

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.30.007

1,25-二羟维生素 D₃ 对糖尿病肾病患者尿足细胞 相关蛋白 Nephrin 的影响

李里¹, 卢松¹, 甘华²

(1. 重庆市中山医院内分泌科 400013; 2. 重庆医科大学附属第一医院肾内科 400016)

摘要:目的 探讨 1,25-二羟维生素 D₃(1,25-(OH)₂D₃)对糖尿病肾病(DN)患者尿足细胞相关蛋白 Nephrin 的影响。方法 选取 DN 患者共 40 例,根据尿清蛋白排泄率(UAER)水平分为微量清蛋白尿的 DN1 组 22 例和大量清蛋白尿的 DN2 组 18 例,经 6 周洗脱期后给予 1,25-(OH)₂D₃ 0.25 μg/d,共治疗 12 周,10 例健康体检者为对照组,测定各组成人群血钙(Ca²⁺)、血磷(P³⁺)、血肌酐(Scr)及 24 h 尿蛋白及 VAER,采用定量酶联免疫吸附法(ELISA)测定各组观察人群尿液中 Nephrin 的表达。结果 DN 组患者尿中 Nephrin 表达明显多于对照组, DN1 组与 DN2 组间尿中 Nephrin 表达也存在差异,1,25-(OH)₂D₃ 可使 DN1 组患者尿中 Nephrin 表达基线下移(P<0.05),但对 DN2 组患者尿中 Nephrin 表达无明显影响(P>0.05)。结论 尿中 Nephrin 的表达是预测 DN 进展的有效因子,1,25-(OH)₂D₃ 可减少早期 DN 患者尿中 Nephrin 表达从而减少蛋白尿,延缓 DN 进展。

关键词:糖尿病肾病;骨化三醇;足细胞;Nephrin

中图分类号:R587.1

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)30-4002-03

Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the expression of urinary nephrin in diabetic nephropathy patients

Li Li¹, Lu Song¹, Gan Hua²

(1. Department of Endocrinology, the Zhongshan Hospital of Chongqing, Chongqing 400013, China; 2. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the expression of urinary Nephrin in patients with diabetic nephropathy. Methods According to albumin excretion rate, 40 type-2 diabetic nephropathy patients were divided into 2 groups, 10 healthy volunteers served as control. The treatment groups received 1,25-dihydroxyvitamin D₃ 0.25 μg/d for 12 weeks. The levels of blood calcium, phosphorus, serum creatinine, 24-hour urinary protein excretion were detected. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect urinary Nephrin in different groups. Results The expressions of urinary Nephrin were statistically different among NC group, DN1 group and DN2 group. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ treatment significantly decreased the expression of urinary Nephrin in DN1 patients, whereas no statistically changes were observed in DN2 group. Conclusion In diabetic nephropathy patients, urinary Nephrin is supposed to be effective an marker of disease progression. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ may be effective to prevent podocyte injury in early-stage diabetic nephropathy.

Key words: diabetic nephropathy; calcitriol; podocyte; Nephrin

糖尿病肾病(DN)是一个渐进发展的过程,临床早期表现为肾小球高滤过状态和尿清蛋白排泄率(UAER)增加,随着 DN 进展,肾小球破坏数量逐渐增多,尿蛋白排泄进一步增加,最终导致肾小球、肾小管及肾间质纤维化。肾小球足细胞对维护肾脏滤过屏障的完整性起关键作用,足细胞受损导致滤过屏障受损、蛋白尿及肾小球硬化^[1],近来研究显示,足细胞损伤在 DN 的发展中具有重要作用^[2],Nephrin 是位于足细胞裂孔隔膜上的一种跨膜糖蛋白,是构成肾小球滤过屏障选择性的关键^[3],正常状态下不出现在尿液中。但在 DN 早期的大鼠尿中即可检测到 Nephrin 蛋白^[4],而在 DN 患者的尿液中也可检测到 Nephrin 蛋白排泄增多,因此尿 Nephrin 近来已成为对 DN 患者早期肾脏损伤的监测指标之一。1,25-二羟维生素 D₃(1,25-(OH)₂D₃)即活性维生素 D₃,其最主要的生物效应是调节钙磷的代谢,已被广泛运用于临床治疗骨质疏松症等。而维生素 D 缺乏在 DN 患者中也普遍存在,其血浆 25-羟维生素 D 水平明显降低,而且糖尿病本身也可以诱发骨质疏松^[5]。近年来,随着对 1,25-(OH)₂D₃ 作用的深入研究,发现它还可以直接或间接的发挥对免疫和炎症系统、肾素-血管紧张素系统等的调节作用。本实验将对 1,25-(OH)₂D₃ 干预后 DN 患者尿

