

## 金属硫蛋白对糖尿病大鼠肾脏氧化应激的影响

张春阳, 曲卫, 石勇铨, 邹俊杰, 刘志民\*

(第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003)

**[摘要]** **目的:**观察抗氧化剂金属硫蛋白(metallothionein, MT)对糖尿病大鼠肾脏氧化应激指标及NADPH氧化酶的影响,探讨MT对糖尿病大鼠肾脏保护作用的可能机制。**方法:**雄性SD大鼠随机分为正常对照组(NC,  $n=8$ )、糖尿病模型组(DM,  $n=7$ )以及糖尿病MT治疗组(DM+MT,  $n=8$ ),糖尿病大鼠腹腔注射链脲佐菌素(60 mg/kg)制备糖尿病大鼠模型,DM+MT组大鼠给予10 g/kg体质量MT灌胃。4周后检测各组大鼠24 h尿蛋白(24 h UP)和肾质量/体质量(KW/BW)值,评价肾脏功能,比色法检测肾脏丙二醛(MDA)含量,real-time PCR法检测NADPH氧化酶亚基p47phox、p22phox,蛋白激酶C(PKC)- $\beta$ 和血管紧张素原(Ang)mRNA表达。**结果:**与NC组相比,DM组24 h UP、KW/BW以及肾皮质MDA水平明显升高( $P<0.05$ );肾皮质p47phox、p22phox、PKC- $\beta$ 和Ang mRNA表达显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与DM组相比,DM+MT组24 h UP、KW/BW以及肾皮质MDA水平降低( $P<0.05$ ),p47phox、PKC- $\beta$ 和Ang mRNA的表达水平降低( $P<0.05$ ),而p22phox无明显改变。**结论:**MT可能通过降低糖尿病大鼠肾脏氧化应激水平,抑制肾皮质PKC- $\beta$ 、Ang以及NADPH氧化酶亚基的表达,从而发挥肾脏保护作用。

**[关键词]** 金属硫蛋白;糖尿病肾病;NADPH氧化酶;蛋白激酶C;血管紧张素

**[中图分类号]** R 587.24

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2007)04-0389-04

### Influence of metallothionein on kidney oxidation of diabetic rats

ZHANG Chun-yang, QU Wei, SHI Yong-quan, ZOU Jun-jie, LIU Zhi-min\* (Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the effect of metallothionein (MT), a potent antioxidant, on the oxidative stress and NADPH oxidase in kidneys of diabetic rats. **Methods:** Male SD rats were assigned to the following 3 groups: normal control (NC,  $n=8$ ), diabetes mellitus control (DM,  $n=7$ ), diabetes mellitus models treated with MT by lavage ( $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , DM+MT,  $n=8$ ). Diabetes in DM group and DM+MT group was induced by intraperitoneal injection of streptozotacin (60 mg/kg). At 4 weeks after initiating treatment, 24 h urinary protein (24 h UP) and kidney weight/body weight (KW/BW) were determined in the 3 groups to assess the renal function of rats; malondialdehyde (MDA) was examined with visible spectrophotometry; NADPH oxidase subunits p47phox and p22phox, protein kinase C (PKC)- $\beta$ , and Angiotensinogen (Ang) were examined by real-time PCR. **Results:** MDA, 24 h UP and KW/BW in DM group were significantly higher than those in NC group ( $P<0.05$ ); expression of PKC- $\beta$ , Ang, and NADPH oxidase subunits p22phox and p47phox mRNA were increased markedly in DM group compared with NC group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). 24 h UP, KW/BW and MDA were significantly lower in DM+MT group compared with DM group ( $P<0.05$ ); expression of p47phox, PKC- $\beta$  and Ang mRNA were significantly decreased in DM+MT group compared with DM group ( $P<0.05$ ), but the expression of p22phox mRNA in DM and DM+MT groups had no significant changes. **Conclusion:** MT may lower the oxidase stress on kidney tissues, inhibit the expression of PKC- $\beta$  and Ang in the kidney, and decrease NADPH oxidase activity, exerting protective effect on the kidney of rats with diabetes mellitus.

