

骨化三醇对糖尿病肾病大鼠尿液 Smad1 水平的影响

兰凯,张光伟,刘树义,张旭东,田甜

(西安医学院临床医学院,陕西 西安 710021)

摘要:目的 探讨骨化三醇对糖尿病肾病(DN)大鼠尿液中信号蛋白 Smad1 水平的影响及尿蛋白改变情况。方法 采用链脲佐菌素(STZ)腹腔注射的方法构建糖尿病肾病大鼠动物模型,将造模成功的大鼠随机分为骨化三醇组(T组)10只、DN组(D组)10只,并设置健康对照组(N组)10只。T组大鼠给予0.03 μg/(kg·d)的骨化三醇灌胃;D组与N组给予等量花生油灌胃。药物干预12周后检测各组大鼠尿液 Smad1 水平、24h尿蛋白定量及一般生化指标。结果 T组和D组 Smad1 水平和24h尿蛋白定量高于N组,差异有统计学意义($P<0.05$);T组尿液 Smad1 水平和24h尿蛋白定量低于D组,差异有统计学意义($P<0.05$)。尿液 Smad1 水平与24h尿蛋白量呈正相关($r=0.671, P<0.05$)。结论 骨化三醇可能是通过调节信号蛋白 Smad1 水平,从而改善糖尿病肾病大鼠蛋白尿的产生。

关键词:糖尿病肾病;骨化三醇;Smad1

中图分类号:R692

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2021.01.020

文章编号:1006-1959(2021)01-0075-03

Effect of Calcitriol on Urine Smad1 Level in Rats with Diabetic Nephropathy

LAN Kai,ZHANG Guang-wei,LIU Shu-yi,ZHANG Xu-dong,TIAN Tian

(Clinical School,Xi'an Medical University,Xi'an 710021,Shaanxi,China)

Abstract: Objective To investigate the effect of calcitriol on the level of signal protein Smad1 in the urine of diabetic nephropathy (DN) rats and the changes in urine protein. Methods The rat model of diabetic nephropathy was constructed by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). The rats that were successfully modeled were randomly divided into calcitriol group (T group), 10 rats, DN group (D group) 10 animals, and a healthy control group (N group) 10 animals. The rats in group T were given 0.03 μg/(kg·d) calcitriol by gavage; group D and group N were given peanut oil by gavage. After 12 weeks of drug intervention, the levels of urine Smad1, 24h urine protein quantitative and general biochemical indicators of each group were detected. Results The levels of Smad1 and 24h urine protein in group T and D were higher than those in group N, the difference was statistically significant ($P<0.05$); the level of urine Smad1 and 24h urine protein in group T were lower than those in group D, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The level of urine Smad1 was positively correlated with 24h urine protein ($r=0.671, P<0.05$). Conclusion Calcitriol may improve the production of proteinuria in rats with diabetic nephropathy by regulating the level of signal protein Smad1.

Key words: Diabetic nephropathy; Calcitriol; Smad1

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最常见的慢性微血管并发症之一,近年来我国糖尿病发病率不断增长。糖尿病肾病初期症状不明显,容易造成漏诊,一旦发展到终末期肾病就必须依靠肾脏替代治疗来维持,因此早期诊断及治疗成为学者关注的焦点。有研究显示^[1],骨化三醇具有减轻糖尿病肾病大鼠蛋白尿及肾脏保护作用,但具体影响机制尚不清楚,可能与减轻肾小球系膜基质增生有关,目前这方面的研究较少。近年来研究发现在肾脏疾病发生发展过程中 Smad1 蛋白发挥信号传导作用,被认为是糖尿病肾病肾损伤的标志物,其可直接调节肾小球基底膜IV型胶原等关键纤维化因子的转录活性,从而可能影响到蛋白尿的发生^[2,3]。本研究拟通过骨化三醇对糖尿病肾病大鼠尿液信号蛋白 Smad1 水平的影响及尿蛋白改变情况,探讨该药物对肾脏保护作用的可能机制,为糖尿病肾病的诊治提供新的思路,现报道如下。

基金项目:陕西省教育厅科研计划项目(编号:19JK0762)

