

吡格列酮对糖尿病大鼠足细胞的保护作用

匡 蕾¹, 戴 武¹, 叶山东², 邢 燕², 胡 闻³

摘要 目的 研究不同剂量盐酸吡格列酮(PIO)对链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠肾脏足细胞的保护作用。方法

将SD大鼠随机分为正常对照组(NC组),糖尿病组(DM组),糖尿病低剂量PIO组(DR1组),糖尿病中剂量PIO组(DR2组)和糖尿病高剂量PIO组(DR3组)。于0、8周末测尿白蛋白、尿nephritin、尿转化生长因子- β 1(TGF- β 1)和尿肌酐(UCr),并计算尿白蛋白/肌酐(UACR)、nephritin/肌酐(UNER)和TGF- β 1/肌酐(UTGR)。每周监测血糖(BG),8周末取血测糖化血红蛋白(HbA1c),免疫组化检测肾组织nephritin及TGF- β 1蛋白表达。结果 ①糖尿病大鼠各时间点BG及8周末HbA1c显著高于NC组($P < 0.05$),糖尿病大鼠组间差异无统计学意义。②8周末,各PIO组UACR、UNER和UTGR均显著低于DM组($P < 0.05$),且DR2、DR3组UACR和UNER低于DR1组($P < 0.05$);肾脏nephritin蛋白表达:NC组>各PIO组>DM组($P < 0.05$),DR1、DR2和DR3组间差异无统计学意义;肾脏TGF- β 1蛋白表达:DM组>各PIO组>NC组($P < 0.05$),DR1、DR2和DR3组间差异无统计学意义。③UNER与UTGR呈显著正相关($r = 0.787, P < 0.01$),肾脏nephritin蛋白与TGF- β 1蛋白呈显著负相关($r = -0.669, P < 0.01$)。结论 PIO对糖尿病大鼠足细胞有一定的保护作用,该作用可能与其上调足细胞nephritin表达和抑制肾组织局部TGF- β 1表达有关。

关键词 糖尿病肾病;nephritin;转化生长因子- β 1;吡格列酮;足细胞

中图分类号 R 587.24;R 696.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)11-1634-04

近年来不少动物实验和临床研究^[1]显示噻唑烷二酮类药物(TZDs)包括吡格列酮(pioglitazone, PIO)和罗格列酮等除降低血糖和改善脂质代谢之外,还可以减少尿白蛋白排泄,具有潜在的肾脏保护作用,但确切机制尚未明了。nephritin是足细胞裂孔隔膜“拉链”结构的主要成分,在滤过屏障的形成及

维持其正常功能中发挥重要作用。转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)在正常情况下可修复组织损伤,但过量表达和生成可促进肾小球系膜区细胞外基质的聚集、肾小球硬化和肾间质纤维化^[2],目前认为糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)的病理变化是一种慢性纤维增生性改变,这就提示TGF- β 1在DN的发病中起一定作用。该研究旨在探讨PIO对糖尿病大鼠足细胞的保护及其与抑制TGF- β 1的关系,为临床应用PIO防治DN提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康清洁级雄性Sprague-Dawley大鼠50只,2月龄, (196 ± 20) g,由安徽医科大学实验动物中心提供。实验期间,室温控制在 $(19 \pm 1)^\circ\text{C}$,湿度48%,12 h交替照明,大鼠自由进食饮水。

1.2 药品及试剂 PIO由江苏恒瑞公司提供,临用时于生理盐水溶解;尿白蛋白(UA1b)试剂盒购自北京北方生物技术研究所;肌酐测定试剂盒购自上海荣盛生物药业有限公司;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自美国Sigma公司;nephritin及TGF- β 1 ELISA试剂盒购自美国R&D公司;nephritin及TGF- β 1多克隆抗体购自北京博奥森生物技术公司。

1.3 糖尿病大鼠模型的制备和分组 50只大鼠适应性喂养1周,检测血糖(blood glucose, BG)正常。设立正常对照组(NC组, $n = 8$),其余42只大鼠禁食12 h后,在空腹状态下,STZ按65 mg/kg一次性腹腔注射。72 h后测BG ≥ 16.7 mmol/L鼠为糖尿病大鼠模型,其中36只大鼠造模成功,稳定1周后随机分为4组:糖尿病模型组(DM组)、糖尿病低剂量PIO组(DR1组)、糖尿病中剂量PIO组(DR2组)、糖尿病高剂量PIO组(DR3组),每组各9只。DR1、DR2、DR3组分别予以PIO 10、20和30 mg/(kg·d)的混悬液灌胃,NC组和DM组给予等量生理盐水灌胃,1次/d,持续8周。为防止糖尿病大鼠BG过高或糖尿病酮症酸中毒发生,予皮下注射甘精胰岛素0.5 U,视情况每周注射2~3次,维持BG在20~30 mmol/L。实验过程中DR3组1只大鼠死于

