

· 论 著 ·

糖尿病大鼠肾脏肾素及其受体表达改变^{*}高 召,任志龙,丁国华[△],梁 伟,杨红霞

(武汉大学人民医院肾内科,武汉 430060)

摘 要:目的 研究链脲佐菌素糖尿病大鼠肾脏肾素及肾素受体表达变化情况。方法 12 只雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组(N 组)、糖尿病组(DM 组)。大鼠左下腹腔注射链脲佐菌素(STZ)60 mg/kg 建立糖尿病模型。测定第 4、8 周尿蛋白。8 周后心脏取血检测血糖、血肌酐、血钠、血钾;取肾脏行 PAS 染色观察病理改变;免疫组化检测肾脏肾素和肾素受体表达水平;RT-PCR 检测肾脏肾素和肾素受体 mRNA 表达水平。结果 DM 组 4 周始相同时间段尿蛋白较 N 组升高($P<0.01$),8 周时 DM 组 24 h 尿蛋白较 N 组明显升高($P<0.01$);DM 组 8 周时肾小球损伤指数明显高于 N 组($P<0.05$);免疫组化和 RT-PCR 检测显示 DM 组肾素表达较 N 组明显升高($P<0.05$),而肾素受体表达差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 肾脏肾素表达增加可能参与糖尿病肾脏早期损伤。

关键词:糖尿病肾病;肾素;肾素受体

中图分类号:R587.202

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)12-1481-03

Renal expression of renin and renin receptor in the streptozotocin-induced rats^{*}GAO Zhao, REN Zhi-long, DING Guo-hua[△], et al.

(Division of Nephrology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract:Objective To investigate the expression of renin and renin receptor in the kidneys of streptozotocin-induced rats. **Methods** Twelve male Wistar rats were randomly assigned to normal control group($n=6$, group N) and diabetic group($n=6$, group DM). Streptozotocin(60 mg/kg) was administrated intraperitoneally to induce diabetes. Urine creatinine and proteinuria were measured at week 4, 8. At week 8 animals were sacrificed and blood glucose, serum creatinine (SCr), serum sodium and serum potassium were assayed. Renal pathological changes were quantified with glomerular injury index on PAS-stained sections. Protein and mRNA levels of renin and renin receptor expression were analyzed by immunohistochemical staining and RT-PCR respectively. **Results** The proteinuria and glomerular injury index in diabetic rats were significantly increased when compared to those in normal rats at week 8. Protein and mRNA expression of renin expression in kidneys of diabetic rats was up-regulated, however, renin receptor expression was comparable among two groups. **Conclusion** Elevated expression of renal renin maybe involve in the progression of diabetic renal damage.

Key words:diabetic nephropathy; renin; renin receptor

肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)在糖尿病肾病进展过程中发挥着关键的作用,阻断 RAS 成为目前治疗糖尿病肾病的重要措施^[1-3]。然而临床上作用于 RAS 的药物会引起血浆肾素水平升高,减弱治疗效果^[4]。近年来肾素及肾素受体成为研究的热点,人们希望通过此靶点从源头阻断 RAS 以获得更佳疗效。目前,有关糖尿病模型肾脏中肾素和肾素受体表达水平的研究较少。为了进一步研究糖尿病模型肾素与肾素受体表达变化与糖尿病肾病之间的联系,本研究拟通过建立链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)糖尿病大鼠模型,观察糖尿病大鼠肾脏肾素及肾素受体表达变化。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 STZ(Sigma);多克隆兔抗大鼠肾素/肾素抗体(renin/renin receptor antibody, Santa Cruz 公司);SP 免疫组化染色试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司);浓缩型 DAB 试剂盒(北京中杉公司);Trizol 试剂(Invitrogen 公司);RT-PCR 逆转录试剂盒(东洋坊上海生物科技有限公司);PCR 试剂盒(Fermentas);renin/renin receptor 引物和 β -actin 引物(上海英骏);DNA Marker (SABC 公司);BCA 试剂盒(Pierce);¹²⁵I 血管紧张素 I 放射免疫分析试剂盒(北京科美东

