

维格列汀对糖尿病肾病保护作用机制探讨^{*}

武红梅,邓丽萍,胡园园,龙爱梅,黄莹,黄震,沈明静[△](广东省深圳市龙岗中心医院 518116)

【摘要】 目的 研究结缔组织生长因子(CTGF)和血管内皮生长因子(VEGF)在大鼠糖尿病肾病发生和发展中的作用,探讨维格列汀对糖尿病肾病的保护机制。**方法** 将 60 只大鼠分为 A、B、C 3 组, A、B 两组给予链脲佐菌素用于制备大鼠糖尿病肾病模型组,然后分别给予维格列汀 8 mg/(kg·d)灌胃连续治疗 8 周和 12 周, C 组为对照组,只给予生理盐水灌胃。处死大鼠,检测 A、B 两组大鼠血糖、24 h 尿蛋白定量和血清 CTGF 和 VEGF 表达水平。进一步测定肾重指数,形态学观察肾小球体积及肾小球基底膜变化,测定肾小球平均截面积(MGA),计算肾小球平均体积(MGV),比较其 MGA 和 MGv。**结果** 大鼠糖尿病组血糖、24 h 尿蛋白定量和 CTGF、VEGF 水平明显高于对照组。经维格列汀治疗后大鼠糖尿病肾病组血糖、24 h 尿蛋白定量和 CTGF、VEGF 水平显著下降,治疗 12 周后以上各项指标比治疗 8 周下降更明显,肾重指数降低,肾脏肥大程度减轻,且治疗前、后 CTGF 和 VEGF 水平呈正相关。**结论** CTGF 和 VEGF 可作为糖尿病肾病病情评估有价值的指标,维格列汀可能部分通过调控 CTGF 和 VEGF 的表达而发挥肾脏保护作用。

【关键词】 糖尿病肾病; 结缔组织生长因子; 血管内皮生长因子; 维格列汀

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.24.013 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)24-3645-03

Investigation of protection mechanism of vildagliptin to diabetic nephropathy^{*} WU Hong-mei, DENG Li-ping, HU Yuan-yuan, LONG Ai-mei, HUANG Ying, HUANG Zhen, SHEN Ming-jing[△] (Central Hospital of Longgang District, Shenzhen, Guangdong 518116, China)

【Abstract】 Objective To study the role of CTGF and VEGF in the occurrence and development of rat diabetic nephropathy, and to investigate the protection mechanism of vildagliptin to diabetic nephropathy. **Methods** 60 rats were divided into three groups: group A, B and C. Group A and B were treated by streptozotocin for the preparation of diabetic nephropathy rat models. Then the diabetic nephropathy rats of group A and B were treated by continuous intragastric administration of 8 mg/(kg·d) vildagliptin for 8 and 12 weeks respectively. Group C was control group, and just given intragastric administration of saline. The rats were killed, then blood glucose, 24 h urine protein, and the expression levels of CTGF and VEGF of rats in group A and B were detected. Furthermore, kidney weight index, morphological observation of glomerular volume, glomerular basement membrane changes were determined as well as the glomerular average sectional area (MGA) and the average calculated glomerular volume (MGV) were compared. **Results** The levels of blood glucose, 24 h urine protein, CTGF and VEGF of group A and B were significantly higher than those of control group. After vildagliptin treatment, the levels of blood glucose, 24 h urine protein, CTGF and VEGF reduced in both of group A and B, and those in group B reduced more significantly than group A. At the same time, both of the kidney weight index and the degree of renal hypertrophy reduced after treatment, and the levels of CTGF and VEGF were positively correlated before and after treatment. **Conclusion** CTGF and VEGF could serve as a valuable indexes of diabetic nephropathy. Vildagliptin might play a role of renal protection via partially regulate the expression of CTGF and VEGF.

【Key words】 diabetic nephropathy; CTGF; VEGF; vildagliptin

糖尿病肾病(DN)是糖尿病主要的微血管并发症,其病理变化表现为肾小球、肾小管肥大,肾小球肾小管基底膜增厚,肾小球系膜区细胞外基质堆积及肾小球硬化^[1]。血管内皮生长因子(VEGF)是一种特异作用于血管内皮细胞的细胞因子,有研究表明,VEGF 参与蛋白尿的产生和肾脏肥大形成,与 DN 关系密切^[2]。结缔组织生长因子(CTGF)在肾脏表达尤为丰富,它介导了转化生长因子-β(TGF-β)1 促进细胞外基质积聚

的效应,参与组织纤维化过程,促进肾脏肾小球系膜细胞外基质聚集、肾小球硬化和肾小管间质纤维化^[3]。给予二肽基肽酶-4 抑制剂(DPP-4)维格列汀通过调控 CTGF 和 VEGF 的表达而发挥糖尿病肾脏保护作用,其国内外报道甚少。因此,本研究给予 DN 大鼠维格列汀治疗,通过检测主要反映 DN 病情进展的指标(血糖和 24 h 尿蛋白)及检测反映肾小球硬化和肾小管间质纤维化的 2 个项目(CTGF、VEGF)血清学表达水平,

