DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.035
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
78 2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)01-0078-03

蛋白激酶C在糖尿病肾病发生与发展中的作用

戎 健[1],邱鸿鑫[2],汪恕萍[2] ([1]第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所高血压内分泌科,重庆 400042;[2]重庆医科大学第一附属医院内分泌科,重庆 400039)

提 要:目的 探讨糖尿病状态下肾小球蛋白激酶C(PKC)与肾脏改变的关系。方法 对链脲菌素诱发的糖尿病大鼠喂养28周,同时对部分糖尿病大鼠进行胰岛素治疗。测定糖尿病大鼠血糖、糖化血红蛋白A1c(HbA1c)、PKC活性、肾小球基底膜厚度(GBMT)和尿蛋白质/肌酐(Pr/Cr)比值,并与正常对照组比较。结果 糖尿病大鼠在血糖水平和HbA1c含量增高的同时,PKC活性、GBMT和尿Pr/Cr比值都显著增加($P<0.01$);PKC活性与血糖相关($P<0.01$),而与HbA1c无显著相关性($P>0.05$),胰岛素治疗可通过降低血糖水平来减少HbA1c形成、改善PKC活性,从而减缓GBMT增加,减少尿蛋白排出。结论 高血糖慢性刺激可引起肾小球PKC活性增高,非酶促糖基化可能未直接参与PKC活性改变,PKC活性长期增高可促进糖尿病肾病发生与发展。

关键词:糖尿病肾病;肾小球基底膜;非酶促糖基化;蛋白激酶C
中图分类法号:R345.57;R587.1 文献标识码:A

Role of protein kinase C in the development and progression of diabetic nephropathy

RONG Jian, QIU Hong-xin, WANG Shu-ping (Department of Endocrinology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To evaluate the relationship between glomerular protein kinase C (PKC) and renal alterations under diabetic state. Methods The streptozotocin-induced diabetic rats were fed for 28 weeks. Insulin was administered to some of them after the onset of diabetes. Then blood glucose, hemoglobin A1c (HbA1c), glomerular PKC activity, glomerular basement membrane thickness (GBMT) and urine protein/creatinine (Pr/Cr) ratio in diabetic rats were measured and compared with those in the control. Results The levels of blood glucose, HbA1c content, PKC activity and GBMT were significantly higher in diabetic rats than those in the control ($P<0.01$). Insulin treatment could decrease the levels of blood glucose, reduce HbA1c content, ameliorate PKC activity and delay the thickening of glomerular basement membrance (GBM). Conclusion Chronic stimulation of hyperglycemia may increase PKC activity. Nonenzymatic glycosylation may not directly contribute to increasing PKC activity. Long-term increase of PKC activity may enhance the development and progression of diabetic nephropathy.

Key words: diabetic nephropathy; glomerular basement membrance; nonenzymatic glycosylation; protein kinase C

糖尿病肾病的早期改变以肾小球滤过率(Glomerular filtration rate, GFR)的增高为主,随着病程进展出现肾小球系膜扩张和基底膜增厚等。研究发现糖尿病高血糖短期刺激可增加肾小球蛋白激酶C(Protein kinase C, PKC)活性,与糖尿病大鼠早期肾小球滤过率改变和肾肥大有关[1,2]。高血糖对PKC的慢性刺激作用的机制是否与非酶糖基化有关,目前尚不清楚;而在长期高血糖条件下,糖尿病PKC活性改变与肾脏病变的关系目前也未见有报道。本研究对此进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

包括III-S型组蛋白、二酰基甘油和磷酯酰丝氨酸(Sigma),PMSF和0.25 um醋酸纤维素滤膜(华美公司),ATP(重庆化学试剂公司),[r-^{32}P]ATP>5 000 Ci/mmol)(北京亚辉生物医学工程公司),闪烁液(第三军医大学核医学教研室)和同位素检测仪(Beckman)。雄性Wistar大鼠,体重152~250 g。腹腔注射STZ(65 mg/kg体重,溶于0.1 mmol/L柠檬酸钠缓冲液,pH4.0),72 h后血糖大于17 mmol/L为糖尿病大鼠。

1.2 方法

1.2.1 分组 30只大鼠随机分为正常对照组(NC组)、糖尿病未治疗组(D组)和胰岛素治疗组(DI组),每组10只。DI组每日皮下注射1次鱼精蛋白锌胰岛素2~6 U,使血糖和HbA1c(Hemoglobin A1c)水平都高于NC组,但又低于D组。喂养28周后,腹腔注射戊巴比妥钠(5 mg/100 g)麻醉,原位灌注肾脏,分离肾小球,制备肾小球提取物(Glomerular tissue extracts, GTE)及肾小球细胞细胞浆和细胞膜蛋白。

