

## 霉酚酸酯对糖尿病肾病大鼠肾脏足细胞的保护作用

刘 磊<sup>1</sup> 常保超<sup>1</sup> 陈 峥<sup>1</sup> 吴雪平<sup>1</sup> 杨丽娟<sup>2</sup>

( 1. 蚌埠医学院第一附属医院 肾内科 安徽 蚌埠 233004; 2. 蚌埠医学院 生理学教研室 安徽 蚌埠 233030)

**【摘要】**目的: 探讨霉酚酸酯对糖尿病肾病大鼠肾脏足细胞相关蛋白 Nephlin 及炎症因子单核细胞趋化因子-1 表达的影响及机制。方法: 建立糖尿病肾病大鼠模型 将模型大鼠随机分为糖尿病肾病组及霉酚酸酯干预组 干预组给予霉酚酸酯 15 mg/( kg · d) 灌胃 8 周末处死动物 常规检测尿蛋白、肾功能、肾质量/体质量 光镜及电镜观察肾小球及肾小管变化 RT-PCR 及免疫组化法检测 Nephlin 及 MCP-1 mRNA 及蛋白表达。结果: 与正常对照组相比 糖尿病组大鼠肾脏组织肾小球肥大、部分纤维化 肾小球滤过膜损伤严重 尿蛋白增加 Nephlin 蛋白及 mRNA 表达减少 MCP-1 蛋白及 mRNA 表达增加; 与糖尿病组相比 霉酚酸酯干预组尿蛋白较正常对照组增加 但较糖尿病组有改善 ( $P < 0.01$ ) 肾小球滤过膜病变较糖尿病组改善 Nephlin 蛋白及 mRNA 表达较糖尿病组增加 ( $P < 0.01$ ) MCP-1 蛋白及 mRNA 表达减少 ( $P < 0.01$ )。结论: 霉酚酸酯可减少糖尿病肾病大鼠尿蛋白水平 下调 MCP-1 等炎症介质 上调 Nephlin 蛋白。霉酚酸酯对糖尿病肾病大鼠肾脏足细胞的保护可能通过干预 Nephlin 蛋白及炎症因子 MCP-1 的表达实现。

**【关键词】**糖尿病肾病; 霉酚酸酯; Nephlin; MCP-1

**【中图分类号】**R 587.2 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2015.06.003

## Protective mechanisms of mycophenolate mofetil for podocyte injury in diabetic rats

LIU Lei ,CHANG Baochao ,CHEN Zheng ,WU Xueping ,YANG Lijuan

Department of Nephrology ,The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College ,Bengbu 233004 ,China

**【Abstract】Objective:** To investigate the effect of mycophenolate mofetil (MMF) on the expression of nephrin and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and its mechanisms in the kidney of diabetic rats. **Methods:** Diabetic rat models were initially induced by peritoneal injection of streptozocin (STZ). Then the diabetic rats were randomized into diabetic group and MMF intervention group. Rats in the intervention group were administered with intragastric MMF 15 mg/(kg · d) and sacrificed by the end of the 8th week and subjected to conventional measurement of the urine protein ,renal function and kidney weight/body weight. Both light microscope and electron microscope were used to observe the changes of glomeruli and were kidney tubules and RT-PCR and immunohistochemistry were performed to determine the expression of nephrin and MCP-1 mRNA as well as protein. **Results:** As compared with normal controls ,the diabetic rats were found to have glomerular hypertrophy ,partial fibrosis of the kidney tissues ,seriously damaged glomerular basement membrane and elevated urinary protein ,yet downward expression of nephrin protein and MCP-1 mRNA. By comparison with the diabetic group ,urinary protein was increased in MMF group ,yet lower than the diabetic group ( $P < 0.01$ ). The damaged glomerular basement membrane was improved ,and nephrin expression was increased ,whereas MCP-1 expression was decreased in MMF group compared to the diabetic group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** MMF can suppress MCP-1 expression ,increase the nephrin expression ,and decrease proteinuria level in diabetic rats ,suggesting that MMF may prevent the podocytes from loss in the early stage of diabetic nephropathy through an anti-inflammatory effect.

