

依普利酮对糖尿病肾病大鼠的保护机制研究

刘书伟(河南医学高等专科学校附属医院, 河南 新郑 451191)

摘要: 目的 探讨依普利酮对糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)大鼠的保护机制。方法 DN模型大鼠随机分成模型组、依普利酮组(40 mg·kg⁻¹)、阳性对照组(缬沙坦, 20 mg·kg⁻¹), 另设正常组。灌胃给药8周。全自动生化分析仪检测24 h尿蛋白、血肌酐及血糖化血红蛋白水平; HE染色行肾组织病理形态学观察; ELISA检测肾组织IL-6、TNF- α 和MCP-1水平; qPCR检测TLR4、NF- κ B p65 mRNA水平, Western blot法检测肾组织TLR4、NF- κ B p65蛋白水平。结果 与模型组比较, 依普利酮组大鼠24 h尿蛋白、血肌酐及血糖化血红蛋白水平均明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 肾组织病理变化有不同程度的改善; 肾组织IL-6、TNF- α 和MCP-1水平均明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), TLR4、NF- κ B p65 mRNA水平和TLR4、NF- κ B p65蛋白水平明显下降($P < 0.01$)。结论 依普利酮能有效地改善DN大鼠的炎症水平, 机制可能与下调IL-6、TNF- α 、MCP-1、TLR4、NF- κ B p65水平有关。

关键词: 依普利酮; 糖尿病肾病; 炎症因子; TLR4; NF- κ B p65

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2018)06-0812-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.06.006

引用本文: 刘书伟. 依普利酮对糖尿病肾病大鼠的保护机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(6): 812-815.

Protective Mechanism of Eplerenone on Rats with Diabetic Nephropathy

LIU Shuwei(Henan Medical College Hospital Workers, Xinzheng 451191, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the protective mechanism of eplerenone on rats with diabetic nephropathy(DN). **METHODS** DN model rats were randomly assigned as follows: model group, eplerenone group (40 mg·kg⁻¹) and positive control group (valsartan, 20 mg·kg⁻¹). And a normal group was set. The drugs were given to rats daily for 8 weeks by intragastric administration. The 24 h urinary protein, serum creatinine and the blood glucose hemoglobin levels were measured by automatic biochemical analyzer. Then observed the levels of IL-6, TNF- α and MCP-1 changes in renal tissue by ELISA. The mRNA expression of TLR4, NF- κ B p65 in renal tissue were examined by qPCR, the protein expression of TLR4, NF- κ B p65 in renal tissue were examined by Western blot. **RESULTS** Compared with the model group, the levels of 24 h urinary protein, serum creatinine and glycosylated hemoglobin in eplerenone group were significantly decreased($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the pathological changes of renal tissue were improved in different degree; the levels of IL-6, TNF- α and MCP-1 in renal tissue of rats in eplerenone group were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the mRNA level of TLR4, NF- κ B p65 and the protein level of TLR4, NF- κ B p65 in renal tissue of rats with eplerenone was also decreased significantly ($P < 0.01$). **CONCLUSION** Eplerenone can effectively improve the inflammation level of rats with DN, which may be related with decreasing IL-6, TNF- α , MCP-1, TLR4, NF- κ B p65 levels.

KEY WORDS: eplerenone; diabetic nephropathy; inflammatory factor; TLR4; NF- κ B p65

糖尿病是常见的代谢异常综合征, 与遗传和环境因素存在一定的联系^[1], 而糖尿病肾病是常见的微血管并发症, 与高血糖及血流动力学障碍所致炎症存在一定的相关性。研究显示, 糖尿病炎症损伤包括高水平的炎症因子表达及炎症信号通路的激活, 其中TLR4/NF- κ B信号通路对肾组织病变起着重要的介导作用^[2]。依普利酮作为新型选择性醛固酮拮抗剂, 无性激素抑制的不良反应, 大量临床研究及动物实验表明, 其对于糖尿病肾病有确切疗效。既往的研究均着重于依普利酮的疗效及不良反应, 对其机制研究较少。糖尿病肾病模型是一种与人类糖尿病肾病相似的典型动物模

型, 有关选择性醛固酮拮抗剂对该模型疗效和治疗机制的研究较多。本研究通过探讨依普利酮对糖尿病肾病模型大鼠TLR4/NF- κ B信号通路的影响, 探讨其可能的作用机制。

