

· 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 ℃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 ℃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。

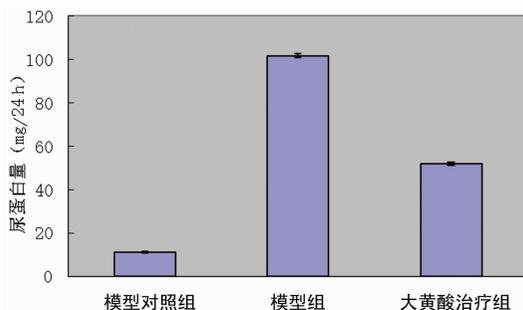


图 1 各组 24 h 尿蛋白量

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	<i>n</i>	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

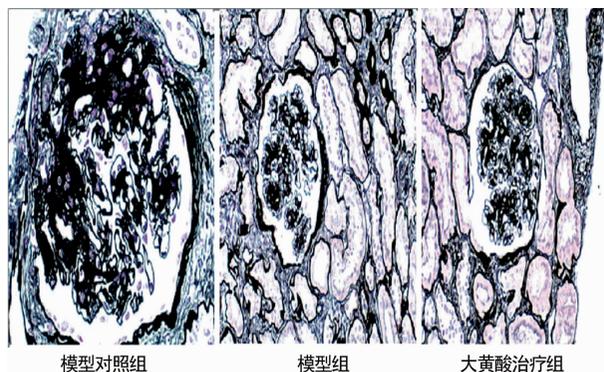


图 2 模型组肾小球病理改变电镜下图片(免疫组化,×1 000)

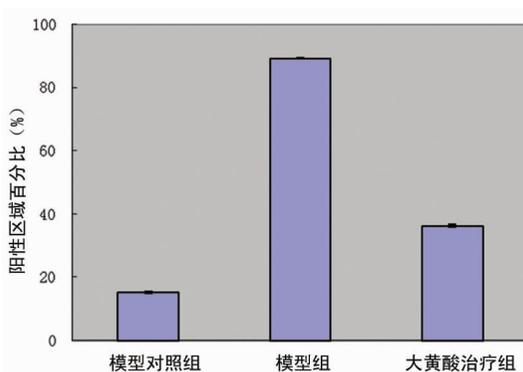


图 3 各组足突细胞 nephrin 表达

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(acting Research Bulletins, ARB)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.