DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.017
第24卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 8
2002年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2002

文章编号:1000-5404(2002)08-0913-03

论著

糖尿病大鼠血、尿、肾脏内皮素变化及意义

艾智华,孟 萍,蔡红卫 (第三军医大学附属西南医院内分泌科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨内皮素在糖尿病大鼠血浆、尿、肾脏中的含量变化和意义。方法 采用链脲佐菌素(STZ)诱导大鼠糖尿病模型,观察12周时肾脏损害和血浆、尿、肾脏组织内皮素(ET)的变化。结果 与正常对照大鼠相比,糖尿病大鼠12周时体重降低,内生肌酐清除率(Ccr)、血尿素氮(BUN)、24 h尿蛋白排泄量(UPE)明显升高。电镜可见细胞外基质堆积和基膜增厚。血浆ET明显降低,而肾组织ET含量、24 h尿ET排泄量(UET)显著升高($P<0.01$)。结论 12周糖尿病大鼠已有明显肾脏病变。研究提示肾脏ET的合成增加参与了糖尿病肾病的发生,高血糖的直接作用可能为抑制内皮细胞合成、释放内皮素。尿ET可作为反映糖尿病肾脏损害的一个较敏感的临床指标。

关键词:糖尿病肾病;内皮素;肾功能
中图法分类号:R349.2;R587.1 文献标识码:A

Contents and significance of endothelin in plasma urine and renal tissue of diabetic rats

AI Zhi-hua, MENG Ping, CAI Hong-wei (Department of Endocrinology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the contents of endothelin (ET) in plasma urine and renal tissue of diabetic rats and their significance. **Methods** Diabetic mellitus was induced by an intraperitoneal injection of streptozotocin (50 mg/kg) in rats. Renal damages and changes of endothelin in plasma, urine and renal tissue were observed. **Results** After 12 weeks of hyperglycemia, endogenous creatinine clearance rate, blood urea nitrogen, and 24-hour urinary protein excretion increased significantly and the body weight decreased in the diabetic rats when compared with controls. Extracellular matrix accumulation and basement membrane thickening were seen with EM. Plasma ET of diabetic rats was lower than that of normal rats, but renal tissue ET and 24-hour urinary ET excretion were increased obviously. **Conclusion** Our study suggests: ①Increase of renal ET synthesis plays an important role in the pathogensis of diabetic nephropathy. ②Hyperglycemia has direct effect on the inhibition of the synthesis and release of endothelin in endothelial cells. ③The increased urine ET excretion in diabetes mellitus is related to the severity of the diabetic renal lesion and can be regarded as an early and sensitive marker of diabetic nephropathy.

Key words: diabetic nephrophathy; endothelin; renal function

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)是糖尿病常见而严重的并发症之一,其发生机制至今仍未明了。内皮素(Endothelin, ET)是作用强、作用时间持久的内源性缩血管活性肽,并且具有促进细胞增殖的作用。肾脏的许多部位都合成和分泌ET,并有内皮素受体分布。ET对肾血浆流量、肾小球滤过率、系膜细胞生物学、尿液浓缩稀释等重要功能均有影响[1]。本实验利用链脲佐菌素(Streptozotocine, STZ)诱导糖尿病大鼠模型,观察糖尿病大鼠血浆、肾组织、尿中内皮素水平变化,以及肾功能的改变,旨在进一步认识糖尿病肾病的发病机制。

1 材料与方法

1.1 糖尿病动物模型复制

选用150~190 g的健康雄性Wistar大鼠17只,随机分为正常对照组9只(Control)和糖尿病组8只(Diabetes)分笼喂养,随意饮水,将糖尿病组大鼠参照于德明等[2]的方法,禁食10 h,用链脲佐菌素(Sigma公司)溶于0.1 mol/L柠檬酸—柠檬酸钠缓冲液(pH 4.5),配成1%的溶液,按50 mg/kg体重单次腹腔注射,5 d后取尾静脉血,用one Touch II血糖仪测定血糖,血糖≥16.7 mmol/L为糖尿病大鼠(成模率100%)。正常对照组注射相应体积的柠檬酸-柠檬酸缓冲液。继续喂养至12周。

1.2 标本采集

分组12周后采集标本,收集24 h尿,测24 h尿蛋白排泄量(Urinary protein excretion, UPE)、尿肌酐(Urea creatinine, Ucr)、24 h尿内皮素排泄量(Urinary ET, UET)。

称重后麻醉,右心房取血测内皮素,放免法测定胰岛素(Insulin, INS),用CX-7自动生化分析仪(美国BeckMan公司产品)测血糖(Glucose, GLU)、血尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN)、血肌酐(Serum reatinine, Scr),并计算内生肌酐清除率(Endogenous creatinine clearance rate, Ccr),结果用体重校正。

