

二甲双胍对2型糖尿病模型大鼠尿nephlin排泄的影响

翟丽敏,叶山东*,顾俊菲,杨迪

(安徽医科大学附属省立医院内分泌科,安徽 合肥 230001)

[摘要] 目的:观察二甲双胍对2型糖尿病模型大鼠尿nephlin(UNE)排泄的动态影响,探讨二甲双胍对糖尿病肾小球足细胞的保护作用。方法:将高脂膳食联合小剂量链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)诱导的2型糖尿病大鼠随机分为3组:糖尿病模型组、二甲双胍干预组、优降糖干预组,并设正常对照组。干预前后监测血糖(BG)以及尿白蛋白(UALB)和尿nephlin排泄,8周末糖化血红蛋白(HbA1c)的变化。结果:①3组糖尿病大鼠BG及HbA1c均明显高于正常组($P < 0.05$);经二甲双胍和优降糖干预后,4、8周末2组BG和HbA1c均明显低于2型糖尿病模型组($P < 0.05$),但差异无统计学意义($P > 0.05$);②4、8周末各糖尿病大鼠尿白蛋白/肌酐比(UACR)明显高于正常组($P < 0.05$);与2型糖尿病模型组比较,二甲双胍和优降糖组UACR值明显降低($P < 0.05$),4周末,两干预组间无显著性差异($P > 0.05$),8周末,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$);③0、2周末,4组大鼠尿nephlin/肌酐比(UNER)差异无统计学意义,4、8周末,各糖尿病大鼠UNER均明显高于正常组($P < 0.05$),二甲双胍和优降糖干预组UNER明显低于糖尿病模型组($P < 0.05$),且二甲双胍组低于优降糖组($P < 0.05$);④Pearson相关分析显示UNER与UACR存在正相关($r=0.846, P < 0.05$)。结论:二甲双胍可以降低糖尿病肾病大鼠尿nephlin的排泄,提示对肾小球足细胞可能存在保护作用,该作用不完全依赖于血糖的降低。

[关键词] 糖尿病肾病;nephlin;二甲双胍;足细胞;优降糖;氧化应激

[中图分类号] R587.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)07-988-04

doi:10.7655/NYDXBNS20150717

Effects of metformin on urinary nephlin excretion in type 2 diabetes rats

Zhai Limin, Ye Shandong*, Gu Junfei, Yang Di

(Department of Endocrinology, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of metformin on urinary nephlin excretion in type 2 diabetic model rats and investigate its protection of glomerular podocytes. **Methods:** Type 2 diabetes SD rats induced by high fat diet/ streptozotocin(HFD-STZ) were randomly divided into 3 groups: the diabetic model group, the metformin group, the glibenclamide group, and the normal control group. Blood glucose (BG), urine albumin (UALB) and nephlin excretion were monitored before and after the intervention, and glycosylated hemoglobin (HbA1c) was measured at the end of the study. **Results:** (1) BG and HbA1c levels of diabetic rats were significantly higher than those of normal group ($P < 0.05$); BG and HbA1c levels of the metformin and glyburide group were significantly lower than those of the type 2 diabetic model group ($P < 0.05$) at the end of the 4th and 8th week, but there were no significant differences between the two intervention groups. (2) At the end of the 4th and 8th week, UACR in all diabetic rats was significantly higher than that of the normal group ($P < 0.05$), which was significantly decreased in the metformin and glyburide group when compared with the type 2 diabetic model group ($P < 0.05$). There were no significant differences between the two intervention groups ($P > 0.05$) at the 4th week, but statistically differences were found at the 8th weeks ($P < 0.05$). (3) There were no significant differences of UNER among the 4 groups at the end of the 0th and 2nd weekend. At the end of the 4th and 8th week, UNER in the diabetic groups was significantly higher than that of the normal group ($P < 0.05$). UNER was significantly decreased in the metformin and glyburide group compared with the diabetic model group. The level of UNER in the metformin group was obviously lower than that of the glyburide group ($P < 0.05$). (4) Pearson correlation analysis showed that UNER was positively correlated with UACR ($r = 0.846, P < 0.05$). **Conclusion:** Metformin can decrease the excretion of urinary nephlin and provide some protection for glomerular podocyte in diabetic

[基金项目] 安徽省自然科学基金(11040606M159);安徽高校省级自然科学基金项目(KJ2011A157)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:ysd196406@163.com

rats, which is not completely dependent on its hypoglycemic effect.