1 材料及仪器

1.1 动物

40只健康SPF级4周龄SD大鼠, ♂, 体质量(80~100)g, 由河南省实验动物中心提供, 动物生产许可证号: SCXK(豫)2010-0002。

1.2 试剂和仪器

依普利酮(大连美仑生物技术有限公司, 货号: MB1444-S); 链脲佐菌素(STZ, Sigma公司, 批号:

作者简介: 刘书伟, 男, 主管药师 Tel: 15515599885 E-mail: lswei79@sina.com

S0130); IL-6、TNF- α 和 MCP-1 ELISA 试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号: 150911, 151102, 150903); TLR4(货号: 19811-1-AP)、NF- κ B p65(货号: 10745-1-AP)、兔抗大鼠多克隆抗体(美国 Proteintech 公司); MCP-1 试剂盒(美国 RND 公司, 批号: R002365L)。

ALC-V8 动物呼吸机(上海奥尔科特公司); 全自动生化分析仪(日本 HITACHI 公司); ST-360 酶联免疫检测仪(上海科华实验系统有限公司); Light cycle[®] 96 实时荧光定量 PCR 仪[罗氏诊断产品(上海)有限公司]; Geldoc 2000 凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物模型的建立

40 只大鼠禁食不禁水 12 h 后, 随机选择 30 只采用 10%水合氯醛(2 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉, 行右肾摘除术; 余下 10 只为正常组, 行右肾摘除假手术。术后青霉素(2 万单位)肌注, 每天 1 次, 连续 3 d。手术 6 d 后, 大鼠尾静脉注射 STZ(45 mg·kg⁻¹, 0.1 mmol·L⁻¹ 柠檬酸缓冲液溶解, pH 4.4)。正常组尾静脉注射柠檬酸缓冲液(5 mL·kg⁻¹, pH 4.4)。72 h 后测定空腹血糖, 血糖>16.7 mmol·L⁻¹ 即为糖尿病模型。1 周后, 复测血糖, 并收集 24 h 尿液, 血糖>16.7 mmol·L⁻¹、24 h 尿蛋白>造模前的 50%即为糖尿病肾病模型^[3]。

2.2 动物分组和给药

按成人 1 日剂量折算出大鼠等效剂量。选择符合诊断标准的成模大鼠 30 只, 随机分成模型组、依普利酮组(40 mg·kg⁻¹)、阳性对照组(缬沙坦, 20 mg·kg⁻¹)、另设正常组。各治疗组每天灌胃给药 1 次, 模型组和正常组给予 2 mL·kg⁻¹ 生理盐水灌胃, 连续治疗 8 周。试验期间, 除正常组外, 每组各死亡 1 只, 予以剔除。

2.3 标本收集

给药第 8 周末, 收集大鼠 24 h 尿液, -80 °C 低温保存备用; 禁食 12 h, 腹主动脉取血 6 mL, 其中 EDTA 抗凝管 3 mL, 检测糖化血红蛋白水平, 促凝管内 3 mL, 检测肌酐水平。颈椎脱位法处死大鼠, 取出左侧肾脏, 1/2 采用 10%甲醛固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片, 行 HE 染色。1/2 于 -80 °C 低温保存备用。

2.4 观察指标

全自动生化分析仪检测 24 h 尿蛋白、血肌酐

及血糖化血红蛋白水平; 肾组织加入生理盐水于冰水浴中进行组织匀浆, 取上清, ELISA 法测定 IL-6、TNF- α 和 MCP-1 水平。

2.5 qPCR 检测 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 水平

Trizol 提取总 RNA, 取 2 μ g RNA 按照试剂盒说明书逆转录合成 cDNA。引物序列由上海英骏公司提供。TLR4 上游序列: 5'-TGGCAGTTTCTGAG TAGCCG-3', 下游序列: 5'-GCTACTTCCTTGTGC CCTGT-3', 产物: 389 bp; NF- κ B p65 上游序列: 5'-CCCCCAACTTCTTTGGGTGA-3', 下游序列: 5'-CCTAGGAGCGTTGCTTTGGA-3', 产物: 326 bp; 内参 GAPDH 上游引物: 5'-TGTGAACGGATTG GCCGTA-3', 下游引物: 5'-GATGGTGATGGGTT TCCCGT-3', 产物: 208 bp。PCR 采用 20 μ L 的反应体系, 选择 SYBR Green 试剂盒, 采用 Light cycle[®] 96 实时荧光定量 PCR 仪进行基因扩增。计算基因的相对表达量(相对表达量=2^{- $\Delta\Delta$ Ct}×100%, Δ Ct=Ct(待测基因)-Ct(GAPDH))。