**[KEY WORDS]** metallothionein; diabetic nephropathies; NADPH oxidase; protein kinase C; angiotensinogen

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(4): 389-392]

以往研究<sup>[1-2]</sup>表明长期高血糖会导致糖尿病肾病(DN)的发生和发展,良好的血糖控制能减缓DN的进展,但无法最终抑制其发展。因此,有必要寻找防治DN的新措施。近年来,氧化应激在DN发病机制中的作用逐渐受到重视。动物实验<sup>[3-4]</sup>表明糖尿病时氧化应激水平显著升高,抗氧化剂可以降低氧化应激水平,抑制DN的进展。但相关氧化剂的人体临床试验结果并不一致<sup>[5-6]</sup>。因此,仍需进一步

研究以筛选疗效确切的抗氧化剂。

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一种强抗

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2005CB523304)。Supported by National Program on Key Basic Research Projects (973 Program)(2005CB523304)。

**[作者简介]** 张春阳, 博士生。E-mail: zhangchunyanghug@163.com

\* Corresponding author. E-mail: LZM@sh163.net

氧化剂,可直接清除羟自由基( $\text{OH}^\cdot$ )和 $\text{O}_2^\cdot$ ,发挥抗氧化作用<sup>[7]</sup>。有研究<sup>[8]</sup>表明 MT 可能通过抑制 NADPH 氧化酶 p47phox 亚基表达,来发挥抗氧化作用,进而减轻糖尿病对心室肌收缩功能的损害。但具体机制仍不很清楚,因此,本研究观察了 MT 对糖尿病大鼠肾脏氧化应激指标及 NADPH 氧化酶的影响,进一步探讨 MT 对糖尿病大鼠肾脏保护作用的可能机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 链脲佐菌素(STZ)购自美国 Sigma 公司,MT 由哈尔滨春源生物科技开发有限公司提供,丙二醛(MDA)测定试剂盒购自南京建成公司。血糖测定采用罗氏公司血糖测定仪。

1.2 动物分组及处理 雄性 SD 大鼠,体质量 150~200 g,由上海实验动物中心提供。大鼠适应性饲养 7 d 后分组,设置正常对照组(NC)大鼠 8 只;糖尿病组(DM)大鼠给予 STZ(60 mg/kg)一次性腹腔注射,STZ 用前以 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 4.5)新鲜配制,1 周后尾静脉采血测定血糖,以血糖大于 16.7 mmol/L 确定为糖尿病模型,再随机分为 2 组:糖尿病模型组(DM)7 只和糖尿病 MT 治疗组(DM+MT)8 只。MT 蛋粉和 MT 奶粉按 7:3 比例,以最大浓度制备成混悬液,相当于 1 g MT 蛋奶粉/2 ml,DM+MT 组大鼠按每天 10 g/kg 体质量灌胃;NC 和 DM 组大鼠予等量的生理盐水溶液灌胃。所有大鼠自由饮水,给予正常大鼠饲料,每周测量体质量和血糖。

持续给药 4 周后用代谢笼留 24 h 尿液,测尿蛋白排泄量(24 h UP)。实验动物空腹麻醉下迅速取出肾脏,称右肾质量,计算肾质量/体质量(KW/BW),分离肾皮质,-70℃低温冰箱保存,用于检测丙二醛(MDA)、NADPH 氧化酶亚基 p22phox 和 p47phox、蛋白激酶 C(PKC)- $\beta$  及血管紧张素原(Ang)mRNA。

1.3 肾皮质 MDA 含量的测定 按照 MDA 试剂盒说明书操作,用比色法测定。

1.4 Real-time PCR 法检测肾组织 PKC- $\beta$ 、Ang 及 NADPH 氧化酶亚基 p22phox、p47phox mRNA 的表达 Ang 是 Ang-II 的前体,故本研究检测 Ang mRNA 的表达水平来间接了解肾脏组织内 Ang II 的表达;为了更准确地反映待测指标 mRNA 表达水平在各组间的相对差异,本研究采用 18 S 核糖体亚基 mRNA 为参照,即取得待测 mRNA/18 S mRNA 比值,消除标本量对结果的影响。

