

· 论 著 ·

大黄酸对糖尿病肾病大鼠足突细胞 nephrin 基因表达的影响

陈建伟, 刘 玲, 钟 玲[△]

(重庆医科大学附属第二医院肾内科 400010)

摘要:目的 观察 nephrin 在糖尿病肾病(DN)大鼠肾小球中的表达,研究大黄酸对 nephrin 表达的影响。方法 用链脲佐菌素 60 mg/kg 一次性腹腔注射方式制作大鼠 DN 模型,将 DN 模型分为 2 组:大黄酸治疗组、模型组,另外设置模型对照组。各组均干预 8 周后,测量大鼠体重、肾脏质量、相对肾质量、24 h 尿蛋白定量、血清肌酐、尿素氮,利用光镜、电镜观察肾脏病理改变,应用免疫组化技术观察 nephrin 蛋白的表达情况。结果 大黄酸治疗组 24 h 尿蛋白定量明显下降($P < 0.05$),肾功能改善,足突细胞 nephrin 表达明显下降。结论 大黄酸对 DN 肾脏有保护作用,而此种保护作用可能与其能够抑制足突细胞 nephrin 表达有关。

关键词: 大黄酸;糖尿病肾病;nephrin

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.31.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)31-3732-03

Rhein on diabetic nephropathy rat podocytes nephrin expression

Chen Jianwei, Liu Ling, Zhong Ling[△]

(Department of Respiratory, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate rhein on podocyte nephrin gene expression and nephrin on glomerular in diabetic nephropathy (DN) rats. **Methods** DN rats mode were made by Intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) 60 mg/kg once. the DN model was divided into 2 groups: rhein treatment group (A), model group (B), and in addition, set up a control group (C). body weight, kidney weight, relative kidney weight, 24-hour urinary protein excretion, serum creatinine, blood urea nitrogen of rats were detected after 8 weeks of intervention, kidney pathological changes were observed by using light microscope, electron microscope. immunohistochemical technique used to nephrin protein expression. **Results** Both the DN rats 24-hour urinary protein excretion and podocyte nephrin gene expression of group A decreased significantly ($P < 0.05$), improvement in renal function. **Conclusion** Rhein on DN kidney has a protective effect, which may be related to its podocyte nephrin gene expression

Key words: rhein; diabetic nephropathy; nephrin

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是 2 型糖尿病严重的常见微血管并发症,是最终导致终末期肾衰竭的常见原因,也是糖尿病致死的主要原因之一,由于其发病率高,治疗棘手、效果差,危害大而备受关注。而近年来研究发现 nephrin 基因在足突细胞上的表达下调在肾功能不断恶化中起到重要作用^[1]。因此,如何抑制 nephrin 基因在足突细胞上的下调,在 DN 的治疗中起到至关重要的作用,目前为止很多临床对照研究显示,大黄酸在控制 DN 蛋白尿及 DN 进展中有一定作用,然而,其除了对血糖、胰岛素抵抗、减轻肾脏肥大等作用之外^[2-3],是否能够抑制 nephrin 基因下调,目前尚无实验研究。本实验旨在探索大黄酸对 DN 的治疗作用,以及通过 nephrin 基因在 DN 大鼠足突细胞的表达变化,探讨大黄酸治疗 DN 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 Wistar 雄性大鼠 18 只,体质量 170~200 g (重庆医科大学中心实验室);链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)^[3-4]。

1.2 试剂 24 h 尿蛋白测定试剂盒(北京为康惠华生物公司);酶联免疫吸附测试大鼠尿微量清蛋白试剂盒(上海研谨生物科技有限公司);抗体稀释液(ADI 公司);兔抗 nephrin 抗体。

1.3 实验药物 大黄酸是从大黄的根茎中提取^[5-6],大黄根茎

购自北京兴事堂,并由上海众华生物科技有限公司提取。

1.4 仪器 德国 Satorious 电子天平;日立 7020 生物分析仪。

1.5 方法

1.5.1 动物模型制作 按照 Anderson 等^[1]建立方法将所有动物适应性喂养 5 d,禁食 12 h,STZ 以 0.1 mmol/L 柠檬酸缓冲液溶解,按照 50 mg/kg 一次性腹腔注射作为 DN 模型,模型对照组给予同等剂量的柠檬酸缓冲液,72 h 后开始检测空腹血糖、尿糖、尿量及 24 h 微量清蛋白排泄率, DN 建立成功标准为:(1)空腹血糖高于 16.6 mmol/L;(2)尿糖强阳性;(3)尿量/原尿量大于 1.5;(4)24 h 尿蛋白排泄率大于 30 mg/24 h。