作者简介:兰凯(1984.4-),男,河南偃师人,硕士,讲师,主治医师,主要从事肾脏病方面的研究

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 购入清洁级封闭群雄性 SD 大鼠 30 只,体质量(200±20)g,均普通饮食喂养。采用随机数字表法将其分为骨化三醇组(T组)、DN组(D组)和对照组(N组),每组 10 只。大鼠进行糖尿病肾病造模,剩余 10 只大鼠为健康对照组(N组)。本研究严格按照我国实验动物伦理的要求进行,所有动物实验均按照西安医学院伦理委员会的指导方针进行,并经西安医学院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的构建 T组和D组大鼠禁食 10 h 后,予链脲菌素(美国 Sigma 公司)单次无菌经腹腔注射,60 mg/kg,健康对照组给予腹腔注射等量的柠檬酸缓冲液,常规饮食喂养,检测血糖。72 h 后 T 组和 D 组分别取大鼠尾静脉血检测空腹血糖(FBG),FBG ≥ 16.65 mmol/L 确定糖尿病大鼠造模成功,正常饮食喂养 3 周后留尿检测 24h 尿蛋白量 ≥ 30 mg 确定为糖尿病肾病大鼠。T 组将骨化三醇(上海罗氏制药公司,规格 0.25 μg/粒,批号 J20190056)溶于花生油,以 0.03 μg/(kg·d)的剂量

进行灌胃治疗;D组和N组均给予等量的花生油灌胃。

1.2.2 血、尿指标检测 12周后所有大鼠代谢笼收集24h尿液,记录24h尿量和饮水量,进食8~10h后称重,用10%水合氯醛腹腔内注射麻醉,腹主动脉采血4~5ml,立即送检。24h尿蛋白采用双缩脲法检测,依照试剂盒(美国R&D公司试剂盒)操作流程,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定大鼠尿液Smad1蛋白水平;自动生化仪(美国Glamour生化仪)检测空腹血糖(FBG)、血肌酐(Scr)、血钙、血磷和甲状旁腺激素(PTH)。

1.3 观察指标 比较治疗12周后各组24h尿蛋白含量、尿Smad1蛋白水平、血肌酐、血钙、血磷、空腹血

糖及PTH。分析尿液Smad1水平和24h尿蛋白量相关性。

1.4 统计学处理 所有数据采用SPSS 19.0软件包进行统计学分析。计量资料数据采用($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD-*t*检验。两变量之间相关性描述采用直线相关性分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗12周后各组大鼠血指标比较 T、D组空腹血糖、肌酐和PTH均高于N组,差异有统计学意义($P < 0.05$);T组肌酐低于D组,差异有统计学意义($P < 0.05$);T组血钙、血磷与N组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 治疗12周后各组大鼠血指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	肌酐(μmol/l)	FBG(mmol/L)	血钙(mmol/l)	血磷(mmol/L)	PTH(pg/dl)
N组	10	17.17±1.21	4.89±0.34	1.31±0.26	1.73±0.44	4.10±1.32
T组	10	22.43±1.63 ^a	23.78±1.13 ^a	1.24±0.26	1.58±0.37	10.29±1.45 ^a
D组	10	29.36±2.21 ^{ab}	25.39±1.27 ^a	1.10±0.13 ^{ab}	1.98±0.35 ^{ab}	27.87±1.58 ^{ab}

注:与N组比较,^a $P < 0.05$;与P组比较,^b $P < 0.05$

2.2 治疗12周后各组大鼠尿液Smad1水平和24h尿蛋白量变化情况 T组和D组尿液中的Smad1水平及24h尿蛋白高于N组,差异有统计学意义($P < 0.05$);T组尿液中Smad1水平及24h尿蛋白低于D组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 治疗12周后各组大鼠尿液smad1水平和24h尿蛋白量变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	smad1(μg/L)	24h尿蛋白(mg)
N组	10	6.83±0.31	5.17±0.69
T组	10	9.73±0.47 ^a	31.32±1.72 ^a
D组	10	13.98±0.63 ^{ab}	43.91±1.87 ^{ab}

