

1 型糖尿病大鼠肾脏病变与 ADPN、TGF- β 1、collagen IV、ICAM-1 的关系

郭文荣 李 兴 刘 晶

摘要 **目的** 探讨脂联素、TGF- β 1、collagen IV、ICAM-1 在 1 型糖尿病肾脏病变发生及发展中的变化及作用。**方法** 大鼠随机分为正常对照组和糖尿病组, 每组分别于 4 周和 8 周, 测 24h 尿白蛋白排泄量 (UPro/24h)、空腹血浆葡萄糖、血肌酐、尿素氮、血清脂联素 (ADPN)、肾重/体重, 观察肾脏 TGF- β 1、IV 型胶原蛋白 (collagen IV)、ICAM-1 的表达。**结果** 糖尿病大鼠 UPro/24h 增高、TGF- β 1、collagen IV、ICAM-1 的表达增加、脂联素水平降低。**结论** TGF- β 1、collagen IV、ICAM-1 在肾脏组织中表达水平与血清 ADPN 呈负相关。随着 ADPN 水平降低, TGF- β 1、collagen IV、ICAM-1 在肾脏组织的表达增加。

关键词 糖尿病肾脏病变 脂联素 TGF- β 1 collagen IV ICAM-1

中图分类号 R587 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.12.021

Correlation between Type 1 Diabetic Nephropathy and ADPN, TGF- β 1, Collagen IV, ICAM-1. Guo Wenrong, Li Xing, Liu Jing. Department of Endocrinology, The Second Hospital, Shanxi Medical University, Shanxi 030001, China

Abstract Objective This study investigated the effect of adiponectin, TGF- β 1, collagen IV, ICAM-1 on development of diabetic nephropathy. **Methods** Fourty male SD rats were randomly divided into two groups: the normal control group and the diabetic group. At 4 and 8 weeks, 24-hour urinary albumin excretion, fasting plasma glucose (FPG), serum creatinine (Scr), blood urea nitrogen (BUN), kidney weight/body weight, serum adiponectin (ADPN) were measured and determined renal expression of TGF- β 1, collagen IV, ICAM-1. **Results** 24-Hour urinary albumin excretion and renal expression of TGF- β 1, Collagen IV, ICAM-1 were increased in the diabetic rats. Whereas ADPN were decreased. **Conclusion** The expression of TGF- β 1, collagen IV, ICAM-1 in renal tissue were negatively correlated with serum ADPN. With the decrease of ADPN, expression of TGF- β 1, ICAM-1, collagen IV increased in kidney tissue.

Key words Diabetic nephropathy; Adiponectin; TGF- β 1; Collagen IV; ICAM-1

一项由 Barry Popkin 博士和中国研究人员于 1989~2011 年间共同完成的对超过 29000 中国人的健康和营养研究调查发现, 在中国青少年中 1 型糖尿病发生率为 1.9%, 为美国同龄青少年的 4 倍多^[1]。糖尿病肾病是 1 型糖尿病患者最常见的微血管并发症和主要死亡原因之一。近年来, 脂联素 (ADPN)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、IV 型胶原蛋白 (collagen IV) 在肾脏纤维化的发生、发展中的作用日益受到人们的关注。本研究旨在探讨脂联素、TGF- β 1、collagen IV、ICAM-1 在 1 型糖尿病肾病发生、发展中的变化及作用, 为糖尿病肾病的早期防治提供理论依据。

材料与方法

1. 糖尿病大鼠模型建立及分组: 雄性 SD 大鼠 40 只, 体重 180~220g, 随机分为正常对照组 (NC 组, $n=16$) 和糖尿病组 (DM 组, $n=24$)。DM 组以链尿佐菌素 (STZ, Sigma 公司) 65mg/kg 剂量腹腔注射。NC 组以等体积的枸橼酸缓冲液腹腔注射。72h 后采用瑞特血糖仪测尾血血糖, 血糖 ≥ 16.7 mmol/L, 并出现多饮、多尿、多食等症状者, 为 1 型糖尿病大鼠模型制备成功。所有大鼠分笼、普通饲料喂养、自由饮水。两组大鼠分别于成模后 4、8 周各取 8 只称体重, 测 24h 尿白蛋白排泄量; 10% 水合氯醛 3ml/kg 腹腔注射, 麻醉后大鼠腹主动脉采血, 离心取上清液, -70°C 冻存备用; 切取左肾去被膜后长轴对切, 称重, 取部分 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 取余肾脏液氮冻透后 -70°C 冻存备用。

