

大麻素受体1拮抗药类似物AM251对糖尿病肾病模型大鼠肾组织足细胞损伤的保护作用研究[△]

吕霄*,李甜甜,李伟*(徐州医学院附属医院,江苏徐州 221000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)41-3861-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.41.08

摘要 目的:研究大麻素受体1(CB1)拮抗药类似物AM251对糖尿病肾病模型大鼠肾组织足细胞损伤的保护作用。方法:将大鼠随机分为阴性对照(生理盐水)组、对照[1 mg/(kg·d) AM251]组、模型组和AM251干预[建模+1 mg/(kg·d) AM251]组,每组10只。后2组建立糖尿病肾病模型,建模成功后腹腔注射相应药物,12周后检测各组大鼠24 h尿蛋白量、血肌酐清除率(Ccr)、肾质量/体质量(KW/BW)、血清生化指标和肾组织中CB1和肾组织足细胞裂隙蛋白Nephrin、Podocin蛋白的表达,并观察肾组织和足细胞病理变化。结果:与阴性对照组比较,对照组大鼠各检测指标差异无统计学意义($P>0.05$),模型组和AM251干预组大鼠24 h尿蛋白量、KW/BW、血清生化指标和肾组织中CB1表达均明显增加($P<0.05$),Ccr和足细胞中Nephrin、Podocin蛋白表达均明显降低($P<0.05$);与模型组比较,AM251干预组大鼠24 h尿蛋白量、KW/BW明显降低($P<0.05$),Ccr和足细胞中Nephrin、Podocin蛋白表达均明显增强($P<0.05$),其余组间差异无统计学意义($P>0.05$)。阴性对照组和对照组大鼠肾组织和足细胞形态正常,模型组大鼠肾组织和足细胞有明显糖尿病肾病的病理改变,AM251干预组大鼠糖尿病肾病的病理改变较模型组均改善。结论:AM251对糖尿病肾病模型大鼠足细胞病变具有保护作用,部分机制可能与上调足细胞中Nephrin、Podocin蛋白的表达有关。
关键词 糖尿病肾病;大鼠;大麻素受体1拮抗药类似物AM251;足细胞病变;保护作用

Protective Effects of Cannabinoid Receptors 1 Antagonist Analogs AM251 on Kidney Podocyte Lesions in Diabetic Nephropathy Rats

Lü Xiao, LI Tian-tian, LI Wei (The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Jiangsu Xuzhou 221000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the protective effect of cannabinoid receptors 1 (CB1) antagonist analogs AM251 on the podocyte lesions in rats with diabetes nephropathy. METHODS: SD rats were randomized into negative control group, control group [1 mg/(kg·d) AM251], model group and AM251 intervention group [modeling+1 mg/(kg·d) AM251] with 10 rats in each group. Diabetes nephropathy model was induced in latter 2 groups, and relevant medicine was injected intraperitoneally after modeling. After 12 weeks, 24 h urine protein, Ccr, KW/BW, serum biochemical indicator were determined; the expressions of CB1 receptors, Nephrin and Podocin protein in renal tissue were evaluated, and pathological change of renal tissue and podocyte were observed. RESULTS: Compared with negative control group, the lab index of rats had no significant change in control group ($P<0.05$); 24 h urine protein, KW/BW, serum biochemical indicator and the expressions of CB1 receptors increased significantly ($P<0.05$) while the expression of Nephrin and Podocin protein decreased significantly ($P<0.05$) in model group and AM 251 intervention group; the level of Ccr decreased significantly in model group ($P<0.05$). Compared with model group, 24 h urine protein and KW/BW decreased significantly in AM251 intervention group ($P<0.05$); the level of Ccr and the expression of Nephrin and Podocin protein increased significantly ($P<0.05$); other index had no significant difference between 2 groups ($P>0.05$). The morphology of renal tissue and podocyte were normal in negative control group and control group; significant pathological change of diabetes nephropathy was found in renal tissue and podocytes of rats in model group; compared with model group, pathological change of diabetes nephropathy was improved in AM251 intervention group. CONCLUSIONS: AM251 may exert the protective effect on podocytes in diabetic nephropathy rats, and the mechanism may be associated with the up-regulated expression of Nephrin and Podocin protein.