1.2.2 检测 血浆葡萄糖浓度和HbA1c含量分别采用氧化酶法和亲和层析法。尿肌酐浓度采用碱性苦味酸法。蛋白质定量均采用考马斯亮蓝法。肾小球基底膜厚度(Glomerular basement membrance thickness, GBMT)在电镜下进行测量。肾小球PKC测定:于20 mmol/L Tris-HCl缓冲液中加入10 mmol/L $MgCl_2$、400 μg/ml III-S型组蛋白、100 μmol/L[r-^{32}P]ATP、1 mmol/L $CaCl_2$、160 μg/ml磷酯酰丝氨酸、2 μmol/L二酰基甘油和适量待测酶蛋白制剂。反应结束后用醋酸纤维素薄膜收集沉淀,置于闪烁液中进行放射性计数测定。本研究酶蛋白反应浓度线性范围为0.1~0.4 mg/ml,反应时间的线性范围为1~5 min,选择

作者简介:戎 健(1962-),男,安徽省阜阳市人,博士,主治医师,讲师,主要从事糖尿病并发症发病机制方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68757443

收稿日期:2000-02-01;修回日期:2000-05-23

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

反应时间为 5 min。变异系数为 13.5%。本研究用每毫克膜蛋白或胞浆蛋白每分钟引起 III-S 型组蛋白底物发生磷酸化的量来表示 PKC 活性, 结果为 3 次检测的均值, 单位: $pmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$。

1.3　统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间采用 F 检验和 q 检验。相关分析采用直线相关分析和多元线性回归与相关分析。

2　结果

2.1　3 组大鼠血糖、HbA1c、GBMT 和尿 Pr/Cr 比值的变化

本研究通过胰岛素治疗使 DI 组血糖浓度和 HbA1c 水平显著低于 D 组, 但又显著高于 NC 组($P<0.05$ 和 $P<0.01$), 这种状态一直保持到实验结束。到 28 周时, D 组 GBMT 和尿 Pr/Cr 比值均显著高于其它两组($P<0.05$ 和 $P<0.01$); DI 组 GBMT 和尿 Pr/Cr 比值均显著高于 NC 组($P<0.05$ 和 $P<0.01$), 见表 1。

表 1　各组大鼠 GBMT 和尿 Pr/Cr 比值的比较($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Comparison of GBMT and urine Pr/Cr ratio among NC group, DI group and D group($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Items	GBMT(nm)	Urine Pr/Cr ratio(mg/mmol)
NC	142.71±3.41	122.26±36.36
DI	175.00±13.52※	238.42±52.13※
D	198.07±14.65 *	291.45±36.18 *

NC: Normal control group, DI: Insulin-treated diabetic group; D: Non-insulin-treated diabetic group; ※: $P<0.01$ *vs* NC; *: $P<0.05$ *vs* DI

2.2　3 组大鼠 PKC 活性比较

3 组大鼠 PKC 总活性差异均无显著性, 然而 D 组细胞浆 PKC 活性显著低于其它两组($P<0.05$ 和 $P<0.01$), DI 组显著低于 NC 组($P<0.01$)。细胞浆 PKC 活性占总活性的百分比也有相同变化。D 组细胞膜 PKC 活性则显著高于其它各组($P<0.05$, 和 $P<0.01$), DI 组显著高于 NC 组($P<0.05$ 和 $P<0.01$), 见表 2。结果表明病程 28 周时糖尿病大鼠肾小球细胞膜 PKC 活性增高, 而细胞浆 PKC 活性相对降低, PKC 活性由细胞浆向细胞膜转移; 胰岛素治疗可改善 PKC 活性。

表 2　各组大鼠肾小球 PKC 活性的改变($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Alterations of PKC activity in glomeruli from normal control and diabetic rats($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Items	Specific activity ($pmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$)		Total activity ($pmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$)	Cytosol (%)
	Membrane	Cytosol		
NC	148±25	24±4	166±45	85±3
DI	103±8△	60±13△	164±16	62±5△
D	81±10 *	79±11 **	159±21	51±3 **

