基础研究 文章编号：0253-3626（2011）07-0826-03

吡格列酮对糖尿病大鼠肾组织 TGF-β1、MMP-9、Col-Ⅳ表达影响

张 红，胡长军，陆卫平

（南京医科大学附属淮安第一医院内分泌科，淮安 223300）

【摘 要】目的：探讨吡格列酮对链脲佐菌素（Streptozotocin，STZ）诱导的糖尿病大鼠肾脏保护作用及机制。方法：实验用大鼠随机分为正常对照组（Normal control，NC）、糖尿病对照组（Diabetes mellitus control，DMC）、糖尿病吡格列酮治疗组（Diabetes treated with pioglitazone，DP）。DP 组给予吡格列酮 20 mg/(kg·d)灌胃。8 周后观察大鼠血糖、尿素氮（Blood urea nitrogen，BUN）、肾指数（Kidney index，KI）、尿微量白蛋白（Microalbuminuria，MAU）等生化指标，免疫组化法观察肾组织基质金属蛋白酶 9（Matrix metalloproteinase-9，MMP-9）、转化生长因子 β1（Transforming growth factor β1，TGF-β1）及Ⅳ型胶原（Collagen type Ⅳ，Col-Ⅳ）的表达。结果：DMC 组大鼠 BUN、KI、MAU 及肾组织 TGF-β1、Col-Ⅳ的表达显著高于 NC 组（$P<0.01$），而 DP 组 BUN、KI、MAU 及肾组织 TGF-β1、Col-Ⅳ的表达较 DMC 组明显减低，差异具有显著性（$P<0.01$）。同时观察到 DMC 组 MMP-9 表达较 NC 组减低（$P<0.01$），而 DP 组较 DMC 组显著升高（$P<0.01$）。结论：吡格列酮通过下调肾组织中 TGF-β1、上调 MMP-9 表达，对糖尿病肾病（Diabetic nephropathy，DN）起保护作用。

【关键词】吡格列酮；糖尿病肾病；转化生长因子 β1；基质金属蛋白酶 9；Ⅳ型胶原

【中国图书分类法分类号】R587.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-11-14

Effects of pioglitazone on renal transforming growth factor β1, matrix metalloproteinase-9 and collagen type Ⅳ of diabetic rats

ZHANG Hong, HU Chang-jun, LU Wei-ping

(*Department of Endocrinology, the First Affiliated Huaian Hospital, Nanjing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of pioglitazone on diabetic nephropathy (DN) and related mechanisms. *Methods*: All rats were randomized into 3 groups: normal control (NC), diabetes mellitus control (DMC), and diabetes treated with pioglitazone (DP). After 8 weeks of treatment, blood glucose, kidney index (KI), microalbuminuria (MAU), blood urea nitrogen (BUN), and the expression of transforming growth factor β1 (TGF-β1), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and collagen type Ⅳ (Col-Ⅳ) in kidney were observed by immunol histochemistry. *Results*: KI, MAU, BUN and the expression of TGF-β1 and Col-Ⅳ in DMC group were significantly higher than other two groups ($P<0.01$), but the expression of MMP-9 in DMC group was significantly lower than other two groups ($P<0.01$). *Conclusion*: pioglitazone improves DN through down-regulating the expression of TGF-β1 and up-regulating MMP-9 in diabetic rats.

【Key words】pioglitazone; diabetic nephropathy; transforming growth factor β1; matrix metalloproteinase-9; collagen type Ⅳ

糖尿病肾病（Diabetic nephropathy，DN）是终末期肾病（End stage renal disease，ESRD）的主要病因，并且是糖尿病患者死亡的主要原因之一[1,2]。细胞外基质（Extracellular matrix，ECM）在肾小球及间质的积聚是 DN 发生的中心环节，从而导致肾小球纤维化、硬化。因此，ECM 合成及降解失衡在DN 的肾小球硬化中发挥重要作用[3,4]。转化生长因子β1（Transforming growth factor β1，TGF-β1）被认为是促进 ECM 合成的核心因子，而基质金属蛋白酶 9（Matrix metalloproteinase-9，MMP-9）是降解下调Ⅳ型胶原（Collagen type Ⅳ，Col-Ⅳ）等 ECM 的主要水解酶类[5,6]。因此，TGF-β1 和 MMP-9 表达的异常将会影响 DN 的病理学进程。本实验旨在研究吡格列酮对糖尿病大鼠肾组织 TGF-β1、MMP-9、Col-Ⅳ表达的影响，进而探讨吡格列酮对 DN 的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