KEY WORDS Diabetic nephropathy; Rats; Cannabinoid receptors 1 antagonist analogs AM251; Podocyte lesion; Protective effects

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)不仅为2型糖尿病的主要并发症之一,也是1型糖尿病致死的重要原因。DN中足细胞损伤引起尿蛋白的发病机制为近年来研究的热点。nephrin、podocin是肾足细胞裂隙蛋白,其对足细胞结构及功能的完整性起到至关重要的作用^[1-2]。大麻素受体1(Cannabinoid receptor 1, CB1)是一种G蛋白偶联受体,主要是在神经系统表达,在外周组织也有表达,如肝脏、胰腺、脂肪细胞等,

△基金项目:江苏省科技创新与成果转化(自然科学基金)专项引导资金项目(No.BK2010181)

*硕士研究生。研究方向:糖尿病慢性并发症。E-mail:lxsys@126.com

#通信作者:主任医师,教授,硕士研究生导师。研究方向:糖尿病发病机制及慢性并发症。E-mail:liwei.190@hotmail.com

其在外周组织代谢中起着重要的作用。AM251[N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,3-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide]是一种高效的、特异的CB1拮抗药类似物,在结构上与CB1拮抗药利莫那班非常接近,但比CB1的亲合力更强,具有明显的中枢性镇痛、抑制食欲等作用。最新研究^[3-5]发现,AM251可改善糖尿病模型小鼠的血脂紊乱、葡萄糖耐量异常、胰岛素抵抗和视网膜病变,而且可降低糖化血红蛋白、尿蛋白水平,但其机制尚不明确。本文研究了AM251对DN模型大鼠足细胞病变的影响,为其机制研究提供参考。

1 材料

显微镜(日本奥林巴斯公司);FEI型透射电镜(美国FEI公司);尿蛋白检测仪(挪威Axis-shield公司)。

AM251(粉末状固体,美国Cayman公司,分子质量:555.2,纯度:≥98%,为实验用药);链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司);大鼠尿白蛋白检测试剂盒(美国Bio-Rad公司);兔抗大鼠CB1抗体(美国生物技术有限公司);兔抗大鼠Nephrin、Podocin抗体(武汉博士德生物工程有限公司)。

SD大鼠40只,♂,体质量180~200g,由徐州医学院实验动物中心提供,使用许可证号:SCXK(苏)2005-0005。

2 方法

2.1 分组与建模

取大鼠适应性喂养1周后禁食12h,按随机分为阴性对照(生理盐水)组、对照[1mg/(kg·d)AM251]组、模型组和AM251干预[建模+1mg/(kg·d)AM251]组,每组10只。模型组和AM251干预组大鼠空腹状态下按55mg/kg一次性腹腔注射STZ,48~72h后尾静脉采血,测定全血血糖,随机血糖≥16.7mmol/L者糖尿病模型建立成功;成模后1个月测24h尿蛋白量≥30mg者DN模型建模成功^[6]。最终DN成模16只,每组均8只。

2.2 给药

对照组正常大鼠和AM251干预组DN模型大鼠均按1mg/(kg·d)^[7]腹腔注射AM251,阴性对照组正常大鼠和模型组DN模型大鼠均腹腔注射等体积的生理盐水。每组每日上午给药1次,每周称体质量调整药量,连续给药12周。

2.3 24h尿蛋白量、肾质量/体质量(KW/BW)、收缩压(SBP)、血肌酐清除率(Ccr)检测

实验结束前1d于留取各组大鼠24h尿液,离心分装后保存于一80℃冰箱中,按试剂盒操作检测24h尿蛋白量。大鼠处死前称BW,并测量大鼠SBP,在5%水合氯醛麻醉下行下腔静脉插管收集血标本,游离双侧肾脏,称KW,计算KW/BW。采用生化分析仪检测各组大鼠血清中血肌酐含量,计算Ccr。