中 Nephrin 蛋白表达的变化进行观察,旨在探索 1,25-(OH)₂D₃ 对 DN 的可能保护作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 3 月至 2012 年 12 月在重庆市中山医院内分泌科就诊的 2 型 DN 患者,共 40 例,男 23 例,女 17 例,年龄(50.35±8.65)岁,均符合 1999 年 WHO 制定的糖尿病诊断标准。入选标准:(1)临床诊断为 DN,血肌酐(Scr)值小于 265 μmol/L,24 h 尿清蛋白定量大于 0.5 g,糖化血红蛋白小于或等于 10%;(2)血钙(Ca²⁺)、血磷(P³⁺)水平正常;(3)根据 Mogenson 分型标准,按照 24 h UAER 结果将 40 例患者分为:微量清蛋白尿组(DN1 组)22 例,20 μg/min<UAER<200 μg/min;大量清蛋白尿组(DN2 组)18 例,UAER>200 μg/min。排除标准:(1)年龄在 18 岁以下或 70 岁以上者;(2)妊娠或哺乳妇女;(3)有原发性或其他继发性肾病导致蛋白尿者;(4)近 2 个月发生糖尿病酮症、肝胆或泌尿系统感染及其他严重感染者;(5)有严重心脑血管疾病、肿瘤、外伤、应用肾毒性药物者;(6)已知对 1,25-(OH)₂D₃ 过敏者;(7)正在服用或半年内使用过血管紧张素酶抑制剂或血管紧张素受体拮抗剂、噻唑啉二酮类药物的患者。同时选取重庆市中山医院体检健康

者 10 例作为对照组(NC)组,男女各 5 例,年龄(45.25±6.17)岁。各组间年龄、性别构成经均衡性检验,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 DN 患者各组与正常对照组资料($\bar{x}\pm s$)

项目	DN1 组	DN2 组	NC 组
年龄(岁)	50.25±8.45	50.55±8.75	47.25±6.17
性别(男/女)	12/10	11/7	5/5
糖尿病病史	8.85±2.15 ^a	10.15±2.85 ^a	0
BMI(kg/m ²)	25.11±0.88	24.32±1.65	23.35±0.55
收缩压(mm Hg)	135.75±8.86 ^a	138.33±7.65 ^a	120.15±6.73
舒张压(mm Hg)	85.45±6.28 ^a	86.88±4.58 ^a	60.15±3.58
尿蛋白(g/d)	1.45±0.43 ^a	2.65±0.75 ^{ab}	0
Scr(μ mol/L)	125.78±9.45 ^a	185.55±7.84 ^{ab}	75.18±4.15

^a: $P<0.05$,与 NC 组比较;^b: $P<0.05$,与 DN1 组比较。

1.2 方法 DN1 与 DN2 组患者经 6 周的初始监测洗脱期后给予 1,25-(OH)₂D3 0.25 μ g/d 口服,如无禁忌证,两组患者疗程均为 16 周,研究期间所有患者均通过调整胰岛素用量使血糖稳定在空腹小于 8 mmol/L,糖化血红蛋白小于 7%,以排除血糖对研究结果的干扰。有高血压的患者使用非血管紧张素转化酶抑制剂-I(ACE-I)或血管紧张素受体阻断剂(ARB)类降压药物(钙离子拮抗剂、利尿剂等)使血压控制在靶目标(<140/80 mm Hg)以排除血压对研究结果的干扰。观察治疗期间有无严重不良反应如高钙血症等。治疗结束后观察项目包括:(1)各组人群血 Ca²⁺、P³⁺、Scr,所有血清学指标采用全自动生化分析仪检测。(2)各组人群留取晨尿 10 mL,2 000 r/min 离心 5 min 后收集上清液,-20℃保存备用,24 h 尿蛋白定量(24 h UPE)、UAER 测定采用免疫比浊法。(3)尿 Neph- rin 检测:采用定量酶联免疫吸附法(ELISA),试剂盒为美国 R&D System 公司产品。将 Neph- rin 单抗包被于标板上,使标准品与样品上的 Neph- rin 与单抗相结合,然后加入酶标抗体以在酶标板上形成免疫复合物,再加入酶底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)后出现蓝色,加终止液,用酶标检测仪在 450 nm 处测定吸光度,Neph- rin 的浓度与吸光度成正比,由此可求出样品中 Neph- rin 蛋白浓度。为消除患者尿量不同的影响,以尿 Neph- rin/尿肌酐(μ g/mg)的比值表示尿 Neph- rin 的质量分数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 软件进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验进行统计处理,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组人群血生化指标变化 各组人群血 Ca²⁺、P³⁺ 于治疗前后无明显变化,1,25-(OH)₂D3 0.25 μ g/d 治疗未引起高钙血症。治疗结束后 DN1 组 Scr 水平与治疗前比较无明显变化,而 DN2 组 Scr 水平较治疗前上升,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.2 各组人群 24 h UPE、UAER 变化 DN1 组与 DN2 组治疗后 24 h UPE 和 UAER 均较治疗前下降,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

