

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.04.008
文章编号: 1005-8982 (2022) 04-0040-05

实验研究·论著

恩格列净对血糖波动糖尿病小鼠肾损伤的影响及其机制研究*

史丽¹, 胡婷婷², 李红³, 张三明², 刘智慧², 左惠玲⁴, 胡利梅¹, 任卫东¹

(1. 河北北方学院附属第一医院 内分泌科, 河北 张家口 075000; 2. 河北北方学院附属第一医院 国际医疗部, 河北 张家口 075000; 3. 张家口市卫生健康项目管理中心, 河北 张家口 075000; 4. 河北北方学院附属第一医院 核医学科, 河北 张家口 075000)

摘要: **目的** 探究恩格列净通过 Caspase-1 介导的细胞焦亡对血糖波动糖尿病小鼠肾损伤的影响。**方法** 将 30 只 SPF 级 SD 雄性小鼠随机分为对照组、血糖波动组及恩格列净组, 每组 10 只。恩格列净组、血糖波动组小鼠成功复制血糖波动糖尿病模型后, 分别同时给予恩格列净 10 mg/(kg·d)、等量生理盐水灌胃, 1 次/d, 连续 4 周; 对照组小鼠同时灌胃等量生理盐水。采用全自动生化分析仪测定 24 h 尿蛋白、血肌酐、血尿素氮水平, 苏木精-伊红(HE)染色观察肾组织病理学变化, 酶联免疫吸附试验测定肾脏组织白细胞介素 1 β (IL-1 β)水平, Western blotting 检测肾组织 NLRP3、Cleaved caspase-1、GSDMD-N 蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 血糖波动组小鼠肾小球体积增大, 毛细血管基底膜明显增厚, 系膜基质增生, 肾小管上皮细胞中可见空泡化。与血糖波动组比较, 恩格列净组小鼠上述病理变化有所改善。与对照组比较, 血糖波动组和恩格列净组小鼠 24 h 尿蛋白、血尿素氮、血肌酐、肾组织 IL-8, 以及 NLRP3、Cleaved caspase-1、GSDMD-N 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$), 但恩格列净组小鼠 24 h 尿蛋白、血尿素氮、血肌酐、肾组织 IL-1 β , 以及 NLRP3、Cleaved caspase-1、GSDMD-N 蛋白相对表达量低于血糖波动组 ($P < 0.05$)。**结论** 恩格列净可能通过抑制 Caspase-1 通路活化, 对血糖波动性糖尿病小鼠肾损伤发挥保护作用。

关键词: 糖尿病; 肾损伤; 血糖波动; 恩格列净; 半胱天冬酶-1 通路; 焦亡

中图分类号: R587.1

文献标识码: A

Effects of empagliflozin on renal injury in diabetic mice with blood glucose fluctuation*

Li Shi¹, Ting-ting Hu², Hong Li³, San-ming Zhang², Zhi-hui Liu², Hui-ling Zuo⁴, Li-mei Hu¹, Wei-dong Ren¹
(1. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China; 2. International Medical Services, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China; 3. Zhangjiakou Municipal Health Commission, Zhangjiakou, Hebei 075000, China; 4. Department of Nuclear Medicine, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

Abstract: Objective To explore the effects of empagliflozin on renal injury in diabetic mice with blood glucose fluctuation via pyroptosis mediated by Caspase-1. **Methods** Thirty SPF male SD mice were randomly divided into control group, blood glucose fluctuation group and empagliflozin group, each group with 10 mice. After the modeling of diabetes mellitus with blood glucose fluctuation, the mice in the blood glucose fluctuation group and

收稿日期: 2021-09-24

* 基金项目: 2021 年度河北省“三三三人才工程”(No: A202103006); 张家口市科技攻关计划项目(No: 2021040D)