2.4 组织病理变化

取各组大鼠左侧肾清洗切好后置于10%中性甲醛溶液中固定,苏木精-伊红(HE)染色,显微镜下观察肾组织病理变化;将右侧肾切成1mm³组织块,用5%戊二醛于4℃下固定4h以上,乙醇和丙酮脱水,石蜡包埋切片,将切片于醋酸铅染液中室温染1h,再置于柠檬酸铅溶液中室温染10~15min,双蒸水洗净,FEI透射电镜观察肾脏足细胞病理变化。

2.5 血清生化指标检测

采用7150型生化分析仪检测各组大鼠血清中血糖(Blood glucose, BG)、糖化血红蛋白(HbA_{1c})、血脂[甘油三酯(Triglyceride, TG)、总胆固醇(Total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白(Low-density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白(High-density lipoprotein, HDL),并进行比较。

2.6 肾组织中CB1和足细胞裂隙蛋白Nephrin、Podocin的表达检测

采用免疫印迹法,裂解各组大鼠肾小球,提取总蛋白,取30μl蛋白加入等体积2×十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液,分别于12%、8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳后转至聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜)上,加入兔抗大鼠CB1抗体和兔抗大鼠Nephrin、Podocin抗体,4℃孵育过夜,二抗室温孵育1h,二氨基联苯胺(DAB)显影。以β-肌动蛋白(β-actin)为内参,用Graphpad软件分析,应用灰度值评价肾组织中CB1和Nephrin、Podocin的蛋白相对表达量。

2.7 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并检验各组变量正态分布情况,组

间比较采用单因素方差分析应用SPSS 16.0统计软件进行分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 24h尿蛋白量、KW/BW、SBP、Ccr比较

与阴性对照组比较,对照组大鼠各检测指标差异无统计学意义($P > 0.05$),模型组和AM251干预组大鼠24h尿蛋白量、SBP、KW/BW均明显增加($P < 0.05$),Ccr均明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较,AM251干预组大鼠24h尿蛋白量、KW/BW明显降低($P < 0.05$),Ccr明显增加($P < 0.05$),结果见表1(1mmHg=133.32Pa)。

表1 各组大鼠24h尿蛋白、KW/BW、SBP、Ccr的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of 24 h urine protein, KW/BW, SBP, Ccr of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	24h尿蛋白量,mg	KW/BW,g/kg	SBP,mmHg	Ccr,ml/min
阴性对照组	10	6.87±1.34	5.42±0.27	103±11	3.52±0.17
对照组	10	6.22±1.37	5.73±0.22	100±13	3.55±0.17
模型组	8	132.09±15.26*	27.17±0.85*	118±14*	1.82±0.24*
AM251干预组	8	55.22±13.64**	12.64±0.72**	116±16*	2.57±0.26**

与阴性对照组比较:* $P < 0.05$;与模型组比较:** $P < 0.05$

vs. negative control group:* $P < 0.05$; vs. model group:** $P < 0.05$

3.2 血清生化指标比较

与阴性对照组比较,对照组大鼠各检测指标差异无统计学意义($P > 0.05$),模型组和AM251干预组大鼠血清中BG、HbA_{1c}、TG、TC、LDL、HDL水平均明显增加($P < 0.05$),后2组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具体结果见表2。

表2 各组血清生化指标的变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Changes of serum biochemical indicators of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BG,mmol/L	HbA _{1c} ,%	TG,mmol/L	TC,mmol/L	LDL,mmol/L	HDL,mmol/L
阴性对照组	10	6.23±0.33	6.48±0.30	0.60±0.09	1.60±0.17	0.77±0.13	0.47±0.02
对照组	10	6.43±0.31	6.44±0.31	0.63±0.15	1.64±0.32	0.75±0.15	0.45±0.04
模型组	8	27.8±1.30*	12.81±0.16*	0.78±0.10*	1.79±0.23*	1.06±0.45*	0.51±0.08*
AM251干预组	8	28.5±0.98*	13.06±0.54*	0.81±0.13*	1.80±0.24*	0.92±0.19*	0.49±0.07*

