

· 实验研究 ·

GSK-3 β 抑制剂通过 wnt/ β -catenin 调控 OPG 在 DKD 大鼠肾组织中作用*

周谊霞, 杨文晴, 李龙, 于燕妮, 夏菁

【摘要】目的 探讨糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)对糖尿病肾病(DKD)大鼠肾组织中骨保护素(OPG)相关通路的调控作用及意义。**方法** 将大鼠随机分为对照组、模型组和氯化锂干预组。考马斯亮蓝法检测大鼠24h尿蛋白;肾脏组织切片进行苏木素-伊红染色,观察大鼠肾脏病理改变;RT-qPCR及免疫组化检测各组大鼠肾组织中 β -catenin和OPG的mRNA及蛋白表达。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠血糖水平[(22.63 \pm 2.08)mmol/L]及24h蛋白尿[(154.17 \pm 20.65)g]明显升高,肾脏组织病理变化明显;与模型组比较,氯化锂干预组大鼠血糖水平[(17.98 \pm 1.09)mmol/L]及24h蛋白尿[(107.2 \pm 31.15)g]明显降低,大鼠肾脏组织病理改变减轻;与对照组比较,模型组、氯化锂干预组大鼠肾细胞胞浆内 β -catenin表达量[分别为(2.2 \pm 0.31)、(2.0 \pm 0.20)]明显升高(P <0.05);与对照组比较,模型组大鼠肾组织中OPG/RANKL mRNA表达量(0.6 \pm 0.06)降低;与模型组比较,氯化锂干预组大鼠肾组织中OPG/RANKL mRNA表达量(1.6 \pm 0.12)明显升高,差异有统计学意义(P <0.05)。**结论** 氯化锂可减轻大鼠糖尿病肾病改变,缓解糖尿病肾病进程,其机制可能与调控Wnt/ β -catenin信号通路,升高OPG表达有关。

【关键词】 糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β);氯化锂;糖尿病肾病(DKD);骨保护素(OPG);wnt/ β -catenin;信号通路
中图分类号:R 692 文献标志码:A 文章编号:1001-0580(2019)06-0738-04 DOI:10.11847/zgggws1118646

Regulation effect of glycogen synthase kinase-3 β inhibitor on osteoprotegerin-related wnt/ β -catenin signal pathway in renal tissue of rats with diabetic kidney disease

ZHOU Yi-xia, YANG Wen-qing, LI Long, et al (Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province 550004, China)

【Abstract】Objective To explore the effect and significance of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) in the regulation of osteoprotegerin-related signal pathway in renal tissue of rats with diabetic kidney disease (DKD). **Methods** Forty-five Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into a normal control group (NC), a DKD model group and a GSK-3 β inhibitor (lithium chloride, LiCl) treatment group. For all the rats, 24-hour urine protein was determined with coomassie brilliant blue method. Kidney tissue sections were stained by hematoxylin-eosin for observing pathological changes in the renal tissues. The protein and mRNA expression of β -catenin and osteoprotegerin (OPG) in renal tissues were detected with reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) and immunohistochemistry method. **Results** Compared with those in the NC group, significantly increased blood glucose (22.63 \pm 2.08 mmol/L), 24-hour protein urine (154.17 \pm 20.65 g), and obvious pathological changes in renal tissues were observed in the DKD model group. In comparison to those of the DKD model group, the blood glucose (17.98 \pm 1.09 mmol/L) and 24-hour protein urine (107.2 \pm 31.15 g) decreased significantly and pathological changes in renal tissues alleviated in LiCl treatment group. Compared to those of the NC group, the expression of β -catenin in the rats' renal cell cytoplasm (2.2 \pm 0.31) of model group and LiCl treatment group (2.0 \pm 0.20) were significantly higher (both P < 0.05). Compared with that of NC group, the expression of OPG/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) mRNA (0.6 \pm 0.06) in rats' renal tissues of model group was decreased; whereas, the expression of OPG/RANKL mRNA (1.6 \pm 0.12) in the rats' renal tissues of the LiCl treatment group increased significantly compared to that of the DKD model group (P < 0.05). **Conclusion** LiCl could reduce renal pathological changes and alleviate the progression of diabetic kidney disease in rats; the mechanism of the effects may be related to the regulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway and the increase of OPG expression.