[通信作者] 任卫东, Tel: 15530396532。

the empagliflozin group were given 10 mg/(kg·d) of empagliflozin or the equal volume of normal saline by gavage once a day for 4 weeks. The mice in the control group were also given the equal volume of normal saline at the same time. The levels of 24-h urine protein, blood creatinine and blood urea nitrogen were measured by automatic biochemical analyzer. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of renal tissues. The level of interleukin-1 β (IL-1 β) in renal tissues was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. The protein levels of NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3), Cleaved caspase-1 and GSDMD-N in renal tissues were measured by Western blotting. **Results** Compared with the control group, increased glomerular volume, obvious thickening of glomerular basement membrane, mesangial matrix hyperplasia and vacuolation in renal tubular epithelium were observed in the blood glucose fluctuation group, while these pathological changes were ameliorated in the empagliflozin group relative to the blood glucose fluctuation group. In addition, the levels of 24-h urine protein, blood urea nitrogen, blood creatinine, IL-1 β , and the protein levels of NLRP3, Cleaved caspase-1 and GSDMD-N were higher in the blood glucose fluctuation group and empagliflozin group compared with the control group ($P < 0.05$), but they were even lower in the empagliflozin group than those in the blood glucose fluctuation group ($P < 0.05$). **Conclusions** Empagliflozin may play a protective role in renal injury in diabetic mice with blood glucose fluctuation by inhibiting the activation of Caspase-1 pathway.

Keywords: diabetes mellitus; renal injury; blood glucose fluctuation; empagliflozin; Caspase-1 pathway; pyroptosis

糖尿病是一种糖脂代谢紊乱性疾病。不按时吃药、患者心态较差、不合理饮食等都可引起糖尿病患者血糖波动。近年来越来越多研究证实,血糖波动越大的患者发生糖尿病并发症,如糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)、糖尿病视网膜病变等风险越高^[1-2]。DN是2型糖尿病主要并发症之一,是一种全身性微血管病变,能够引起渐进性肾功能损害,甚至引起严重肾衰竭,而血糖波动能够加重DN肾损伤^[3]。目前血糖波动对DN肾损伤的影响机制尚未阐明,临床也仍缺乏治疗DN的特效药。因此探究血糖波动加速肾损伤的作用机制,寻找新的治疗靶点和靶向治疗药物仍是临床研究热点。蒲阅雨等^[4]研究显示,恩格列净可能通过抑制NLRP3/Caspase-1/GSDMD细胞焦亡通路,改善糖尿病小鼠肾损伤。但目前有关恩格列净对血糖波动糖尿病小鼠肾损伤的影响报道较少,因此本研究探究恩格列净通过Caspase-1介导的焦亡通路对血糖波动糖尿病小鼠肾损伤的影响,为临床寻找有效治疗靶点和靶向治疗药物提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

30只4周龄SPF级SD雄性小鼠,体重20~30g,平均(25 \pm 5)g,购自北京北生研生物制品有限公司。实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0012,实验动物使用许可证号:SYXK(京)2021-

0262。

1.2 主要材料与仪器

链脲佐菌霉素(Streptozotocin, STZ)购自合肥博美生物科技有限责任公司,苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司,白细胞介素1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自北京伊塔生物科技有限公司,尿微量蛋白试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司,兔抗鼠NLRP3、Cleaved caspase-1、GSDMD-N、 β -actin抗体及山羊抗兔HRP二抗均购自上海经科化学科技有限公司。

ACCU-CHEK Advantage II型血糖仪购自北京中西远大科技有限公司,7150型生化自动分析仪购自日本Esco公司。

1.3 方法

1.3.1 动物模型的复制 DM模型的复制^[5]:随机选择20只小鼠禁食不禁水12h,一次性尾静脉注射STZ溶液(40 mg/kg,以pH 4.5的0.01 mol/L柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液现用现配),72h后经尾静脉检测小鼠空腹血糖,空腹血糖 \geq 16.7 mmol/L为DM模型复制成功。剩余10只小鼠作为对照组,一次性尾静脉注射等量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液。

血糖波动性DM模型的复制:小鼠DM模型复制成功后1周,于每天9:00、13:00、17:00时间点腹腔注射葡萄糖溶液(250 g/L, 0.4 mL),持续

8 周, 复制血糖波动性 DM 模型。对照组小鼠同时腹腔注射等量生理盐水。

1.3.2 实验分组 将 20 只血糖波动性 DM 模型小鼠随机分为血糖波动组、恩格列净组, 每组 10 只。恩格列净组小鼠于血糖波动性 DM 模型复制结束后予以恩格列净 10 mg/(kg·d) 灌胃, 1 次/d, 连续 4 周^[6]。对照组、血糖波动组小鼠同时灌胃等量生理盐水。

