维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)04－0448－04

血管紧张素Ⅱ与糖尿病大鼠足细胞损害的实验研究

覃乔静，邓华聪，曹文富，兰丽珍，刘东方

(重庆医科大学临床学院内分泌科，重庆 400016)

【摘 要】目的：研究血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)在糖尿病大鼠肾小球滤过屏障外层足细胞损害中的作用，以探讨糖尿病肾病的发生机制。方法：实验大鼠分为3组：正常对照组(C)、糖尿病组(D)和氯沙坦治疗病鼠组(DT)，实验第5周末检测肾皮质超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)和尿白蛋白排泄率(UAER)的水平，利用透射电子显微镜观察肾脏足细胞超微结构，同时用免疫组化技术检测肾小球足细胞损伤标志蛋白－desmin蛋白的表达。结果：与正常对照组比较，糖尿病组大鼠肾皮质SOD和CAT活性显著降低，而MDA含量明显增加，肾小球内desmin蛋白表达上调，足细胞部分足突融合，尿白蛋白排泄率增高；AngⅡ1型受体拮抗剂氯沙坦明显减轻糖尿病大鼠肾皮质SOD、CAT、MDA及肾小球内desmin蛋白表达的改变，减轻足细胞足突融合，降低尿白蛋白排泄率。结论：糖尿病时AngⅡ参与增高肾组织氧化应激，损害肾小球滤过屏障外层足细胞的结构和功能，促使糖尿病肾脏损害和蛋白尿的发生。

【关键词】糖尿病肾病；血管紧张素Ⅱ；氧化应激；足细胞

【中国图书分类法分类号】R587.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－11－10

Experimental study on angiotensin Ⅱ and podocyte injury in diabetic rats

QIN Qiaojing, et al

(*Department of Endocrinology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the role of angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ) in the injury of podocytes, last barrier of glomemlar filtration, to research the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Methods*: The experimental rats were divided into three groups: control rats (group C), diabetic rats (group D) and diabetic rats treated by losartan (group DT). Urinary albumin excretion rate (UAER) was assayed 5 weeks after treatment. In addition, the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and concentration of matondialdehyde (MDA) in renal cortex were measured. The podocyte ultrastructure was observed by transmission electronic microscopy while immunohistochemistry was used to detect the expression of desmin, a marker of podocyte injury. *Results*: Compared with control rats, the activity of SOD and CAT was decreased significantly and the concentrations of MDA were increased markedly in diabetic renal cortex. The expression of glomerular desmin increased markedly accompanied with foot process effacement in podocytes in diabetic group. At the same time, UAER increased in diabetes. The changes of SOD, CAT, MDA, glomemlar desmin expression, UAER and foot process effacement were markedly ameliorated after diabetic rats were treated by angiotensin Ⅱ type one receptor antagonist losartan. *Conclusion*: Ang Ⅱ may participate in the structural and functional damage of podocytes, last barrier of glomerular filtration, by increasing renal oxidative stress to injure kidney and accelerate proteinuria in diabetes.

【Key words】Diabetic nephropathy; Angiotensin Ⅱ; Oxidative stress; Podocyte

糖尿病肾病是糖尿病常见的慢性并发症，越来越多的证据表明肾小球滤过屏障最外层足细胞损害在肾小球滤过屏障通透性改变、蛋白尿的发生中起关键作用。糖尿病时肾素－血管紧张素系统(RAS)存在不适当活化，干扰RAS终产物血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)的作用可有效治疗糖尿病肾病[1]。但目前有关AngII对糖尿病足细胞的影响及其机制的研究甚少，因此，本文通过STZ诱导的糖尿病大鼠模型，利用AngⅡ的AT1受体拮抗剂氯沙坦阻断AngⅡ的部分效应，观察AngⅡ对糖尿病大鼠肾组织抗氧化能力和足细胞的影响，探讨AngⅡ损害糖尿病大鼠足细胞的机制和意义，旨在进一步明确糖尿病肾病的发病机理，为临床治疗提供理论指导。