^{*} 基金项目:广东省深圳市龙岗区科技发展资金 2013 年度课题资助项目(YS2013075)。

作者简介:武红梅,女,硕士,主任医师,主要从事内分泌及代谢疾病临床与基础研究。△ 通讯作者, E-mail: mingjingshen1962@126.com。

旨在探讨维格列汀对 DN 大鼠肾脏的保护作用,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂 健康雄性 SD 大鼠 60 只,体质量 180~200 g,购自广东医学院实验动物中心;链脲佐菌素(STZ),美国 sigma 公司;DPP-4 维格列汀,诺华制药有限公司产品;尿蛋白试剂盒购自南京建成科技有限公司;CTGF、VEGF 酶联免疫试剂盒购自武汉博士德生物有限公司。

1.2 糖尿病大鼠模型建立 大鼠分为 A、B、C 3 组, A、B 两组单次腹腔注射 65 mg/kg STZ,STZ 用 0.1 mmol/L 无菌枸橼酸缓冲液配制(pH=4.5)。72 h 后摘除眼球取血测定血糖,血糖大于或等于 16.67 mmol/L 的大鼠入组为糖尿病大鼠。连续 4 周测定血糖,24 h 尿蛋白,连续 3 d 随机血糖大于或等于 16.67 mmol/L,24 h 尿蛋白大于 30 mg/(kg·d)者为 DN 组。然后分别给予维格列汀 8 mg/(kg·d)灌胃连续治疗 8 周和 12 周。C 组为对照组,只给予生理盐水灌胃。

1.3 仪器与试剂 血糖及 24 h 尿蛋白采用速率法,罗氏 AU600 全自动生化分析仪及配套试剂测定;血清 CTGF 和 VEGF 检测采用 ELISA,试剂由深圳晶美公司提供。奥地利 AUTH2010 全自动酶标仪比色分析试验数据,操作严格按照仪器及试剂使用说明书执行。

1.4 肾重指数检测 各组大鼠喂养 12 周时称体质量,处死大鼠取双肾并去掉肾包膜,冰盐水冲洗后滤纸吸干,测双肾重量。根据公式:肾重/体质量=[双侧肾脏重量之和(g)/体质量(g)]×1 000 进行计算。

1.5 肾脏组织 HE 染色及肾组织病理图像分析 取新鲜肾脏组织用生理盐水冲洗干净,然后采用甲醛固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,制成 3 μm 石蜡切片,行 HE 染色。采用 CIAS-1000 型细胞图像分析系统对病理染色切片(×400 倍)进行图像分析。每个切片随机选择 8 个正切的肾小球,测定肾小球平均截面积(MGA),取其平均值作为每个标本的 MGA,并根据公式:肾小球平均体积(MGV)=1.25×3/2(MGA)计算 MGv。

1.6 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。多组间先进行确实数据方差分析,再用 D 检验进行组间比较。CTGF 与 VEGF 相关性采用单因素直线相关分析进行处理。

2 结 果

2.1 各组大鼠血糖、24 h 尿蛋白及 CTGF 与 VEGF 水平变化 见表 1。与 DN 组和对照组相比,维格列汀组血糖、24 h 尿蛋白、CTGF 和 VEGF 差异均有统计学意义(*P*<0.05)。

表 1 各组大鼠血糖、24 h 尿蛋白及 CTGF 与 VEGF 水平变化($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	血糖(mmol/L)	24 h 尿蛋白(mg/L)	CTGF(μg/L)	VEGF (μg/L)
DN 组	40	22.36±2.18	26.75±5.61	26.75±5.61	462.43±55.04
维格列汀治疗 8 周	20	16.05±1.84	19.40±3.69	2.59±0.45	245.49±23.70
维格列汀治疗 12 周	20	10.87±1.19	110.8.10±4.52	2.13±0.35	204.28±18.11
对照组	20	6.01±0.84	8.14±1.47	8.14±1.47	142.96±12.50

2.2 DN 大鼠治疗前、后血液 CTGF 与 VEGF 水平比较 见表 2。由表 2 可见,DN 大鼠治疗 12 周后血清 CTGF 与 VEGF 水平显著低于治疗前,差异有统计学意义(*P*<0.05)。

表 2 DN 大鼠治疗前、后血清 CTGF 与 VEGF 水平比较($\bar{x} \pm s$,ng/L)

组别	<i>n</i>	VEGF	CTGF
治疗前	40	462.43±55.04	5.47±0.81
治疗后	40	269.55±19.27	2.14±0.39

