

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.24.008

利格列汀对 2 型糖尿病 SD 大鼠肾脏 PRMT1 表达及肾功能的影响*

梅 希¹, 吴锦林^{2△}, 黎 瑶¹, 邱 平¹(1. 成都医学院第一附属医院内分泌与代谢病科, 成都 610500; 2. 重庆市中医院/
重庆市中医研究院内分泌与代谢病科 400021)

摘要:目的 观察利格列汀对 2 型糖尿病 SD 大鼠肾脏组织中蛋白质精氨酸甲基转移酶 1 (PRMT1) 表达及其肾功能的影响。**方法** 将 SD 大鼠随机分为正常对照组 (NC 组, $n=10$) 和观察组 ($n=20$), 将观察组全部注射链脲佐菌素后用于制备 2 型糖尿病肾病模型组, 建模成功后将观察组随机分为糖尿病组 (DM 组, $n=10$) 和糖尿病利格列汀干预治疗组 (LM 组, $n=10$), 12 周后测定所有大鼠体质量、收缩压 (SBP)、舒张压 (DBP)、空腹血糖 (FBG)、胰岛素 (FINS) 水平、胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)、肌酐 (Cr)、尿微量清蛋白肌酐比值 (ACR) 及 24 h 尿微量清蛋白 (24 h mALB); 同时分离各组大鼠肾脏组织, 分别采用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)、蛋白质免疫印迹法及免疫组化化学法检测其 PRMT1 的 mRNA 及蛋白表达。**结果** DM 组体质量、SBP、DBP、FINS、HOMA-IR、Cr、ACR 及 24 h mALB 与 NC 组比较均明显升高, 且肾脏 PRMT1 表达也明显升高; 经利格列汀干预治疗 12 周后, LM 组大鼠体质量、SBP、DBP、FBG、FINS、HOMA-IR、Cr、ACR 及 24 h mALB 均降低, 肾脏 PRMT1 表达也明显下降。**结论** 利格列汀可能通过降低肾脏组织中 PRMT1 的表达发挥肾脏保护作用。

关键词: 2 型糖尿病; 蛋白质精氨酸甲基转移酶 1; 利格列汀; 氧化应激

中图法分类号: R587.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)24-3670-04

The influence of Linagliptin on PRMT1 expression in the kidney of Sprague-Dawley rats with type 2 diabetes*

MEI Xi¹, WU Jinlin^{2△}, LI Yao¹, QIU Ping¹

(1. Department of Endocrinology and Metabolism, the First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610500, China; 2. Department of Endocrinology and Metabolism, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital / Traditional Chinese Medicine Institute of Chongqing, Chongqing 400021, China)

Abstract: Objective To observe the effect of Linagliptin on the protein arginine methyl transfer 1 (PRMT1) expression in the kidney tissue of type 2 diabetic rats, and on the renal function protection. **Methods** The SD rats were randomly assigned to two groups: the observation group ($n=20$) and normal control group (NC group, $n=10$). The observation group was injected with STZ to prepare the model group of type 2 diabetic nephropathy. After successful modeling, the observation group was randomly divided into diabetic group (DM group, $n=10$) and diabetic ligliptin intervention group (LM group, $n=10$). 12 weeks later, the levels of body mass, systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), fasting blood glucose (FBG) and insulin (FINS), insulin resistance index (HOMA-IR), creatinine (Cr), urinary microalbumin creatinine ratio (ACR) and 24-hour urinary microalbumin (24 h mALB) were measured in all rats. The expression of PRMT1 was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blot and immunohistochemistry. **Results** The values of body mass, SBP, DBP, FINS, HOMA-IR, Cr, ACR, and 24 h mALB in DM group were significantly increased compared with NC group. After 12 weeks of treatment with Linagliptin, the values of body mass, SBP, DBP, FBG, FINS, HOMA-IR, Cr, ACR, and 24 h mALB were decreased and PRMT1 expression in the kidney was significantly decreased. **Conclusion** Linagliptin may improve the function of diabetic nephropathy via decreasing PRMT1 expression in the kidney.

