

格列齐特对 2 型糖尿病大鼠肾脏组织中 HIF-1 α 和 VEGF 表达的影响

操 轩 胡亚琳

(黄石市中心医院 肾内科 湖北 黄石 435000)

【摘要】目的: 探讨分析格列齐特对 2 型糖尿病大鼠肾功能、肾脏病理学、缺氧诱导因子-1 α (hypoxia Inducible factor-1 α ,HIF-1 α) 及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor ,VEGF) 影响。方法: 48 只雄性 SD 大鼠 ,随机分为空白组(control group ,CG) 模型组(model group ,MG) 以及格列齐特组(gliclazide group ,GG) ,每组 16 只 ,MG 组和 GG 组高脂饮食 6 个月诱导 2 型糖尿病大鼠模型 ,造模成功后 GG 组给予格列齐特 24 mg/(kg · d) 灌胃治疗 ,其他二组予生理盐水参照; 治疗 6 周和 12 周后 ,每组均处死大鼠各半 ,收集血清及肾脏行相关检测。结果: CG 肾组织切片层次分明 ,无炎症反应 ,MG 组有明显的炎症反应 ,治疗 6 周后明显改善 ,治疗 12 周后进一步改善; 治疗 6 周后血清肾功能指标血尿素氮、血肌酐和血尿素 GG 组明显低于 MG 组($P < 0. 05$) ,治疗 12 周后进一步降低; 肾组织 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白和 mRNA 表达 ,治疗 6 周后 GG 组明显低于 MG 组($P < 0. 05$) ,治疗 12 周后进一步降低。结论: 格列齐特可抑制 HIF-1 α 及 VEGF 的表达 ,改善 2 型糖尿病大鼠肾功能。

【关键词】格列齐特; 缺氧诱导因子-1 α ; 血管内皮生长因子; 2 型糖尿病; 大鼠

【中图分类号】R 587. 1; R 965 **【文献标识码】**A

【DOI】10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2016. 01. 003

Effects of gliclazide on the HIF-1 α and VEGF expression in kidney tissue of type 2 diabetic rats

CAO Xuan HU Yalin

Department of Kidney ,Huangshi Central Hospital ,Huangshi 435000 ,China

【Abstract】Objective: To investigate the effects of gliclazide on the kidney function ,pathology and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in type 2 diabetic rats induced by high fat diet. **Methods:** Forty-eight male SD rats were randomly divided into control group (CG) ,model group (MG) and gliclazide group (GG) ($n = 16$ for each) ,Rats in MG and GG groups were given high fat diet for six months to induce type 2 diabetic models. The eligible animals in GG group were intragastrically administered with gliclazide in dose of 24 mg/(kg · d) and the other two with saline as placebo. By the 6th week and 12th week after treatment ,half of rats in each group were sacrificed to obtain the serum and kidney tissues for examination. **Results:** Renal tissue sections in the CG group remained distinct with no inflammatory reaction. Although the renal tissues in MG group demonstrated significant inflammation ,yet it was managed and improved after 6 and 12 weeks of treatment ,respectively. The index suggestive of renal function ,including blood urea nitrogen ,serum creatinine and blood urea was significantly reduced in GG group by the 6th week ,further decrease occurred by the 12th week($P < 0. 05$) . Expression of HIF-1 α ,VEGF protein and mRNA in the renal tissues was significantly lower in GG group than MG group after six week of treatment ,and the expression was further down-regulated by the 12th week($P < 0. 05$) . **Conclusion:** Gliclazide may inhibit the expression of HIF-1 α and VEGF and improve kidney function of type 2 diabetic rats induced by high fat diet.

【Keywords】gliclazide; HIF-1 α ; VEGF; type 2 diabetes; rats

糖尿病与肿瘤、心血管疾病并称为威胁人类健康的三大慢性非传染性疾病^[1]。本病危害不仅是血糖升高 ,由血糖升高带来的心脑血管、肾病等也严重危害人们的健康 ,有研究显示在所有血透治疗患

者中糖尿病肾病处于第二位 ,因此糖尿病肾病已经成为威胁糖尿病患者健康的一大疾病^[2]。目前认为血脂失调、血压异常、氧化应激以及血糖毒害等参与了肾病的进展 ,而上述学说均与肾缺氧密不可

