

· 基础研究 ·

吡格列酮对糖尿病大鼠氧化应激和肾组织基质积聚的影响

张 红, 胡长军, 陆卫平

(南京医科大学附属淮安第一医院内分泌科, 江苏淮安 223300)

摘要:目的 研究吡格列酮对链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠氧化应激及肾组织细胞外基质蛋白积聚的影响。方法 将 45 只大鼠随机分为 3 组:正常对照组(NC 组),糖尿病对照组(DM 组),糖尿病吡格列酮治疗组(DP 组)。DP 组给予吡格列酮 $20\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃。8 周后观察大鼠肾指数(KI)、尿微量清蛋白(MAU)、肾组织丙二醛(MAD)、过氧化氢酶(CAT)、铜锌超氧化物歧化酶(Cu, Zn-SOD)等,光镜及超微电镜观察肾脏病理形态学改变,免疫组化法观察肾组织 IV 型胶原表达。结果 DM 组大鼠 KI、MAU、肾组织 MAD 水平显著高于 NC 组,并出现典型糖尿病肾病(DN)病理学损害,而 DP 组 KI、MAU、MAD 水平明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$);DM 组大鼠肾组织 CAT、Cu-ZnSOD 水平较 NC 组降低($P < 0.01$),DP 组 CAT、Cu-ZnSOD 显著上升($P < 0.01$)。DM 组大鼠肾组织 IV 型胶原表达明显增多,DP 组表达显著降低($P < 0.01$)。结论 吡格列酮可通过抑制氧化应激反应、减轻细胞外基质积聚,对 DN 起保护作用。

关键词:糖尿病肾病;氧化应激;IV 型胶原;吡格列酮

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.04.014

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)04-0349-03

Effect of pioglitazone on oxidative stress and accumulation of matrix in diabetic rats

Zhang Hong, Hu Changjun, Lu Weiping

(Department of Endocrinology, Affiliated Huaian No. 1 Hospital, Nanjing Medical

University, Huaian, Jiangsu 223300, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of pioglitazone on oxidative stress and accumulation of matrix in diabetic rats. **Methods** All rats were randomized into 3 groups: normal control rats (group NC), diabetic rats (group DM), diabetic rats treated with pioglitazone (group DP). After 8 weeks of treatment, the kidney index, microalbuminuria, malondialdehyde, catalase, Cu, Zn superoxide dismutase in nephridial tissue were measured by chromatometry, the pathologic change of kidney was measured. Furthermore, collagen-IV expression in kidney was observed by immunohistochemistry. **Results** The kidney index, microalbuminuria, MDA and the expression Col-IV in group DM were higher significantly than those in the group NC and group DP ($P < 0.01$). Moreover, CAT in the group DM was significantly lower than that in the other two groups ($P < 0.01$). **Conclusion** Pioglitazone improves diabetic nephropathy through downregulating the expression of TGF- β 1 and upregulating MMP-9 in diabetic rats.

Key words: diabetic nephropathies; oxidative stress; type IV collagen; pioglitazone

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的慢性微血管并发症之一,也是慢性肾功能衰竭和需要肾脏替代治疗的终末期肾衰(end-stage renal disease, ESRD)的主要原因。细胞外基质蛋白(extracellular matrix, ECM)在肾小球及间质的积聚是 DN 发生的中心环节,从而导致肾小球纤维化硬化的发生^[1]。Brownlee^[2]认为氧化应激是引起糖尿病慢性并发症的主要发病机制之一,在 DN 的发生、发展中起重要作用。研究表明,噻唑烷二酮类(thiazolidinediones, TZDs)药物对 DN 具有直接有益的保护作用,本实验以此为依据从生化指标、氧化应激、形态学改变、基质积聚表达等方面,研究吡格列酮(pioglitazone, PIO)对链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病大鼠肾脏保护作用及相关机制。

1 材料与方 法

1.1 材料 STZ 购自 Sigma 公司,丙二醛(malondialdehyde, MAD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、铜锌超氧化物歧化酶(Cu, Zn superoxide dismutase; Cu, Zn-SOD)由南京建成生物工程研究所提供,大鼠 IV 型胶原(type IV Collagen, Col-IV)抗体购自美国 Santa Cruz 公司,免疫组化二步法试剂盒购自北京中山公司,吡格列酮由江苏恒瑞医药公司提供。

1.2 方 法

1.2.1 模型建立和分组 STZ 60 mg/kg 一次性腹腔注射,48 h 测尾静脉血糖,持续大于 16.7 mmol/L 者确定为糖尿病大

鼠;将 SD 大鼠分 3 组:正常对照组(NC 组,15 只);糖尿病对照组(DM 组,15 只);糖尿病 PIO 治疗组(DP 组,15 只);20 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ PIO 无菌水混悬液灌胃^[3],其余予无菌水灌胃。