**【Key words】**diabetic nephropathy; mycophenolate mofetil; nephrin; monocyte chemoattractant protein-1

肾小球滤过膜是维持肾脏滤过功能的重要结构 其中 由足细胞的足突及其裂隙膜构成的最外层的结构最为复杂 功能也最为重要 Nephlin 是裂孔

膜“拉链”结构的主要成分 也是肾小球滤过膜存在分子选择性的基础<sup>[1-2]</sup>。近年来 有许多研究发现足细胞及相关蛋白 Nephlin 表达异常是糖尿病肾病

基金项目: 安徽省高等学校自然科学研究基金项目( kJ2015B036by; kJ2015B021by); 蚌埠医学院自然科学研究基金项目( BYKY1229)

收稿日期: 2015-07-03

作者简介: 刘 磊(1978-) 男 副主任医师 硕士 (电话) 13625528388 (电子信箱) bbmell@163.com;

杨丽娟 女 讲师 硕士 (电子信箱) @163.com 通讯作者。

(diabetic nephropathy ,DN) 蛋白尿发生的重要机制。霉酚酸酯( mycophenolate mofeti ,MMF) 能强有力地抑制 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞增殖 ,目前作为免疫抑制剂在临床上使用 ,新近有研究表明 MMF 干预治疗糖尿病肾病大鼠 ,治疗后大鼠高尿蛋白、肾小球高滤过、肾小球硬化及巨噬细胞浸润程度均有所好转<sup>[3]</sup>。本研究探讨 MMF 是否通过调节 Nephrlin 表达减少糖尿病肾病大鼠尿蛋白及其可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 雄性 SD 大鼠 30 只(购自蚌埠医学院动物中心) 随机分为正常对照( NC) 组( 10 只)、DN 组( 10 只)、MMF 组( 10 只)。用链脲佐菌素制作糖尿病肾病大鼠模型 ,DN、MMF 组腹腔注射 60 mg/kg STZ( 以 pH 4.2 的 0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液配制) ,NC 组注射同浓度的枸橼酸缓冲液作为对照 ,腹腔注射 STZ 3 d 后进行空腹血糖的测量 ,连续测量 3 d ,血糖 >16.7 mmol/L 定为糖尿病肾病大鼠模型;造模成功后 ,MMF 组给予 MMF 15 mg/( kg · d) 灌胃<sup>[4]</sup> ,NC 组、DN 组给予同等量的生理盐水灌胃 ,早晚各灌 1 次。所有大鼠按分组分笼 ,按清洁级动物饲养 ,饲养周期为 8 周。

1.1.2 药物 链脲菌素( STZ ,美国 Sigma) ; MMF ( 杭州中美华东) ; 枸橼酸、2% 戊巴比妥钠、10% 中性甲醛液( 上海化学试剂厂) ,链酶菌素-过氧化氢酶溶液( 福州东旗) ; 羊抗大鼠多克隆抗体 Nephrlin、兔抗大鼠单克隆抗体 MCP-1 ( 武汉博士德) 。

### 1.2 方法

1.2.1 标本收集 各组大鼠饲养 8 周后分别置于代谢笼中收集 24 h 尿液 ,检测尿蛋白定量; 处死动物 ,收集血标本检测血糖、肾功能 ,测量肾质量/体质量; 留取肾标本分别进行病理、免疫组化及逆转录 PCR 检测。

1.2.2 病理学检查 部分肾组织经 10% 甲醛固定 ,制成 4 μm 厚切片 ,行 HE 染色观察肾小球病变; 部分肾皮质经固定 ,切片 50 μm ,行电镜观察。

