

胰岛素对糖尿病大鼠肾小球蛋白激酶 C 和核因子 κ B 表达的影响

肖醉萱 邓德明 孙爱萍

摘要 目的 通过观察糖尿病大鼠肾小球病理改变及蛋白激酶 C (PKC)、核因子 κ B (NF- κ B) 表达的变化,探讨胰岛素的抗炎机制与对 PKC、NF- κ B 信号转导通路抑制的相关性。**方法** 将实验动物随机分为正常对照组 (N 组)、糖尿病组 (DM 组)、胰岛素治疗组 (INS 组)、二甲双胍治疗组 (MET 组),第 4 周、8 周观察其肾小球病理改变,采用免疫组化方法测定 PKC、NF- κ B 活性,及其在糖尿病大鼠肾小球的表达变化。**结果** INS 组大鼠血糖水平低于 DM 组高于 MET 组,但其肾小球 PKC、NF- κ B 的表达明显低于 DM 组、MET 组。**结论** 胰岛素对 PKC、NF- κ B 表达的抑制应更多为其抗炎作用所致,而并非完全依靠其降糖作用。

关键词 胰岛素 PKC NF- κ B

Effect of Insulin on the Expression of Protein Kinase C and Nuclear Factor Kappa B in Diabetic Rat Renal Glomerulus. Xiao Zuixuan, Deng Deming, Sun Aiping. Medical School of Yangtze University, Hubei 434000, China

Abstract Objective To study the correlation between the anti-inflammatory mechanisms of insulin effect and the inhibition to protein kinase C (PKC), nuclear factor kappa B (NF- κ B) signal transduction pathway by observing the pathological changes and PKC, NF- κ B expression in glomeruli of diabetic rats. **Methods** The experimental animals were randomly divided into normal control group (N group), diabetic group (DM group), insulin-treated group (INS group), metformin-treated group (MET group). The pathological changes of glomerular on the first 4 weeks, 8 weeks were observed. PKC and NF- κ B activity was measured by immunohistochemistry, and the expression changes in diabetic rat glomerular was studied. **Results** Blood glucose level of INS rats was lower than that of DM group and higher than that of ME group, but its glomerular PKC and NF- κ B expression was significantly lower than that of the DM group and MET group. **Conclusion** The inhibition effect of insulin on PKC and NF- κ B expression should be more due to its anti-inflammatory effect, and not rely on its hypoglycemic effect entirely.

Key words Insulin; PKC; NF- κ B

近年来越来越多的研究显示,慢性、亚临床性、非特异性的炎症状态与糖尿病 (DM) 及其并发症的发生发展有密切关系。许多炎症因子与 DM 及其并发症有密切关联,其中核转录因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B)、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 在 DM 及其并发症的发生中起着重要作用。而胰岛素 (insulin) 具有抗炎、保护血管内皮、扩张血管、抗血小板聚集、抗动脉粥样硬化及心脏保护等多种非降糖作用,其中抗炎作用是这些作用的核心。笔者于 2009 年 3~8 月通过观察链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠肾小球的组织病理学改变及 PKC、NF- κ B 表达的变化,从而探讨 PKC、NF- κ B 信号转导通路与胰岛素的抗炎机制的相关性。

材料与方法

1. 主要实验材料: (1) 实验动物: 雄性 Wistar 大鼠, 体重 200~220g (湖北省实验动物研究中心) 许可证号: SCXK (鄂) 2008-0005。 (2) 实验试剂: 链脲佐菌素 (STZ, 美国 Sigma 公司); 胰岛素 (诺和灵 N, 丹麦诺和诺德公司); 二甲双胍 (上海施惠宝公司) 小鼠抗小鼠 PKC 单克隆抗体、小鼠抗兔 NF- κ B 多克隆抗体 (上海活乐生物公司); 二步法免疫组化检测试剂 PV-9000 (中杉金桥公司); DAB 显色试剂盒 (批号: 0031/1031, 福州迈新公司)。 (3) 实验仪器: 拜安易血糖仪 (德国拜耳公司); HMIAS-2000 高清彩色医学图文分析仪 (武汉千屏公司)。

