

rhGLP-1(7-36)对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护机制研究

张敏杰^{1,2}, 方翼^{1,2*} (1.徐州医科大学, 江苏 徐州 221004; 2.北京大学人民医院药剂科, 北京 100044)

摘要: 目的 探讨 rhGLP-1(7-36)对糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)大鼠肾脏的保护机制。方法 DKD 模型大鼠随机分成模型组、rhGLP-1(7-36)低剂量组(20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、rhGLP-1(7-36)中剂量组(40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、rhGLP-1(7-36)高剂量组(80 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)，另设正常组，皮下注射给药 4 周。全自动生化分析仪检测 24 h 尿微量白蛋白、血肌酐及尿肌酐水平，计算肌酐清除率；进行腹腔糖耐量实验并计算药时曲线下面积(area under the curve, AUC)；HE 染色行肾组织病理形态学观察；Western blotting 检测肾组织 SIRT1 蛋白水平。结果 与模型组相比，rhGLP-1(7-36)高剂量组大鼠肌酐清除率有明显改善($P<0.05$)；24 h 尿微量白蛋白水平明显下降($P<0.05$)；腹腔糖耐量 AUC 水平明显减小($P<0.05$)；肾组织病理变化有不同程度改善；肾组织 SIRT1 蛋白水平明显上升($P<0.05$)。结论 rhGLP-1(7-36)能有效改善 DKD 大鼠的肾脏功能，其机制可能与上调肾脏组织的 SIRT1 水平有关。

关键词: rhGLP-1(7-36); 糖尿病肾病; 胰岛素抵抗; SIRT1

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)03-0281-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.03.005

引用本文: 张敏杰, 方翼. rhGLP-1(7-36)对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(3): 281-285.

Study on Protective Mechanism of rhGLP-1(7-36) on Kidney of Rats with Diabetic Kidney Disease

ZHANG Minjie^{1,2}, FANG Yi^{1,2*} (1.Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China; 2.Department of Pharmacy, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the protective mechanism of rhGLP-1(7-36) on the kidney of diabetic kidney disease (DKD) rats. **METHODS** DKD model rats were randomly divided into model group, rhGLP-1(7-36) low dose group (20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), rhGLP-1(7-36) medium dose group(40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), rhGLP-1(7-36) high dose group(80 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), another normal group. Subcutaneous injection was administered for four weeks. Full-automatic biochemical analyzer was used to detect urine microalbumin, serum creatinine, and urinary creatinine levels for 24 h, calculated creatinine clearance. The area under the curve(AUC) was calculated by intraperitoneal glucose tolerance test. HE staining was used to observe the pathological and morphological changes of renal tissue. Western blotting was used to detect the level of SIRT1 protein in kidney tissue. **RESULTS** Compared with the model group, the creatinine clearance of the rats in the rhGLP-1(7-36) high dose group was significantly improved; the 24 h urine level was significantly reduced($P<0.05$); the AUC of intraperitoneal glucose tolerance was significantly reduced($P<0.05$); the pathological changes of renal tissue were improved to varying degrees; SIRT1 protein level in renal tissue was significantly increased($P<0.05$). **CONCLUSION** rhGLP-1(7-36) can effectively improve the renal function of DKD rats, and the mechanism may be related to the up-regulation of SIRT1 level in kidney tissue.

KEYWORDS: rhGLP-1(7-36); diabetic kidney disease; insulin resistance; SIRT1

糖尿病是一种进行性代谢综合征，患者机体所进行的葡萄糖、蛋白质和脂肪的代谢均对肾脏造成严重损害^[1]。糖尿病所导致的微血管并发症主要为糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)及神经性视网膜病变，其中 DKD 是糖尿病患者终末期肾病的主要原因，占亚洲和西方国家新发病例的 40%。大量研究表明高血糖、高血压、肥胖及老年因素均会促进 DKD 的发病进程，但其产生的确切机制尚未明确^[2]。研究表明，DKD 患者均有

不同程度的胰岛素抵抗，这意味着患者胰岛功能已出现异常^[3]。rhGLP-1(7-36)作为新型 GLP-1 受体激动剂，无低血糖、胰高血糖素血症等不良反应，大量研究表明，其可抑制 NF- κ B 和 MAPK 信号通路的激活而发挥 DKD 肾脏保护作用，但鲜有其对 DKD 胰岛素抵抗及 SIRT1 影响的研究^[4]。SIRT1 是治疗 DKD 的潜在药物靶点，开发恢复 SIRT1 活性的药物是治疗 DKD 的必要策略^[5]。本研究通过探讨 rhGLP-1(7-36)对 DKD 模型 SIRT1