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2013CFC058)

收稿日期: 2015-07-07

作者简介: 操 轩(1972-) ,男 ,副主任医师 ,硕士 ,(电话) 13971751872 ,(电子信箱) cxhy4678@163. com;

胡亚琳 ,女 ,主任护师 ,(电子信箱) yalinhu123@126. com ,通讯作者。

分^[3]。肾脏缺氧可诱导肾脏组织中缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 表达升高, HIF-1 α 表达升高又可激活血管内皮生长因子(VEGF) 表达, 最终造成肾脏病理反应^[4]。本研究以高糖高脂喂养诱导 2 型糖尿病大鼠, 分析格列齐特治疗后, 其肾脏组织中 HIF-1 α 和 VEGF 表达特点, 为格列齐特的药物开发和本病的治疗提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 清洁级雄性 SD 大鼠 48 只 [合格证号: SCXK(鄂) 2010-0004], 体质量 180 ~ 200 g 随机分为空白组(CG), 模型组(MG) 以及格列齐特组(GG), 每组 16 只(为保证实验顺利进行, 研究设计时, MG 组和 GG 组各增加了 6 只大鼠, 期间 MG 组死亡 4 只, GG 组死亡 5 只)。

1.2 试剂盒及相关材料 血尿素氮、血肌酐和血尿素试剂盒购于南京建成生物工程研究所; 琼脂糖购自上海仁凯生物科技有限公司; 引物为生工生物(上海)股份有限公司购买, 总 RNA 提取试剂盒购自北京博凌科为生物公司, 多克隆抗体 HIF-1 α 、单克隆抗体 β -actin 以及 ECL 发光试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司, 单克隆抗体 VEGF 购于 Abcam 公司; 二抗购于金斯瑞生物科技有限公司; ChemiDox XRS 凝胶成像仪购于 BIO-RAD 公司; 溴化乙锭购于上海联硕生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 2 型糖尿病模型的建立及给药方法 造模时间为 6 个月(每只大鼠连续 3 天大鼠空腹血糖高于 11.1 mol/L 时确认大鼠造模成功^[5]), 造模成功后 GG 给予格列齐特 24 mg/(kg·d) 灌胃治疗, CG 和 MG 组予生理盐水参照, 治疗 6 周和 12 周后, 每组处死大鼠各半, 收集血清以及肾脏检测。

1.3.2 标本采集 大鼠麻醉用水合氯醛腹腔注射, 大鼠麻醉后绑定, 碘酒消毒后, 沿腹中线切开暴露腹腔, 迅速掏出肾脏, 肾脏取出后置于 -86 °C 超低温冰箱保存; 之后用注射器心脏迅速取血, 血液提取后用 3000 r/s 低温离心机离心, 之后取血清, 并置于 -86 °C 超低温冰箱保存。

1.4 HE 染色 肝脏取出后, 统一切肝左叶四分之一置于 4% 的中性多聚甲醛溶液中保存, 之后交由我院病理科完成, 得到切片后, 光镜观察照相。

1.5 半定量 PCR 取出肾脏小心称取 30 mg 用碾磨棒碾磨匀浆, 匀浆后用组织总 RNA 提取试剂盒提

取总 RNA(总 RNA 提取后行凝胶电泳, 见图 1, 从图 1 可以看出, 总 RNA 提取较好), 总 RNA 提取后, 取 1 μ L 行定量并调平, 之后参照文献 [6] 进行 PCR 扩增 mRNA 和电泳, 电泳完成后凝胶成像仪采集图像, Image J 计算灰度值, 采用 β -actin, 每组实验重复 3 次, 引物序列如下, HIF-1 α 引物设计为: Primer A: 5'-AATGGGATCGTGAAACGCCG-3', Primer B: 5'-AGGGGAGCATGTTCTGATG-3'。VEGF 引物设计为 Primer A: 5'-AGTCACCATGGGAAGAGACT-3', Primer B: 5'-CTGTTCCGTCGACCACCATT-3'。 β -actin 引物设计为 Primer A: 5'-CTGACGGAGCGC-CAAGCAAGAG-3', Primer B: 5'-ACGCACTGTAACT-TGGGAAGTGTGG-3'。