取双肾,右肾取米粒大小块肾皮质修剪成1 mm×1 mm×1 mm大小,置1.25%戊二醛固定,部分以4%多聚甲醛固定,用电镜(Philips CM-10)和光镜检查,左肾用于组织ET含量测定。

1.3 血浆、尿及肾组织ET-1含量测定

血样处理:用含10%EDTA二钠30 μl和抑肽酶40 μl(400 IU)的预冷试管收集1.5 ml血,混匀,4 ℃ 3 000 r/min离心10 min,取上清—20 ℃保存待测。组织标本处理:肾组织解剖分离为皮质、髓质,分别称取100 mg,放入预冷的1 mol/L醋酸1 ml中略碾磨,100 ℃水浴10 min,匀浆,4 ℃离心,取上清—20 ℃保存待测。用解放军总医院提供的内皮素放免药盒测定血浆及

作者简介:艾智华(1969—),男,江西省临川县人,硕士,主治医师,主要从事糖尿病并发症发病机制和防治方面研究。电话:(023)68754138
收稿日期:2001-10-31;修回日期:2002-03-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

组织匀浆中 ET 含量。

1.4 肾组织 ET-1 免疫组化检测

用 S-P 试剂盒(福州迈新生物技术开发公司)及 DAB 显色系统(Aldrich Chem 公司),按药盒说明操作,其中兔抗鼠 ET-1 抗体(Sigma 公司)效价为 1∶1 000,以 PBS 替代一抗作为阴性对照。光镜观察染色结果,并于 400 倍光镜下分皮质、髓质层,每层随机选取 5 个视野,用 tiger 920 图像分析仪测定阳性染色的积分光密度,取均值。

1.5 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用第三军医大学医用统计程序包 SPMR 进行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 糖尿病大鼠体重、血糖、胰岛素和肾脏功能的变化

与正常大鼠相比,12 周时糖尿病大鼠体重、血浆胰岛素降低,血糖显著升高,血尿素氮、内生肌酐清除率和 24 h 尿蛋白排泄量均显著增加,见表 1。

表 1 两组体重、血糖、胰岛素和肾脏功能的比较

Tab 1 Comparison on weight, blood glucose, insulin and renal function in diabetic and normal rats

Group	n	Weight(g)	Glu(mmol/L)	INS(mμ/L)	BUN(mmol/L)	Ccr(ml/min.kg)	UPE(mg/d)
Control	9	368.2±24.7	9.07±0.98	24.37±3.07	7.28±0.75	4.40±0.55	9.41±1.74
Diabetes	8	205.5±20.8**	30.57±2.56**	9.38±1.91**	11.36±1.79**	6.82±0.52**	44.04±14.38**

**: $P<0.01$ *vs* control

2.2 血浆 ET 浓度和 24 h 尿 ET 排泄量、肾组织 ET 含量变化

与正常对照组相比,糖尿病大鼠组血浆 ET 浓度显著低于正常对照组,24 h 尿 ET 排泄却显著升高。糖尿病组肾脏皮质和髓质 ET 显著升高,见表 2。

表 2 两组血、尿、肾组织 ET 含量变化

Tab 2 Changes of ET contents in the plasma, urine and renal tissue

Group	n	Plasm(pg/ml)	Urine(ng/d)	Cortex(ng/g)	Medulla(ng/g)
Control	9	174.89±23.15	6.09±0.60	10.63±1.21	12.10±1.10
Diabetes	8	99.79±15.39**	11.37±1.13**	13.08±1.38*	15.35±2.06**

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

2.3 肾脏组织中 ET-1 免疫组化改变

正常大鼠肾脏肾小球、小血管内皮细胞和肾小管上皮细胞、集合管上皮细胞散在分布少量阳性染色。糖尿病大鼠肾脏皮质和髓质 ET 免疫组化阳性染色增多,见图 1。图像分析统计积分光密度结果见表 3,糖尿病大鼠肾脏皮质和髓质 ET 免疫组化免疫组化染色积分光密度显著增加。

表 3 肾脏 ET-1 积分光密度值(IOD)

Tab 3 Integrate optical density of renal ET-1

Group	n	Cortex	Medulla
Control	9	1136.6±210.8	1426.6±320.0
Diabetes	8	2621.6±438.1**	3249.0±457.1**

