



DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.08.010

<http://xbyx.xysm.net/xbwk/fileup/PDF/201308818.pdf>

## 血糖波动与持续性高血糖对糖尿病大鼠肾脏病理改变及IV型胶原表达的影响

王环君<sup>1</sup>, 王爱民<sup>2</sup>, 雷闽湘<sup>1</sup>, 廖洁<sup>1</sup>, 胡维<sup>1</sup>

(中南大学湘雅医院 1. 内分泌科; 2. 急诊科, 长沙 410008)

**[摘要]** **目的:** 观察血糖波动与持续性高血糖对糖尿病大鼠肾脏病理改变及IV型胶原(Col IV)表达的影响。**方法:** 将60只SD雄性大鼠随机分为正常组和模型组, 正常组大鼠喂以普通饲料, 模型组大鼠高糖高脂饲料喂养6周后予以小剂量链脲佐菌素(STZ, 30 mg/kg)皮下注射制造糖尿病大鼠模型。再将糖尿病组大鼠随机分为持续性高血糖组和血糖波动组, 其中血糖波动组给予每日两次皮下注射胰岛素人为诱导血糖波动。3个月后将大鼠剖腹取出肾, 行HE染色、PAS染色、Col IV免疫组织化学及Western印迹检测。**结果:** 与正常组大鼠比较, 模型组大鼠肾小球体积增大、毛细血管内皮细胞基底膜增厚、系膜基质增多、肾小球囊腔扩张, 肾小管体积增大、肾小管管腔扩张、上皮细胞基底膜增厚, 肾小球通透性增强, 肾脏病理形态改变明显; 肾肥大指数增加、肾小球硬化指数增加、Col IV表达量明显增加( $P<0.01$ )。与持续性高血糖组比较, 血糖波动组大鼠上述指标变化更为明显( $P<0.05$ )。**结论:** 糖尿病大鼠出现了肾小球基底膜增厚、系膜基质增多等病理形态的改变, 血糖波动组肾小球硬化更明显, Col IV的增多可能与糖尿病肾病的严重程度有关。

**[关键词]** 血糖波动; 糖尿病肾病; IV型胶原

## Effect of blood glucose fluctuation and the sustained high blood glucose on renal pathological change and collagen IV expression in diabetic rats

WANG Huanjun<sup>1</sup>, WANG Aimin<sup>2</sup>, LEI Minxiang<sup>1</sup>, LIAO Jie<sup>1</sup>, HU Wei<sup>1</sup>

(1. Department of Endocrinology; 2. Department of Emergency, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

### ABSTRACT

**Objective:** To observe the effect of blood glucose fluctuation and the sustained high blood glucose on renal pathological change and collagen IV (Col IV) expression in diabetic rats.

**Methods:** The 60 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned into a normal control group (NC) and a model group (DM). The rats in the normal control group were fed with normal diet, while the rats in the model group were fed with high-sucrose-high-fat diet for 6 weeks. After that,

收稿日期 (Date of reception): 2012-05-29

作者简介 (Biography): 王环君, 硕士, 医师, 主要从事糖尿病慢性并发症的研究, 现在长沙市第一医院工作; 王爱民为并列第一作者。

通信作者 (Corresponding author): 雷闽湘, Email: lmx618@medmail.com.cn

streptozocin (STZ, 30 mg/kg) was injected to induce diabetic model. The model group was then randomly divided into 2 subgroups: a sustained high blood glucose group and a fluctuation blood glucose group (animals in the latter group were subcutaneously injected with insulin twice daily). Rats were sacrificed after 3 months and kidney tissues were dissected for HE and PAS staining, Col IV immunohistochemistry and Western blot.

**Results:** Compared with the normal control group, the renal glomeruli and capillary basal membrane in the diabetic rats was getting larger and thicker, respectively; the capsular space and ground substance was extended and increased, respectively; the volume of renal tubule, kidney hypertrophy index, glomerular sclerosis index and Col IV content were all increased in the diabetic rats ( $P < 0.01$ ). Compared with the sustained high blood glucose group, the above mentioned pathological changes were more serious in the blood glucose fluctuation group.