1.2.3 免疫组织化学检查 采用 SABC 技术 ,将石蜡固定标本制成 4 μm 厚切片 ,经脱蜡及抗原修复后 ,切片分别与羊抗大鼠多克隆抗体 nephrlin ( 1: 200) 、兔抗大鼠单克隆抗体 MCP-1 ( 1: 200) 4℃ 孵育过夜。缓冲液冲洗后 ,滴加山羊抗小鼠 IgG 抗体-HRP 多聚体 ,37℃ 孵育 20 ~ 30 min。再次缓冲

液冲洗 3 次 ,DAB 显色 ,苏木素复染、脱水、透明、封片。以 HPLAS-400 图像分析系统对肾组织免疫组化结果行半定量分析 ,每张标本按顺序选 5 个肾小球 ,对所选视野内的免疫组化阳性信号进行图像分析 ,以阳性目标总面积占统计场总面积的百分比表示。

1.2.4 逆转录 PCR 检测 用 TRIzol 一步法提取组织总 RNA ,于 260 nm 和 280 nm 处测定其 OD 值 ,计算 OD260/OD280 比值 ,观察纯度。取总 RNA 3 μL 为模板 ,用随机引物逆转录合成 cDNA ,进行 PCR 扩增。Nephrlin( 94bp) 正义序列 5'-CCCGGACACCTG-CATGATG-3' ,反义序列 5'-GCTGCCACCTGGTTCG-TAGATT-3'。扩增条件: 95℃ 预变性 3 min 后 ,以① 95℃ 50 s 变性; ② 退火温度 62℃ 30 s; ③ 72℃ 60 s ,反应 30 个循环 ,最后一轮延长至 10 min。MCP-1( 146 bp) 正义序列 5'-CAGCCGACTCATTGG-GATCA-3' ,反义序列 5'-CTATGCAGGTCTCTGT-CACGCTTC-3'。扩增条件: 95℃ 预变性 3 min 后 ,以① 95℃ 50 s 变性; ② 退火温度 58℃ 30 s; ③ 72℃ 60 s ,反应 30 个循环 ,最后一轮延长至 10 min。取 PCR 产物 5 μL 在 15% 的琼脂糖凝胶电泳 ,然后在凝胶成像系统( Bio-Rad 公司) 上扫描 ,测定各目的基因吸光度值 ,分别计算其比值。

1.3 统计学方法 计量资料采用均数 ± 标准差表示 ,多组间采用 F 检验 ,两两比较采用 q 检验 ,P < 0.05 表示有统计学意义。

## 2 结果

2.1 一般指标 结果显示 ,DN 组和 MMF 组大鼠出现消瘦 ,毛发萎黄 ,体质量较 NC 组明显下降 ,而 MMF 组较 DN 组大鼠体质量偏高; DN 组和 MMF 组大鼠肾质量/体质量较 NC 组升高 ,且差异有高度统计学意义( P < 0.01) ; DN 组和 MMF 组大鼠 24 h 尿蛋白定量、BUN、Scr 和 FBS 较 NC 组升高 ,且差异有统计学意义( P < 0.01) 。具体情况见表 1。

2.2 病理学改变 光镜下经 PAS 染色可见 DN 组及 MMF 组大鼠肾小球体积增大 ,基底膜增厚 ,肾小球毛细血管腔受压变窄 ,NC 组无明显变化 ,而其中 MMF 组较 NC 组变化较轻 ,有一定程度的改善。电镜结果显示 ,DN 组大鼠肾小球足突融合变平 ,可见部分基底膜裸露 ,部分足细胞脱落 ,MMF 组大鼠较 DN 组足突融合减轻 ,足细胞脱落减少 ,而 NC 组无变化。见图 1。