1.5.2 实验分组 将 DN 动物模型分为 2 组:模型组、大黄酸治疗组。大黄酸溶于生理盐水,灌胃给药,每天 1 次,大黄酸治疗组给予大黄酸 150 mg·kg⁻¹·d⁻¹干预 8 周($n=6$),模型组及模型对照组分别给予等剂量生理盐水灌服作为对照($n=6$)。实验重复 2 次。

1.5.3 血糖、体质量、肾功能的测量 每 2 周测量各组大鼠血糖 1 次;第 8 周测定各组大鼠体质量;股动脉放血 20 μ L 分离血清,使用日立 7170A 全自动生化分析仪(重庆医科大学中心实验室)测量血肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)、血清总胆固醇(TC)及三酰甘油(TG)。

1.5.4 尿微量清蛋白排泄率的检测 给药 6 周后,大鼠放入代谢笼,留取 24 h 尿液,计算尿量,尿液离心 25 min(4 $^{\circ}$ C,

4 000 r/min), 取上清液分装, 并于 -70 °C 冻存, 后使用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒检测尿蛋白。

1.5.5 肾组织形态学观察 大体观察并称质量。光镜下观察: 在给予大鼠大黄酸干预 8 周后, 麻醉并经腹主动脉插管, 5 °C 磷酸盐缓冲液(PBS)灌注后取肾脏。迅速剥去肾包膜, 称重后纵向剖开肾脏, 切取约 0.5 cm×0.5 cm×0.2 cm 大小的肾脏组织, 肾组织经过 10% 中性甲醛缓冲溶液中固定、浸蜡、包埋、切片, HE、PAS、Masson3 染色观察, 取 1 mm×1 mm×1 mm 肾皮质, 经戊二醛固定、饿酸后固定、脱水、环氧树脂 618 包埋, 制作成超薄切片, 用醋酸铀-柠檬酸铅染色, JEM 透射电镜下观察。

1.5.6 肾脏免疫组织化学检测 5 μm 肾组织石蜡切片梯度脱蜡水化后, 3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶, 0.01 mol/L PBS 缓冲液洗涤, 正常兔血清封闭, 一次加入 nephrin 抗体, DAB 显色, 苏木精复染, 树脂封片, 采用 JD-801 计算机图像分析系统, 每张切片随机选取 15 个肾小球, 计算各组肾小球内 nephrin 的阳性信号占肾小球面积百分比^[4]。

1.5.7 肾小球足突细胞密度测定 10% 中性甲醛缓冲溶液固定, 常规脱水、浸蜡、包埋, 5 μm 石蜡切片。兔抗大鼠 WT1 多克隆抗体(Merk 公司)免疫组化 SP 法检测肾小球 WT1 表达, Image-Pro Plus 6.0 彩色图像分析系统半定量足突细胞密度。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较进行 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般情况 模型组血糖均有升高, 与模型对照组比较, 均

有多尿、多饮、多食、消瘦等症状。模型制作成功后, 模型组血糖较模型对照组血糖升高明显 (*P* < 0.05), 除模型对照组外, 其余两组间血糖差异无统计学意义 (*P* < 0.05)。DN 大鼠体重质量均低于模型对照组 (*P* < 0.05)。

2.2 各组指标比较 模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量均高于模型对照组 (*P* < 0.05), 见图 1。6 周后大黄酸治疗组与模型组比较, 除血糖无明显变化外, BUN, Cr 显著改善 (*P* < 0.05), 见表 1。

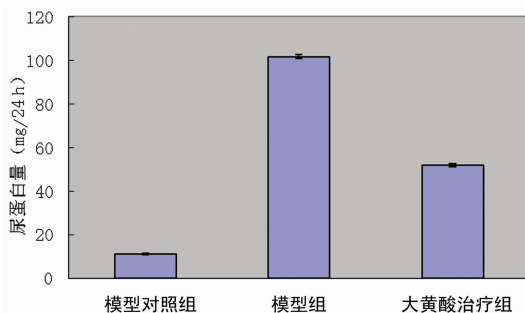


图 1 各组 24 h 尿蛋白量

2.3 肾组织形态学改变 模型组肾脏较模型对照组肾脏外观苍白、肿胀, 质地变硬。模型对照组大鼠肾小球、肾小管形态规则, 无明显膜基质增生。模型组肾小球肥大, 见系膜区弥漫性增宽, 并有逐渐增多的 PAS 阳性物质沉积, 肾小球基底膜 (GBM) 增厚, 近端肾小管上皮细胞含较多糖原, 并呈空泡样及颗粒样变性, 间质内较多淋巴细胞等炎性细胞浸润。大黄酸干预后, 肾小球及肾小管病变均有不同程度改变。见图 2。