作者介绍：覃乔静(1971－)，女，博士生，

主要研究方向：糖尿病慢性并发症的发病机制及防治。

1 材料和方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料、试剂和仪器

体重 170～220g 的健康雄性 Wistar 大鼠由重庆医科大学动物中心提供，抗 desmin 单克隆抗体(NeoMarkers 公司)，即用型第二代免疫组化 Elivision^{TM} plus 广谱试剂盒和 DAB 试剂盒(福州迈新生物技术开发公司)，链脲佐菌素(Sigma 公司)，氯沙坦(杭州默沙东制药有限公司)，超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)，BIOSEN 5030 葡萄糖/乳酸分析仪(Neckar Healthcare 公司)，H－600 透射电子显微镜(Hitachi 公司)，CM－2000B 型生物医学图像分析系统(北京航空航天大学)。

1.2 分组及模型制备

大鼠随机分为正常对照组(C)、糖尿病组(D)和糖尿病治疗组(DT)。链脲佐菌素(STZ)临用时溶于(pH 值 4.2)0.1 mmol/L 枸橼酸－枸橼酸钠缓冲液中，大鼠禁食 10h 后，糖尿病大鼠以 60mg/kg 单次腹腔注射 STZ，正常对照组腹腔注射 0.1mmol/L 枸橼酸－枸橼酸钠缓冲液 1ml/只。72h 后，采大鼠尾静脉血测定血糖值，以血糖(BG)高于 16.65mmol/L 作为糖尿病大鼠成模标准。

每日上午 9:00～10:00，DT 组大鼠给予氯沙坦 20mg/kg 灌胃，C 组和 D 组大鼠给予等量的生理盐水灌胃。为使糖尿病大鼠血糖和糖化血红蛋白(HbA_{1c})在同一基线水平波动，避免糖尿病酮症酸中毒，维持体重的正常增长，每日上午 9:00～10:00 根据血糖水平给予糖尿病大鼠精蛋白锌胰岛素 0～6u 腹腔注射。每周采大鼠尾静脉血测定血糖 1 次，若血糖水平波动较大，则加大血糖监测频率。

1.3 测定指标

实验第 5 周末，将大鼠单只置于代谢笼中，收集 24h 尿液，－70℃保存，待测尿白蛋白排泄率(放射免疫法)；腹腔注射 10%水合氯醛麻醉大鼠后，心腔穿刺采血，用以测定血糖和糖化血红蛋白(色谱－分光光度计法)。处死大鼠，取出双肾，取肾皮质制作匀浆，严格按试剂盒说明书操作，测定 SOD、CAT 和 MDA 水平。另取小于 $1mm^3$ 肾皮质组织块经 4%戊二醛及 1%四氧化锇作预固定和后固定，作透射电子显微镜检查；取小于 2cm×2cm×0.4cm 肾皮质组织块经 4%多聚甲醛固定液固定，石蜡包埋切片用于免疫组化检测；

1.4 免疫组化染色

用免疫组化方法检测各组肾小球中 desmin 的表达，具体方法参考试剂盒提供的方法(抗 desmin 单克隆抗体用 PBS 溶液 1:50 稀释)。实验中以 PBS 溶液代替一抗作阴性对照。

1.5 数据和统计学处理

免疫组化用北航 CM－2000B 型生物医学图像分析系统作半定量分析，每张标本按顺序选 5 个肾小球，用平均光密度表示阳性物质的相对含量。采用 SPSS10.0 for Windows 统计软件分析处理，结果均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，统计学处理采用方差分析和 q 检验，以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠 BG、HbA_{1c}、UAER 测定结果(表 1)

D 组和 DT 组大鼠 BG 和 HbA_{1c} 均显著高于 C 组大鼠(P 均<0.05)，D 组和 DT 组两组比较 BG 和 HbA_{1c} 的差异无显著性(P 均>0.05)；D 组大鼠 UAER 明显高于 C 组($P<0.05$)，DT 组大鼠 UAER 显著低于 D 组($P<0.05$)。

2.2 各组大鼠肾皮质 SOD、CAT、MDA 水平(表 2)

D 组大鼠肾皮质 SOD、CAT 活性明显低于 C 组(P 均<0.05)，而 MDA 含量显著高于 C 组($P<0.05$)；与 D 组比较，DT 组大鼠肾皮质 SOD、CAT 活性显著升高(P 均<0.05)，而 MDA 含量显著降低($P<0.05$)；DT 组与 C 组相比大鼠肾皮质 SOD 活性和 MDA 含量无显著性差异(P 均>0.05)，而 DT 组 CAT 活性明显低于 C 组($P<0.05$)。