链脲佐菌素（Streptozotocin，STZ）购自 Sigma 公司，兔抗

作者介绍：张 红（1979-），女，讲师，博士，研究方向：糖尿病及并发症发病机制。

鼠 TGF-β1 抗体购自于美国 Santa Cruz 公司，免疫组化试剂盒由北京中山公司提供，大鼠 Col-Ⅳ抗体购自美国 Santa Cruz 公司，盐酸吡格列酮由江苏某公司提供。

1.2 方法

1.2.1 模型建立和分组 STZ 60 mg/kg 腹腔注射，48 h 测尾静脉血糖，持续大于 16.7 mmol/L 者确定为糖尿病大鼠；45只 SD大鼠随机分 3 组：正常对照组(NC 组，15 只)，糖尿病对照组(DMC 组，15 只)和糖尿病吡格列酮治疗组(DP 组，15只)。DP 组大鼠予吡格列酮 20 mg/(kg·d)灌胃[7]，其余大鼠给予无菌水灌胃。

1.2.2 标本收集检测 8 周末收集 24 h 尿检测尿微量白蛋白(Microalbuminuria，MAU)，麻醉后腹主动脉采血，用于血糖、糖化血红蛋白(Glycolated hemoglobin A1c，HbA1c)、尿素氮(Blood urea nitrogen，BUN)检测。肾指数(Kidney index，KI)以右肾重/体重(g/kg)表示。肾脏称重后留于免疫组化检测。

1.2.3 免疫组化 TGF-β1、MMP-9、Col-Ⅳ采用二步法，步骤按说明书进行，显色强度用 LEICA Qwin 图像系统分析，染色强度以光密度值(OD 值)表示。

1.2.4 统计学处理 计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，组间差异性比较采用 ANOVA 分析，$P<0.05$ 为有统计学差异，SPSS 13.0 统计软件进行分析。

2 结 果

2.1 一般情况

糖尿病造模成功率 100%，成模的大鼠出现多饮、多尿、多食、体重减轻等糖尿病表现，实验中共有 3 只 DMC 组大鼠死亡，2 只 DP 组大鼠死亡。

2.2 生化指标检测结果

由表 1 可知，DMC 及 DP 组 HbA1c 较 NC 组明显升高，DP 组与 DMC 组相比，HbA1c 无明显差异($P>0.05$)。DMC 及 DP 组的 BUN、KI、MAU 均高于 NC 组($P<0.01$)，DP 组显著低于 DMC 组($P<0.01$)。

表 1 各组大鼠 HbA1c、BUN、KI、MAU 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数(n)	HbA1c (%)	BUN (mmol/L)	KI (g/kg)	MAU (μg/mg)
NC	15	3.54 ± 0.45	5.76 ± 1.03	3.52 ± 0.39	8.05 ± 2.05
DMC	13	7.60 ± 1.19[a]	18.80 ± 2.87[a]	8.82 ± 1.30[a]	118.24 ± 9.48[a]
DP	12	7.41 ± 0.94	11.05 ± 2.24[b]	5.56 ± 0.83[b]	68.23 ± 9.64[b]

注：DMC 组与 NC 组比较，a，$P<0.01$；DP 组与 DMC 组比较，b，$P<0.01$

2.3 免疫组化

TGF-β1 在 NC 组肾小球肾小管未见明显着色，DMC 组肾小球肾小管着色明显增多增深，以肾小管表达为著，DP 组上述部位染色明显减弱减少；Col-Ⅳ在 NC 组大鼠肾小球肾小管轻度染色，DMC 组肾小球肾小管着色明显增多增深，以肾小球表达为著，DP 组上述部位染色显著减少减弱；MMP-9 在 NC 组大鼠肾小球着色明显，DMC 组表达明显减少，DP 组表达上调(图 1)。由表 2 可知染色强度的 OD 值。

表 2 各组大鼠肾组织 TGF-β1、MMP-9 及 Col-Ⅳ表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数(n)	TGF-β1	MMP-9	Col-Ⅳ
NC	15	28.65 ± 6.30	56.07 ± 7.52	33.22 ± 5.15
DMC	13	52.48 ± 7.10[a]	23.35 ± 5.06[a]	70.34 ± 9.51[a]
DP	12	31.01 ± 5.02[b]	35.78 ± 5.65[b]	36.97 ± 7.32[b]

