

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.03.004

AT1 受体自身抗体调控肾组织内质网应激在糖尿病肾病发病中的机制研究*

郭乃凤,陈晓岚[△],曹英杰,袁莉,范亚平
(南通大学附属医院肾内科,江苏南通 226001)

[摘要] **目的** 研究 AT1 受体自身抗体(AT1-AA)调控肾组织内质网应激诱导大鼠糖尿病肾病的机制。**方法** 构建糖尿病肾病模型大鼠为实验组,以正常大鼠为阳性对照组,以正常大鼠静脉注射 AT1-AA 作为 AT1-AA 处理组。使用 ELISA 法检测大鼠血清中 AT1-AA 表达变化;进一步使用 HE 染色法观察 3 组大鼠肾组织变化;使用 Western blot 检测各组大鼠肾组织葡萄糖调节蛋白-78(GRP78)及 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)表达水平。**结果** 实验组大鼠血清中空腹血糖(FBG)、肾脏肥大指数(KHI)、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、胰岛素样生长因子 1(IGF-1)表达水平均高于正常大鼠($P < 0.01$),糖尿病肾病大鼠造模成功。与阳性对照组相比,实验组大鼠血清 FBG、KHI、TGF- $\beta 1$ 、IGF-1 表达增加($P < 0.01$)。实验组和 AT1-AA 处理组肾组织中 GRP78、CHOP 蛋白表达水平均高于阳性对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 糖尿病个体中 AT1-AA 通过调节 GRP78、CHOP 信号通路,增加肾组织内质网应激,从而诱导糖尿病肾病的发生、发展。

[关键词] 糖尿病肾病;AT1 受体自身抗体;内质网应激

[中图分类号] R692.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)03-0374-03

Study on mechanisms of AT1 receptor autoantibodies for regulating renal tissue endoplasmic reticulum stress in diabetic nephropathy onset*

GUO Naifeng, CHEN Xiaolan[△], CAO Yingjie, YUAN Li, FAN Yaping
(Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Nantong University,
Nantong, Jiangsu 226001, China)

[Abstract] **Objective** To study the mechanisms of AT1 receptor autoantibodies (AT1-AA) for regulating renal tissue endoplasmic reticulum stress induced rat diabetic nephropathy. **Methods** The diabetic nephropathy model was established as experimental group, and the normal rats were selected as the control group. Normal rats were injected with AT1-AA intravenously as AT1-AA group. The expression of AT1-AA in rat serum was detected by ELISA. The HE staining was used to observe the renal tissue changes of the rats of three group. The expressions of glucose-regulated protein-78 (GRP78) and CCAAT/enhancer protein homolog protein (CHOP) expression levels in renal tissues of each group were detected by western blot. **Results** The expression levels of FBG, KHI, TGF- $\beta 1$ and IGF-1 of experimental group were higher than those in control group ($P < 0.01$), and the rat diabetic nephropathy were successfully modeled. At the same time, the levels of FBG, KHI, TGF- $\beta 1$ and IGF-1 of experimental group increased compared with those in the control group ($P < 0.01$). The expression levels of GRP78 and CHOP in experimental group and AT1-AA group were significantly higher than those in normal rat renal tissues, and the differences were statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** AT1-AA in diabetic individuals could increase the renal endoplasmic reticulum stress by regulating GRP78 and CHOP signaling pathways, there by inducing the development of diabetic nephropathy.

[Key words] diabetic nephropathies; AT1 receptor autoantibodies; endoplasmic reticulum stress

糖尿病是一种慢性代谢性疾病,具有较高发病率,是全球主要健康隐患之一^[1-2],每年影响大约 4.15 亿患者,并造成 500 万患者死亡。糖尿病肾病是糖尿病病后期严重并发症,也是造成该病患者死亡的主要

原因^[3-4]。进一步明确糖尿病肾病的发病机制及相关通路有利于寻求治疗糖尿病肾病的潜在治疗靶点。AT1 受体自身抗体(AT1-AA)发现于先兆子痫患者体内,后被证明介导原发性肾小球疾病发生、发展,其

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170656)。 作者简介:郭乃凤(1984-),主治医师,硕士,主要从事肾纤维化方面的研究。