Key words: type 2 diabetes mellitus; protein arginine methyl transfer 1; linagliptin; oxidative stress

目前, 糖尿病肾病 (DN) 的发病机制仍没有完全阐明, 现在公认的主要机制有: 肾脏血流动力学改变、高血糖诱导的终末糖基化产物堆积、氧化应激和炎症

反应等。既往关于氧化应激方面的研究已证实, 糖尿病、高血压患者存在血管内皮功能障碍, 其血清中非对称性二甲基精氨酸 (ADMA) 水平明显升高。约

* 基金项目: 成都医学院科研基金资助项目 (CYZ13-027)。

作者简介: 梅希, 女, 主治医师, 主要从事糖尿病及其发病机制方面的研究。△ 通信作者, E-mail: wujinlin1987@163.com。

85% 的 ADMA 主要由蛋白质精氨酸甲基转移酶 1 (PRMT1) 催化生成, 约 75% 的 ADMA 则由二甲基精氨酸二甲胺水解酶 1 (DDAH1) 水解, 即形成 1 条 PRMT1-ADMA-DDAH1 代谢轴^[1-2]。既往研究证明这条代谢轴存在于糖尿病患者胰腺、眼及肾脏组织中^[3-5]。二肽基肽酶-4 (DDP-4) 抑制剂是目前临床上使用的一种新型降糖药物, 其主要作用机制是通过抑制胰高糖素样肽-1 的分解, 从而促进胰岛 β 细胞对胰岛素的释放。在众多 DPP4 抑制剂中, 利格列汀由于其对肝功能影响小, 且能控制体质量增加, 所以广泛用于糖尿病的降糖治疗中。既往已有研究证实, 在替米沙坦治疗基础上加用利格列汀可有效减少 DN 患者的蛋白尿。为此推测利格列汀除降糖作用外, 还可能具有保护肾脏的作用。另外, 利格列汀对肾脏中 PRMT1 的影响少见相关报道。本研究建立 2 型糖尿病伴早期 DN 的大鼠模型, 通过单用利格列汀干预治疗, 探讨其能否通过抑制 PRMT1 而起到保护肾功能的作用, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 30 只清洁及体质量为 (170.30±10.09)g 的雄性 SD 大鼠, 购于成都医学院动物实验中心, 在基础饲料喂养和自由进水进食的标准环境中饲养并适应 1 周, 随机分为观察组 ($n=20$) 和正常对照组 (NC 组, $n=10$)。观察组给予高糖、高脂饲料饲养, NC 组给予普通饲料饲养。

1.2 分组 4 周后, 分别在观察组和 NC 组 SD 大鼠腹腔内注射链脲佐菌素 (STZ) 溶液 (STZ, 30 mg/kg, Sigma 公司) 和相应体积的柠檬酸缓冲液。1 周后分别经尾静脉采血检测空腹血糖 (FBG) (标准: 以禁食后血糖水平 >7.8 mmol/L 判定观察组 2 型糖尿病大鼠模型建模成功)。随机将观察组分为糖尿病组 (DM 组, $n=10$) 和糖尿病利格列汀治疗组 (LM 组, $n=10$)。LM 组以利格列汀 [3 mg/(kg·d), 美国礼来公司] 经口灌胃, 相应剂量的蒸馏水给予 NC 组和 DM 组。12 周后, 收集 24 h 尿液, 将大鼠隔夜禁食称重并经乙醚麻醉后, 从腹主动脉留取血液并分离肾脏标本。

1.3 方法

1.3.1 相关指标检测和计算 采用葡萄糖氧化酶法测定 FBG; 采用放射免疫法检测空腹胰岛素 (FINS)、肌酐 (Cr)、24 h 尿微量清蛋白 (24 h mALB) 及尿微量清蛋白肌酐比值 (ACR)。胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 用 [HOMA-IR = FINS × FBG / 22.5] 计算, FINS 单位为 mU/L, FBG 单位为 mmol/L。