△: $P<0.01$ *vs* NC; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* DI

2.3　相关分析

直线相关分析显示血糖和 HbA1c 分别与细胞浆 PKC 活性呈显著性负相关($r_1=-0.860$, $P<0.01$; $r_2=-0.482$, $P<0.01$), 与细胞膜 PKC 活性呈显著性正相关($r_1'=0.907$, $P<0.01$; $r_2'=0.662$, $P<0.01$), 进一步多元回归和相关分析表明 PKC 只与血糖呈显著相关性, 偏相关系数分别为 −0.528($P=0.022$)和 0.667($P=0.008$), 而与 HbA1c 无显著相关性。

直线相关分析显示 GBMT 与细胞浆 PKC 活性呈显著负相关($r=-0.531$, $P<0.01$), 与细胞膜 PKC 活性呈显著性正相关($r'=0.558$, $P<0.01$); GBMT 与血糖、HbA1c 和 PKC 一起进行多元回归与相关分析, 对各因素相互影响进行控制后, GBMT 与血糖、HbA1c 和 PKC 活性(细胞膜部分和细胞浆部分)均具显著相关性, 偏相关系数分别为 0.305($P=0.031$)、0.558($P=0.005$)、0.381($P=0.018$)和 −0.367($P=0.022$), 其中与 HbA1c 关系更为密切。同样, 尿 Pr/Cr 比值也与血糖、HbA1c 和 PKC 具显著相关性, 而与 HbA1c 关系更密切。

3　讨论

蛋白激酶 C 广泛存在于许多组织内, 细胞膜是其发挥活性作用的部位, 作为第二信使的主要靶蛋白, 能将信号从细胞外的分子上(如生长因子、激素和药物等)传递到细胞内, 对细胞的功能和生长进行调节。研究表明糖尿病大鼠于病程 2 周时, 肾小球细胞膜上的 PKC 活性显著增高, 可能参与了糖尿病早期肾肥大和 GFR 增高等改变[2], 本研究糖尿病大鼠于病程 28 周时, 肾小球 PKC 活性也由细胞浆向细胞膜转移, 表明病程较长的糖尿病大鼠肾小球 PKC 活性是处于一种持续增高状态。一般认为高血糖是 PKC 活性增高的主要原因, 本研究中血糖与 PKC 活性呈正相关, 提示慢性高血糖可能是肾小球 PKC 活性持续增高的重要原因。其机理可能与 DAG 有关, DAG 是 PKC 内源性激活物[3]。葡萄糖可引起细胞内 DAG 含量增加, 其途径可能通过磷脂酶 C 的介导作用, 或是糖酵解途径而实现[1]。

慢性高血糖可通过非酶促糖基化反应, 引起 HbA1c 含量增加, 本研究 HbA1c 含量在各组的改变与肾小球 PKC 活性改变相一致, 但多元线性回归与相关分析显示两者无显著相关性, 表明非酶促糖基化反应与肾小球 PKC 活性无相关关系, 提示 HbA1c 可能未直接参予肾小球 PKC 活性改变。

慢性高血糖可促进肾小球组织非酶促糖基化, 引起肾小球基底膜增厚[4]。体外实验表明 L-葡萄糖与 D-葡萄糖均能刺激肾小球内皮细胞过量合成基质蛋白, 提示高浓度葡萄糖可以不通过非酶促糖基化途径增加内皮细胞基质蛋白合成。PKC 活性增加可改变肾小球内皮细胞的屏障功能, 导致对白蛋白和其它大分子物质的通透性增加。DeRuhertis 则认为随着病程的延长, 肾小球内具有缩血管活性的 TXA_2 逐渐增加(与 TX 合成酶活性增加有关), TXA_2 通过 PKC 的介导, 增加肾小球基质蛋白合成, 与肾基底膜厚度和肾系膜体积等增加有关[3]。本研究 PKC 活性与 GBMT 和尿

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

Pr/Cr 比值具显著相关性，表明 PKC 活化对肾脏改变有影响，这种影响可能与非酶促糖基化的影响相伴随。高血糖可引起肾小球非酶促糖基化产物（如晚期糖基化终末产物）含量增加，大量的晚期糖基化终末产物可引起局部释放大量的生长因子（如血小板源生长因子和胰岛素样生长因子等）[5]；PKC 活性增加，则增强了肾小球细胞对各种生长因子的反应性，增加了信号传递，PKC 本身也可增加肾小球碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 的表达，这些作用可促进肾小球增殖性病变，也包括GBM 增厚[6,7]。另外，AGE 淬灭-氧化氮（NO）活性，减少肾小球环化鸟苷一磷酸（cGMP），放大 PKC 对 TXA_2、高血糖和其他 PKC 激活剂的反应性；PKC 能抑制 NO 合成，并减弱 cGMP 对 NO 的反应，最终减少肾小球内 NO 介导生成的 cGMP，引起系膜细胞增殖及基质形成，而系膜的增生与基底膜厚有关[3]。