【Key words】 glycogen synthase kinase-3 β ; lithium chloride; diabetic kidney disease; osteoprotegerin; wnt/ β -catenin; signal pathway

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)引起的严重并发症,也是糖尿病致残和死亡重要原因,发病机制比较复杂^[1-2],至今仍未完全阐明,遗传因素、糖代谢紊乱、血流动力学改变、氧化应激、细胞及炎症因子^[3]等多种

因素均可能参与其发生发展过程。研究发现使用糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)抑制剂后,核转录因子(nuclear factor kappa B, NF- κ B)的mRNA与蛋白表达显著下降,NF- κ B通路活性降低,相关炎症因子减少,可缓解DKD肾脏的

* 基金项目:国家自然科学基金(31360280);人社部留学人员科技活动优秀项目[人社厅函(2015)192号]

作者单位:贵州医科大学附属医院,贵州 贵阳 550004

作者简介:周谊霞(1979-),女,贵州人,教授,博士,硕士研究生导师,研究方向:动脉粥样硬化临床与基础。

数字出版日期:2018-06-28 10:24

数字出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20180628.1024.012.html>

病理病变^[4]。在破骨细胞中骨保护素(osteoprotegerin, OPG)作为一种可溶性诱导受体,可与核因子 κ B受体活化因子(receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK)竞争性结合RANK配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL),阻断RANKL与RANK的结合,抑制其生理效应的发挥,在破骨细胞分化、发育和成熟过程中起关键作用^[5-7]。研究表明氯化锂可以调节糖代谢、影响上皮-间质转分、参与胰岛素抵抗从而预防糖尿病肾脏病发生^[8]。因此,本研究使用GSK-3 β 抑制剂氯化锂抑制GSK-3 β 活性,观察DKD大鼠肾组织中 β -catenin和OPG表达水平变化,旨在探讨GSK-3 β 对糖尿病肾脏病大鼠肾组织中OPG相关通路的调控作用及意义。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

722E型可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司),LDIS-2型低温离心机(北京医用离心机厂),血糖分析仪(深圳市鑫台欣公司),Gel Doc EQ型DNA成像分析仪(美国BIO-RAD公司),TC-512型梯度PCR扩增仪(英国TECHNE公司),光学显微镜(日本OLYMPUS公司),梯度PCR扩增仪(德国Eppendorf公司),DYY-III-5型稳流电泳仪及电泳槽(北京六一仪器厂),病理摄像及分析系统(JD-801计算机图像分析系统)、BX41图像采集系统(日本OLYMPUS公司)。链脲佐菌素(streptozocin, STZ)(美国Sigma公司),OPG抗体(美国BioVision生物试剂公司), β -catenin抗体(加拿大Sigma-Aldrich有限公司),RT-qPCR试剂盒(加拿大Qiagen有限公司),PCR引物设计及合成(上海捷瑞生物工程有限公司)。

1.2 动物模型建立

45只健康SD大鼠(体重200~250g),由贵州省实验动物工程技术中心提供,生产许可证号:SYXK(黔)2012-0001,给予普通饲料适应性喂养2周后,随机选择15只,作为对照组,其余30只禁食后,按55mg/kg腹腔一次性注射STZ溶液制备糖尿病模型,对照组大鼠腹腔注射相同体积溶剂(柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液)。3d后静脉取血,血糖>16.7mmol/L者确定为糖尿病模型^[9]成功。各组大鼠继续喂养10周,每周称重、测血糖。10周后禁食(不禁水)24h,测定24h尿蛋白含量,24h尿蛋白 \geq 30mg或超过对照组尿蛋白10倍,作为糖尿病大鼠早期DKD标准^[10]。

1.3 分组与处理

将30只DKD造模成功大鼠随机分为模型组(15只)和氯化锂干预组(15只)。氯化锂干预组大鼠腹腔注射氯化锂(LiCl)15mg/kg,隔天1次,连续10d;模型组和对照组大鼠给予同等体积生理盐水腹腔注射。腹腔注射12d后处死大鼠,处死大鼠前1天代谢笼收集24h尿样本,肾脏按常规制成3 μ m病理切片行苏木精-伊红