[△] 通信作者, E-mail: chenxl8448@sina.com。

表达增加可导致肾脏损伤^[5-6]。糖尿病肾病中肾脏内质网应激发挥重要作用,而 AT1-AA 可介导内质网应激的发生。为研究 AT1-AA 介导糖尿病肾病发生的通路及机制,本文探讨 AT1-AA 对内质网应激相关蛋白葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)及 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)表达的影响,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 选取 10 周龄 SD 大鼠,体质量 200 g。链脲佐菌素(STZ)腹腔注射,继续高脂饲料饲养两周。抗体和 STZ 均购自美国 Sigma 公司,AT1-AA ELISA 试剂盒购自英国 Abcam 公司;GRP78 抗体、CHOP 抗体,以及 β -actin 抗体、羊抗兔二抗、兔抗大鼠二抗和羊抗小鼠二抗均购自美国 Cayman 公司。

1.2 方法

1.2.1 造模方法 使用高脂饲料(67.7%基础饲料+10.0%动物油+20.0%糖+2.0%胆固醇+0.3%食盐)饲养,两周后大鼠行单肾切除手术,并将糖尿病造模成功大鼠[空腹血糖(FBG) > 7.0 mmol/L,随机血糖大于 11.1 mmol/L]进行糖尿病肾病模型的检测。选择 FBG、肾脏肥大指数(KHI)、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)水平显著升高的大鼠进行后续实验,即为糖尿病肾病模型组(实验组);选取 30 只正常大鼠注射 AT1-AA(1×10^{-5} mmol/L AT1-AA 液),即 AT1-AA 处理组,正常饮食,并于相同时间注射同等量生理盐水;另取 30 只正常大鼠,于两周后腹腔注射 STZ(剂量 30 mg/kg)作为阳性对照组。

1.2.2 血清的采集 采用眼眶取血的方法,使用毛细针准确插入大鼠内眦,取 6 mL 血液,静置 30 min 后使用 4 °C 低速离心机离心(3 000 r/min,10 min),获得血清后放置于-80 °C 冰箱备用。

1.2.3 肾脏取样方法 大鼠麻醉后,开腹腔取肾脏。动作轻柔,取出后于生理盐水中冲洗,并去除脂肪及

结缔组织。用滤纸轻柔沾除表面水分,称重后立即放入固定液中固定,用以切片。采用冷冻切片技术,由于肾组织较软,水分含量高,对冷冻速度要求高,冷冻速度与组织表面积及体积有关,故需将固定好的大鼠肾脏组织切为 0.2 cm 组织块后再进行切片。肾组织采用 4% 多聚甲醛固定 48 h,石蜡包埋、切片、HE 染色,观察肾脏病理改变。

1.2.4 相关指标检测的方法 使用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清 AT1-AA 表达水平。取肾脏组织进行匀浆,并使用 Western blot 检测大鼠肾组织 GRP78 及 CHOP 表达水平。使用电镜技术检测大鼠肾组织超微结构改变情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料用率表示,组间比较采用 χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病肾病模型血清中 FBG、KHI、TGF- β 1、IGF-1 表达情况 实验组大鼠血清中 FBG、KHI、TGF- β 1、IGF-1 水平均明显高于阳性对照组,两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。糖尿病肾病大鼠模型构建成功。

表 1 糖尿病肾病指标检测($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | FBG (mmol/L) | KHI (g/kg) | TGF- β 1 (μ g/L) | IGF-1 (μ g/L) |
|----------|----------|-----------------|------------------|-----------------------------|--------------------|
| 阳性对照组 | 30 | 4.13 \pm 0.36 | 7.84 \pm 1.23 | 0.58 \pm 0.06 | 0.59 \pm 0.08 |
| 实验组 | 30 | 7.30 \pm 1.07 | 15.19 \pm 3.03 | 0.78 \pm 0.07 | 0.89 \pm 0.09 |
| <i>t</i> | | 15.38 | 12.31 | 11.88 | 13.65 |
| <i>P</i> | | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

2.2 AT1-AA 处理大鼠模型血清中 FBG、KHI、TGF- β 1、IGF-1 表达情况 AT1-AA 处理组大鼠血清中 FBG、KHI、TGF- β 1、IGF-1 表达明显高于阳性对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 2。

