

# 维甲酸受体介导全反式维甲酸对糖尿病肾病大鼠肾组织细胞增殖与凋亡的影响

王云 陈晓岚 陈旭 王娜 郭乃凤 范亚平

**【摘要】目的** 探讨维甲酸受体(RAR- $\alpha$ 、RAR- $\beta$ 、RAR- $\gamma$ )介导的全反式维甲酸(ATRA)对糖尿病肾病大鼠肾组织细胞增殖与凋亡的影响及机制。**方法** 健康雄性SD大鼠30只,随机选10只为空白对照组;链脲佐菌素(STZ)诱导糖尿病模型,造模成功后随机分为糖尿病模型组( $n=10$ )和 ATRA 组( $n=10$ )。于造模成功第2天起 ATRA 组大鼠给予 ATRA  $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃,对照组与糖尿病组均予等体积蒸馏水灌胃。于第8周及第12周观察生化指标及处死各组大鼠,取肾组织行HE染色观察肾脏病理变化;原位末端标记法(TUNEL法)检测各组肾组织细胞凋亡率;间接免疫荧光法检测各组肾组织中维甲酸受体 RAR- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  的表达情况;免疫组化法检测各组肾组织中增殖指标 I 型胶原(Col I),层粘连蛋白(LN)及凋亡相关因子 Smac、caspase-3 的蛋白表达。实时定量 PCR 法检测各组肾组织中 Smac、caspase-3 mRNA 的表达。**结果** 与对照组比较,糖尿病组大鼠 24 h 尿蛋白、Scr、BUN、肾质量/体质量比值均显著增加(均  $P < 0.05$ ),而 ATRA 组上述指标较糖尿病组减少(均  $P < 0.05$ )。ATRA 组病理改变较糖尿病组减轻。12 周时,与对照组比较,糖尿病组细胞凋亡率显著增加( $P < 0.01$ ), ATRA 组较糖尿病组减少( $P < 0.01$ )。间接免疫荧光结果显示,12 周时糖尿病组肾组织 RAR- $\alpha$ 、RAR- $\beta$  阳性细胞数显著少于对照组(均  $P < 0.05$ ),而 ATRA 组较糖尿病组显著增加(均  $P < 0.01$ );各组肾组织中均未见 RAR- $\gamma$  表达变化。免疫组化结果显示,12 周时糖尿病组肾组织肾小球系膜区中 Col I、LN、Smac、caspase-3 蛋白的表达显著高于对照组(均  $P < 0.01$ ), ATRA 组较糖尿病组显著减少(均  $P < 0.01$ )。实时定量 PCR 结果显示,与对照组比较,糖尿病组 Smac、caspase-3 mRNA 的表达均显著增多(均  $P < 0.01$ ),并随时间延长表达增强; ATRA 组较糖尿病组显著减少( $P < 0.01$ )。**结论** 全反式维甲酸可能通过其受体介导途径抑制糖尿病肾病肾组织细胞增殖及凋亡,对糖尿病肾病有保护作用。

**【关键词】** 糖尿病肾病; 细胞增殖; 细胞凋亡; 维甲酸受体; 维甲酸

**Influence of retinoic acid receptor-mediated all-trans retinoic acid on renal tissue cell proliferation and apoptosis in rats with diabetic nephropathy** WANG Yun, CHEN Xiao-lan, CHEN Xu, WANG Na, GUO Nai-feng, FAN Ya-ping. Department of Nephrology, the Affiliated Hospital, Nantong University, Jiangsu Nantong 226001, China  
Corresponding author: CHEN Xiao-lan, Email: chenxl8448@sina.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the influence of retinoic acid receptor (RAR- $\alpha$ , RAR- $\beta$  and RAR- $\gamma$ )-mediated all-trans retinoic acid (ATRA) on renal tissue cell proliferation and apoptosis in rats with diabetic nephropathy, and to analyze the possible mechanism. **Methods** Male SD rats were randomly divided into normal control group (group N,  $n=10$ ) and diabetic model

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2012.04.014

基金项目:江苏省自然科学基金(BK2008185)

作者单位:226001 江苏省南通市,南通大学附属医院肾内科(王云,现在江苏无锡市第九人民医院肾脏内科)

通信作者:陈晓岚,Email:chenxl8448@sina.com

group ( $n=20$ ). Diabetes was induced by streptozotocin(STZ) injection. After successful modeling, the model rats were randomly divided into diabetes group (group D,  $n=10$ ) and ATRA treatment group (group T,  $n=10$ ). Rats in group T received ATRA  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  by gavage from the 2nd day of successful modeling for 8 or 12 weeks, meanwhile group N and group D received same volume distilled water. In each group, 5 rats were sacrificed respectively at the 8th week or the 12th week, then biochemical markers were measured and kidney pathology was examined. Apoptosis index(AI) of renal tissue cells of each group was tested by TUNEL. The expressions of RAR- $\alpha$ , RAR- $\beta$  and RAR- $\gamma$  in renal tissues were tested using indirect immunofluorescence. The expressions of type I collagen and laminin as proliferation indicators, along with Smac and caspase-3 as the correlated factors of apoptosis in renal tissue of each group were tested by immunohistochemistry staining. The mRNA expressions of Smac and caspase-3 were tested using real-time fluorescence quantitative PCR.