(hematoxylin-eosin staining, HE)染色、免疫组化检测。

1.4 指标与方法

1.4.1 生化指标检测

采用考马斯亮蓝法测定大鼠24h尿蛋白浓度,采用血糖仪检测大鼠血糖水平。

1.4.2 肾组织病理学观察

颈椎脱臼法处死大鼠,解剖、分离双侧肾脏,去除包膜,右肾用生理盐水冲洗后,固定,4 $^{\circ}$ C保存,用于HE染色及免疫组化检测。左肾置于冰盒中,-80 $^{\circ}$ C低温冰箱保存,用于实时荧光定量PCR检测。3 μ m肾组织石蜡切片,5 $^{\circ}$ C烤箱内烤片10min,脱蜡,切片置于二甲苯中浸泡10min,更换二甲苯后再浸泡10min,水洗,放入1%苏木素染液中染色5min,自来水冲洗反蓝及1%的盐酸酒精分色,再放入0.5%伊红染色液中染色2~3min,自来水冲洗后放入双蒸水,脱水,中性胶封片。显微镜观察大鼠肾组织肾小球、肾小管、间质等的形态结构变化。

1.4.3 肾组织 β -catenin和OPG蛋白表达检测

采用免疫组化法,肾组织石蜡切片,烤片、脱水,磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)洗后,0.01mol/L柠檬酸修复液(pH 6.0)微波修复10min,冷却至室温,PBS洗后用3%过氧化氢室温下孵育20min,PBS洗后滴加1:100稀释的一抗摇床50min,PBS洗后滴加过氧化物酶标记二抗,20~37 $^{\circ}$ C孵育60min,PBS冲洗后二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色,冲洗,苏木素复染2min,盐酸酒精分化,脱水、透明、封片,镜检。采用全自动图像分析系统分析免疫组化结果,光学显微镜200倍视野下,每张切片随机选择8个视野,测定肾小管/球阳性免疫组化染色的灰度值,计算相对表达量。

1.4.4 肾组织中OPG和RANKL mRNA表达检测

采用实时荧光定量PCR(reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR)法,用Trizol试剂盒抽提各组大鼠肾组织总RNA,进行逆转录。OPG F: 5'-ATAAAGGCATGCAAACCCAG-3', R: 5'-GCCTCAAGTGCCTGAGAAAC-3',扩增片段长度341bp; RANKL F: 5'-GCTCACCTCACCATC AATGCT-3', R: 5'-GGTACCAAGAGGACAGACT GACTTTA-3',片段长度497bp; β -actin F: 5'-GGA GATTACTGCCCTGGCTCCTA-3', R: 5'-GACTCAT CGTACTCCTGCTTGCTG-3',片段长度186bp。Real-time PCR循环条件为:93 $^{\circ}$ C 3min,92.5 $^{\circ}$ C 48s,55 $^{\circ}$ C 1min,40个循环。以Applied Biosystems SDS 14.0软件进行荧光收集和数据分析。

1.5 统计分析

计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 20.0软件进行统计分析,正态分布计量资料两两比较采用 t 检验,3组间比较采用单因素方差分析,方差齐时用SNK检验,方差不齐用Tamhane's检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氯化锂对 DKD 大鼠血糖与尿蛋白水平影响

(表 1) 糖尿病造模后(第 4 周末),模型组大鼠出现不同程度多尿、多饮、多食、消瘦,活动减少;DKD 造模后(第 10 周末),与对照组比较,模型组、氯化锂干预组大鼠体重降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,氯化锂干预组大鼠体重升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组大鼠血糖与 24 h 尿蛋白水平明显升高(P 均 < 0.05);与模型组比较,氯化锂干预组大鼠血糖与 24 h 尿蛋白水平下降(P 均 < 0.05)。

表 1 氯化锂干预对 DKD 大鼠体重、血糖、24h 尿蛋白水平影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