1.3.2 动脉血压测定 各组大鼠动脉血压测量采用无创大鼠鼠尾测压仪。保持大鼠处于安静清醒状态, 放置鼠尾于 37 °C 加热毯加热, 测量舒张压 (DBP) 和收缩压 (SBP)。

1.3.3 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 肾脏总

RNA 的提取用 Trizol, 其水平和纯度测定采用核酸蛋白仪。将 RNA 反转录成 cDNA 后进行扩增 (试剂购自日本 Takara 公司)。PRMT1 上游引物为: 5'-GAG TTC ACC CGA TGC CAC AAG-3', 下游引物为: 5'-TCC GGT AGT CGG TGG AAC AAG-3', 扩增产物大小为 238 bp, 退火温度为 57 °C。取产物加入 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳后, 采用 BioRad GelDose200 凝胶成像系统进行图片拍摄, 光密度值采用 Quantity One 软件进行分析。

1.3.4 蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测 PRMT1 蛋白的表达 将肾脏组织加入蛋白裂解液中置于冰上匀浆, 提取总蛋白, 其蛋白水平测定采用 BCA 法。将蛋白样品按常规方法加入配制好的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 凝胶中进行电泳后转至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 加入 PRMT1 (1:2000, 美国 Cell Signaling 公司) 经 4 °C 孵育过夜后用磷酸盐缓冲液洗膜, 经 1 h 室温孵育二抗后再次洗膜, 加入电化学发光试剂后采集图像 (BioRad 成像系统), 分析光密度值 (Quantity One 软件)。

1.3.5 免疫组织化学法 常规脱蜡并进行抗原热修复, 按说明书进行一抗, 在 37 °C 下孵育 2 h, 经 4 °C 过夜后标记二抗 (用 DAB 显色), 苏木精复染、脱水并用中性树脂封片, 并于光镜下观察阳性细胞 (细胞内出现棕黄色颗粒) 进行图像分析, 计算光密度值 (Image-Pro Plus 软件)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件进行数据统计分析。所有数据均进行正态性检验, 对于非正态分布的数据, 经对数转换 (log2) 后再行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行多组间比较。检验水平 α 取双尾 0.05, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠相关指标比较 见表 1、2。DM 组大鼠 FBG 水平较 NC 组明显升高, LM 组与 DM 组比较明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 NC 组比较, DM 组及 LM 组大鼠体质量、SBP、DBP、FINS、HOMA-IR、Cr、ACR 及 24 h mALB 水平明显升高, 而 LM 组较 DM 组明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠肾脏组织中 PRMT1 的 mRNA 表达比较 见图 1。与 NC 组比较, DM 组及 LM 组大鼠肾脏组织中 PRMT1 的 mRNA 表达明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 而 LM 组的表达较 DM 组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠肾脏组织中 PRMT1 蛋白表达比较 见图 2。与 NC 组比较, DM 组及 LM 组大鼠肾脏组织中 PRMT1 蛋白表达明显升高, 而 LM 组的表达较 DM 组明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠肾脏免疫组织化学法结果比较 见图

3. NC 组大鼠肾小管上皮细胞核内可见少量阳性细胞,DM 组有大量阳性细胞,LM 组也可见部分阳性细胞,介于 NC 组与 DM 组之间。NC 组平均光密度值

低于 DM 组及 LM 组,LM 组光密度值低于 DM 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠生化指标检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

