文章编号:1000-5404(2011)19-2021-04

论著

2型糖尿病肾病大鼠肾脏MCP-1与氧化应激相关性研究

魏 平,梁瑞凯,谭明红,匡剑韧,宁 宁 (400038 重庆,第三军医大学西南医院内分泌科)

[摘要] **目的** 观察2型糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)大鼠肾脏氧化应激指标与单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)表达水平的相关性,并通过普罗布考早期干预来探讨抗氧化剂对糖尿病肾脏的保护机制。**方法** 设立对照(N组,健康对照组)的同时,采用链脲佐菌素(STZ) 35 mg/kg体质量剂量腹腔注射,构建2型糖尿病肾病大鼠模型,将造模成功的2型糖尿病大鼠分别给予普罗布考(P组,普罗布考组)和NADPH氧化酶抑制剂(Apocynin)(A组,Apocynin组)干预。12周时,测量24 h尿蛋白、尿微量白蛋白以及FPG、Cr、BUN;然后处死观察肾脏病理及超微病理改变;免疫组化(S-P)法检测肾组织NT和MCP-1的表达量;RT-PCR半定量NF-κB mRNA表达,并作相关分析。**结果** ①P组和A组较DN组可以明显改善尿白蛋白、血Cr、BUN水平和肾脏肥大指数($P<0.05$)。②DN组大鼠肾脏NT和MCP-1的表达呈明显正相关($r=0.0$),且显著高于N组($P<0.05$)。③P组肾脏NT、MCP-1表达较DN组明显下降($P<0.05$),但和A组无显著差异。**结论** 普罗布考可能通过抑制氧化应激反应下调MCP-1过表达对肾脏的损伤,起到保护肾脏的作用。

[关键词] 普罗布考;单核细胞趋化蛋白-1;核因子-κB;2型糖尿病;糖尿病肾病
[中图法分类号] R587.2; R341; R979.9 [文献标志码] A

Correlation on renal MCP-1 and oxidative stress in rats with type 2 diabetic nephropathy

Wei Ping, Liang Ruikai, Tan Minghong, Kuang Jianren, Ning Ning (Department of Endocrinology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the correlation between monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) expression and oxidative stress indices in kidney of type 2 diabetic nephropathy (DN) rat model, and through probucol early intervention to explore the protective mechanism of antioxidants on diabetic kidney. **Methods** Twenty-four male Wistar rats of 8 weeks age were randomly divided into a normal control group ($n=6$) and a model group ($n=18$). Rats of the normal control group were fed with regular diet, while rats of the model group were fed with high-fat high-sugar diet and 4 weeks later were given an intraperitoneal injection of 35 mg/kg streptozotocin (SZT). The successfully constructed type 2 diabetic nephropathy rat models were then randomly divided into a DN group ($n=5$), a P group ($n=6$) and an A group ($n=6$). Rats of the P group were given 61 mg/kg Probucol and high-fat high-sugar diet. Rats of the A group were given 200 mg/kg Apocynin (NAPDH oxidase inhibitor) and high-fat high-sugar diet. At week 12, the levels of 24-hour urine protein, urinary micro albumin, serum creatinine and blood urea nitrogen were measured. The rats were then sacrificed. Renal and ultrasturctural pathological changes were examined. Renal tissue NT and MCP-1 expressions were measured by immunohistochemical assay. NF-κB mRNA expression was semi-quantified by RT-PCR, and correlation analysis was performed. **Results** ①Compared with the DN group, the P group and A group had significantly lower levels of urinary micro albumin, serum creatinine, blood urea nitrogen and kidney hypertrophy index ($P<0.05$). ②MCP-1 expression in the DN group was positively correlated with NT expression and renal function ($r=0.0$); both MCP-1 and NT levels were significantly higher than those in the N group ($P<0.05$). ③NT and MCP-1 expressions in the P group were significantly decreased as compared with those in the DN group ($P<0.05$), but not significantly different from those in the A group. **Conclusion** Antioxidant may down-regulate MCP-1 expression through inhibition of oxidative stress in diabetic nephropathy and therefore protect renal function by reducing injury resulted from MCP-1 overexpression.