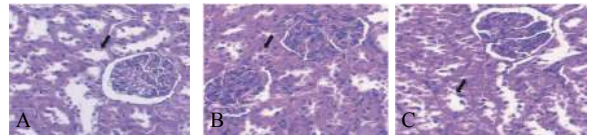
| 组别 | 体重(g) | 血糖值(mmol/L) | 尿蛋白(g/24h) |
|--------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 对照组 | 489.77 ± 49.86 | 10.67 ± 2.10 | 14.72 ± 3.37 |
| 模型组 | 254.08 ± 24.74 ^a | 22.63 ± 2.08 ^a | 154.17 ± 20.65 ^a |
| 氯化锂干预组 | 298.27 ± 18.71 ^b | 17.98 ± 1.09 ^b | 107.20 ± 31.15 ^b |

注:与对照组比较, a $P < 0.05$;与模型组比较, b $P < 0.05$ 。

2.2 氯化锂对 DKD 大鼠肾脏组织病理学影响(图 1)

结果显示,对照组大鼠肾小球大小均一,小管上皮细胞完整,基底膜薄,管周无纤维化及明显的间质水肿(图 1A);模型组大鼠肾脏组织中肾小球肥大,系膜基质

增多,毛细血管基底膜增厚;肾小管基底膜增厚,管腔狭窄(图 1B);氯化锂干预组大鼠肾小球体积稍增大、毛细血管基底膜轻度增厚、系膜基质增生、肾小管上皮细胞变性程度较模型组有所减轻(图 1C)。

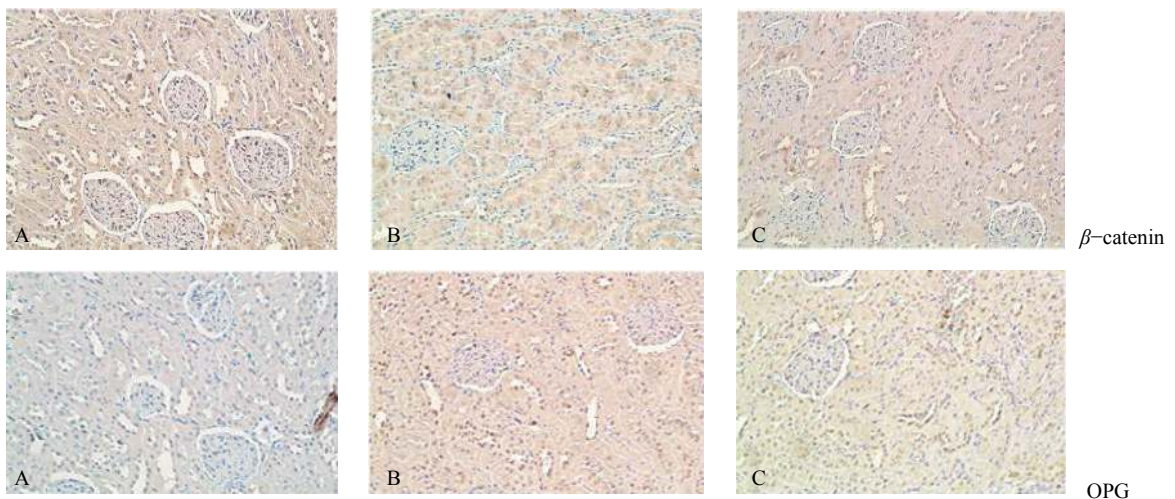


注: A 对照组; B 模型组; C 氯化锂干预组。

图 1 氯化锂对 DKD 大鼠肾脏组织病理学影响(HE, × 400)

2.3 氯化锂对 DKD 大鼠肾脏组织中 β -catenin 和 OPG 表达影响(图 2、表 2)

β -catenin 阳性表达部位在肾小管和肾小球的胞浆及胞核,呈黄染颗粒状。对照组大鼠肾小管上皮细胞胞浆内 β -catenin 呈中度表达,胞核内未见表达(图 2A);模型组大鼠肾小管上皮细胞胞浆内 β -catenin 有部分表达,但胞核内未见表达(图 2B);氯化锂干预组大鼠肾脏组织细胞胞浆内 β -catenin 有表达,且核浆可见表达(图 2C)。OPG 阳性部位在肾小球和肾小管胞浆及胞核,呈黄染颗粒状。对照组胞浆及胞核可见少量阳性表达(图 2A);与对照组比较,模型组与氯化锂干预组大鼠肾小管上皮细胞胞浆内 OPG 表达均有增强($P < 0.05$)(图 2B、C)。