**Conclusion:** The capillary basal membrane of kidney in diabetic rats is thicker and the ground substance is increased. The degree of glomerular sclerosis is more serious in the blood glucose fluctuation group compared with the sustained high blood glucose group, which is confirmed by the increased level of Col IV.

## KEY WORDS

blood glucose fluctuation; diabetic nephropathy; collagen IV

糖尿病的高血糖状态可以分为慢性持续性高血糖和慢性波动性高血糖两种<sup>[1]</sup>, 近年有相当多的流行病学资料<sup>[2]</sup>、临床试验或观察<sup>[3-5]</sup>、细胞水平研究<sup>[6-9]</sup>等相继表明糖尿病慢性并发症的发生发展不仅与整体血糖水平有关, 而且与血糖的波动性也密切相关, 肾是糖尿病慢性并发症最常累积的一个脏器。在本课题组的前期实验中发现波动性高糖较持续性高血糖对血管内皮细胞有更强的损伤效应<sup>[10]</sup>、更易促进人脐静脉内皮细胞的凋亡<sup>[11]</sup>, 而且相关临床资料分析也发现血糖波动能促进2型糖尿病患者糖尿病肾病的进展<sup>[12]</sup>。同时, 不少体外细胞实验<sup>[8-9]</sup>也发现波动性高血糖比持续性高血糖更易促进胶原蛋白等的合成, 有可能加重糖尿病肾病的发生发展, 但目前动物模型上血糖波动对肾的影响尚没有较多的研究。本课题组通过人为诱导糖尿病大鼠的血糖波动, 对血糖波动和持续性高血糖对糖尿病大鼠肾脏病理损伤之间的关系进行探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

链脲佐菌素(STZ)购自美国Sigma公司; 普通胰岛素购自江苏万邦生化医药; DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥技术有限公司; GAPDH抗体购自美国Sigma-Aldrich公司; IV型胶原(Col IV)兔多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的抗兔的二抗购自美国Abcam公司; SABC(兔IgG)免疫组织化学染

色试剂盒购自武汉博士德公司; 3K15低温离心机购自美国Sigma公司。

### 1.2 动物及分组

健康雄性Sprague Dawley(SD)大鼠60只, 6~8周龄, 体质量130~160(146.50±4.20) g, 购自中南大学动物学部。

将大鼠随机分为糖尿病组和正常组。糖尿病组喂以高糖高脂饲料, 6周后予以腹腔内注射小剂量STZ(30 mg/kg), 用柠檬酸缓冲液配置成1%的浓度。正常组喂以普通饲料, 6周后予同样标准腹腔注射柠檬酸缓冲液。连测两次随机血糖>16.7 mmol/L为造模成功。将糖尿病组大鼠再随机分为持续性高血糖组和血糖波动组, 继续喂以高糖高脂饲料。血糖波动组大鼠予以每日上午8点和下午3点皮下注射两次胰岛素人为诱导血糖波动, 胰岛素用量4~12 U, 根据血糖调整胰岛素用量, 波动3个月, 根据血糖波动图谱的制作, 血糖波动模型的制作是成功的<sup>[13]</sup>。

### 1.3 肾脏标本的采集

人为干预3个月处死各组大鼠。各组大鼠腹腔内注射10%的水合氯醛麻醉后称重。剖腹取出双肾, 称重。左肾称重后沿矢状面剖成两半, 其中一部分肾皮质用冰生理盐水原位灌流后迅速放入液氮中保存备用, 另一半用4%多聚甲醛固定24 h后, 常规脱水石蜡包埋, 制成5 mm切片, 行HE,

PAS染色和免疫组织化学检测。

#### 1.4 肾脏病理形态分析

取PAS染色标本, 每张切片在高倍显微镜下随机观察40个互不重复的肾小球, 对肾小球硬化程度进行半定量评分, 分为5级: 基本正常记为0级; 硬化面积比<25%记为1级; 硬化面积比26%~50%记为2级; 硬化面积比51%~75%记为3级; 硬化面积比76%~100%为4级。其计算公式为: 硬化指数=[(1×N<sub>1</sub>+2×N<sub>2</sub>+3×N<sub>3</sub>+4×N<sub>4</sub>)/每张切片肾小球总数]×100%<sup>[14]</sup>, N代表相应硬化面积级别的肾小球个数。每张切片都由2位观察者进行盲法评分, 取其平均值。

