基酸神经递质的毒性.而 APP 本身,具有细胞粘附分子的特性^[8],因此有理由推测存在于大鼠肾皮质中的 AGG,可能参与和维持细胞与细胞以及细胞与间质之间的相互作用,从而参与高血压糖尿病肾病的发生.

本研究进一步的工作包括用筛库或 RACE 方法继续未知基因的全长 cDNA 序列的克隆和蛋白质的功能预测,并从基因或蛋白质水平验证上述差异条带在人类病变肾组织中表达的特异性,为深入研究糖尿病性高血压肾损害的发病机制奠定基础.

参 考 文 献

- 1 The national blood pressure program working group. National high blood pressure education program working group report on hypertension in diabetes. *Hypertension*, 1994, **23** (2): 145~158
- 2 刘志红,黎磊石. 糖尿病肾病发病机理. *中华肾脏病杂志*, 1999, **15** (2): 120~123
Liu Z H, Li L S. *Chinese Journal of Kidney*, 1999, **15** (2): 120~123
- 3 Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, **257** (5072): 967~971
- 4 Marta R O, Dulcenombre G G, Roberto A, *et al.* Involvement of angiotensin and endothelin in matrix protein production and renal sclerosis. *J Hypertens*, 1994, **12** (Suppl 4): s51~s58
- 5 Weber M A. Comparison of type 1 angiotensin II receptor blockers and angiotensin converting enzyme inhibitors in the treatment of hypertension. *J Hypertens*, 1997, **15** (Suppl 6): s31~s36
- 6 Suh Y H, Chong Y H, Kim S H, *et al.* Molecular physiology, biochemistry, and pharmacology of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP). *Ann N Y Acad Sci*, 1996, **786** (15): 169~183
- 7 Paola D, Domenicotti C, Nitti M, *et al.* Oxidative stress induces increase in intracellular amyloid β -protein production and selective activation of β 1 and β 2 PKCs in NT2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **268** (2): 642~646
- 8 Dodart J C, Mathis C, Ungerer A. The β -amyloid precursor protein and its derivatives: from biology to learning and memory processes. *Rev Neurosci*, 2000, **11** (2~3): 75~93

Cloning and Identification of cDNA Fragments Related to Renal Damage of Diabetic Hypertension Rats

ZHANG Fang-Lin^{1)*}, LI Guo¹⁾, YE Chuan-Zhong²⁾, DING Wei¹⁾, LIU Your-Ping¹⁾,
XIE Chao¹⁾, ZHANG Di¹⁾, SUN Wei-Hua¹⁾, LUO Min¹⁾

¹⁾ Shanghai Institute of Endocrinology, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China;

²⁾ Department of Urology, the Affiliated Zhongshan Hospital, Medical Center of Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract To investigate new genes related to renal damage of diabetic hypertension rats for exploring its mechanism, the model of diabetic hypertension rats was established by streptozotocin (STZ) injection. Urine protein of this model rats continued positive and ultrastructure of their renal cortex changed. Fluorescence-labelled differential display reverse transcription polymerase chain reaction and Northern blot were used to isolate and identify the genes that showed transcription changes in the renal cortex between the unitary hypertension and diabetic hypertension rats. Four differential fragments were obtained, two of which were novel whereas the other two showed significant similarity with rat amyloidogenic glycoprotein and CDK109 respectively according to the public database of Genbank. Via the application of bioinformatics the altered renal mRNA expression of these genes associated with diabetic hypertension suggested that they were the candidates for a role in the development of the nephropathy.

Key words differential display, diabetic hypertension, kidney, bioinformatics

* Corresponding author. Tel: 86-21-63050615, E-mail: zhang_fanglin@yahoo.com

Received: August 13, 2001 Accepted: September 12, 2001