1.4.1 总 RNA 提取 取出冰冻 100 mg 肾皮质,用 TRIzol 提取总 RNA,电泳观察 RNA 的浓度和完整性。

1.4.2 引物 根据 GenBank 提供的大鼠 p22phox(NM\_024160)、p47phox(NM\_053734)、Ang(NM\_134432)、PKC- $\beta$ (NM\_012713)mRNA 序列,利用 Primer Premier 5.0,自行设计引物。p22phox:上游引物 5'-CGG GCT GTC CTC CAC TTA CTG C-3',下游引物 5'-TGA TGG TGC CTC CAA CCT GCG-3';p47phox:上游引物 5'-GGA CAC CTA TCG CCG CAA CAG-3',下游引物 5'-GAT GAG GTC CGA GCT GGG TCT C-3';Ang:上游引物 5'-TTG TCT GGG CTG GAG CTA AAG G-3',下游引物 5'-GCA GGT GCT CTT GCT GTA GTA G-3';PKC- $\beta$ :上游引物 5'-GGG CTT CGG GAA ACA GGG ATT C-3',下游引物 5'-TGG TCA CAG AAG GTA GGG CTG G-3'。引物由上海欧易生物科技有限公司合成。

1.4.3 RNA 样品逆转录 利用 RNA 逆转录试剂盒进行 RNA 逆转录。试剂盒使用 TaKaRa 公司的 RNA PCR kit,按照试剂盒提供的反应体系进行反转录反应。

1.4.4 Real-time PCR 利用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) kit 进行 real-time PCR 反应。PCR 仪使用 Corbet Research 公司的 Rotor-Gene3000。实验结果利用软件 Rotor-Gene 5.0 以及 Excel 7.0 进行数据分析处理。

1.4.5 标准曲线的绘制 将预试验的 PCR 产物按照 10 倍浓度梯度进行稀释,选择 1/1 000,1/10 000,1/100 000,1/1 000 000 浓度的稀释产物作为标准品模板,进行 real-time PCR 反应。通过这 4 个标准品生成的反应数据,应用软件 Rotor-Gene 6.0 根据反应的荧光实时监控数据和标准品的浓度关系,生成标准曲线。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件,实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间数据差异显著性均采用 *t* 检验处理。

## 2 结果

2.1 糖尿病模型的制备情况 与 NC 组相比,DM 组和 DM+MT 大鼠血糖水平显著升高( $P < 0.01$ ),体质量明显减轻( $P < 0.05$ );与 DM 组相比,DM+MT 组大鼠血糖和体质量没有明显改变,差异无统计学意义(表 1)。

2.2 各组大鼠肾功能及 MDA 检测结果 如表 1

所示,与 NC 组相比,DM 组 KW/BW、24 h UP 和肾皮质 MDA 水平均显著升高( $P < 0.05$  或  $0.01$ )。与

DM 组相比较,DM+MT 组大鼠 KW/BW、24 h UP 和肾皮质 MDA 水平显著降低( $P < 0.05$ )。

表 1 各组大鼠血糖、体质量、肾质量/体质量、尿蛋白和 MDA 检测结果

Tab 1 Blood glucose, weight, KW/BW, 24 h UP and MDA levels in each group

Group	n	Blood glucose ( $c_B/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Weight( $m_B/\text{g}$ )	KW/BW ( $\text{mg}/\text{g}$ )	24 h UP ( $m_B/\text{mg}$ )	MDA ( $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{protein}^{-1}$ )
NC	8	$5.8 \pm 1.2$	$310.1 \pm 20.6$	$4.01 \pm 0.41$	$5.20 \pm 1.16$	$2.01 \pm 0.12$
DM	7	$26.7 \pm 6.1^{**}$	$243.3 \pm 45.4^*$	$5.87 \pm 0.68^*$	$11.34 \pm 1.57^{**}$	$2.94 \pm 0.53^*$
DM+MT	8	$25.9 \pm 5.9^{**}$	$253.4 \pm 40.1^*$	$4.28 \pm 0.56^{*\Delta}$	$7.85 \pm 1.39^{*\Delta}$	$2.32 \pm 0.36^{*\Delta}$

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs NC group;  $\Delta P < 0.05$  vs DM group; KW; Kidney weight; BW; Body weight; UP; Urinary protein; MDA; Malondialdehyde