2.3 大鼠足细胞超微结构

透射电子显微镜下可见 C 组大鼠肾组织足细胞有许多突起，突起的末端膨大如足，呈薄片状，附着于毛细血管外的基底膜上，足突分布均匀，无融合及假绒毛样改变(图 1)；D 组大鼠足细胞的足突部分融合，使原来附于基底膜的排列有序的足状突起代之以带状结构，敷贴于基底膜上(图 2)；DT 组大鼠足细胞足突融合较 D 组大鼠明显减轻(图 3)。

2.4 各组大鼠肾小球内 desmin 蛋白的表达

C 组大鼠肾小球内偶有 desmin 蛋白散在表达(图 4)；D 组大鼠肾小球内 desmin 蛋白表达较 C 组显著增高(图 5)；与 D 组相比，DT 组大鼠肾小球内 desmin 蛋白表达明显降低(图 6)，但仍显著高于 C 组大鼠。各组免疫组化半定量结果见表 3。

表 1 各组大鼠 BG、HbA_{1C}、UAER 水平($\bar{x} \pm s$)

分组	鼠数(只)	BG(mmol/L)	HbA_{1C}(%)	UAER(μg/24h)
C	8	5.63±0.52	3.39±0.45	3.85±1.04
D	7	33.11±6.10*	7.07±1.02*	22.05±4.08*
DT	10	28.99±4.81*	6.70±0.51*	11.98±2.06*#

与 C 组比较，*$P<0.05$；与 D 组比较，#$P<0.05$。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 各组大鼠肾皮质 SOD、CAT、MDA 水平($\bar{x} \pm s$)

分组	鼠数(只)	SOD(NU/mgprot)	CAT(U/mgprot)	MDA(nmol/mgprot)
C	8	34.68±3.27	4.59±0.58	2.93±0.69
D	7	26.90±2.36*	3.40±0.25*	4.67±0.75*
DT	10	33.60±4.08#	3.95±0.32*#	2.60±0.23#

与 C 组比较,*$P<0.05$;与 D 组比较,#$P<0.05$。



图 1 正常对照组大鼠足细胞结构完整,足突排列整齐清晰(电镜×12000)

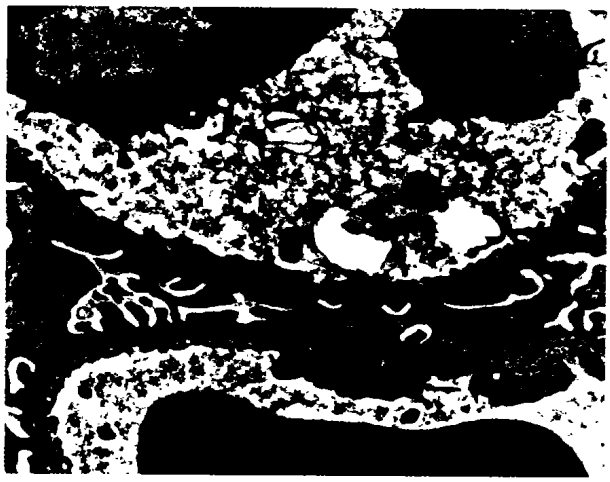


图 2 糖尿病组大鼠足细胞部分足突融合(电镜×12000)



图 3 糖尿病治疗组大鼠足细胞足突结构基本正常(电镜×25000)

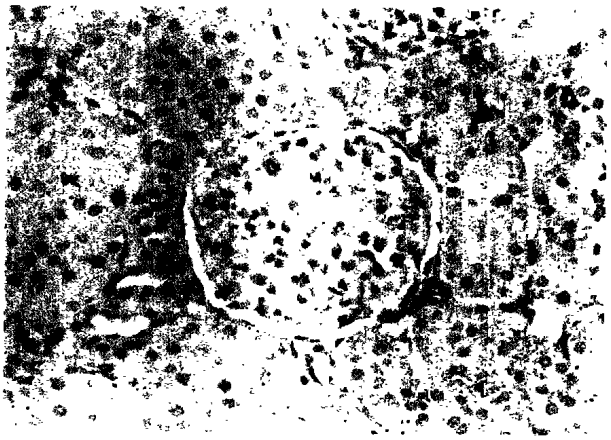


图 4 正常对照组大鼠肾小球内未见 desmin 蛋白表达(免疫组化×400)

