

利格列汀对2型糖尿病大鼠肾组织纤维化过程中骨膜蛋白及转化生长因子- β 1的影响

弓慧杰^{1,2}, 张光明²

(1. 四川省成都市新都区人民医院内分泌肾病血液内科, 成都 610500; 2. 西南医科大学病理生理研究室, 泸州 646000)

[摘要] **目的** 通过观察利格列汀对2型糖尿病大鼠肾组织纤维化过程中骨膜蛋白(periostrin)及转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)的影响, 探讨利格列汀治疗糖尿病肾病患者的抗炎、抗纤维化等保护机制。**方法** 24只SD大鼠采用腹腔注射链脲佐菌素的方式建立2型糖尿病大鼠模型, 另取12只SD大鼠注射等剂量的柠檬酸缓冲液作为对照组。糖尿病模型大鼠分为模型组及治疗组。治疗组大鼠予以利格列汀($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)持续灌胃12周, 其他2组予以等量生理盐水灌胃。12周后取材, HE染色和Masson染色法观察肾组织病理学变化, 分别采用免疫组织化学法和RT-PCR法检测各组大鼠肾组织中骨膜蛋白和TGF- β 1蛋白及mRNA的表达水平。**结果** 与对照组相比, 模型组大鼠的肾间质有大量被深染为蓝色的炎性细胞浸润, 治疗组则有较少的炎性细胞浸润; 模型组的肾间质纤维含量比对照组增多, 而治疗组的纤维化不明显。与对照组相比, 模型组大鼠的肾脏组织中骨膜蛋白和TGF- β 1蛋白表达水平及mRNA含量均明显升高($P < 0.05$); 与模型组相比, 治疗组大鼠的肾脏组织中骨膜蛋白和TGF- β 1蛋白表达水平及mRNA含量均明显降低($P < 0.05$)。**结论** 利格列汀可通过抑制2型糖尿病大鼠肾脏组织中TGF- β 1的过表达, 下调骨膜蛋白表达, 减缓肾组织纤维化进程。

[关键词] 利格列汀; 糖尿病肾病; 肾脏纤维化; 骨膜蛋白; 转化生长因子- β 1; 大鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)02-0135-06

Effects of Inagliptin on the Expression of Periosteal and TGF- β 1 in Renal Fibrosis of Type 2 Diabetic Rats

GONG Huijie^{1,2}, ZHANG Guangming²

(1. Department of Endocrinology, Nephropathy and Hematology, Chengdu Xindu District People's Hospital, Chengdu 610500, China; 2. Department of Pathophysiology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

Correspondence to: ZHANG Guangming, E-mail: 770930017@qq.com

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the effect of linagliptin on the expression of periostin and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in the process of renal tissue fibrosis in type 2 diabetic rats, and explore the anti-inflammatory and anti-fibrotic protective mechanism of linagliptin on diabetic nephropathy. **Methods** Totally twenty-four SD rats were injected with streptozotocin in intraperitoneal to replicate the type 2 diabetes rats, and another 12 SD rats were injected with the same dosage of citrate buffer as the control group. The type 2 diabetic rats were randomly divided into two groups: model group and treatment group. The rats in the treatment group were continuously given linagliptin ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) for 12 weeks, and the other two groups were given the same amount of normal saline. The pathological changes of renal were observed by HE staining and Masson staining. Immunohistochemistry and RT-PCR were used to detect the expressions of periostin and TGF- β 1 protein and mRNA levels in kidney tissues of rats, respectively. **Results** HE staining showed that compared with the control group, there were a large number of inflammatory cells in the renal stroma in the model group, while there were less inflammatory

[作者简介] 弓慧杰(1984—),男,硕士,主治医师,研究方向:糖尿病肾病微血管并发症。E-mail: 82295788@qq.com

[通信作者] 张光明(1970—),男,主任医师,研究方向:糖尿病微血管并发症。E-mail: 770930017@qq.com

cells in the treatment group. Masson staining showed that compared with the control group, there were more collagen fibers in renal interstitial in the model group, while the collagen fibers in the treatment group was not obvious. Immunohistochemistry and RT-PCR showed that compared with control group, the protein and mRNA expressions of periostin and TGF- β 1 in rat renal in model group were significantly increased ($P < 0.05$), while they were decreased in treatment group ($P < 0.05$). **Conclusion** Inaglipatin maybe reduce the protein expression of periostin by inhibiting the overexpression of TGF- β 1 in the kidney of type 2 diabetic rats, and slow down the progression of renal fibrosis.