1.2.2 标本收集检测 8 周末代谢笼收集 24 h 尿,检测尿清蛋白(microalbuminuria, MAU),麻醉腹主动脉采血,检测糖化血红蛋白(HbA1c)、尿素氮(BUN)。肾指数(KI)以肾质量/体质量(g/kg)表示。肾脏称质量后用于 MAD、CAT、Cu 及 Zn-SOD 检测及电镜观察、蜡块制备。化学比色法测定 MDA、CAT 及 Cu, Zn-SOD 含量及活性,步骤按说明书操作。

1.2.3 免疫组化 Col-IV 采用二步法,步骤按说明书进行,显色强度用 LEICA Qwin 图像系统分析,以光密度(OD)值表示。

1.3 统计学处理 用 SPSS13.0 统计软件进行资料分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 生化指标及氧化应激水平结果 DM 及 DP 组 HbA1c 较 NC 组升高,DP 组与 DM 组 HbA1c 比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。DM 组及 DP 组的 KI、BUN、MAU 均高于 NC 组,DP 组显著低于 DM 组($P < 0.01$),见表 1。

2.2 肾组织氧化应激水平变化 PIO 治疗后的大鼠,肾组织 CAT 和 Cu, Zn-SOD 水平升高,而 MAD 水平被抑制($P < 0.01$),见表 2。

2.3 肾组织病理学变化 光镜下 DM 组大鼠肾小球细胞数显著增多,肾小球毛细血管狭窄甚至闭塞,电镜下见肾小球基底膜增厚,系膜细胞增生,足突微绒毛化,PIO 治疗后病理学损害明显改善,见图 1、2。

2.4 免疫组化 DM 组大鼠肾 Col-IV 在肾小球肾小管表达增多,DP 组大鼠 Col-IV 明显减低($P<0.01$),见图 3。染色强度 OD 值,见表 3。

表 1 各组大鼠 HbA1c、BUN、KI、MAU 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	HbA1c(%)	BUN(mmol/L)	KI(g/kg)	MAU($\mu\text{g}/\text{mg}$)
NC 组	3.54±0.45	5.76±1.03	3.52±0.39	8.05±2.05
DM 组	7.60±1.19*	18.80±2.87*	8.82±1.30*	118.24±9.48*
DP 组	7.41±0.94	11.05±2.24▲	5.56±0.83▲	68.23±9.64▲

*: $P<0.01$,与 NC 组比较;▲: $P<0.01$,与 DM 组比较。

表 2 各组大鼠 MAD、CAT、Cu-ZnSOD 比较($\bar{x}\pm s$)

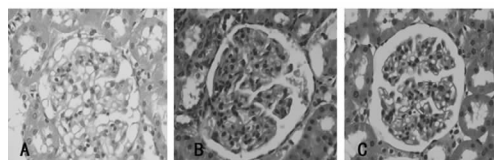
组别	MAD(mmol/mg)	CAT(U/mg)	Cu,Zn-SOD(U/mg)
NC 组	6.21±1.56	730.0±69.5	50.5±4.9
DM 组	11.35±2.77*	516.3±59.8*	39.6±5.2*
DP 组	7.81±1.94▲	688.5±78.2▲	46.7±6.1▲

*: $P<0.01$,与 NC 组比较;▲: $P<0.01$,与 DM 组比较。

表 3 各组大鼠肾组织Ⅳ型胶原蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

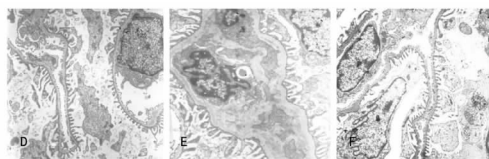
组别	C-Ⅳ
NC 组	33.22±5.15
DM 组	70.34±9.51*
DP 组	36.97±7.32▲

*: $P<0.01$,与 NC 组比较;▲: $P<0.01$,与 DM 组比较。



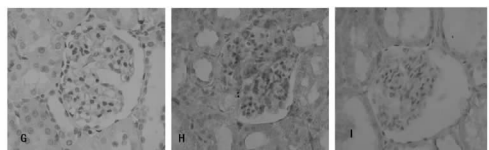
A: NC 组; B: DM 组; C: DP 组。

图 1 各组大鼠肾组织病理形态学变化(HE 染色, $\times 400$)



D: NC 组; E: DM 组; F: DP 组。

图 2 各组大鼠肾小球超微结构($\times 6000$)