表 1 各组生化数据变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量(g)	肾质量(g)	血糖(mmol/L)	BUN(mmol/L)	Cr(μmol/L)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)
模型对照组	6	412.1±13.1	2.07±0.12	5.10±0.11	5.90±0.68	71.2±0.58	1.10±0.10	0.50±0.35
模型组	6	210.3±8.41	5.31±1.57	26.12±7.89	19.12±4.32	124.1±2.87	2.79±0.21	2.63±0.20
大黄酸治疗组	6	256.3±5.12	2.53±0.20	24.03±1.24	11.21±4.27	87.9±1.87	1.74±0.19	7.81±0.21

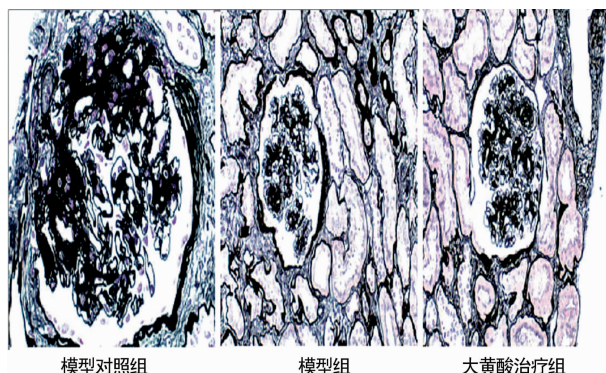


图 2 模型组肾小球病理改变电镜下图片(免疫组化, ×1 000)

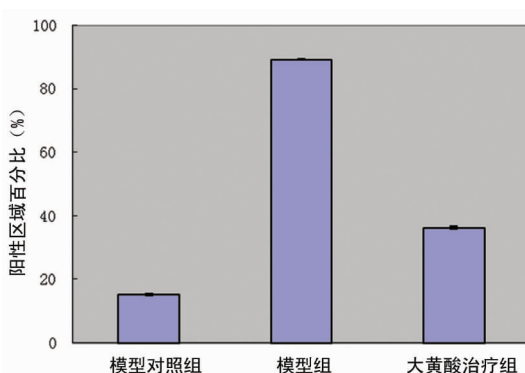


图 3 各组足突细胞 nephrin 表达

2.4 足突细胞上 nephrin 的表达 nephrin 特异性的表达于肾小球足突细胞上, 通过电镜观察, 模型组足突细胞上 nephrin 阳性明显, 大黄酸治疗组阳性明显减少, 半定量分析见: 大黄酸治疗组与模型组比较, 肾小球 nephrin 阳性面积百分比差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。见图 3。

3 讨 论

研究发现, DN 在早起正确治疗, 可能逆转肾小球、肾小管病理改变, 但是, 一旦进入 IV 期, 病理改变就难以逆转, 因此, 在 DN 的治疗中应该早起诊断及治疗, 既往研究发现, GBM 成分改变及细胞外基质聚集是最终导致 DN 的关键病理改变, 然而这些研究并不能完全解释蛋白尿及肾小球滤过率的改变, 而近

期研究发现足突细胞的损伤在 DN 的发病中起了重要作用,而 nephrin 基因表达的 nephrin 蛋白在足突细胞的裂孔隔膜中起重要作用,是裂孔隔膜的主要成分^[7-9]。本实验研究大黄酸在早期使用,对足突细胞裂孔隔膜的主要成分 nephrin 基因表达的影响。

目前,国内外大部分研究,都是针对肾脏血管紧张素 II (Ang II) 升高的研究,研究认为高血糖等作用最终导致 Ang II 升高,使机体血流动力学的改变,从而让肾脏处于高压、高滤过、高灌注的病理性情况下,最终导致肾脏损伤^[10]。今年研究发现,使用血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitors, ACEI)、血管紧张素受体(ACEI)等药物阻断 Ang II 或者 AT1 发挥生物学效应。而针对足突细胞及 nephrin 基因的研究较少,足突细胞即肾足突细胞,小囊脏层上皮细胞,它附着于 GBM 的外侧,是一种高度分化和特异性的细胞,呈星状多突状,主要由 3 部分组成:细胞体、主突、足突,足突呈指状交叉覆盖于 GBM 外侧,并通过黏附分子及糖蛋白分子将二者相连,足突细胞之间由极薄的裂孔隔膜相连接,构成一种拉链式结构,从而与 GBM 及肾小球内皮细胞共同构成肾小球滤过屏障,是具有电荷及相对分子质量选择性的分子筛^[11-12]。正常情况下,这种电荷屏障及机械屏障能保持肾脏正常的滤过功能,然而在糖尿病病程进展过程中,由于高血压等诸多因素,可通过细胞内因子、活性氧基团及改变血流动力学等导致足突细胞的坏死及凋亡,足突细胞数目减少及功能减弱以及 GBM 的裸露等原因最终导致患者出现蛋白尿。近期研究发现,足突细胞的裂孔隔膜上的蛋白分子的表达与 nephrin 基因密切相关,而该基因与肾小球滤过屏障选择功能密切相关^[13-14],并且 nephrin 下调及重新分布先于肾小球组织损害,是 DN 病程中的早期改变,且 nephrin 表达与蛋白尿的程度呈负相关,而已经有研究发现缬沙坦在阻止了 nephrin 下调后,小鼠蛋白尿有明显下降^[15],然而针对 DM 引起足突细胞的损伤,除了严格控制血糖、抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 外,并无其他治疗方法,因此积极寻找抑制足突细胞损伤,控制 DN 病情进展的药物迫在眉睫。