#### 1.5 肾组织Col IV免疫组织化学测定(SABC法)

石蜡切片常规脱蜡、透明、脱水后, 放入3%双氧水中浸泡10 min灭活内源性酶, TBS洗2次。在柠檬酸缓冲液中煮沸3 min行抗原修复。5%山羊血清37℃温箱中封闭30 min, TBS洗2次。滴加兔多克隆抗体(浓度1:200)37℃孵育2 h。TBS冲洗3次。滴加生物素化山羊抗兔IgG, 37℃孵育30 min。TBS冲洗, 行SABC染色、DAB显色, 再经分色、苏木素复染、二甲苯透明等, 于显微镜下观察。

#### 1.6 肾组织Col IV Western免疫印迹测定

取100 mg组织放入液氮中充分研磨、冰上裂解、离心, 提取上清液, 用BCA蛋白定量法测定蛋白浓度。配置8%的分离胶和5%的浓缩胶, 经上样、电泳、转膜等步骤后将蛋白转移至PVDF膜上。用含5%脱脂奶粉的TBST室温下封闭2 h。弃去封闭液, 将一抗(1:1000)加入塑料袋中, 4℃过夜。室温复温1 h。TBST洗膜3次。将膜转入新的塑料袋中, 用含0.5%脱脂奶粉的TBST稀释羊抗兔的二抗(1:20000), 37℃孵育1 h。ECL发光, 显影、定影, 再进行分析。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠一般情况

实验结束时可以发现糖尿病组大鼠存活率明显低于正常组, 体质量降低、饮水量增加、尿量增多、在血糖波动组中上述指标变化更为明显。

### 2.2 各组大鼠肾脏肥大指数及肾小球硬化指数的比较

与正常组比较, 波动组和持续组大鼠肾脏肥大

指数肾质量/体质量和肾小球硬化指数均有显著性增加( $P<0.01$ , 表1); 与持续组比较, 波动组大鼠肾脏肥大指数肾质量/体质量和肾小球硬化指数均有显著性增加( $P<0.05$ , 表1)。

表1 各组大鼠肾质量/体质量和肾小球硬化指数之间的比较 ( $n=10, \bar{x}\pm s$ )

Table 1 Comparison of kidney quality to body quality and glomerular sclerosis index of the 3 groups ( $n=10, \bar{x}\pm s$ )

组别	肾质量 / 体质量 (mg/g)	硬化指数 / %
正常组	2.93 ± 0.47	26.25 ± 12.20
持续组	5.60 ± 0.73**	120.00 ± 27.81**
波动组	7.17 ± 0.65**	173.25 ± 35.65**

与正常组比较, \*\* $P<0.01$ , 与持续组比较, \* $P<0.05$ 。

### 2.3 各组大鼠肾脏病理形态分析

#### 2.3.1 HE染色和PAS染色分析

光镜下(×400)可见正常组大鼠肾脏组织结构清晰, 肾小球大小、形态及肾小球囊腔间隙均正常。毛细血管祥形态规则, 毛细血管内皮细胞排列整齐、细胞核清晰, 基底膜厚度正常、均匀、光滑。系膜基质正常。肾小管形态、体积正常, 肾小管上皮细胞基底膜光滑、均匀。持续组大鼠肾脏组织结构较为清晰, 肾小球、肾小管体积增大, 肾小球球囊腔、肾小管管腔扩张。毛细血管扩张、内皮细胞基底膜和系膜基质增厚, 而且厚薄不一, 表面粗糙。部分肾小管管腔中有分泌物。血糖波动组大鼠肾脏组织结构严重变形。肾小球、肾小管体积明显增大, 形态不规则。肾小球球囊腔扩大。毛细血管管腔明显扩张, 毛细血管祥形态极不规则, 内皮细胞基底膜明显增厚、表面粗糙, 厚薄不一, 细胞核固缩。系膜基质明显增多呈絮状。肾小管体积明显扩大、管壁松散、部分小管上皮细胞浊肿、坏死、空泡样变性, 肾小球球囊腔及肾小管管腔内有大量管形蛋白。在PAS染色中上述变化更为明显(图1)。