[**Key words**] Probucol;monocyte chemotactic protein-1;NF-κB;diabetes mellitus;diabetic nephropathy

Corresponding author:Wei ping,E-mail:wp301@sina.com

[通信作者] 魏 平,E-mail:wp301@sina.com

糖尿病控制及并发症评估试验(diabetes control and complications trial, DCCT)和英国糖尿病前瞻性研究(United Kingdom prospective diabetes study, UKPDS)已经证实氧化应激在糖尿病肾病的发病过程中为一原发且独立的参与因素,糖尿病状态下高血糖诱导的线粒体电子传递链活性氧(reactive oxygen species,ROS)产生是氧化应激的基本环节,是引起糖尿病肾损伤多条通路激活的共同途径[1],单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)是糖尿病肾病重要的生物学标志物,在引起糖尿病肾血管损伤及肾基质纤维化中起到关键作用。越来越多的证据证明,在糖尿病状态下肾组织中氧化应激水平和MCP-1表达呈现明显的相关关系。肾组织中过量产生的ROS,可能是MCP-1高表达的刺激因素。抗氧化剂可以有效抑制糖尿病大鼠肾脏内的MCP-1表达,但是机制不明。本实验拟观察抗氧化剂(普罗布考)抗氧化及抗炎的作用机制及其对2型糖尿病大鼠肾脏病变的影响,并探讨这种抑制作用是否与其下调MCP-1表达有关。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

24只周龄8周清洁级雄性Wistar大鼠,体质量210~230 g(购于第三军医大学实验动物中心)。适应性喂养1周后,随机抽取18只大鼠给予高糖高脂饮食(普通饲料66.6%、蔗糖20%、熟猪油10%、胆固醇2.5%、胆酸钠1%)。4周后采用链脲佐菌素(STZ,美国sigma,用0.1 mmol/L柠檬酸-柠檬酸钠溶液稀释成1%溶液,pH=4.2)35 mg/kg体质量剂量腹腔注射,72 h后血糖持续高于16.7 mmol/L为造模成功[2]。将造模成功的大鼠随机分为糖尿病肾病组(DN组,$n=5$)、普罗布考治疗组(P组,$n=6$)(山东齐鲁制药)、夹竹桃麻素组(A组,$n=6$)(美国sigma)。P组以普罗布考500mg/(kg·d),A组以夹竹桃麻素200 mg/(kg·d)灌胃。12周时留24 h尿量,处死腹腔静脉取血-20 ℃冰箱保存。取肾脏,迅速称量后,10%甲醛溶液固定。剩余6只大鼠作为正常对照组(N组)。

1.2 方法

1.2.1 生化指标 血糖采用德国罗氏Accu-chek便携式血糖仪测定,血肌酐、血尿素氮采用日本AU640 Olympus全自动生化分析仪测定,尿蛋白采用双缩脲法Olympus全自动生化分析仪检测。

1.2.2 免疫组化检测大鼠肾组织NT表达 严格按照S-P-9002免疫组化试剂盒说明书(北京 中山金桥)操作常规石蜡包埋,切片厚2 μm脱蜡至水;含3% H_2O_2的甲醇室温孵育25 min,阻断内源性过氧化物酶;微波修复抗原;加入1∶100稀释的兔抗鼠单克隆抗体,置湿盒中4 ℃过夜;1∶100稀释生物素化羊抗鼠IgG,37 ℃孵育25 min;DAB显色:1 ml蒸馏水加入试剂盒中A、B、C试剂各1滴,混匀后加至切片,室温显色,镜下控制反应时间5 min,阳性细胞于细胞质出现棕黄色颗粒;苏木精轻度复染细胞核;脱水、透明、中性树胶封片。

1.2.3 免疫组化检测肾组织MCP-1表达量 MPC-1免疫组化步骤同NT,1抗稀释比例为1∶100。

1.2.4 免疫组化结果半定量分析 应用高清晰彩色病理图像免疫组化测量系统(imago-pro plus5.0)进行免疫组化图像分析,经标准灰度校正后,任取5个视野,测定NT和MCP-1的平均积分光密度值(IDP)。

1.3 统计学处理

计量资料用$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS统计软件,进行方差分析,组间用q检验,行相关及回归分析。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