[Key words] Inaglipatin; Diabetic nephropathy; Renal fibrosis; Periostin; Transforming growth factor- β 1; Rats

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最常见、最严重的微血管并发症, 其主要表现为肾脏纤维化, 最终发展为终末期肾病, 是导致慢性肾功能衰竭的主要原因之一^[1]。肾脏纤维化的病理生理变化是肾脏固有细胞被大量细胞外基质取代, 分泌大量炎症介质及细胞因子, 从而破坏肾脏正常结构^[1]。骨膜蛋白 (periostin) 是一种细胞外基质蛋白, 研究发现在侵袭、迁移及黏附能力明显提高的细胞内其表达水平明显升高^[2]。另外在以机体组织纤维化及迁移为特点的病理生理过程中, 骨膜蛋白通过对胶原蛋白的调节, 参与肾脏纤维化^[3]。转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 是引起肾脏损伤的重要炎症因子之一, 也是单核巨噬细胞等分泌的具有多种生物学功能的细胞因子, 在肾脏纤维化进展过程中发挥重要的促进作用。利格列汀 (Inaglipatin) 是一种二肽基肽酶4 (dipeptidyl peptidase-4, DPP-4) 抑制剂, 通过高效地选择性抑制 DPP-4 来调节血糖, 具有一定的肾脏保护作用^[4]。本实验以2型糖尿病大鼠为研究对象, 观察肾组织纤维化过程中骨膜蛋白和 TGF- β 1 的表达变化, 以及利格列汀是否会影响这两个指标的表达水平, 为治疗糖尿病肾病提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

雄性SD大鼠36只, 体质量为230~250 g, 由西南医科大学实验动物中心 [SCXK (川) 2018-17] 提供, 动物质量合格证号为川医动字第2401115, 饲养于西南医科大学实验动物中心 [SYXK (川) 2018-065] 的屏障环境。动物实验经西南大学动物福利伦理委员会审查批准 (文号: IACUC2018001592)。

1.1.2 实验仪器

微型凝胶电泳仪 (日本 Mupid 公司), 全光谱酶标

读数仪 (10~240 VAC, 美国 Thermo 公司), 紫外分光光度计 (JC-UT2000 型, 成都光学仪器厂), 凝胶图像扫描系统 (Tannon 2500 型, 美国 BioRad 公司), 光学显微镜 (AX-72 型, 日本 Olympus 光学仪器公司)。

1.1.3 主要试剂

利格列汀片 (欧唐宁[®], 批号 H20130865, 美国 Eli Lilly and Company 公司), TRIzol 试剂盒及 RT-PCR 试剂盒 (成都市博瑞克生物技术有限公司), 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) (美国 Sigma 公司), ELISA 试剂盒 (上海西唐生物科技有限公司), SP 免疫组化检测试剂盒 (泉州市睿信生物科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 糖尿病大鼠模型建立及分组

24 只大鼠禁食不禁水 12 h 后, 称其体质量并腹腔注射 60 mg/kg 的 STZ, 建立糖尿病模型。另外 12 只 SD 大鼠注射等剂量的柠檬酸缓冲液, 作为对照组。注射 STZ 的大鼠 48 h 后尾静脉取血, 测空腹血糖水平, 血糖浓度 ≥ 16.7 mmol/L 的大鼠确定为造模成功。24 只大鼠均造模成功。将造模成功的大鼠随机分为糖尿病模型组及治疗组, 每组各 12 只。治疗组大鼠予以利格列汀 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 持续灌胃 12 周, 模型组及对照组予以等剂量的生理盐水 (即 0.9% NaCl 溶液) 灌胃相同时间。实验期间各组大鼠均给予普通饲料喂养, 12 周后 3 组大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉, 开腹取肾脏备用。