注: A 对照组; B 模型组; C 氯化锂组。

图 2 氯化锂对 DKD 大鼠肾脏组织 β -catenin、OPG 表达影响(免疫组化, × 200)

表 2 氯化锂对 DKD 大鼠肾脏组织 β -catenin、OPG 表达影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

| 组别 | β -catenin | OPG |
|--------|-------------------------|--------------------------|
| 对照组 | 1.0 ± 0.00 | 1.0 ± 0.00 |
| 模型组 | 2.2 ± 0.31 ^a | 1.97 ± 0.15 ^a |
| 氯化锂干预组 | 2.0 ± 0.20 ^a | 1.62 ± 0.21 ^a |

注:与对照组比较, a $P < 0.05$ 。

2.4 氯化锂对 DKD 大鼠肾脏组织中 OPG/RANKL mRNA 表达影响

与对照组(1.00 ± 0.00)比较,模型组大鼠肾脏组织 OPG/RANKL mRNA 表达(0.6 ± 0.06)明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,氯化锂干预组大鼠肾脏组织中 OPG/RANKL mRNA 表达(1.6 ± 0.12)明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

糖尿病患者中约有 30%~40% 的比例会出现肾脏损害,即糖尿病肾病(DKD),是导致终末期肾病和死亡的主要原因。目前,认为是多因素如糖代谢紊乱^[11]、血流动力学改变^[12],炎症因子^[13-14]等综合作用下的结果。研究发现,GSK-3 β 可促进高糖及胰岛素诱导的肾上皮细胞外基质蛋白合成,在DKD肾脏肥大及细胞外基质聚集中发挥着重要作用,GSK-Wnt信号通路在DKD肾小管损伤中发挥重要作用^[15]。Wnt信号通路与细胞生长、分化、行使功能、凋亡等有关,该通路可通过OPG/RANKL/RANK信号通路的Cross-Talk来调节骨重建过程^[16]。通过增加OPG/RANKL比例, β -catenin可抑制破骨细胞的合成^[17]。NF- κ B是一种广泛存在于各种细胞中的转录因子,在鼠破骨细胞中,NF- κ B信号通路上关键细胞因子RANKL刺激能活化NF- κ B信号通路^[18],RANKL信号经过RANK传递给肿瘤坏死因子受体相关因子6(TNFR-associated factors 6, TRAF6),TRAF6可通过NIK(NF- κ B可诱导性激酶)和IKK(NF- κ B激酶诱导剂)活化NF- κ B^[19-20],活化的NF- κ B转位到核内与其相关的DNA序列结合以诱导多种前炎性细胞因子的转录,是炎症发生发展的重要因子。前期研究发现DKD与NF- κ B信号通路的炎症反应具有一定关系^[4],同时发现DKD大鼠肾组织中RANK表达显著上升。提示,RANK参与了DKD疾病进程。

本研究结果显示,糖尿病肾病模型组大鼠血糖及尿蛋白水平均高于对照组,OPG/RANKL mRNA比值减小,模型组大鼠肾组织病理变化明显;与模型组比较,氯化锂干预组(GSK-3 β 抑制剂)大鼠血糖及尿蛋白水平均明显降低,肾组织中OPG/RANKL mRNA比值增大,大鼠肾组织病理改变减轻。其机制可能与下列过程有关:DKD大鼠肾组织中,虽然OPG呈保护性上升,但RANKL活化表达上升幅度更大,相对下调了OPG/RANKL mRNA比值;而在NF- κ B信号通路中,过量上游因子RANKL的刺激活化下游NF- κ B,促进DKD病程;而GSK-3 β 抑制剂氯化锂在不同程度上激活了wnt/ β -catenin信号通路,引起 β -catenin不同程度活化,上调了OPG/RANKL mRNA比值,即OPG表达相对上升,OPG作为RANK的竞争性因子,与RANKL结合,抑制了RANK/RANKL引起的NF- κ B活化,一定程度上缓解了DKD的疾病进程。

