论著

文章编号:1000-5404(2012)11-1040-04

甜菜碱对糖尿病肾病小鼠的治疗作用及其机制

陈吉刚,庞 琦,曾 薇,郭艳红,牟 娇,聂 凌,袁发焕,冯 兵 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院肾内科)

[摘要] **目的** 探讨分子伴侣甜菜碱(betaine)对糖尿病肾病小鼠的治疗作用及机制。**方法** db/db 小鼠按随机数字表法分为糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)组和甜菜碱治疗组(DN + B),db/m 小鼠作为正常对照组,每组 18 只。在治疗第 4、8、12 周末分别采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 技术测定 GRP78 的表达水平,ELISA 测定尿单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)的含量,常规病理和生化方法检测肾脏病理、血糖(blood glucose, BG)、血肌酐(serum creatinine,Scr)、血尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)、24 h 尿蛋白排泄率(urinary albumin excretion rate, UAER)的动态改变。**结果** ①与同期正常对照组比较,DN 组小鼠的 BG、BUN、24 h UAER、MCP-1 均明显升高($P < 0.05$),甜菜碱治疗后可明显降低 BG、BUN、24 h UAER、MCP-1 水平($P < 0.05$),而对 Scr 无明显影响。②与正常对照组比较,12 周时 DN 组小鼠肾小球基底膜增厚,系膜细胞增生,系膜基质积聚,而甜菜碱治疗后可明显抑制肾脏的病理变化。③与正常对照组比较,DN 组小鼠肾脏组织 GRP78 mRNA 和蛋白质表达水平均显著升高($P < 0.05$),甜菜碱治疗后可明显抑制 GRP78 的表达($P < 0.05$)。**结论** 甜菜碱可能通过减轻内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)及相关的炎症反应治疗 DN 小鼠。

[关键词] GRP78;糖尿病肾病;甜菜碱;小鼠
[中图法分类号] R-332; R587.2; R977.4 [文献标志码] A

Therapeutic effect of betaine on diabetic nephropathy in db/db mice

Chen Jigang, Pang Qi, Zeng Wei, Guo Yanhong, Mu Jiao, Nie Ling, Yuan Fahuan, Feng Bing (Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of betaine on diabetic nephropathy (DN) in mice. **Methods** Thirty-six db/db mice were randomly divided into DN group ($n = 18$) and betaine treatment group ($n = 18$), with 18 db/m mice served as a normal control group (NC group). At the end of 4, 8 and 12 weeks, GRP78 expression level in the renal tissue was measured by real-time quantitative fluorescence PCR and Western blotting, urine monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) concentration was assayed by ELISA, and dynamic renal pathology, blood glucose (BG), serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN), 24-hour urinary albumin excretion rate (UAER) were tested with routine pathological and biochemical methods. **Results** The BG, BUN, 24-h UAER and MCP-1 levels were significantly higher in DN group than in NC group ($P < 0.05$), which became significantly lower after betaine treatment. However, betaine had no effect on Scr. The glomerular basement membrane was thicker, the number of mesangial cells was greater, and more mesangial matrix was accumulated in DN group than in NC group at 12 weeks ($P < 0.05$), which were significantly alleviated after betaine treatment. The GRP78 mRNA and protein expression levels were significantly higher in DN group than in NC group ($P < 0.05$), which became significantly lower after betaine treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** Betaine can exert its effect on DN in db/db mice by alleviating endoplasmic reticulum stress (ERS) and related inflammatory reactions.