1.2.2 肾脏切片 HE 染色观察

将大鼠肾脏组织用 4% 甲醛溶液固定 2~3 h 后包埋并切片; 切片置入苏木精染液中 5 min, 自来水充分清洗后置于 1% 的盐酸乙醇溶液中分化数秒, 用自来水冲洗; 再次将切片置入伊红染液中染色 5 min, 充分清洗; 再次将切片置于梯度乙醇溶液及无水乙醇中脱水 5 min, 放入二甲苯中透明 5 min 后, 用树胶封固。光学显微镜 (100 倍、200 倍) 下观察, 拍照。

1.2.3 RT-PCR检测肾脏组织中骨膜蛋白和TGF- β 1 mRNA 转录水平

依据 TRIzol 试剂盒说明书提取各组大鼠肾脏组织中 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 然后采用紫外分光光度法测定 RNA 的纯度和浓度。采用反转录试剂盒将总 RNA 进行反转录, 分别得到模板单链 cDNA 后进行 PCR 反应。骨膜蛋白上游引物序列为 5'-GCTGGCACCTGTGAATA-3', 下游引物序列为 5'-TCTCCCTTGCTTACTCC-3', 目标产物长度为 252 bp; TGF- β 1 基因上游引物序列为 5'-TGGAAACGACCTTCTATGACGATG-3', 下游引物序列为 5'-TGATGTGCCCCGTGCTGGAC-3', 目标产物长度为 195 bp。GAPDH 上游引物序列为 5'-CAACTCCCTCAAGATTGT CAGCAA-3', 下游引物序列为 5'-GGCATGGACTGTG GTCATGA-3', 目标产物长度为 207 bp。PCR 反应体系: dNTP 原料混合液 10 μ L, 转录酶 0.5 μ L, RT-PCR 增强剂 0.25 μ L, 模板 cDNA 5 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 无核酸酶水 2.25 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 30 s 变性, 50 $^{\circ}$ C 10 s 退火, 70 $^{\circ}$ C 30 s 延伸, 35 个循环。反应后的产物经琼脂糖凝胶电泳, 分离目的条带, 拍照。最终结果以目的基因与内参 GAPDH 光密度的比值表示骨膜蛋白、TGF- β 1 的 mRNA 转录情况。

1.2.4 免疫组织化学法检测肾脏组织中骨膜蛋白和 TGF- β 1 蛋白表达

将大鼠肾脏组织制作切片标本, 然后用磷酸缓冲

盐溶液清洗, 冷丙酮 4 $^{\circ}$ C 固定 15 min 后, 再次磷酸缓冲盐溶液漂洗; 3% 去离子水室温孵育 15 min 后血清封闭, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 加入兔抗鼠骨膜蛋白一抗或马抗鼠 TGF- β 1 一抗 (工作液体积稀释比例分别为 1:200、1:100), 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h; 磷酸缓冲盐溶液漂洗, 加入山羊抗兔二抗或兔抗马二抗 (工作液体积稀释比例分别为 1:50、1:100), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 磷酸缓冲盐溶液漂洗, 加 DAB 显色剂显色。光学显微镜 (400 倍) 下选取 30 个随机视野, 摄影, 然后使用 IPP 软件分析平均积分光密度 (integral optical density, IOD), 以此反映骨膜蛋白和 TGF- β 1 蛋白的含量。