雅生物技术有限公司);紫外可见分光光度计(北京莱伯泰科仪器有限公司);BX51 显微摄像系统(Olympus);PCR 仪(T-personal, Biometra);ZF-258 全自动凝胶成像分析系统(上海嘉鹏科技有限公司)。

1.2 糖尿病大鼠模型建立 12 只体质量 180~220 g 的 SPF 级雄性 Wistar 大鼠(湖北省预防医学科学院实验动物中心),随机分为正常对照组(N 组)6 只和模型组(DM 组)6 只。DM 组禁食 36 h 后在大鼠左下腹腔注射 STZ 60 mg/kg。N 组腹腔注射等量柠檬酸缓冲液。DM 组于 72 h 后尾静脉取血测定血糖,以血糖大于或等于 16.7 mmol/L,确定为糖尿病大鼠。未达标准者,重复上述方法、剂量,至模型成功^[5]。实验期间两组均自由饮食。

1.3 标本采集与检测 造模成功后第 4 周、8 周收集 24 h 尿液检测尿总蛋白和尿肌酐;8 周后乙醚麻醉动物,心脏采血,检测血糖、血肌酐(SCr)、血钠(Na)、血钾(K)。肾脏常规石蜡包埋,切片,用于 PAS 染色及免疫组化。血糖、肌酐、血钠(Na)、血钾(K)由 Beckman 自动生化分析仪进行检测。免疫透射比浊法检测尿蛋白(上海太阳生物技术有限公司)。

1.4 肾组织病理学分析 肾组织石蜡切片(2~3 μ m)常规脱

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30871167)。 [△] 通讯作者, E-mail: ghxding@gmail.com。

蜡入水,行 PAS 染色,普通光镜下观察肾组织病理改变^[6]。肾小球损伤程度采用肾小球损伤指数进行半定量分析,评分标准如下:病变范围未见明显改变计 0 分,病变范围占肾小球面积小于 25%计 1 分,25%~50%之间计 2 分,50%~75%之间计 3 分,大于 75%计 4 分。每张切片 200 倍镜下观察 50 个正切肾小球,肾小球损伤指数计算公式为: $1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3 + 4 \times N_4$,式中 N_1 代表 1 分的损伤肾小球个数,……, N_4 为代表 4 分的损伤肾小球个数。

1.5 免疫组化法检测肾素及肾素受体表达 石蜡切片常规脱蜡入水,柠檬酸缓冲液(pH 6.0)微波修复,3% H_2O_2 阻断,5% BSA 封闭,加一抗(兔肾素和肾素受体多克隆抗体,santa cruz 公司)4℃过夜,滴加二抗 IgG 及 SP 复合物,DAB 显色,苏木素复染盐酸分化,脱水,封片。以 PBS 代替一抗设置阴性对照,以细胞浆棕黄色为阳性表达。每张切片 400 倍镜下随机摄取 20 个肾小球,采用 Image-pro plus6.0 软件分析,以肾小球切面肾素和肾素受体积分光密度(OD)表示阳性物质的相对含量。