[**Key words**] GRP78; diabetic nephropathy; betaine; mice

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31100927). Corresponding author: Feng Bing, E-mail: fxb12@yahoo.com.cn

糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)是糖尿病严重的微血管并发症之一,其发病率在全世界范围内迅速增加,是引起终末期肾病最常见的原因。目前其发病机制尚未完全阐明,缺乏有效的治疗手段。多数人认为持续的高血糖引起的肾脏血流动力学改变,糖代谢异常伴蛋白质、脂肪代谢紊乱是 DN 的病变基础,炎症持续刺激、众多细胞因子激活以及氧化应激等因素是导致 DN 发生、发展的直接原因[1-2]。近来研究表明,内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)在 DN 的发病中发挥了重要作用[3-4],因此针对 ERS

[基金项目] 国家自然科学基金(31100927)
[通信作者] 冯 兵, E-mail:fxb12@yahoo.com.cn

发病机制寻找有效治疗药物是 DN 防治的一个新方法。甜菜碱最初是从甜菜汁中分离出的一种天然物质,化学名称为三甲基甘氨酸,属于季铵型水溶性生物碱,广泛存在于动物、植物和微生物体内,菠菜、甜菜、小麦以及虾类等海产品中含量丰富。甜菜碱主要生理功能是作为体内重要的渗透压缓冲物质保护细胞以及作为甲基供体参与蛋氨酸循环生化反应[5]。甜菜碱还是一种化学分子伴侣,可以非选择性的稳定突变蛋白质,促进蛋白质正确折叠[6]。Ji 等[7]发现甜菜碱作为分子伴侣能减轻 C57BL/6 小鼠肝脏 ERS,减轻酒精性肝损伤。因此我们推测甜菜碱在防治 DN 方面也具有一定价值。本研究拟利用甜菜碱治疗 DN 小鼠,观察其对小鼠肾脏组织 GRP78 和 MCP-1 表达的影响,探讨其对 DN 的治疗作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

RIPA 裂解液(上海申能博彩公司),兔抗鼠 GRP78 多克隆抗体(北京博奥森公司),小鼠抗小鼠 β-actin 单克隆抗体(美国 Novus 公司),抗小鼠 HRP 标记二抗、抗兔 HRP 标记二抗(美国 Sigma 公司),总 RNA 提取试剂盒(北京天根公司),逆转录试剂盒(日本 Toyobo 公司),甜菜碱(美国 Sigma 公司)。

1.2 实验动物分组及治疗方法

18 只 4 周龄(体质量 14 ~ 16 g)的 db/m 小鼠作为正常对照组,36 只 4 周龄(体质量 20 ~ 26 g)的 db/db 小鼠按随机数字表法分为糖尿病肾病组(DN 组,$n = 18$)和甜菜碱治疗组(DN + B 组,$n = 18$)。实验动物均购自南京大学模式动物中心,按照 SPF 级标准适应性喂养 1 周。采用灌胃法给药,每天 9:00 灌胃 1 次,持续 12 周,甜菜碱剂量为 800 mg/(kg · d)[7],平均每只每天灌胃 0.2 ~ 0.3 ml,DN 组以相同体积生理盐水代替。实验期间所有实验动物普通饲料喂养,自由饮水。

1.3 标本收集及指标检测

在治疗第 4、8、12 周按随机数字表法从每组随机抽取 6 只小鼠,放代谢笼留取 24 h 尿液,准确计量体积,充分混匀后,使用离心机 1 300 r/min 离心 5 min,收集上清液,用日本东芝 Toshiba-120FR 全自动生化分析仪测定尿蛋白含量,计算 24 h 尿蛋白排泄率(urinary albumin excretion rate, UAER) = 24 h 总尿量(L) × 尿蛋白浓度(mg/L)。采用 ELISA 方法检测尿单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)含量,按照试剂盒说明操作。腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,心脏取血,分装于抗凝管及普通试管中,用全自动生化分析仪测定血糖(blood glucose, BG)、血肌酐(serum creatinine, Scr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)含量。开腹取出双侧肾脏,沿肾脏中线剖开,一半组织用 10% 中性甲醛固定,PAS 染色,光镜下观察,其余肾组织液氮保存。