注:与N组相比,^a $P < 0.05$;与P组相比,^b $P < 0.05$

2.3 尿液Smad1水平和24h尿蛋白量相关性 糖尿病肾病大鼠尿液中Smad1蛋白水平和24h尿蛋白量呈正相关($r=0.671$, $P < 0.05$)。

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病病人最为常见的慢性微血管特异性并发症,糖尿病肾病发病率呈逐年上升的趋势,已成为导致临床终末期肾病的主要病因之一^[4,5]。由于该病患者机体存在复杂的代谢紊乱,往往要比其它肾脏疾病治疗起来更加棘手。研究发现糖尿病肾病发病包括糖的高代谢异常、肾组织氧化应激及肾脏血流动力学改变等因素,均可引起肾小球滤过膜的损伤,最终导致患者蛋白尿的发生,而微量蛋白尿被广泛认为就是糖尿病肾病的早期标志^[6,7]。临床上患者出现持续性蛋白尿说明肾脏可能

已经发生的实质性损害。蛋白尿目前已被证实是肾脏损伤的独立危险因素,有效控制蛋白尿可以延缓糖尿病肾病肾脏功能减退,是目前研究治疗的一个突破口。

近来多项研究发现维生素D具有除调节体内钙磷代谢以外更广泛的生理作用,其还可能影响免疫、生殖、内分泌、神经等生理活动的调节。活性维生素D是一种脂溶性维生素,其通过影响细胞内介导特异维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)发挥生物学活性^[8,9]。维生素D类似物的分子结构同活性维生素D相似,可以和VDR结合通过结构修饰改变产生生物学效应,具有与活性维生素D相似的生物学活性,目前主要包括骨化三醇、帕立骨化醇和度骨化醇等^[10,11]。骨化三醇作为维生素D类似物中临床应用最为广泛的一种,前期的研究主要集中在其调节钙磷代谢及治疗佝偻病等方面的作用,近年来有关骨化三醇可能参与肾脏保护作用的研究越来越多。

本研究发现在骨化三醇治疗12周后糖尿病肾病大鼠蛋白尿指标较未治疗组明显下降,肌酐水平也有下降,尿液中的Smad1蛋白水平较未治疗组有所下降,证实了其具有独立于钙磷代谢以外的肾脏保护作用,推测骨化三醇可能具有影响信号蛋白Smad1的作用。Smad蛋白家族被证实是一类细胞内的信号传导蛋白,其可将TGF-β信号通路信息

从受体传导至靶向细胞内核中,并可在多种靶向细胞种类中发挥重要作用,如调节细胞的分化凋亡,合成基质等,同时也参与免疫调节和组织修复^[12,13]。有研究发现,Smad1 蛋白作为 Smad 蛋白家族一员是 TGF- β_1 下游重要的信号传导因子,在糖尿病肾病整个病程的进展中发挥着重要的调节作用,可促进足细胞线粒体 NADPH 氧化酶增多,抑制了线粒体的功能,诱导肾小球的肥大、形状的改变,甚至细胞凋亡,最终可引起肾小球硬化,造成肾脏功能的持续恶化,导致患者进入终末期肾病^[14-16]。研究发现骨化三醇不仅具有调节钙磷代谢的生物学作用,还可能通过影响炎症因子分泌、改善系膜细胞增殖、抑制 RAS 系统、减少细胞外基质沉积等途径改善糖尿病肾病病理生理过程,具有独立于钙磷代谢以外的肾脏保护作用^[17-19],但其具体作用机制尚不完全清楚。有研究表明^[20,21],骨化三醇可能通过调节细胞内核因子 κB 通路,影响其下游的炎症因子表达减少,抑制炎症反应,进而缓解肾脏组织炎症损伤及肾小球纤维化的进展,从而对改善肾脏功能起到一定的保护作用,与上述研究结果是一致的。同时本研究发现糖尿病肾病大鼠尿液中 Smad1 信号蛋白水平和 24 h 尿蛋白量成存在正相关趋势,这也说明了 Smad1 信号蛋白可以影响糖尿病肾病蛋白尿的发生及进展,其能否作为糖尿病肾病诊断检测的指标还需要进一步的研究。

综上所述,骨化三醇可以调节信号蛋白 Smad1 水平,从而改善糖尿病肾病大鼠蛋白尿的,改善肾脏功能,延缓糖尿病肾病的发展,给临床上糖尿病肾病的诊断治疗提供了新思路。

参考文献:

[1]付佳,徐琪,韩睿.维生素 D 及其受体在糖尿病肾病发病中的研究进展[J].中国医药导报,2020,17(7):23-26.
[2]Li Q,Feng L,Li J,et al.Urinary Smad1 is a new biomarker for diagnosis and evaluating the severity of diabetic nephropathy[J].Endocrine,2013,46(1):83-89.
[3]李梦,田少江.Smad1 蛋白在糖尿病肾病中的应用与研究进展[J].广东医学,2020,41(12):1294-1296.
[4]Oshiro Y,Tanaka H,Kawasaki F,et al.Partial remission by cyclosporine monotherapy in a patient with membranous nephropathy superimposed diabetic nephropathy [J].CEN Case Reports,2016,5(2):219-222.
[5]陈武,邹光美.检测血浆 25-羟基维生素 D 水平在糖尿病肾病中的应用价值[J].检验医学与临床,2020,17(13):1850-1853.
[6]张健,徐丹丹,王伟涛,胱抑素 C、尿微量白蛋白/肌酐比值对早期糖尿病肾病的诊断价值[J].医学信息,2019,32(8):176-177.
[7]Miraghajani MS,Esmailzadeh A,Najafabadi MM,et al.Soy

milk consumption, inflammation,coagulation, and oxidative stress among type 2 diabetic patients with nephropathy [J].Diabetes Care,2012,35(10):1981-1985.

[8]Seyyed A,Bootorabi M,Ayremloou P,et al.The effect of vitamin D supplementation on insulin resistance, visceral fat and adiponectin in vitamin D deficient women with polycystic ovary syndrome: a randomized placebo -controlled trial [J].Gynecol Endocrinol,2018,34(6):489-494.

[9]Nam H,Kim HY,Choi JS,et al.Association between Serum 25 -hydroxyvitamin D Levels and Type 2 Diabetes in Korean Adults[J].Chonnam Medical Journal,2017,53(1):73-77.

[10]杨静,傅继华.糖尿病肾病病理机制及治疗措施的研究进展[J].医学研究与教育,2020,37(1):1-6.

[11]Wang XM,Yao M,Liu SX,et al.Interplay between the Notch and P13K/Akt pathways in high glucose induced podocyte apoptosis [J].Am J Physiol Renal Physiol,2014,30(6):205-213.

[12]Meng X,Chung AK,Lan H.Role of the TGF- β /BMP-7/Smad pathways in renal diseases [J].Clinical Ence,2013,124(4):243-254.

[13]Qu X,Li X,Zheng Y,et al.Regulation of Renal Fibrosis by Smad3 Thr388 Phosphorylation [J].Am J Pathol,2014,184(4):944-952.

[14]Das R,Xu S,Quan X,et al.Upregulation of mitochondrial Nox4 mediates TGF- β -induced apoptosis in cultured mouse podocytes[J].Am J Physiol Renal Physiol,2014,306(2):F155.

[15]刘俊芬,王琳琳,金玉杰,等.糖尿病肾病患者血清 TGF β /Smad 蛋白、p38MAPK 蛋白及尿 α_1 -MG 水平变化及意义[J].解放军预防医学杂志,2018,36(7):946-947,950.

[16]Bi J,Watanabe H,Fujimura R,et al.A downstream molecule of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, alpha-1-acid glycoprotein, protects against mouse model of renal fibrosis [J].Scientific Reports, 2018,8(6):3590-3604.

[17]蔡凯鹏,谢伟基.骨化三醇对早期糖尿病肾病患者相关炎症因子的影响[J].汕头大学医学院学报,2020,33(2):101-104.

[18]李黎.血清 1,25-二羟维生素 D₃ 超敏 C 反应蛋白与 2 型糖尿病肾病的相关性研究 [J].中国药物与临床,2020,20(18):3039-3041.

[19]陈武,邹光美.检测血浆 25-羟基维生素 D 水平在糖尿病肾病中的应用价值 [J].检验医学与临床,2020,17(13):1850-1853.

[20]宁聪华,权莉,俞瑞,等.活性维生素 D₃ 下调核因子 κB 炎症通路对 2 型糖尿病大鼠肝脏保护作用的研究[J].中国糖尿病杂志,2020,28(8):613-618.

[21]张爱鸣,厉钊微,高赛赛.C 肽及其他因素与 2 型糖尿病肾病的相关性[J].浙江临床医学,2020,22(5):654-656.

收稿日期:2020-09-11;修回日期:2020-09-25

编辑/宋伟