**Results** Compared with group N, 24 h urine protein, serum creatinine, blood urea nitrogen, ratio of kidney weight/body weight increased significantly ( $P<0.05$ , respectively) in group D, and further increased with observation time. Compared with the group D, 24 h urine protein and ratio of kidney weight/body weight decreased in group T ( $P<0.05$ , respectively). Compared with group D, the group T presented minor pathological changes. TUNEL assay indicated that compared with group N, the group D showed an obvious increase in renal cell apoptosis in time-dependent manner, and the group T showed a decrease compared with the group D ( $P<0.01$ , respectively). Compared with group N, the expression of RAR- $\alpha$  and RAR- $\beta$  positive cells number in group D were decreased ( $P<0.01$ , respectively). Compared with group D, the expression of RAR- $\alpha$  and RAR- $\beta$  positive cells number in group T increased ( $P<0.01$ , respectively). Renal tissues of each group did not show expressions of RAR- $\gamma$ . After 12 weeks, compared with group N, expressions of type-I collagen, laminin, Smac and caspase-3 protein in the glomerular mesangial area and basement membrane of renal tissues in group D increased significantly ( $P<0.01$ , respectively), and enhanced with time. Compared with the group D, expressions of type I collagen, laminin, Smac and caspase-3 protein in group T decreased ( $P<0.01$ , respectively). Compared with the group N, group D had an obvious increase in the mRNA expressions of Smac and caspase-3, and a significantly decrease in group T ( $P<0.01$ , respectively).

**Conclusions** ATRA may prevent the cell proliferation and apoptosis in diabetic renal tissue through its receptor-mediated pathway, and may protect rats against diabetic nephropathy.

**【Key words】** Diabetic nephropathies; Cell proliferation; Apoptosis; Retinoic acid, receptor; Retinoic acid

糖尿病肾病(DN)是糖尿病最常见的严重微血管并发症之一,也是导致终末期肾衰竭的主要原因。DN的发病机制尚未完全阐明,目前研究认为主要与遗传易感性、蛋白核酸的非酶糖基化、脂质过氧化、细胞凋亡及激肽系统激活有关。有证据表明细胞凋亡参与多种肾脏疾病的发生、发展过程<sup>[1]</sup>。随着对细胞凋亡的基因调控、信号转导及其与疾病关系的深入研究,证实细胞凋亡参与了DN的发生<sup>[2]</sup>。

维甲酸具有激素样作用方式,其进入细胞后,由细胞内维甲酸结合蛋白(CRABP)运送至细胞核,结合并活化核受体。维甲酸受体为核受体的亚家族,即维甲酸受体(RAR)和维甲酸X受体

(RXR),每一亚家族又有3种亚型 RAR- $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$ 。当前,研究显示全反式维甲酸(ATRA)具有良好的抗纤维化和抗增殖作用<sup>[3-4]</sup>。但由 RAR 介导的 ATRA 对细胞凋亡的影响报道较少。本研究观察不同时间 RAR- $\alpha$ 、RAR- $\beta$ 、RAR- $\gamma$  在大鼠肾组织中的表达情况,探讨 ATRA 通过其受体途径对 DN 大鼠肾组织细胞增殖、凋亡的影响及机制,为 DN 发病机制的研究及治疗提供理论依据。