1.6 逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)检测肾素/肾素受体 mRNA 表达 取 100 mg 肾组织加入 Trizol 试剂 1 mL,参照说明书提取总 RNA。2 μ g RNA 在 20 μ L 逆转录体系中扩增合成 cDNA。模板进行肾素及肾素受体 PCR 扩增反应,用 Primer5.0 软件设计引物。肾素上游引物:5' GAG TCA TCC CTG TCT TCG 3';下游引物:5' GTG TCC ACC ACT GCC ATA 3'。产物为 256 bp。肾素受体上游引物:5' GGG AAG CGT TAT GGAG 3';下游引物:5' CGC AAG GTT GTA GG-GA 3'。产物为 219 bp。用 β -actin 作为内参,其上游引物为:5' AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC 3';下游引物为:5' TCT CAG CTG TGG TGG TGA AG 3',产物为 220 bp。PCR 反应体系 25 μ L:cDNA 1 μ L,上下游引物 1 μ L,2 $\times$ PCR mix 12.5 μ L,去核酸水 9.5 μ L。扩增条件为:预变性 94℃ 3 min,变性 94℃ 45 s,退火温度:肾素 54.1℃ 45 s、肾素受体 50.1℃ 45 s,延伸 72℃ 45 s,循环 35 次,72℃ 延伸 3 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,ZF-258 全自动凝胶成像分析系统进行摄影并采用 Gel-pro Analyzer version 4.5 行半定量分析。用 renin/renin receptor 与 β -actin 比值表示 renin/renin receptor 的 mRNA 表达水平。

1.7 放射免疫法检测肾脏肾素活性 PBS 缓冲液中加入 1 μ g/L 苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)蛋白酶抑制剂,100 mg 肾组织加 1 mL 缓冲液,玻璃匀浆器匀浆,匀浆液在 4℃ 下 2 000 r/min 离心 20 min,取上清液用放射免疫法检测血管紧张素 I(angiotensin I, Ang I)的含量。肾素活性是以 Ang I 的产生速率来衡量^[7]。同时用 BCA 法检测上清液总蛋白含量,放射免疫法测量值与总蛋白含量值相比得出含量百分比。具体方法参照试剂盒说明书。

1.8 统计学方法 数据采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠生化指标检测 DM 组大鼠血糖明显高于 N 组。DM 组 4 周始尿蛋白较 N 组升高,8 周时 DM 组 24 h 尿蛋白高于 N 组。DM 组 SCr 较 N 组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。DM 组肾质量/体质量比值与 N 组相比明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组间 SCr 和血钠、血钾水平相比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

2.2 大鼠肾脏病理改变 DM 组 PAS 染色可见节段性的系

膜基质和系膜细胞的增生,DM 组肾小球损伤指数显著高于 N 组,见彩插 I 图 1。

2.3 肾脏肾素和肾素受体表达改变 肾素主要分布于肾小管,以肾小球周围近曲小管为主;肾素受体在肾脏表达广泛,在肾小球系膜细胞、足细胞、近端小管、远端小管均有表达,见彩插 I 图 2、3。

2.4 肾素及肾素受体 mRNA 表达 DM 组肾素 mRNA 较 N 组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),肾素受体 mRNA 与 N 组相比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 4、图 5。

表 1 各组大鼠血糖、尿蛋白量(24 h)和 SCr 的比较

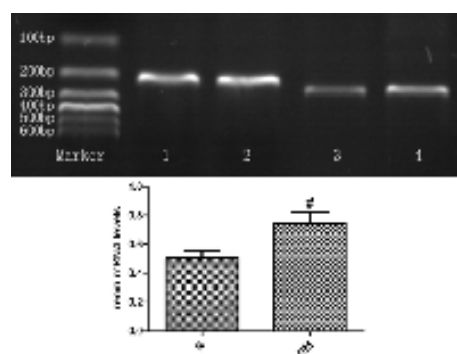
组别	动物数 (只)	血糖 (mmol/L)	尿蛋白量(mg/24 h)		SCr (mL/min)
			第 4 周	第 8 周	
N 组	6	5.31 $\pm$ 0.84	37.63 $\pm$ 0.15	27.86 $\pm$ 0.16	18.90 $\pm$ 2.95
DM 组	6	24.35 $\pm$ 3.86*	103.42 $\pm$ 0.27*	91.02 $\pm$ 0.07*	28.79 $\pm$ 4.32*