1.4 实时荧光定量 PCR 测定 GRP78 mRNA 表达

取冻存肾脏组织,按照总 RNA 提取试剂盒说明提取总 RNA,紫外分光光度计测量浓度,按试剂盒说明书完成 Real time-PCR。GRP78(193 bp)基因上游引物:5′-ACTGGAATCCCTCCTGCTC-3′,下游引物:5′-CAAACTTCTCGGCGTCAT-3′;GADPH(159 bp)作为内参对照基因,上游引物:5′-ACCCATCACCATCTTCCAGGAG-3′,下游引物:5′-GAAGGGGCGGAGATGATGAC-3′。PCR 反应体系:2 × SYBRGreen 10 μl,上、下游引物各 0.5 μl,模板 2 μl,终体积 20 μl。反应条件:94 ℃、3 min→(94 ℃、50 s→59 ℃、30 s→72 ℃、1 min) × 30 cycles→72 ℃、1 min。Ct 值按公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 GRP78 的相对表达量。

1.5 Western blot 检测 GRP78 蛋白的表达

用 RIPA 裂解液裂解肾脏组织提取总蛋白,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。取 50 μg 蛋白样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将电泳后的蛋白转移至 PVDF 膜,封闭液封闭(4 ℃过夜)。加入兔抗鼠 GRP78 多克隆抗体(1∶250)和小鼠抗小鼠 β-actin 单克隆抗体(1∶2 000)孵育,室温反应 1 h,再用 PBS 洗涤 5 次(15 min × 1 次, 5 min × 4 次)后,加入 HRP 标记的抗鼠 IgG 和抗兔 IgG 二抗(1∶2 500)室温孵育 1 h,再用 PBS 洗涤 5 次(15 min × 1 次, 5 min × 4 次)后,最后 PVDF 膜与 X 线片曝光(3 ~ 10 min),显影和定影后观察结果。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析。

2 结果

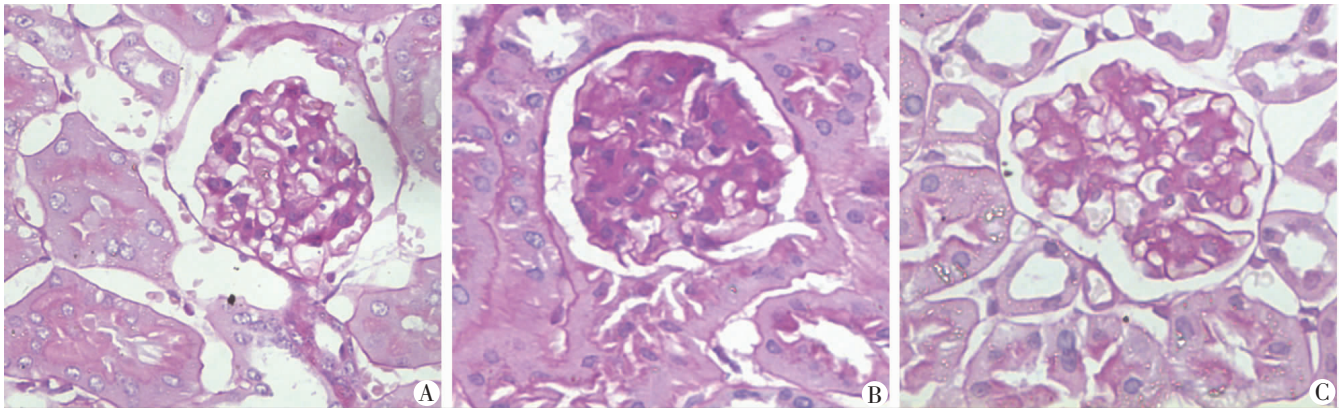
2.1 甜菜碱治疗对糖尿病肾病小鼠血糖、血肌酐、尿素氮、24 h 尿蛋白排泄率、尿 MCP-1 表达的影响

与同期正常对照组相比,DN 组小鼠 BG、BUN、MCP-1 均明显升高($P < 0.05$);与同期 DN 组相比,DN + B 组 BG、BUN、MCP-1 明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。DN、DN + B 组的 Scr 在第 4、8 周时与正常对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),在第 12 周差异有统计学意义($P < 0.05$);DN + B 组与 DN 组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与同期正常对照组比较,DN、DN + B 组小鼠 24 h UAER 均显著升高($P < 0.05$);与同期 DN 组比较,4 周时 DN + B 组差异无统计学意义($P > 0.05$),在 8、12 周时明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 3 组小鼠各指标比较($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