作者简介: 张敏杰, 女, 硕士生 Tel: 18612930993 E-mail: 18227551564@163.com *通信作者: 方翼, 男, 主任药师 Tel: 13701165926 E-mail: fygk7000@163.com

表达的影响,探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物

40只4周龄健康SPF级SD大鼠,♂,体质量100~150g,由北京维通利华生物技术公司提供,动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0009。

1.2 试剂与仪器

rhGLP-1(7-36)(无色澄明液体,上海仁会生物制药股份有限公司,批准文号:国药准字S20160007;规格:2.1mL:4.2mg;批号:S201609);链脲佐菌素(STZ, Sigma公司,批号:S0130);抗SIRT1抗体(英国Abcam公司,货号:ab104833)。

ALC-V8动物呼吸机(上海奥尔科特公司);全自动生化分析仪(日本HITACHI公司);ST-360酶联免疫检测仪(上海科华实验系统有限公司);Geldoc 2000凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司)。

尿微量白蛋白由北京大学人民医院内分泌实验室检测;血、尿肌酐由北京大学人民医院生化室检测。

2 方法

2.1 模型的建立

40只大鼠随机分为正常组大鼠($n=10$)与DKD模型大鼠($n=30$)。正常组大鼠使用维持饲料喂养,模型组大鼠采用高糖高脂饲料诱导喂养4周,禁食不禁水12h后DKD组大鼠腹腔注射STZ($25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸缓冲液溶解, $\text{pH}4.4$),正常组大鼠腹腔注射柠檬酸缓冲液($1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),72h后再行注射。行STZ注射后,正常组大鼠使用维持饲料喂养,DKD模型大鼠使用高糖高脂饲料喂养。3个月后测定大鼠空腹血糖,血糖 $>16.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 即为糖尿病模型。1周后,复测血糖,且收集大鼠24h尿液,血糖大于 $16.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,且24h尿蛋白大于造模前的50%即为DKD模型。

2.2 分组及给药

选择符合诊断标准的成模大鼠30只,随机分成模型组、rhGLP-1(7-36)低剂量组($20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、rhGLP-1(7-36)中剂量组($40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、rhGLP-1(7-36)高剂量组($80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。各治疗组每天颈部皮下给药2次,每次给药间隔时间 $>8\text{ h}$,模型组和正常组给予 $1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 生理盐水行颈部皮下注射,连续给药4周。实验期间,模型组、rhGLP-1(7-36)低剂量组大鼠各死亡1只,予以剔除。

2.3 腹腔糖耐量测定

给药结束后各组大鼠禁食不禁水12h,腹腔注射50%葡萄糖注射液($2.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。并在0, 15,

30, 60, 120 min于大鼠尾端切口取血,血糖仪测量血糖。观察血糖随时间的变化,并按公式: $\text{AUC}=1/4\times 0\text{ h血糖值}+1/2\times 0.5\text{ h血糖值}+3/4\times 1\text{ h血糖值}+2\text{ h血糖值}$,计算AUC。

2.4 样本收集

给药第4周末,收集大鼠24h尿液, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用;禁食12h,异戊烷吸入麻醉,开腹行前腔动脉取血6mL,静置离心取血清, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。摘除左右肾,1/2采用10%甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,切片,行HE染色。其余分装于冻存管中快速放于液氮中,而后转至 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.5 观察指标

全自动生化分析仪检测24h尿微量白蛋白、血尿素氮、血肌酐并计算肌酐清除率。

2.6 Western blotting 检测 SIRT1 蛋白水平

取肾组织,常规方法提取蛋白质,BCA法测定总蛋白含量。蛋白样品行SDS-PAGE电泳, PVDF膜转膜1.5h。5%脱脂奶粉封闭2h;加入SIRT1(1:8000)一抗 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 摇床孵育过夜, TBST洗膜 $3\times 5\text{ min}$,二抗(山羊抗小鼠)室温摇床孵育1h, TBST洗膜 $3\times 5\text{ min}$ 后,行ECL反应,显色。Bio-Rad凝胶成像系统拍照, GIS凝胶成像分析软件分析。

