

· 论 著 ·

厄贝沙坦对 2 型糖尿病大鼠肾小管上皮细胞 MMP-2/TIMP-2 和 α -SMA 表达关系的影响

李 华,董骏武,吴 扬,宋小红,李承旭,蔡 源

(华中科技大学同济医学院附属普爱医院肾内科,武汉 430030)

摘 要:目的 探讨血管紧张素 II (Ang II) 1 型受体拮抗剂(ARB)厄贝沙坦对 2 型糖尿病(T2DM)大鼠肾小管上皮细胞基质金属蛋白酶-2(MMP-2)/基质金属蛋白酶组织抑制物-2(TIM-2)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达关系的影响及其肾脏功能保护的可能机制。方法 将实验大鼠随机分成正常对照组(A 组)、糖尿病组(B 组)、厄贝沙坦治疗组(C 组),8 周时用免疫组织化学法检测肾脏 α -SMA、MMP-2、TIMP-2 表达并进行相关分析。结果 (1)与 A 组比较,B 组大鼠肾脏 α -SMA、TIMP-2 表达明显增强,MMP-2 表达减弱($P < 0.05$);(2) α -SMA 蛋白含量与肌酐清除率(Ccr)、MMP-2 呈明显的负相关;与 TIMP-2 蛋白含量之间呈正相关。结论 糖尿病肾病(DN)存在肾小管间质纤维化的病理变化,且与肾功能密切相关;MMP-2/TIMP-2 与肾小管纤维化密切相关;厄贝沙坦具有延缓肾小管纤维化进展的作用。

关键词:厄贝沙坦;糖尿病,2 型; α -平滑肌肌动蛋白;基质金属蛋白酶-2;基质金属蛋白酶组织抑制物-2

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.29.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)29-3030-03

Effect of ebesartan on expression of the relationship of renal tubular epithelial cells MMP-2/TIMP-2 and α -SMA in type 2 diabetes

Li Hua, Dong Junwu, Wu Yang, Song Xiaohong, Li Chengxu, Cai Yuan

(Department of Nephrology, Puai Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To investigate effect of angiotensin II (Ang II) type 1 receptor block ebesartan on expression of renal MMP-2/TIMP-2 and α -SMA in rats with type 2 diabetes. **Methods** All rats were divided into control group(group A), diabetes mellitus group(group B) and treating group(group C). Type 2 diabetic rats were treated with ebsartan or vehicle respectively. Immunohistochemistry was used to measure expression of MMP-2, TIMP-2 and α -SMA at 8th week. **Results** (1) In the group B, expression of α -SMA and TIMP-2 were significant higher than the group A and was lower in MMP-2 expression($P < 0.05$). (2) α -SMA had a significant negative correlation with tubular MMP-2 protein expression and Ccr, and a positive correlation with TIMP-2 expression. **Conclusion** Tubulointerstitial fibrosis was involved in the pathogenesis of the injury of type 2 diabetic nephropathy. Ebesartan can restrain the process of Tubulointerstitial fibrosis in type 2 diabetic rats.

Key words: ebesartan; diabetes mellitus, type 2; α -smooth muscle actin; matrix metalloproteinase-2; tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2

近年大量研究发现,糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)时肾小管病变及小管间质纤维化对肾功能的影响较肾小球病变更为重要,肾小管上皮细胞-肌成纤维细胞转分化(tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation, TEMT)是肾间质纤维化的重要发病机制之一,抑制或逆转肾小管上皮细胞转分化对延缓肾功能衰竭具有重要的临床意义^[1]。研究表明,基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)参与早期 DN 肾小球基底膜的损伤及肾小管萎缩和肾间质纤维化^[2],血管紧张素 II (Ang II)参与肾管端小管细胞 MMP-2 的表达调节^[3],本研究的目的旨在观察血管紧张素 II 1 型受体拮抗剂(ARB)厄贝沙坦对 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)大鼠肾小管上皮细胞 MMP-2 及 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)表达关系的影响,探讨厄贝沙坦的肾脏保护作用及其可能机制。

