

• 基础研究 •

缬沙坦对糖尿病大鼠肾脏的保护作用与机制探讨

赵红霞¹, 赵建芹², 刘元涛³, 姜兆顺^{2△}

(1. 山东省临邑县人民医院内分泌科 251500; 2. 济南军区总医院内分泌科, 济南 250031;

3. 山东大学第二医院内分泌科, 济南 250033)

摘要:目的 探讨缬沙坦对糖尿病大鼠肾脏病变的影响及其作用机制。方法 将 20 只糖尿病大鼠随机分为糖尿病组(DM 组)、糖尿病缬沙坦治疗组(DMV 组), 无糖尿病大鼠作为正常对照组(NC 组)。12 周后, 取血测定血糖(BG)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)及 24 h 尿清蛋白(UAE)。光镜下观察肾小球形态、结构并计算平均肾小球截面(MGA)、平均肾小球体积(MGV)。免疫组织化学法检测肾组织单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)表达。结果 大鼠 BG、TG、TC、Scr、BUN、UAE 及肾组织 MCP-1 表达 DM 组分别为(18.30±0.82)mmol/L、(1.97±0.08)mmol/L、(3.22±0.07)mmol/L、(41.0±2.16) μ mol/L、(9.87±0.19)mmol/L、(25.99±0.52)mg/24 h、12.17±1.94, DMV 组分别为(17.89±0.79)mmol/L、(1.94±0.06)mmol/L、(3.20±0.05)mmol/L、(38.9±0.99) μ mol/L、(9.05±1.02)mmol/L、(19.87±0.78)mg/24 h、9.08±1.2, 与对照组[(6.10±0.06)mmol/L、(0.58±0.04)mmol/L、(1.41±0.07)mmol/L、(32.9±2.13) μ mol/L、(6.60±0.37)mmol/L、(4.95±0.27)mg/24 h、1.19±0.70]比较差异有统计学意义($P<0.05$); 肾组织 MCP-1 蛋白表达与 24 h 尿 UAE 定量呈正相关($r=0.943, P<0.05$); 与 Scr 水平呈正相关($r=0.823, P<0.05$)。结论 缬沙坦对糖尿病大鼠肾脏病变有一定的保护作用。抑制 MCP-1 蛋白表达, 可能是其保护作用机制之一。

关键词: 肾病; 糖尿病并发症; 趋化因子 CCL2; 缬沙坦

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.13.024

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)13-1305-02

Study on protective effects and mechanisms of valsartan on rat diabetic nephropathy

Zhao Hongxia¹, Zhao Jianqin², Liu Yuantao³, Jiang Zhaoshun^{2△}

(1. Department of Endocrinology, Linyi People's Hospital, Linyi, Shandong 251500, China; 2. Department of Endocrinology, General Hospital of Jinan Military Region, Jinan, Shandong 250031, China; 3. Department of Endocrinology, Second Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250033, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of valsartan on diabetic nephropathy in rats and to explore its action mechanisms. **Methods** High-fat diet in combination with abdominal injection of low-dose of streptozocin(STZ) was used to induce diabetes in Wistar rats. Diabetic rats were randomly divided into none-treated group(DM) and valsartan treated group(DMV). None diabetic normal Wistar rats were served as controls(NC). After 12 weeks of treatment, blood glucose(BG), triglyceride(TG), total cholesterol(TC), serum creatinine(Scr), urea nitrogen(BUN) and 24 h urinary albumin excretion(UAE) were measured. HE staining was performed on renal tissues for light microscopy examination of glomerular structure and measurements of mean glomerular area(MGA) and mean glomerular volume(MGV). The expression of MCP-1 was detected by immunohistochemical method. **Results** Serum BG, TG, TC, Scr, BUN, UAE and MCP-1 expression in renal tissues were(18.30±0.82)mmol/L, (1.97±0.08)mmol/L, (3.22±0.07)mmol/L, (41.0±2.16) μ mol/L, (9.87±0.19)mmol/L, (25.99±0.52)mg/24 h and 12.17±1.94 in the DM group; (17.89±0.79)mmol/L, (1.94±0.06)mmol/L, (3.20±0.05)mmol/L, (38.9±0.99) μ mol/L, (9.05±1.02)mmol/L, (19.87±0.78)mg/24 h and 9.08±1.2 in the DMV group; (6.10±0.06)mmol/L, (0.58±0.04)mmol/L, (1.41±0.07)mmol/L, (32.9±2.13) μ mol/L, (6.60±0.37)mmol/L, (4.95±0.27)mg/24 h and 1.19±0.70 in the control group, showing statistical difference($P<0.05$). The MCP-1 expression in renal tissues was positively correlated with UAE and Scr($r=0.943, r=0.823, P<0.05$). **Conclusion** Valsartan has the protective effects on diabetic nephropathy. One of the mechanisms may be thought to be the suppression of the renal MCP-1 expression.