#### 2.3.2 免疫组织化学检测Col IV

免疫组织化学发现大鼠的Col IV在肾脏组织中表达, 为棕黄色物质, 主要出现在肾小球毛细血管内皮细胞基底膜、系膜基质和肾小管上皮细胞基底膜中, 正常组中Col IV分布均匀光滑, 持续性高血糖组中Col IV分布厚薄不一, 且Col IV的表达增多。波动性高血糖组中表达更多、厚薄不一、表面粗糙, 部分呈现絮状、团块状(图2)。

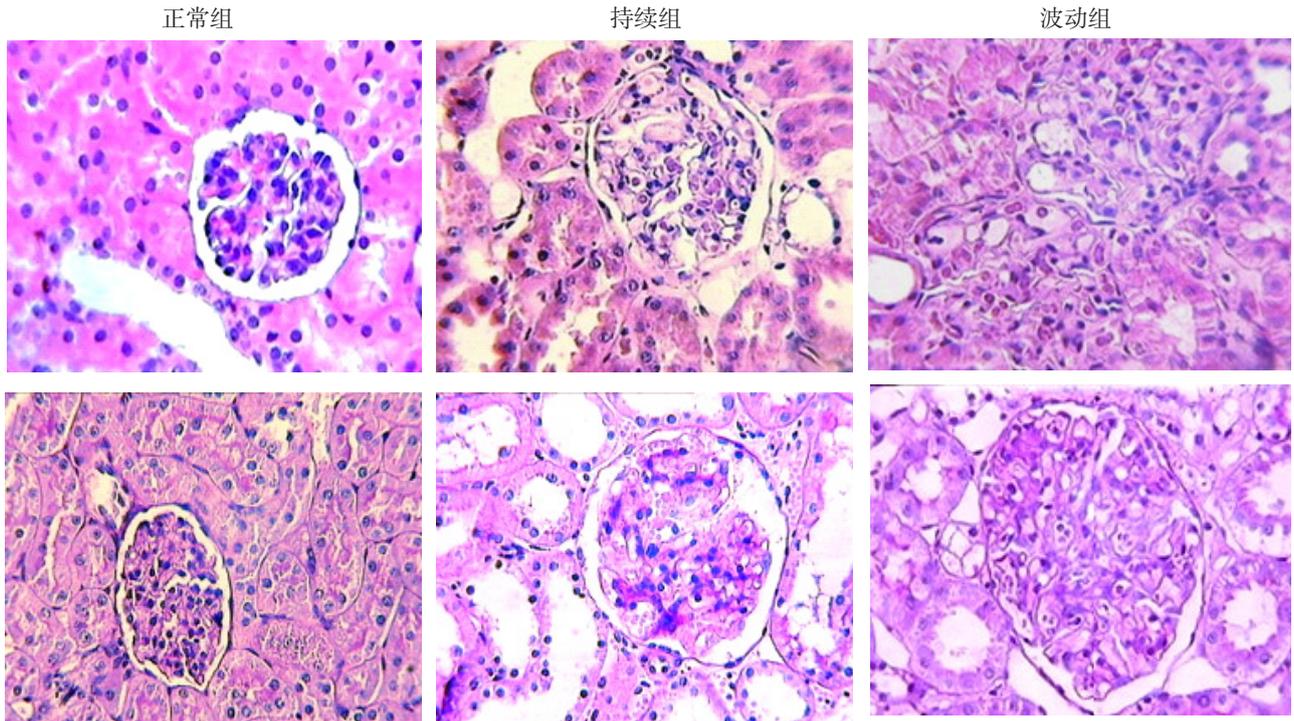


图1 各组大鼠肾组织HE染色(上排)和PAS染色(下排)( $\times 400$ )。

Figure 1 HE (above) and PAS (below) staining of renal tissues in the 3 groups ( $\times 400$ ).