## 材料和方法

1. 材料、试剂与仪器:健康成年雄性 SD 大鼠(180~200 g,由南通大学实验动物中心提供),

罗氏血糖仪(德国罗氏),链脲菌素(STZ,美国 Sigma),全反式维甲酸(山东良福),TUNEL 凋亡试剂盒(美国 Promega),兔抗 RAR- $\alpha$  抗体、兔抗 RAR- $\beta$  抗体、兔抗 RAR- $\gamma$  抗体、兔抗 caspase-3 抗体(美国 R&D),羊抗 Smac 抗体、羊抗 I 型胶原(Col I)抗体、羊抗层粘连蛋白(LN)抗体(美国 Santa Cruz),二抗 FITC 标记山羊抗兔 IgG(H+L)(江苏碧云天),山羊超敏第二步法检测试剂盒(PV-9003)、辣根酶标记抗山羊 IgG 多聚体、山羊抗兔、抗小鼠 IgG 多聚体(PV-9000)、DAB 显色试剂盒(北京中杉),Smac、caspase-3、GAPDH 基因引物合成(上海生工),RNAiso 总 RNA 提取试剂盒、反转录酶(PrimeScript<sup>®</sup> Reverse Transcriptase)、实时定量 PCR 试剂盒(SYBR<sup>®</sup> PrimeScript<sup>™</sup> RT-PCR Kit)(日本 TaKaRa),ABI 7500 实时定量 PCR 扩增仪(美国应用生物),荧光显微镜(日本奥林巴斯 BX51)。

2. 实验动物及分组:将 30 只 SD 雄性大鼠随机分入对照组(N 组)10 只,余 20 只用于造模。普通饮食 1 周后,于造模前 1 d 收集大鼠 24 h 尿液检测 24 h 尿蛋白量,尾静脉取血 3 ml 测 Scr、BUN。造模大鼠空腹(禁食 12 h),以 STZ 按 60 mg/kg 予一次性腹腔注射。对照组给予相应部位注射等量的枸橼酸缓冲液。造模成功后,将糖尿病大鼠随机分为糖尿病组(D 组, $n=10$ )和 ATRA 组(T 组, $n=10$ )。于造模成功第 2 天起 ATRA 组大鼠给予 ATRA 10 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>灌胃。糖尿病组与对照组均予等体积蒸馏水灌胃。分别于 8 周及 12 周测定 24 h 尿蛋白、血清 Scr、BUN。于 8 周及 12 周大鼠称质量后各组处死 5 只并取出右侧肾脏,去除被膜后称肾质量,得肾质量指数(KWI)。部分肾组织快速冰冻切片(5  $\mu$ m)后冰冻保存,部分组织用 4%多聚甲醛固定,制石蜡切片厚 2  $\mu$ m,待行免疫荧光、免疫组化和原位凋亡检测,剩余组织置于低温冰箱保存备用以提取 RNA 行实时定量 PCR 检测。

3. TUNEL 法检测凋亡细胞:从冰箱中取出冰冻切片,室温晾干,按凋亡试剂盒说明进行操作。阴性对照的切片不加 rTdT 酶,阳性对照切片滴加 100  $\mu$ l 5.5~10 U/ml DNase I 室温作用 10 min。碘化丙啶避光染色后荧光显微镜观察,细胞核中有绿色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞。每张切片取连续不重叠的 10 个视野( $\times 200$ )下计数

50 个肾小球的阳性细胞数。肾小球的凋亡指数(AI)用平均单个肾小球切面的阳性细胞数作为比较指标。

4. 免疫荧光检测肾组织中 RAR- $\alpha$ 、RAR- $\beta$ 、RAR- $\gamma$  的表达:冰冻切片室温晾干,PBS 洗涤,0.5%Triton X-100 室温处理后加入正常羊血清封闭,加一抗(RAR- $\alpha$  1:200、RAR- $\beta$  1:200、RAR- $\gamma$  1:200)孵育过夜。加入 FITC 标记的山羊抗兔抗体,碘化丙啶避光染色后 PBS 洗涤封片,荧光显微镜观察,拍片。免疫荧光结果应用病理图文分析系统测定每个肾小球视野内阳性胞核细胞数与所有肾小球细胞数之比,每组取 5 个标本,每个标本切片取 5 个完整的肾小球进行分析,阳性细胞表达率用平均单个肾小球切面的阳性细胞数作为比较指标。

5. 免疫组化检测肾组织中 Col I、LN、Smac、caspase-3 的表达:5  $\mu$ m 冰冻切片晾干,95%乙醇固定,PBS 洗涤后用柠檬酸盐缓冲液热诱导修复 20 min,0.3% $H_2O_2$  孵育 20 min,正常羊血清室温孵育 30 min,加相应一抗(羊抗 Col I 抗体、羊抗 LN 抗体、羊抗 Smac 抗体、兔抗 caspase-3 抗体均 1:50),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗 3 min,共 3 次,加相应的二抗(辣根酶标记抗山羊 IgG,山羊抗兔、抗小鼠 IgG),37 $^{\circ}$ C 30 min。PBS 洗 3 min,共 3 次,DAB 显色,苏木素复染,树脂封片。显微镜下观察,核呈紫蓝色,阳性呈棕黄色。免疫组化结果应用病理图文分析系统,以积分吸光度(A)表示其表达强度。每组取 5 个标本,每个标本切片取 5 个完整的肾小球进行分析。