2.3 各组人群尿 Neph- rin 变化 DN1 组与 DN2 组治疗后尿 Neph- rin/尿肌酐值均较治疗前下降,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

表 2 各组患者血生化指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	Ca ²⁺ (mmol/L)	P ³⁺ (mmol/L)	Scr(μ mol/L)
DN1 组($n=22$)			
治疗前	2.14±0.17	1.84±0.20	125.78±9.45
治疗后	2.33±0.11	1.68±0.18	132.01±7.32
t	1.683	1.354	1.845
P	0.060	0.085	0.065
DN2 组($n=18$)			
治疗前	2.19±0.41	1.74±0.17	185.55±7.84
治疗后	2.29±0.25	1.59±0.15	215.62±9.51
t	1.761	1.165	3.482
P	0.070	0.120	0.030
NC 组($n=10$)			
	2.45±0.10	1.61±0.27	75.18±4.15

表 3 各组患者 24 h UPE、UAER 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	24 h UPE(g/d)	UAER(μ g/min)
DN1 组($n=22$)		
治疗前	1.45±0.43	152.42±23.22
治疗后	1.19±0.39	130.18±18.76
t	4.787	3.098
P	0.005	0.008
DN2 组($n=18$)		
治疗前	2.65±0.75	362.60±27.41
治疗后	2.22±0.48	313.54±22.15
t	2.415	2.655
P	0.032	0.028
NC 组($n=10$)		
	0	9.16±3.42

表 4 各组患者尿 Neph- rin/尿肌酐比较($\bar{x}\pm s$)

组别	尿 Neph- rin/尿肌酐(μ g/mg)
DN1 组($n=22$)	
治疗前	35.33±5.43
治疗后	23.66±6.39
t	3.615
P	0.042
DN2 组($n=18$)	
治疗前	63.78±8.75
治疗后	18.42±8.48
t	4.228
P	0.006
NC 组($n=10$)	
	0

3 讨 论

目前认为, DN 早期足细胞损伤表现为足细胞数量和密度

的减少、细胞变性肥大和足突融合^[6]。足细胞的损伤导致蛋白尿的产生,而特异性表达于足细胞裂孔膜上的蛋白分子 Neph-
rin 是肾小球电荷和机械屏障选择性功能的重要环节,其蛋白
和基因的表达异常在 DN 蛋白尿的发生机制中具有重要作用。
Doublier 等^[7]研究发现,极早期 DN 患者肾脏足细胞表面
Nephrin 蛋白表达就可能出现代偿性增加,导致足细胞骨架蛋
白的重新分布,最终可致使 Nephrin 蛋白与骨架解离脱落并随
尿液排出体外,肾小球屏障受到破坏,蛋白随之滤出。因此,肾
小球 Nephrin 表达的下降低往往伴随着尿蛋白增加。在本实验
中,与健康人群比较,DN1 与 DN2 组治疗前 24 h UPE 与
UAER 均明显增高,尿液中 Nephrin 蛋白含量也明显增加,且
两组人群 Nephrin 蛋白含量存在差异,这与文献报道相一致,
证实尿中 Nephrin 蛋白含量是反映 DN 患者早期足细胞损伤
程度的重要证据。

近来的研究表明,1,25-(OH)₂D₃ 除了具有调节钙磷代谢
作用以外,还具有抑制炎症因子分泌,减少细胞外基质沉淀和
免疫细胞增殖活化并抑制 RAS 系统等肾脏保护作用^[8]。
Fishbane 等^[9]使用帕立骨化醇治疗 CKD 患者,6 个月后患者
的尿蛋白基线水平明显下降并低于对照组,朱晗玉等^[10]发现,
1,25-(OH)₂D₃ 可减低早期 DN 患者炎症因子水平及减少尿
蛋白排泄,Wang 等^[11]在高糖环境下培养的肾小球足细胞中发
现,高糖可导致纤维连接蛋白和 Col-IV 蛋白分泌增加,而 1,25-
(OH)₂D₃ 则可以限制这一过程,从而缓解高糖环境下足细胞
的损伤。我们的研究发现,无论是处于微量清蛋白尿阶段还是
大量清蛋白尿阶段,1,25-(OH)₂D₃ 治疗均可以减少 DN 患者
尿 Nephrin 蛋白含量。Tian 等^[12]发现,1,25-(OH)₂D₃ 可以通
过下调 RAS、抑制肾素生成从而抑制系膜细胞增殖并减少足
细胞的丢失。同时有研究发现,1,25-(OH)₂D₃ 对于肾内和体
外培养的足细胞都具有抑制 RAS 激活的作用^[13],因此,本研
究推测 1,25-(OH)₂D₃ 对 DN 患者尿 Nephrin 蛋白的减少作
用至少是部分通过抑制肾内 RAS 系统激活而实现的。曾有研
究者使用血管紧张素受体拮抗剂类药物联合骨化三醇对 DN
患者进行干预,证实骨化三醇能加强血管紧张素受体拮抗剂的
肾素抑制作用从而减轻肾损害^[14-15],而本研究中并没有使用
血管紧张素受体拮抗剂类药物,结果证实即使单独应用 1,25-
(OH)₂D₃ 也能有效地减少蛋白尿。