[Key words] diabetic nephropathy; nephrin; metformin; podocytes; glibenclamide; oxidative stress

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(07): 988-991]

二甲双胍现已被各国糖尿病指南推荐为治疗 2 型糖尿病的一线首选药物。近年来一些基础和临床研究发现,二甲双胍除降糖之外,尚可以通过抗炎抗氧化等途径发挥肾脏保护作用,但确切机制尚不清楚^[1-2]。肾小球足细胞损害是糖尿病肾损伤的早期表现并参与糖尿病肾小球硬化的发生。足细胞突起交替之间覆有一层 4~6 nm 厚的隔膜,称为裂孔隔膜。裂孔膜是阻止蛋白渗漏进入尿液的最后一道屏障。近年来已有研究发现了多种裂孔膜相关分子如 nephrin、podocin、CD2AP 等,其中 nephrin 在保持肾小球滤过屏障功能中起着重要作用^[3]。本实验通过建立 2 型糖尿病大鼠动物模型,设立正常对照组、糖尿病模型组、二甲双胍干预组和优降糖干预组,观察二甲双胍干预对 2 型糖尿病大鼠尿 nephrin 的排泄情况,初步探讨二甲双胍对 2 型糖尿病大鼠肾小球足细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

健康清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 40 只,2 月龄,由安徽医科大学实验动物中心提供。高脂饲料:常规饲料加 10% 猪油、2% 胆固醇。

链脲佐菌素(STZ, Sigma 公司,美国),二甲双胍(上海施贵宝制药有限公司),优降糖(天津太平洋制药有限公司);尿肌酐、尿素氮检测试剂盒(南京建成科技有限公司),白蛋白放射免疫试剂盒(天津市协和医药科技有限公司),尿 nephrin ELISA 检测试剂盒(上海艾来萨生物科技有限公司);DS-5 型糖化血红蛋白检测仪(英国 DREW 公司),DFM-96 型 10 管放射免疫 γ 计数仪(安徽合肥众成机电公司)。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病大鼠模型的制备和分组

40 只健康雄性 SD 大鼠购入适应性喂养 1 周后随机分为 2 组:正常对照组(普通饲料喂养, $n=8$),模型组(高脂饲料喂养, $n=32$)。4 周后,按 30 mg/kg 剂量,一次性腹腔注射 STZ (溶解于新鲜配置的 0.1 mmol/L 枸橼酸缓冲液中, pH4.4)。对照组注射等量枸橼酸缓冲液。稳定 72 h 后,测随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L 即为造模成功。将造模成功的 25 只 2 型糖尿病大鼠随机分为 3 组:二甲双胍干预组 [$n=8, 300$ mg/(kg·d)],

优降糖干预组 [$n=8, 1.5$ mg/(kg·d)], 糖尿病模型组 ($n=9$)。正常对照组喂以普通饲料,其余 3 组继续高脂喂养^[4-6]。

1.2.2 标本留取

STZ 注射稳定后 7 d 设为 0 周。分别于 0 周,给药后 2、4、8 周末经尾静脉测定随机血糖(BG),所有大鼠禁食 1 d 后留取随机尿,将 10 mL 随机尿 3 000 r/min 离心 10 min 并置于 -40°C 冰箱隔日待测尿白蛋白(UALB)、尿肌酐(Ucr)和尿 nephrin(UNE)。8 周末所有大鼠在 10% 的水合氯醛腹腔注射麻醉下行腹主动脉插管收集血标本检测糖化血红蛋白(HbA1c)。

1.2.3 实验室指标的检测

放射免疫法测定尿白蛋白,苦味酸法检测尿肌酐,HPLC 系统检测 HbA1c,ELISA 检测尿沉渣中的 nephrin。本实验均留取随机尿,为排除尿量的影响,UNE 和 UALB 均以 Ucr 校正,分别以 UALB/Ucr (UACR)和 UNE/Ucr(UNER)表示。

1.3 统计学方法

计量数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS16.0 统计软件,组间比较采用 one-way ANOVA 分析,方差具有齐性时两两比较用 LSD 检验,方差不具有齐性者两两比较用 Dunnett' T3 检验。相关指标采用 Pearson 相关系数分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况、血糖和 HbA1c

实验期间,建模成功后各组糖尿病大鼠均表现出多饮、多尿、多食以及体重减轻;各干预组 BG 明显高于正常对照组 ($P < 0.05$),与糖尿病模型组比较,4 周末,干预组血糖明显下降 ($P < 0.05$),两干预组间差异无统计学意义;8 周末,各组糖尿病大鼠 BG 和 HbA1c 均明显高于正常对照组 ($P < 0.05$),与糖尿病模型组比较,二甲双胍干预组和优降糖干预组均明显降低 ($P < 0.05$),两干预组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

2.2 各糖尿病大鼠 UACR 变化

0、2 周末,各糖尿病组大鼠 UACR 均高于正常对照组,但差异无统计学意义,4 周末,各糖尿病组大鼠 UACR 均明显高于正常对照组 ($P < 0.05$);与糖尿病模型组比较,二甲双胍干预组和优降糖干