2.6 Western blot 法检测 TLR4、NF- κ B p65 蛋白水平

取肾组织, 常规方法^[4]提取蛋白质, 考马斯亮蓝染色(Bradford)法测定总蛋白的含量。蛋白样品行 SDS-PAGE 电泳, PVDF 膜转膜 2 h。5%脱脂奶粉封闭; 加入 TLR4(1:1 000)、NF- κ B p65(1:2 000)一抗 4 °C 孵育过夜, 二抗(羊抗兔)室温孵育 2 h。行 ECL 反应, 显色。Bio-Rad 凝胶成像系统拍照, GIS 凝胶成像分析软件分析。

2.7 统计学方法

运用 SPSS 13.0 进行统计学处理, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采 *t* 检验。计数资料用百分比表示, 采用 χ^2 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状态

与正常组比较, 模型组大鼠出现多饮、多食、多尿、体质量减轻等明显的糖尿病症状。阳性对照组、依普利酮组大鼠经过治疗后, 症状较模型组均有所改善, 体质量明显增加, 见表 1。

3.2 24 h 尿蛋白、血肌酐及血糖化血红蛋白水平比较

治疗后, 阳性对照组、依普利酮组大鼠 24 h 尿蛋白、血肌酐及血糖化血红蛋白水平较模型组均明显下降, 均有统计学差异(*P*<0.05 或 *P*<0.01), 见表 1。

表 1 大鼠体重、24 h 尿蛋白、血肌酐及血糖化血红蛋白水平比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of rat body weight, 24 h urinary protein, serum creatinine and blood glucose hemoglobin levels ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	体重/g	24 h 尿蛋白/mg·(24 h) ⁻¹	血肌酐/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	血糖化血红蛋白/%
正常组	10	-	432.24±9.42	8.58±3.39	21.36±2.47	2.59±0.28
模型组	9	-	368.38±12.48 ¹⁾	61.38±7.59 ¹⁾	58.24±4.84 ¹⁾	6.89±0.59 ¹⁾
阳性对照组	9	20	427.29±6.83 ³⁾	34.24±13.35 ³⁾	30.28±2.32 ³⁾	4.51±0.68 ³⁾
依普利酮	9	40	429.38±6.98 ³⁾	35.24±12.59 ³⁾	32.26±2.17 ³⁾	5.48±0.57 ²⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$.

3.3 HE 染色行肾组织病理形态学观察

正常组大鼠肾小球结构清晰, 基底膜、系膜区基质、系膜细胞及内皮细胞水平正常; 而糖尿病肾病大鼠肾小球体积增大, 并出现分叶。基底膜、系膜区基质均明显增加, 肾小管上皮细胞伴有空泡样变性, 肾间质出现炎性细胞浸润。与模型组比较, 阳性对照组、依普利酮组大鼠的肾小球体积改善, 空泡样变性和浸润明显减轻。结果见图 1。

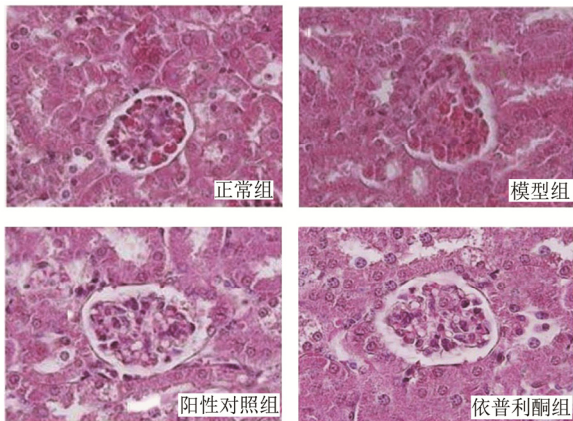


图 1 HE 染色行肾组织病理形态学观察(400×)

Fig. 1 Pathological observation of renal tissue in HE staining line(400×)

3.4 IL-6, TNF- α 和 MCP-1 水平比较

治疗后, 阳性对照组、依普利酮组大鼠肾组织 IL-6、TNF- α 和 MCP-1 水平较模型组均明显下降, 有统计学差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见表 2。

