

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.16.001

文章编号: 1005-8982(2018)16-001-05

基础研究·论著

血红素加氧酶 1 对 2 型糖尿病肾病 大鼠肾脏功能影响的研究*

罗喜钢¹, 王毅¹, 张凤香²

(1. 锦州医科大学附属第三医院 检验中心, 辽宁 锦州 121000;
2. 锦州医科大学附属第一医院 胸外科, 辽宁 锦州 121001)

摘要: 目的 通过复制糖尿病肾病大鼠模型, 以药物干预改变糖尿病肾病大鼠肾脏中血红素加氧酶 1 (HO-1) 水平, 从而探讨 HO-1 对 2 型糖尿病肾病大鼠肾脏功能的影响。**方法** 32 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分成正常对照组、糖尿病肾病 (DN) 组、DN 氯化血红素组和 DN 锌原卟啉组。除正常对照组外, 其他 3 组复制糖尿病肾病模型, 进行药物干预。各组大鼠用药 4 周后进行取材, 大鼠处死前禁食收集 24 h 尿液, 测定大鼠 24 h 尿量和尿肌酐 (Ucr)。大鼠麻醉后心脏取血, 分别检测血肌酐 (Scr) 和血胱抑素 C (Cys-c) 的浓度, 计算内生肌酐清除率 (Ccr)。肾脏组织 HE 染色观察大鼠肾脏组织结构是否异常, 电镜下观察肾小球和肾小管超微结构的改变, 应用免疫组织化学和 Western blot 技术对肾脏中 HO-1 进行定位和定量分析。**结果** ① DN 组、DN 氯化血红素组和 DN 锌原卟啉组 Scr、Cys-c、Ucr、Ccr 与正常对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), DN 组、DN 氯化血红素组和 DN 锌原卟啉组 Scr 和 Cys-c 升高, Ucr、Ccr 降低, DN 锌原卟啉组 Scr 和 Cys-c 增加幅度较 DN 组和 DN 氯化血红素组高。② HE 染色及电镜结果显示, 正常对照组大鼠肾脏组织结构无明显变化, 其余 3 组大鼠肾脏组织结构均有改变。肾脏组织结构破坏程度, DN 锌原卟啉组 > DN 组 > DN 氯化血红素组。③ Western blot 结果显示, DN 氯化血红素组肾脏中 HO-1 表达水平高于 DN 组, DN 锌原卟啉组肾脏中 HO-1 表达水平低于 DN 组。**结论** DN 氯化血红素组大鼠肾脏中 HO-1 表达水平升高, 而 DN 锌原卟啉组大鼠肾脏中 HO-1 表达水平下降, DN 氯化血红素组大鼠肾脏的损伤指标以及肾脏组织形态学的损伤程度轻于 DN 锌原卟啉组, 实验结果说明提高 2 型糖尿病肾病大鼠肾脏中 HO-1 表达水平可以减轻肾脏损伤。

关键词: 2 型糖尿病肾病; 血红素加氧酶 1; 内生肌酐清除率; 肾损伤

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Effect of HO-1 on renal function of rats with type 2 diabetic nephropathy*

Xi-gang Luo¹, Yi Wang¹, Feng-xiang Zhang²

(1. Clinical Laboratory, the Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China; 2. Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of heme oxygenase-1 (HO-1) on the renal function of rats with type 2 diabetic nephropathy by changing the expression of HO-1 in the kidneys of the rats through drug intervention.

Methods After one week of adaptive feeding, 32 SD rats were randomly divided into normal control group, diabetic

收稿日期: 2017-05-05

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81541099)