**: $P<0.01$ *vs* control

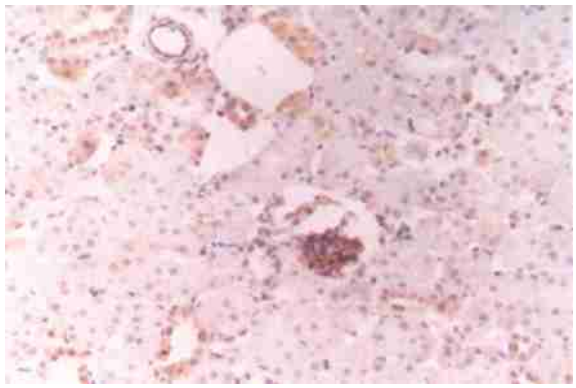


图 1 糖尿病大鼠肾脏的 ET-1 表达 (S-P× 200)

Fig 1 Expressing of ET-1 in renal tissue of diabetic rat (S-P×200)

2.4 超微结构观察

糖尿病组肾小球肥大,肾囊腔狭窄,系膜区弥散性增宽,细胞增生数目增多,散在肾小管上皮细胞肿胀变性,脱落。肾小球系膜区扩大,基质增多,脏层上皮细胞足突融合,基膜不规则轻度增厚,见图 2。

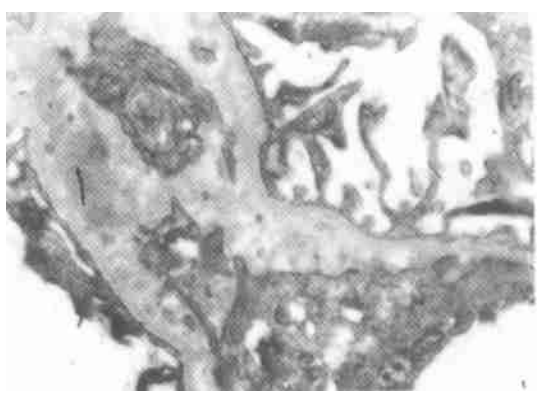


图 2 糖尿病组肾脏的超微结构 (EM× 11 500)

Fig 2 Ultrastructure of renal tissue in diabetes group (EM× 11 500)

3 讨论

人类糖尿病肾病分为 5 期,但国内外对实验性糖尿病大鼠肾脏损害尚无明确的分期。本实验用 STZ 诱导大鼠糖尿病模型,结果发现第 12 周时,糖尿病鼠肾小球滤过率显著高于正常,电镜下肾脏病理改变表现为脏层上皮细胞足突融合,基膜不规则轻度增厚;并出现 24 h 尿蛋白排泄量增加、血尿素氮增高等肾脏功能损害。

Takahashi[3] 观察到糖尿病鼠 4 d 时肾组织 ET 水平已有升高趋势,本实验发现第 12 周时,糖尿病大鼠肾脏皮质和髓质 ET 含量已显著升高,免疫组化也显示了糖尿病大鼠肾脏皮质和髓质 ET 免疫组化阳性染色增多,积分光密度显著增加,肾小球和小血管内皮细胞、肾小管上皮细胞、集合管上皮细胞合成分泌 ET-1

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

增多, 证实肾脏组织 ET 的升高来自于肾脏本身 ET-1 的合成分泌增强。肾脏组织 ET 的升高可能由于糖尿病大鼠肾脏内皮素基因的转录、翻译均增强, Hargrove 等[4] 研究发现, 糖尿病大鼠肾脏 ET-1mRNA 也增加。内皮素主要以自分泌和旁分泌方式起作用的, 伴随着肾组织 ET 的升高, 出现尿蛋白排泄量增加, 血尿素氮增加等肾功能损害, 提示 ET 参与了糖尿病肾病的发生和发展。文献[5] 报道用内皮素受体拮抗剂可以使糖尿病大鼠蛋白尿减少。

本实验中发现, 糖尿病大鼠尿中 ET-1 排泄量增加, 这与 Morabito 等[6] 的观察一致, 在他的实验中, STZ 诱导糖尿病模型 3 d 后尿中 ET 显著升高, 并逐渐增多至 20 周。血中 ET 自由经肾小球滤过, 绝大部分被位于近曲小管刷状缘的中性肽酶所降解, 所以尿中 ET 基本上是肾源性的[7], 糖尿病大鼠尿中 ET 的增多, 反映了肾脏合成分泌 ET 增多。尿中 ET 水平的增加伴随尿蛋白排泄量的增加, 提示尿中 ET 排泄增加不仅反映了肾脏 ET 增多在 DN 中的重要作用, 另一方面反映糖尿病肾脏损害, 有作为反映糖尿病肾病的临床观察指标的可能, 需进一步临床观察。