2.7 统计学方法

运用SPSS 20.0统计软件对研究取得的数据进行统计学分析, GraphPad Prism 4.0软件进行统计图制作。计量资料的实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组之间的比较用one-way ANOVA方差分析,2组之间用 t 检验进行分析,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状态

与正常组比较,模型组大鼠逐渐出现多饮、多食、多尿、体重减轻等明显的糖尿病症状,毛发无光泽且蓬松污秽,弓背躯体,动作迟缓,精神萎靡。rhGLP-1(7-36)中剂量组和高剂量组大鼠经过治疗后,症状较模型组有所改善,体质量有所增加。

3.2 大鼠血糖及胰岛素抵抗情况比较

模型组大鼠的空腹血糖在3个月内均 $>18.02\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。治疗后, rhGLP-1(7-36)高剂量组大鼠的空腹血糖得到明显改善($P<0.05$)。模型组大鼠腹腔糖耐量AUC水平明显高于正常组, rhGLP-1(7-36)高剂量组大鼠腹腔糖耐量AUC水平显著低于模型组($P<0.05$),结果见图1。

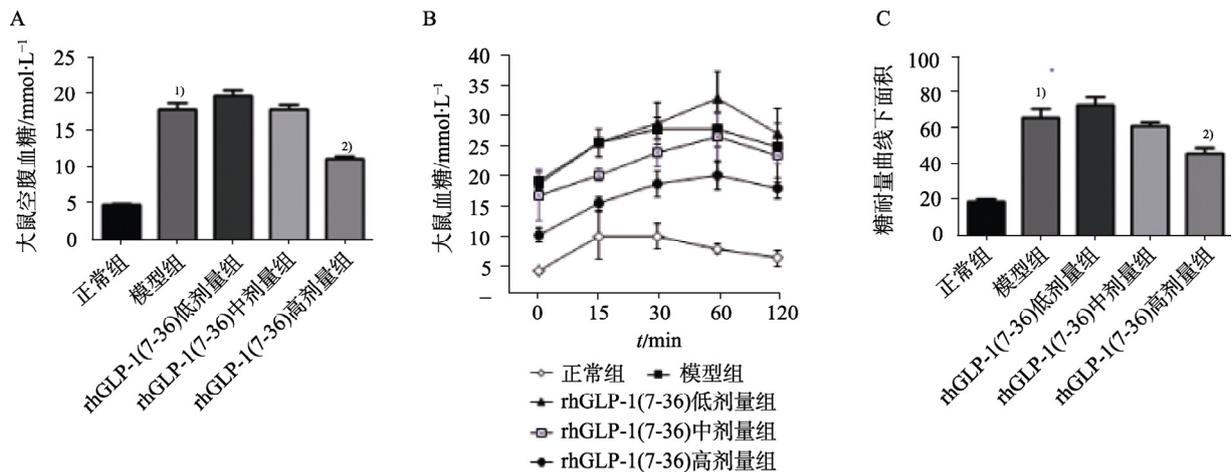


图1 rhGLP-1(7-36)对DKD大鼠FBG及IPGTT的影响(n=6)

A-给药期间各组大鼠空腹血糖; B-给药后各组大鼠的IPGTT试验血糖随时间的变化曲线; C-IPGTT试验血糖-时间曲线下面积; 与正常组比, ¹⁾P<0.01; 与模型组比, ²⁾P<0.05。

Fig. 1 Effect of rhGLP-1(7-36) on FBG and IPGTT of DKD rats(n=6)

A-fasting blood glucose in each group of rats during administration; B-IPGTT test blood glucose change curve with time in each group of rats after administration; C-area under the IPGTT test blood glucose-time curve; compared with the normal group, ¹⁾P<0.01; compared with the model group, ²⁾P<0.05.

3.3 24 h 尿微量白蛋白、肌酐清除率及尿素氮水平比较

治疗后, rhGLP-1(7-36)中剂量组和高剂量组大鼠的24 h尿微量白蛋白及尿素氮水平较模型组均明显下降, rhGLP-1(7-36)高剂量组肌酐清除率显著上升(P<0.05), 见图2。