[通信作者] 张凤香, E-mail: zhangfengxiang64@163.com; Tel: 13500469254

nephropathy (DN) group, DN hemin group and DN zinc protoporphyrin group with 8 in each group. The rats in each group were sacrificed 4 weeks later. The rats were fasted before sacrifice to collect 24-h urine. The volume of 24-h urine and urinary creatinine (Ucr) were measured. Blood samples were taken from the hearts of the rats after anesthesia. Serum creatinine (Scr) and blood cystatin C (Cys-C) concentrations were measured and the creatinine clearance rate (Ccr) was calculated. HE staining was used to observe the histological changes of renal tissues. The ultrastructural changes of glomeruli and renal tubules were observed by electron microscopy. Immunohistochemistry and Western blot were used for localization and quantitative analysis of HO-1 in the rat kidneys. **Results** Compared with the control group, the levels of Scr and Cys-C were increased ($P < 0.05$), Ucr and Ccr were decreased ($P < 0.05$) in the DN group, the DN hemin group and the DN zinc protoporphyrin group; Scr and Cys-C increased more in the DN zinc protoporphyrin group than in the DN and DN hemin groups. HE staining and electron microscopy showed that the renal tissue structures of the control group had no obvious change, but the structures of the kidney tissues changed in the other three groups. The degree of renal tissue structure damage was ranged as follows: DN zinc protoporphyrin group > DN group > DN hemin group. Western blot analysis showed that the expression of HO-1 in the kidneys of the DN hemin group was higher than that in the DN group, and the expression of HO-1 in the DN zinc protoporphyrin group was lower than that in the DN group. **Conclusions** The expression of HO-1 significantly increased in the rat kidneys of the DN hemin group, but decreased in the rat kidneys of the DN zinc protoporphyrin group. The indexes of renal injury and the degree of renal histomorphological injury in the DN hemin group were significantly lighter than those in the DN zinc protoporphyrin group. These experimental results showed that the expression of HO-1 in the kidneys of type 2 diabetic nephropathy rats could relieve kidney injury.

Keywords: type 2 diabetic nephropathy; heme oxygenase-1; endogenous creatinine clearance; kidney damage

血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 活性对热较稳定, 又被称为热休克反应蛋白 32, 是 HO 亚型中的可诱导型。在正常的情况下, 机体内各种组织器官中的 HO-1 表达水平极低, 当机体受到一些刺激因素时其表达水平和生物活性会有所提高。其中能够刺激 HO-1 产生的活化信号分子包括血红素、内毒素、活性氧和生长因子等。在上述诱因下可诱导 HO-1 生成^[1], 而锌原卟啉等物质对其有抑制作用。血红素在其限速酶 HO-1 的催化下可以代谢生成 CO、铁离子和胆绿素, 胆绿素经过还原酶的作用生成胆红素^[2]。近年来研究发现^[3], HO-1 与其代谢产物有一定的抗炎、抗凋亡、舒张血管等作用。HO-1 在许多疾病中都起重要的保护作用, 抑制肾脏 HO-1 活性会导致肾脏血流灌注减少加重肾功能不全, 提高 HO-1 活性恰恰与其相反。

本实验通过复制 2 型糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 大鼠模型, 使用 HO-1 诱导剂氯化血红素和抑制剂锌原卟啉对大鼠模型进行药物干预后, 分析不同组别大鼠肾脏损伤程度与肾脏中 HO-1 表达之间的关系, 探讨 HO-1 对 2 型糖尿病肾病肾脏损伤是否具有保护作用, 为 2 型糖尿病导致的肾脏损伤提供新的治疗思维方式。

1 材料与方法

1.1 一般资料

200 ~ 250 g 健康清洁 6 周龄雄性 SD 大鼠 32 只, 辽宁长生生物技术有限公司供给, 合格证: SCXK (辽) 2010-0001, 分笼饲养。氯化血红素、锌原卟啉 (美国 Sigma 公司), HO-1 多克隆抗体、免疫组织化学试剂盒、DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物技术有限公司)。

1.2 方法

大鼠尾静脉注射链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ) 复制 DN 模型, 72 h 后用快速血糖仪测血糖, 其中 ≥ 16.65 mmol/L 的大鼠入选实验组。确定模型复制成功后, 各组大鼠分别进行药物干预。氯化血红素是 HO-1 的诱导剂, DN 氯化血红素组大鼠腹腔注射氯化血红素 30 μ mol/kg, 1 次 /2 d, 连续 4 周; 锌原卟啉是 HO-1 抑制剂, DN 锌原卟啉组大鼠腹腔注射锌原卟啉 10 μ mol/kg, 1 次 /2 d, 连续 4 周; 正常对照组和 DN 组大鼠腹腔注射等剂量的生理盐水。氯化血红素与锌原卟啉溶液均需现用现配以免药物失效, 药物需要避光配制。使用 0.2 mol/L 的氢氧化钠 NaOH 溶液对药品进行充分的溶解后, 0.2 mol/L 的氯化氢 HCl 调节 pH 值至 7.4 ~ 8.0。