2. 实验方法: (1) 糖尿病模型的制备、分组及药物剂量: 随机选取 12 只大鼠作为正常对照组 (N 组), 标准饲料喂养 8 周后腹腔注射 0.01mol/L 的无菌柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 4.5)。其余大鼠高糖高脂饲料喂养 8 周后腹腔注射溶于 0.01mol/L 的无菌柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液的 STZ (pH 4.5), 剂量为 40mg/kg。注射后 72h, 测定尾末梢血糖 $\geq$

作者单位: 434000 荆州, 长江大学医学院 (肖醉萱、邓德明); 434000 荆州, 长江大学附属第一医院 (孙爱萍)

16.7mmol/L 为糖尿病模型构建成功的标准。选择成模大鼠 36 只,随机分为糖尿病组(DM 组)、胰岛素治疗组(INS 组)和二甲双胍治疗组(MET 组),每组 12 只。每组又分 4、8 周组。此后各组标准饲料喂养,INS 组每皮下注射诺和灵 N2U/12h, MET 组将二甲双胍按 2mg/kg 混入第 1 口饲料中。实验期间自由饮水,每日每鼠按 15g/12h 投食。(2)血糖测定:取大鼠尾末梢血测定血糖,每 2 周 1 次。(3)标本的留取与处理:糖尿病发病 4、8 周末,称量各组大鼠体重,在戊巴比妥钠麻醉(50mg/kg,腹腔注射)下,开腹取双侧肾脏,生理盐水冲洗,10% 中性甲醛固定,梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋。切片厚度 4 μ m,贴于普通玻片,用于 HE 染色;切片厚度 3 μ m,贴于多聚赖氨酸处理玻片,用于免疫组化。(4)免疫组化及染色主要步骤:石蜡切片常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇入水 $\rightarrow$ 3% H₂O₂ 去离子水孵育 10min 阻断内源性过氧化物酶 $\rightarrow$ 0.01mol/L PBS (pH7.2) 冲洗 2min $\times$ 3 次 $\rightarrow$ 微波修复抗原:在 0.01mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH6.2)中,加热至沸腾 7min,冷却 5min,再加热沸腾 7min,自然冷却 $\rightarrow$ PBS 冲洗 2min $\times$ 3 次 $\rightarrow$ 滴加一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜 $\rightarrow$ PBS 冲洗 2min $\times$ 3 次 $\rightarrow$ 滴加 PV-9000 聚合物酶辅助剂

37 $^{\circ}$ C 孵育 20min $\rightarrow$ PBS 冲洗 2min $\times$ 3 次 $\rightarrow$ 滴加二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min $\rightarrow$ PBS 冲洗 2min $\times$ 3 次 $\rightarrow$ DAB 显色 3~10min $\rightarrow$ 自来水充分冲洗 $\rightarrow$ 苏木素复染 $\rightarrow$ 乙醇梯度脱水 $\rightarrow$ 二甲苯透明 $\rightarrow$ 中性树胶封片。阴性对照:用 0.01mol/L PBS 代替一抗,其余步骤相同。(5)结果判定:PKC 免疫组化染色片中,在细胞质和细胞膜有棕色着色的细胞为阳性细胞;在细胞质和细胞膜无棕色着色的细胞为阴性细胞。NF- κ B 免疫组化染色片中,在细胞质和细胞核有棕色着色的细胞为阳性细胞;在细胞质和细胞核无棕色着色的细胞为阴性细胞。两者结果均采用 HMIAS-2000 高清彩色医学图文分析系统,每片随机抽取高倍镜视野(含肾小球)10 个,测定平均灰度值。(6)统计学分析:所有数据均以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 *t* 检验法进行组间资料的比较,SPSS11.0 统计软件分析数据,*P* < 0.05 为差异显著。

结 果

1. 各组大鼠血糖检测结果:成模后 INS 组大鼠平均血糖较 DM 组低但较 MET 组高,见表 1。

表 1 各组大鼠血糖检测结果比较(mmol/L)

组别	0 周	2 周	4 周	6 周	8 周
N 组	5.7 $\pm$ 0.82	6.1 $\pm$ 0.97	6.0 $\pm$ 1.27	6.7 $\pm$ 0.94	5.9 $\pm$ 0.98
DM 组	23.9 $\pm$ 3.90	22.3 $\pm$ 3.41	23.7 $\pm$ 4.06	22.4 $\pm$ 2.98	21.2 $\pm$ 4.07
INS 组	25.2 $\pm$ 4.01	18.9 $\pm$ 2.86 [*] Δ	19.2 $\pm$ 3.78 [*] Δ	18.7 $\pm$ 2.75 [*] Δ	17.4 $\pm$ 2.22 [*] Δ
MET 组	24.6 $\pm$ 3.18	14.4 $\pm$ 2.43	14.2 $\pm$ 3.59	13.4 $\pm$ 2.63	13.6 $\pm$ 3.61