表 2 两组指标情况比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | FBG(mmol/L) | KHI(g/kg) | TGF- β 1(μ g/L) | IGF-1(μ g/L) |
|------------|----------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 阳性对照组 | 30 | 4.13 \pm 0.36 | 7.84 \pm 1.23 | 0.58 \pm 0.06 | 0.59 \pm 0.08 |
| AT1-AA 处理组 | 30 | 6.12 \pm 0.38 ^a | 11.54 \pm 3.25 ^a | 0.69 \pm 0.08 ^a | 0.78 \pm 0.07 ^a |

^a: $P < 0.01$,与阳性对照组比较

2.3 大鼠肾组织切片光镜影像 实验组和 AT1-AA 处理组大鼠肾脏出现病理性肥大;观察肾脏超微结构变化,两组肾小球同样出现病理性肥大增生(图 1、2)。与阳性对照组大鼠相比,实验组大鼠和 AT1-AA 处理组大鼠肾脏质量及肾质量/体质量比值均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 3。

2.4 大鼠肾脏组织 GRP78 及 CHOP 表达情况 实验

组和 AT1-AA 处理组肾脏组织 GRP78 及 CHOP 水平均增高,两组与阳性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 3。



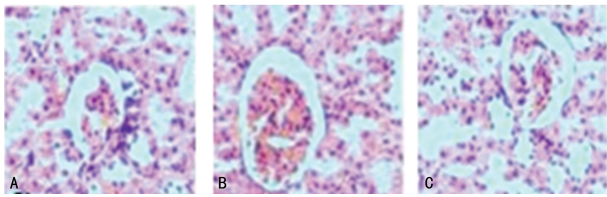
A: 阳性对照组; B: 实验组; C: AT1-AA 处理组

图 1 肾脏大体外观

表 3 3 组大鼠肾肥大指数的比较

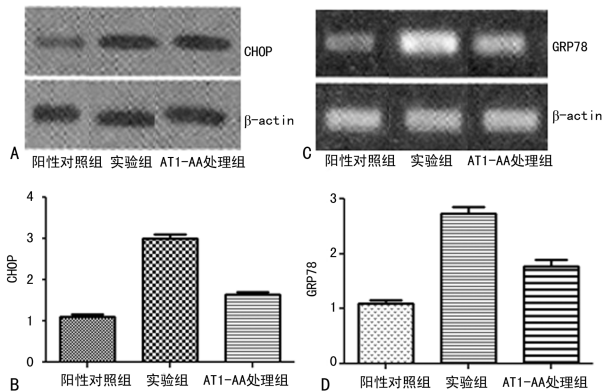
| 组别 | n | 大鼠肾脏质量 ($\bar{x} \pm s, g$) | 肾质量/体质量 ($\bar{x} \pm s, \%$) |
|------------|----|----------------------------------|------------------------------------|
| 阳性对照组 | 30 | 1.53 ± 0.36 | 0.51 ± 0.05 |
| 实验组 | 30 | 2.46 ± 1.07 ^a | 1.07 ± 0.09 ^a |
| AT1-AA 处理组 | 30 | 1.97 ± 0.43 ^a | 0.85 ± 0.12 ^a |

^a: $P < 0.05$, 与阳性对照组比较



A: 阳性对照组; B: 实验组; C: AT1-AA 处理组

图 2 肾组织切片 (HE 染色, $\times 400$)



A: 各组 CHOP 表达情况; B: 各组 CHOP 表达情况的柱状图; C: 各组 GRP78 表达情况; D: 各组 GRP78 表达情况的柱状图

图 3 各组肾组织中的 GRP78 及 CHOP 表达情况

3 讨论

随着生活水平的提高,人们的饮食结构和生活习惯发生很大改变,患糖尿病等代谢性疾病的患者越来越多,且具有明显年轻化趋势^[7-8]。糖尿病肾病是糖尿病晚期并发症,是糖尿病患者死亡的主要原因之一^[9],严重影响患者的生存质量及生命健康。进一步研究糖尿病肾病的发病机制,有利于发现治疗的潜在靶点及药物。

AT1-AA 是导致原发性肾小球变病的主要因素,研究表明,糖尿病肾病患者存在肾素-血管紧张素系统(RAS)异常活化现象^[10-12],而 RAS 参与内质网应激的发生、发展过程^[13-15]。提示 AT1-AA 可能通过调节内质网应激从而导致糖尿病肾病的发生。GRP78、CHOP 是内质网应激通路两个重要相关分子。