本研究发现,对于 DN1 组的患者,1,25-(OH)₂D₃ 的干
预能有助于抑制 Scr 水平的上升,而对于 DN2 组的患者,这一作
用并不明显。相反,DN2 组的患者在研究结束后尿 Nephrin 蛋
白含量下降却非常明显,除了 1,25-(OH)₂D₃ 干预的作用之
外,作者还推测这是因为部分 DN2 组患者的肾脏损害随着病
程进展已经接近 CKD4 期,处于这一时期的肾脏已出现大部分
肾小球硬化,肾功能仅接近于正常值的 30%,因此尿液中损伤
脱落的足细胞反而较 CKD2~3 期时减少。综上所述,1,25-
(OH)₂D₃ 的干预能减少 DN 患者尿中 Nephrin 蛋白的含量,
减轻足细胞损伤从而减少蛋白尿,延缓 DN 进展,这一作用在
DN 早期更为明显。

参考文献:

[1] Zelmanovitz T, Gerchman F, Balthazar AP, et al. Diabetic nephropathy[J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2009, 1(1): 10.
[2] Shankland SJ. The podocyte's response to injury; role in proteinuria and glomerulosclerosis[J]. *Kidney Int*, 2006,

69(12): 2131-2147.

- [3] Lehtonen S, Ryan J, Kudlicka K, et al. Cell junction associated protein IQGAP1, MAGI-2, CASK, spectrins and alpha-actinin are components of the nephrin multiprotein complex[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(28): 9814-9819.
[4] Zhang P, Zhang JJ, Su J, et al. Effect of total glucosides of paeony on the expression of nephrin in the kidneys from diabetic rats[J]. *Am J Chin Med*, 2009, 37(2): 295-307.
[5] Lemire JM, Archer DC, Beck L, et al. Immunosuppressive actions of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃; preferential inhibition of Th1 functions[J]. *J Nutr*, 125(6 Suppl): S1704-1708.
[6] Benigni A, Gagliardini, Tomasoni S, et al. Selective impairment of gene expression and assembly of nephrin in human diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2004, 65(6): 2193-2200.
[7] Doublier S, Salvidio G, Lupia E, et al. Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy; evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II [J]. *Diabetes*, 2003, 52(4): 1023-1030.
[8] Tokuda N, Kano M, Meiri H, et al. Calcitriol therapy modulates the cellular immune responses in hemodialysis patients [J]. *Am J Nephrol* 2000, 20(12): 129-137.
[9] Fishbane S, Chittineni H, Packman M, et al. Oral paricalcitol in the treatment of patients with CKD and proteinuria; a randomized trial [J]. *Am J Dis*, 2009, 54(4): 647-652.
[10] 朱晗玉, 张东, 耿文佳, 等. 1, 25-(OH)₂D₃ 治疗对早期糖尿病肾病相关炎症因子的影响[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2012, 26(1): 12-14.
[11] Wang Y, Zhou J, Minto AW, et al. Altered vitamin D metabolism in type II diabetic mouse glomeruli may provide protection from diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2006, 70(5): 882-891.
[12] Tian J, Liu Y, Williams LA, et al. Potential role of active vitamin D in retarding the progression of chronic kidney disease [J]. *Nephrol Dial transplant*, 2007, 22(2): 321-328.
[13] Yuan W, Pan W, Kong J, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter [J]. *Biol Chem*, 2009, 282(41): 29821-29830.
[14] Lambers H, Agarwal R, Coyne D, et al. The selective vitamin D receptor activator for albuminuria lowering (VITAL) study: study design and baseline characteristics [J]. *Am J Nephrol*, 2009, 30(3): 280-286.
[15] Zhang Z, Zhang Y, Ning G, et al. Combination therapy with AT1 blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy: blockade of compensatory renin increase [J]. *Am J Nephrol*, 2009, 30(3): 280-286.