6. 实时定量 PCR:按 RNAiso 试剂盒说明书提取总 RNA,反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,按照 SYBR<sup>®</sup> PrimeScript<sup>™</sup> RT-PCR Kit II 试剂盒说明操作。引物由上海生工合成,Smac 引物序列:上游 5'-GACAGCAGTCAGCCTTTCAGA-3',下游 5'-TGATTCCTGGCGGTTATAGAG3',片段长度 84 bp;caspase-3 引物序列上游 5'-GAGCTGGACT GCGGTATTGAG-3',下游 5'-GAACCATGACCCGT CCCTTG-3',片段长度 147 bp;内参 GAPDH 引物序列:上游 5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3',下游 5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3',片段长度 207 bp。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 34 s,循环 40 次。用 ABI 7500 Real-Time PCR 仪分析 Smac 和 caspase-3 基因在各组的表达

情况。每个循环结束时实时测定荧光值,全部循环结束时测量熔解曲线。用 ABI 7500 2.0.4 软件测定每个样品的 Ct 值,用相对定量法分析基因表达水平。

7. 统计学分析: 计量资料数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,所有数据进行方差齐性检验后进行单因素方差分析。用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。

### 结 果

1. DN 动物模型建立后一般情况: 与对照组比较, 糖尿病组及 ATRA 组的大鼠肾质量指数、24 h 尿白蛋白量、BUN、Scr 均增加, 但 ATRA 组上述指标较糖尿病组有所改善, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。肾脏病理 HE 染色显示, 对照组大鼠肾小球形态基本正常; 糖尿病组大鼠肾小球系膜区增宽明显, 毛细血管腔狭窄、闭塞, 系膜增生, 基质沉积, 且随病程延长, 呈加重趋势; ATRA 组大鼠病理改变较糖尿病组减轻。见表 1, 图 1。

2. 各组肾组织细胞凋亡情况: 组织内所有细胞予碘化丙啶染色呈红色, 细胞核中有绿色信号者为凋亡细胞, 主要表达于肾小球中, 肾小管与肾间质细胞亦可见少许表达, 对照组表达极少, 糖尿病组荧光强度显著高于对照组, 且随病程延长呈增多趋势; ATRA 组较糖尿病组显著减少, 差异有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ), 见表 2, 图 2。

3. 各组肾组织中 RAR- $\alpha$ 、RAR- $\beta$ 、RAR- $\gamma$  的

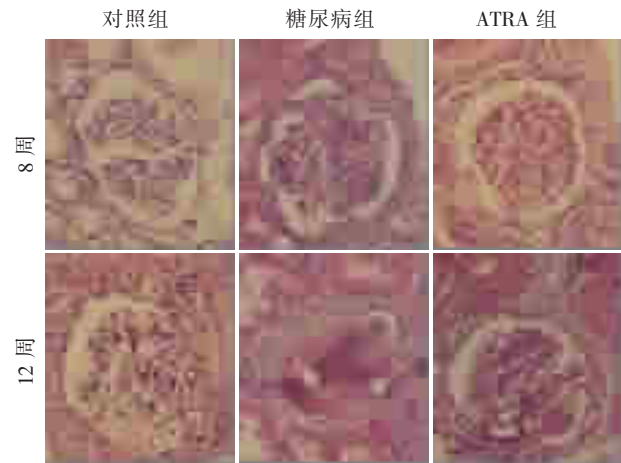


图 1 各组大鼠肾组织不同时间点病理改变 (HE  $\times 400$ )

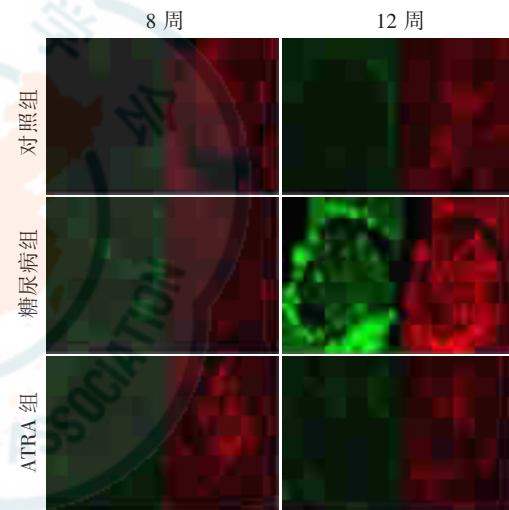


图 2 各组大鼠 8 周、12 周时肾组织细胞的凋亡 (TUNEL  $\times 200$ )