与 N 组相比较, *: $P < 0.01$ 。

表 2 各组大鼠肾质量/体质量指数、生化指标的比较

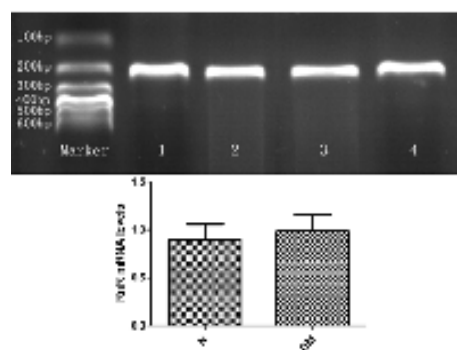
组别	动物数 (只)	肾质量/体质量 ($\times 10^{-3}$)	Na ⁺ (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)	SCr (μ mol/L)
N 组	6	4.31 $\pm$ 0.58	144.93 $\pm$ 4.44	5.98 $\pm$ 0.36	62.35 $\pm$ 7.61
DM 组	6	8.18 $\pm$ 1.45*	142.63 $\pm$ 6.41	5.78 $\pm$ 1.02	68.21 $\pm$ 10.02

与 N 组相比较, *: $P < 0.05$ 。



1 为正常组 β -actin mRNA;2 为糖尿病组 β -actin mRNA;3 为正常组 renin mRNA;4 为糖尿病组 renin mRNA。N: 正常组;DM: 糖尿病组;与 N 组相比较, #: $P < 0.05$ 。

图 4 两组肾脏肾素 mRNA 表达



1 为正常组 β -actin mRNA;2 为糖尿病组 β -actin mRNA;3 为正常组 renin receptor mRNA;4 为糖尿病组 renin receptor mRNA。N: 正常组;DM: 糖尿病组;DM 组与 N 组相比较, $P > 0.05$ 。

图 5 两组肾脏肾素受体(RnR)mRNA 表达

2.5 肾脏肾素活性变化 DM 组 Ang I 的含量较 N 组明显升

高 $[(5.14 \pm 1.05) \times 10^{-6}]$ 比 $(2.12 \pm 0.58) \times 10^{-6}$, $P < 0.05$ 。

3 讨 论

本实验观察到肾素在肾小球周围区域如肾小管高表达,肾小球表达较弱。这可能与肾小球旁器是肾素的主要来源有关。以往认为肾素原不过是肾素的前体,没有生物学作用,而不被重视,肾素受体的发现改变了人们的认识。2002 年肾素受体被发现,它能够增加肾素和肾素原的活性并诱导自身活化^[8]。肾素/肾素原结合肾素受体激发 2 条通路:肾素原能够催化血管紧张素产生激活传统的 RAS,同时还能激活细胞内丝裂素激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)通路,上调促纤维化基因表达诱导肾小球硬化^[9]。本研究发现肾素受体在肾内广泛表达,肾小球的系膜细胞、足细胞、近端小管、远端小管均有表达。这预示着肾素受体在机体的病理生理过程中发挥重要作用。糖尿病大鼠肾脏病进展与肾组织 RAS 激活有关,研究肾素受体在该系统的地位具有重要意义。目前,已有阻断肾小球系膜细胞肾素受体可以延缓细胞外基质蓄积的报道^[10]。

已有研究表明糖尿病状态下肾内 RAS 激活^[11],局部 RAS 激活被认为与糖尿病肾病肾功能恶化有关^[12]。本研究发现模型组肾素水平升高,放射免疫法证实糖尿病模型组肾脏肾素活性升高,Takahashi 等^[13]用实时定量 PCR 检测 17 和 29 周糖尿病大鼠肾脏肾素受体表达变化,发现正常对照与糖尿病模型组肾素受体表达差异无统计学意义,本研究模型组肾素受体表达变化与 Takahashi 等人研究一致。Scheffe 等^[14]认为肾素表达增加可通过短负反馈机制抑制肾素受体表达,即高肾素水平会抑制肾素受体的表达,防止肾素受体过度激活。Siragy 和 Huang^[15]研究发现糖尿病大鼠肾素受体表达增加,并提出该效应可能是通过增强血管紧张素受体-1(AT1)-NADPH 氧化酶活性,上调肾素受体表达。与本研究不同的是 Siragy 检测的是 6 周糖尿病大鼠肾素受体表达情况,目前有关肾素受体的调节机制还不清楚,有待探讨。尽管在本研究中两组间肾素受体表达没有差异,但是肾素活性增高可以通过激活 RAS 途径,造成肾脏损害,在本实验中观察到糖尿病大鼠肾小球系膜细胞增生,系膜区基质沉积,同时产生大量蛋白尿。