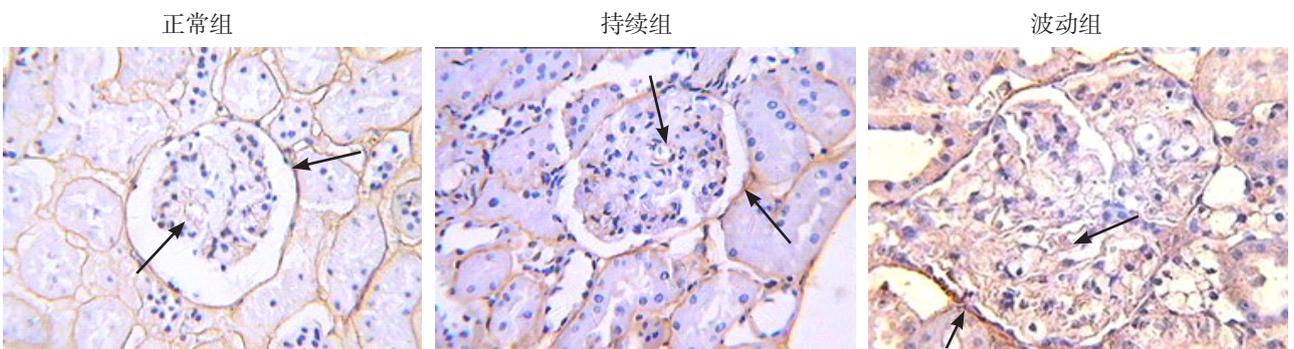


图2 各组大鼠Col IV免疫组织化学染色( $\times 400$ )。箭头示肾小球基底膜和基质中表达的Col IV。

Figure 2 Col IV immunohistochemistry in the 3 groups ( $\times 400$ ). Arrows show the expression of Col IV in glomerular capillary loops and basement membrane.

### 2.3.3 Western印迹测定Col IV的表达

与正常组比较, 糖尿病持续性高血糖组大鼠、波动性高血糖组的Col IV相对光密度值有显著升高( $0.66 \pm 0.12$  vs  $0.42 \pm 0.10$ ,  $0.87 \pm 0.08$  vs  $0.42 \pm 0.10$ ;  $P < 0.01$ )。与持续性高血糖组比较, 波动性高血糖组大鼠的Col IV相对光密度值显著升高( $P < 0.05$ )。Col IV在波动性高血糖组大鼠肾组织中的表达最高(图3)。

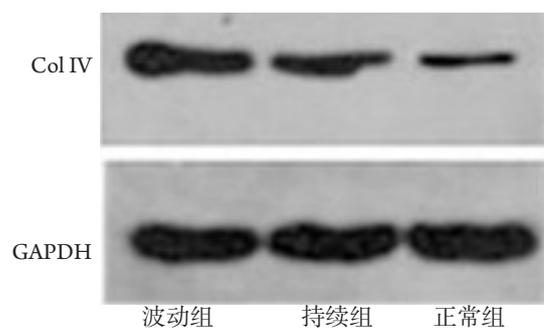


图3 各组大鼠Col IV表达的Western印迹电泳图。

Figure 3 Expression of Col IV in the 3 groups by Western blot.

