高血糖和蛋白尿促进肾小管上皮细胞凋亡*

桂华珍[1]，阎秀英[2]，肖 瑛[2]，石明隽[2]，张国忠[2]**
(1. 贵阳医学院 机能学实验室，贵州 贵阳 550004；2. 贵阳医学院 病理生理学教研室，贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的：**探讨糖尿病(DM)病程中高血糖和蛋白尿与肾小管上皮细胞凋亡的关系。**方法：**SD 大鼠随机分为对照组和糖尿病组，注射链脲佐菌素(STZ)诱导糖尿病，分别于糖尿病 2 周、4 周、8 周、16 周和 24 周处死动物；检测血糖和 24 h 尿蛋白量，免疫组织化学检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达，TUNEL 法检测细胞凋亡。**结果：**与对照组相比，DM 大鼠出现明显高血糖并且持续高水平，DM 组 2 周起 24 h 尿蛋白增多并随病情进展而加重；TUNEL 检测显示，对照组和 DM 组 2 周大鼠肾小管上皮细胞未见凋亡，而 DM 组 24 周大鼠部分肾小管可见凋亡细胞；免疫组化结果显示，DM 组 2 周大鼠肾小管上皮细胞 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白均明显高于对照组，然而 DM 组 8 周 Bcl-2 蛋白表达开始减少，Bax 蛋白则随 DM 进展而增多，Bax/Bcl-2 比值亦随之增高，并且与 24 h 尿蛋白呈正相关。**结论：**糖尿病病程中，高血糖和持续增多的蛋白尿使肾小管上皮细胞 Bax/Bcl-2 比值增高，促进肾小管上皮细胞凋亡。

[关键词] 高血糖症；蛋白尿；肾小管；细胞凋亡；免疫组织化学；大鼠，Sprague－Dawley
[中图分类号] Q813.11；R692 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2011)05-0448-04

Hyperglycemia and Proteinuria Promote Apoptosis of Renal Tubular Epithelial Cells

GUI Huazhen[1], YAN Xiuying[2], XIAO Ying[2], SHI Mingjun[2], ZHANG Guozhong[2]
(*1. Department of Function Laboratory, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Pathophysiology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To explore the relation of hyperglycemia and proteinuria to apoptosis of renal tubular epithelial cells in the diabetic course. **Methods**: Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group and diabetic group. Diabetic models were established by injection with streptozotocin (STZ). Rats were sacrificed in 2, 4, 8, 16 and 24 weeks (groups DM2w, DM4w DM8w DM16w and DM24w) respectively. Blood glucose and 24h urine protein were examined with biochemistry method. Immunochemistry was employed to detect the expression of Bcl-2 and Bax protein. Cell apoptosis was detected with TUNEL method. **Results**: Compared with control animals, diabetic rats presented a sustained high level of blood glucose; The 24h urine protein increased along with the progress of the disease since the 2nd week. TUNEL staining didn't show apoptotic cell in renal tubules in either control group or group DM2w. While in group DM 24w, several apoptotic cells were found in renal tubules. Immunochemistry exhibited that both Bcl-2 and Bax proteins in group DM2w were much higher than those in control group. The Bax protein increased progressively, but Bcl-2 protein decreased since the 8th week. The ratio of Bax/Bcl-2 therefore increased and was positively correlated with 24 h urine protein. **Conclusion**: Hyperglycemia and progressively increasing proteinuria promote apoptosis of renal tubular cells perhaps by up-regulating the ratio of Bax/Bcl-2.

[**Key words**] hyperglycemia; proteinuria; kidney tubules; apoptosis; immunohistochemistry; rats, Sprague-Dawley

*[基金项目]高等学校博士学科点基金[20060660001]，贵州省科技计划课题[黔科合 SY 字(2008)3042]。
**通讯作者 E-mail：zgz107@163.com