DN组大鼠造模成功后开始出现明显的多饮、多食、多尿,逐渐消瘦,精神萎靡,至实验结束时死亡2只。实验4周后,DN组大鼠体质量增加缓慢,P组大鼠增长较快($P<0.05$),P组和A组之间体质量差别无统计学意义。DN、P、A组之间血糖较N组明显升高($P<0.05$),组间差异不显著。DN组肾脏肥大指数明显高于其他各组($P<0.05$),A、P组之间差别不显著。DN组尿微量白蛋白和24 h尿蛋白明显高于其余3组,($P<0.05$),P、A组之间差异不显著。DN组血Cr与BUN较其余3组均明显升高($P<0.05$),P组和A组降低血Cr与BUN均具有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 普罗布考对大鼠肾脏组织的病理改变

电镜下可见N组肾脏超微结构清晰,无足突细胞融合,GBM厚度均匀一致;DN组GBM厚薄不均,总体呈明显增厚,结构模糊不清,足突增粗、破坏、融合、消失,足突融合率约达80%,系膜基质增多、肿胀,系膜区扩大,系膜细胞肿胀,可见高密度电子沉积物;P组的平均基底膜厚度较DM组明显降低,有少量足突细胞融合,足突融合率约达30%,系膜区细胞仅可见轻度增生(图1)。

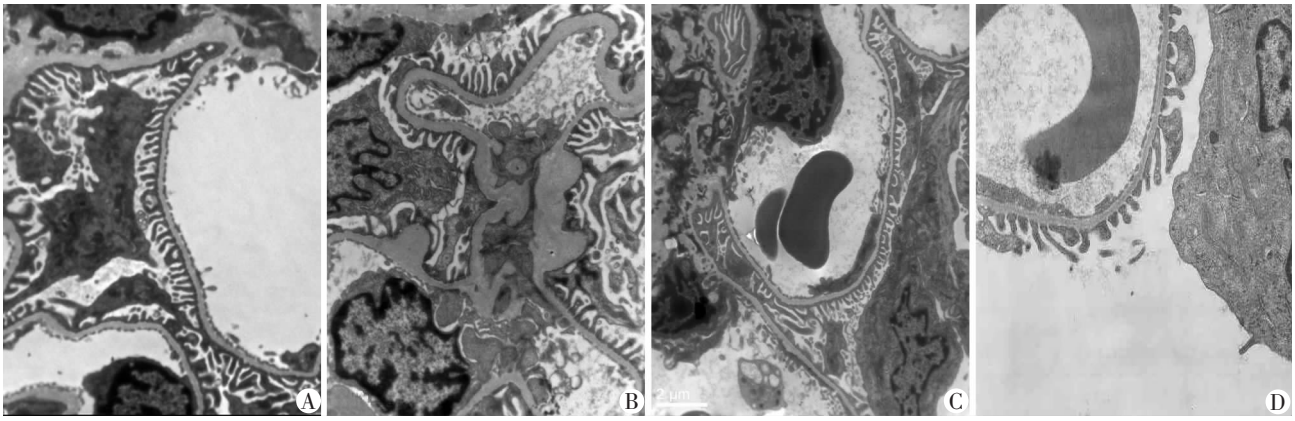
2.3 普罗布考对大鼠肾组织硝基酪氨酸(nitrotyrosine, NT)表达影响

4组大鼠肾组织NT免疫组化结果:DN组大鼠肾小球和肾小管细胞质内呈明显棕黄色染色,可见大量阳性细胞,而N组大鼠肾小管基本未见阳性细胞,P组、A组阳性细胞数明显少于DN组,用图像分析软件测得阳性面积平均光密度值,P组明显改善NT的表达($P<0.05$)(图2、表2)。

表1 4组大鼠体质量、K/G、空腹血糖、肌酐、尿素氮、尿微量白蛋白、24 h尿蛋白比较($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