2014-07-14 接收

基金项目 安徽省自然科学基金(编号:11040606M159);安徽高校省级自然科学研究项目(编号:KJ2011A157)

作者单位:¹安徽省合肥市第二人民医院内分泌科,合肥 230011

安徽医科大学附属省立医院²内分泌科、³病理科,合肥 230001

作者简介 匡 蕾,女,硕士研究生;

叶山东,男,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: ysd196406@163.com

尾部感染,DR1、DM 组各有 1 只大鼠因 BG 过高发生酮症酸中毒死亡,DR2 组 1 只大鼠死于灌胃窒息。

1.4 标本留取 注射 STZ 稳定 7 d 后设为 0 周,开始分组干预治疗。分别于 0 周和 8 周末留取尿,混匀后置于 -40°C 冰箱待测 UAlb、尿 nephrin (Unephrin)、尿 TGF- $\beta 1$ (UTGF- $\beta 1$) 和尿肌酐 (Ucr)。8 周末各组大鼠在 10% 的水合氯醛腹腔注射麻醉下行腹主动脉插管收集血标本检测糖化血红蛋白 (HbA1c)、血肌酐 (Scr),然后留取左侧肾脏,部分肾脏组织分离皮质后液氮保存,用于免疫组化。

1.5 实验室指标的检测 放射免疫法测定 UAlb;苦味酸法检测 Scr、Ucr;HPLC 法检测 HbA1c;利用酶联免疫分析法检测 Unephrin 和 UTGF- $\beta 1$ 。本实验留取 10 ml 随机尿,为消除尿量的影响,UAlb、Unephrin 及 UTGF- $\beta 1$ 均以 Ucr 校正,简称为 UACR、UNER 和 UTGR。

1.6 免疫组化检测肾组织 nephrin 及 TGF- $\beta 1$ 蛋白水平 石蜡切片脱蜡水化,微波抗原修复,滴加兔抗大鼠 nephrin (1:200)、TGF- $\beta 1$ (1:200), 4°C 过夜;PBS 洗,再滴加生物素标记的羊抗兔二抗 (福州迈新生物技术开发有限公司),室温孵育 30 min,二甲胺基偶氮苯显色,苏木精复染,盐酸乙醇分化,中性树胶封固。于 200 倍下,每张切片取 3 个视野拍照,全自动图像分析系统 (Image pro plus 6.0) 对图像中的阳性反应部位测定累积光密度 (integral optical density, IOD) 及相应面积,取每张切片阳性物质的相对含量。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,同一时间点的多组分析采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法,相关性分析采用 Pearson 相关检验。

2 结果

2.1 一般情况 实验期间,各组糖尿病大鼠均表现出多饮、多尿、多食以及体重减轻。

2.2 各组 UACR、UNER 和 UTGR 比较 8 周末,各糖尿病大鼠 UACR、UNER 和 UTGR 均明显高于 NC 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与 DM 组比较,上述指标在各剂量 PIO 组均显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且 DR2、DR3 组 UACR、UNER 低于 DR1 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 肾组织 nephrin 及 TGF- $\beta 1$ 蛋白的表达 8 周末,免疫组化显示:① 肾脏 nephrin 蛋白 IOD 值:NC 组 > 各 PIO 组 > DM 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),DR1、DR2 和 DR3 组间 IOD 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 1、表 1;② 肾脏 TGF- $\beta 1$ 蛋白 IOD 值:DM 组 > 各 PIO 组 > NC 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),DR1、DR2 和 DR3 组间 IOD 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 1、表 1。

2.4 相关分析 Pearson 相关分析显示:UNER 与 UTGR 呈显著正相关 ($r = 0.787, P < 0.01$);肾组织 nephrin 蛋白与 TGF- $\beta 1$ 蛋白呈显著负相关 ($r = -0.669, P < 0.01$)。