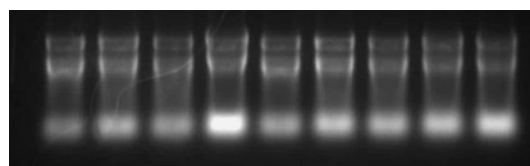


图 1 mRNA 提取后电泳图

1.6 Western Blot 检测 称取肾脏 100 mg 用电子匀浆机磨碎, 低温高速匀浆机离心, 速度为 4000 r/min, 离心后取上清液分装于 1 mL 的离心管中并置于超低温冰箱中保存, 使用时每组各取样本 80 μ g 进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 电泳按照文献 [6] 进行, 收集到电泳图片后用 Image J 计算各条带的灰度值, 本次内参采用 β -actin, 每组试验重复至少 3 次。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 12.0 对数据进行统计学处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用 F 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验大鼠一般情况 CG 组大鼠毛发整齐, 精神活跃, 饮食、饮水以及相应的日常活动均正常; 造模成功后 MG 组和 GG 组大鼠造模毛发明显杂乱, 同时出现多尿、多饮、多食等典型糖尿病症状。

2.2 各组大鼠血糖、胰岛素和胰岛素抵抗指数变化特点 CG 组大鼠 FBG 和 HOMA-IR 均较低, FINS 较高, MG 组和 GG 相较于 CG 组, FBG 和 HOMA-IR 明显升高, FINS 明显降低, 提示大鼠已经形成了明显的高血糖和低胰岛素血症 2 型糖尿病大鼠基本造模成功, 详见表 1。

表1 各组大鼠FBG、FINS及LnHOMA-1R表达变化

组别	FBG/(mmol/L)	FINS/(mIU/L)	Ln/HOMA-1R
CG	5.44 ± 0.36	20.17 ± 2.16	1.61 ± 0.04
MG	16.34 ± 2.88*	16.21 ± 2.11*	2.54 ± 0.07*
GG	16.71 ± 1.87*	16.44 ± 2.62*	2.52 ± 0.11*
F 值	10.87	31.89	17.39
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

注:与CG相比* P<0.05。

2.3 HE染色 CG组大鼠肾脏结构清晰,肾小球以及肾小管形状也较为致密和规则,MG组大鼠肾小管较大,肾小球受到了一定的挤压,为轻微的炎症反应,治疗6周后,大鼠肾小管逐步缩小,细胞趋于致密,治疗12周后,大鼠肾脏结构清晰,肾小球、肾小管形状较为规则,但仍有一定的炎症反应,详见

图2。

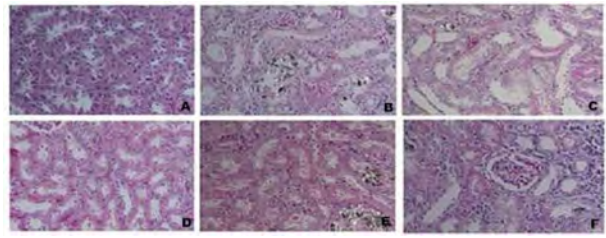


图2 大鼠肾脏切片 HE 染色

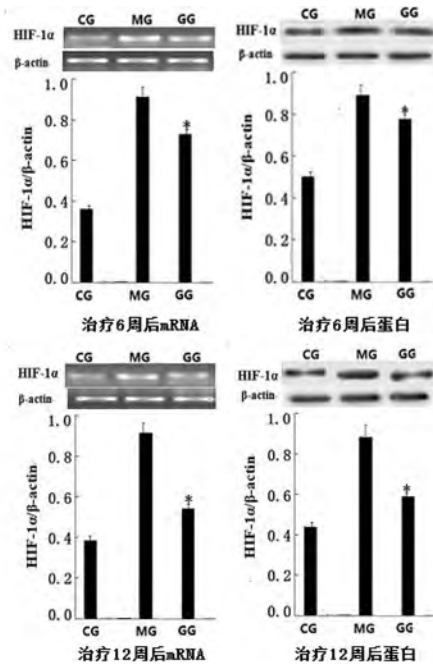
2.4 肾功能检测结果 治疗6周后,GG组与MG组相比,血尿素氮、血肌酐以及血尿酸含量明显降低(P<0.05),治疗12周后进一步降低,详见表2。