1 材料与方

1.1 动物模型的建立与分组 18 只清洁级健康雄性 Wistar

大鼠,体质量 180~200 g(购自华中科技大学同济医学院动物实验中心,为同一批繁殖),给予基础饲料(蛋白质 22%,脂肪 10%,碳水化合物 60%,其他 8%)喂养适应环境 2 周后,随机分为正常对照组(A 组)6 只和模型组 12 只, A 组继续予以基础饲料喂养,模型组则参照文献[4]建立 T2DM 大鼠模型,先喂以高糖、高脂饲料(常规饲料加 20%蔗糖、10%猪油、2.5%胆固醇),4 周后左下腹单次注射小剂量链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,30 mg/kg 溶于 0.1%柠檬酸缓冲溶液, pH 4.4),以非空腹血糖大于或等于 16.7 mmol/L、伴胰岛素敏感性降低作为 T2DM 大鼠模型成功标准。造模成功后将成模动物再随机分成 DM 对照组(B 组)及厄贝沙坦治疗组(C 组)各 6 只, C 组在造模成功后即开始喂服厄贝沙坦($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,杭州赛诺菲安万特民生制药有限公司),B 组则以等体积蒸馏水灌胃。

1.2 标本的收集与处理 于 8 周末,各组大鼠用代谢笼收集 24 h 尿, -30℃ 保存,次日用乙醚麻醉,从心脏采血,留取血、

表 1 各组动物生化指标及肾脏病变情况(±s)

组别	<i>n</i>	体质量(g)	血糖 (mmol/L)	血三酰甘油 (mmol/L)	胆固醇 (mmol/L)	胰胰岛素 (μIU/L)	高密度脂蛋白 (mmol/L)
A 组	6	223.00±9.70	6.80±0.71	0.87±0.10	1.98±0.10	20.50±1.46	1.57±0.08
B 组	6	63.33±12.69 ^a	4.43±0.84 ^a	1.66±0.06 ^a	2.89±0.14 ^a	38.00±1.22 ^a	1.60±0.07
C 组	6	246.00±8.33 ^a	13.78±0.73 ^a	1.57±0.06 ^a	2.75±0.15 ^a	35.21±0.79 ^a	1.61±0.06

续表 1 各组动物生化指标及肾脏病变情况(±s)

组别	<i>n</i>	低密度脂蛋白 (mmol/L)	肾重指数 (mg/g)	24 h 尿清蛋白排泄量 (mg)	内生肌酐清除率 (mL/min)	肾小管损伤 指数
A 组	6	3.99±0.26	0.35±0.05	1.12±0.42	3.15±0.13	0.10±0.02
B 组	6	5.27±0.21 ^a	0.95±0.09 ^a	8.34±0.21 ^a	1.25±0.08 ^a	4.75±0.42 ^a
C 组	6	4.05±0.14 ^a	0.91±0.11 ^b	1.28±1.12 ^b	2.27±0.13 ^b	2.39±0.36 ^{ab}

q≥3.49,^a:*P*<0.05,与 A 组比较;*q*≥2.89,^b:*P*<0.05,与 B 组比较。

尿标本后立即打开腹腔,游离并取出双肾,以 4℃生理盐水洗净,小心剥去肾包膜,再以 4℃生理盐水冲洗肾血管 3 次,右肾称质量后,以 10%中性甲醛固定,石蜡包埋,制成 2 μm 厚切片。

1.3 生化指标检测 留取的血、尿标本检测血糖、血肌酐、尿肌酐、尿清蛋白(免疫散射比浊法)、胰胰岛素(放射免疫法)等指标,并参照有关公式计算内生肌酐清除率(Ccr)。

1.4 组织病理学观察 石蜡切片 HE、PAS 染色,光镜下观察肾组织形态学改变,采用 HPIAS-1000 型医学图像分析系统 6.0,每只动物选 2 张切片,每张切片在高倍镜下连续观察 50 个视野,按肾小管上皮细胞扩张、萎缩、炎性细胞浸润、肾间质纤维化等病变程度,将肾小管损伤分为 4 级:(-)为无肾小管病变;(+)为轻度,病变范围小于 20%;(++)为中度,病变范围 20%~40%;(+++)为重度,病变范围大于 40%。记录连续不重叠的 20 个高倍镜视野内积分,取均值作为肾小管损伤的指数。

1.5 免疫组织化学检测 兔抗鼠 α-SMA、MMP-2 单克隆抗体、免疫组织化学超敏 S-P 试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。采用 S-P 法检测 α-SMA、MMP-2。详细步骤严格按照说明书进行。用 PBS 代替一抗作阴性对照,用已知阳性片作阳性对照,用 DAB 显色,苏木素复染。每张切片在高倍镜(×400)下随机选择 20 个视野,以胞浆出现棕黄色染色为阳性信号,采用 HPIAS-1000 型医学图像分析系统进行分析,测定该区域的积分吸光度值,以均值表示每个标本的积分吸光度,最后进行各组均值比较。