与阴性对照组比较:* $P < 0.05$

vs. negative control group:* $P < 0.05$

3.3 肾组织病理变化

阴性对照组和对照组大鼠的肾小球、肾小管形态结构清晰,分布正常;模型组大鼠的肾小球肥大,系膜基质增多,系膜区增宽,未见明显的系膜细胞数目增加,肾小囊囊腔变窄,部分毛细血管腔狭窄,小管细胞肥大、肿胀、管腔变窄;AM251干预组大鼠上述病变明显轻于模型组。显微镜图见图1。

3.4 肾脏足细胞病理变化

阴性对照组和对照组大鼠的肾组织结构清晰,肾脏足细胞形态正常,足突分布整齐、规律,未见足突融合,肾小球基底膜完整连续,厚度均匀正常,系膜区无扩张;模型组大鼠肾脏足细胞足突排列分布紊乱,部分足突融合,呈连续性附着于基膜上,足突间隙数目及面积减小,足细胞内细胞器肥大,肾脏肾小球基底膜呈非均质性增厚,系膜区扩大,系膜基质增多,足突裂孔数减少,裂孔膜消失,足细胞有脱落、细胞数减少;AM251干预组大鼠上述改变较模型组减轻。电镜图见图2。

3.5 肾组织中CB1、Nephrin和Podocin蛋白表达比较

与阴性对照组比较,对照组大鼠各检测指标差异无统计学意义($P > 0.05$),模型组和AM251干预组大鼠肾组织中CB1表达明显增强($P < 0.05$),足细胞中Nephrin、Podocin蛋白表达均明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较,AM251干预组大鼠足

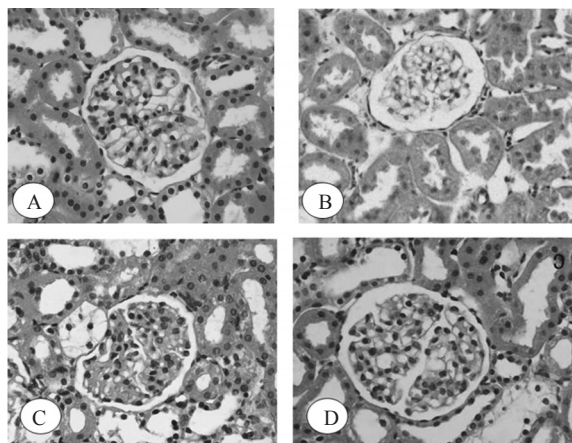


图1 各组大鼠肾组织病理变化显微镜图(HE, ×400)

A.阴性对照组;B.对照组;C.模型组;D.AM251 干预组

Fig 1 Microscopic images of pathological changes of renal tissue in each group (HE, ×400)

A.negative control group;B.control group;C.model group;D. AM251 intervention group

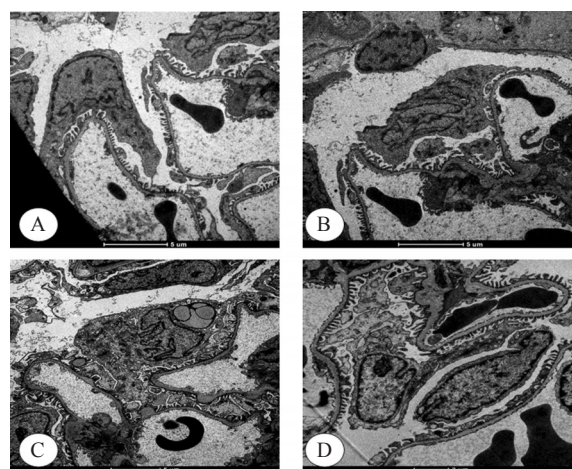


图2 各组大鼠肾脏足细胞病理变化电镜图(×8 000)

A.阴性对照组;B.对照组;C.模型组;D.AM251 干预组

Fig 2 Electron micrograph of pathological changes of podocyte in each group (×8 000)