本文即针对 AT1-AA 是否通过 GRP78、CHOP 通路诱导肾脏内质网应激而造成糖尿病肾病进行研究。结果显示,与正常大鼠相比,糖尿病肾病大鼠出现肾脏病理性肥大、肾小球肥大、肾小球硬化等。向正常大鼠静脉注射人工合成 AT1-AA 后,大鼠同样

出现肾脏病理性肥大,肾小球水肿、肥大、结构改变及缺失等现象。这说明 AT1-AA 是诱发糖尿病肾病出现的重要因素。为进一步探讨 AT1-AA 的作用机制及信号通路是否与内质网应激有关,本研究对正常大鼠及糖尿病肾病大鼠肾脏 GRP78 及 CHOP 蛋白表达情况进行检测,结果表明,与正常大鼠相比,糖尿病肾病大鼠肾脏组织内 GRP78 及 CHOP 蛋白表达均明显增加;且向正常大鼠静脉注射人工合成 AT1-AA 后,正常大鼠肾脏组织内 GRP78 及 CHOP 蛋白同样出现表达增加现象,进一步证明了 AT1-AA 通过该通路发挥肾脏损伤作用。

综上所述,糖尿病个体中 AT1-AA 通过调节 GRP78、CHOP 信号通路,增加肾组织内质网应激,从而诱导糖尿病肾病的发生、发展。

参考文献

- [1] FITZGERALD K R. Review of article: Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults[J]. J Vascul Nurs, 2013, 31(3): 131-132.
- [2] WANG N, LI T, HAN P. The effect of Tianmai Xiaoke Pian on insulin resistance through PI3-K/AKT signal pathway[J]. J Diabetes Res, 2016: 9261259.
- [3] GROUP I. Update of mortality attributable to diabetes for the IDF diabetes atlas: estimates for the year 2013[J]. Diabetes Res Clin Prac, 2015, 109(3): 461-465.
- [4] CARNAGARIN R, DHARMARAJAN A M, DASS C R. Molecular aspects of glucose homeostasis in skeletal muscle; a focus on the molecular mechanisms of insulin resistance[J]. Mol Cell Endocrinol, 2015(417): 52-62.
- [5] BAYRAMOGLU A, KURT H, GUNES H V, et al. Angiotensin II type 1 receptor (AT1) gene A1166C is associated with the risk of hypertension[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2015, 19(1): 14-17.
- [6] HILL A A, REID B W, HASTY A H. A decade of progress in adipose tissue macrophage biology[J]. Immunol Rev, 2014, 262(1): 134-152.
- [7] MANTOVANI A, BISWAS S K, GALDIERO M R, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling[J]. J Pathol, 2013, 229(2): 176.
- [8] YE H, BAI X, GAO H, et al. Urinary podocalyxin positive-element occurs in the early stage of diabetic nephropathy and is correlated with a clinical diagnosis of diabetic nephropathy[J]. J Diabet Complicat, 2014, 28(1): 96-100.
- [9] MENG N, ZHANG Y, LI H, et al. Association of tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism (tnf- α 238g/a and tnf- α 308g/a) with diabetic mellitus, diabetic retinopathy and diabetic nephropathy: a meta-analysis[J]. Curr Eye Res, 2014, 39(2): 194-203.
- [10] WYNN T A. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies[J]. Nature Rev Immunol, 2015, 15(5): 271.

(下转第 381 页)