预组 UACR 显著降低($P < 0.05$),但两组间无显著差异($P > 0.05$)。8 周末,各糖尿病组大鼠 UACR 明显高于正常对照组($P < 0.05$),与糖尿病模型组比较,二甲双胍干预组与优降糖干预组均明显降低 ($P < 0.05$),且两组间差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

2.3 各组糖尿病大鼠 UNER 比较

0、2 周末,各糖尿病大鼠 UNER 比正常对照组增高,但差异无统计学意义;4、8 周末,各糖尿病大鼠 UNER 明显高于正常对照组($P < 0.05$),与糖尿病模型组比较,二甲双胍干预组和优降糖干预组 UNER 明显降低($P < 0.05$),与优降糖干预组比较,二甲双胍干预组 UNER 明显降低($P < 0.05$,表 1)。

表 1 不同时间点各组大鼠 BG、UACR、UNER、HbA1c 比较
Table 1 The level of BG, UACR, UNER and HbA1c of rats in different weeks ($\bar{x} \pm s$)

时间	组别	BG(mmol/L)	UACR(mg/g)	UNER(ng/g)	HbA1c(%)
0 周	正常对照组	4.20 ± 0.32	0.23 ± 0.08	96.29 ± 18.27	-
	糖尿病模型组	15.32 ± 2.28*	0.30 ± 0.02	93.04 ± 19.98	-
	优降糖干预组	17.18 ± 3.09*	0.15 ± 0.03	91.30 ± 22.60	-
	二甲双胍干预组	16.60 ± 3.17*	0.34 ± 0.09	86.20 ± 11.19	-
2 周	正常对照组	4.62 ± 0.22	0.22 ± 0.04	85.32 ± 10.02	-
	糖尿病模型组	17.24 ± 3.55*	1.01 ± 0.09	160.56 ± 10.56	-
	优降糖干预组	16.34 ± 3.01*	0.97 ± 0.10	140.88 ± 11.09	-
	二甲双胍干预组	15.45 ± 2.67*	0.88 ± 0.05	150.63 ± 8.98	-
4 周	正常对照组	4.35 ± 0.92	0.25 ± 0.06	99.31 ± 22.46	-
	糖尿病模型组	16.49 ± 3.33*	2.44 ± 0.25*	532.42 ± 36.04*	-
	优降糖干预组	13.05 ± 3.27**	2.36 ± 0.21**	411.07 ± 33.97** Δ	-
	二甲双胍干预组	13.19 ± 1.87**	1.81 ± 0.16**	270.62 ± 11.38**	-
8 周	正常对照组	4.45 ± 1.07	0.25 ± 0.66	96.49 ± 7.59	4.13 ± 0.89
	糖尿病模型组	15.60 ± 1.56*	2.86 ± 0.10*	678.77 ± 34.27*	12.81 ± 0.77*
	优降糖干预组	11.78 ± 1.43**	2.37 ± 0.12** Δ	456.25 ± 48.24** Δ	8.85 ± 1.07**
	二甲双胍干预组	11.75 ± 0.98**	1.80 ± 0.08**	371.13 ± 33.42**	8.78 ± 0.32**

与同一时间点正常对照组比较,* $P < 0.05$;与同一时间点糖尿病模型组比较,** $P < 0.05$;与同一时间点二甲双胍干预组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.4 UNER 与 UACR 相关分析

Pearson 相关分析示,UNER 与 UACR 显著正相关($r = 0.846, P < 0.05$)。

3 讨论

nephrin 是足细胞裂孔膜结构的主要构架分子,起着黏附分子作用,同时调节足细胞内的信号转导,nephrin 与调节蛋白 Nck 亚基结合亦可以高效动态地调节肌动蛋白细胞骨架,维持足细胞的形态^[7]。文献报道 2 型糖尿病患者中尿 nephrin 排泄显著增加,可间接提示肾小球足细胞损伤^[8]。临床上糖尿病患者的尿 nephrin 与糖尿病肾病进程密切相关,与肾小球滤过率(eGFR)的降低联系紧密,可以作为潜在肾脏损害早期的指标^[9]。本动物实验显示,2 周末 2 型糖尿病大鼠 UNER 有所增加,4 周末 UNER 显著增加($P < 0.05$),且与 UACR 呈显著正相关,提示糖尿病早期即存在足细胞损伤,并参与蛋白尿的形成。与糖尿病模型组比较,二甲双胍和优降糖干预,均可明显降低尿白蛋白的排泄,且同一时间点,二甲双胍改善尿白蛋白的排泄效果更佳。