表1 3组大鼠尿蛋白定量、血糖、血肌酐、尿素氮、肾质量/体质量( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	尿蛋白定量(g)	Scr(μmol/L)	BUN(mmol/L)	FBS(mmol/L)	KW/BW(×10 <sup>-3</sup> )
NC	10	4.85 ± 1.02	32.00 ± 5.33	6.69 ± 1.78	6.10 ± 1.23	2.80 ± 0.34
DN	10	44.72 ± 6.00**	71.80 ± 5.86**	34.41 ± 4.98**	27.41 ± 4.44**	5.00 ± 1.01**
MMF	10	24.37 ± 5.12**△△	39.60 ± 6.48**△△	16.74 ± 3.92**△△	24.65 ± 5.13**	3.54 ± 0.64*△△
F		188.478	127.872	136.336	84.747	24.329
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与NC组相比\* P<0.05,\*\* P<0.01,与DN组相比△P<0.05,△△P<0.01

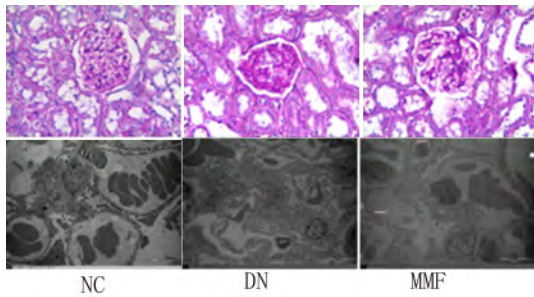


图1 光镜下及电镜下3组大鼠肾脏组织病理变化

2.3 免疫组化改变 NC组可见Nephrin蛋白均匀分布于肾小球基底膜, DN组Nephrin蛋白表达减少,呈颗粒状不均匀分布, MMF组Nephrin表达较DN组改善,呈不均匀分布,部分可见颗粒样中断。DN组MCP-1蛋白表达增加, MMF组MCP-1蛋白表达减少,两组相比有统计学意义(P<0.01)。见图2和表2。

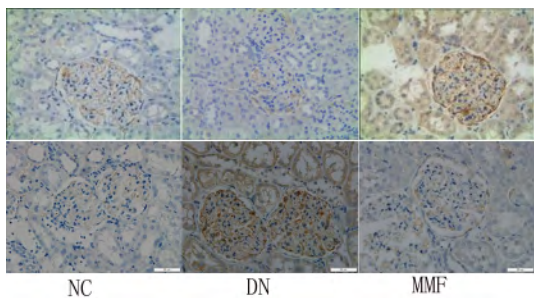


图2 经免疫组化处理后3组大鼠肾脏组织中Nephrin、MCP-1的表达

表2 各组大鼠肾组织中Nephrin、MCP-1的表达(%)

组别	n	Nephrin	MCP-1
NC	10	61.58 ± 2.84	17.66 ± 2.56
DN	10	25.68 ± 1.96**	47.48 ± 2.96**
MMF	10	35.06 ± 2.52**△△	28.86 ± 2.34**△△
F		569.655	187.117
P		0.000	0.000

注:与NC组相比\* P<0.05,\*\* P<0.01,与DN组相比△P<0.05,△△P<0.01

2.4 RT-PCR检测Nephrin及MCP-1 mRNA表达变

化 与NC组大鼠相比, DN组大鼠肾组织MCP-1 mRNA表达显著升高, Nephrin mRNA表达明显下降(P<0.01); 经MMF干预治疗后, MMF组大鼠MCP-1 mRNA表达减少, Nephrin mRNA表达增加(P<0.05)。见图3。