G: NC 组; H: DM 组; I: DP 组。

图 3 大鼠肾组织 Col-IV 免疫组化表达变化(二步法, $\times 400$)

3 讨论

随着人们生活水平的提高及人口老龄化生活方式转变等,

糖尿病的患病率迅速增加,其中 1/3 的患者最终进展为 DN,由此也导致了 ESRD 的大量增长^[4-5]。但是 DN 发病机制尚未完全清楚,其中高血糖对 DN 的影响一直以来是人们关注的重要领域,长期高血糖引起的多元醇代谢通路的激活、蛋白质的非酶糖化、蛋白激酶 C 过度活化、己糖途径激活、葡萄糖转运蛋白活化等从不同作用环节促进了 DN 的病理进程^[6-7]。反应性氧簇(reactive oxygen species, ROS)是上述途径发挥作用的主要分子链,它通过促进 ECM 过表达,加速肾脏纤维化,最终导致 ESRD 的发生^[8-9]。

ROS 是超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)和羟自由基(OH^-)等活性含氧化合物的总称,氧化应激(oxidative stress, OS)时 ROS 产生增多和/或清除减少,导致其在体内蓄积而引起的分子、细胞和机体的损伤^[10]。MAD 是反应机体氧化能力的重要指标,在 DN 中的作用主要是与糖基化胶原蛋白发生交联反应,进而影响胶原蛋白的降解,使 ECM 积聚增加,加速 DN 进展^[11]。Col-IV 是肾小球基底膜和 ECM 的主要成分,故本实验选择 Col-IV 作为 DN 基质积聚的一项研究指标^[12]。SOD 是体内最重要的抗氧化酶之一,是清除 ROS 的第一道防线,Cu,Zn-SOD 存在于细胞质中,其主要作用是清除 O_2^- ,防止生物膜脂质过氧化损伤,故 SOD 水平的高低可间接反映机体的抗氧化能力。CAT 活性的降低可间接反映 H_2O_2 生成的减少,是反映机体抗氧化能力的重要指标之一^[13]。

临床上 PIO 主要用于治疗 2 型糖尿病,它通过结合并激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR- γ)进而调节与胰岛素效应有关的多种基因的转录,以此达到降低血糖的目的。PPAR- γ 除在胰岛素主要作用靶组织表达外,还表达于单核/吞噬细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、肾小球系膜细胞及上皮细胞等,它可以抑制成纤维细胞增殖和巨噬细胞浸润、抑制炎症介质,调节系膜细胞增殖和分化、抑制血管活性物质合成,提示 PIO 直接的肾脏保护作用可能与上述机制有关^[14]。

本试验结果显示,8 周时 DM 组大鼠的 MAU、KI、BUN 增加($P<0.01$),即出现肾脏肥大,尿蛋白排泄增加,病理形态上显示毛细血管狭窄或闭塞,系膜细胞增生,肾小球基底膜增厚,足突微绒毛化,说明模型已出现 DN 典型的功能改变及病理学异常。DM 组大鼠肾组织中 MDA 含量明显高于 NC 组,而 Cu,Zn-SOD 和 CAT 活性明显下降($P<0.01$),说明糖尿病大鼠肾组织氧化效应增强,抗氧化能力下降,即氧化应激反应出现。PIO 治疗 8 周后的 DP 组大鼠,肾脏肥大减轻,尿蛋白排泄减少,病理学损害改善,同时 MAD 水平下降,Cu,Zn-SOD 和 CAT 活性增强($P<0.01$)。免疫组化结果显示,DM 组大鼠 Col-IV 蛋白在肾小球表达增多,PIO 治疗后,Col-IV 表达减少($P<0.01$),而 HbA1c 并未降低($P>0.05$),说明 PIO 治疗可通过下调 MDA 水平、提高 Cu,Zn-SOD 和 CAT 的活性,有效地抑制基质积聚,进而延缓 DN 病理学进程,而且这种作用并未依赖血糖水平的降低。

综上所述,PIO 具有 DN 的保护作用,它可以通过抑制氧化应激介导的基质积聚而实现,且这种作用并不依赖血糖水平的降低,具有直接的肾脏保护作用。研究表明,TZDs 同时具有控制血糖、调节血压、改善血脂、抑制细胞周期进展、调节细胞因子及炎症因子表达等作用^[15]。关于 PIO 的 DN 保护作用需要更多的研究证实。

参考文献:

[1] Han SY, Jee YH, Han KH, et al. An imbalance between

- matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 contributes to the development of early diabetic nephropathy [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2006, 21(9): 2406-2416.
- [2] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications[J]. *Nature*, 2001, 414(6865): 813-820.
- [3] 李红, 郑芬萍, 阮昱, 等. 吡格列酮对糖尿病大鼠肾皮质 TGF- β 基因表达的抑制作用[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2003, 19(3): 238-239.
- [4] Scherthaner G. Kidney disease in diabetology: lessons from 2009 [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(2): 360-363.
- [5] Biesenbach G. Highest mortality during the last year before and the first year after start of dialysis treatment in type 2 diabetic patients with nephropathy[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2007, 3(2): 123-126.
- [6] Abe H. Recent progress in understanding the molecular pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Rinsho Byori*, 2011, 59(2): 179-186.
- [7] Chang CC, Chang CY, Wu YT, et al. Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein kinase [J]. *J Biomed Sci*, 2011, 18(1): 47.
- [8] Choudhury D, Tuncel M, Levi M. Diabetic nephropathy—a multifaceted target of new therapies [J]. *Discov Med*, 2010, 10(54): 406-415.
- [9] Kashiwara N, Haruna Y, Kondeti VK, et al. Oxidative stress in diabetic nephropathy [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(34): 4256-4269.
- [10] Ray G, Husain SA. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis [J]. *Indian J Exp Biol*, 2002, 40(11): 1213-1232.
- [11] Agavwal R. Smoking, oxidative stress and inflammation: impact on resting energy expenditure in diabetic nephropathy [J]. *BMC Nephrol*, 2005, 6(11): 13-22.
- [12] Guo B, Koya D, Isono M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit TGF- β_1 -induced fibronectin expression in glomerular mesangial cells [J]. *Diabetes*, 2004, 53(1): 200-208.
- [13] Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes [J]. *Diabetes*, 2008, 57(6): 1446-1454.
- [14] de Pablos-Velasco P. Pioglitazone: beyond glucose control [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2010, 8(8): 1057-1067.
- [15] Biscetti F, Straface G, Pitocco D, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors and angiogenesis [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2009, 19(11): 751-759.

(收稿日期: 2011-03-16 修回日期: 2011-05-22)

(上接第 348 页)

- with hyperbaric oxygen therapy [J]. *Int Orthop*, 2009, 33(2): 441-446.
- [4] 帕丽旦, 吉米兰木, 地丽达尔. 高压氧综合治疗糖尿病足的临床疗效观察 [J]. *中华航海医学与高气压医学杂志*, 2008, 15(4): 248-249.
- [5] Kalani M, Jörneskog G, Naderi N, et al. Hyperbaric oxygen (HBO) therapy in treatment of diabetic foot ulcers [J]. *J Diabetes Complications*, 2002, 16(2): 153-158.
- [6] Kang TS, Gorti GK, Quan SY, et al. Effect of hyperbaric oxygen on the growth factor profile of fibroblasts [J]. *Arch Facial Plast Surg*, 2004, 6(1): 31-35.
- [7] Norgauer J, Hildenbrand T, Idzko M, et al. Elevated expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) and membrane-type matrix metalloproteinases in venous leg ulcers [J]. *Br J Dermatol*, 2002, 147(6): 1180-1186.
- [8] Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G, et al. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29(1): 5-17.
- [9] Abidia A, Laden G, Kuan G, et al. The role of hyperbaric oxygen therapy in ischaemic diabetic lower extremity ulcers: a double-blind randomized-controlled trial [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2003, 25(6): 513-518.
- [10] Kessler L, Bibault P, Ortéga F, et al. Hyperbaric oxygenation accelerates the healing rate of nonischemic chronic diabetic foot ulcers: a prospective randomized study [J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(8): 2378-2382.
- [11] Shyu KG, Hung HF, Wang BW, et al. Hyperbaric oxygen induces placental growth factor expression in bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Life Sci*, 2008, 83(1/2): 65-73.
- [12] Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, et al. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin [J]. *Circulation*, 2010, 101(6): 676-681.
- [13] Schwentker A, Billiar TR. Nitric oxide and wound repair [J]. *Surg Clin North Am*, 2003, 83(3): 521-530.
- [14] Boykin JV Jr, Baylis C. Hyperbaric oxygen therapy mediates increased nitric oxide production associated with wound healing: a preliminary study [J]. *Adv Skin Wound Care*, 2007, 20(7): 382-388.
- [15] Chen SJ, Yu CT, Cheng YL, et al. Effects of hyperbaric oxygen therapy on circulating interleukin-8, nitric oxide, and insulin-like growth factors in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Clin Biochem*, 2007, 40(1/2): 30-36.
- [16] Shi HP, Most D, Efron DT, et al. Supplemental L-arginine enhances wound healing in diabetic rats [J]. *Wound Repair Regen*, 2003, 11(3): 198-203.

(收稿日期: 2011-05-09 修回日期: 2011-07-22)