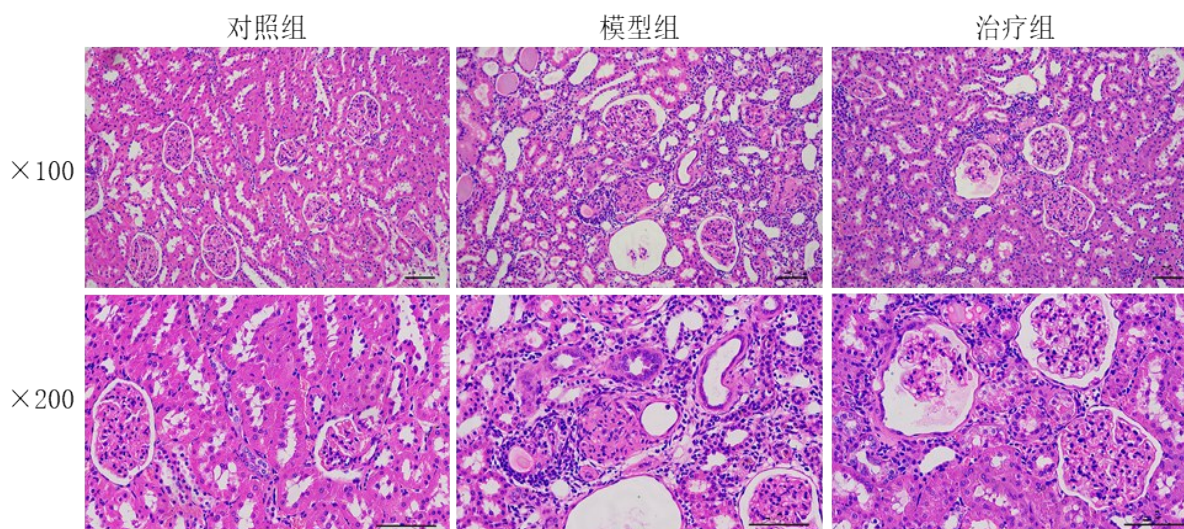
1.3 统计方法

采用统计软件 SPSS 22.0 进行结果分析。各实验的检测数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 利格列汀抑制糖尿病模型大鼠的肾组织纤维化

HE 染色后光学显微镜下观察结果 (图 1) 显示, 对照组大鼠的肾小球分布相对密集, 大部分呈椭圆形, 外周光滑; 血管球内毛细血管分布也密集; 肾小管的管腔光滑、规整。与对照组比较, 糖尿病模型组大鼠的肾皮质内小叶间动脉、入球小动脉、弓形动脉的管



注: 上下两行图片中比例尺大小分别为 10 μ m 和 20 μ m。

图1 HE 染色显示各组大鼠肾脏组织病理学特征 (×100, ×200)

Figure 1 The pathological characteristics in renal interstitium of rats detected by HE staining (×100, ×200)

壁明显增厚,管腔明显变小;细胞外基质增多;有大量染色较深且核质比例相对较大的炎性细胞浸润,肾小管明显扩展;肾小球出现萎缩,纤维化明显。治疗组较模型组的纤维化病变明显减轻。