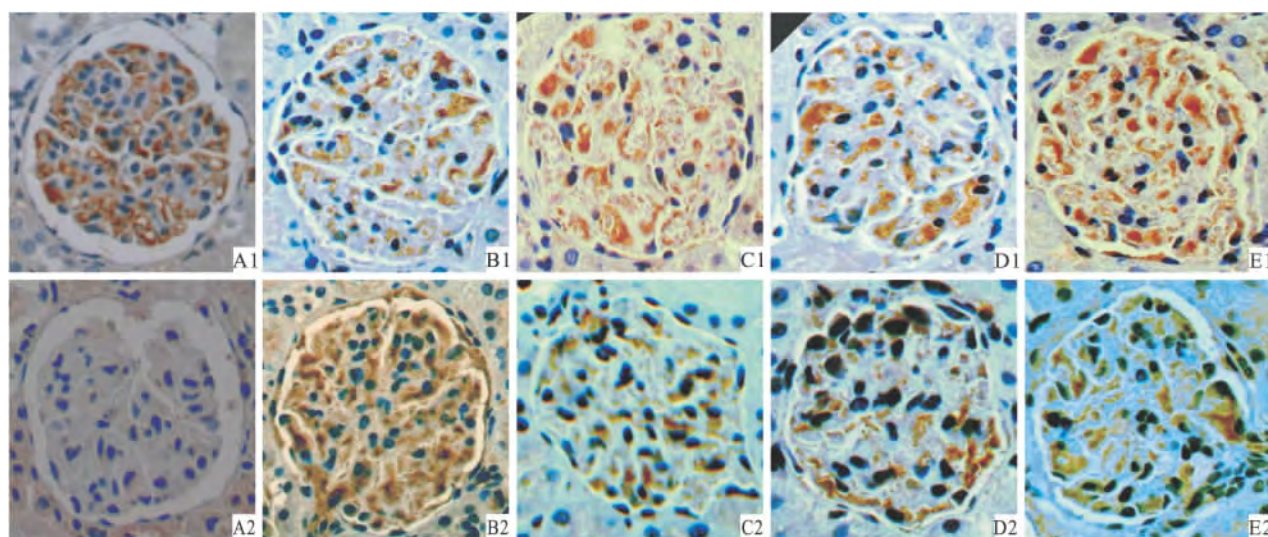


图 1 各组肾组织 nephrin、TGF- $\beta 1$ 蛋白的表达 $\times 200$

A: NC 组; B: DM 组; C: DR1 组; D: DR2 组; E: DR3 组; 1: nephrin; 2: TGF- $\beta 1$

表1 8周末各组 UACR、UNER、UTGR、SCr、BG、HbA1c、IOD_{neph}和 IOD_{TGF-β1}的比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	UACR (mg/g)	UNER (ng/g)	UTGR (mg/g)	SCr (μ mol/L)	BG (mmol/L)	HbA1c (%)	IOD _{neph}	IOD _{TGF-β1}
NC	35.05 ± 6.75	97.00 ± 10.39	0.61 ± 0.48	55.10 ± 8.04	4.00 ± 0.77	3.80 ± 0.57	58.74 ± 7.82	9.94 ± 4.51
DM	138.51 ± 18.87*	683.25 ± 8.74*	2.57 ± 0.74*	106.50 ± 16.20*	21.76 ± 1.57*	11.07 ± 1.55*	16.00 ± 5.50*	89.90 ± 15.05*
DR1	107.53 ± 18.36* [#]	414.94 ± 10.51* [#]	1.21 ± 0.34* [#]	93.18 ± 13.06*	22.26 ± 2.02*	10.55 ± 1.24*	35.52 ± 7.48* [#]	64.37 ± 12.78* [#]
DR2	89.04 ± 16.12* [#] △	310.50 ± 12.17* [#] △	1.14 ± 0.38* [#]	93.67 ± 17.28*	21.96 ± 2.10*	10.54 ± 1.43*	35.79 ± 6.07* [#]	56.27 ± 15.35* [#]
DR3	89.93 ± 16.46* [#] △	303.31 ± 9.41* [#] △	1.22 ± 0.43* [#]	98.30 ± 13.64*	21.83 ± 1.89*	10.49 ± 1.10*	36.14 ± 5.68* [#]	58.31 ± 16.70* [#]

与同一时间点 NC 组比较: * $P < 0.05$; 与同一时间点 DM 组比较: [#] $P < 0.05$; 与同一时间点 DR1 组比较: △ $P < 0.05$