### 3 讨论

在日常生活中, 由于饮食控制不佳造成的餐后高血糖、药物相对过量和治疗依从性差等导致的低血糖是造成糖尿病患者血糖波动的主要原因。本实验通过高糖高脂饮食造成餐后高血糖和注射胰岛素造成血糖下降这两种方法较好地模拟了糖尿病患者血糖的波动情况, 而且通过血糖波动谱等的分析, 证实糖尿病大鼠血糖波动的模型制作是比较成功的<sup>[13]</sup>。但由于在实验过程中部分大鼠出现了感染或其它并发症, 病情较重而导致死亡, 最终实验结束时正常组有大鼠20只, 持续性高血糖组17只, 血糖波动组仅12只, 样本量减少<sup>[13]</sup>; 且该实验耗时较长, 从饲养大鼠到本实验的完成达3年, 其中有技术的相对不成熟性及各组标本在提取、冷冻或转移等过程中受到不同程度的损耗, 导致在本部分实验开始时无法完整地收集到最终49只大鼠所有的肾脏标本, 而从各组中随机选取了10个肾脏样本进行分析, 样本量的减少导致各组数据可比性的意义减小, 但是实验结果与前期各种相关研究<sup>[12-13]</sup>及预期目的是相符的, 因此得出的结论有一定的可信度。

肾脏作为糖尿病慢性并发症中最常累及的一个器官在受到损害时, 主要表现为肾小球毛细血管基底膜和系膜区为主的细胞外基质的积聚, 进而导致弥漫性或结节性肾小球硬化, 出现蛋白尿, 最后发展为肾衰竭<sup>[15]</sup>。Col IV是一种结构蛋白, 在正常生理状态下能够维持组织的形态, 而病理状态下的增多则可以导致肾小球毛细血管基底膜等的增厚和系膜基质的积聚, 它在糖尿病肾病发病中早期以合成增加为主, 晚期则是降解减慢, 其已经成为评判肾小球硬化的一个比较重要的指标。本实验发现血糖波动组的大鼠肾小球体积增大, 纤维化更为明显, Col IV的表达量增加, 均提示血糖波动对糖尿病大鼠的肾损害更严重。2型糖尿病患者中波动性高血糖比持续性高血糖更易加重氧化应激的产生, 对内皮功能的影响很大<sup>[16]</sup>。血糖波动能使各种凋亡基因、黏附分子、细胞因子等的产生增多, 造成大血管、微小血管的内皮细胞损伤, 而氧化应激可能是餐后高血糖等诱发内皮细胞损伤的共同介质<sup>[17]</sup>。研究<sup>[18]</sup>发现波动性高血糖比持续性高血糖更容易导致促凋亡基因等的产生增多, 可能通过影响P13K/PKB/eNOS通路导致NO合成减少<sup>[10]</sup>。波动性高血糖较持续性高血糖更易促培养的人脐静脉内皮细胞的凋亡, 可能与氧化应激水平增高, 进而激活JNK信号转导途径有关<sup>[11]</sup>。Jones等<sup>[8]</sup>研究也发现相比持续性高血糖, 间歇性高糖可以明显促进肾小管间质细胞

胶原蛋白、转移生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ )以及血小板生长因子(PDGF)等细胞因子的产生等。葡萄糖浓度的急性升高可以通过活化动脉内皮细胞的核因子- $\kappa B$ 的P65亚单位, 进而诱导单核细胞趋化蛋白1和血管细胞黏附分子-1表达增加, 并且有后续效应, 从而推测急性血糖波动有持续的效应<sup>[19]</sup>。

因此, 对于糖尿病患者的血糖控制, 不仅要注重糖化血红蛋白的达标, 更要注重平稳地降低血糖, 避免血糖长期大幅度的波动, 尽可能减少因血糖波动诱发的氧化应激反应, 减少细胞因子、黏附分子、炎症因子等的产生, 减轻血管内皮细胞的损伤, 防治糖尿病肾病的发生发展。