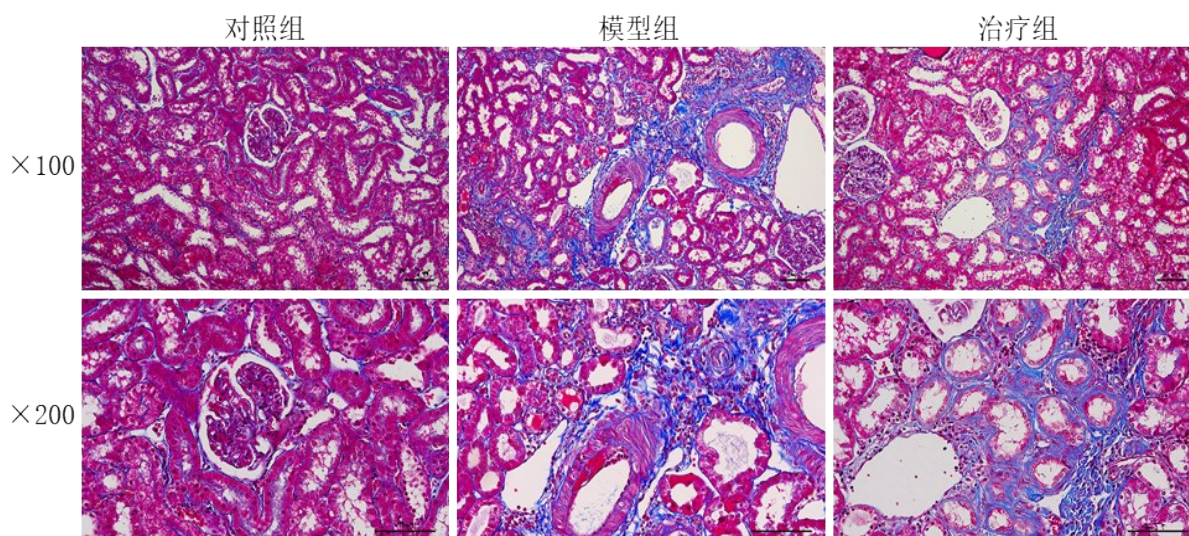
2.2 利格列汀抑制糖尿病模型大鼠的肾小管间质病变

Masson 染色结果显示,肾脏胶原着色主要位于 Bowman 囊、肾小球基底膜和肾小管微血管周围。与对照组相比,糖尿病模型组大鼠的肾间质宽度增加,系膜基质增生,肾小管管腔扩张,肾间质深蓝色胶原

沉积显著。治疗组大鼠的肾小管间质病变明显轻于模型组(图2)。

2.3 利格列汀下调糖尿病模型大鼠肾脏组织中骨膜蛋白和 TGF- β 1 mRNA 转录

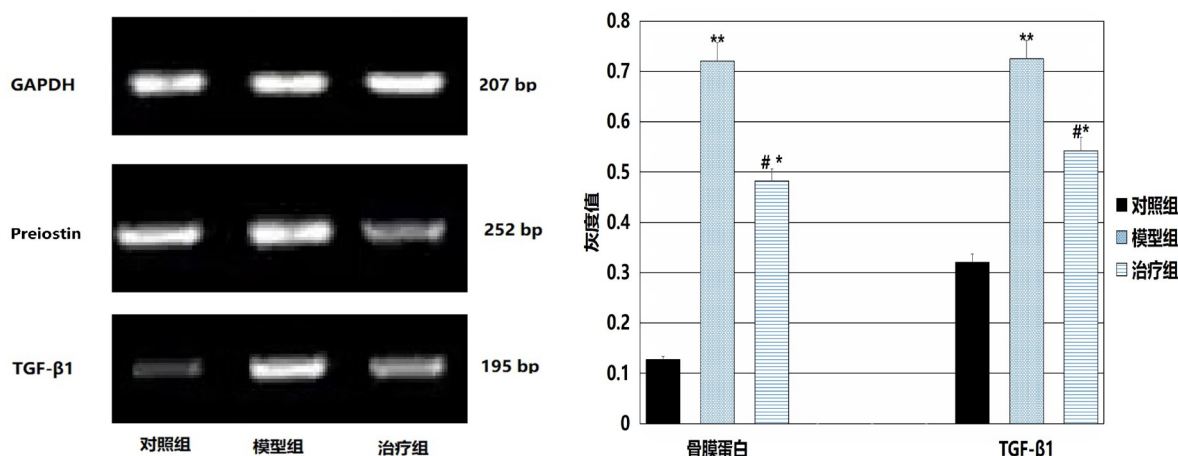
RT-PCR 检测结果显示,与对照组相比,糖尿病模型组大鼠肾脏组织中骨膜蛋白和 TGF- β 1 mRNA 表达水平显著升高,差异有统计学意义($P=0.0315$);与糖尿病模型组比较,治疗组糖尿病大鼠肾脏组织中骨膜蛋白和 TGF- β 1 mRNA 表达水平明显下降,差异有显著的统计学意义($P=0.0072$)(图3)。



