

• 短篇论著 •

全反式维甲酸防治早期糖尿病肾病的实验研究

赵石磊 郑秀峰 解汝娟 关冰 王德润 王林华

【摘要】 目的 研究全反式维 A 酸(ATRA)对糖尿病肾病(DKD)大鼠尿微量蛋白(UAlb)及单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的影响。**方法** 雄性成年 Wistar 大鼠,分为正常对照组(NC)、模型组(DKD)、DKD + ATRA 组(ATRA)、DKD + ACEI 组(ACEI)和 ATRA + ACEI 组。ARTA 组以 20 mg/kg 的 ARTA 灌胃,ACEI 组灌以 10 mg/kg 的贝那普利,ATRA + ACEI 组则予以同等量的 ATRA 和贝那普利(20 mg/kg + 10 mg/kg)灌胃,DKD 组和 NC 组灌以相同剂量的蒸馏水。4 周后检测上述各组大鼠的 UAlb、UCr、MCP-1 指标并计算 UAlb/UCr 及尿 MCP-1/UCr,观察各组间指标的变化,并观察各组肾组织病理学和 MCP-1 在大鼠肾组织表达的变化。**结果** ATRA 组、ACEI 组、ATRA + ACEI 组大鼠 UAlb/UCr 及尿 MCP-1/UCr 均显著低于 DKD 组($P < 0.01$),ATRA + ACEI 组与 ATRA 组和 ACEI 组比较,上述指标亦有明显下降($P < 0.05$)。肾组织的病理学检查显示 DKD 组的肾小球系膜基质轻度增多,细胞明显肥大,体积亦增大显著。与 DKD 组比较,ATRA 组、ACEI 组和 ATRA + ACEI 组的上述改变明显改善。而 ATRA + ACEI 组与单一用药组比较细胞肥大和系膜基质的增生程度也明显降低。免疫组织化学的检测结果显示与正常组比较,DKD 组的 MCP-1 的水平显著增多,与之相比,ATRA 组、ACEI 组和 ATRA + ACEI 组的 MCP-1 的表达水平则明显降低。ATRA + ACEI 组的 MCP-1 的表达减少较 ATRA 组和 ACEI 组更明显。**结论** ATRA 可明显减少早期 DKD 大鼠肾组织 MCP-1 的表达水平,减少尿 MCP-1 及 UAlb 的排泄,延缓 DKD 的进展,ATRA 联合 ACEI 的效果明显优于单用上述任何一种药物。

【关键词】 糖尿病肾病; 趋化因子 CCL2; 血管紧张素转换酶抑制剂; 全反式维 A 酸

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是由多种综合因素引起的以慢性高血糖为特点的代谢性疾病,如今,随着人们生活水平的不断改善,DM 已逐渐成为常见病和多发病,而糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是 DM 最主要的微血管病变之一,而且 DKD 一旦进入到临床蛋白尿期,病情往往无法逆转,最终会发展至终末期肾衰竭,严重威胁着人们的健康和生活质量。因此,DKD 的早期诊断、预防及治疗是特别重要的。众所周知,蛋白尿是 DKD 的主要临床表现之一和加重原因,蛋白尿的排出量在一定程度上反映了 DM 病变的损害程度,目前尿微量蛋白(UAlb)的检测已成为评价早期 DKD 的主要指标,但近期的一些研究表明,单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1),即在 DKD 早期中的产生和排泄均增多,其与 DKD 的发生、发展关系密切^[1-2]。故本实验主要研究全反式维 A 酸(all-trans retinoic acid, ATRA)对早期 DKD 大鼠 MCP-1 和 UAlb 的干预作用,为 DKD 的早期诊断、预防和治疗提供新的依据和线索。

一、对象与方法

1. 模型制备:雄性成年 Wistar 大鼠腹腔一次性注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(55 mg/kg,溶于 pH 4.2, 0.1 mol/L 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液,冰浴新鲜配制),NC 组注射等量的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液。48 h 后经大鼠尾静脉采血测血糖,随机血糖高于 16.7 mmol/L,表明 DM 模型成功。

2. 标本留存:共分为 5 组,正常对照组(NC 组, $n = 10$)、糖尿病肾病模型组(DKD 组, $n = 10$)、全反式维 A 酸治疗组(ATRA 组, $n = 10$)、贝那普利治疗组(ACEI 组, $n = 10$)和全反式维 A 酸 + 贝那普利治疗组(ATRA + ACEI 组, $n = 10$)。ATRA 组给予 ATRA(20 mg/kg)灌胃,ACEI 组给予贝那普利(10 mg/kg)灌胃,