近年来, 糖尿病患者血浆内皮素水平受到人们的重视。但是研究结果中, 对糖尿病病人血浆 ET 水平的变化及其与糖尿病血管并发症的关系看法不一。Takahashi[8] 在研究中观察到, 用 STZ 诱导的 Wistar 大鼠糖尿病模型 4 d 后, 肺组织 ET 显著低于对照鼠, 肾组织 ET 增高, 但没有显著差别, 而血浆 ET 未能测到[小于 0.5 pmol/L, 对照鼠为 (1.33 ±0.18) pmol/L], 作者考虑可能为高血糖抑制了 ET 的分泌。本实验中, 我们发现糖尿病大鼠 12 周时测血浆 ET 水平显著低于正常大鼠, 而此时肾脏皮质和髓质 ET 合成显著增加, 我们考虑高血糖的直接作用可能为抑制 ET 的合成和分泌, 而肾脏内皮素的产生增加可能与肾脏局部因素有关, 包括糖尿病早期肾小球高灌注、毛细血管高内压的血流动力学改变, 刺激 ET-1 原基因的表达、分泌增加; 糖尿病肾脏局部 TXA_2、AT Ⅱ、TGF-β、TNF 及 PDGF 等的合成增加, 它们均是 ET 合成释放的强效刺激因子。临床研究糖尿病患者血浆 ET 水平所得出的不一致的结果, 可能由于循环 ET 水平受糖尿病类型、是否存在高胰岛素血症、病程长短和血管并发症严重程度等多种因素的影响。

综上所述, 本实验用 STZ 诱导 DM 大鼠模型, 12 周时肾脏损害表现在肾小球高滤过, 尿蛋白增多及血尿素氮增高。血浆 ET 水平降低, 可能与高血糖抑制内皮细胞 ET 的合成、释放有关。糖尿病大鼠肾脏组织 ET 的合成、分泌增强, 可能以自分泌和旁分泌方式参与了 DN 的发病机制。尿 ET 反映了肾脏 ET 的合成分泌情况, 有可能成为反映肾脏损害的一个较敏感的临床指标。

参考文献:

[1] Simonson M S. Endothelin: multifunctional renal peptides[J]. Physiol Rev, 1993, 73(2): 375—411.

[2] 于德民, 吴　锐, 尹　澔, 等. 实验性链脲佐菌素糖尿病动物模型的研究[J]. 中国糖尿病杂志, 1995, 3(2): 105—109.

[3] Takahashi K, Suda K, Lam H C, *et al*. Endothelin-like immunoreactivity in rat models of diabetes mellitus[J]. J Endocrinol, 1991, 130(1): 123—127.

[4] Hargrove G M, Dufresne J, Whiteside C, *et al*. Diabetes mellitus increases endothelin-1 gene transcription in rat kidney[J]. Kidney Int, 2000, 58(4): 1 534—1 545.

[5] Hocher B, Schwarz A, Reinbacher D, *et al*. Effects of endothelin receptor antagonists on the progression of diabetic nephropathy[J]. Nephron, 2001, 87(2): 161—169.

[6] Morabito E, Corsico N, Serafini S, *et al*. Elevated urinary excretion of endothelins in streptozotozin diabetic rats[J]. Life Sci, 1994, 54(11): PL197—200.

[7] Abassi Z A, klein H, Golomb E, *et al*. Urinary endothelin: a possible biological market of renal damage[J]. Am J Hypertens, 1993, 6(12): 1 046—1 054.

[8] Takahashi K, Suda K, Lam H C, *et al*. Endothelin-like immunoreactivity in rat models of diabetes mellitus[J]. J Endocrinol, 1991, 130(1): 123—127.

(编辑　冷怀明)

(上接 912 页)

症状体征的患者, 应规范扫描, 以免遗漏病变。② 脑膜瘤的生长方式因发生部位不同而异, 位于顶枕部者多呈球形生长, 扁平形生长者多见于脑底[1], 本病例主要为顶枕部颅骨改变而颅内病变较轻, 因而给诊断带来困难。文献介绍血管造影有脑膜支供血, 肿瘤小血管放射状排列及持续雪团样肿瘤染色为脑膜瘤的特点, 有重要的诊断价值。③ 本病还应与下列病变相鉴别: 颅骨海绵状血管瘤: 好发于顶枕部颅骨, 起自板障, 多破坏外板形成边缘硬化的类圆形透光区, 其中可见与颅骨垂直或向周围放射的骨小梁, 但其脑血管造影可见板障内融合或散在的血窦样组织[2]。成骨肉瘤: 成骨型骨肉瘤有骨质增生和粗大的骨针, 但本病发生于颅骨者少见, 且实验室检查碱性磷酸酶升高为其特点。

关键词: 脑膜瘤; 体层摄影术; X 线计算机
中图法分类号: R739.41　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 章　翔 主编. 神经系统肿瘤学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1999. 78.

[2] 吴恩惠, 张景荣, 曹来宾 主编. 放射学[M]. 下册. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 169—170.

(编辑　谢义霞)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net