表 1 各组大鼠不同时间点生化指标变化 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	8 周				12 周			
	24 h 尿蛋白量(mg)	BUN (mmol/L)	Scr ( $\mu\text{mol/L}$ )	肾质量指数 (%)	24 h 尿蛋白量(mg)	BUN (mmol/L)	Scr ( $\mu\text{mol/L}$ )	肾质量指数 (%)
对照组	4.66 $\pm$ 0.59	6.48 $\pm$ 0.77	61.03 $\pm$ 2.16	0.35 $\pm$ 0.02	6.34 $\pm$ 0.51	8.23 $\pm$ 0.93	61.07 $\pm$ 1.69	0.34 $\pm$ 0.01
糖尿病组	11.26 $\pm$ 1.19 <sup>a</sup>	14.76 $\pm$ 2.51 <sup>a</sup>	76.30 $\pm$ 4.34 <sup>a</sup>	0.71 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	17.56 $\pm$ 0.97 <sup>ac</sup>	17.61 $\pm$ 1.38 <sup>ac</sup>	82.50 $\pm$ 2.38 <sup>ac</sup>	0.76 $\pm$ 0.05 <sup>ac</sup>
ATRA 组	7.82 $\pm$ 0.85 <sup>ab</sup>	10.66 $\pm$ 2.46 <sup>ab</sup>	68.55 $\pm$ 3.38 <sup>ab</sup>	0.59 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	12.06 $\pm$ 0.72 <sup>abc</sup>	13.63 $\pm$ 1.13 <sup>abc</sup>	72.49 $\pm$ 1.82 <sup>abc</sup>	0.51 $\pm$ 0.10 <sup>abc</sup>

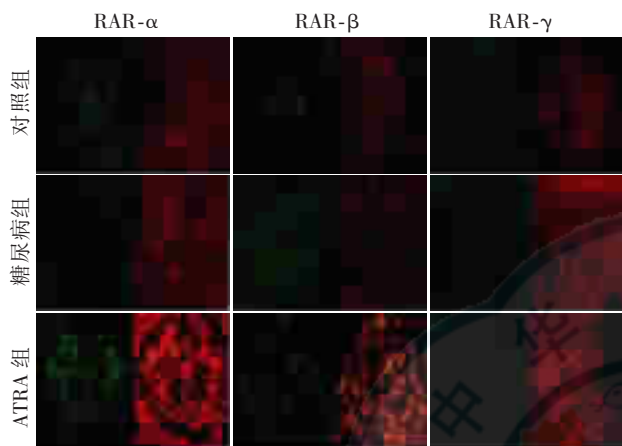
注: 与同时时间点对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与同时时间点糖尿病组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与同组内 8 周时比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

表 2 各组大鼠不同时间点肾组织中凋亡指数 (AI) 及 RAR- $\alpha$ 、RAR- $\beta$  阳性细胞数 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	8 周			12 周		
	AI	RAR- $\alpha$	RAR- $\beta$	AI	RAR- $\alpha$	RAR- $\beta$
对照组	0.11 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.03
糖尿病组	0.42 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.03 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.82 $\pm$ 0.08 <sup>ac</sup>	0.05 $\pm$ 0.02 <sup>ac</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>ac</sup>
ATRA 组	0.23 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	0.68 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	0.56 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	0.47 $\pm$ 0.06 <sup>abc</sup>	0.63 $\pm$ 0.09 <sup>abc</sup>	0.61 $\pm$ 0.06 <sup>abc</sup>

注: 与同时时间点对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与同时时间点糖尿病组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与同组内 8 周时比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$

表达情况: 免疫荧光显示, RAR- $\alpha$ 、RAR- $\beta$  在对照组肾小球中有少量表达, 呈核表达形式, ATRA 组阳性细胞表达量较对照组显著增多, 糖尿病组表达极少, 不同时间点各组肾组织中均未见 RAR- $\gamma$  表达, 见表 2, 图 3。



注: 绿色: 阳性细胞; 红色: 碘化丙啶染色的细胞核

图 3 12 周时各组大鼠肾组织中 RAR- $\alpha$ 、RAR- $\beta$ 、RAR- $\gamma$  的表达(免疫荧光  $\times 200$ )

4. 各组肾组织中 Col I、LN、Smac、caspase-3 蛋白的表达: 免疫组化结果显示, Col I、LN 蛋白在各组大鼠肾组织肾小球系膜区、基底膜、肾小管上皮及肾间质中均有表达, 在对照组有少量表达, 糖尿病组表达明显高于对照组, 且随病程延长呈增多趋势; ATRA 组较糖尿病组表达下降 ( $P < 0.01$ )。Smac、caspase-3 主要表达于肾小球系膜区及基底膜, 肾小管上皮可见少量表达, 肾间质偶见。在各时间点对对照组表达量极少, 糖尿病组表达显著高于对照组, 且随病程延长呈增多趋势; ATRA 组较糖尿病组表达下降 (均  $P < 0.01$ )。见图 4。