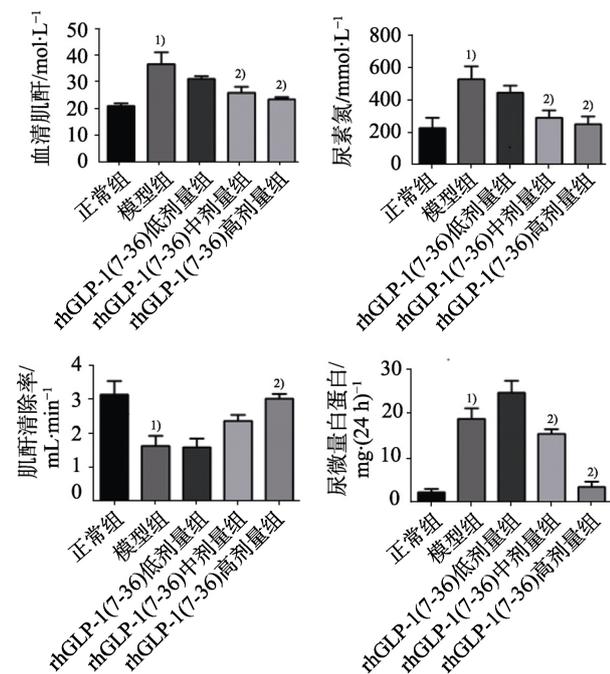


图2 rhGLP-1(7-36)对DKD大鼠的肾脏功能及代谢参数的影响(n=6)

与正常组比, ¹⁾P<0.01; 与模型组比, ²⁾P<0.05。

Fig. 2 Effects of rhGLP-1(7-36) on renal function and metabolic parameters of DKD rats(n=6)

Compared with the normal group, ¹⁾P<0.01; compared with the model group, ²⁾P<0.05.

3.4 肾脏组织病理形态学观察

正常组大鼠肾小球结构清晰, 基底膜、系膜区基质、系膜细胞及内皮细胞水平正常; 模型组大鼠肾小球体积增大, 并出现分页, 基底膜、系膜区基质均明显增加, 肾小管上皮细胞伴有空泡样变性, 肾间质出现炎性细胞浸润。与模型组比较, rhGLP-1(7-36)中剂量组和高剂量组大鼠的肾小球体积改善, 空泡样变性和浸润明显减轻, 结果见图3。

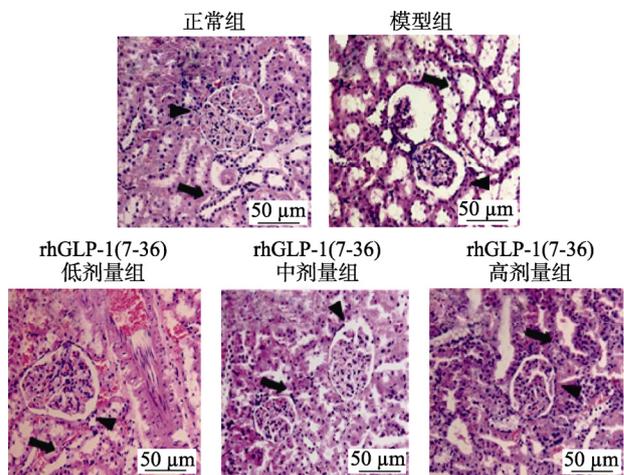


图3 HE染色肾组织病理形态学观察(200×)

三角形表示肾小球结构改变, 箭头表示肾小管上皮细胞空泡样病变。

Fig. 3 Pathological observation of renal tissue in HE staining line(200×)

Triangle diagram indicates a structural change in the glomeruli, arrow diagram indicates vacuolus epithelial lesions in the renal tubules.

3.5 SIRT1 蛋白水平比较

治疗后, rhGLP-1(7-36)高剂量组大鼠肾脏组

织 SIRT1 水平较模型组明显上升($P<0.05$), 低剂量组和中剂量组大鼠肾组织 SIRT1 水平虽有上升趋势但未有统计学差异, 结果见图 4。

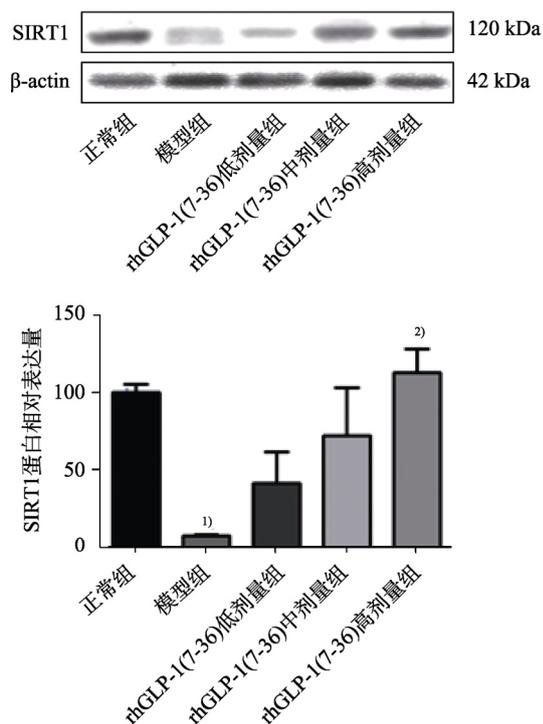


图 4 大鼠肾组织 SIRT1 蛋白水平比较($n=3$)