### 2.3 Real-time PCR 检测结果

2.3.1 NADPH 氧化酶亚基的表达 与 NC 组相比,DM+MT 组和 DM 组 p22phox mRNA 表达显著升高( $P < 0.05$ ),DM+MT 组肾皮质 p22phox mRNA 水平与 DM 组相比无显著差异。DM+MT 组和 DM 组大鼠 p47phox mRNA 表达水平较 NC 组大鼠均显著升高( $P < 0.05$ ),DM+MT 组

p47phox mRNA 水平较 DM 组降低( $P < 0.05$ )。详见图 1A。

2.3.2 PKC- $\beta$  和 Ang 水平 与 NC 组相比,DM+MT 组和 DM 组 PKC- $\beta$  和 Ang mRNA 表达水平显著升高( $P < 0.01$ );DM+MT 组大鼠 PKC- $\beta$  和 Ang mRNA 水平较 DM 组显著降低( $P < 0.05$ )。详见图 1B、1C。

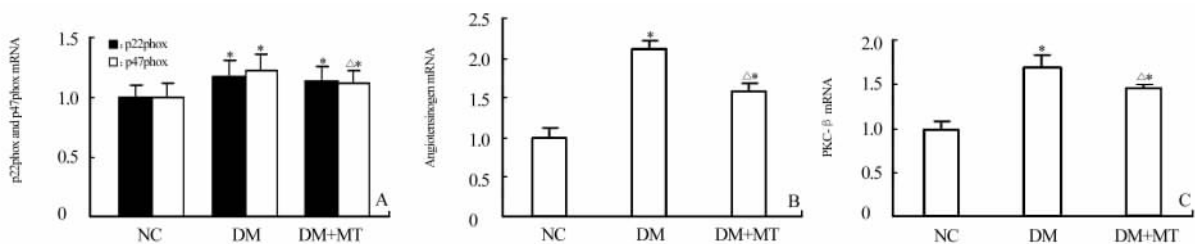


图 1 各组大鼠肾组织 NADPH 氧化酶亚基(A)、Ang(B)以及 PKC- $\beta$ (C) mRNA 的表达

Fig 1 Expression of p22phox and p47phox(A), angiotensinogen(B) and PKC- $\beta$ (C) mRNA as detected by real-time PCR

The levels of p22phox and p47phox, angiotensinogen and PKC- $\beta$  mRNA were relative to 18 s rRNA. Results were expressed relative to NC group, which were arbitrarily assigned a value of 1.0. \*  $P < 0.05$  vs NC group;  $\Delta P < 0.05$  vs DM group;  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

糖尿病肾病的早期表现是肾脏肥大,质量增加,尿蛋白水平升高。故 KW/BW 和 24 h UP 可反映糖尿病大鼠肾脏的早期病变情况,本研究表明,MT 可使糖尿病大鼠这两项指标明显下降,减轻高血糖对肾脏的损伤,抑制糖尿病大鼠早期肾脏病变的进展。糖尿病时氧化应激水平显著升高,NADPH 氧化酶是糖尿病时高水平活性氧族(ROS)的重要来源之一<sup>[3]</sup>。为了评价 MT 对糖尿病大鼠肾脏氧化应激水平的影响,本研究检测了肾皮质 MDA 水平,结果表明,MT 可部分抑制糖尿病大鼠肾脏 MDA 的水

平。降低糖尿病大鼠肾脏氧化应激水平,减少 ROS 的产生和对肾组织的损伤。

糖尿病时 NADPH 氧化酶处于活化状态,而抑制其活性可以降低糖尿病大鼠肾脏氧化应激水平,抑制肾小球基质沉积,减少尿蛋白,减缓 DN 的进展<sup>[9]</sup>。因此,NADPH 氧化酶是防治 DN 的一个重要靶点,包括多个亚基,其中 p22phox 位于细胞膜上,p47phox 在细胞质内。p47phox 磷酸化后可转位到细胞膜,与 p22phox 结合使该酶具有催化活性<sup>[10]</sup>。在肾脏系膜细胞中有 p22phox 和 p47phox 表达。高血糖时肾脏 PKC- $\beta$  和 Ang- II 活性增强,是引起 DN 的重要因素,也促进 p47phox 表达和转位,