2. 观察指标及方法: (1) 生化指标: 血浆葡萄糖用葡萄糖氧化酶法 (上海荣盛生物药业有限公司), 血肌酐用苦味酸比色法 (南京建成科技有限公司), 尿素氮采用脲酶法测定 (南京建成科技有限公司), 24h 尿白蛋白排泄量采用放射免疫法测定。(2) 血清脂联素: 采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法 (上

基金项目: 山西省归国留学基金资助项目 (2012088)

作者单位: 030001 太原, 山西医科大学第二医院内分泌科

通讯作者: 李兴, 教授, 电子信箱: 13503504180@163.com

海西唐生物科技有限公司)。(3)肾脏病理改变:肾组织标本经 10% 中性甲醛液固定,常规梯度乙醇脱水,石蜡包埋,制成厚 3 μ m 石蜡切片,行 HE 染色,在光镜下观察肾脏组织形态学改变。(4)免疫组化检测肾脏组织 TGF- β 1、ICAM-1、IV 型胶原蛋白的表达:采用 SABC 方法:石蜡切片脱蜡至水,3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物,0.01mol/L、pH = 6.0 的枸橼酸盐缓冲液热抗原修复,5% 正常山羊血清封闭液封闭内源性生物素及非特异性抗原,滴加 1:100 稀释的兔抗大鼠 TGF- β 1、IV 型胶原蛋白抗体(购自博奥森生物技术有限公司),兔抗大鼠 ICAM-1 抗体(武汉博士德生物工程有限公司),PBS 代替一抗作阴性对照,滴加山羊抗兔 IgG 二抗后加 SABC 试剂, DAB 显色。苏木素复染 10s,脱水、透明、封片。于 Scanscope 数字病理扫描系统中图像分析软件下,每张切片随机选取 5 个肾小球和肾小管视野进行观察,以出现棕黄色颗粒为阳性,计算平均光密度(即 A 值)。(5)RT-PCR 法测定肾脏组织中 TGF- β 1、Collagen IV 和 ICAM-1 mRNA 的表达:取肾组织 50mg 用 Trizol 试剂提取总 RNA。RT-PCR 法检测肾脏组织中 TGF- β 1、collagen IV 和 ICAM-1 mRNA 表达水平。TGF- β 1 基因引物序列:上游:5'-TGAGTGGCTGTCTTTTGACG-3',下游:5'-ACTGAAGCGAAAGCCCTGTA-3'。IV 型胶原蛋白引物序列:上游:5'-GCCAAGTGTGCATGAGAAGA-3',下游:5'-AGCGGGGTGTGTTAGTTACG-3'。ICAM-1 引物序列:上游:5'-AGGTATCCATCCATCCCACA-3',下游:5'-GCCACAGT-

TCTCAAAGCACA-3'。内参照 β -actin 引物序列:上游:5'-GTCAGGTGCATCACTATCGGCAAT-3',下游:5'-AGAGGTCTTTACGGATGTCAACGT-3'。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 10min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 15s,60 $^{\circ}$ C 复性 60s,共 45 个循环。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后,应用图像分析软件对条带进行 A 峰值下灰度积分,各组灰度与内参 β -actin 灰度的比值表示每个标本 mRNA 相对表达水平。(6)Western blot 法测定肾脏组织中 TGF- β 1、Collagen IV 和 ICAM-1 蛋白表达水平:在 50mg 肾脏组织加入 500 μ l 蛋白裂解液,超声破碎,电泳后转移至硝酸纤维素膜上,5% BSA 封闭过夜,1:1000 稀释小鼠来源 TGF- β 1、Collagen IV 和 ICAM-1 抗体(美国 Cell Signaling 公司)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗室温孵育 2h,ECL 底物化学发光显色、显影、定影、扫描。

3. 统计学方法:用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较用方差分析及 *t* 检验。两变量间的相关关系采用 Pearson 直线相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组大鼠一般情况:与 NC 组相比,DM 组同期大鼠血浆葡萄糖、血肌酐、尿素氮、24h 尿白蛋白排泄量和肾重/体重显著升高($P < 0.05$),血肌酐、尿素氮和 24h 尿白蛋白排泄量在 DM 组间差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

表 1 正常组和糖尿病组大鼠一般特征 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FPG (mmol/L)	Cr (μ mol/L)	BUN (mmol/L)	UPro/24h (mg)	肾重/体重
NC(4 周)	8	5.47 \pm 0.15	80.57 \pm 12.50	6.00 \pm 0.27	2.21 \pm 1.37	0.34 \pm 0.06
DM(4 周)	8	28.37 \pm 3.25*	238.56 \pm 8.40*	20.41 \pm 4.00*	17.80 \pm 9.21*	0.62 \pm 0.02*
NC(8 周)	8	5.64 \pm 0.41	89.21 \pm 11.88	6.40 \pm 0.38	2.65 \pm 0.83	0.34 \pm 0.04
DM(8 周)	8	28.38 \pm 2.63*	284.79 \pm 18.78* ^Δ	31.51 \pm 2.26* ^Δ	35.83 \pm 2.68* ^Δ	0.65 \pm 0.04*