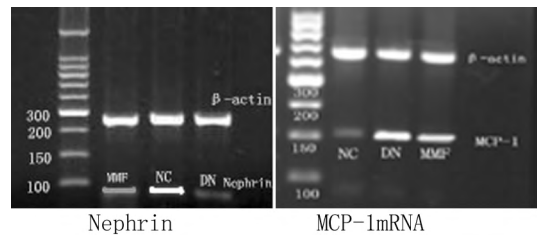


图3 RT-PCR检测Nephrin及MCP-1 mRNA表达变化

3 讨论

近年来,糖尿病(diabetes mellitus, DM)的发病率迅速增加,对人类健康造成重大危害。DN是DM最常见和最严重的并发症,其发病率逐年上升,已成为终末期肾脏病的主要病因之一。DN的特征是大量蛋白尿,有研究揭示DN的发病与肾脏足细胞病变密切相关<sup>[5]</sup>。糖尿病伴微量白蛋白尿患者的肾脏足细胞特异蛋白Nephrin、α3β1整合素表达显著下降,并与蛋白尿程度呈负相关<sup>[6-7]</sup>。DN后期足细胞脱落、凋亡增加和缺乏再生能力等导致足细胞的密度和数量减少;足细胞单层结构破坏影响裂孔膜的完整性以及细胞间的连接和细胞糖萼蛋白丢失,使白蛋白和其他分子滤过增加,导致DN蛋白尿的发生<sup>[8-9]</sup>。单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)是公认的炎症指标。Han等<sup>[10]</sup>报道MCP-1由肾小球足细胞合成,并在肾小管间质中发现, MCP-1属于CC趋化因子家族,可诱导单核/巨噬细胞浸润肾小球、肾间质细胞中,促进基底膜和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)增生,加速肾小球硬化和肾间质纤维化,加快DN进展<sup>[11]</sup>。霉酚酸酯(MMF)治疗后糖尿病肾病大鼠肾组织MCP-1表达明显降低,萎缩肾小管及间质纤维化明显减少,并可减轻蛋白尿;不论从基因水平还是

从蛋白水平,MMF均可抑制MCP-1的表达抑制巨噬细胞的特异性趋化和增殖,减轻炎症反应,延缓DN的进展。糖尿病模型中MCP-1在肾小球中高表达,MCP-1的缺失可减轻蛋白尿及上调Nephrin蛋白的表达<sup>[12]</sup>。Nephrin在维持裂孔膜复合体结构和功能上发挥重要作用,是肾小球滤过膜屏障的重要组成部分。蛋白尿的产生与Nephrin表达下调密切相关<sup>[13]</sup>。本研究结果显示, DN组大鼠24h尿蛋白、肾质量指数、Scr、BUN、FBS较NC组出现明显异常,病理下肾组织损害明显,MCP-1 mRNA表达明显增加,Nephrin蛋白在肾小球基底膜表达下降,与相关研究相符。

MMF是霉酚酸(mycophenolic acid,MPA)的酯类衍生物,脱脂后形成具有免疫抑制活性的代谢产物MPA,从而发挥其生物学效应。MMF主要通过抑制淋巴细胞和单核细胞的增殖、减少抗体产生和细胞表面粘附分子的抑制,达到抗炎效果<sup>[14]</sup>。2003年Utamura等<sup>[15]</sup>首次在糖尿病模型中给予免疫抑制剂MMF干预,发现可明显减轻肾小球硬化与尿蛋白排泄率增加,其机制主要为抑制肾内巨噬细胞浸润。国内外众多的实验证明,MMF可减少单核巨噬细胞浸润、肾间质成纤维细胞的活化及胶原沉积,延缓了RIF的进展<sup>[16]</sup>。新近有研究发现MMF干预治疗DN大鼠,大鼠尿蛋白排泄和肌酐清除率显著下降、单核细胞/巨噬细胞浸润减少、肾组织的ECM增生减轻,起到了有效的保肾作用<sup>[17]</sup>。本研究结果显示,糖尿病肾病大鼠给予MMF组干预治疗后,大鼠一般情况改善。在给药第8周后体质量较DN组明显增高;24h尿蛋白、肾质量指数、Scr、BUN、FBS较DN组明显降低;肾组织病理检查损害明显减低。MCP-1 mRNA在肾组织中的表达明显减少,Nephrin蛋白在肾小球基底膜表达明显增加。

综上所述,通过研究实验动物肾组织中MCP-1及Nephrin表达,揭示了炎症反应对糖尿病肾病发病及病情发展起了重要作用,MMF可通过抑制炎症反应来调节Nephrin的表达,从而保护肾脏足细胞,改善病情,为临床上治疗糖尿病肾病提供了新的方向。

#### 【参考文献】

[1] Deen WM. What determines glomerular capillary permeability[J]. Clin Invest 2004, 114: 1412-1414.