表 2 IL-6、TNF- α 和 MCP-1 水平比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of IL-6, TNF- α and MCP-1 levels ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-6/pg·mL ⁻¹	TNF- α /ng·mL ⁻¹	MCP-1/pg·mL ⁻¹
正常组	10	-	2.34±0.15	29.16±2.98	15.28±2.27
模型组	9	-	5.95±0.27 ¹⁾	116.36±21.25 ¹⁾	72.17±12.27 ¹⁾
阳性对照组	9	20	3.11±0.14 ³⁾	69.58±9.25 ³⁾	38.27±4.46 ³⁾
依普利酮	9	40	3.15±0.16 ²⁾	72.37±10.28 ³⁾	41.16±4.54 ³⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$.

3.5 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 表达水平比较

治疗后, 阳性对照组、依普利酮组大鼠肾组

织 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 水平较模型组明显下降, 均有统计学差异($P < 0.01$)。结果见图 2。

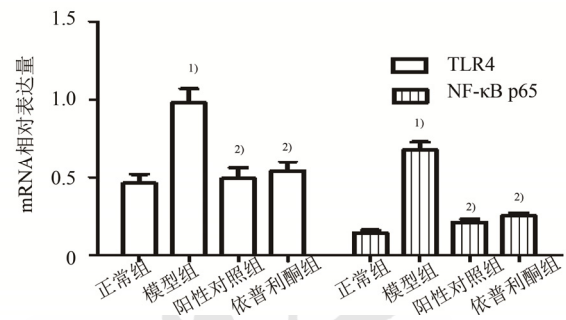


图 2 大鼠肾组织 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 水平比较与正常组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Comparison of TLR4 and NF- κ B p65 mRNA levels in rat kidney

Compared with normal group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.01$.

3.6 TLR4、NF- κ Bp65 蛋白水平比较

治疗后, 阳性对照组、依普利酮组大鼠肾组织 TLR4、NF- κ B p65 水平较模型组明显下降, 均有统计学差异($P < 0.01$)。结果见图 3。

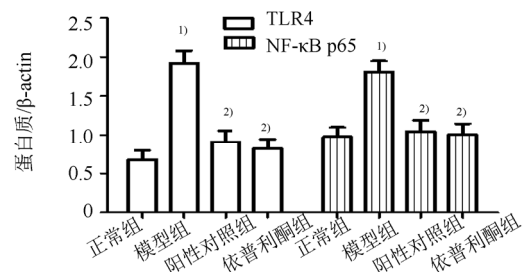
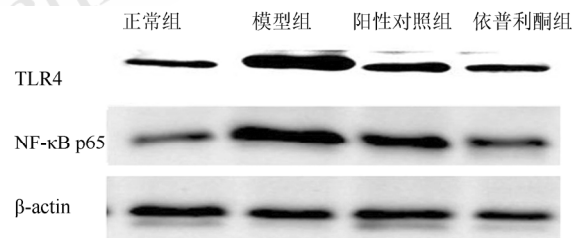


图 3 大鼠肾组织 TLR4、NF- κ Bp65 蛋白水平比较与正常组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 3 Comparison of TLR4 and NF- κ B p65 protein levels in rat kidney

Compared with the normal group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P < 0.01$.

4 讨论

高血糖易增厚肾小管基底膜, 促进细胞外基质的积聚, 改变肾小球和肾小球细胞膜结构及功能, 诱发肾损伤并发症, 严重时出现尿蛋白。研究表明, 糖尿病肾病的发生与晚期糖基化终产物的累积、炎症反应等途径有关, 增加血小板凝聚, 破坏机体的微循环^[5]。研究显示, 醛固酮拮抗剂抗炎、抗纤维化效果明显, 能降低尿蛋白水平, 改善肾小球硬化, 但对性激素具有一定的抑制作用。依普利酮是一种新型醛固酮拮抗剂, 对性激素水平的影响较小。Tsuboi 等^[6]研究发现依普利酮能显著降低非糖尿病肾病患者的尿蛋白水平, 并认为长期低剂量的依普利酮对持续尿蛋白患者具有保护作用。本研究通过肾组织病理形态学观察发现, 依普利酮能有效改善大鼠肾小球体积, 减轻空泡样变性和浸润, 下调 24 h 尿蛋白、血肌酐及血糖化血红蛋白水平, 提示依普利酮对糖尿病肾病引起的肾损伤具有一定的修复作用, 进而保持机体内环境稳定。