注：DMC 组与 NC 组比较，a，$P<0.01$；DP 组与 DMC 组比较，b，$P<0.01$

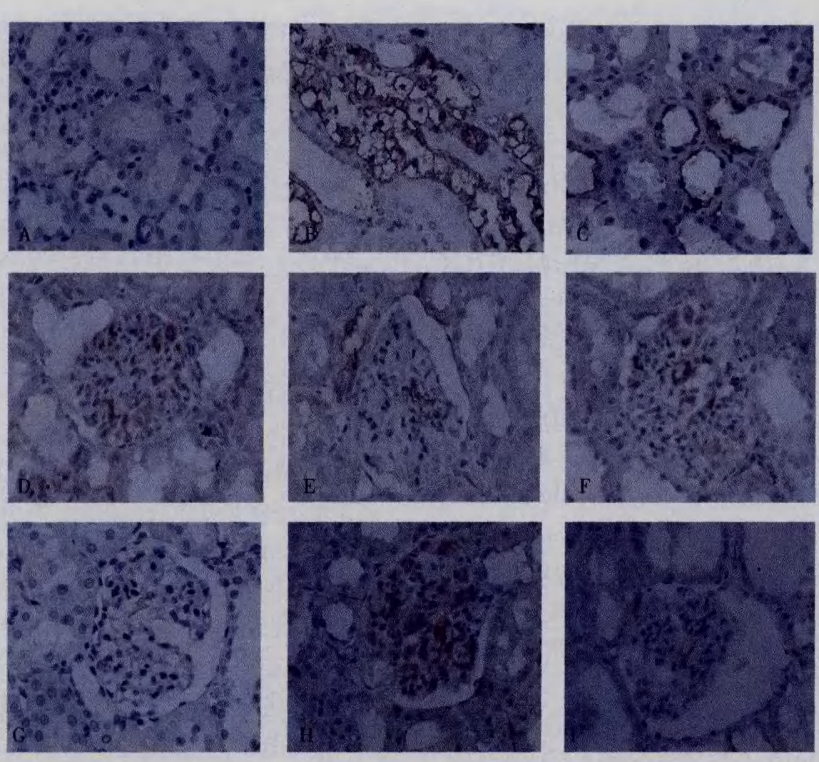
3 讨 论

DN 特征性病理学改变为肾脏肥大、肾小球和肾小管基底膜增厚、ECM 在系膜区积聚。高糖和代谢综合征组分与 DN 发生发展密切相关，其主要机制包括氧化应激、肾素血管紧张素系统激活、炎症、致纤维化因子如 TGF-β1 等促进肾组织纤维化及硬化的发生。在所有的细胞因子中，TGF-β1 被认为是促进 ECM 合成增加、导致 DN 进展的核心因子，它主要通过促进基质合成并抑制其降解发挥强大的促纤维化作用[8]。Col-Ⅳ是 ECM 的主要结构成分，而 ECM 降解的主要调节子是 MMP 家族，其中 MMP-9 被认为是降解 Col-Ⅳ的重要酶系之一[9,10]。吡格列酮是噻唑烷二酮类(Thiazolidinediones，TZDs)药物，它通过结合并激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ(Peroxisome proliferator-activated receptor γ，PPAR-γ)发挥作用，研究[11]表明吡格列酮有独立于降糖效应之外的肾脏保护功能。本试验将以此为依据研究吡格列酮对糖尿病大鼠肾脏的保护作用及相关机制。

试验结果显示，8 周时 DMC 大鼠的 BUN、MAU、KI 增加($P<0.01$)，即出现尿蛋白排泄率增加，肾脏肥大，肾功能损害。吡格列酮治疗后的 DP 组大鼠，BUN、MAU、KI 明显降低($P<0.01$)，但 DMC、DP 两组间 HbA1c 水平无明显差异。表明吡格列酮可以减轻肾脏肥大，降低尿蛋白，改善肾功能，从而对糖尿病大鼠有肾脏保护作用，且这种作用是直接的，并未依赖于血糖水平的降低。