1.6 统计学处理 用 SPSS11.5 统计软件进行统计学分析,实验中计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较在方差检验证明为齐性后,采用单因素方差分析,多样本均数两两比较采用 *q* 检验;指标之间的关系采用简单直线相关分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组动物生化指标变化情况 B 组体质量、血糖、血三酰甘油、胆固醇、低密度脂蛋白均较 A 组显著升高(*P*<0.05);C 组与 B 组比较上述指标有不同程度下降,但差异无统计学意

义(*P*>0.05);3 组之间高密度脂蛋白差异无统计学意义(*P*>0.05),见表 1。B 组肾重指数、24 h 尿清蛋白排泄量均较 A 组增高(*P*<0.05);C 组以上指标虽较 A 组增高但差异无统计学意义(*P*>0.05),与 B 组比较差异有统计学意义(*P*<0.05),Ccr 结果与之相反,见表 1。

2.2 各组动物肾脏病变情况 PAS 染色 A 组肾小球未见病理改变;B 组肾小球体积增大,基底膜增厚,细胞外基质 ECM 增多,系膜区扩大,部分肾小管轻度萎缩或管腔扩张,上皮细胞水肿,呈区域性分布,胞浆内可见脂肪空泡,多位于基底部;C 组则上述病理变化有所改善,见封 2 图 1。B 组肾小管损伤指数较 A 组明显增高,差异有统计学意义(*P*<0.05),C 组肾小管损伤指数虽较 A 组增高,但与 B 组比较则明显减少,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 1。

2.3 免疫组织化学检测肾脏 MMP-2、TIMP-2、α-SMA 蛋白表达 B 组中肾小管上皮细胞可见 α-SMA 大量表达,而 C 组只在肾小管上皮细胞中呈散在表达,表达强度明显减弱(表 2,封 2 图 2~4)。

表 2 大鼠肾脏 MMP-2、TIMP-2、α-SMA 染色
相对含量(±s)

组别	MMP-2	TIMP-2	α-SMA
A 组	0.39±0.02	0.19±0.01	0.01±0.01
B 组	0.24±0.01 ^a	0.36±0.02 ^a	0.41±0.03 ^a
C 组	0.32±0.02 ^{ab}	0.28±0.01 ^{ab}	0.25±0.02 ^{ab}

^a:*P*<0.05,与 A 组比较;^b:*P*<0.05,与 B 组比较。

2.4 相关分析 糖尿病肾病大鼠肾小管损伤指数、α-SMA 蛋白含量与 TIMP-2 呈明显的正相关(*n*=18,*r*=0.90,*P*<0.05),与 Ccr 呈明显的负相关;α-SMA 蛋白与 MMP-2 蛋白含量之间呈明显负相关(*n*=18,*r*=-0.85,*P*<0.05)。

3 讨 论

MMP-2 在 A 组大鼠肾小球系膜细胞、毛细血管内皮细胞及肾小管上皮细胞呈散在表达,B 组的表达较 A 组减弱,C 组的表达强度介于 A、B 两组之间,TIMP-2 表达与之相反,见表 2、封 2 图 2~3。正常大鼠 α-SMA 只在血管壁表达,近曲小管

上皮细胞胞浆内无表达。本实验所制备的动物模型具有高血糖、高胰岛素血症伴肥胖、脂代谢异常等类似人类 T2DM 临床特点;该模型 8 周时出现肾脏体积增大、尿清蛋白排泄量增加、Ccr 降低、肾小球肥大、基底膜增厚及细胞外基质增多、系膜区扩大、早期肾小管纤维化等 DN 的病理特征。

DN 特征性病理改变是基底膜增厚、肾小球结节性硬化,因此,既往许多 ARB 类药物肾保护作用机制的研究多集中在肾小球病变。但近年来越来越多的研究认为肾间质纤维化,特别是肾小管上皮细胞 EMT 在 DN 发病机制中发挥着重要的作用^[5]。TEMT 即肾小管上皮细胞在病理条件下转化为肌成纤维细胞(myofibroblast, MyoF)的过程,MyoF 是一种处于激活状态的细胞,它同时具有成纤维细胞和肌细胞的特性,可表达波形蛋白和 α -SMA,并分泌大量细胞外基质,促发肾间质纤维化的发生^[6],因而 α -SMA 是肌成纤维母细胞的标记分子, α -SMA 表达增加是肾小管转分化的重要标志。本实验结果显示,DN 大鼠肾小管损伤指数、 α -SMA 蛋白含量明显升高且与 Ccr 呈明显的负相关,提示 DN 不仅存在基底膜增厚、肾小球结节硬化等肾小球病变,同时存在肾小管转分化、肾小管损伤的发生,且肾功能与之密切相关。