A.negative control group;B.control group;C.model group;D. AM251 intervention group

细胞中Nephrin、Podocin蛋白表达均明显增强($P < 0.05$)。各组大鼠肾组织中CB1和Nephrin、Podocin蛋白表达的电泳图见图3,表达量比较见表3。

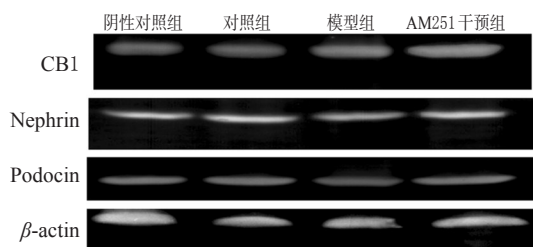


图3 各组大鼠肾组织中CB1、Nephrin、Podocin蛋白表达的电泳图

Fig 3 Electrophoretogram of the expressions of CB1, Nephrin and Podocin protein in renal tissue of rats in each group

表3 各组大鼠肾组织中CB1和Nephrin、Podocin蛋白表达量比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Comparison of the expressions of CB1 and Nephrin, Podocin protein in renal tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CB1	Nephrin	Podocin
阴性对照组	10	0.28 ± 0.03	0.64 ± 0.05	0.60 ± 0.07
对照组	10	0.24 ± 0.03	0.67 ± 0.04	0.59 ± 0.05
模型组	8	0.35 ± 0.02*	0.34 ± 0.02*	0.37 ± 0.03*
AM251 干预组	8	0.40 ± 0.02*	0.47 ± 0.02**	0.58 ± 0.04**

与阴性对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: ** $P < 0.05$

vs. negative control group: * $P < 0.05$; vs. model group: ** $P < 0.05$

4 讨论

与阴性对照组比较,对照组大鼠的CB1和Nephrin、Podocin蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$),模型组和AM251干预组大鼠的CB1表达明显增强,Nephrin、Podocin蛋白表达明显降低($P < 0.05$),说明AM251对正常大鼠的CB1和Nephrin、Podocin蛋白表达无影响,DN发生时高糖可能导致Nephrin、Podocin蛋白表达降低。与模型组比较,AM251干预组大鼠的Nephrin、Podocin蛋白表达明显增强($P < 0.05$),可能原因是AM251与CB1结合减少足突形态改变所致^[8]。

本实验结果表明,AM251对DN模型大鼠足细胞病理变化具有保护作用,部分机制可能与上调足细胞中Nephrin、Podocin蛋白的表达有关。

参考文献

- [1] Li JJ, Kwak SJ, Jung DS, *et al.* Podocyte biology in diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2007(106): S36.
- [2] Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2005, 54(6): 1 626.
- [3] Barutta F, Corbelli A, Mastrocola R, *et al.* Cannabinoid receptor 1 blockade ameliorates albuminuria in experimental diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2010, 59(4): 1 046.
- [4] El-Remessy AB, Rajesh M, Mukhopadhyay P, *et al.* Cannabinoid 1 receptor activation contributes to vascular inflammation and cell death in a mouse model of diabetic retinopathy and a human retinal cell line[J]. *Diabetologia*, 2011, 54(6): 1 567.
- [5] 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): 2 386.
- [6] Ichimura K, Kurihara H, Sakai T. Actin filament organization of foot processes in vertebrate glomerular podocytes [J]. *Cell Tissue Res*, 2007, 329(3): 541.
- [7] Janiak P, Poirier B, Bidouard JP, *et al.* Blockade of cannabinoid CB1 receptor improves renal function, metabolic profile, and increased survival of obese Zucker rats[J]. *Kidney Int*, 2007, 72(11): 1 345.
- [8] 陈立平,周巧玲,欧阳春,等.罗格列酮对糖尿病肾病大鼠足细胞nephrin和podocin表达的影响[J]. *中华肾脏病杂志*, 2007, 23(4): 263.

(收稿日期:2013-01-15 修回日期:2013-02-11)