与正常组比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 4 Comparison of SIRT1 protein levels in rats' kidney tissue($n=3$)

Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$.

4 讨论

DKD 的特征是肾脏的滤过功能受损, 表现为尿蛋白的持续增加和肾小球滤过率的逐渐下降, 最终导致肾功能完全丧失^[6]。高血糖是 DKD 最重要的危险因素, 肾脏组织长期处于高糖环境的刺激下导致肾小球基底膜增厚、系膜扩张、足细胞丢失和剩余足细胞肥大, DKD 病程晚期会出现肾小球硬化和肾小管间质纤维化等病症^[7]。

研究显示, GLP-1 受体激动剂是一类新型的抗高血糖药物, 已被证实具有预防 DKD 发病和延缓病程进展的可能^[8]。通过基因工程技术获得的 rhGLP-1(7-36), 与机体内 GLP-1 的活性成分具有相同氨基酸序列, 可增加胰岛内分泌 β 细胞对葡萄糖的敏感度、刺激胰岛素的分泌, 属于促胰岛素分泌剂。且其促胰岛素分泌作用具有葡萄糖依赖性, 在调节血液葡萄糖稳态中发挥着重要的作用, 当机体血糖处于低水平时不产生促胰岛素分

泌作用, 故而引起低血糖的危险。rhGLP-1(7-36)通过与 GLP-1 受体结合发挥作用^[9]。既往研究表明 GLP-1 受体在机体分布广泛, 包括胰岛、内皮细胞、肺脏、肾脏等, 提示 rhGLP-1(7-36)可能在这些组织中也具有一定药效^[10]。本研究通过肾组织病理形态学观察发现, rhGLP-1(7-36)能有效改善大鼠肾小球体积, 减轻空泡样变形和浸润, 下调 24 h 尿微量白蛋白, 上调肌酐清除率, 提示 rhGLP-1(7-36)对 DKD 引起的肾损伤具有一定的修复作用, 进而保持机体内环境的相对稳定。

既往研究表明, 肾脏功能由胰岛素调节, 肾脏胰岛素敏感性在 DKD 早期有所丢失。胰岛素抵抗会增加患者机体氧化应激、高密度脂蛋白的生成并产生内皮功能障碍, 加剧机体微血管病变。外源性胰岛素虽可逆转糖毒性, 但却有加重胰高血糖素血症的风险^[11]。在高糖状态下, GLP-1 能够刺激胰岛细胞分泌胰岛素减少胰高血糖素, 恢复胰岛素敏感性, 增强血糖平衡^[12]。本研究显示, rhGLP-1(7-36)组大鼠的腹腔糖耐量 AUC 水平较模型组均有所下降, 说明 rhGLP-1(7-36)对 DKD 患者的胰岛素抵抗具有一定的治疗和预防作用, 这也提示 rhGLP-1(7-36)能有效改善胰岛 B 细胞功能, 提高机体对血糖的调节能力。

SIRT1 在预防细胞衰老、增强血管舒张反应和减轻衰老引起的血管损伤方面具有多种益处。大量研究表明, SIRT1 在 DKD 中起重要作用, 随着 DKD 的发生, SIRT1 在患者体内的表达显著降低^[13]。然而, 调控 DKD 中 SIRT1 表达的确切机制尚不清楚。既往研究表明, SIRT1 可通过去乙酰化调控多种调节肾细胞内环境平衡的转录因子活性, 并参与 DKD 的发病机制^[13]。增加 SIRT1 活性能减轻 DKD 的肾纤维化^[14]; 抑制 FOXO4 乙酰化和足细胞凋亡^[15], 减轻尿蛋白和肾小球损伤。同时 SIRT1 作为炎症、细胞衰老和线粒体功能障碍的负调控因子, 是 DKD 发病机制的关键抑制因子^[16], 当使用 SIRT1 抑制剂 EX527 时, 维达列汀对高糖环境下的肾脏内皮功能保护作用消失^[17]。本研究显示, rhGLP-1(7-36)组大鼠 SIRT1 水平较模型组均有所上升, 提示 rhGLP-1(7-36)可通过增加糖尿病肾病大鼠肾组织的 SIRT1 水平, 延缓 DKD 的进展, 产生肾脏保护作用。