IV 型胶原是肾小球基底膜和肾小管基底膜的主要组分,形成三维网状骨架,对维持基底膜的结构和生理功能有着举足轻重的作用^[7],由于其具有独特的螺旋结构,大部分降解酶对它没有作用。基质金属蛋白酶家族中的 MMP-9、MMP-2,又称 IV 型胶原酶 A、B,是 IV 型胶原的专一降解酶,MMP-2 是一类具有 Zn^{2+} 依赖性的内源性蛋白水解酶,TIMP-2 是其特异性抑制剂,生理状态下,MMP-2 与 TIMP-2 处于相对平衡状态,两者相互拮抗维持基底膜正常代谢。本实验结果显示,DN 大鼠肾脏 MMP-2 表达水平明显低于正常对照组,TIMP-2 则明显高于正常对照组,与既往研究结果一致^[2,8],且 MMP-2 与 α -SMA 呈负相关,TIMP-2 与 α -SMA 呈正相关,表明 MMP-2/TIMP-2 与 DN 肾小管纤维化密切相关。目前,现有的体内外实验证实^[2],TGF- β_1 是最重要的 MMPs 的调节因子。且是一种公认的致纤维化因子。大量的实验表明^[9-10],糖尿病或高糖状态下 TGF- β_1 是升高的。糖尿病状态下,TGF- β_1 受血糖、Ang- II、血管张力等多种因素调节^[11-13],MMP-2/TIMP-2 是其调节的众多的下游因子之一,而 MMP-2/TIMP-2 只是基质金属蛋白酶大家族成员中的一种,提示 DN 的发病机制存在多种途径,多靶点全方位治疗才是有效防治 DN 的方向。本实验结果显示,厄贝沙坦干预后 MMP-2 表达有所增加,而 TIMP-2 表达有所减少, α -SMA 蛋白含量明显减少,提示厄贝沙坦具有延缓肾小管纤维化进展的作用。

参考文献:

- [1] Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial to mesenchymal transition in renal fibrosis[J]. J Mol Med, 2004, 82(3): 175-177.
- [2] Cheng S, Polio AS, Mabimbar R, et al. Matrix metallopro-

teinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury[J]. FASEB J, 2006, 20(11): 1898-1900.

- [3] Han SY, Jee YIH, 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): 2406-2410.
- [4] 高苹,贾汝汉,王学玉. 厄贝沙坦对 T2DM 大鼠肾组织中核因子-kB 的调节[J]. 中华肾脏病杂志, 2002, 10(3): 364-366.
- [5] Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implication in renal interstitial fibrosis[J]. Am J Pathol, 2001, 159(14): 1465-1467.
- [6] Yang JW, Liu YH. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(1): 96-98.
- [7] Sinniah R, Khan TN. Renal tubular basement membrane changes in tubulointerstitial damage in patients with glomerular diseases[J]. Ultrastruct Pathol, 1999, 23(6): 359-362.
- [8] Lelongt B, Legallier B, Piedagnel R, et al. Do matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 (gelatinases) play a role in renal development, physiology and glomerular diseases? [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001, 10(1): 7-9.
- [9] Isono M, Mogyorósi A, Han DC, et al. Stimulation of TGF-beta type II receptor by high glucose in mouse mesangial cells and in diabetic kidney[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2000, 278(5): 830-833.
- [10] Singh R, Alavi N, Singh AK, et al. Role of angiotensin II in glucose-induced inhibition of mesangial matrix degradation[J]. Diabetes, 1999, 48(15): 2066-2069.
- [11] Sharma K, Ziyadeh FN. Hyperglycemia and diabetic kidney disease: The case for transforming growth factor as a key mediator[J]. Diabetes, 1995, 44(10): 1139-1142.
- [12] 李慧芳,王霞,徐睿,等. 厄贝沙坦对早期糖尿病肾病大鼠血浆中 Ang II 浓度及 t-PA 和 PAI-1 活性的影响[J]. 重庆医学, 2004, 33(10): 1515-1517.
- [13] Wolf G, Ziyadeh FN. The role of angiotensin II in diabetic nephropathy: Emphasis on nonhemodynamic mechanisms[J]. Am J Kidney Dis, 1997, 29(1): 153-155.

(收稿日期:2012-03-18 修回日期:2012-04-26)