大鼠腹腔用药 4 周后, 分别收集各组大鼠 24 h 尿液。根据大鼠的体重腹腔注射一定量的 10% 水合氯醛充分麻醉大鼠, 待大鼠麻醉后固定大鼠的四肢于手术台上, 取血 3 ml, 将血液缓慢推入一次性试管中, 静止一段时间, 当有血块凝集后, 以 3 000 r/min 离心 10 min 后轻轻取出试管, 使用移液器将上层血清转移至无菌 EP 管中。使用全自动生化分析仪检测各组大鼠血中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、血肌酐 (serum creatinine, Scr)、尿肌酐 (urine creatinine, Ucr) 和胱抑素 C (cystatin-c, Cys-c) 浓度, 计算内生肌酐清除率 (creatinine clearance, Ccr), 做相关性分析。

取血后开腹取大鼠的肝脏和肾脏组织, 双侧肾脏使用大量生理盐水反复洗至颜色苍白为止, 取大鼠左侧部分肾脏组织将其修饰为 5 mm × 5 mm × 5 mm 左右的组织块, 迅速置于 10% 甲醛中固定, 用于 HE 染色、免疫组织化学分析, 同时取 1 mm × 1 mm × 1 mm 的组织块, 2% 戊二醛和 1% 锇酸固定, 用于电镜观察。取右侧肾脏立即放置到 -80℃ 冰箱中用于 Western blot 检测。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间的比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠生化指标比较

经单因素方差分析, 4 组大鼠 Scr、Cys-c、Ucr、Ccr 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与正常对照

组比较, DN 组、DN 氯化血红素组和 DN 锌原卟啉组 Scr、Ucr、Cys-c、Ccr、Cys-c 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), DN 组 Scr、Cys-c 升高 ($t = 7.021$ 和 27.502 , $P = 0.004$ 和 0.001), Ucr、Ccr 降低 ($t = -6.143$ 和 -5.604 , $P = 0.007$ 和 0.008)。与 DN 组比较, DN 氯化血红素组的 Scr、Cys-c 降低 ($t = 5.041$ 和 11.893 , $P = 0.007$ 和 0.003), Ucr、Ccr 增高 ($t = -3.922$ 和 -3.623 , $P = 0.009$ 和 0.015)。与 DN 组比较, DN 锌原卟啉组 Scr、Cys-c 增高 ($t = -13.924$ 和 -6.391 , $P = 0.003$ 和 0.009), Ucr、Ccr 降低 ($t = 2.481$ 和 7.183 , $P = 0.021$ 和 0.006)。见附表。

2.2 肾脏组织形态学改变

光镜下可观察到对照组大鼠肾脏组织结构正常, 肾小球基底膜厚度均匀, 足突细胞排列有序; DN 组大鼠肾小球与肾小管结均有改变, 肾小管上皮细胞排列不整齐, 并且有肿胀, 脱落等现象, 在肾小管中还可可见有管型生成, 肾小球基底膜增厚, 肾小球有一定程度上的萎缩; DN 氯化血红素组大鼠肾小管上皮细胞水肿, 空泡样的变性, 刷状缘丢失; DN 锌原卟啉组大鼠肾小管和肾小球的病变最为严重, 可见肾小管管腔扩大, 上皮细胞水肿变性, 大量的脱落, 细胞质和线粒体中有空泡形成, 肾小球萎缩, 鲍曼囊腔扩大, 肾小球基底膜不均匀的增厚, 足突细胞大量的融合。见图 1 ~ 3。