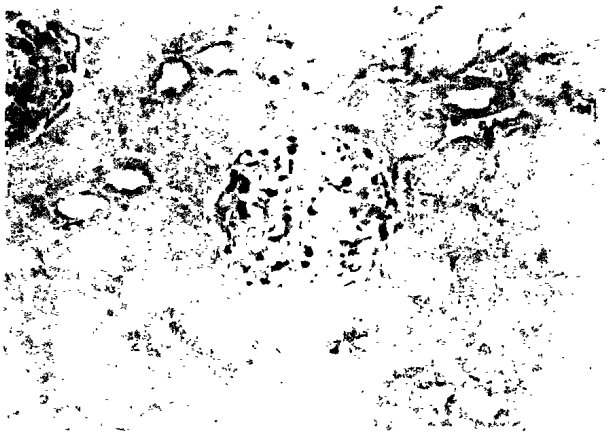


图 5 糖尿病组大鼠肾小球内 desmin 蛋白表达显著增多(免疫组化×400)

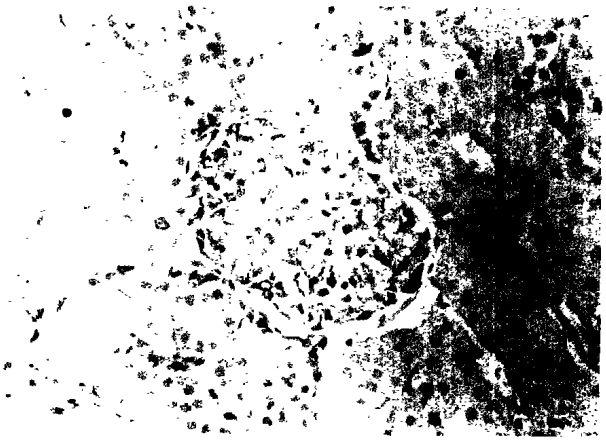


图 6 糖尿病治疗组大鼠肾小球内 desmin 蛋白表达降低免疫组化×400)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 各组大鼠肾小球内 desmin 蛋白表达平均光密度值($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	desmin
C 组	8	0.064±0.012
D 组	7	0.303±0.088*
DT 组	10	0.200±0.035*#

与组比较,* $P<0.05$;与 D 组比较,# $P<0.05$。

3 讨 论

足细胞是持有功能的肾小球滤过屏障最外层,其表面覆盖着由涎酸及硫酸蛋白多糖所组成的阴离子衣,依赖大量的微丝与肾小球基底膜的外层相连,其胞体伸出许多足突敷衍于基底膜,足突间的裂孔隔膜以大小选择性方式来限制血浆蛋白进入尿路,构成阻止血浆蛋白丧失的最后屏障,当足细胞受到损伤时,足突的正常结构破坏、消失,由于足细胞属于终末分化的细胞,受损后缺乏增殖再生的修复能力[2],不能有效覆盖基底膜,肾小球滤过膜完整性破坏,可导致蛋白尿发生。因此,足细胞的损害与蛋白尿明显相关[3]。desmin 为细胞骨架丝蛋白的一种,以往常作为肌源性细胞的标志,正常情况下肾小球系膜细胞可偶见少量表达,而足细胞无明显表达。当足细胞因各种原因发生损伤时,可大量表达 desmin 而发生表型转化,其可能原因是足细胞骨架重新排列。因此,desmin 可作为光镜下足细胞损伤的标志[4]。