与正常组相比,* $P < 0.05$;与 4 周糖尿病组相比,^Δ $P < 0.05$

2. 各组大鼠血清脂联素水平的比较:DM 组同期大鼠血清脂联素水平均低于 NC 组($P < 0.05$),DM 组间差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。

表 2 正常组和糖尿病组血清脂联素水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	脂联素 (ng/ml)	
	4 周	8 周
NC	1919.45 \pm 744.58	1830.21 \pm 920.17
DM	509.38 \pm 96.35*	371.53 \pm 75.71* ^Δ

与正常组相比,* $P < 0.05$;与 4 周糖尿病组相比,^Δ $P < 0.05$

3. 各组大鼠肾脏组织形态学改变:光镜下,正常对照组肾脏结构清晰,系膜区未见明显改变。4 周糖尿病组肾小球体积增大,肾脏结构模糊不清,内皮细

胞排列紊乱、系膜细胞肿胀,系膜基质增多,系膜区扩大,肾小管细胞增生肥大,管腔变窄并出现空泡样变,8 周糖尿病肾脏结构损害更明显。

4. 各组大鼠肾脏组织 TGF- β 1、collagen IV、ICAM-1 免疫组化改变:TGF- β 1、collagen IV 在细胞质阳性表达,胞质被染成黄褐色。ICAM-1 在细胞核表达阳性,细胞核被染成黄褐色。阳性细胞主要为肾小球内皮细胞、系膜细胞和肾小管上皮细胞。NC 组大鼠肾小球、肾小管中偶见 TGF- β 1、collagen IV 和 ICAM-1 表达,DM 组大鼠 TGF- β 1、collagen IV 和 ICAM-1 阳性表达的平均灰度值较同期对照组低($P < 0.05$),DM 组 8 周 TGF- β 1、collagen IV 和 ICAM-1 表达灰度值低于 4 周组($P < 0.05$,表 3)。

表 3 免疫组化实验组和对照组 TGF-β1、collagen IV、ICAM-1 平均灰度值的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TGF-β1	ICAM-1	collagen IV
NC(4 周)	201.18 ± 1.00	195.32 ± 1.10	198.19 ± 1.10
DM(4 周)	178.16 ± 0.68*	178.31 ± 1.16*	185.56 ± 0.88*
NC(8 周)	200.06 ± 1.20	195.09 ± 0.36	198.47 ± 1.32
DM(8 周)	166.54 ± 0.75* ^Δ	173.15 ± 1.27* ^Δ	178.19 ± 0.48* ^Δ

与正常组相比, * $P < 0.05$; 与 4 周糖尿病组相比, ^Δ $P < 0.05$

5. 各组大鼠肾脏组织 TGF-β1、collagen IV、ICAM-1 mRNA 表达的变化: 与 NC 组相比, DM 组同期大鼠肾脏组织 TGF-β1、collagen IV、ICAM-1 mRNA 表达增加($P < 0.05$)。DM 8 周组 TGF-β1、collagen IV、ICAM-1 mRNA 表达水平高于 4 周组($P < 0.05$, 表 4)。

表 4 实验组和对照组 TGF-β1、Collagen IV、ICAM-1 mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TGF-β1	ICAM-1	collagen IV
NC(4 周)	0.51 ± 0.13	0.21 ± 0.07	0.34 ± 0.15
DM(4 周)	7.61 ± 4.91*	5.39 ± 1.42*	6.65 ± 0.89*
NC(8 周)	0.54 ± 0.16	0.23 ± 0.07	0.37 ± 0.14
DM(8 周)	53.36 ± 21.70* ^Δ	18.53 ± 8.13* ^Δ	30.05 ± 14.87* ^Δ

与正常组相比, * $P < 0.05$; 与 4 周糖尿病组相比, ^Δ $P < 0.05$

6. 各组大鼠肾脏组织 TGF-β1、collagen IV、ICAM-1 蛋白表达的变化: 与正常组相比, DM 组同期大鼠肾脏组织 TGF-β1、collagen IV、ICAM-1 蛋白表达增加($P < 0.05$)。DM 组 8 周 TGF-β1、collagen IV 和 ICAM-1 蛋白表达水平高于 4 周组(表 5)。