Key words: nephrosis; diabetes complications; chemokine CCL2; valsartan

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病致死、致残的重要原因之一。其发病机制是多方面的, 其中肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)激活在 DN 的发生与发展过程中具有重要作用。临床资料显示, 血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACE-I)以及血管紧张素 II 受体阻断剂(angiotensin-II receptor blocker, ARB)可通过抑制 RAS 系统对 DN 发挥一定的保护作用^[1]。单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)是一种趋化因子, 对单核细胞和 T 细胞具有强大的趋化活性。研究证实, 高血糖、糖基化终末产物等均能促

进肾脏 MPC-1 的表达增加, 而 MPC-1 的过度表达与 DN 的发生有密切关系^[2]。ARB 对 DN 的保护作用是否与调控 MPC-1 的表达有关目前尚未完全阐明。现将缬沙坦对糖尿病大鼠肾脏的保护作用与机制探讨报道如下。

1 材料与方法

1.1 试剂 兔抗大鼠 MPC-1 一抗(武汉博士德)、链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, 美国 Sigma 公司)、血糖试纸(强生公司)、缬沙坦(北京诺华制药公司)等。

1.2 动物模型建立与分组 12 周清洁级健康雄性 Wistar 大鼠[体质量(200±20)g]购自山东大学实验动物中心。单只分

表 1 3 组 BW、BG、TG、TC、Scr、BUN、BUN、MCP-1 蛋白表达比较 (n=10, $\bar{x}\pm s$)

组别	体质量(g)	BG (mmol/L)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	Scr (μ mol/L)	BUN (mmol/L)	UAE (mg/24 h)	MCP-1
NC 组	363.50 $\pm$ 33.36	6.10 $\pm$ 0.06	0.58 $\pm$ 0.04	1.41 $\pm$ 0.07	32.9 $\pm$ 2.13	6.60 $\pm$ 0.37	4.95 $\pm$ 0.27	1.19 $\pm$ 0.70
DM 组	233.70 $\pm$ 25.23*	18.30 $\pm$ 0.82*	1.97 $\pm$ 0.08*	3.22 $\pm$ 0.07*	41.0 $\pm$ 2.16*	9.87 $\pm$ 0.19*	25.99 $\pm$ 0.52*	12.17 $\pm$ 1.94*
DMV 组	251.40 $\pm$ 26.78*	17.89 $\pm$ 0.79*	1.94 $\pm$ 0.06*	3.20 $\pm$ 0.05*	38.9 $\pm$ 0.99* Δ	9.05 $\pm$ 1.02* Δ	19.87 $\pm$ 0.78* Δ	9.08 $\pm$ 1.20* Δ

*: P<0.05, 与 NC 组比较; Δ : P<0.05, 与 DM 组比较。

笼饲养,自由饮水,室温 8~20℃。适应性喂养 1 周后随机取 10 只作为正常对照组(NC 组)喂养普通饲料。其余 20 只喂养高脂、高糖饲料(由普通鼠饲料加蔗糖、炼猪油和蛋黄按比例搭配制作而成,其中猪油 18%,蔗糖 20%,蛋黄 3%,基础饲料 59%),喂养 4 周后造模,造模前禁食 12 h,按 35 mg/kg 单次腹腔注射 STZ 溶液,NC 组注射柠檬酸缓冲液,2 周后尾静脉采血,将血糖大于或等于 16.7 mmol/L 确定为糖尿病模型动物。将成膜 20 只糖尿病大鼠随机分为糖尿病组(DM 组,10 只),缬沙坦治疗组(DMV 组,10 只)。DMV 组给予缬沙坦 10 mg/(kg·h)灌胃,NC、DM 组每日给予等量饮用水灌胃。