### 参考文献

1. Del Prato S. In search of normoglycaemia in diabetes: controlling postprandial glucose[J]. *Int J Obes*, 2002, 26(3): 9-17.
2. The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial[J]. *Diabetes*, 1995, 44(8): 968-983.
3. Antonio C, Katherine E, Ludovica P, et al. Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients[J]. *Diabetes*, 2008, 57(5): 1349-1354.
4. Monnier L, Mas E, Ginet C, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes[J]. *JAMA*, 2006, 295(14): 1681-1687.
5. Hirsch IB. Glycemic variability: it's not just about A1C anymore[J]. *Diabetes Technol Ther*, 2005, 7(5): 780-783.
6. Risso A, Mercuri F, Quagliaro L, et al. Intermittent high glucose enhances apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in culture[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 281(5): 924-930.
7. Piconi L, Quagliaro L, Daros R, et al. Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and interleukin-6 expression in human umbilical endothelial cells in culture: the role of poly(ADP-ribose) polymerase[J]. *J Thromb Haemost*, 2004, 2(8): 1453-1459.
8. Jones SC, Saunders HJ, Qi W, et al. Intermittent high glucose enhances cell growth and collagen synthesis in cultured human tubulointerstitial cells[J]. *Diabetologia*, 1999, 42(9): 1113-1119.
9. Sun J, Xu Y, Deng H, et al. Involvement of osteopontin upregulation on mesangial cells growth and collagen synthesis induced by intermittent high glucose[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 109(6): 1210-1221.
10. 廖洁, 雷润湘, 陈雄, 等. 波动性高糖对人脐静脉内皮细胞中NO合成的影响及作用机制[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2010, 35(4): 295-300.
11. LIAO Jie, LEI Minxiang, CHEN Xiong, et al. Effect of intermittent high glucose on synthesis of nitric oxide in human umbilical vein endothelial cells and its mechanism[J]. *Journal of Central South University*.

- Medical Science, 2010, 35(4): 295-300.
11. 汤智敏, 雷闽湘. 波动性高糖诱导的内皮细胞凋亡与JNK信号转导途径[J]. 中南大学学报: 医学版, 2010, 35(6): 616-621.  
TANG Zhimin, LEI Minxiang. Involvement of JNK signal transduction pathway in endothelial cell apoptosis induced by intermittent high glucose[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2010, 35(6): 616-621.
  12. 余芳, 雷闽湘. 血糖波动对糖尿病肾病的影响[J]. 医学临床研究, 2009, 26(11): 2040-2042.  
YU Fang, LEI Minxiang. Effect of glucose variability on diabetic nephropathy[J]. Journal of Clinical Research, 2009, 26(11): 2040-2042.
  13. 廖洁, 雷闽湘, 胡维. 大鼠糖尿病血糖波动模型的建立[J]. 中国医师杂志, 2010, 12(2): 157-161.  
LIAO Jie, LEI Minxiang, HU Wei. Establishment of blood glucose fluctuation diabetic rats model[J]. Journal of Chinese Physician, 2010, 12(2): 157-161.
  14. Raji L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension and progressive glomerular damage in Dahl rats[J]. Kidney Int, 1984, 26(2): 137-143.
  15. Watanabe H, Stanada H, Shigetomi S, et al. Urinary excretion of type IV collagen as a specific indicator of the progression of diabetic nephropathy [J]. Nephrology, 2000, 86 (1): 27-35.
  16. Ceriello A, Esposito K, Piconi L, et al. Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients[J]. Diabetes, 2008, 57(5): 1349-1354.
  17. Ceriello A, Quagliaro L, Piconi L, et al. Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastatin treatment[J]. Diabetes, 2004, 53(3): 701-710.
  18. 金可可, 林艳红, 王万铁, 等. 血糖波动对糖尿病大鼠肾小球内皮细胞和肾小管上皮细胞凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(3): 570-573.  
JIN Keke, LIN Yanhong, WANG Wantie, et al. Effects of fluctuation high blood glucose on apoptosis in glomerular endothelial cells and renal tubular epithelial cells in diabetic rats[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2007, 23(3): 570-573.
  19. El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia[J]. J Exp Med, 2008, 205(10): 2409-2417.

(本文编辑 彭敏宁)

**本文引用:** 王环君, 王爱民, 雷闽湘, 廖洁, 胡维. 血糖波动与持续性高血糖对糖尿病大鼠肾脏病理改变及 IV 型胶原表达的影响 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2013, 38(8): 818-823. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.08.010

**Cite this article as:** WANG Huanjun, WANG Aimin, LEI Minxiang, LIAO Jie, HU Wei. Effect of blood glucose fluctuation and the sustained high blood glucose on renal pathological change and collagen IV expression in diabetic rats[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2013, 38(8): 818-823. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.08.010