近年来研究发现,大黄酸具有改善糖代谢,逆转胰岛素抵抗作用,对治疗 DN 有一定效果,但是大黄酸除了抑制内皮细胞 PAI-1 的表达,保护内皮功能逆转胰岛素抵抗预防糖尿病高血糖对肾脏的影响外,是不是还对肾脏足突细胞本身有一定作用,目前尚无研究。本实验采用 STZ 60 mg/kg 一次性腹腔注射方式制作大鼠 DN 模型,并给予大黄酸灌胃给药 8 周,后取肾脏行病理活检及免疫组化发现模型组与大黄酸治疗组比较, nephrin 表达下调受到抑制,与对照组比较差异有统计学意义,本实验研究发现大黄酸对 DN 不止与改善糖代谢、逆转胰岛素抵抗、抗炎等功能有关,而且与 nephrin 基因的表达有一定关系,可能是通过 nephrin 蛋白的损伤,维持足突细胞完整性有一定作用,但是最佳剂量及不良反应等尚需进一步实验来证实。

参考文献:

[1] Anderson S, Rrenner BM. Reduced permselectivity in isolated perfused rat kidneys following small elevations of

- glomerular capillary pressure[J]. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1994, 150(2): 201-209.
- [2] Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN, et al. From the periphery of glomerular capillary wall toward the center of disease podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2005, 54(6): 1626-1634.
- [3] Langham RC, Kelly DJ, Cox AJ, et al. Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein nephrin in diabetic nephropathy effects of angiotensin[J]. *Diabetologia*, 2002, 45(11): 1572-1576.
- [4] 管娜, 邓江红. 足细胞分子分布和表达与足突形态变化和蛋白尿发生的关系[J]. *北京大学学报: 医学版*, 2004, 36(2): 139-144.
- [5] Aatltonen P, Luimula P, Astrom E, et al. Changes in the expression of nephropathy[J]. *Lab Invest*, 2001, 81(9): 1185-1190.
- [6] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. *Analyti Bio*, 1987, 10(154): 125-128.
- [7] Shankland SJ, Scholey JW, Ly H. Expression of transforming growth- β_1 during diabetic renal hypertrophy[J]. *Clin Study*, 2012, 7(34): 862-870.
- [8] Ruano G, Fenton W, Kidd KK. Biphasic amplification of very dilute DNA samples via "booster" PCR[J]. *Nucl Aci Res*, 1989, 17(13): 335-350.
- [9] Ruano G, Kidd KK, Stephens C. Haplotype of multiple polymorphisms resolved by enzymatic amplification of single DNA molecules[J]. *Author Affiliations*, 2003, 23(4): 45-50.
- [10] Fujihara CK, Padilha RM, Zatz R. Glomerular abnormalities in long-term experimental diabetes; role of hemodynamic and nonhemodynamic factors and effects of antihypertensive therapy[J]. *Sym Dia Me*, 1992, 12(26): 689-695.
- [11] Remuzzi A, Perico N, Amuchastegui CS. Short and long-term effect of an angiotensin II receptor blockade in rats with experimental diabetes[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1993, 21(5): 214-219.
- [12] 何东元, 王笑云, 王宁宁, 等. 大黄酸抑制肾间质成纤维细胞激活的实验研究[J]. *中华肾脏病杂志*, 2006, 22(2): 105-108.
- [13] 攀均明, 唐嵘. 含马铃酸中草药及马兜铃酸肾病的熏蒸医学观点[J]. *中药药理与临床*, 2001, 12(6): 396-399.
- [14] Mauer SM, Steffes MW, Brown DM. Animal models of diabetic nephropathy[J]. *Adv Nephrol*, 1979, 12(8): 23-42.
- [15] Qsterby R, Gundersen HJG. The glomerular basement membrane in early diabetes[J]. *Front Matrix Biol*, 1979, 12(7): 72-77.