注:上下两行图片中比例尺大小分别为10 μ m和20 μ m。

图2 Masson 染色显示各组大鼠肾组织($\times 100$, $\times 200$)

Figure 2 The pathological characteristics in renal interstitium of rats detected by Masson staining ($\times 100$, $\times 200$)



注: TGF- β 1 即转化生长因子- β 1。每组大鼠12只,与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

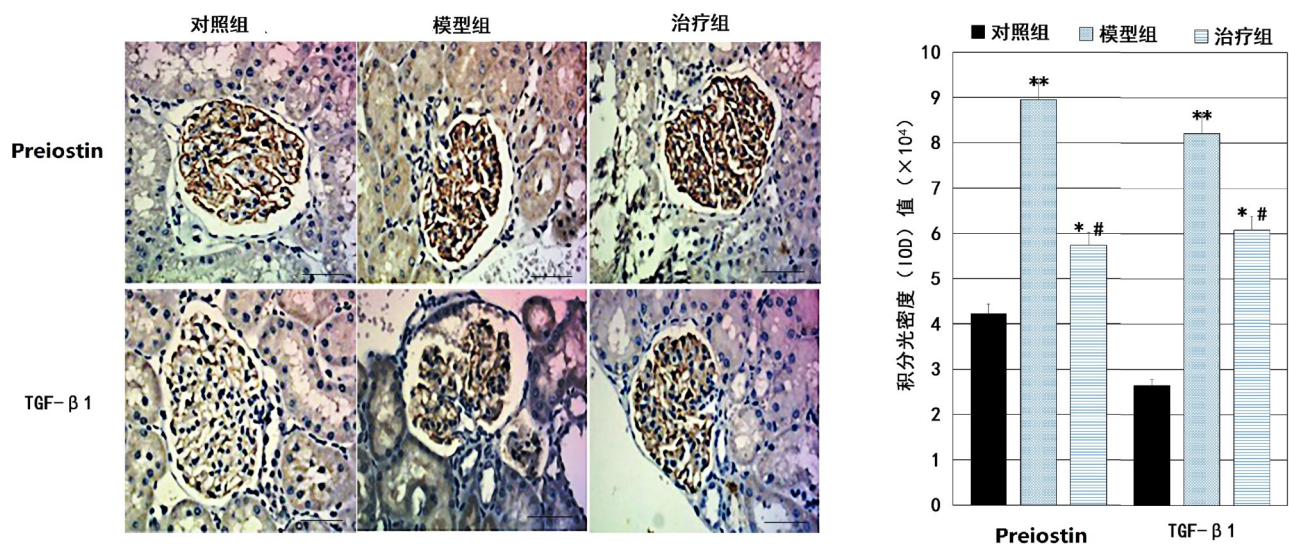
图3 RT-PCR 法检测各组大鼠肾脏组织中骨膜蛋白和 TGF- β 1 mRNA 表达

Figure 3 The expressions of periostin and TGF- β 1 mRNA of in renal renal interstitium of rats detected by RT-PCR

2.4 利格列汀下调糖尿病模型大鼠肾脏组织中骨膜蛋白和TGF- β 1蛋白表达

免疫组织化学法检测结果(图4)显示,与对照组相比,糖尿病模型组大鼠肾脏组织中骨膜蛋白和TGF-

β 1表达水平偏高,差异有统计学意义($P=0.0038$);与糖尿病模型组相比,治疗组糖尿病大鼠肾脏组织中骨膜蛋白和TGF- β 1表达水平明显下调,差异有统计学意义($P=0.0370$)。



注: TGF- β 1即转化生长因子- β 1。每组大鼠12只,与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。比例尺=5 μ m。

图4 免疫组织化学法检测各组大鼠肾组织骨膜蛋白和TGF- β 1的表达变化(DAB染色,×400)

Figure 4 The expressions of periostin and TGF- β 1 protein in renal renal interstitium of rats detected by immunohistochemistry (DAB, ×400)