综上所述,OPG可通过OPG/RANKL/RANK信号通路减缓糖尿病肾病的发生发展。因此,OPG可作为一个潜在的细胞因子治疗靶点,发挥对DKD大鼠肾脏的保护作用。

参考文献

- [1] Gluhovschi GH, Gluhovschi C, Vlad A, et al. Diabetic nephropathy and multiorgan protection. Part I[J]. Rom J Intern Med, 2011, 49(3): 163-177.
- [2] Gluhovschi GH, Gluhovschi C, Vlad A, et al. Diabetic nephropathy and multiorgan protection. Part II[J]. Rom J Intern Med, 2011, 49(4): 237-249.
- [3] Mora C, Navarro JF. The role of inflammation as pathogenic factor in the development of renal disease in diabetes[J]. Curr Diab Rep, 2005, 5: 399-401.
- [4] 周谊霞,李龙,于燕妮,等.糖原合酶激酶-3 β 抑制剂对糖尿病肾病大鼠Wnt和核因子- κ B信号通路的影响[J].中华病理学杂志, 2015, 11: 783-787.
- [5] Tanaka S. Signaling axis in osteoclast biology and therapeutic targeting in the RANKL/RANK/OPG system[J]. Am J Nephrol, 2007, 27(5): 466-478.
- [6] Daisuke K, Masakazu H, Hiroko N, et al. Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC beta inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes[J]. Faseb J, 2000, 14(3): 439-447.
- [7] Akira M. Glomerular-specific protein kinase C-beta-induced insulin receptor substrate-1 dysfunction and insulin resistance in rat models of diabetes and obesity[J]. Kidney Int, 2011, 79(8): 883-896.
- [8] Gao C, Hölscher C, Liu Y, et al. GSK3: a key target for the development of novel treatments for type 2 diabetes mellitus and Alzheimer disease[J]. Rev Neurosci, 2012, 23(1): 1-11.
- [9] Nam JS, Cheong YS, Karm MH, et al. Effects of nefopam on streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain in rats[J]. Korean J Pain, 2014, 27(4): 326-333.
- [10] Flyvbjerg A, Denner L, Schrijvers BF, et al. Long-term renal effects of a neutralizing RAGE antibody in obese type 2 diabetic mice[J]. Diabetes, 2004, 53(1): 166-172.
- [11] McDonald SD, Pesarchuk E, Don-Wauchope A. Adverse metabolic effects of a hypercaloric, high-fat diet in rodents precede observable changes in body weight[J]. Nutr Res, 2011, 31(9): 707-714.
- [12] Chirinos JA, Segers P, Gillebert TC, et al. Central pulse pressure and its hemodynamic determinants in middle-aged adults with impaired fasting glucose and diabetes: the Asklepios Study[J]. Diabetes Care, 2013, 36(8): 2359-2365.
- [13] Matia-Garcia I, Muñoz-Valle JF, Parra-Rojas I. Macrophage migration inhibitory factor and its relationship with obesity and diabetes[J]. Invest Clin, 2014, 55(3): 266-277.
- [14] 苏毅.糖尿病肾脏疾病发病机制研究进展[J].中国实用医药, 2009, 4: 231-234.
- [15] 唐杰,郝丽荣. GSK3-Wnt信号通路与糖尿病肾病的关系[J].医学综述, 2012, 18(3): 421-423.
- [16] 陈锡山,于燕妮. Wnt经典信号通路与氟骨症[J].中华地方病学杂志, 2014, 33(1): 113-115.
- [17] 刘晓青,崔燎.防治骨质疏松症的药物研究进展[J].中国骨质疏松杂志, 2009, 15(2): 153-157.
- [18] Otero JE, Chen T, Zhang K, et al. Constitutively active canonical NF-kappa B pathway induces severe bone loss in mice[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38694.
- [19] Darnay BG, Ni J, Moore PA, et al. Activation of NF-kappa B by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF-kappa B-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif[J]. J Biol Chem, 1999, 274(12): 7724-7731.
- [20] Ruocco MG, Maeda S, Park JM, et al. I{kappa}B kinase (IKK){beta}, but not IKK{alpha}, is a critical mediator of osteoclast survival and is required for inflammation-induced bone loss[J]. J Exp Med, 2005, 201(10): 1677-1687.