2.3 各组大鼠模型肾重指数变化 DN 组、维格列汀组、对照组肾重指数分别是(11.02±0.89)、(9.85±0.45)、(6.40±0.39),维格列汀组肾脏肥大程度减轻,3 组差异均有统计学意义(*P*<0.05)。

2.4 病理切片图像分析 见表 3。DN 组 MGA、MGV 明显扩大,维格列汀各治疗组均有不同程度缩小,差异有统计学意义(*P*<0.05),而对照组、DN 组 MGA、MGV 未见明显扩大。

表 3 各组大鼠 MGA MGv 的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	MGA(×10 ² μm ²)	MGV(×10 ⁶ μm ³)
DN 组	40	468.50±49.17	13.14±2.01
维格列汀组	40	317.85±27.74	7.14±0.35
对照组	20	294.87±33.98	6.14±0.28

3 讨 论

DN 是糖尿病的微血管并发症之一,早期病理特征是肾小球肥大,肾小球及肾小管基底膜增厚,系膜区细胞外基质进行性积聚,后期表现为肾小球、肾小管间质纤维化,最终致蛋白尿和肾衰竭。DN 发病机制比较复杂,目前尚不完全清楚,可能与遗传因素、高血糖、高血压、血脂异常等代谢紊乱及某些免疫因子调控相关。本研究给予 DPP-4 抑制剂维格列汀通过调控 CTGF 和 VEGF 的表达而发挥糖尿病肾脏保护作用,其国内外报道较少。VEGF 是 1989 年从培养的牛垂体滤泡星状细胞分离出的一种相对分子质量为(35~45)×10³ 的二聚体糖蛋白^[4]。近年强调微血管结构在肾脏疾病进展中的重要性,血管内皮生长因子 CTGF、VEGF 与 DN 的关系成为关注的热点。CTGF 是 1991 年 Bradham 等首先在人脐静脉内皮细胞的条件培养基中发现的,它是一种由 349 个氨基酸组成,相对分子质量为(34~38)×10³ 的富含半胱氨酸的分泌肽^[5]。CTGF 作为 TGF-β1 的下游因子,在肾脏表达尤为丰富,它介导了 TGF-β1 促进细胞外基质积聚的效应,参与组织纤维化过程^[6]。它的过度表达促进肾脏肾小球系膜细胞外基质的聚集、肾小球硬化和肾小管间质纤维化。

本研究通过测定 DN 大鼠血糖、24 h 尿蛋白、肾重指数和 MGA、MGV 变化,观察肾小球的病理形态改变及大鼠血清学 VEGF 和 CTGF 的表达水平。随着疾病进程加重,本研究结果显示,各组大鼠在早期就已出现多饮、多食、多尿等糖尿病表

现。随着病情的进展,血糖及 24 h 尿蛋白明显高于同期对照组,出现肾脏病理损伤加重等 DN 表现,由此表明研究过程中肾功能不断受损,其病理变化表现为肾小球、肾小管肥大,肾小球、肾小管基膜增厚,肾小球系膜区细胞外基质堆积及肾小球硬化。进一步检测反映肾小球硬化和肾小管间质纤维化 2 项指标 CTGF 和 VEGF 的血清学表达水平发现, DN 大鼠血清 CTGF 和 VEGF 水平显著高于对照组,且经过维格列汀治疗后 DN 大鼠血糖及 24 h 尿蛋白及 CTGF 和 VEGF 水平显著下降,且治疗 12 周后以上各项指标比治疗 8 周下降更明显,与文献[7]报道一致。薛菲等^[2]认为, VEGF 与尿清蛋白排泄率呈正相关,表明高水平 VEGF 会促进蛋白尿产生,促进肾脏组织损伤。本研究结果亦显示,经过维格列汀治疗后 CTGF 和 VEGF 水平均显著下降,且治疗前、后 CTGF 和 VEGF 2 项指标呈正相关关系, DN 大鼠中 CTGF 和 VEGF 2 项因子明显高于同期对照组,因此推测 CTGF 和 VEGF 在大鼠 DN 发生和发展过程中起到加速作用,进一步导致肾脏病理损伤加重,最终发展为 DN 所起的作用可能是一对相辅相成的免疫因子。CTGF 是介导肾间质炎性反应最重要炎性反应趋化因子之一,在多种肾脏疾病的发病及进展中发挥作用,是关键性细胞因子之一,参与 DN 的病理过程,是导致糖尿病肾损害的重要原因^[8]。本研究结果显示, CTGF 与 DN 大鼠弥漫性肾小球硬化与巨噬细胞浸润有关,提示长期高血糖刺激,使 CTGF 促使血管内皮细胞 VEGF 表达增加,其结果导致白细胞黏附增加、血管内皮细胞产生慢性炎性反应,进而促进 DN 形成。随 DN 进一步加重 CTGF 呈进行性上升趋势,导致肾小球高滤过、清蛋白排泄、肾小球肥大等,由此提示 CTGF 和 VEGF 参与了 DN 发病及发生和发展。