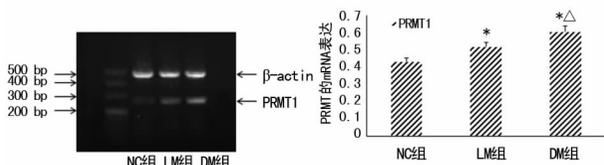
组别	n	FBG(mmol/L)	FINS(mU/L)	HOMA-IR	Cr(μ mol/L)	ACR	24 h mALB (μ mol/L)
NC 组	10	5.75 \pm 0.47	18.20 \pm 3.12	4.21 \pm 1.04	102.37 \pm 3.24	18.39 \pm 5.56	7.90 \pm 0.91
DM 组	10	10.09 \pm 1.01*	26.53 \pm 3.10*	8.21 \pm 0.92*	159.88 \pm 19.25*	250.76 \pm 66.13*	75.72 \pm 16.91*
LM 组	10	8.04 \pm 1.25*#	20.69 \pm 4.15*#	5.01 \pm 1.55*#	113.97 \pm 8.58*#	69.83 \pm 18.13*#	25.55 \pm 7.78*#

注:与 NC 组比较,* $P < 0.05$;与 DM 组比较,# $P < 0.05$

表 2 各组大鼠生理指标检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

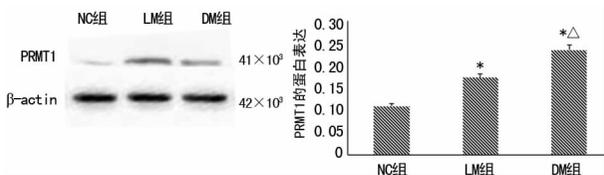
组别	n	体质量(g)	SBP(mm Hg)	DBP (mm Hg)
NC 组	10	170.30 \pm 10.09	122.80 \pm 9.92	73.50 \pm 6.55
DM 组	10	217.40 \pm 15.44*	170.50 \pm 10.86*	96.40 \pm 5.36*
LM 组	10	186.50 \pm 13.30*#	145.50 \pm 22.92*#	80.10 \pm 6.98*#

注:与 NC 组比较,* $P < 0.05$;与 DM 组比较,# $P < 0.05$



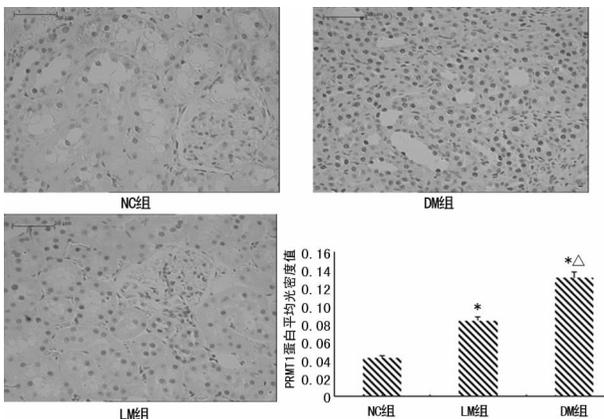
注:与 NC 组比较,* $P < 0.01$;与 LM 组比较, $\Delta P < 0.05$

图 1 大鼠肾脏组织中 PRMT1 的 mRNA 表达



注:与 NC 组比较,* $P < 0.01$;与 LM 组比较, $\Delta P < 0.05$

图 2 大鼠肾脏组织中 PRMT1 蛋白表达



注:与 NC 组比较,* $P < 0.01$;与 LM 组比较, $\Delta P < 0.05$

图 3 各组大鼠肾脏 PRMT1 蛋白表达免疫组织化学结果(HE, $\times 400$)

3 讨论

利格列汀属于 DPP4 抑制剂,15%左右以原型经肾脏排泄,85%左右经粪便排出,故其不良反应少,肝肾功能不全者无需调整剂量,在众多 DPP4 抑制剂中

有独特优势。本研究以糖尿病 SD 大鼠模型作为研究对象,采用利格列汀干预治疗 12 周,结果显示该药除明显降糖作用外,还能降低其肾脏组织中 PRMT1 的表达,明显减少 24 h mALB 及 ACR,降低血 Cr 及血压水平,提示利格列汀有肾脏保护作用,可能与下调肾脏组织中 PRMT1 的表达有关,推测其机制可能有以下几方面。