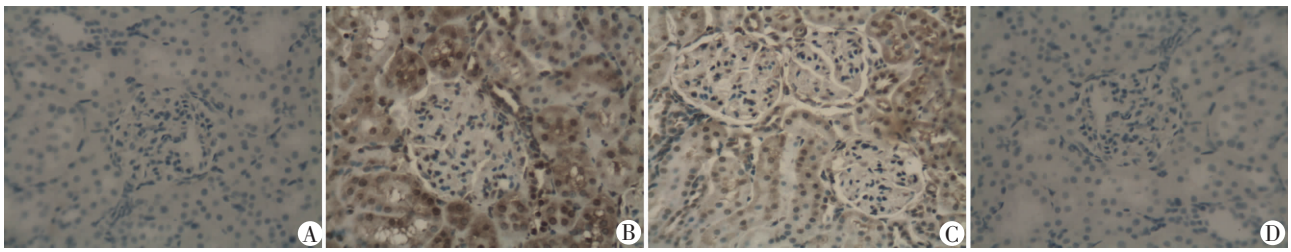
组别	体质量(g)	K/G	空腹血糖(mmol/L)	肌酐(μmol/L)	尿素氮(mmol/L)	尿微量白蛋白(mg/dl)	24小时尿蛋白定量(mg/24 h)
N组	358.400±7.635	0.022±0.004	5.4±0.3	97.961±10.071	5.161±0.450	0.064±1.133	11.612±5.150
DN组	303.667±7.371[a]	0.023±0.003[a]	18.8±1.5[a]	141.862±8.923[a]	8.967±0.808[a]	0.202±0.890[a]	44.27±7.143[a]
P组	314.200±4.817[ab]	0.022±0.001[ab]	17.9±2.0[ab]	123.681±5.846[ab]	7.324±0.385[ab]	0.144±2.030[ab]	34.214±4.332[ab]
A组	315.602±9.290[ab]	0.020±0.003[ab]	17.9±0.7[ab]	123.522±5.485[ab]	7.114±0.726[ab]	0.140±1.013[ab]	33.622±7.321[ab]

a:$P<0.05$,与N组比较;b:$P<0.05$,与DN组比较



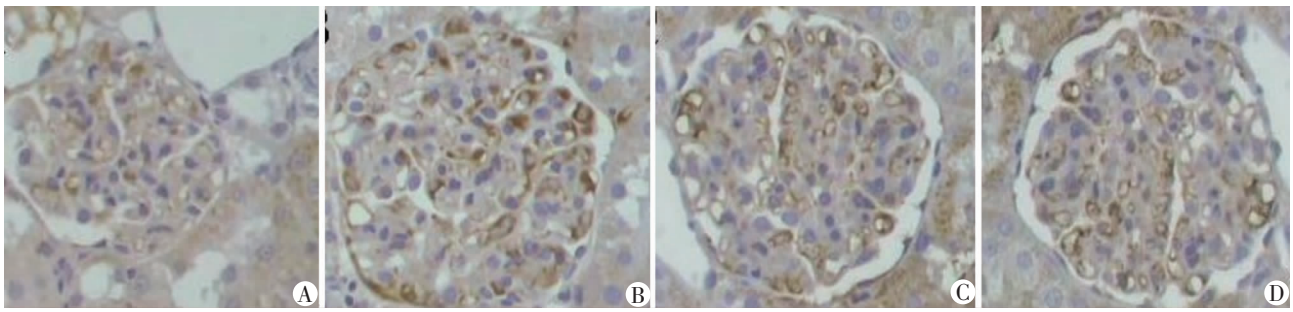
A:正常对照组(×7 000);B:糖尿病肾病组(×10 000);C:普罗布考治疗组(×8 000);D:夹竹桃麻素干预组(×10 000)

图1 电镜观察4组大鼠肾组织病理变化



A:正常对照组(×400);B:糖尿病肾病组(×600);C:普罗布考治疗组(×600);D:夹竹桃麻素干预组(×400)

图2 免疫组化检测4组大鼠肾皮质NT的表达 (S-P)



A:正常对照组;B:糖尿病肾病组;C:普罗布考治疗组;D:夹竹桃麻素干预组

图3 免疫组化检测4组大鼠肾皮质MCP-1的表达 (S-P ×800)