表 5 实验组和对照组 TGF-β1、collagen IV、ICAM-1 的蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TGF-β1	ICAM-1	collagen IV
NC(4 周)	0.39 ± 0.06	0.41 ± 0.02	0.30 ± 0.05
DM(4 周)	0.68 ± 0.05*	0.72 ± 0.03*	0.64 ± 0.05*
NC(8 周)	0.44 ± 0.03	0.43 ± 0.01	0.37 ± 0.05
DM(8 周)	1.07 ± 0.08* ^Δ	1.06 ± 0.11* ^Δ	0.82 ± 0.08* ^Δ

与正常组相比, * $P < 0.05$; 与 4 周糖尿病组相比, ^Δ $P < 0.05$

7. TGF-β1、collagen IV、ICAM-1 表达与血清脂联素的相关性分析: 各组大鼠肾脏 TGF-β1、collagen IV、ICAM-1 mRNA 表达与血清 ADPN 呈负相关($r = -0.539, P < 0.01$; $r = -0.603, P < 0.01$; $r = -0.560, P < 0.01$)。各组大鼠肾脏 TGF-β1、collagen IV、ICAM-1 的蛋白表达与血清 ADPN 呈负相关

($r = -0.790, P < 0.01$; $r = -0.868, P < 0.01$; $r = -0.768, P < 0.01$)。

讨 论

STZ 通过葡萄糖转运蛋白被转运到胰岛 β 细胞内, 将 DNA 的特异位点烷基化, 使得 DNA 双链结构被破坏, 激活 β 细胞中的聚腺苷二磷酸核糖合成酶(PARS), 对 DNA 损伤的部位进行修复。大剂量 STZ 时, β 细胞中的 DNA 受到严重破坏, PARS 被大量激活, 消耗了大量 ATP, 使得细胞缺乏能量, 不能完成损伤修复, 进一步发生凋亡和坏死^[2]。本实验通过一次性大剂量腹腔注射 STZ, 造成 β 细胞损伤、胰岛素绝对缺乏与人类 1 型糖尿病发生、发展相类似。

糖尿病肾脏病变早期表现为肾小球增大, 细胞外基质沉积和基膜增厚, 晚期导致肾小球硬化、肾小管萎缩、间质纤维化。本实验 4 周 DM 组大鼠肾脏形态结构发生病理改变, 且血肌酐、尿素氮、24h 尿白蛋白排泄量都处于增高趋势, 8 周明显高于 4 周组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 说明 4 周已经发生了糖尿病肾功能损害, 且肾功能损害在逐渐加重。

TGF-β1 是公认的致纤维化因子, 高糖可引起肾脏 TGF-β1 表达增多, 其与受体结合, 通过跨膜的丝氨酸/苏氨酸激酶(Ser/Thr)受体转导信号, 激活胞质 Smad2、Smad3 磷酸化, 并与 Smad4 结合形成复合物进入细胞核, 进一步激活肾小球系膜细胞和肾间质成纤维细胞, 促进系膜细胞、肾小管上皮细胞向间充质细胞分化, 自分泌炎性介质和合成、分泌细胞外基质, 参与肾小球硬化、肾间质纤维化^[3,4]。IV 型胶原蛋白是细胞外基质的主要组成部分, 糖尿病肾病中 IV 型胶原蛋白主要沉积在肾小球系膜基质和基膜上, 也可分布在远端小管和集合管基膜上^[5]。IV 型胶原蛋白的表达增加导致细胞外基质增多, 最终出现肾脏纤维化^[6]。糖尿病高血糖可引起肾脏固有细胞损伤与激活, 释放大量的炎性趋化因子, 激活细胞中的核转录因子 κB(NF-κB), 导致细胞中的 ICAM-1 转录表达增加, 吸引单核-吞噬细胞、淋巴细胞及中性粒细胞等炎性细胞迁移、聚集, 导致肾小球硬化和肾间质纤维化^[7]。与研究一致, 本实验随着糖尿病病程的发展, TGF-β1、collagen IV、ICAM-1 在肾脏表达逐渐增加, 参与了糖尿病肾脏病变的发生、发展。

脂联素是脂肪细胞合成和分泌的细胞因子。Nakamaki 等发现, 种植载有脂联素基因腺病毒的糖尿病大鼠与种植载有 β-半乳糖苷酶基因腺病毒的糖尿病大鼠相比, 蛋白尿含量、TGF-β1 mRNA 水平显