糖尿病高血糖引起肾病的途径很多[8]，本研究结果提示非酶促糖基化与 PKC 活性改变可能是两条不同的途径，因此在糖尿病肾病的防治过程中，既要注重减少或阻止非酶促糖基化，也要注意 PKC 活性的改善。

参考文献：

[1] Xia P, Inoguchi T, Kern T S, *et al*. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia[J]. Diabetes, 1994, 43(9): 1 122—1 129.
[2] Wolf G, Ziyadeh F N. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy[J]. Kidney Int, 1999, 56(2): 393—405.
[3] Derubertis F R, Craven P A. Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes[J]. Diabetes, 1994, 43(1): 1—8.
[4] Ellis E N, Good B H. Prevention of glomerular basement membrane thickening by aminoguanidine in experimental diabetes mellitus[J]. Metabolism, 1991, 40(8): 1 016—1 019.
[5] Friedman E A. Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications[J]. Diabetes Care, 1999, 22 (Suppl 2): B65—71.
[6] Ayo S H, Radnik R, Garoni J A, *et al*. High glucose increases diacylglycerol mass and activates protein kinase C in mesangial cell cultures[J]. Am J Physiol, 1991, 261(Renal Fluid Electrolyte Physiol. 30): F571—F577.
[7] Nakamura T, Fukui M, Ebihara I, *et al*. mRNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats[J]. Diabetes, 1993, 42(3): 450—456.
[8] Cooper M E. Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy[J]. Lancet, 1998, 352(9 123): 213—219.

（编辑 冷怀明）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2001)01-0080-01

超声诊断新生儿完全型大动脉转位 1 例

Diagnosis a case of total transposition of great artery in newborn by echocardiogragphy

左 松，高云华 （第三军医大学附属新桥医院超声科，重庆 400037）

患儿，男，2 d，因出生后发现皮肤、口唇发绀，而从外院转来我院。患儿口唇青紫、呼吸稍急促，胸骨左缘 2、3、4 肋间闻及局限性收缩期杂音。心脏超声检查显示：主动脉起源于右心室，位于右前，肺动脉源于左心室，位于左后；房间隔中部中断 4 mm，该处见左→右过隔分流束；肺动脉内径 7 mm，左肺动脉起始处可见一宽约 3.7 mm 的分流束，于肺动脉内测得连续性湍流，收缩期流速 160 cm/s，舒张期流速 140 cm/s。提示：①完全型大动脉转位；②卵圆孔未闭；③动脉导管未闭；④肺动脉轻度狭窄。入院第 2 天行大动脉转位调转术、卵圆孔修补术、动脉导管结扎术，术后诊断为：①完全型大动脉转位；②卵圆孔未闭；③动脉导管未闭。手术成功，但患儿于第 3 天死于术后心低排综合征。

讨论

完全型大动脉转位在新生儿紫绀型心血管畸形中居首位，为 10.8%，男多于女 3～4 倍。不经治疗者 50% 死于生后 1 个月内，85%～90% 死于 1 岁以内[1]，由于此病死亡率高，死亡年龄小，故经超声诊断新生儿完全型大动脉转位甚为少见。完全型大动脉转位的主要异常是主动脉与肺动脉在解剖上互换位置，形成体、肺循环分别运行。本病例患儿由于存在约 4 mm 未闭的卵圆孔和动脉导管交通，得以互换血流，但由于体循环接受静脉血液，患儿动脉血氧含量很低，紫绀严重，为维持全身氧供，心脏必须成倍地增加排出量，以致负荷过重，心脏很快增大，所以应尽早明确诊断及手术治疗。超声作为一种无创性确诊完全型大动脉转位的检查手段，在新生儿患者中显得尤为重要。

关键词：超声心动描记术；新生儿；完全型大动脉转位
中图法分类号：R725.43 文献标识码：B

参考文献：

[1] 顾恺时 主编. 胸心外科手术学[M]. 第 2 版. 北京：人民卫生出版社，1993. 820.

（编辑 王 红）

作者简介：左 松（1968－），女，重庆市人，硕士，主治医师，讲师，主要从事风湿性心脏病方面的研究，发表论文 10 篇。电话：（023）68755000-74698

收稿日期：2000-09-24；修回日期：2000-12-27

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