5. 各组肾组织中 Col II、LN、Smac、caspase-3 mRNA 的表达: 实时定量 PCR 结果显示, 与对照组比较, 糖尿病组、ATRA 组 Smac、caspase-3 mRNA 表达显著上调, 但 ATRA 组较糖尿病组减少, 差异有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 见图 5。

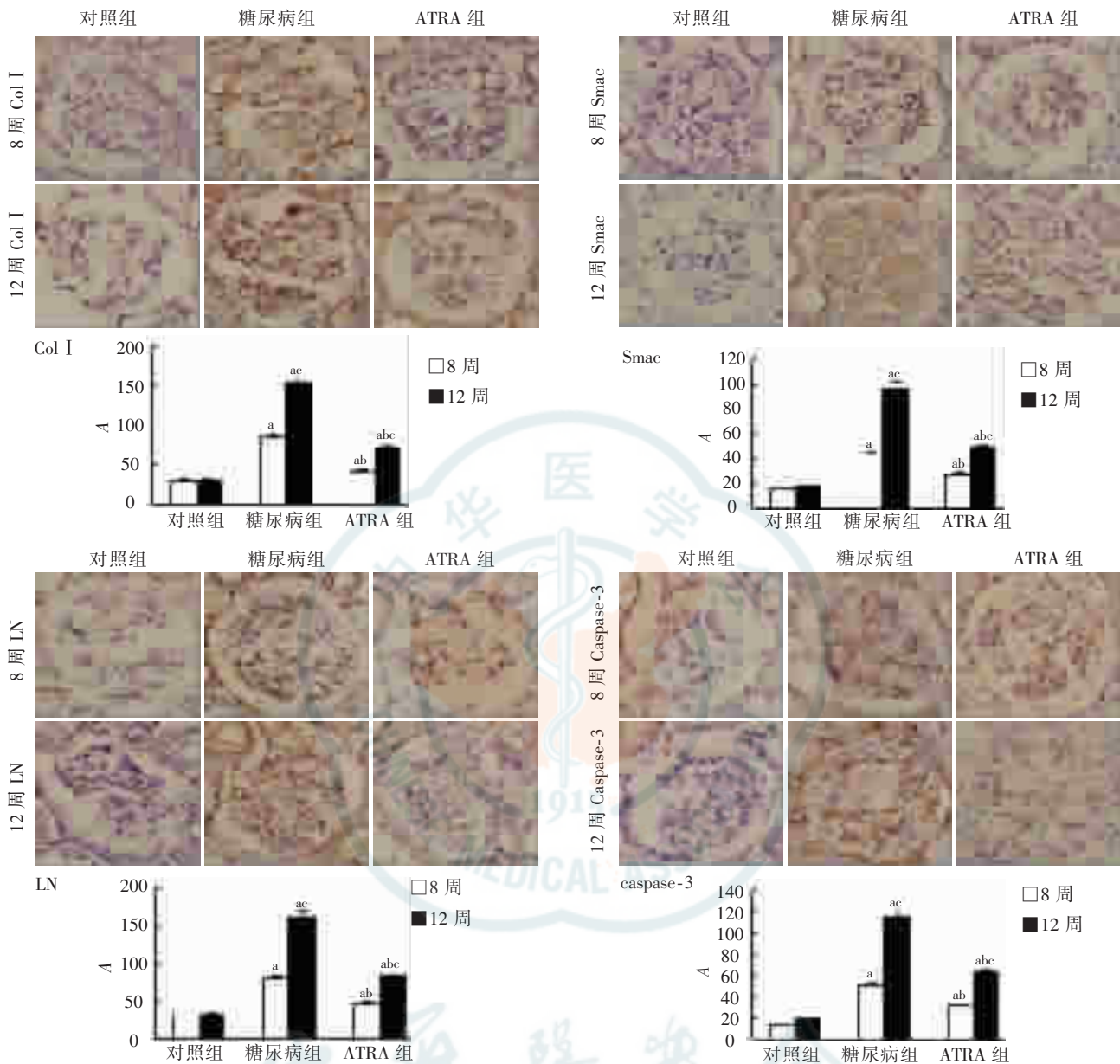
### 讨 论

DN 是糖尿病重要的微血管并发症, 其基本病理改变包括肾小球肥大、细胞外基质增多和肾小球硬化。本研究观察了造模成功后 8 周及 12

周大鼠, 发现 BUN、Scr、24 h 尿蛋白、肾质量/体质量比值较对照组大鼠均显著增加。第 8 周末光镜下肾组织细胞外基质增多, 肾小球系膜区呈弥漫性增宽, 毛细血管部分塌陷等, 免疫组化显示 Col I 和 LN 的表达明显增加, 且随病程时间延长, 呈加重趋势, 并可见硬化的肾小球, 符合 DN 的表现, 提示肾小球细胞的增殖与肾小球的硬化是密切关联的病理过程。