免疫组化的结果显示，DMC 组大鼠的 TGF-β1 蛋白表达显著增高($P<0.01$)，MMP-9 表达明显减少($P<0.01$)，Col-Ⅳ蛋白在肾小球表达增多($P<0.01$)，TGF-β1、MMP-9 可能通过促进肾脏肥大、Col-Ⅳ合成增加和降解减少，进而促进 DN 的病理化进程。吡格列酮治疗 8 周后，肾脏肥大改善，尿蛋白排泄减少，肾组织 TGF-β1 表达下降，MMP-9 表达增多，Col-Ⅳ表达减少($P<0.01$)，而 HbA1c 并未降低($P>0.05$)，说明吡格列酮治疗可有效延缓 DN 发生发展，其机制是通过下调肾组织 TGF-β1，上调 MMP-9 的表达而实现的且并未依赖血糖水平的降低。既往研究[12,13]表明了吡格列酮对 DN 的保护作用，与本研究结果类似，但未从致纤维化因素与抗纤维化因素失衡的角度去探讨。

综上所述，吡格列酮能减少尿蛋白排泄，减轻肾脏肥大、抑制 ECM 积聚，缓解 DN 的进展，其机制主要是通过下调肾



A、B、C. TGF-β1 表达变化；D、E、F. MMP-9 表达变化；G、H、I. Col-Ⅳ表达变化；A、D、G. NC 组；B、E、H. DMC 组；C、F、I. DP 组

图 1　大鼠肾组织 TGF-β1、MMP-9、Col-Ⅳ免疫组化表达变化（二步法×400）

组织中 TGF-β1、上调 MMP-9 的表达而实现的。除以上机制外，研究表明[14]，TZDs 同时具有降糖、调节血压、改善血脂、抑制超氧化物产生、抑制细胞周期进展、调节其他细胞因子及炎性因子表达等作用。因此，关于吡格列酮对 DN 保护的相关机制需要更多的研究进一步证实。

参 考 文 献

[1] Schernthaner G.Kidney disease in diabetology:lessons from 2009 [J].Nephrol Dial Transplant,2010,25(2):360-363.

[2] Biesenbach G.Highest mortality during the last year before and the first year after start of dialysis treatment in type 2 diabetic patients with nephropathy[J].Curr Diabetes Rev,2007,3(2):123-126.

[3] Guo B,Koya D,Isono M,et al.Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit TGF-β1 induced fibronectin expression in glomerular mesangial cells[J].Diabetes,2004,53(1):200-208.

[4] Sang Y H,Jee Y H,Han K H,et al.An imbalance between matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 contributes to the development of early diabetic nephropathy[J].Nephrol Dial Transplant,2006,21(9):2406-2416.

[5] Daniel C,Schaub K,Amann K,et al.Thrombospondin-1 is an endogenous activator of TGF-β in experimental diabetic nephropathy in vivo[J].Diabetes,2007,56(12):2982-2989.

[6] Catania J M,Chen G,Parrish A R.Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies[J].Am J Physiol Renal Physiol,2007,292(3):F905-F911.

[7] 李　红，郑芬萍，阮　昱，等.吡格列酮对糖尿病大鼠肾皮质 TGF-β 基因表达的抑制作用[J].中华内分泌代谢杂志，2003，19(3)：238-239.

[8] Ziyadeh F N.Mediators of diabetic renal disease:the case for TGF-Beta as the major mediator[J].J Am Soc Nephrol,2004,15(s1):S55-57.

[9] Tashiro K,Koyanagi I,Ohara I,et al.Levels of urinary matrix metalloproteinase-9(MMP-9)and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy[J].J Clin Lab Anal,2004,18(3):206-210.

[10] Toblli J E,Ferrini M G,Cao G,et al.Anti-fibrotic effects of pioglitazone on the kidney in a rat model of type 2 diabetes mellitus[J].Nephrol Dial transplant,2009,24(8):2384-2391.

[11] Pablos Velasco P D.Pioglitazone:beyond glucose control[J].Expert Rev Cardiovasc Ther,2010,8(8):1057-1067.

[12] 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):835-847.

[13] 董凤芹，李　红，蔡卫民，等.吡格列酮对糖尿病大鼠肾组织基质金属蛋白酶 2 和 9 表达的影响[J].中华内分泌代谢杂志，2004，24(5)：459-460.

[14] Biscetti F,Straface G,Pitocco D,et al.Peroxisom proliferator-activated receptor and angiogenesis[J].Nutr Metab Cardiovasc Dis,2009,19(11):751-759.

（责任编辑：关蕴良）