表2 治疗6周、12周后大鼠肾功能比较

组别	血尿素氮/(mmol/L)		血肌酐/(μmol/L)		血尿酸/(μmol/L)	
	6周	12周	6周	12周	6周	12周
CG	8.87 ± 1.96	8.92 ± 2.07	11.71 ± 3.16	11.68 ± 2.57	112.55 ± 23.11	114.15 ± 24.36
MG	13.14 ± 4.21	13.20 ± 4.05	17.46 ± 2.96	17.29 ± 2.05	165.26 ± 36.52	167.39 ± 31.62
GG	11.12 ± 3.21*	9.54 ± 2.89*	14.72 ± 3.75*	12.32 ± 3.15*	136.01 ± 26.46*	116.50 ± 24.11*
F 值	27.00	13.32	10.87	16.16	17.39	31.19
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

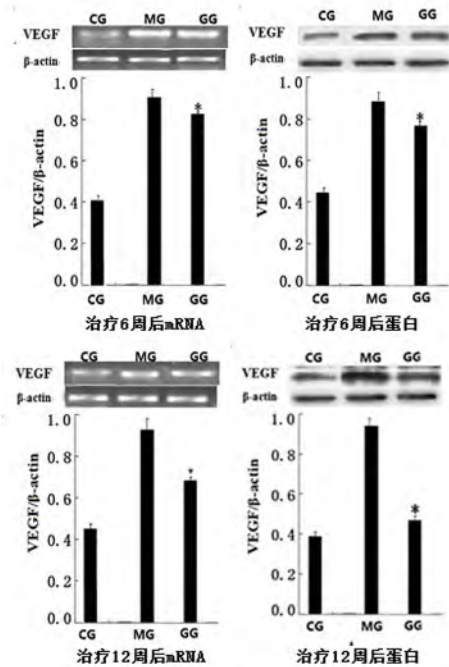
注:与MG相比,* P<0.05。

2.5 大鼠 HIF-1α、VEGF mRNA 和蛋白表达 与MG组相比,治疗6周后GG组大鼠肝脏 HIF-1α、VEGF mRNA 和蛋白表达均明显降低(P<0.05),治疗12周后进一步降低(详见图3、4)。



与MG组相比* P<0.05。

图3 肾脏组织中 HIF-1α mRNA 和蛋白的表达



与MG组相比,* P<0.05。

图4 肾脏组织中 VEGF mRNA 和蛋白的表达

3 讨论

2型糖尿病是以胰岛素抵抗及胰岛功能受损为主要特点的一种病症。胰岛功能受损可引起胰岛素

分泌不足,最终造成血糖和血脂代谢异常,血脂和血糖代谢长期异常,又可造成患者发生器质性病变,其中肾脏为人体最重要的排泄器官,2型糖尿病的发生会导致其发生缺氧,进而导致肾功能受损及结构异常,同时由于2型糖尿病本身除糖脂代谢异常外,还可造成炎症反应和氧化应激,这些均可造成患者发生肾脏损害^[7]。由于本病比单纯肾脏病更加棘手,因此有学者建议对本病应注重防治,延缓其进展,对保护2型糖尿病患者肾脏具有十分重要的意义^[8]。

当前2型糖尿病患者肾脏组织缺氧已经得到研究证实,肾脏缺氧最直接的危害是造成HIF-1 α 表达异常增高,HIF-1 α 几乎参与了哺乳动物所有器官的缺氧应答^[9-10]。HIF-1 α 本身属于应激蛋白,其主要介导机体对应缺氧状态,同时其也可以引起缺血/缺氧诱导下游基因的调控,促使下游基因分泌,造成相关基因表达^[11],肾脏细胞糖酵解反应即为其中之一,当肾脏组织发生缺血/缺氧表现时,HIF-1 α 自身会大量分泌,加强细胞糖酵解反应,以弥补缺氧引起的细胞供能不足^[12];此外HIF-1 α 分泌的增加可刺激VEGF分泌,诱导新生血管形成,而高分泌的VEGF又可增加血管通透性,进而改变肾小球滤过膜通透性,导致患者发生蛋白尿等典型肾脏损害表现^[13-15]。