有研究认为[1,2]，糖尿病患者或动物出现肾小管萎缩可能与肾小管上皮细胞凋亡有关，从而参与糖尿病肾病（DN）的发生发展。研究表明，随糖尿病病程进展，DM 动物出现进行性增多的蛋白尿[3]，糖尿病性蛋白尿可引起肾小管上皮细胞凋亡[4]，但蛋白尿通过哪些机制引起细胞凋亡目前尚不甚清楚。本文动态观察链脲佐菌素（streptozotocin，STZ）诱导的 DM 大鼠病程进展过程中尿蛋白排泄量以及肾小管上皮细胞凋亡相关基因 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的变化，探讨尿蛋白引起肾小管上皮细胞凋亡的机制。

1　材料与方法

1.1　实验动物　清洁级雄性 Sprague-Dawley（SD）大鼠，体重 170 ~ 200 g，购于上海实验动物中心。批号：SCXK（沪）2003 - 0002。大鼠适应性饲养 1 周，2 次尿蛋白定性阴性并且空腹血糖在正常范围内者纳入实验。

1.2　试剂　STZ（Sigma 公司），兔抗鼠 bcl-2 多克隆抗体、兔抗鼠 bax 多克隆抗体、SABC 即用型免疫组化试剂盒、辣根过氧化物酶标记的二抗、DAB 显色试剂盒、TUNEL 原位检测凋亡细胞试剂盒（武汉博士德公司），血糖检测试剂盒（ 四川迈克科技有限公司 ），尿蛋白检测试剂盒（南京建成生物工程研究所）。

1.3　动物分组与模型制备　大鼠随机分为糖尿病组和正常对照组，每组 30 只，糖尿病组从尾静脉注射溶于 pH4.5 无菌柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液的 STZ 55 mg/kg 复制大鼠模型，于注射后 48 h 测空腹血糖值大于或等于 16.7 mmol/L 且尿糖阳性动物认为糖尿病模型成立。对照组大鼠尾静脉注射相应体积的溶媒，两组动物于实验 2 周、4 周、8 周、16 周和 24 周处死。

1.4　标本采集　动物处死前 1 天代谢笼收集 24 h 尿液，测定尿量，取部分尿液离心后 4 ℃保存。处死前禁食 6 ~ 8 h，股动脉穿刺取血，分离血清，-20 ℃保存。开腹取肾脏，4% 多聚甲醛固定，供制石蜡切片用。

1.5　生化指标检测　氧化酶（GOD-PAP）法测血清葡萄糖；考马斯亮蓝法测尿蛋白浓度，其与 24 h 尿量乘积为 24 h 尿蛋白排泄量。

1.6　免疫组化检测　取肾脏石蜡切片，进行免疫组化 SABC 法检测。Bcl-2 和 Bax 一抗工作浓度均为 1∶100。用 PBS 液代替一抗，作为阴性对照。4 ℃孵育过夜后，分别滴加生物素化羊抗兔 IgG 以及链酶亲和素 - 生物素 - 过氧化物酶复合物（SABC）室温孵育，盐酸 3，3-二氨基联苯胺（DAB）显色，苏木素复染。光镜观察细胞浆棕黄色为阳性染色，在高倍镜下随机计数 10 个视野的免疫染色阳性肾小管数目，取均值。

1.7　TUNEL 法检测细胞凋亡　切片常规脱腊，3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶，37 ℃蛋白酶 K 消化 15 min，加入 TDT 和 Dig-dUTP，4 ℃孵育过夜。第二天复温后，加生物素化的抗地高辛抗体 37 ℃孵育 2 h，加 SABC 37 ℃ 继续孵育 30 min，DAB 显色，不复染。光镜观察胞核有棕色颗粒为凋亡细胞。

1.8　统计学方法　应用 SPSS 11.0 统计软件进行数据处理。各组数据用（$\bar{x} \pm s$）表示，糖尿病组与对照组间资料比较采用 t 检验，糖尿病组内资料比较采用单因素方差分析，用 Pearson 方法分析相关性，$P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2　结果

2.1　血糖和尿蛋白变化　与正常对照组比较，DM 大鼠血糖明显升高，且在整个实验过程中一直维持相对稳定的高水平（表 1），动物出现显著多饮、多食、多尿的“三多”现象，表明大鼠发生了糖尿病。从糖尿病 2 周起，24 h 尿蛋白量明显高于正常对照组，且随着病程的进展呈进行性增多（表 1）。