1.3.3 肾功能指标检测 于末次给药前, 收集并记录 24 h 尿量, 3 000 r/min 离心 10 min, 离心半径 8 cm, 取上清液, 用全自动生化分析仪检测 24 h 尿蛋白。末次给药结束后, 用 4% 水合氯醛麻醉小鼠并处死, 眼球取血, 3 000 r/min 离心 10 min, 离心半径 8 cm, 取上清液, 于 -80℃ 冰箱冷冻保存, 用全自动生化分析仪测量血肌酐、血尿素氮水平。

1.3.4 标本采集及 IL-1β 水平检测 取血完毕后取双肾组织^[7]。①将左肾组织分为两部分, 一部分用 4% 多聚甲醛固定, 乙醇脱水、透明、石蜡包埋过夜, 连续切片 (6 μm 厚), 脱蜡、水化, 进行 HE 染色, 以中性树胶封片, 光学显微镜下观察肾组织病理学变化; 另一部分制备组织匀浆, 3 000 r/min 离心 10 min, 离心半径 8 cm, 取上清液, 采用 ELISA 检测 IL-1β 水平, 以上操作严格按照试剂盒说明书进行。②取右肾组织, 保存于 -80℃ 冰箱用于蛋白检测。

1.3.5 Western blotting 检测肾组织中焦亡通路相关蛋白 分别取各组小鼠右肾组织制备组织匀浆, 提取总蛋白并检测浓度及纯度, 电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后分别加入一抗 NLRP3、Caspase-1、GSDMD、内参 β-actin (1:1 000), 次日加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1:5 000), 室温孵育 2 h, 显色, 显影, 定影, 根据蛋白条带灰度值计算目的蛋白相对表达量^[8]。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 进一步两两比较用 SNK-*q* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肾组织病理学变化

对照组小鼠肾组织毛细血管腔内未见扩张, 肾小管排列规则而紧密, 肾小管上皮细胞形态正常, 肾小球未见萎缩或肥大, 基底膜和肠系膜无增厚。与对照组比较, 血糖波动组小鼠肾小球体积增大, 毛细血管基底膜明显增厚, 系膜基质增生, 肾小管上皮细胞可见空泡化。与血糖波动组比较, 恩格列净组小鼠上述病理变化有所改善。见图 1。

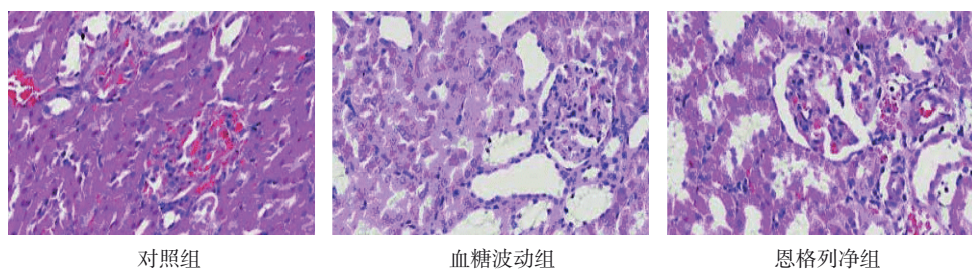


图 1 各组小鼠肾组织病理学变化 (×400)

2.2 各组小鼠肾功能指标比较

对照组、血糖波动组、恩格列净组小鼠 24 h 尿蛋白、血尿素氮、血肌酐水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。进一步两两比较结果: 与对照组比较, 血糖波动组、恩格列净组小鼠 24 h 尿蛋白、血尿素氮、血肌酐水平升高 (P < 0.05); 但恩格列净组小鼠 24 h 尿蛋白、血尿素氮、血肌酐水平低于血糖波动组 (P < 0.05)。

见表 1。

2.3 各组小鼠肾组织 IL-1β 水平比较

对照组、血糖波动组、恩格列净组小鼠肾组织 IL-1β 分别为 (15.09 ± 2.27) pg/mL、(55.83 ± 8.36) pg/mL 和 (30.93 ± 4.65) pg/mL, 经方差分析, 差异有统计学意义 (F = 665.569, P = 0.000)。进一步两两比较结果: 与对照组比较, 血糖波动组、恩格列净组小鼠肾组织 IL-1β 水平升高 (P < 0.05), 但恩格列