1.3 生化指标检测 血糖(blood glucose,BG)、三酰甘油(triglycerides,TG)、总胆固醇(total cholesterol,TC),肌酐(serum creatinine,Scr)、尿素氮(urea nitrogen,BUN)及 24 h 尿清蛋白(urinary albumin excretion,UAE)用美国 Beckcoulter GXC800 型自动生化分析仪测定。

1.4 UAE 测定 给药 12 周后,于代谢笼中收集 24 h 尿液。散射比浊法测定 UAE。

1.5 肾脏组织形态学观察 乙醚麻醉,眼眶静脉取血,然后取左侧肾脏,置于 4%多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋,制成 4 μ m 石蜡切片,行 HE 及免疫组织化学染色。在光镜下观察肾脏组织形态学变化。采用 HPLAS-1000 型医学图像分析仪计算肾小球平均截面积(mean glomerular area,MGA)、肾小球平均体积(mean glomerular volume,MGV)。每个肾脏标本切片随机测量 20 个肾小球,取其平均值。考虑到肾小球包膜囊腔大小不等,而毛细血管丛能比较客观反映肾小球的变化,故肾小球 MGA 以肾小球毛细血管面积计算。根据公式肾小球体积=1.25 $\times$ 肾小球截面积 3/2,计算出每张切片的 MGv。

1.6 免疫组织化学法检测 MCP-1 在大鼠肾脏组织中的分布及表达水平 二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水;磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution,PBS)漂洗 2 min $\times$ 3 次;将切片浸入盛有 0.01 M 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)的高压锅中,加热,出蒸汽维持 3 min 后,取出切片冷却;3% H₂O₂ 去离子水室温孵育 5 min 以灭活内源性酶,蒸馏水漂洗 2 min $\times$ 3 次;PBS 液漂洗 2 min $\times$ 3 次;滴加封闭用正常山羊血清工作液,室温孵育 10 min,倾去,勿洗;加兔抗大鼠 MCP-1 一抗(1:200 稀释),4℃过夜;复温 10 min,PBS 液冲洗 2 min $\times$ 3 次;滴加生物素化二抗;37℃孵育 20 min;PBS 液漂洗 5 min $\times$ 3 次;37℃1 h;0.01 M PBS 2 min $\times$ 3 次;取 1 mL 蒸馏水,加 DAB 显色试剂盒中 A、B、C 液各 1 滴,混匀后加至切片显色。流水冲洗 20 min;苏木素复染,1%盐酸乙醇分色,1/400 氨水返蓝,流水冲洗 10 min;梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。采用 HPLAS-1000 型医学图像分析系统进行分析,每张切片随机选取 10 个肾小球,分别检测每个肾小球视野内 MCP-1 抗体染色阳性细胞数,以均值表示每例肾小球中阳性细胞数。

1.7 统计学处理 应用 SPSS16.0 统计软件进行实验数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA),任意两组间比较用 Student-Newman-Keuls 检验,直线相关用 Pearson 相关分析,以 P<0.05 为差异有统计

学意义。

2 结 果

直线相关分析显示肾组织 MCP-1 的表达与 24 h 尿 UAE 定量呈正相关($r=0.943,P<0.01$);与 Scr 水平呈正相关($r=0.823,P<0.05$)。3 组体质量、BG、TG、TC、Scr、UAE、BUN、MCP-1 蛋白比较见表 1。缬沙坦对糖尿病大鼠肾脏病理改变的影响见图 1。

3 讨 论

近年来,随着人们生活方式的改变,我国糖尿病患病率急剧增加。最新统计资料显示,我国 20 岁以上成年人 2 型糖尿病人数已达到 92.4 万^[3]。DN 是糖尿病的严重并发症之一,也是糖尿病致死、致残的重要原因。据研究,约 20%~40% 的糖尿病患者将最终需要进行肾脏移植以维持生命^[4-5]。因此, DN 不但给社会造成极大的经济负担,同时也严重影响了患者的生活质量。