3.1 抑制氧化应激 DPP4 抑制剂对肾脏功能的保护作用机制可能与抑制氧化应激有关,相关研究也发现,DPP4 抑制剂能够预防和改善心脏和肾脏组织的氧化应激状态^[6]。PRMT1-ADMA-DDAH1 通路在糖尿病的氧化应激中起重要作用。PRMT1 的表达在糖尿病高氧化状态下升高,而 DDAH1 的表达却下降,导致 ADMA 水平升高。有研究发现,PRMT1-ADMA-DDAH1 通路在糖尿病大鼠的多个器官,如胰腺、肾脏及眼中均表达失衡^[3-5]。本研究发现,通过利格列汀干预治疗后,糖尿病大鼠肾脏组织中 PRMT1 mRNA 及蛋白表达均明显降低,证实了利格列汀对 PRMT1-ADMA-DDAH1 通路关键蛋白的调节作用,提示其具有抗氧化应激效应,与近期研究结果相似^[7]。但本研究未对该轴其余 2 个分子的水平进行检测,后续研究可围绕利格列汀作用于 PRMT1 相关通路展开进一步研究。

3.2 改善血流动力学和抑制血管增生 正常肾动脉呈高速低阻的血流动力学特点,随着糖尿病病情进展,受损血管内皮细胞不断增生,加重血管管腔的狭窄和闭塞。目前认为,ADMA 升高可能是糖尿病患者导致血管内皮功能失调的主要机制。DPP4 抑制剂可抑制血管增生,改善血管内膜与中膜比率及肾动脉血流动力学,抑制肾脏纤维化及血管内皮增生,从而达到肾脏保护作用^[8-9]。本研究显示,通过利格列汀干预治疗后,糖尿病大鼠肾小管上皮细胞核中 PRMT1 表达明显降低,且 SBP、Cr 水平均下降。本研究推测这是由于利格列汀通过降低肾小管上皮细胞核中的 PRMT1 水平,抑制 ADMA 表达,从而减轻对血管内皮功能的损伤,加上利格列汀对血压的改善,减轻了 DN 状态下高阻低速的血流动力学改变,从而降低 Cr 水平。本研究未检测血流动力学及内皮细胞的

相关指标,这是本研究的不足之处。

3.3 减轻胰岛素抵抗及减少尿蛋白 早期研究发现,ADMA 升高伴随胰岛素抵抗发生,而胰岛素抵抗是糖尿病和高血压的共同发病基础^[10]。本研究发现,通过利格列汀干预治疗后,大鼠体质量明显下降,胰岛素抵抗明显改善,血糖得到较好控制。本研究推测,除 DPP4 抑制剂本身通过肠促胰岛素途径降低血糖外,利格列汀也可通过对 PRMT1-ADMA-DDAH1 轴的影响,改善胰岛素抵抗,从而改善血糖水平。另外,DPP4 抑制剂还有降低 DN 患者尿蛋白及改善肾脏功能的作用^[11]。本研究结果提示,利格列汀单药治疗 12 周后可明显减少糖尿病大鼠 24 h mALB、ACR 及血 Cr 水平。作者推测,血糖降低本身可从一定程度上改善肾功能和蛋白尿,但利格列汀除降糖机制的降尿蛋白作用外,还对肾功能起到一定保护作用。

综上所述,利格列汀可以通过对糖尿病大鼠肾脏中 PRMT1 表达的影响,起到改善氧化应激、抑制血管增生、改善肾脏血流动力学、缓解胰岛素抵抗和减少尿蛋白等作用,在一定程度上延缓和改善了 DN 的发生和发展。

参考文献

[1] THAHA M, NILAMSARI W P, YUSUF M, et al. Profile of PRMT-1 gene polymorphism in hemodialysis patients with increased ADMA levels [J]. *Acta Med Indones*, 2014, 46(2):97-103.