与同期 DM 组比较,**P* < 0.01;与同期 MET 组比较, Δ *P* < 0.01

2. 肾组织病理学变化:造模成功大鼠,肾小球体积明显增大,肾小球基膜普遍增厚,肾小球内可有弥漫分布的玻璃样物质;肾小管上皮细胞出现颗粒样和空泡样变性。

3. 免疫组化结果:正常组大鼠肾小球系膜细胞、肾小管细胞及脂肪细胞可见弱的 PKC、NF- κ B 表达,多以胞质为主。DM 大鼠在肾组织上述部位表达

明显增强。PKC 免疫组化结果(第 136 页彩图 3)表现在可见较多的细胞质及细胞膜棕黄色颗粒,细胞膜上的棕黄色颗粒颜色较深,可呈线状分布,胞质棕黄色颗粒颜色较浅。NF- κ B 免疫组化结果(第 136 页彩图 4)表现在可见较多的细胞质及细胞核棕黄色颗粒,细胞核中的棕黄色颗粒颜色较深,可呈团块状分布,胞质棕黄色颗粒颜色较浅。平均灰度值结果见表 2。

表 2 两组大鼠 PKC、NF- κ B 平均灰度值

组别	鼠数	4 周		鼠数	8 周	
		PKC	NF- κ B		PKC	NF- κ B
N 组	6	31.3 $\pm$ 5.63	34.2 $\pm$ 2.68	6	33.8 $\pm$ 3.79	37.4 $\pm$ 3.67
DM 组	6	71.9 $\pm$ 4.78	53.2 $\pm$ 3.57	5	77.6 $\pm$ 3.71	64.3 $\pm$ 3.22
INS 组	6	47.1 $\pm$ 3.33 [#] *	36.9 $\pm$ 3.46 [#] *	6	53.4 $\pm$ 5.07 [#] *	42.0 $\pm$ 3.71 [#] *
MET 组	6	58.7 $\pm$ 3.46	44.6 $\pm$ 3.73	5	59.5 $\pm$ 3.65	61.1 $\pm$ 2.77

与同期 DM 组比较,[#] *P* < 0.01;与同期 MET 组比较,**P* < 0.01

讨 论

炎症与糖尿病的关系最早由 Hotmamisligil 于 1993 年在动物实验中发现。之后 Crook、Pickup、Dun-

can、Leinonen 等^[1-4]多位学者发现 T2DM 患者血清中多种炎症标志物水平增高。越来越多的证据表明糖尿病及其并发症不是单一的代谢病,在某种程度上

可以说是炎症性疾病^[5-7]。研究显示,线粒体超氧化物产生过多是糖尿病并发症的统一机制,多元醇通路代谢亢进、蛋白质非酶糖基化及其终末产物(AGE)形成增加、PKC 激活、己糖胺通路活性增高及 NF- κ B 等的激活都是高糖诱导线粒体内电子传递呼吸链产生超氧化物过多后造成的下游事件^[8]。PKC 是多种不同结构不同生物活性的同工酶组成的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,参与众多血管活性和细胞因子的跨膜信号转导;NF- κ B 是由 Rel 蛋白家族的成员以同源或异源二聚体的形式组成的一组转录因子,可被多种细胞外刺激激活,参与细胞凋亡、炎症等多种条件下的基因调控。目前,已证实高血糖和氧化应激的主要靶点是转录因子 NF- κ B,并通过其调控与炎症、细胞增生、细胞分化等密切相关的多种基因的表达,PKC 通路的异常变化则可能是高糖引起各种紊乱的共同通路^[9]。