肠促胰素类药物是目前用于治疗 2 型糖尿病较新的一类药物,肠促胰素类药物有两类:一类是胰高血糖素样肽-1 类似物,一类是 DPP-4 抑制剂^[9]。临床研究显示,此类药物不仅可有效控制血糖,还能减少体重增加、降低低血糖发生的风险。与此同时,临床试验及动物研究亦发现,肠促胰素类药物对 DN 具有保护作用,为 DN 的治疗提供了新的思路^[10]。维格列汀治疗组与 DN 组相比,不仅能明显降低血糖、尿蛋白,减轻肾脏体积,用药后肾组织病理损伤也减轻。说明维格列汀具有一定的肾脏保护作用,减少尿蛋白及肾脏保护作用更强。本研究证实,糖尿病患者血 CTGF 水平可作为诊断早期肾损害较敏感的指标,其水平也与 DN 严重程度呈正相关,有助于监测、判断其病程进展情况^[11]。提示 CTGF 与 VEGF 参与 DN 的发病过程,阻断或减弱其表达将成为 DN 更有效的治疗途径。早期对 VEGF 进行干预,如使用小分子 VEGF 受体抑制剂及抗黏附分子治疗,可降低血管高渗透性,减轻蛋白尿及肾小球肥大,

同时阻断或减弱 CTGF 表达,将成为 DN 更有效的治疗途径。

参考文献

- [1] Mahmood D, Singh BK, Akhtar M. Diabetic neuropathy: therapies on the horizon[J]. J Pharm Pharmacol, 2013, 61 (5): 1137-1145.
- [2] 薛菲, 刘惠兰, 王银娜. 血管内皮细胞生长因子水平及其基因多态性与 2 型糖尿病肾病的关系[J]. 中华肾脏病杂志, 2007, 23(12): 813-814.
- [3] Zhou YH, Wang QY. The role and significance of CTGF in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Intern J Endocrinol Metab, 2009, 26(4): 273-276.
- [4] Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, et al. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p213[J]. Circulation, 1996, 93(8): 1493-1495.
- [5] Ito Y, Aten J, Nguyen TQ, et al. Involvement of connective tissue growth factor in human and experimental hypertensive nephrosclerosis [J]. Nephron Exp Nephrol, 2013, 117(1): e9-20.
- [6] 陈瑞林, 陶怡, 张北平, 等. MRL/lpr 狼疮鼠中结缔组织生长因子与 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的表达及相关性研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(5): 317-319.
- [7] Jiang L, Lv HB. Recent progress in the investigation of cy-token and diabetes retinopathy[J]. Chinese Ophthalmic Research, 2009, 27(12): 1165-1168.
- [8] Yokoi H, Mukoyama M, Mori K, et al. Over expression of connectivetissue growth factor in podocytes worsens diabetic nephropathy in mice [J]. Kidney Int, 2008, 73 (4): 446-455.
- [9] Wang Y, Landheer S, van Gilst WH, et al. Attenuation of renovascular damage in Zucker diabetic fatty rat by NWT-03, an egg protein hydrolysate with ACE-and DPP4-inhibitory Activity[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46781.
- [10] Mahmood D, Singh BK, Akhtar M. Diabetic neuropathy: therapies on the horizon[J]. J Pharm Pharmacol, 2009, 61 (9): 1137-1145.
- [11] El Mesallamy HO, Ahmed HH, Bassyouni AA, et al. Clinical significance of inflammatory and fibrogenic cytokines in diabetic nephropathy[J]. Clin Biochem, 2012, 45 (9): 646-650.

(收稿日期: 2015-05-13 修回日期: 2015-08-21)

(上接第 3644 页)

- 作用对代谢综合征患者血管内皮细胞功能的影响[J]. 南通大学学报, 2012, 32(3): 191-193.
- [8] Bugge A, Siersbaek M, Madsen MS, et al. A novel intronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma enhancer in the uncoupling protein (UCP) 3 gene as a regulator of both UCP2 and 3 expression in adipocytes[J]. J Biol Chem, 2010, 285(23): 17310-17317.

- [9] Ma S, Ma L, Yang D, et al. Uncoupling protein 2 ablation exacerbates high-salt intake-induced vascular dysfunction [J]. Am J Hypertens, 2010, 23(8): 822-828.
- [10] Sasaki S, Inoguchi T. The role of oxidative stress in the pathogenesis of diabetic vascular complications[J]. Diabetes Metab J, 2012, 36(4): 255-261.

(收稿日期: 2015-05-05 修回日期: 2015-07-15)