2.4 普罗布考对大鼠肾组织MCP-1表达的影响

4组大鼠肾组织MCP-1免疫组化结果:N组肾小球内皮细胞、系膜细胞无明显染色,肾小球系膜区,基底膜均极少量表达MCP-1。DN组肾组织着色广泛、浓集,MCP-1表达以肾小球表现最为突出,肾小球内皮细胞、系膜细胞强阳性表达,肾小管和间质也有所增强。P组肾小球内皮细胞、系膜细胞及肾小管上皮细胞有弱着色,MCP-1表达程度明显减轻(图3,表2)。

表2 4组大鼠肾皮质NT、MCP-1表达($\bar{x} \pm s$)

组别	NT	MCP-1
N组	0.085±0.007	0.115±0.008
DN组	0.211±0.015[a]	0.391±0.010[a]
P组	0.172±0.007[ab]	0.291±0.015[ab]
A组	0.176±0.061[ab]	0.293±0.020[ab]

a:$P<0.05$,与N组比较;b:$P<0.05$,与DN组比较

3 讨论

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是常见的糖尿病慢性微血管并发症之一,通常指由于糖尿病引起的肾小球基底膜增厚,系膜扩张以及胞外基质增生,导致肾小球的高滤过和蛋白尿,已经证实氧化应激在糖尿病肾病的发病过程中为一原发且独立的参与因素。糖尿病状态下活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生及氧化应激水平升高是氧化应激的基本环节,其能破坏组织蛋白、脂肪、核酸反应同时产生过氧化脂质,如各种醛、酮等,从而放大氧化损伤[3]。糖尿病肾病的另一启动因素是外周血中的单核/巨噬细胞在肾组织的浸润和活化,MCP-1作为CC趋化家族最重要的成员之一,一方面通过趋化和激活单核/巨噬细胞至肾小球及肾小管区域参与内皮细胞的损伤和ECM沉积,另一方面通过自分泌或旁分泌的形式直接刺激肾脏细胞表达IL-1、TGF-β1、α-SMA等细胞因子,加重肾血管损伤和基质纤维化,最终引起终末期肾

衰[4]。有研究[5]证实,高糖诱导下,通过ROS刺激MCP-1 mRNA可以高表达,进而引起肾小球系膜细胞的损伤[6]。本实验中,2型糖尿病大鼠注射STZ 12周后,血肌酐、血尿素氮、肾质量/体质量比值、尿微量白蛋白以及24 h尿蛋白定量明显高于健康对照组,肾脏病理显示毛细血管基底膜增厚、结构模糊;足突破坏、融合消失;系膜基质增多、系膜细胞肿胀,表明此时糖尿病大鼠已有糖尿病肾病的改变。糖尿病肾病组肾组织NT(ROS与蛋白反应产物)和MCP-1表达量明显高于健康对照组,而NADPH氧化酶抑制剂(Apocynin)干预组,肾功能以及肾脏病理改变有明显改善,且NT和MCP-1的表达量也显著降低,和文献报道一致。提示氧化应激在MCP-1的过表达和糖尿病肾病发生、发展中起到重要作用,机制可能是ROS通过上调MCP-1的表达引起肾损伤。

ROS在体内具有高度反应性[6],能够迅速与周围组织发生反应,使生物膜脂质过氧化、细胞内蛋白质及酶变性、DNA损伤,这种高度的反应性就决定了其半衰期非常短,直接测量这些自由基给非常困难,但是和脂质、蛋白质、DNA反应后的产物相对比较稳定,可以作为反应氧化应激的标志物,氧自由基与周围蛋白质反应的产物NT已被国内外实验广泛用于氧化应激指标的检测[7],本实验就采用免疫组化的方法通过检测蛋白质氧化产物NT作为反应体内氧化应激水平的指标[8]。