表 1　各组大鼠血糖和 24 h 尿蛋白量变化（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Tab. 1　Changes of blood glucose and 24 h urine protein in each group（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

时间	血糖（mmol/L）		24 h 尿蛋白（mg）	
（周）	N 组	DM 组	N 组	DM 组
2	6.72 ± 2.42	20.42 ± 5.11(1)	2.01 ± 1.21	23.36 ± 8.91(1)
4	7.61 ± 0.55	24.07 ± 3.52(1)	5.28 ± 2.31	32.30 ± 8.35(1)(2)
8	7.89 ± 1.34	26.36 ± 2.02(1)	7.73 ± 1.22	27.26 ± 8.51(1)
16	8.04 ± 0.32	26.70 ± 2.16(1)	7.65 ± 1.24	49.38 ± 10.86(1)(2)
24	7.95 ± 1.09	25.32 ± 4.13(1)	8.76 ± 1.19	55.37 ± 3.22(1)(2)

注：(1) 与正常组（N）比较 $P < 0.01$，(2) 与上一时点比较 $P < 0.05$。

2.2　Bcl-2 和 Bax 蛋白在肾小管的表达　正常对照组肾小管上皮细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白有少量表达，糖尿病各组 Bcl-2 和 Bax 表达均显著增高。糖尿病 2 周和 4 周组 Bcl-2 表达相似，处于高水平，8

周开始其表达减少,16 周和 24 周则进一步减少,与 2 周和 4 周比较有显著性差异,但仍然高于对照组。Bax 蛋白随糖尿病进展不断增多,糖尿病 8 周、16 周和 24 周组 Bax 蛋白表达显著高于糖尿病 2 周和 4 周组($P<0.05$);Bax/Bcl-2 比值随糖尿病病程进展而不断增高(见表 2)。整个糖尿病 24 周期间,所有时点 Bax/Bcl-2 比值与 24 h 尿蛋白量呈显著正相关,$r=0.647$,$P<0.01$。

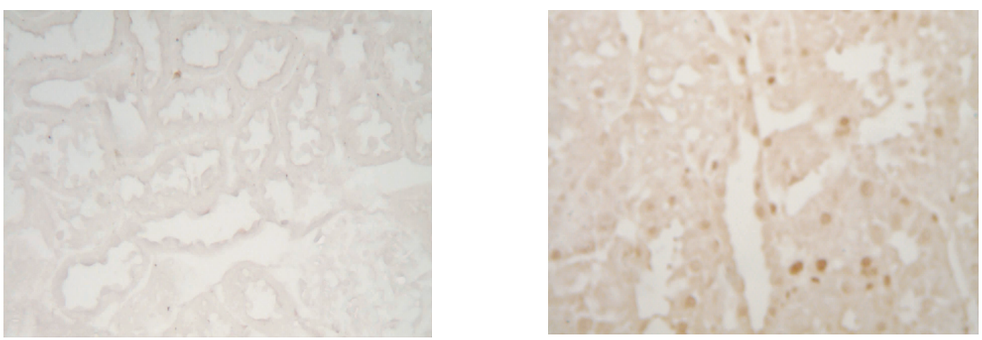
表 2　Bcl-2 和 Bax 蛋白在肾小管的表达($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

Tab. 2　The expression of Bcl-2 and Bax protein in renal tubules ($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

时间(周)	Bcl-2		Bax		Bax/Bcl-2
	N 组	DM 组	N 组	DM 组	DM 组
2	0.32 ± 0.10	13.56 ± 3.25$^{(1)}$	0.05 ± 0.08	6.83 ± 1.25$^{(1)}$	0.47 ± 0.14
4	0.14 ± 0.05	13.68 ± 2.51$^{(1)}$	0.03 ± 0.05	8.31 ± 1.77$^{(1)}$	0.64 ± 0.21
8	0.21 ± 0.10	10.25 ± 2.20$^{(1)(2)}$	0.08 ± 0.10	9.45 ± 2.01$^{(1)(2)}$	1.02 ± 0.25$^{(3)}$
16	0.33 ± 0.34	8.90 ± 2.61$^{(1)(2)}$	0.08 ± 0.13	11.9 ± 3.33$^{(1)(2)}$	1.42 ± 0.27$^{(3)}$
24	0.18 ± 0.13	8.64 ± 1.96$^{(1)(2)}$	0.08 ± 0.11	13.12 ± 1.76$^{(1)(2)}$	1.78 ± 0.45$^{(3)}$