糖尿病状态下,肾脏内 RAS 被不适当激活,血管紧张素转换酶活性增高,AngⅡ表达增多,直接参与了肾脏的进行性损害[5]。在我们的实验中通过电镜观察到,糖尿病大鼠肾小球滤过屏障外层足细胞足突部分融合,呈带状敷贴在基底膜上,免疫组化亦显示糖尿病大鼠肾小球内 desmin 蛋白表达显著增高,同时 UAER 显著高于正常对照组;与糖尿病组相比,治疗组大鼠足细胞足突融合和肾小球内 desmin 蛋白表达均明显减少,UAER 显著降低。这些实验结果提示糖尿病大鼠肾小球足细胞有明显损害,肾小球滤过屏障完整性受损,促使糖尿病肾脏损害和蛋白尿的发生:采用氯沙坦阻断糖尿病大鼠 AngⅡ的部分效应可有效保护足细胞,维持肾小球滤过屏障的正常通透性、减少蛋白尿,对糖尿病大鼠肾脏起保护作用。因此,糖尿病时,AngⅡ加速糖尿病肾病的发生发展的作用至少部分是通过损害足细胞、破坏肾小球滤过屏障的完整性来实现的。

AngⅡ可通过多种途径使反应氧产物(ROS)产生增多、氧化应激水平增高:(1)AngⅡ通过活化 AT1 受体上调多酶复合体的数个亚基,致使细胞内超氧阴离子(O_2^-)浓度升高;(2)AngⅡ也可以上调 NAD(P)H 氧化酶,该酶产物 O_2^- 与一氧化氮(NO)相互作用生成过氧亚硝基阴离子($ONOO^-$)[6];(3)还原型谷胱甘肽(GSH)是细胞内重要的抗氧化物质,AngⅡ可使细胞内 NADH/NADPH 比例失调,NADPH 含量下降,而后者正是氧化型谷胱甘肽(GSSG)转变为 GSH 过程中谷胱甘肽还原酶的辅酶,致使细胞内 GSH 含量下降[5]。所以,干预 AngⅡ效应的药物 AT1 受体拮抗剂可以作为抗氧化剂起作用,阻止血管和肾脏变化。目前认为在多种肾小球疾病中,氧化应激通过损伤足细胞,从而促进肾脏损害和蛋白尿的发生[7,8],大鼠嘌呤霉素(PAN)肾病模型类似于人类微小病变病,有明显的氧化应激参与其发生发展,Ricardo[8]等研究了接受 PAN 注射的大鼠在联合与不联合抗氧化剂时尿蛋白排泄及足细胞的变化,接受 PAN 处理的大鼠应用 α-生育酚/抗坏血酸治疗后尿蛋白减少近 90%,足突消失显著降低,抗氧化剂对 PAN 大鼠提供的保护作用是抵抗发生在肾小球足细胞足突的变化,ROS 在足细胞损伤和蛋白尿的发生机制中起关键作用[9]。

本实验中我们采用脂质过氧化产物 MDA 含量和抗氧化酶 SOD、CAT 活性来反映机体的抗氧化能力和氧化应激程度,结果显示,糖尿病组大鼠肾皮质 MDA 含量显著高于正常对照组,而 SOD、CAT 活性显著低于正常对照组,同时伴有糖尿病大鼠足细胞明显受损,表明糖尿病时存在肾组织抗氧化能力降低,自由基及其产物增多,损害了肾小球滤过屏障外层足细胞的结构和功能;采用氯沙坦干预治疗后,糖尿病大鼠肾皮质 MDA 含量显著降低,而 SOD、CAT 活性显著升高,足细胞损伤明显减轻,提示 AngⅡ可通过作用于 AT1 受体抑制糖尿病大鼠肾组织的抗氧化能力、提高肾组织氧化应激水平,增高足细胞损伤标志-desmin 蛋白的表达,损害足细胞的结构和功能,从而破坏肾小球滤过屏障的完整性,阻断 AngⅡ对 AT1 受体的作用可有效减轻糖尿病大鼠肾组织的氧化应激从而保护足细胞。

因此,本研究表明,AngⅡ对糖尿病大鼠肾脏的损害作用可能部分是通过作用于 AT1 受体、增高肾组织氧化应激从而损害肾小球滤过屏障外层足细胞的结构和功能而实现的,这可能是 AngⅡ参与糖尿病肾病发生发展的途径之一。但糖尿病 (下转第 502 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

气。一般以尿糖维持在(+)较适宜,不强求尿糖阴性,尿糖超过(++)时,每增加(+),皮下注射胰岛素 4U。有的病人有较大的波动,须酌情随时调整。经肠营养恢复后,仍应强调根据病情制订长期使用胰岛素或根据内科意见采用其它控制糖尿病的治疗方案。