指标	4 周	8 周	12 周
BG(mmol/L)			
正常对照组	10.41 ± 1.09	10.36 ± 0.90	9.67 ± 0.96
DN 组	31.28 ± 4.89[a]	36.17 ± 5.02[a]	49.70 ± 6.60[a]
DN + B 组	22.82 ± 5.89[ab]	19.85 ± 4.87[ab]	35.00 ± 7.99[ab]
Scr(μmol/L)			
正常对照组	27.00 ± 3.41	30.17 ± 4.62	28.17 ± 3.49
DN 组	33.67 ± 4.76	37.83 ± 6.43	50.33 ± 6.98[a]
DN + B 组	30.17 ± 6.85	28.80 ± 6.94	44.83 ± 7.39[a]
BUN(mmol/L)			
正常对照组	9.96 ± 0.93	11.48 ± 1.48	10.92 ± 1.71
DN 组	12.86 ± 1.18[a]	14.30 ± 1.94[a]	14.91 ± 3.43[a]
DN + B 组	9.75 ± 0.98[b]	7.66 ± 1.12[ab]	7.93 ± 1.11[b]
24 h UAER(μg/24 h)			
正常对照组	11.13 ± 2.26	13.35 ± 2.81	13.20 ± 4.26
DN 组	160.13 ± 15.71[a]	185.57 ± 20.84[a]	232.83 ± 45.83[a]
DN + B 组	140.40 ± 25.91[a]	120.80 ± 24.31[ab]	113.40 ± 24.99[ab]
MCP-1(pg/ml)			
正常对照组	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.02
DN 组	0.24 ± 0.03[a]	0.26 ± 0.04[a]	0.29 ± 0.04[a]
DN + B 组	0.18 ± 0.03[ab]	0.17 ± 0.03[ab]	0.13 ± 0.02[ab]

a:$P < 0.05$,与同期正常对照组比较;b:$P < 0.05$,与同期 DN 组比较



A:正常对照组; B:DN 组;C:DN + B 组

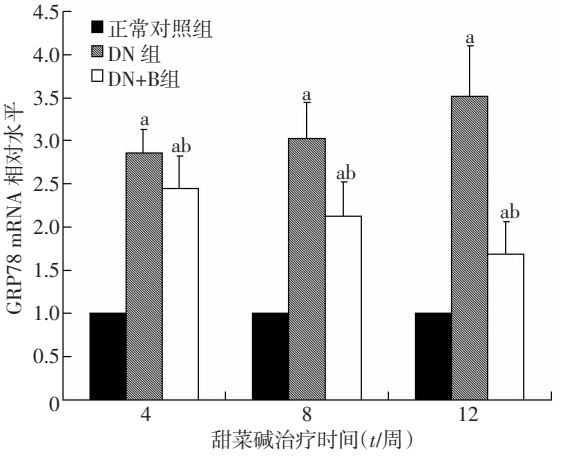
图 1 PAS 染色观察 12 周各组小鼠肾脏病理改变 (×400)

2.2 甜菜碱治疗对糖尿病肾病小鼠病理的影响

肾脏病理显示,12 周时正常对照组小鼠肾小球、肾小管及系膜细胞结构大致正常;DN 组小鼠在 12 周时出呈肾小球肥大、肾小球基底膜增厚、系膜基质积聚等糖尿病肾病表现;DN + B 组在甜菜碱治疗 12 周后,小鼠肾脏病理改变显著减轻(图 1)。