DN 的发生是一个复杂过程,其机制目前仍未完全阐明。RAS 是一个激素级联系统,对动脉血管压力及水、电解质平衡具有重要调节作用。此外,RAS 系统对于控制肾小球内压也具有重要作用,而 RAS 系统的过度激活与 DN 的发生、发展具有密切关系^[6]。临床资料证实,抑制 RAS 系统对糖尿病患者微量清蛋白尿的发生具有预防作用,而这一作用并不完全依赖于 RAS 抑制剂的降压作用^[7]。

近年的研究发现 MCP-1 过度表达与 DN 有密切关系^[8]。除了血流动力学的改变之外,肾脏的氧化应激及炎症反应与 DN 的发生也具有密切关系^[9]。MCP-1 是介导炎症反应的关键细胞因子,属于趋化因子超家族,是作用于单核细胞特异的趋化蛋白,通过募集单核细胞在肾小球或间质浸润参与早期 DN 的发生。正常情况下,体内 MCP-1 呈低水平表达,糖尿病时体内高 BG、蛋白非酶糖基化产物等可上调 MCP-1 的表达^[10-11]。大量表达的 MCP-1 介导单核巨噬细胞在肾脏的聚集、活化。活化的单核巨噬细胞释放多种活性介质,导致细胞外基质产生增加,从而导致肾小球硬化和肾间质纤维化。除了通过募集炎症细胞间接发挥作用外,最近体外研究发现,MCP-1 可通过与系膜细胞表面的受体结合,通过激活细胞内的信号系统,直接促进细胞外基质基因的表达^[12]。

本研究发现,糖尿病大鼠肾组织 MCP-1 表达明显升高,并与微量清蛋白尿及 Scr 呈正比;而缬沙坦可明显抑制 MCP-1 表达的同时,降低了微量清蛋白尿及 Scr,从而进一步证实 MCP-1 上调是导致 DN 的重要机制之一。关于缬沙坦如何抑制 MCP-1 的表达,其机制尚不清楚。有研究发现在胰腺导管腺癌细胞,血管紧张素 II(AT II)与细胞表面受体结合,可通过激活 ERK 途径,使 MCP-1 表达增加^[13]。有研究发现^[9],JNK 蛋白激酶(c-Jun N-terminal kinase)的激活可促进 MCP-1 表达。缬沙坦是否通过降低 JNK 蛋白激酶活性而抑制 MCP-1 的表达有待于进一步研究。

综上所述,虽然缬沙坦显著降低了清蛋白尿及 Scr,同时改善了系膜增殖,但却并不能完全防止 DN(下转第 1309 页)

他问题,如消化系统疾病、面部美观和发音等。

参考文献:

[9] 张永辉,王征兵. 中国农村居民自评健康状况的实证分析[J]. 中南财经政法大学学报,2009,52(5):31-36.

[1] 顾杏元. 农村卫生调查统计[J]. 中国农村卫生事业管理, 1999,19(3):52-57.

[2] 王素华. SF-36 健康调查表的应用[J]. 国外医学社会医学分册,2003,10(2):266-268.

[3] 许军,王斌会,胡敏燕,等. 自测健康评定量表的研制与考评[J]. 中国行为医学科学,2000,9(1):65-68.

[4] Orifila F,Ferret M,Lamarca R,et al. Evolution of self-rated health status in the elderly:cross sectional vs longitudinal estimates[J]. Clin Epidemiol,2000,53(6):563-570.

[5] Doorslaer E,Gerdtham UG. Does inequality in self-assessed health predict inequality in survey by income? Evidence from Swedish data[J]. Soc Sci Med,2003,57(9):1621-1629.

[6] 赵忠,侯振刚. 中国城镇居民的健康需求与 Grossman 模型[J]. 经济研究,2005,8(10):79-90.

[7] 谷琳,乔晓春. 中国老年人健康自评影响因素分析[J]. 人口学刊,2006,15(6):25-29.

[8] 周佳,毛勇,许传志. 泸水县不同民族农村居民行为和自

评健康状况调查[J]. 卫生软科学,2010,24(2):173-175.