ATRA + ACEI 组予 ATRA 和 ACEI(20 mg/kg + 10 mg/kg)灌胃,DKD 组和 NC 组灌以相同剂量的蒸馏水。4 周后收集大鼠的 24 h 尿量,然后处死大鼠,迅速取出肾脏,做石蜡包埋,然后切 2 μm 厚片做普通肾脏的病理学染色(PAS 染色)。同时采用免疫组织化学法(S-P 法)观察 MCP-1 在大鼠肾组织中的表达情况。

3. 大鼠各项指标的检测及计算:应用 ELISA 试剂盒检测 UAlb、尿肌酐(UCr)和尿 MCP-1,从而计算 UAlb/UCr、尿 MCP-1/UCr 的比值。

4. 统计学处理:采用 SPSS 13.0 软件,各组数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组之间的比较采用 t 检验,两组以上的数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 大鼠的上述数据分析:与 NC 组比较,DKD 组的 UAlb/UCr 及尿 MCP-1/UCr 的指标显著升高($P < 0.01$),而 ATRA 组、ACEI 组和 ATRA + ACEI 组大鼠尿 UAlb/UCr 及尿 MCP-1/UCr 均显著低于 DKD 组($P < 0.01$),且联合用药组与单一用药组(ATRA 组和 ACEI 组)比较亦有明显的下降($P < 0.05$),差异均有统计学意义(表 1)。

表 1 各组大鼠 UAlb/UCr、尿 MCP-1/UCr 的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	UAlb/UCr	尿 MCP-1/UCr
NC 组	0.13 \pm 0.02	1865 \pm 152
DKD 组	0.72 \pm 0.03	9624 \pm 203 ^a
ATRA 组	0.33 \pm 0.04 ^b	6824 \pm 256 ^b
ACEI 组	0.32 \pm 0.03 ^b	6687 \pm 202 ^b
ACEI + ATRA 组	0.20 \pm 0.03 ^{bc}	4536 \pm 196 ^{bc}

注:与 NC 组比较,^a $P < 0.01$;与 DKD 组比较,^b $P < 0.01$;与 ATRA 组和 ACEI 组比较,^c $P < 0.01$