3 讨论

TZDs 是一种胰岛素增敏剂,是人工合成的过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator activated receptors, PPAR γ)的特异性配体,包括 PIO 和罗格列酮等,近来研究^[3-4]显示, TZDs 可显著降低尿蛋白排泄,对糖尿病肾小球硬化有确切的防治作用。前期研究^[5]显示,与未干预的糖尿病对照组比较,经 8 周 PIO 治疗的糖尿病大鼠 UAlb 排泄显著降低,且该指标在 DR2 和 DR3 组更低于 DR1 组,该结果进一步证实 TZD-PIO 对糖尿病大鼠具有一定的肾脏保护作用,且该作用具有一定的剂量依赖性,不完全依赖于血糖的控制。

neph_{rin} 是肾小球滤过屏障中裂孔隔膜上的重要蛋白成分,其结构和功能异常参与了蛋白尿及糖尿病肾小球硬化的发生。neph_{rin} 蛋白的缺乏可导致肾小球足细胞减少、大量蛋白尿及肾功能衰竭,尿 neph_{rin} 的出现是肾小球足细胞损伤及随后发生肾脏疾病的早期标志^[6]。本研究结果显示,糖尿病大鼠肾组织 neph_{rin} 蛋白表达明显降低,这与文献^[7]报道一致;与 DM 组比较,PIO 干预组大鼠(DR1、DR2、DR3 组)肾组织 neph_{rin} 蛋白表达明显增强,且尿 neph_{rin} 排泄率显著减少,提示 TZD-PIO 对糖尿病大鼠肾小球足细胞具有良好的保护作用,但确切的机制尚不十分清楚,可能与其抑制肾组织局部炎症反应^[8-9]、降低氧化应激^[10-11]和恢复肾脏 neph_{rin} 蛋白表达^[12]等有关。此外,PIO 还可降低 IL-1 诱导的环氧化酶-2(COX-2)的表达^[13],对肾脏足细胞起间接保护作用。DR2 与 DR3 组间的 UACR、UNER 差异无统计学意义,可能是因为 20 mg/(kg·d) PIO 已使 PPAR γ 结合位点充分饱和,因此再增高剂量并不能进一步提高疗效。

本研究结果显示糖尿病大鼠尿 TGF- β 1 排泄及肾小球 TGF- β 1 蛋白表达均显著高于正常对照组,PIO 治疗 8 周后,尿 TGF- β 1 排泄减少,肾小球 TGF- β 1 蛋白表达下降,表明 PIO 可延缓 DN 的发生与发

展,这与既往研究^[14]结果相似。进一步分析显示肾小球 TGF- β 1 蛋白与 neph_{rin} 蛋白表达呈显著负相关,尿 TGF- β 1 与尿 neph_{rin} 呈显著正相关,提示 TZD-PIO 上调肾组织 neph_{rin} 表达,保护足细胞可能与其抑制局部增强的 TGF- β 1 表达有关。糖代谢异常发生 DN 时可通过 TGF- β 、MAPK 信号途径、p27Kip1 途径,损伤 neph_{rin} 蛋白,破坏足细胞的电荷屏障,改变足细胞骨架,诱导足细胞去极化。Takano et al^[15]发现活化的巨噬细胞产生前炎症因子 IL-1 与 TNF- α 通过磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 途径下调 neph_{rin} 蛋白的表达。另外,Chayur et al^[16]研究肾脏 TGF- β 1 表达上调导致蛋白尿及足细胞去分化,可能与 snail 表达上调及足细胞标志物 neph_{rin} 蛋白表达下调有关。本实验结果未显示上述指标(尿 TGF- β 1、肾小球 TGF- β 1 蛋白、neph_{rin} 蛋白)在不同剂量 PIO 组间差异有统计学意义,有待进一步研究。

参考文献

- Maehira F, Ishimine N, Miyagi I, et al. Anti-diabetic effects including diabetic nephropathy of anti-osteoporotic trace minerals on diabetic mice [J]. Nutrition, 2011, 27(4): 488-95.
- Border W A, Noble N A. Evidence that TGF-beta should be a therapeutic target in diabetic nephropathy [J]. Kidney Int, 1998, 54(4): 1390-1.
- Neda R, Pitocco D, Zaccardi F, et al. Effect of pioglitazone on systemic inflammation is independent of metabolic control and cardiac autonomic function in patients with type 2 diabetes [J]. Acta Diabetol, 2010, 47(Suppl 1): 117-22.
- Sarafidis P A, Stafylas P C, Georgianos P I, et al. Effect of thiazolidinediones on albuminuria and proteinuria in diabetes: a meta-analysis [J]. Am J Kidney Dis, 2010, 55(5): 835-47.
- 匡 蕾, 叶山东, 刑 燕, 等. 盐酸吡格列酮对糖尿病大鼠尿 neph_{rin} 排泄的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(10): 1029-31.
- Patari A, Forsblom C, Havana M, et al. Neph_{rin}uria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes [J]. Diabetes, 2003, 52(12): 2969-74.
- 陈立平, 周巧玲, 彭卫生. 足细胞超微结构及其相关分子表达变化在糖尿病肾病发病中的作用 [J]. 中南大学学报(医学