综上所述,本研究发现在 STZ 诱导的糖尿病大鼠模型中,肾素在肾小球周围区域高表达,肾小球表达较弱。肾素受体在肾小球系膜细胞、足细胞、近端小管、远端小管均有表达。糖尿病大鼠肾脏肾素表达增加,可能与肾脏损伤有关,但肾素受体表达无改变,其分子机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Shah IM, Mackay SP, McKay GA. Therapeutic strategies in the treatment of diabetic nephropathy a translational medicine approach[J]. Curr Med Chem, 2009, 16(8): 997.
- [2] Sarafidis PA, Bakris GL. Renin-angiotensin blockade and kidney disease[J]. Lancet, 2008, 372(38): 511.
- [3] 申兵冰, 赵洪雯, 干磊, 等. 螺内酯联合厄贝沙坦对早期糖尿病肾病患者微量清蛋白尿影响[J]. 重庆医学, 2008, 37(8): 812.
- [4] Zhang Z, Zhang Y, Ning G, et al. Combination therapy with AT1 blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy; blockade of compensatory renin increase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(41): 15896.
- [5] 陈幼发, 熊羽. 全反式维甲酸对糖尿病大鼠肾小管-间质纤维化的作用及机制[J]. 重庆医学, 2009, 38(15): 1902.
- [6] 刘雷, 甘华, 王辉, 等. 活性维生素 D₃ 抗炎机制对糖尿病大鼠肾脏保护作用[J]. 广东医学, 2008, 29(12): 1975.
- [7] 王晓霞, 黄伟, 刘金萍, 等. 依那普利联合伊贝沙坦对慢性心力衰竭左室重构的作用观察[J]. 海南医学, 2005, 16(12): 47.
- [8] Scheffe JH, Unger T, Funke-Kaiser H. PLZF and the (pro)renin receptor[J]. J Mol Med, 2008, 86(6): 623.
- [9] Ichihara A, Sakoda M, Mito-Kurauchi A, et al. Activated prorenin as a therapeutic target for diabetic nephropathy[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2008, 82(Suppl 1): 63.
- [10] He M, Zhang L, Shao Y, et al. Inhibition of renin/prorenin receptor attenuated mesangial cell proliferation and reduced associated fibrotic factor release[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 606(1): 155.
- [11] Vidotti DB, Casarini DE, Cristovam PC, et al. High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 286(2): 1039.
- [12] Konoshita T, Wakahara S, Mizuno S, et al. Tissue gene expression of renin-angiotensin system in human type 2 diabetic nephropathy[J]. Diabetes Care, 2006, 29(4): 848.
- [13] Takahashi H, Ichihara A, Kaneshiro Y, et al. Regression of nephropathy developed in diabetes by (Pro)renin receptor blockade[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(7): 2054.
- [14] Scheffe JH, Menk M, Reinemund J, et al. A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein [J]. Circulation Res, 2006, 99(12): 1355.
- [15] Siragy HM, Huang J. Renal (pro)renin receptor upregulation in diabetic rats through enhanced angiotensin AT1 receptor and NADPH oxidase activity[J]. Exp Physiol, 2008, 93(5): 709.

(收稿日期: 2009-06-10 修回日期: 2009-10-10)

《重庆医学》——中文核心期刊, 欢迎投稿, 欢迎订阅!