本次实验采用高脂饮食建立2型糖尿病大鼠模型,观察格列齐特对肾脏组织中HIF-1 α 及VEGF蛋白表达的影响,研究结果显示格列齐特治疗后大鼠肾组织病理形态学明显改善,但仍然有一定炎症反应,这提示格列齐特虽然不能治疗2型糖尿病肾病,但可以延缓其进展;此外治疗后血尿素氮、肌酐和血尿素GG组明显低于MG组($P < 0.05$),提示格列齐特可改善2型糖尿病大鼠肾功能;治疗后大鼠肾组织HIF-1 α 及VEGF蛋白和mRNA表达GG组明显低于MG组($P < 0.05$),提示格列齐特可以调节HIF-1 α 及VEGF蛋白和mRNA表达,有利于延缓血糖和血脂异常造成的大鼠肾脏损害。

综上所述,格列齐特可抑制HIF-1 α 及ET-1表达,改善2型糖尿病大鼠肾功能,但其是直接作用于HIF-1 α 及ET-1表达还是通过降低血糖改善表达的,仍有待于今后进一步研究。

【参考文献】

- [1] 韩卓笑,牛尚梅,王芸,等.肥胖与2型糖尿病肾病的研究进展[J].医学综述,2015,21(3):488-490.
- [2] BONDEVA T, HEINZIG J, RUHE C, et al. Advanced glycated end-products affect HIF-transcriptional activity in renal cells [J]. Mol Endocrinol, 2013, 27(11): 1918-1933.
- [3] NOLAN KA, BRENNAN EP, SCHOLZ CC, et al. Paricalcitol protects against TGF- β 1-induced fibrotic responses in hypoxia and stabilises HIF- α in renal epithelia [J]. Exp Cell Res, 2015, 330(2): 371-381.
- [4] KHAMAISI M, FOUKAN H, AXELROD JH, et al. Endothelin-converting enzyme is a plausible target gene for hypoxia-inducible factor [J]. Kidney Int, 2015, 87(4): 761-770.
- [5] KUNTZ E, PINGET M, DAMGÉC. Effects of cholecystokinin octapeptide on the exocrine pancreas in a new rat model of type 2 diabetes [J]. Eur J Pharmacol, 2002, 448(2-3): 253-261.
- [6] 武俊紫,牛世伟,贾亚敏,等.富硒灵芝对非酒精性脂肪性肝病大鼠酰基辅酶A氧化酶水平的影响[J].重庆医学,2014,43(32):4346-4349.
- [7] 佟之复,李宁华,苗俊梅.2型糖尿病肾病流行病学研究进展[J].中国老年学杂志,2001,21(3):241-243.
- [8] 王爱民,雷闽湘,刘泽灏,等.2型糖尿病肾病危险因素分析[J].中国现代医学杂志,2005,15(1):116-119.
- [9] 姚军萍,周珏,徐又海. COX-2和HIF-1 α 在非霍奇金淋巴瘤组织中的表达[J].皖南医学院学报,2010,29(4):255-258.
- [10] 姚军萍,汪兴洪,苏贵平.多发性骨髓瘤中缺氧诱导因子-1 α 和VEGF的表达及相关性研究[J].皖南医学院学报,2012,31(1):21-22.
- [11] ZHANG C, XIAO C, WANG P, et al. The alteration of Th1/Th2/Th17/Treg paradigm in patients with type 2 diabetes mellitus: Relationship with diabetic nephropathy [J]. Hum Immunol, 2014, 75(4): 289-296.
- [12] BAI X, GENG J, LI X, et al. VEGF-A inhibition ameliorates podocyte apoptosis via repression of activating protein 1 in diabetes [J]. Am J Nephrol, 2014, 40(6): 523-534.
- [13] TAIANA MM, LOMBARDI R, PORRETTA-SERAPIGLIA C, et al. Neutralization of schwann cell-secreted VEGF is protective in vitro and in vivo experimental diabetic neuropathy [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e108403.
- [14] 徐向进,陈频,郑全林,等.吡格列酮下调糖尿病大鼠肾脏组织缺氧诱导因子1 α 及血管内皮生长因子的表达[J].中华内分泌代谢杂志,2010,26(10):885-888.
- [15] THALLAS-BONKE V, JHA JC, GRAY SP, et al. Nox-4 deletion reduces oxidative stress and injury by PKC- α -associated mechanisms in diabetic nephropathy [J]. Physiol Rep, 2014, 2(11): e12192.