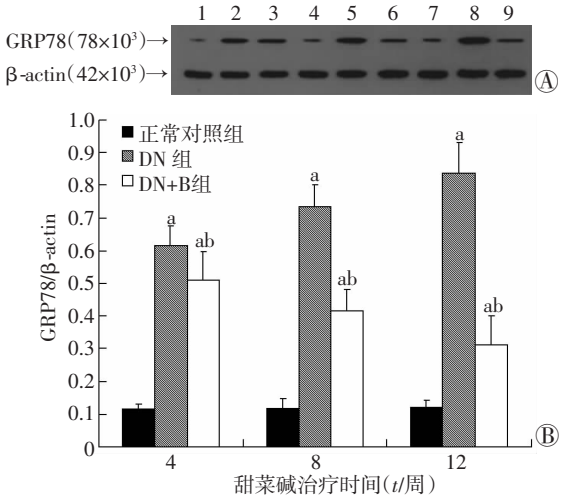
2.3 甜菜碱治疗对糖尿病肾病小鼠肾脏组织 GRP78 表达的影响

与同期正常对照组比较,DN 组小鼠肾脏组织 GRP78 mRNA的表达均显著升高,DN + B 组较 DN 组显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$,图 2)。与 mRNA 表达趋势一致的是,同期相比,DN 组大鼠肾组织 GRP78 的蛋白表达较正常对照组显著升高,而 DN + B 组大鼠肾组织 GRP78 蛋白表达较 DN 组明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$,图 3)。提示,糖尿病肾病小鼠肾脏 ERS 的强度明显增强,而甜菜碱干预能显著抑制 ERS 的强度。



a:$P<0.05$,与同期正常对照组比较;b:$P<0.05$,与同期 DN 组比较

图 2 实时荧光定量 PCR 检测各组小鼠 GRP78 mRNA 表达



A:Western blot 检测 1:正常对照组 4 周;2:DN 组 4 周;3:DN + B 组 4 周;4:正常对照组 8 周;5:DN 组 8 周;6:DN + B 组 8 周;7:正常对照组 12 周;8:DN 组 12 周;9:DN + B 组 12 周; B:半定量分析 a:$P<0.05$,与同期正常对照组比较,b:$P<0.05$,与同期 DN 组比较

图 3 Western blot 检测各组小鼠 GRP78 蛋白表达

3 讨论

本实验结果显示,分子伴侣甜菜碱可以有效地抑制糖尿病肾病小鼠的肾脏损害,表现为肾小球肥大改善,基底膜增厚及细胞外基质积聚减轻,BG、BUN、24 h UAER 明显下降,肾脏 ERS 水平降低,促炎因子表达减少。表明甜菜碱在动物水平能有效地抑制 DN 的发展,其机制可能与减轻肾脏 ERS 并进一步抑制相关的炎症反应有关。

葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)作为 ERS 的中枢调节分子,是启动未折叠蛋白反应的重要分子伴侣,它的表达情况直接反映细胞内 ERS 水平[8]。本研究发现,

GRP78 mRNA 和蛋白在 DN 小鼠的肾脏中表达均显著升高,且随着时间累积而增加,甜菜碱治疗后其表达显著下降,表明甜菜碱能够有效地降低 DN 小鼠肾脏 ERS 水平。ERS 是真核细胞的一种保护性应激反应,适当的刺激可以通过未折叠蛋白反应(UPR)激活保护机制,恢复内质网及内环境稳态并增强细胞防御能力,但持久过强的 ERS 是导致细胞损伤的重要致病机制。Liu 等[9]研究发现,在 STZ 诱导的 DN 大鼠中,GRP78 和 CHOP/GADD153 表达明显增高,表明内质网应激诱发的凋亡可能是导致 DN 发病的一个重要机制。Chen 等[10]发现,导致 DN 发病的糖基化终末产物(AGES)能诱导小鼠足细胞产生 ERS,引起 GRP78 的表达上调及细胞凋亡,而利用分子伴侣牛熊去氧胆酸(TUDCA)治疗后,GRP78 表达显著下降,细胞凋亡明显减少。新近研究发现,分子伴侣 4-苯基丁酸(4-PBA)同样能减少 DN 大鼠肾脏内 GRP78 的表达,减轻 ERS 水平并抑制 DN 的发展[11]。这些结果与本研究结果一致,进一步证明了分子伴侣可能是治疗 DN 的一类有效药物。