普罗布考(probucol,丙丁酚)化学名:4. 4-[(1-甲基乙基)二硫]双[2.6-二(1.1-二甲基乙基)苯酚],于1977年首先在美国上市,最初以降脂药应用于临床,主要降低血清胆固醇。近几年对其药理作用的认识不断深入,发现其有抗氧化及保护肾脏的作用,有实验[9]喂食雄鼠高脂高胆固醇饮食12周后,血清丙二醛(MDA)含量,ox-LDL的含量,C反应蛋白(CRP)活性,谷胱甘肽S转移酶(GST)的活性增加,总抗氧化能力(T-AOC),总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性,对氧磷脂酶-1 (PON1)的活性降低,普罗布考可逆转这些改变[10]。本实验中普罗布考治疗组糖尿病大鼠肾脏NT与糖尿病肾病组相比有明显降低,肾功能及肾脏病理改变均明显缓解,说明普罗布考可以通过抗氧化作用延缓糖尿病肾脏病变,起到肾脏保护作用。普罗布考降低组织氧化应激水平机制尚不明确,可能是通过以下途径:①有效抑制LDL氧化形成ox-LDL,同时抑制NT的生成,而且此作用与其浓度成正比[11]。②抑制烟酰胺辅酶氧化酶的活性、清除自由基[12]。③在细胞膜内清除自由基,ROS所致的细胞损伤,渗入内皮细胞、平滑肌细胞、单核巨噬细胞中抑制单体氧的产生及释放,降低脂质氧化酶活性从而阻止细胞对LDL的氧化修饰,抑制过氧化脂质生成[10]。④普罗布考可以升高屏氧酶(paraoxonase, PON)又称对氧磷脂酶,降低氧化脂蛋白堆积[13]。

总之,本研究提示,氧化应激在MCP-1的过表达和糖尿病肾病发生、发展中起到重要作用,其机制可能是高血糖引起ROS过量生成,进而上调MCP-1的表达。普罗布考可以通过抑制肾组织氧化应激反应,从而降低MCP-1的表达,减轻糖尿病肾组织增强的炎症反应,对糖尿病大鼠肾脏有保护作用,其确切完整的机制尚待进一步研究。

参考文献:

[1] Adler S G, Pahl M, Seldin M F. Deciphering diabetic nephropathy: progress using genetic strategies[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2000, 9(2): 99-106.

[2] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications[J]. Nature, 2001, 414(13): 813-820.

[3] 徐颖,周世文,汤建林,等.实验性糖尿病肾病大鼠模型建立及优化[J].第三军医大学学报, 2006, 28(22): 2247-2249.

[4] Kuhad A, Sachdeva A K, Chopra K. Attenuation of renoinflammatory cascade in experimental model of diabetic nephropathy by sesamol[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(14): 6123-6128.

[5] Han S Y, So G A, Jee Y H, *et al*. Effect of retinoic acid in experimental diabetic nephropathy[J]. Immunol Cell Biol, 2004, 82(6): 568-576.

[6] Yi G H, Mo Z C, Ye Y P, *et al*. Effects of probucol on paraoxonase 1 expression and oxidative stress in hyperlipidemic mice[J]. Cell Biol Int, 2008, 32(S19-S20): 67-71.

[7] Umeji K, Umemoto S, Itoh S, *et al*. Comparative effects of pitavastatin and probucol on oxidative stress, Cu/Zn superoxide dismutase, PPAR-gamma, and aortic stiffness in hypercholesterolemia[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291(5): H2522-H2532.

[8] Heistad D D, Wakisaka Y, Miller J, *et al*. Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular diseases[J]. Circ J, 2009, 73(2): 201-207.

[9] Lopes-de-Faria J B, Silva K C, Lopes-de-Faria J M. The contribution of hypertension to diabetic nephropathy and retinopathy: the role of inflammation and oxidative stress[J]. Hypertens Res, 2011, 34(4): 413-422.

[10] Lemieux H, Bulteau A L, Friguet B, *et al*. Dietary fatty acids and oxidative stress in the heart mitochondria[J]. Mitochondrion, 2011, 11(1): 97-103.

[11] Kanwar Y S. TRB3: an oxidant stress-induced pseudokinase with a potential to negatively modulate MCP-1 cytokine in diabetic nephropathy[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 299(5): F963-F964.

[12] 郭啸华,刘志红,李恒,等.高糖高脂饮食诱导的2型糖尿病大鼠模型及其肾病特点[J].中国糖尿病杂志, 2002, 10(5): 290-294.

[13] Canon-Barroso L, Diaz-Herrera N, Calvo-Hueros J I, *et al*. Incidence of cardiovascular disease and validity of equations of coronary risk in diabetic patients with metabolic syndrome[J]. Med Clin (Barc), 2007, 128(14): 529-535.

(**收稿**:2011-05-09;**修回**:2011-08-27)

(编辑 栾 嘉)