注:$^{(1)}$ 与正常组比较 $P<0.01$;$^{(2)}$ 与糖尿病 2 周和 4 周组比较 $P<0.05$;$^{(3)}$ 与前一时点比较 $P<0.05$

2.3　肾小管上皮细胞凋亡　正常对照组大鼠和 DM 2 周组大鼠肾小管未见 TUNEL 染色阳性细胞,在糖尿病 24 周组大鼠可见多个肾小管有 TUNEL 染色阳性细胞,表明随糖尿病病程进展,DM 组大鼠多个肾小管上皮细胞发生凋亡,见图 1。



N 组　　DM 组(24 周)

图 1　肾小管上皮细胞凋亡(TUNEL,×400)

Fig. 1　TUNEL staining showing apoptosis of renal tubular epithelial cells

3　讨论

DN 是糖尿病常见并发症,近年发现伴随肾小球的病理改变,肾小管间质有明显的进行性损伤,部分肾小管萎缩继而为结缔组织取代发生纤维化,使肾脏丧失功能。研究表明[1,2],糖尿病患者或动物肾小管萎缩可能是肾小管上皮细胞凋亡的结果,但其发生机制尚未被完全阐明。有研究认为,高血糖引起肾小管上皮细胞氧化应激和促进局部血管紧张素生成增多,从而促使细胞凋亡[5]。本研究显示,在糖尿病 2 周的动物并未观察到肾小管上皮细胞凋亡,而 DM 组的动物 24 周时有部分肾小管出现凋亡细胞,提示短期高血糖并不诱导细胞凋亡,持续高血糖才使肾小管上皮细胞凋亡。

动态观察肾小管上皮细胞凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的结果表明,在 DM 组 2 周 Bcl-2 蛋白显著高于对照组,DM 组 4 周其表达水平与 2 周相似,至 8 周有所减少,DM 组 16 和 24 周则进一步减少,但仍然远高于对照组。DM 组 2 周时,Bax 蛋白也明显高于对照组,并且随糖尿病病程进展呈进行性增多。Bcl-2 和 Bax 同属于 Bcl-2 基因家族,但两种蛋白的作用相反,Bcl-2 蛋白抑制细胞凋亡,而 Bax 蛋白促进凋亡,且两者可形成异二聚体而相互拮抗。因此,有人认为两者比值可决定肾小管上皮细胞是凋亡还是存活[6]。本实验结果显示,Bax/Bcl-2 比值随糖尿病病程进展而增高,在 DM 组 2 周和 4 周比值小于 1,DM 组 8 周接近 1,而 DM 组 16 周和 24 周则大于 1,并且 DM 组 24 周可见多个肾小管出现凋亡细胞,提示 Bax/Bcl-2 比值增高

引起了肾小管上皮细胞凋亡。

在整个实验过程中,DM 组动物血糖维持在相对稳定的高水平,不随病程进展而升高,与 Bax/Bcl-2 比值不平行;而尿蛋白在 DM 组 2 周出现并呈进行性增多,与 Bax/Bcl-2 比值呈明显正相关。Ohse 等[7]用 40 g/L 浓度牛血清白蛋白培养肾小管上皮细胞发现,细胞出现明显的内质网应激和凋亡,这与本组实验一致。因此,可以推测,在糖尿病发病过程中,高血糖可能促进了肾小管上皮细胞 Bcl-2 和 Bax 表达,且前者高于后者,不引起细胞凋亡,但是持续高血糖引起的渗透性高滤过可造成肾小球损伤和持续蛋白尿[8],后者抑制肾小管上皮细胞 Bcl-2 表达并促进 Bax 表达,使 Bax/Bcl-2 比值增高从而引起肾小管上皮细胞凋亡。

4　参考文献

[1]Verzola D, Gandolfo MT, Ferrario F, et al. Apoptosis in the kidney of patients with type Ⅱ diabetic nephropathy [J]. Kidney Int, 2007(10):1262 - 72.