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病晚期出现的一种严重的微血管并发症,是临床上糖尿病患者主要的死亡原因之一,患者死亡率远大于其他慢性肾脏病患者。肾脏纤维化是糖尿病肾病进展的主要特征,其表现为肾脏本身实质细胞合成细胞外基质增多。研究发现,肾脏纤维化进展与肾素-血管紧张素-醛固酮系统、炎症反应及氧化应激密切相关,其中TGF- β 1对信号转导发挥着重要作用^[5]。因此,TGF- β 1及其下游的调节因子作为抗纤维化治疗的有效靶标,受到越来越多的关注^[6]。TGF- β 1是一种具有多项调节功能的纤维形成生长因子,可诱导肾脏血管内皮细胞向肌成纤维细胞转分化,在肾脏纤维化过程中起到关键决定性作用^[7]。推测TGF- β 1是糖尿病肾病纤维化过程中的核心因子,可通过促进肾脏实质细胞外基质蛋白的合成并抑制降解,诱导肾脏实质细胞发生炎症反应,加速糖尿病肾病的发展。因此,研究糖尿病肾病纤维化进展机制并开发有效的阻断药物,成为了目前迫切需要探讨的研

究内容之一。

骨膜蛋白作为一种细胞外基质蛋白,可以通过整合蛋白受体产生粘附作用,并与多种胶原蛋白结合,促进I型胶原蛋白、V型胶原蛋白、肝素黏连蛋白等的分泌及成熟,参与糖尿病肾病纤维化^[8]。骨膜蛋白是早期肾病肾小管损伤的敏感性生物标志物,并且与糖尿病肾病的并发症关系密切^[9]。有文献报告,受到损伤的急性肾小管上皮细胞中骨膜蛋白处于高表达状态,I型、III胶原蛋白表达增加,推测骨膜蛋白可能通过某种途径参与了III胶原蛋白形成^[11];然而这一结论还需要通过后续的体内外实验进行验证,例如将骨膜蛋白基因沉默质粒转染至糖尿病肾病大鼠肾小管上皮细胞,探讨骨膜蛋白调控III胶原蛋白的病理生理机制。另外,推测TGF- β 1作为糖尿病肾病纤维化过程中的核心因子,可能通过正相关调控骨膜蛋白的表达水平,加速糖尿病肾病进展。本实验结果证实,在糖尿病模型组中TGF- β 1和骨膜蛋白及其mRNA表达水平均明显升高($P<0.05$),提示两个指标之间有一定的相关性。

利格列汀是一种治疗2型糖尿病的药物,其作用模式是抑制胰高血糖素样肽1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 代谢。GLP-1 是一种肠促胰岛素,具有葡萄糖浓度依赖性。利格列汀还可以抑制胰高血糖素的释放^[11]。另外,利格列汀是一种DPP-4抑制剂,可能是治疗2型糖尿病肾病的一种潜在的新型药物^[12]。有文献报告,在糖尿病小鼠动物实验中,DPP-4治疗后TGF- β 1水平较对照组明显下降,说明在2型糖尿病大鼠实验中利格列汀不仅可以改善早期糖尿病肾病的血糖水平,而且还有保护肾脏功能及调节机体炎性状态的作用,在早期糖尿病肾病的病情控制中发挥着重要作用^[13]。本实验结果表明,糖尿病肾病大鼠经利格列汀干预后骨膜蛋白及TGF- β 1表达均明显下调,对肾脏纤维化有一定保护作用,这与文献[13]的研究结果一致。

综上所述,本实验中糖尿病模型组大鼠骨膜蛋白及TGF- β 1均处于高表达状态,而经利格列汀治疗后,骨膜蛋白和TGF- β 1蛋白表达及mRNA转录水平均明显下降。结合本实验结果推断,腹腔注射利格列汀可下调糖尿病小鼠肾脏中TGF- β 1水平,从而促进骨膜蛋白降解,延缓糖尿病肾脏纤维化的发生与发展。本研究结果提示,TGF- β 1可能是一个重要的调控因子,可能成为治疗糖尿病肾病进展的作用靶点,为糖尿病肾病纤维化的预防和治疗提供了新的思路。