有研究显示, 长期过度分泌炎症因子, 对肾小球具有一定的破坏作用, 严重时导致细胞外基质堆积和肾小球硬化^[7]。本研究显示, 依普利酮组大鼠经过治疗后, IL-6、TNF- α 和 MCP-1 水平较模型组均明显下降, 说明依普利酮具有一定的抗炎作用, 对糖尿病肾病有一定的治疗和预防作用, 这也提示依普利酮能有效地改善靶器官损伤和血管内皮功能, 降低进行性炎症, 减少纤维化的发生。TLR4 是一种重要的机体免疫和炎症识别系统的跨膜蛋白受体, 能识别并结合炎症刺激因子, 诱导炎症因子及部分细胞因子的释放。研究报道, 糖尿病肾病大鼠的肾组织中 TLR4 水平明显增加, 并与蛋白尿等指标相关^[8]。NF- κ B 是一种转录调节因子, 包含 p50 和 p65 组成的同源或异源二聚体, 对调控机体的免疫功能和炎症反应, 发挥着重要作用^[9]。研究证实, TLR4 激活受体后, 通过信号传导激活 NF- κ B, 诱发炎症介质网络失衡, 加重机体的炎症反应, 导致尿蛋白的发生, TLR4 表达的多少同时又受到 IL-6、TNF- α 、MCP-1 和 NF- κ B 等细胞因子的调控, 形成了复杂的正反馈持续激

活的网络环路^[10]。本研究结果显示, 依普利酮能下调大鼠肾组织 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 水平, 减少 TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达, 提示依普利酮可能通过降低大鼠肾组织 TLR4、NF- κ B p65 水平, 抑制炎症因子释放, 减缓并发症的进展, 改善肾损伤和肾功能。

总之, 依普利酮能有效地改善糖尿病肾病大鼠的炎症水平, 其机制可能与下调患病大鼠 IL-6、TNF- α 、MCP-1、TLR4、NF- κ B p65 的水平有关。

REFERENCES

- [1] BIAN H X, LIU X, HAN J M, et al. Comparison of type 2 diabetes patients between depression and comorbid depression [J]. J Northwest Univ(Nat Sci Edit)(西北大学学报: 自然科学版), 2015, 45(4): 599-601.
- [2] 唐坤龙, 张春来, 周洪霞, 等. 参芍口服液对糖尿病肾病大鼠肾脏组织 TLR4 及 NF- κ B 表达的影响[J]. 山东医药, 2016, 56(30): 31-33.
- [3] 赵陆斌. 六味地黄丸对糖尿病肾病大鼠 MCP-1、NF- κ B 表达的影响及保护机制的研究[D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2015.
- [4] 吴玉鹏. LYAR 在结直肠癌中的表达及其功能研究[D]. 南京: 南京大学, 2016.
- [5] WANG J, CHENG X X, ZHU X L, et al. Effect of the union of Yiqi Bushen Fang and *Tripterygium wilfordii* polyglycosidum on expression of VEGF and secretion of IL-6 and TNF- α in rats with diabetic nephropathy [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(6): 711-716.
- [6] TSUBOI N, KAWAMURA T, OKONOGI H, et al. The long-term antiproteinuric effect of eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with non-diabetic chronic kidney disease [J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2012, 13(1): 113-117.
- [7] LOU X D, WANG H D, CHEN F, et al. The expression levels of serum interleukin-17 in type 2 diabetes with macroangiopathy [J]. Chin J Gerontol(中国老年学杂志), 2013, 33(13): 3024-3026.
- [8] CHEN N, ZAHNG Y K, TAN N, et al. Protective effects of aqueous extracts of *Zebrina pendula* Schnizl. on kidney of diabetic mice [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2017, 33(2): 131-135.
- [9] XU Z J, SHU S, LI Z J, et al. Liuwei Dihuang pill treats diabetic nephropathy in rats by inhibiting of TGF- β /SMADS, MAPK, and NF- κ B and upregulating expression of cytoglobin in renal tissues [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(3): e5879.
- [10] PAN Y, ZHANG X, WANG Y, et al. Targeting JNK by a new curcumin analog to inhibit NF- κ B-mediated expression of cell adhesion molecules attenuates renal macrophage infiltration and injury in diabetic mice [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79084.

收稿日期: 2017-07-19

(本文责编: 李艳芳)