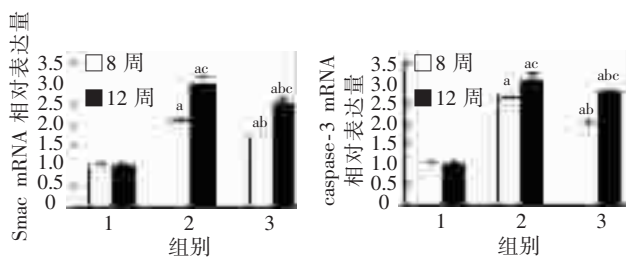
细胞凋亡或程序性细胞死亡对于维持机体稳定具有重要作用。细胞凋亡还参与人类多种疾病的发生、发展过程。通过对凋亡机制的深入研究发现, 线粒体在凋亡过程中发挥了重要作用。其中线粒体释放蛋白 Smac-DIABLO 蛋白可以通过激活 caspase 通路导致细胞凋亡, 或直接作用于细胞核引起细胞凋亡。Smac 是 caspase 活化的关键调节因子。Smac 在正常细胞不诱发凋亡, 只在受损的细胞中起作用, 而损伤细胞的清除也通过凋亡的形式实现<sup>[5]</sup>。本研究通过 TUNEL 方法检测, 发现糖尿病大鼠肾小球中有明显的绿色荧光标记的凋亡细胞, 且随时间延长呈增多趋势, 提示细胞凋亡与 DN 的发生、发展有关。近年来许多研究发现, 细胞凋亡参与了 DN 发生的整个过程, 在 DN 发展过程中, 细胞外基质增多, 肾小球硬化和肾小管萎缩, 肾脏实质细胞逐渐减少, 这一细胞减少过程可能与细胞凋亡相关。我们的结果与文献报道一致<sup>[6-8]</sup>。免疫组化结果显示, 糖尿病组肾组织中 Smac 与 caspase-3 的蛋白表达较对照组明显升高, 且随时间延长表达呈增加趋势。实时定量 PCR 结果显示糖尿病组肾组织中凋亡蛋白 Smac 与 caspase-3 mRNA 的表达量较对照组明显升高, 且随时间延长呈增加趋势, 与免疫组化结果一致, 以上结果表明 Smac 的释放促进了 caspase-3 的活化继而导致了凋亡的发生, 提示 DN 导致肾组织细胞损伤, 从而引起 Smac 从线粒体中释放, 参与凋亡调节。

ATRA 在细胞增殖、凋亡、分化、生殖、维持细胞正常功能等方面发挥重要作用。有研究显示 ATRA 在肾脏病的动物模型中显示出良好的肾脏保护和免疫调节作用<sup>[9]</sup>。我们既往研究了 ATRA 对 TGF- $\beta$  诱导的肾小球系膜细胞 COX-2、CTGF 的表达及 Smad 信号通路的影响, 结果显示 ATRA 具有良好的抗纤维化和抗增殖作用<sup>[9-10]</sup>。本研究



注:与同时时间点对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与同时时间点糖尿病组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与同组内8周比较,<sup>c</sup> $P < 0.01$

图4 各组大鼠肾组织中各指标在不同时间点的表达(免疫组化  $\times 200$ )



注:1:对照组;2:糖尿病组;3:ATRA组;与同时时间点对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与同时时间点糖尿病组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与同组内8周比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

图5 各组大鼠不同时间点肾组织中 Smac 和 caspase-3 的 mRNA 表达(实时定量 PCR)

结果发现 ATRA 能减少糖尿病大鼠的尿蛋白量、血 BUN、Scr 及肾质量/体质量比值水平,能减轻肾脏病理改变及减少肾组织 Coll 和 LN 表达,提示 ATRA 能减轻细胞增殖等改变,有效缓解糖尿病大鼠早期肾损害。此外,细胞凋亡结果显示 ATRA 组肾组织中细胞凋亡数较糖尿病组明显减少;实时定量 PCR 和免疫组化结果示 ATRA 组肾组织中凋亡蛋白 Smac 及 caspase-3 的表达量较糖尿病组明显下降,证实 ATRA 对 DN 的肾组织细胞凋亡有抑制作用,考虑可能 ATRA 对多种生长因子、细胞因子、激酶等有直接或间接的调控,