增强 NADPH 氧化酶活性的作用<sup>[11-12]</sup>。

本研究结果表明,MT 对 PKC-β 和 Ang mRNA 表达有明显的抑制作用。由于 Ang 是 Ang- II 的前体,故 Ang 也能间接反映肾脏 Ang- II 的水平。MT 对 PKC-β 和 Ang(Ang- II)表达的抑制作用,可间接降低 p47phox 亚基的表达和活性,抑制 NADPH 氧化酶的活性,减少 ROS 的产生,降低肾皮质内的氧化应激水平。

MT 对 NADPH 亚基 p22phox 和 p47phox 的作用是不同的,对 p22phox mRNA 表达没有影响,对 p47phox mRNA 的表达则有显著的抑制作用。p47phox 磷酸化后可活化 NADPH 氧化酶。因此,MT 对 p47phox 的抑制可直接降低 NADPH 氧化酶的活化。

总之,本研究表明,MT 可抑制 PKC-β、Ang 和 p47phox 的表达,降低 p47phox 亚基对 NADPH 氧化酶的活化作用,减少肾脏 ROS 的产生。MT 可通过抑制肾皮质内的氧化应激水平,对糖尿病大鼠的早期肾脏病变具有保护作用。

[参考文献]

[1] Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus[J]. N Engl J Med,1993,329:977-986.

[2] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33)[J]. Lancet,1998,352:837-853.

[3] Inoguchi T, Li P, Umeda F, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through

protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells[J]. Diabetes,2000,49:1939-1945.

[4] Koya D, Lee I K, Ishii H, et al. Prevention of glomerular dysfunction in diabetic rats by treatment with d-α-tocopherol[J]. J Am Soc Nephrol,1997,8:426-435.

[5] Gaede P, Poulsen H E, Parving H H, et al. Double-blind, randomised study of the effect of combined treatment with vitamin C and E on albuminuria in type 2 diabetic patients[J]. Diabet Med,2001,18:756-760.

[6] Lonn E, Yusuf S, Hoogwerf B, et al. Effects of vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high-risk patients with diabetes: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy[J]. Diabetes Care,2002,25:1919-27.

[7] Romero-Isart N, Vasak M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins[J]. J Inorg Biochem,2002,88(3-4):388-396.

[8] Wold L E, Ceylan-Isik A F, Fang C X, et al. Metallothionein alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of Ca<sup>2+</sup> cycling proteins, NADPH oxidase, poly (ADP-Ribose) polymerase and myosin heavy chain isozyme [J]. Free Rad Biol Med,2006,40:1419-1429.

[9] Asaba K, Tojo A, Onozato M L, et al. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2005, 67: 1890-1898.

[10] Babior B M, Lambeth J D, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase[J]. Arch Biochem Biophys,2002,397:342-344.

[11] Kitada M, Koya D, Sugimoto T, et al. Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C-beta activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy[J]. Diabetes, 2003,52:2603-2614.

[12] Onozato M L, 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.

[收稿日期] 2006-10-27 [修回日期] 2007-02-26  
[本文编辑] 贾泽军

• 书 讯 •

《实用淋巴医学》已出版

本书由张涤生主编,人民军医出版社出版,ISBN号 978-7-5091-0620-4,16开,精装,241页,29.2万字,定价 59.00元。

本书以淋巴循环系统的理论为基础,结合临床与科研实践,介绍了淋巴医学领域的最新进展。包括淋巴系统的解剖、生理、病理,淋巴系统与免疫,淋巴系统疾病的诊断、治疗,淋巴丝虫病的流行病学及防治,淋巴水肿的影像学检查,肢体淋巴水肿的治疗,乳糜反流性疾病的治疗以及淋巴水肿的实验研究。内容科学、实用性强,适于从事淋巴医学的临床及科研人员参考阅读。

本书由人民军医出版社市场部发行。

通讯地址:北京市 100036 信箱 188 分箱,邮编:100036

电话:010-51927252;010-51927300-8168。E-mail: wanglan@pmmpp.com.cn