- [2] 贾俊亚,丁国华. Nephrin信号转导机制研究进展[J]. 生理科学进展 2006, 37(3): 276-279.
- [3] Soler MJ, Riera M, Batlle D. New experimental models of diabetic nephropathy in mice models of type 2 diabetes: efforts to replicate human nephropathy[J]. Am Soc Nephrol 2008, 19: 433-442.
- [4] 张燕,王威,关广聚,等. 霉酚酸酯及缬沙坦对糖尿病大鼠足细胞的保护机制研究[J]. 中华肾脏病杂志 2007, 23(9): 583-588.
- [5] 陈立平,周巧玲. 足细胞超微结构及其相关分子表达变化在糖尿病肾病发病中的作用[J]. 中南大学学报:医学版 2007, 32(4): 620-625.
- [6] Maezawa Y, Takemoto M, Yokote K. Cell biology of diabetic nephropathy: Roles of endothelial cells, tubulointerstitial cells and podocytes[J]. J Diabetes Investig 2015, 6(1): 3-15.
- [7] Zhou J, Sun W, Yoshitomi H, et al. Qiwei granules alleviates podocyte lesion in kidney of diabetic KK-Ay mice[J]. BMC Complement Altern Med 2015, 15: 97.
- [8] 邵德翠,陆利民. 肾素-血管紧张素系统在糖尿病肾病肾脏足细胞损伤中的作用[J]. 生理科学进展 2011, 42(4): 246-250.
- [9] 肖力,孙林,刘伏友. 糖尿病肾病疾病蛋白尿形成机制新进展[J]. 中华肾脏病杂志 2010, 26(6): 478-480.
- [10] Han S Y, So G A, Jee YH, et al. Effect of retinoic acid in experimental diabetic nephropathy[J]. Immunol Cell Biol 2004, 82(6): 568.
- [11] Levin A, Rigatto C, Barrett B, et al. Biomarkers of inflammation, fibrosis, cardiac stretch and injury predict death but not renal replacement therapy at 1 year in a Canadian chronic kidney disease cohort[J]. Nephrol Dial Transplant 2014, 29(5): 1037-1047.
- [12] Barutta F, Piscitelli F, Pinach S, et al. Protective role of cannabinoid receptor type 2 in a mouse model of diabetic nephropathy[J]. Diabetes 2011, 60(9): 2386-2396.
- [13] 亢秋云,张晓东,方敬爱. 霉酚酸酯对糖尿病肾病肾组织Nephrin表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志 2008, 9(8): 700-701.
- [14] Huang K, Huang J, Chen C, et al. AP-1 regulates sphingosine kinase 1 expression in a positive feedback manner in glomerular mesangial cells exposed to high glucose[J]. Cell Signal 2014, 26(3): 629-638.
- [15] Utamura R, Fujihara C, Mattar A L, et al. Mycophenolate mofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes[J]. Kidney Int 2003, 63(1): 209-216.
- [16] Nakanishi T, Morokata T, Noto T, et al. Effect of the inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibitor BMS-566419 on renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction in rats[J]. Int Immunopharmacol 2010, 10(11): 1434-1439.
- [17] Wang P, Li M, Liu Q, et al. Detection of urinary podocytes and nephrin as markers for children with glomerular diseases[J]. Exp Biol Med (Maywood) 2015, 240(2): 169-174.