[2]Kumar D, Zimpelmann J, Robertson S, et al. Tubular and interstitial cell apoptosis in the streptozotocin-diabetic rat kidney[J]. Nephron Exp Neprol, 2004(3):77 - 88.

[3]方开云,娄晶磊,肖瑛,等. 转化生长因子 β1 和 Snail1 参与糖尿病大鼠肾小管上皮细胞向间充质细胞转变[J]. 生理学报,2008(1):125 - 134.

[4]Li X, Pabla N, Wei Q, et al. PKC-delta promotes renal tubular cell apoptosis associated with proteinuria[J]. J Am Soc Nephrol, 2010(7):1115 - 24.

[5]Volker Vallon. The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011:1009 - 1022.

[6]Yang B, Johnson TS, Thomas GL, et al. A shift in the Bax/Bcl-2 balance may activate caspase-3 and modulate apoptosiss in experimental glomerulonephritis[J]. Kidney Int, 2002(4):1301 - 1313.

[7]Ohse T, Inagi R, Tanaka T, et al. Albumin induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in renal proximal tubular cells[J]. Kidney Int, 2006(8):1447 - 55.

[8]Ziyadeh FN, Wolf G. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy[J]. Curr Diabetes Rev, 2008(1):39 - 45.

(2011 - 07 - 04 收稿,2011 - 09 - 12 修回)

(上接第 447 页)

氯甲烷和苯等溶剂的性质[10],采用丙酮、乙醚、三氯甲烷为提取溶剂制备供试品溶液,试验结果表明以乙醚为提取溶剂制备的供试品溶液对样品中己内酰胺测定无干扰。

试验分别采用 FFAP 和 OV-1701 大口径石英毛细管柱对照品和复方荭草冻干粉针剂中己内酰胺进行分离测定,两种色谱柱对复方荭草冻干粉针中己内酰胺均能有较好分离,但由于采用 FFAP 色谱柱分离时基线不稳定,故采用 OV-1701 色谱柱。

本实验采用气相色谱法对复方荭草冻干粉针中的 ε-己内酰胺单体残留量进行测定,结果三批复方荭草冻干粉针中均未检出己内酰胺,且方法重复性好,操作简便,是保证该制剂安全性的重要检测手段。

4　参考文献

[1] 郑林, 王永林, 王爱民,等. 注射用复方荭草冻干粉针除鞣质工艺研究[J]. 中国中药杂志,2007(17): 1811 - 1813.

[2] 王建华, 李铭瑜, 贺谷辉. 高效液相色谱法测定尼龙6样品中的环状齐聚物[J]. 合成纤维工业,2000(2): 50.

[3] 黎明. 气相色谱法测定车间空气中己内酰胺[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,1996(2): 118.

[4] 中华人民共和国卫生部、中国国家标准化管理委员会. GB/T 14966 - 1994 尼龙 6 树脂及成型品中己内酰胺卫生标准的分析方法[S]. 国家标准出版社,1994.

[5] 董启钧, 张本洋. 试述用气相色谱法测定聚酰胺树脂中己内酰胺残留量的方法[J]. 医药与保健,2009: 262.

[6] 粟晶. 大口径毛细管柱测定己内酰胺含量[J]. 合成纤维工业,2001(3): 66.

[7] 陶钢, 季峰. 气相色谱法毛细管柱测定水中己内酰胺[J]. 环境监测管理与技术,1998(5): 28.

[8] 杨先炯, 王爱民, 兰燕宇,等. 气相色谱法测定聚酰胺树脂中己内酰胺残留[J]. 时珍国医国药,2009(4): 877 - 878.

[9] 刘俊, 李锋格, 田延河,等. 毛细管气相色谱法测定食品包装材料中己内酰胺残留量[J]. 中国卫生检验杂志,2009(1): 65 - 66.

[10]王箴. 化工辞典[M]. 2 版. 北京:化学工业出版社, 1979: 48.

(2011 - 06 - 22 收稿,2011 - 07 - 12 修回)