- glycation end products modified low density lipoprotein inhibits atherosclerosis progression in diabetic apoE and LDLR null mice[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2014(13):151.
- [4] SIMA A V, BOTEZ G M, STANCU C S, et al. Effect of irreversibly glycated LDL in human vascular smooth muscle cells: lipid loading, oxidative and inflammatory stress[J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(12):2790-2802.
- [5] MA K, FORTE T, OTVOS J D, et al. Differential additive effects of endothelial lipase and scavenger receptor-class B type I on high-density lipoprotein metabolism in knockout mouse models[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(1):149-154.
- [6] ZHU Y N, FAN W J, ZHANG C, et al. Role of autophagy in advanced atherosclerosis[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(5):2903-2908.
- [7] JEONG S J, LEE M N, OH G T. The role of macrophage lipophagy in reverse cholesterol transport[J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2017, 32(1):41-46.
- [8] SERGIN I, EVANS T D, ZHANG X, et al. Exploiting macrophage autophagy-lysosomal biogenesis as a therapy for atherosclerosis[J]. *Nat Commun*, 2017(8):15750.
- [9] WEI Y, GAO J, QIN L, et al. Curcumin suppresses AGEs induced apoptosis in tubular epithelial cells via protective autophagy[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(6):6052-6058.
- [10] WANG A, WANG J, ZHANG S, et al. Curcumin inhibits the development of non-small cell lung cancer by inhibiting autophagy and apoptosis[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5):5075-5080.
- [11] 刘启梁, 常莹辉. 姜黄素与肿瘤细胞自噬[J]. *生命的化学*, 2017, 37(4):623-628.
- [12] LOPES-VIRELLA M F, HUNT K J, BAKER N L, et al. VADT group of investigators. high levels of AGE-LDL, and of IgG antibodies reacting with MDA-lysine epitopes expressed by oxLDL and MDA-LDL in circulating immune complexes predict macroalbuminuria in patients with type 2 diabetes[J]. *J Diabetes Complicat*, 2016, 30(4):693-699.
- [13] YOUNIS N, SHARMA R, SORAN H, et al. Glycation as an atherogenic modification of LDL[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2008, 19(4):378-384.
- [14] MAKITA Z, YANAGISAWA K, KUWAJIMA S, et al. The role of advanced glycosylation end-products in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1996, 11 Suppl 5:31-33.
- [15] 龙健, 曾智. 糖化低密度脂蛋白与动脉粥样硬化[J]. *心脏杂志*, 2003, 15(1):84-85.
- [16] KEIHANIAN F, SAEIDINIA A, BAGHERI R K, et al. Curcumin, hemostasis, thrombosis, and coagulation[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(6):4497-4511.
- [17] OLSZANECKI R, JAWIEN J, GAJDA M, et al. Effect of curcumin on atherosclerosis in apoE/LDLR-double knockout mice[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2005, 56(4):627-635.
- [18] KIM M, KIM Y. Hypocholesterolemic effects of curcumin via up-regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase in rats fed a high fat diet[J]. *Nutr Res Pract*, 2010, 4(3):191-195.
- [19] 匡双玉, 庾勤慧, 朱炳阳, 等. 姜黄素对血管平滑肌细胞源性荷脂细胞胆固醇代谢及 SREBP-1 表达的影响[J]. *南华大学学报(医学版)*, 2006, 34(3):317-319.
- [20] 郑伟, 李强, 陈欣, 等. 姜黄素通过 LXR α -ABCA1 通路抑制小鼠巨噬细胞脂质聚集[J]. *湖北医药学院学报*, 2015, 34(2):120-124.
- [21] NAKAMURA S, YOSHIMORI T. New insights into autophagosome-lysosome fusion[J]. *J Cell Sci*, 2017, 130(7):1209-1216.
- [22] WANG L, JIANG Y, SONG X, et al. Pcd4 deficiency enhances macrophage lipophagy and attenuates foam cell formation and atherosclerosis in mice[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(7):e2055.
- [23] MARTINET W, VERHEYE S, DE MEYER G R. Everolimus-induced mTOR inhibition selectively depletes macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy[J]. *Autophagy*, 2007, 3(3):241-244.
- (收稿日期:2018-06-18 修回日期:2018-09-01)
-
- (上接第 376 页)
- [11] ARORA M K, Singh U K. Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: an update[J]. *Vascul Pharmacol*, 2013, 58(4):259-271.
- [12] LUPACHYK S, WATCHO P, STAVNIICHUK R, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a key role in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy[J]. *Diabetes*, 2013, 62(3):944-952.
- [13] ERIC C, CLAUDIO H, AFSHIN S. Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis[J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(6):586-597.
- [14] DEJEANS N, BARROSO K, FERNANDEZ-ZAPICO M, et al. Novel roles Of the unfolded protein response in the control of tumor development and aggressiveness[J]. *Semin Cancer Biol*, 2015(33):67-73.
- [15] DANIELE T, SCHIAFFINO M V. Lipid transfer and metabolism across the endolysosomal-mitochondrial boundary[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1861(8):880-894.
- (收稿日期:2018-07-20 修回日期:2018-10-03)