- 版), 2007, 32(4): 620–5.
- [8] Ko G J, Kang Y S, Han S Y, et al. Pioglitazone attenuates diabetic nephropathy through an anti-inflammatory mechanism in Type 2 diabetic rats [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(9): 2750–60.
- [9] Wang W, Liu F, Chen N. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) agonists attenuate the profibrotic response induced by TGF- β 1 in renal interstitial fibroblasts [J]. *Mediators Inflamm*, 2007(1): 626–41.
- [10] Faine L A, Rudnicki M, C  sar F A, et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of a new arylidene-thiazolidinedione in macrophages [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(22): 3351–60.
- [11] Taguchi A, Hayashi S. Study of MDA-LDL by pioglitazone and pitavastatin in patients with type 2 diabetes [J]. *Nihon Rinsho*, 2011, 69(1): 100–4.
- [12] Miglio G, Rosa A C, Rattazzi L, et al. The subtypes of peroxisome proliferator-activated receptors expressed by human podocytes and their role in decreasing podocyte injury [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 162(1): 111–25.
- [13] Martín A, Pérez-Gir  n J V, Hern  n  z R, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation reduces cyclooxygenase-2 expression in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress [J]. *J Hypertens*, 2012, 30(2): 315–26.
- [14] 张红, 胡长军, 陆卫平. 吡格列酮对糖尿病大鼠肾组织 TGF- β 1、MMP-9、Col-IV 表达影响 [J]. *重庆医科大学学报*, 2011, 36(7): 826–8.
- [15] Takano Y, Yamauchi K, Hayakawa K, et al. Transcriptional suppression of Nephron in podocytes by macrophages: roles of inflammatory cytokines and involvement of the PI3K/Akt pathway [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(3): 421–6.
- [16] Ghayur A, Liu L, Kolb M, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of TGF- β 1 to the renal glomeruli leads to proteinuria [J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(3): 940–51.

Experimental study on the expression of podocyte protection by pioglitazone in diabetic rats

Kuang Lei¹, Dai Wu¹, Ye Shandong², et al

(¹Dept of Endocrinology, The Second People's Hospital of Hefei, Hefei 230011;

²Dept of Endocrinology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the protection against podocyte injury by different dosages of hydrochloride pioglitazone in diabetic nephropathy (DN) rats. **Methods** Diabetic rats were randomly divided into following four groups: diabetic model rats (group DM, $n=8$), pioglitazone [PIO, 10, 20 and 30 mg/(kg·d), respectively] treated diabetic rats (group DR1, DR2 and DR3, $n=8$), 8 healthy rats served as a normal control group (group NC). 10 ml urine specimen was collected to test urinary albumin (UAlb), urinary sediment nephrin (Unep), urinary TGF- β 1 (UTGF- β 1) and urinary creatinine (UCr) at the basal and 8th week. To eliminate the impact of urine volume, the parameters mentioned above were expressed as UAlb/UCr (UACR), Unep/UCr (UNER), UTGF- β 1/UCr (UTGR). At the 8th week, glycated haemoglobin (HbA1c) levels were assessed. Renal tissue nephrin and TGF- β 1 protein expression were determined by immunohistochemistry. **Results** ① The blood glucose (BG) levels throughout the study period along with HbA1c in diabetic rats were significantly higher than those in group NC ($P<0.05$), whereas no significant differences among group DR1, DR2, DR3 and group DM. ② At the 8th week, the levels of UACR, UNER and UTGR decreased significantly in PIO-treatment groups compared with group DM. In addition, both UACR and UNER in group DR2 and DR3 were lower than those in group DR1 ($P<0.05$); the level of renal nephrin protein: NC group > PIO-treated groups > DM group ($P<0.05$), and no differences among PIO-treated groups. The level of renal TGF- β 1 protein: DM group > PIO-treated groups > NC group ($P<0.05$), whereas no differences among PIO-treated groups. ③ UNER was positively correlated with UTGR ($r=0.787, P<0.01$). The expression of renal nephrin protein was negatively correlated with renal TGF- β 1 protein ($r=-0.669, P<0.01$). **Conclusion** Pioglitazone has protective effects on podocytes of diabetic rats, which may be related partly with its effects in upregulating renal nephrin protein and inhibiting renal local TGF- β 1 expression beyond its hypoglycemic effect.

Key words diabetic nephropathy; nephrin; TGF- β 1; pioglitazone; podocyte