减轻肾组织细胞的损伤,从而减少 Smac 从线粒体中释放,抑制了 caspase-3 的活化,抑制细胞凋亡。

维甲酸通过其受体介导发挥作用,RAR- $\alpha$ 、- $\beta$ 、- $\gamma$  在不同组织表达不同,RAR- $\alpha$  在成年组织广泛的表达,RAR- $\gamma$  主要表达于皮肤组织,RAR- $\beta$  主要表达于上皮细胞。RAR 可以与核受体家族的其它成员形成二聚体,包括维生素 D 受体和过氧化物酶体增殖子活性受体。这会有效的导致激素信号系统的交叉对话。另外,RAR 可以通过与其他的转录因子如 AP-1 和核因子 NF- $\kappa$ B 相作用来调节基因转录。通过这种途径,维甲酸可以参与多种信号级联放大系统并控制细胞的应答<sup>[11-12]</sup>。本研究通过免疫荧光观察 RAR- $\alpha$ 、RAR- $\beta$ 、RAR- $\gamma$  在 3 组大鼠肾组织中的表达情况,对照组肾小球中 RAR- $\alpha$ 、RAR- $\beta$  有少量表达,糖尿病组表达缺失,提示 RAR- $\alpha$ 、RAR- $\beta$  的缺失可能参与了 DN 的发生。ATRA 组 RAR- $\alpha$ 、RAR- $\beta$  表达较正常组明显增强,提示全 ATRA 通过诱导 RAR- $\alpha$ 、RAR- $\beta$  的表达而发挥其生物学活性,ATRA 抑制 DN 肾组织细胞增殖与凋亡需要 RAR- $\alpha$  和 RAR- $\beta$  的参与。而 RAR- $\gamma$  在 3 组动物模型的不同时间点均未有表达,这与文献报道一致<sup>[13-15]</sup>。

综上所述,全反式维甲酸抑制了大鼠 DN 肾组织细胞的增殖与凋亡,对 DN 有保护作用,而这一作用途径可能通过其受体 RAR- $\alpha$  和 RAR- $\beta$  的介导而实现。

#### 参 考 文 献

- [1] Marshall SM. Recent advances in diabetic nephropathy. *Postgrad Med J*, 2004, 80: 624-633.
- [2] Hughes J, Savill JS. Apoptosis in glomerulonephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2005, 14: 389-395.
- [3] Xu Q, Lucio-Cazana J, Kitamura M, et al. Retinoids in nephrology: promises and pitfalls. *Kidney Int*, 2004, 66: 2119-2131.
- [4] Kinoshita K, Yoo BS, Nozaki Y, et al. Retinoic acid reduces autoimmune renal injury and increases survival in NZB/W F1 mice. *J Immunol*, 2003, 170: 5793-5798.
- [5] Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 2000, 102: 43-53.
- [6] Mishra R, Emancipator SN, Kern T, et al. High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells. *Kidney Int*, 2005, 67: 82-93.
- [7] Susztak K, Raff AC, Schiffer M, et al. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes*, 2006, 55: 225-233.
- [8] Kumar D, Zimpelmann J, Robertson S, et al. Tubular and interstitial cell apoptosis in the streptozotocin-diabetic rat kidney. *Nephron Exp Nephrol*, 2004, 96: e77-e88.
- [9] 陈晓岚,李辉,曹英杰,等.全反式维甲酸对转化生长因子 $\beta$ 1 诱导肾小球系膜细胞环氧化酶 2 表达及 Smad 信号通路的影响. *中华肾脏病杂志*, 2010, 26: 470-471.
- [10] Schaier M, Liebler S, Schade K, et al. Retinoic acid receptor alpha and retinoid X receptor specific agonists reduce renal injury in established chronic glomerulonephritis of the rat. *J Mol Med (Berl)*, 2004, 82: 116-125.
- [11] Okuno M, Kojima S, Matsushima-Nishiwaki R, et al. Retinoids in cancer chemoprevention. *Curr Cancer Drug Targets*, 2004, 4: 285-298.
- [12] Kojima S, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, et al. Acyclic retinoid in the chemoprevention of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*, 2004, 24: 797-805.
- [13] Mojsin M, Grujicic NK, Nikcevic G, et al. Mapping of the RXR alpha binding elements involved in retinoic acid induced transcriptional activation of the human SOX3 gene. *Neurosci Res*, 2006, 56: 409-418.
- [14] Lehrke I, Schaier M, Schade K, et al. Retinoid receptor-specific agonists alleviate experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 282: F741-F751.
- [15] Wagner J. Nuclear (receptor) power: retinoids in rat mesangioproliferative disease. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17 Suppl 9: 81-83.

(收稿日期:2011-08-17)

(本文编辑:王欣)