[作者贡献]

弓慧杰: 实验的实施, 数据整理, 论文书写。

张光明: 实验指导, 论文修改。

[利益声明] 所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献]

- GENG J N, YU X Y, LIU C Y, et al. Herba artemisiae capillaris extract prevents the development of streptozotocin-induced diabetic nephropathy of rat[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018:5180165. DOI:10.1155/2018/5180165.
- RIENER M O, FRITZSCHE F R, SOLL C, et al. Expression of the extracellular matrix protein periostin in liver tumours and bile duct carcinomas[J]. Histopathology, 2010, 56(5):600-606. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2010.03527.x.
- STANSFIELD W E, ANDERSEN N M, TANG R H, et al. Periostin is a novel factor in cardiac remodeling after experimental and clinical unloading of the failing heart[J]. Ann Thorac Surg, 2009, 88(6):1916-1921. DOI:10.1016/j.athoracsurg.2009.07.038.
- KANG Y M, JUNG C H. Effects of incretin-based therapies on diabetic microvascular complications[J]. Endocrinol Metab (Seoul), 2017, 32(3):316-325. DOI:10.3803/EnM.2017.32.3.316.
- CHEN L, YANG T, LU D W, et al. Central role of dysregulation of TGF- β /Smad in CKD progression and potential targets of its treatment[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 101: 670-681. DOI:10.1016/j.biopha.2018.02.090.
- CHEN D Q, CAO G, CHEN H, et al. Gene and protein expressions and metabolomics exhibit activated redox signaling and Wnt/ β -catenin pathway are associated with metabolite dysfunction in patients with chronic kidney disease[J]. Redox Biol, 2017, 12: 505-521. DOI: 10.1016/j.redox.2017.03.017.
- CHUNG J H, HWANG H J, KIM S H, et al. Associations between periodontitis and chronic obstructive pulmonary disease: the 2010 to 2012 Korean national health and nutrition examination survey[J]. J Periodontol, 2016, 87(8):864-871. DOI:10.1902/jop.2016.150682.
- IEKUSHI K, TANIYAMA Y, AZUMA J, et al. Novel mechanisms of valsartan on the treatment of acute myocardial infarction through inhibition of the antiadhesion molecule periostin[J]. Hypertension, 2007, 49(6):1409-1414. DOI: 10.1161/HYPERTENSION.106.080994.
- 赵雪, 郝军, 戎赞华, 等. 敲低periostin对PDGF引起的系膜细胞增殖和细胞外基质表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(11): 1608-1612. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2019.11.023.
- AN J N, YANG S H, KIM Y C, et al. Periostin induces kidney fibrosis after acute kidney injury via the p38 MAPK pathway [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2019, 316(3): F426-F437. DOI: 10.1152/ajprenal.00203.2018.
- HASAN A A, HOCHER B. Role of soluble and membrane-bound dipeptidyl peptidase-4 in diabetic nephropathy[J]. J Mol Endocrinol, 2017, 59(1): R1-R10. DOI:10.1530/JME-17-0005.
- CIVANTOS E, BOSCH E, RAMIREZ E, et al. Sitagliptin ameliorates oxidative stress in experimental diabetic nephropathy by diminishing the miR-200a/Keap-1/Nrf2 antioxidant pathway[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2017, 10: 207-222. DOI:10.2147/DMSO.S132537.
- GANGADHARAN KOMALA M, GROSS S, ZAKY A, et al. Linagliptin limits high glucose induced conversion of latent to active TGF β through interaction with CIM6PR and limits renal tubulointerstitial fibronectin[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0141143. DOI: 10.1371/journal.pone.0141143.

(收稿日期: 2021-05-10 修回日期: 2021-10-25)

(本文编辑: 张俊彦, 周烁)