在应用 TPN 中,高糖高渗非酮性昏迷(HHNC)是糖尿病围手术期 TPN 支持时最严重的代谢并发症,严重时可导致昏迷甚至死亡。它多发生于 TPN 早期,本组有 2 例发生,经抢救治愈,我们的经验是当血糖>13.9mmol/L 时应停用葡萄糖改用生理盐水,胰岛素 2~4u/h;当血糖<13.9mmol/L 再开始过渡到 5% 葡萄糖和脂肪乳剂。其次低血糖发生在 TPN 应用中也时有发生,本组有 2 例(2.7%)病人主要表现心慌、大汗,急查血糖为 2.9 和 2.5mmol/L,及时处理后迅速缓解。

近几年提倡肠内营养支持,优点是并发症少,改善营养状况作用明显,营养摄入及代谢方式合乎生理,能够保护肠粘膜屏障,减少肠源性感染和胆汁淤积的可能性,并能够刺激肠道消化液和激素的分泌。本组 12 例行术后肠内营养支持。在采用肠内营养制剂,越来越多的学者支持使用低碳水化合物、高脂肪(尤其是单不饱和脂肪酸即 MUFA),肠内营养开始后,仍应注意血糖的监测,理想的血糖水平应在 5.5~11.0mmol/L。

近年在接受大的外科手术重危病人又提倡强化胰岛素治疗的概念,因为高血糖和胰岛素抵抗在重危病人中常见。Breghe 等[6]用大宗病例前瞻性研究报告,得出无论病人有无糖尿病病史,使用外源性胰岛素,将血糖维持在 6.1mmol/L 水平以下,可明显降低外科手术重危病人的并发症发生率和死亡率。

参 考 文 献

[1] 傅祖植. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001;798-825.

[2] Pomposelli JJ, Baxter JK, Babineau TJ, et al. Early postoperative glucose control predicts nosocomial infection rate in diabetic patients[J]. J Parenter Enter, Nutr, 1998;22:77-81.

[3] Bell DS. Diabetic cardio myopathy[J]. Diabetes Care, 1995;18:708-714.

[4] Hully SB, Rosenman RH, Bawol RD, et al. Epidemiology as a guide to clinical decision: the association between trigly ceride and coronary heart disease[J]. New Engl J Med, 1980;302:1383-1389.

[5] 张大为. 现代胸心外科学[M]. 北京:人民军医出版社,2000;860-890.

[6] Greet Van DB, Pieter W, Frank W, et al. Intensive insulin therapy in the surgical intensive care unit[J]. New Engl J Med, 2001;354(19):17-22.

(上接第 451 页)时足细胞 desmin 蛋白表达上调的具体机制和对足细胞功能的影响尚不清楚,有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Sugimoto T, Nakamura Y, Makino H. Prevention and remission of diabetic nephropathy[J]. Nippon Rinsho, 2003;1167-1171.

[2] Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury[J]. J Am Sco Nephrol, 2002;13:3005-3015.

[3] Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2002;13:3005-3015.

[4] Floege J, Alpers CE, Sage EH, et al. Markers of complement-dependent and complement-independent glomerular visceral epithelial cell injury in vivo[J]. Expression of antiadhesive proteins and cytoskeletal changes. Lab Invest, 1992;67:486-497.

[5] 陈 玲, 贾汝汉, 丁国华. 肾素-血管紧张素系统与糖尿病肾病研究进展[J]. 国外医学泌尿系统分册, 2002;22:379-381.

[6] Onozato ML, Tojo A, Goto A, et al. Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effects of ACEI and ARB[J]. Kidney Int, 2002;61:186-194.

[7] Binder CJ, Weiher H, Exner M, et al. Glomerular overproduction of oxygen radicals in Mpv17 gene-inactivated mice causes podocyte foot process flattening and proteinuria: A model of steroid-resistant nephrosis sensitive to radical scavenger therapy[J]. Am J Pathol, 1999;154:1067-1075.

[8] Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB. Podocyte architecture in puromycin aminonucleoside-treated rats administered tungsten or allopurinol[J]. Exp Nephrol, 1995;3:270-279.

[9] Greiber S, Muller B, Daemisch P, et al. Reactive oxygen species alter gene expression in podocytes: induction of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor[J]. J Am Soc Nephrol, 2002;13:86-95.