综上所述, rhGLP-1(7-36)能有效改善 DKD 大鼠的胰岛素抵抗和肾脏功能, 其作用机制可能与上调患病大鼠肾组织的 SIRT1 水平有关。

REFERENCES

- [1] WANG C, YIN M S, LIU C X. Intervention of semaglutide on the expression of mTOR signaling pathway in the early stage of diabetic cardiomyopathy rats[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2019, 36(14): 1761-1766.
- [2] CHUANG S M, SHIH H M, CHIEN M N, et al. Risk factors in metabolic syndrome predict the progression of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 153: 6-13.
- [3] CARRÉ J E, AFFOURTIT C. Mitochondrial activity and skeletal muscle insulin resistance in kidney disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2751.
- [4] WANG Y L, ZHU X J, YUAN S G, et al. TLR4/NF- κ B signaling induces GSDMD-related pyroptosis in tubular cells in diabetic kidney disease[J]. *Front Endocrinol*, 2019, 10: 603.
- [5] TANG K, SUN M F, SHEN J, et al. Transcriptional coactivator p300 and silent information regulator 1(SIRT1) gene polymorphism associated with diabetic kidney disease in a Chinese cohort[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2017, 125(8): 530-537.
- [6] LIU S W. Protective mechanism of eplerenone on rats with diabetic nephropathy[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2018, 35(6): 812-815.
- [7] WARREN A M, KNUDSEN S T, COOPER M E. Diabetic nephropathy: An insight into molecular mechanisms and emerging therapies[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, 23(7): 579-591.
- [8] GRECO E, RUSSO G, GIANDALIA A, et al. GLP-1 receptor agonists and kidney protection[J]. *Medicina*, 2019, 55(6): 233.
- [9] YIN W Q, XU S Q, WANG Z, et al. Recombinant human GLP-1(rhGLP-1) alleviating renal tubulointestinal injury in diabetic STZ-induced rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 793-800.
- [10] PARK S, YOON J, SEO D, et al. Resistance exercise training attenuates the loss of endogenous GLP-1 receptor in the hypothalamus of type 2 diabetic rats[J]. *Int J Environ Res Public Heal*, 2019, 16(5): 830.
- [11] MENDEZ C E, WALKER R J, EILER C R, et al. Insulin therapy in patients with type 2 diabetes and high insulin resistance is associated with increased risk of complications and mortality[J]. *Postgrad Med*, 2019, 131(6): 376-382.
- [12] VAN BAAR M J B, VAN DER AART A B, HOOGENBERG K, et al. The incretin pathway as a therapeutic target in diabetic kidney disease: A clinical focus on GLP-1 receptor agonists[J]. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2019, 10. Doi: 10.1177/2042018819865398
- [13] WANG W N, SUN W X, CHENG Y L, et al. Role of sirtuin-1 in diabetic nephropathy[J]. *J Mol Med*, 2019, 97(3): 291-309.
- [14] GE X X, XU B J, XU W W, et al. Long noncoding RNA GAS5 inhibits cell proliferation and fibrosis in diabetic nephropathy by sponging miR-221 and modulating SIRT1 expression[J]. *Aging*, 2019, 11(20): 8745-8759.
- [15] HUANG F J, WANG Q Z, GUO F, et al. FoxO1-mediated inhibition of STAT1 alleviates tubulointerstitial fibrosis and tubule apoptosis in diabetic kidney disease[J]. *EBioMedicine*, 2019, 48: 491-504.
- [16] ZHONG Y F, LEE K, HE J C. SIRT1 is a potential drug target for treatment of diabetic kidney disease[J]. *Front Endocrinol*, 2018, 9: 624. Doi: 10.3389/fendo.2018.00624.
- [17] GAO P, LI L, WEI X, et al. Activation of transient receptor potential channel vanilloid 4 by DPP-4(dipeptidyl peptidase-4) inhibitor vildagliptin protects against diabetic endothelial dysfunction[J]. *Hypertens Dallas Tex*, 2020, 75(1): 150-162.

收稿日期: 2019-12-04
(本文责编: 沈倩)