2. 大鼠的肾脏病理分析:光镜下 DKD 组大鼠的肾脏表现为肾小球的系膜基质略增多,体积增大显著,细胞亦明显肥大,基

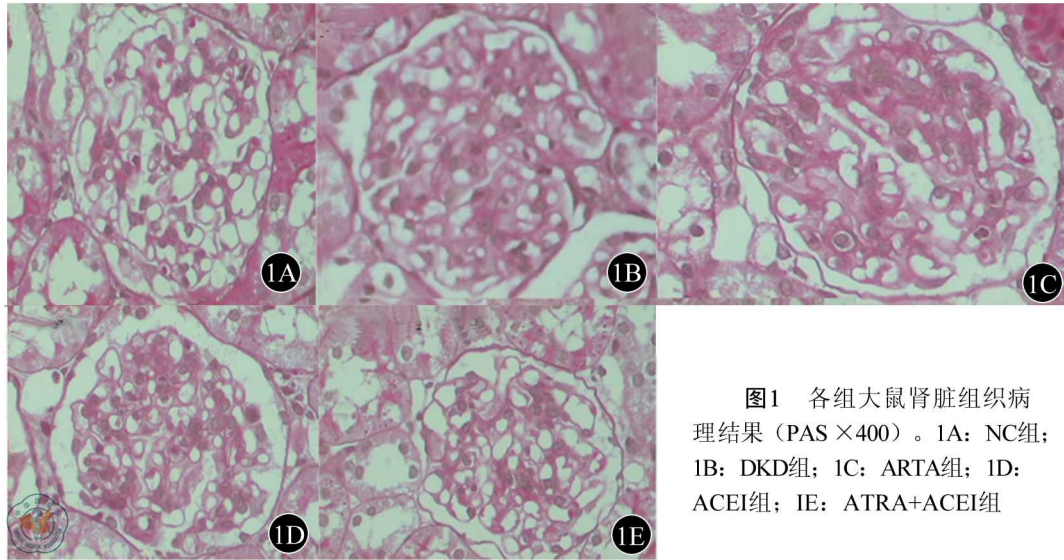


图1 各组大鼠肾脏组织病理结果(PAS×400)。1A: NC组; 1B: DKD组; 1C: ARTA组; 1D: ACEI组; 1E: ATRA+ACEI组

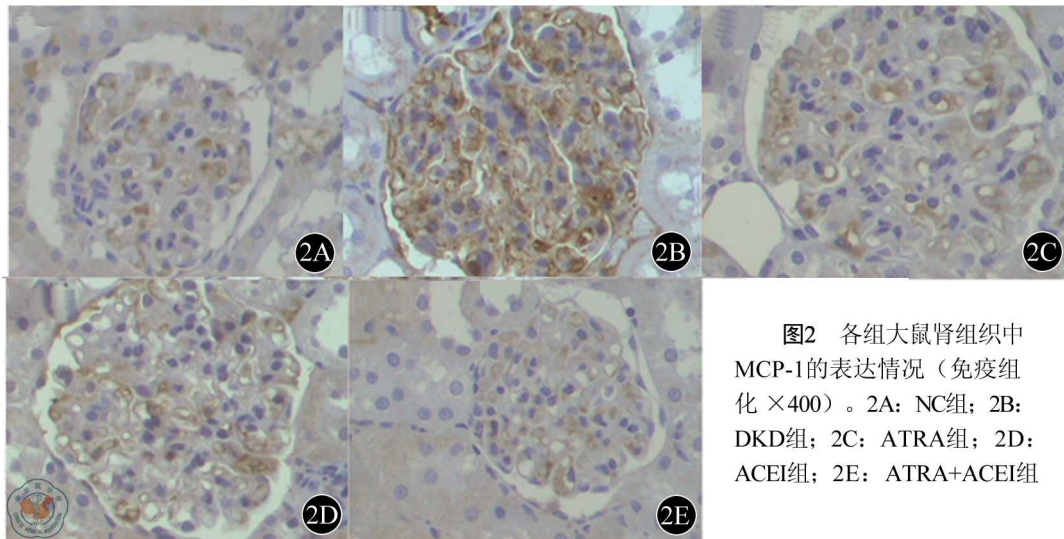


图2 各组大鼠肾脏组织中MCP-1的表达情况(免疫组化×400)。2A: NC组; 2B: DKD组; 2C: ARTA组; 2D: ACEI组; 2E: ATRA+ACEI组

底膜轻度增厚,上述改变为早期DKD的肾脏病理表现,ARTA组、ACEI组及ARTA+ACEI组上述改变较DKD组为轻,系膜基质增多明显改善,肾小球体积较DKD组明显减小,ARTA+ACEI组与ARTA组和ACEI组比较上述改变更为明显(图1)。

3. 肾脏MCP-1的表达:NC组可见有少量的MCP-1染色阳性,主要出现在肾小球细胞的胞质内,颜色为淡棕黄色。DKD组与正常对照组比较,肾脏的MCP-1表达显著增加,主要表现在肥大肾小球的胞质内可见深棕黄色的染色颗粒,而ARTA组、ACEI组及ARTA+ACEI组与DN组比较表达明显下降,且ARTA+ACEI组下降更明显(图2)。

三、讨论

目前,DM的发病率越来越高,而DKD作为DM的主要微血管病变之一,越来越为人们所关注。UAlb作为DKD的早期临床表现之一,是目前诊断早期DKD的重要方法。但国内外已有研究显示,在DKD中UAlb的增多不是最早出现的,MCP-1在尿中的排泄增加可能会更早^[3],而且DKD一旦进入到临床蛋白尿期,肾脏改变通常是无法逆转的,患者最终会发展到终末期肾脏病,需肾脏替代治疗(血液透析、腹膜透析或肾移植等)代替肾功能,严重影响着人们的生活质量及健康,故糖尿病肾病的早期预防、诊断及治疗是十分关键的。

MCP-1可以特异性地趋化单核细胞^[4-5]。有研究表明肾脏

的炎症反应与MCP-1密切相关,其可以趋化巨噬细胞、单核细胞等多种炎症介质,并产生生长因子等,使细胞外基质在肾小球和肾小管中不断地堆积,从而导致了肾脏的纤维化、肾小球的硬化等一系列病理改变,从而参与了DKD的发生与发展^[6]。Kouyama等^[7]的研究还发现尿中MCP-1的增加与UAlb的排泄有明显的相关性,且尿MCP-1的增加的水平与DKD的病变严重程度是一致的。本实验研究结果也表明尿MCP-1在早期DKD大鼠肾脏组织中的表达及尿中的排泄均明显增加,与之前的文献报道是相符的。故目前研究的热点即DKD的发病机制之一即与肾局部MCP-1的升高密切相关。因此,减少MCP-1的产生,可以减轻肾脏的局部的炎症反应和减少尿中蛋白的排泄,延缓肾脏纤维化的进展和硬化等,从而延缓DKD的发生与发展。而作为天然的维生素A的一种代谢产物,ARTA可以刺激细胞的活化、增殖,可以调节免疫、抗炎等,以往主要用于治疗各种皮肤病及恶性肿瘤等。近来研究发现,ARTA在DKD的治疗方面亦有效果,研究显示足细胞的裂孔膜结构蛋白即nephrin的异常是引起尿蛋白的主要原因^[8]。Xu等^[9]的实验亦表明ARTA可以抑制肾小球足突细胞的脱落、融合,减少DKD的蛋白尿的形成,其主要通过刺激足突裂孔膜结构蛋白的启动子,使nephrin的水平异常增加而产生作用的。也有学者^[10]证实ARTA可通过保护肾脏的足细胞、降低尿蛋白的排泄而延缓DKD的进展。而近期亦有