大量研究表明,炎症是 DN 的一个主要发病机制,异常的代谢及血液动力学的改变都会激活大量炎症分子表达而导致肾脏损伤。近年来一些研究表明,ERS 可能启动炎症反应,是炎症性疾病的一个始动因素[12]。据此本研究检测了 DN 小鼠尿中促炎分子 MCP-1 的表达情况,发现 DN 小鼠尿 MCP-1 表达与对照组相比显著增高,甜菜碱治疗后 MCP-1 表达明显下降,与 GRP78 的变化趋势相一致。提示 ERS 表达上调可能是调节肾小球细胞炎症因子表达的重要上游信号,分子伴侣甜菜碱可以通过抑制 ERS 而影响肾小球炎症因子的表达,协同抑制 DN 的发展。MCP-1 作为主要的促炎因子,可以促进单核-巨噬细胞向肾脏浸润并引起肾脏纤维化[13]。MCP-1 缺乏的 db/db 小鼠表现为明显的单核-巨噬细胞浸润减少,减轻 DN 小鼠的肾损害,因此 MCP-1 是导致 DN 炎症发展的关键分子[14]。这些结果表明合理调控 ERS 将有助于减少炎症分子的表达。

总之,本研究结果表明,ERS 及相关炎症反应在 DN 小鼠发病中发挥重要作用,而甜菜碱干预后能有效地减轻肾脏 ERS 水平,抑制炎症反应,对 DN 小鼠肾脏有保护作用,其确切完整的机制尚待进一步研究。尽管目前研究还仅限于动物实验水平,但为临床防治 DN 提供了一种新的思路。由于甜菜碱来源广泛,提取方便,无毒无害,因此推测它将有良好的应用前景。

参考文献:

[1] Navarro-Gonzalez J F, Mora-Fernandez C, Muros-de-Fuentes M, *et al*. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Nat Rev Nephrol, 2011, 7(6): 327 - 340.

[2] Dronavalli S, Duka I, Bakris G L. The pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2008, 4(8): 444 - 452.

[3] Cunard R, Sharma K. The endoplasmic reticulum stress response and diabetic kidney disease[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2011, 300(5): F1054 - F1061.

[4] 魏平, 梁瑞凯, 谭明红, 等. 2 型糖尿病肾病大鼠肾脏 MCP-1 与氧化应激相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(19): 2021 - 2024.

[5] Craig S A. Betaine in human nutrition[J]. Am J Clin Nutr, 2004, 80(3): 539 - 549.

[6] Engin F, Hotamisligil G S. Restoring endoplasmic reticulum function by chemical chaperones: an emerging therapeutic approach for metabolic diseases[J]. Diabetes Obes Metab, 2010, 12 Suppl 2: 108 - 115.

[7] Ji C, Kaplowitz N. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice[J]. Gastroenterology, 2003, 124(5): 1488 - 1499.

[8] Lee A S. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress[J]. Methods, 2005, 35(4): 373 - 381.

[9] Liu G, Sun Y, Li Z, *et al*. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress involved in diabetic kidney disease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 370(4): 651 - 656.

[10] Chen Y, Liu C P, Xu K F, *et al*. Effect of taurine-conjugated ursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress and apoptosis induced by advanced glycation end products in cultured mouse podocytes[J]. Am J Nephrol, 2008, 28(6): 1014 - 1022.

[11] Qi W, Mu J, Luo Z F, *et al*. Attenuation of diabetic nephropathy in diabetes rats induced by streptozotocin by regulating the endoplasmic reticulum stress inflammatory response[J]. Metabolism, 2011, 60(5): 594 - 603.

[12] Zhang K, Kaufman R J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response[J]. Nature, 2008, 454(7203): 455 - 462.

[13] Tesch G H. MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 294(4): F697 - F701.

[14] Chow F Y, Nikolic-Paterson D J, Ma F Y, *et al*. Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice[J]. Diabetologia, 2007, 50(2): 471 - 480.

(**收稿**:2011-11-27;**修回**:2012-01-05)

(编辑 龙 亮)