持续高血糖是糖尿病肾病的基本因素,它可以通过多种途径对肾小球足细胞产生损伤。近来一些研究显示二甲双胍作为一线降血糖药物,可以延缓糖尿病肾病的进展,保护肾小球足细胞。本实验观察结果显示二甲双胍和优降糖干预可以明显降低糖尿病大鼠血糖和糖化血红蛋白,同时大鼠尿 nephrin 的排泄也显著降低,且在血糖控制相似的情况下,二甲双胍效果优于优降糖,提示二甲双胍和优降糖可通过改善血糖对肾小球足细胞提供保护,而二甲双胍可能存在降糖之外的肾小球足细胞的保护作用。目前二甲双胍对糖尿病肾小球足细胞的保护机制尚不十分清楚,除传统的降糖作用以外,其还可能通过抗炎抗氧化途径发挥肾小球足细胞的保护作用:研究证实足细胞对氧化应激异常敏感,氧化应激导致足细胞损伤明显早于肾小球硬化和肾小管间质病变,氧化应激诱导的 nephrin 的表达改变可能在足细胞凋亡及糖尿病肾病的发生发展中起重要作用^[10]。Piwowska 等^[11]报道二甲双胍可以通过抑制 NADPH 氧化酶和糖基化终产物(AGEs)的生成,降低体外培养的足细胞中 ROS 含

量,且可增加抗氧化剂如超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)和过氧化物酶活性,部分阻断 ROS 的生成来源减轻氧化应激反应^[8]。Louro 等^[12]报道二甲双胍可通过降低血中炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和转化生长因子 β 1(TGF- β 1)水平,改善 GK 鼠肾脏足细胞的融合和间质纤维化。Hattori 等^[13]认为二甲双胍可剂量依赖地激活 AMPK,进而抑制 IKK 的活性,降低 I κ B 的磷酸化和降解,降低促炎症因子 TNF- α 、IL-1 以及依赖二者的 NF- κ B 的激活,其作用不完全依赖控制血糖、血脂和体重等的综合作用。Li 等^[14]的动物实验显示二甲双胍可独立于 AMPK,直接抑制 I κ B 磷酸化,下调 NF- κ B,减轻炎症对足细胞的损伤。

总之,本研究结果初步提示二甲双胍和优降糖可通过降低血糖,发挥一定的足细胞保护作用,确切机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Nasri H, Baradaran A, Ardalan MR, et al. Bright renoprotective properties of metformin: beyond blood glucose regulatory effects[J]. *Iran J Kidney Dis*, 2013, 7(6): 423-428
- [2] Viollet B, Guigas B, Sanz GN, et al. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2012, 122(6): 253-270
- [3] Tossidou I, Teng B, Drobot L, et al. CIN85/RukL is a novel binding partner of nephrin and podocin and mediates slit diaphragm turnover in podocytes [J]. *J Biol Chem* 2010, 285(33): 25285-25295
- [4] Kim J, Shon E, Kim CS, et al. Renal podocyte injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin [J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012: 210821
- [5] Alhaider AA, Korashy HM, Sayed-Ahmed MM, et al. Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression[J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 192(3): 233-242
- [6] 袁爱红, 刘志诚, 魏群利, 等. 针刺对 2 型糖尿病大鼠弓状核 INSR 基因表达的影响[J]. *天津中医药*, 2009, 26(4): 293-295
- [7] Welsh GI, Saleem MA. Nephrin-signature molecule of the glomerular podocyte? [J]. *J Pathol*, 2010, 220(3): 328-337
- [8] 赵俐丽, 叶山东, 陈燕, 等. 2 型糖尿病患者尿 nephrin 排泄的变化及其临床意义[J]. *中国临床保健杂志*, 2009, 12(3): 253-255
- [9] Jim B, Ghanta M, Qipo A, et al. Dysregulated nephrin in diabetic nephropathy of type 2 diabetes: a cross sectional study[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36041
- [10] 曾庆菊, 贾汝汉, 王晋文, 等. 氧化应激与糖尿病大鼠 nephrin 表达及足细胞凋亡的关系 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2011, 27(2): 132-134
- [11] Piwkowska A, Rogacka D, Jankowski M, et al. Metformin induces suppression of NAD (P)H oxidase activity in podocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393(2): 268-273
- [12] Louro TM, Matafome PN, Nunes EC, et al. Insulin and metformin may prevent renal injury in young type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 653(1-3): 89-94
- [13] Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, et al. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells [J]. *Hypertension*, 2006, 47(6): 1183-1188
- [14] Li SN, Wang X, Zeng QT, et al. Metformin inhibits nuclear factor kappaB activation and decreases serum high-sensitivity C-reactive protein level in experimental atherogenesis of rabbits [J]. *Heart Vessels*, 2009, 24(6): 446-453

[收稿日期] 2014-12-11