胰岛素用于降低血糖、治疗糖尿病已有数十年历史,近年来 2 份前瞻性、大样本、随机对照研究表明对于心外科手术病人及烧伤、急性心肌梗死、败血症、脑膜炎、大叶肺炎等内科 ICU 重危病人,在传统治疗基础上加用胰岛素或葡萄糖加胰岛素治疗,是具有益处或潜在益处的^[5,10]。该研究认为胰岛素显著降低了 ICAM-1、e-选择素、IL-6、MCP-1 等基因表达,上调了原生型一氧化氮合酶(eNOS)活性,抑制了诱导型一氧化氮合酶(iNOS)基因表达,保护了内皮功能,从而预防了脏器衰竭,显著降低了病死率($P < 0.01$)。目前多项研究认为胰岛素的抗炎机制包括抑制炎症因子的产生与释放、增加抗炎因子的合成与释放、促进 eNOS 表达并抑制 iNOS 表达、抑制氧化应激和 ROS 生成及通过降糖间接抗炎等。对 NF- κ B 活性的抑制可能是其主要的抗炎机制,各种途径之间可能存在相互协同作用^[11]。Kumar、Ha 等^[12,13]通过体外细胞培养研究发现,高糖能快速激活 PKC,并使 PKC 从细胞内可溶性部分向细胞膜转位,与此同时,NF- κ B p65 蛋白也从胞质进入胞核而被活化,而用 PKC 阻滞剂能有效抑制高糖诱导的细胞内 NF- κ B 的活化,说明 PKC 的激活能诱导 NF- κ B p65 蛋白的优先活化,并在诱导 NF- κ B 活化中发挥了重要作用。从本实验结果可看出,INS 组大鼠虽然血糖控制欠佳,但其肾脏 PKC、NF- κ B 的表达明显低于 DM 组;而 MET 组大鼠,虽然血糖控制较好,但肾脏 PKC、NF- κ B 的表达明显高于 INS 组。这一结果说明胰

岛素对 PKC、NF- κ B 表达的抑制并非完全依靠其降糖作用,应更多为其抗炎作用所致。

综上所述,葡萄糖促炎作用和胰岛素抗炎作用的提出和证实,不仅加深了对糖尿病及其并发症发病机制的认识,也为安全应用胰岛素提供了新的理论基础。临床治疗糖尿病,可放心大胆并尽早尽快使用胰岛素,而不必担心高胰岛素血症是滋生代谢相关疾病的“共同土壤”。

参考文献

- 1 Crook MA, Tutt P, Simpson H, *et al.* Serum sialic acid and acute phase proteins in type 1 and 2 diabetes. *Clin Chim Acta*, 1993, 219: 131-138
- 2 Pickup JC, Chusney GC, Thomas SM, *et al.* Plasma interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and blood cytokine production in types 2 diabetes. *Life Sci*, 2000, 67: 291-300
- 3 Duncan B, Schmidt M I, Pankow J S, *et al.* Low grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: The atherosclerosis risk in communities study [J]. *Diabetes*, 2003, 52 (7): 1799-1805
- 4 Leinonen E S, Hiukka A, Hurt Camejo E, *et al.* Low-grade inflammation, endothelial activation and carotid intima-media thickness in type 2 diabetes [J]. *J Intern Med*, 2004, 256 (2): 119-127
- 5 Dandona P, Mohanty P, Chaudhuri A, *et al.* Insulin infusion in acute illness. *J Clin Invest*, 2005, 115 (8): 2069-2072
- 6 Hansson G. K. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*, 2005, 352: 1685-1695
- 7 H. Bruunsgaard. Physical activity and modulation of systemic low level inflammation. *J Leukoc Biol*, 2005, 78 (4): 819-835
- 8 Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications [J]. *Nature*, 2001, 414 (6865): 813-820
- 9 Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, *et al.* Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation [J]. *Circulation*, 2005, 111 (11): 1448-1454
- 10 Langouche L, Vanhorebeek I, Vlasselaers D, *et al.* Intensive insulin therapy protects the endothelium of critically ill patients. *J Clin Invest*, 2005, 115: 2277-2286
- 11 马卫国, 朱本章. 胰岛素抗炎作用研究进展 [J]. 国外医学内分泌学分册, 2004, 24 (3): 194-196
- 12 Kumar A, Hawkins KS, Hannan MA, *et al.* Activation of PKC-beta (I) in glomerular mesangial cells is associated with specific NF- κ B subunit translocation [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001, 281 (4): F613-619
- 13 Ha H, Yu MR, Choi YJ, *et al.* Role of high glucose-induced nuclear factor-kappaB activation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by mesangial cells [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13 (4): 894-902

(收稿: 2010-03-20)