一些学者研究^[11]表明 ATRA 也可以通过下调 MCP-1 在肾组织中的表达水平,从而使肾组织中的多种炎症细胞的聚集减少,达到减轻 DKD 患者的肾脏损害作用。

在本实验中,与 DKD 组相比较,ATRA 组、ACEI 组及 ATRA + ACEI 组 UAlb/UCr、尿 MCP-1/UCr 的水平明显降低,且肾脏组织病理学改变及 MCP-1 的免疫组化表达均显著改善。表明 ATRA 及 ACEI 可在一定程度上减少肾组织中 MCP-1 的表达及尿中 MCP-1 的排泄,同时可降低 UAlb,从而起到肾脏保护的作用,这与文献报道的相符^[12]。而且,与单 ATRA 或 ACEI 相比较,ATRA 联合 ACEI 治疗组上述各项指标均有更明显的改善,表明 ACEI 与 ATRA 的合用能够更加明显地下调肾组织中尿 MCP-1 的表达,减轻肾脏局部的炎症反应,并可减少 UAlb 的排泄,同时还可减少尿 MCP-1 的排泄,从而达到保护肾脏的作用。

本实验的研究结果表明,ATRA 可能通过减少早期 DKD 大鼠的尿蛋白排泄及抑制炎症介质 MCP-1 在肾组织的表达而达到延缓 DKD 的发生与发展的目的,而且 ATRA 联合 ACEI 治疗 DKD 的效果可能优于单用 ACEI 或 ATRA。总之,ATRA 对肾脏的保护作用的机制研究还很少,需要进一步研究,但本实验结果说明 ATRA 对早期 DKD 有一定的作用,且随着人们对 ATRA 认识的逐渐深入,其在早期 DKD 的预防、诊断及治疗中的作用可能会越来越重要。

参 考 文 献

- [1] Berthier CC, Zhang H, Schin M, et al. Enhanced expression of Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway members in human diabetic nephropathy. *Diabetes*, 2009, 58:469-477.
- [2] Lee EY, Chung CH, Khoury CC, et al. The monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 loop, inducible by TGF- β , increases podocyte motility and albumin permeability. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 297:F85-94.
- [3] Chen S, Ziyadeh FN. Vascular endothelial growth factor and diabetic nephropathy. *Curr Diab Rep*, 2008, 8:470-476.
- [4] Lopes-de-Faria JB, Silva KC, Lopes-de-Faria JM. The contribution of hypertension to diabetic nephropathy and retinopathy: the role of inflammation and oxidative stress. *Hypertens Res*, 2011, 34:413-422.
- [5] Karadeniz M, Erdogan M, Cetinkalp S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 2518G/A gene polymorphism in Turkish type 2 diabetes patients with nephropathy. *Endocrine*, 2010, 37:513-517.
- [6] Giunti S, Tesch GH, Pinach S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 has prosclerotic effects both in a mouse model of experimental diabetes and *in vitro* in human mesangial cells. *Diabetologia*, 2008, 51:198-207.
- [7] Kouyama K, Miyake K, Zenibayashi M, et al. Association of serum MCP-1 concentration and MCP-1 polymorphism with insulin resistance in Japanese individuals with obese type 2 diabetes. *Kobe J Med Sci*, 2008, 53:345-354.
- [8] Vaughan MR, Pippin JW, Griffin SV, et al. ATRA induces podocyte differentiation and nephrin and podocin expression *in vitro* and *in vivo*. *Kidney Int*, 2005, 68:133-144.
- [9] Xu ZG, Ryu DR, Yoo TH, et al. P-cadherin is decreased in diabetic glomeruli and in glucose-stimulated podocytes *in vivo* and *in vitro* studies. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20:524-531.
- [10] Kanwar YS, Wada J, Sun L, et al. Two rare forms of renal allograft glomerulopathy during cytomegalovirus infection and treatment. *Am J Kidney Dis*, 2008, 51:1047-1051.
- [11] Shi Y, Du C, Zhang Y, et al. Suppressor of cytokine signaling-1 ameliorates expression of MCP-1 in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*, 2010, 31:380-388.
- [12] Yamagishi S, Matsui T, Nakamura K, et al. Olmesartan blocks inflammatory reactions in endothelial cells evoked by advanced glycation end products by suppressing generation of reactive oxygen species. *Ophthalmic Res*, 2008, 40:10-15.

(收稿日期:2011-12-20)

(本文编辑:张志巍)

赵石磊,郑秀峰,解汝娟,等.全反式维甲酸防治早期糖尿病肾病的实验研究[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2012,6(9):2505-2507.