[2] POPE A J, KARUPPIAH K, CARDOUNEL A J. Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production[J]. *Pharmacol Res*, 2009, 60(6):461-465.

[3] 王楠楠,刘东方,林海玲,等. PRMT1-ADMA-DDAH1 代谢轴在糖尿病大鼠胰腺中的表达及普罗布考的干预影响[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(23):2497-2502.

[4] CHEN Y, XU X, SHENG M, et al. PRMT-1 and DDAHs-

induced ADMA upregulation is involved in ROS- and RAS-mediated diabetic retinopathy [J]. *Exp Eye Res*, 2009, 89(6):1028-1034.

[5] 梅希,刘东方,王楠楠,等. 替米沙坦对 2 型糖尿病大鼠肾脏 PRMT1-ADMA-DDAH1 表达的影响[J]. *中国糖尿病杂志*, 2012, 20(6):461-465.

[6] ALAM M A, CHOWDHURY M R H, JAIN P, et al. DPP-4 inhibitor sitagliptin prevents inflammation and oxidative stress of heart and kidney in two kidney and one clip (2K1C) rats[J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2015, 7(1):107-112.

[7] GAULT V A, LENNOX R, FLATT P R. Sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improves recognition memory, oxidative stress and hippocampal neurogenesis and upregulates key genes involved in cognitive decline [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2015, 17(4):403-413.

[8] HU Y, LIU H, SIMPSON R W, et al. GLP-1-dependent and independent effects and molecular mechanisms of a dipeptidyl peptidase 4 inhibitor in vascular endothelial cells[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(3):2273-2279.

[9] WANG D, ZHANG G, CHEN X, et al. Sitagliptin ameliorates diabetic nephropathy by blocking TGF-β1/Smad signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(5):2784-2792.

[10] ZSUGA J, GESZTELYI R, TÖRÖK J, et al. Asymmetric dimethylarginine, a molecule responsible for the coexistence of insulin resistance and atherosclerosis via dual nitric oxide synthase inhibition[J]. *Med Hypotheses*, 2005, 65(6):1091-1098.

[11] GLORIE L L, VERHULST A, MATHEEUSSEN V, et al. DPP4 inhibition improves functional outcome after renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 303(5):F681-F688.

(收稿日期:2018-05-25 修回日期:2018-09-02)

(上接第 3669 页)

[8] 张兴,李森,郭忠武,等. 75 岁以上老年胃癌患者术前外周血中性粒细胞与淋巴细胞比值的临床意义[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2016, 19(5):526-529.

[9] 秦川,杜智勇,申忠华,等. 术前外周血中性粒细胞与淋巴细胞比值评估高级别 T1 期膀胱癌预后的临床价值[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2016, 37(9):685-689.

[10] 江慧洪,王晖,李阿建,等. 中性粒细胞/淋巴细胞比值对局部进展期结直肠癌患者预后的影响[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2017, 20(5):550-554.

[11] YAO M, LIU Y, JIN H, et al. Prognostic value of preoperative inflammatory markers in Chinese patients with breast cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2014, 7(36):1743-1752.

[12] MARONI P, MATTEUCCI E, BENDINELLI P A. Functions and epigenetic regulation of Wwox in bone metastasis from breast carcinoma: comparison with primary tumors[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(1):75-79.

[13] ZHANG F, WANG B, LONG H, et al. Decreased miR-124-3p expression prompted breast cancer cell progression mainly by targeting beclin-1 [J]. *Clin Lab*, 2016, 62(6):1139-1145.

[14] 陈华玲,马晓晴,袁圣亮. 自噬与炎症的关系研究进展[J]. *山东医药*, 2016, 56(23):100-102.

[15] 王梅,李庆林. 自噬与癌症的治疗[J]. *安徽医药*, 2010, 14(8):869-874.

(收稿日期:2018-05-23 修回日期:2018-08-28)