[10] 李坚,Fielding R,Hedley AJ,等. 自评健康的概念及其重要性[J]. 中国社会医学,1995,58(3):11-12.

[11] 李坚. 自感健康与客观健康的关系[J]. 暨南大学学报:自然科学版,2001,22(1):139-142.

[12] Wolinsky FD,Culler SD,Callahan CM,et al. Hospital resource consumption among older adults:a prospective analysis of episodes, length of stay, and charges over a seven-year period[J]. J Genontol,1994,49(5):240-252.

[13] 刘丽娜,徐凌中,朱敏,等. 农村居民自感健康状况及其影响因素[J]. 医学与社会,2006,19(8):4-6.

[14] 张永辉,王征兵. 我国农村居民自评健康状况的 Logistic 模型分析[J]. 西北工业大学学报,2009,29(3):59-62.

[15] 唐颖,曲江斌,张西凡. 农村社会经济发展与农民自感健康问题探析[J]. 卫生软科学,2005,19(4):119-120.

[16] 李慧娟. 农村居民自感健康状况及其影响因素分析[J]. 中国公共卫生,2008,24(7):851-853.

(收稿日期:2011-11-25 修回日期:2012-02-28)

(上接第 1306 页)

的发生,从而进一步提示 DN 的发生是多种机制共同作用的结果。高 BG 是导致 DN 的始动因素,缬沙坦对 BG 无显著影响。因此,包括降糖治疗在内的各种综合措施对 DN 的防治是非常必要的。

参考文献:

[1] Ruggenenti P,Cravedi P,Remuzzi G,et al. The RAAS in the pathogenesis and treatment of diabetic nephropathy[J]. Nat Rev Nephrol,2010,6(6):319-330.

[2] Park J,Ryu DR,Li JJ,et al. MCP-1/CCR2 system is involved in high glucose-induced fibronectin and type IV collagen expression in cultured mesangial cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2008,295(3):749-757.

[3] Yang WY,Lu JM,Weng JP,et al. Prevalence of diabetes among man and women in China[J]. N Engl J Med,2010,12(3):1090-1101.

[4] Hakim FA,Pflueger A. Role of oxidative stress in diabetic kidney disease[J]. Med Sci Monit,2010,16(2):37-48.

[5] Kamioka M,Ishibashi T,Sugimoto K,et al. Blockade of renin-angiotensin system attenuates advanced glycation end products-mediated signaling pathways[J]. J Atheroscler Thromb,2010,17(6):590-600.

[6] Perico N,Benigni A,Remuzzi G. Present and future drug treatments for chronic kidney diseases:evolving targets in renoprotection[J]. Nat Rev Drug Discov,2008,7(11):936-953.

[7] Ruggenenti P,Fassi A,Ilieva AP,et al. Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes[J]. N Engl J Med, 2004,351(19):1941-1951.

[8] Tarabra E,Giunti S,Barutta F,et al. Effect of the monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine receptor 2 system on nephrin expression in streptozotocin-treated mice and human cultured podocytes[J]. Diabetes,2009,58(9):2109-2118.

[9] Wu J,Mei C,Vlassara H,et al. Oxidative stress-induced JNK activation contributes to proinflammatory phenotype of aging diabetic mesangial cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2009,297(6):1622-31.

[10] Lee S,Kim B,Sik Y,et al. High glucose induces MCP-1expression partly via tyrosine kinase-AP-1 pathway in peritoneal mesothelial cells[J]. Kidney Int,2001,60(1):55-64.

[11] Ehlermann P,Eggers K,Bierhaus A,et al. Increased proinflammatory endothelial response to S100A8/A9 after preactivation through advanced glycation end products[J]. Cardiovasc diabetol,2006,5(6):1-9.

[12] Giunti S,Tesch GH,Pinach S,et al. Monocyte chemoattractant protein-1 has prosclerotic effects both in a mouse model of experimental diabetes,and in vitro in human mesangial cells[J]. Diabetologia,2008,51(1):198-207.

[13] Chehl N,Gong Q,Chipitsyna G,et al. Angiotensin II regulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in pancreatic cancer cells[J]. J Gastrointest Surg, 2009,13(12):2189-2200.

(收稿日期:2011-12-27 修回日期:2012-02-05)