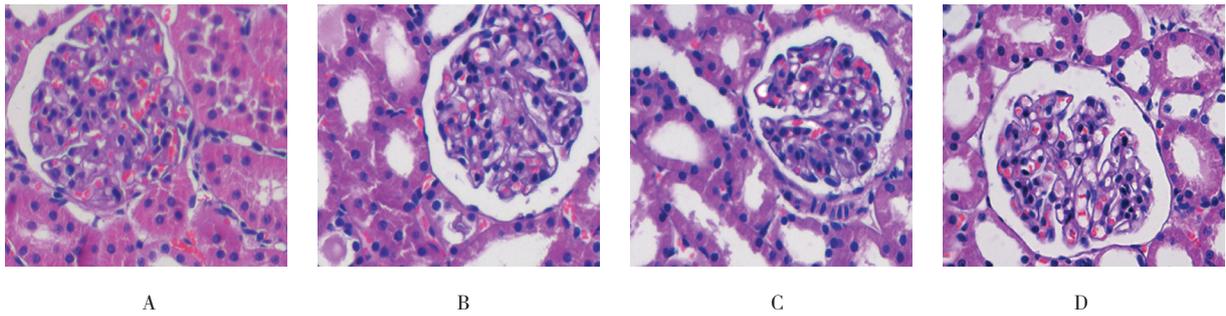
2.3 肾脏中 HO-1 表达水平

Western blot 结果显示, 正常对照组大鼠肾脏中有一定量的 HO-1 表达; DN 组大鼠肾脏中 HO-1 的表达较正常对照组大鼠降低; DN 氯化血红素组大鼠肾脏中 HO-1 表达高于其他各组; DN 锌原卟啉组大鼠肾脏中几乎没有 HO-1 的表达。见图 4。

附表 各组大鼠 Scr、Ucr、Ccr、Cys-c 比较 ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

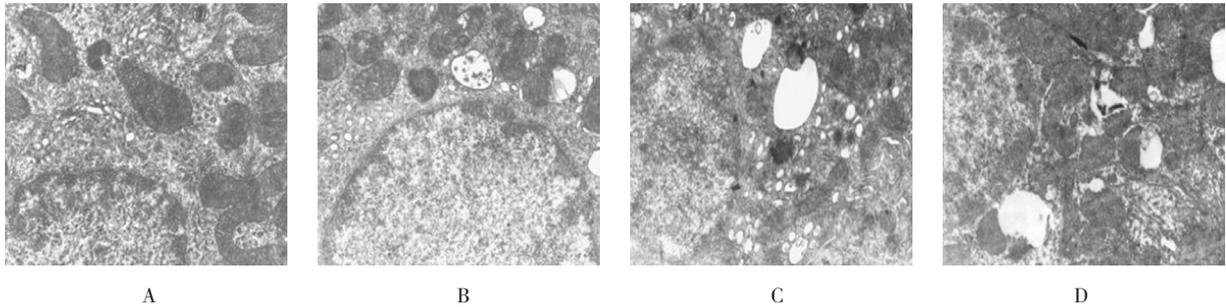
组别	Scr/ ($\mu\text{mol/L}$)	Ucr/ (mmol/L)	Ccr/ (ml/min)	Cys-c/ (mg/L)
正常对照组	35.59 ± 1.35	9.72 ± 1.12	4.21 ± 0.79	0.24 ± 0.03
DN 组	70.52 ± 5.21 ¹⁾	6.42 ± 0.93 ¹⁾	2.40 ± 0.37 ¹⁾	0.75 ± 0.04 ¹⁾
DN 氯化血红素组	50.96 ± 2.13 ¹⁾²⁾	8.55 ± 1.03 ¹⁾²⁾	3.40 ± 0.62 ¹⁾²⁾	0.50 ± 0.03 ¹⁾²⁾
DN 锌原卟啉组	110.18 ± 8.25 ¹⁾²⁾³⁾	5.02 ± 1.12 ¹⁾²⁾³⁾	1.03 ± 0.30 ¹⁾²⁾³⁾	0.91 ± 0.05 ¹⁾²⁾³⁾
F 值	251.315	27.325	38.781	436.206
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与正常对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 DN 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 DN 氯化血红素组比较, $P < 0.05$



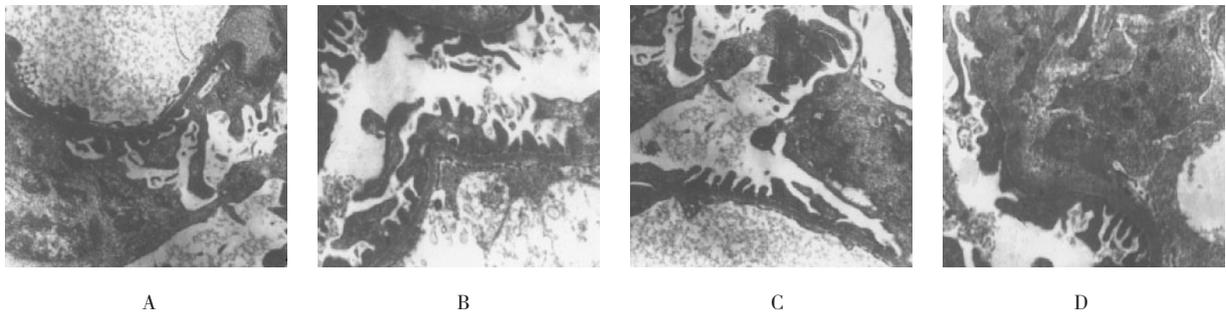
A: 正常对照组; B: DN 组; C: DN 氯化血红素组; D: DN 锌原卟啉组