著低于对照组,说明脂联素可以减低肾脏 TGF - β 1 的表达。Li 等发现与种植载有 β - 半乳糖苷酶基因腺病毒的粥样硬化腹主动脉相比,种植载有脂联素基因腺病毒的动脉粥样硬化腹主动脉,血管壁 ICAM - 1 mRNA 表达显著降低。说明脂联素可以减低 ICAM - 1 的表达。

本实验糖尿病组血清脂联素水平均低于正常对照组,糖尿病 8 周组血清脂联素水平低于糖尿病 4 周组。血清 ADPN 水平与 TGF - β 1、collagen IV、ICAM - 1 在肾脏组织中表达呈负相关。推测,随着糖尿病肾脏病变的进展,血清脂联素水平在逐渐减少,脂联素下调 TGF - β 1 基因表达和抑制 NF - κ B 信号通路的作用减弱,继而 collagen IV 沉积,ICAM - 1 表达增加,炎性细胞迁移、聚集,导致了糖尿病肾脏纤维化的发生。

参考文献

1 Yan S, Li J, Li S, et al. The expanding burden of cardiometabolic risk

in China: the China Health and Nutrition Survey [J]. *Obesity Reviews*, 2012, 13(9): 810 - 821

2 胡珀,宋丽君,王颀,等. 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶抑制剂的临床研究进展[J]. *中国新药与临床杂志*, 2012, 31(1): 1 - 6

3 Hills CE, Squires PE. The role of TGF - β and epithelial - to mesenchymal transition in diabetic nephropathy[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2011, 22(3): 131 - 139

4 Lan HY. Transforming growth factor - β /Smad signalling in diabetic nephropathy[J]. *Clinical and Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(8): 731 - 738

5 王卓平,姚伟峰,钱铁镭,等. 尿视黄醇结合蛋白和转铁蛋白及 IV 型胶原检测在糖尿病肾病早期诊断中的应用价值[J]. *新乡医学院学报*, 2014, 32(10): 823 - 824

6 赵贞,吴金玉. IV 型胶原在糖尿病肾病中的作用[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2009, 19(2): 121 - 123

7 毛拓华,李竞,刘梦江,等. 抑制 NF - κ B 对糖尿病大鼠肾组织 ICAM - 1 表达的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2009, 10(8): 688 - 691

(收稿日期:2015 - 04 - 30)

(修回日期:2015 - 05 - 19)

血清 Cys C、 β_2 - MG 在感染性休克早期集束化治疗中的临床研究

陈国祥 李志波 李彦德 汤忠明 麦志伟 叶观宇

摘要 目的 探讨血清 Cys C、 β_2 - MG 在感染性休克早期集束化治疗中的临床应用。方法 随机选取成人综合 ICU 感染性休克患者 60 例。予以早期集束化治疗。于集束化治疗前、治疗后 6h、入 ICU 1、2、3、4、5 天分别检测血清 Cys C、 β_2 - 微球蛋白(β_2 - MG)浓度并分别记录各时间点 APACHE II 评分。根据患者 28 天转归分为存活组与死亡组,两组不同时间点相关指标进行比较。本组内各时间点相关指标与集束化治疗前进行比较。分别将两组内血清 Cys C、 β_2 - MG 浓度与 APACHE II 评分进行相关分析。结果 存活组 APACHE II 评分血清 Cys C、 β_2 - MG 随着病情好转下降,死亡组则呈升高趋势。经 Pearson 相关分析,APACHE II 评分与血清 Cys C、 β_2 - MG 浓度呈正相关。结论 血清 Cys C、 β_2 - MG 浓度可作为感染性休克治疗效果及预后的评价指标,与 APACHE II 评分结合,能更准确地评估感染性休克病情的严重程度及预后。

关键词 胱抑素 β_2 - 微球蛋白 急性生理学和慢性健康状况评分系统 II 感染性休克

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.12.022

Clinical Study of Cys C and β_2 - MG in the Early Bundle Treatment for Septic Shock. Chen Guoxiang, Li Zhibo, Li Yande, et al. *Intensive Care Unit of Zhongshan Hospital Affiliated Guangdong Medical College, Guangdong 528415, China*

Abstract Objective To study the cilinical application of Cys C and β_2 - MG in the early bundle treatment for septic shock. **Methods** Sixty cases treated by early bundle were selected randomly. The Cys C and β_2 - MG concentration were respectively tested before bundle treatment and after 6 hours and after entering ICU the first day, the second day, the third day, the fourth day, the fifth day. The APACHE II score were recorded respectively in different time point. There were divided into survival group and death group according to 28d outcome. The related indexes in different time point between the two groups were compared and also the indexes within the groups were

基金项目:广东省中山市科技计划项目(20132A039)
作者单位:528415 广东医学院附属中山医院重症医学科