图 1 肾脏组织形态 (HE 染色 ×200)



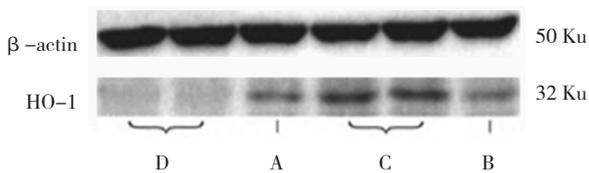
A: 正常对照组; B: DN 组; C: DN 氯化血红素组; D: DN 锌原卟啉组

图 2 肾小管组织形态 (电镜 ×10000)



A: 正常对照组; B: DN 组; C: DN 氯化血红素组; D: DN 锌原卟啉组

图 3 肾小球组织形态 (电镜 ×5000)



A: 正常对照组; B: DN 组; C: DN 氯化血红素组; D: DN 锌原卟啉组

图 4 肾脏 HO-1 蛋白表达

3 讨论

HO-1 是血红素代谢过程中的关键酶^[4],也是器官、组织、细胞受损后机体内重要的保护性酶。HO-1 具有抗炎、抗凋亡、抗氧化和维持应激状态下细胞稳定性的作用^[5]。此外, 现已公认 HO-1 在血液循环系统

具有重要的作用, 是潜在的血管调节器^[6]。本实验通过药物干预改变 DN 大鼠肾脏内 HO-1 的表达水平, DN 氯化血红素组大鼠通过腹腔注射氯化血红素来增加肾脏中 HO-1 的生成, DN 锌原卟啉组大鼠通过腹腔注射锌原卟啉减少肾脏 HO-1 生成。免疫组织化学和 Western blot 实验结果显示正常对照组大鼠肾脏中有少量 HO-1 表达; DN 组大鼠肾脏中的 HO-1 表达较正常对照组降低; DN 氯化血红素组大鼠肾脏中有大量的 HO-1 表达于肾小管上皮细胞; DN 锌原卟啉组大鼠肾脏内几乎没有 HO-1 的表达。

总之, 本实验结果表明提高 DN 大鼠肾脏中 HO-1 的表达, 可以提高肾脏滤过功能并减轻肾脏组织形态的损伤程度, 在一定程度上改善了肾功能。相

反, 减少 DN 大鼠肾脏中的 HO-1 的表达水平, 肾脏内 Cer 下降, 肾小管和肾小球都有一定程度上的损伤, 并且小管的损伤程度较肾小球严重, 但是确切的作用机制仍不完全清楚, 需要进一步去探究验证。

参 考 文 献:

- [1] ZHU K, GUO X, PENG W, et al. Protective effects of wheat germ protein isolate hydrolysates (WGPIH) against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in PC12 cells[J]. Food Res, 2013, 53(5): 297-303.
- [2] WONG P, MURRAY C, LOUW J, et al. Adult bronchopulmonary dysplasia: computed tomography pulmonary findings[J]. J Med Imaging Radiat Oncol, 2011, 55(7): 373-378.
- [3] STEFANSON A, BAKOVIC M. Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: focus on plant-derived compounds and trace minerals[J]. Nutrients, 2014, 6(8): 3777-3801.
- [4] IHO S, MAEYAMA J, SUZUKI F. CpG oligodeoxynucleotides as mucosal adjuvants[J]. Hum Vaccin Immunother, 2015, 11(4): 755-760.
- [5] SCHEIERMANN J, KLINMAN D M. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer[J]. Vaccine, 2013, 32(5): 6377-6389.
- [6] GAO H, MENG J, XING H, et al. Association of heme oxygenase-1 with the risk of polycystic ovary syndrome in non-obese women[J]. Hum Reprod, 2014, 29(5): 1058-1066.

(张蕾 编辑)