表1 各组小鼠肾功能指标比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	24 h尿蛋白/ (mg/d)	血尿素氮/ ($\mu\text{mol/L}$)	血肌酐/ ($\mu\text{mol/L}$)
对照组	0.26 ± 0.08	8.99 ± 1.36	40.15 ± 6.06
血糖波动组	4.98 ± 0.76 ^①	22.78 ± 3.43 ^①	83.29 ± 12.52 ^①
恩格列净组	1.39 ± 0.22 ^{①②}	12.56 ± 1.87 ^{①②}	50.38 ± 7.58 ^{①②}
F值	617.061	659.379	661.531
P值	0.000	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, P < 0.05; ②与血糖波动组比较, P < 0.05。

净组小鼠肾组织 IL-1 β 水平低于血糖波动组 (P < 0.05)。

2.4 各组小鼠肾组织 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 细胞焦亡通路蛋白相对表达量比较

对照组、血糖波动组、恩格列净组小鼠肾组织 NLRP3、Cleaved caspase-1、GSDMD-N 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。进一步两两比较结果: 与对照组相比, 血糖波动组、恩格列净组小鼠肾组织 NLRP3、Cleaved caspase-1、GSDMD-N 蛋白相对表达量升高 (P < 0.05), 但恩格列净组小鼠肾组织 NLRP3、Cleaved caspase-1、GSDMD-N 蛋白相对表达量低于血糖波动组 (P < 0.05)。见表 2 和图 2。

表2 各组小鼠 NLRP3/Caspase-1/GSDMD-N 细胞焦亡通路蛋白相对表达量比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	NLRP3 蛋白	Cleaved caspase-1 蛋白	GSDMD-N 蛋白
对照组	0.15 ± 0.03	0.56 ± 0.09	0.33 ± 0.06
血糖波动组	0.47 ± 0.08 ^①	1.33 ± 0.20 ^①	1.02 ± 0.16 ^①
恩格列净组	0.31 ± 0.05 ^{①②}	1.06 ± 0.16 ^{①②}	0.68 ± 0.11 ^{①②}
F值	365.357	582.680	500.811
P值	0.000	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, P < 0.05; ②与血糖波动组比较, P < 0.05。

3 讨论

糖尿病是一种具有高致残率、高病死率的慢性代谢紊乱性疾病, 主要危害在于并发症。DN 是糖尿病的主要并发症之一, 是长期代谢紊乱导致的全身性微血管病变, 具有较高发病率及病死率^[9]。有研究显示, 糖尿病患者由于胰岛素分泌不足或功能缺失, 易出现餐后血糖快速大幅度上升

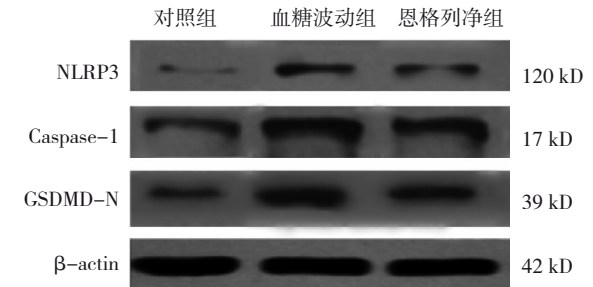


图2 各组小鼠 NLRP3/Caspase-1/GSDMD-N 细胞焦亡通路蛋白的表达

然后缓慢回落的情况, 形成波动血糖, 而血糖波动使糖尿病患者更易并发 DN, 加重肾损伤, 增加病死率^[10]。

恩格列净是新型口服降糖药, 能通过减少肾小管对葡萄糖的重吸收来增加肾脏葡萄糖的排出, 进而发挥降糖作用^[11]。张瑜等^[12]研究显示, 恩格列净对 2 型糖尿病伴慢性肾损伤患者的肾功能具有一定保护作用。何建芳等^[13]研究显示, 恩格列净对 2 型糖尿病患者的血糖及肾功能有一定改善作用。血肌酐是人体肌肉代谢产物, 其浓度变化主要由肾小球的滤过能力即肾小球滤过率来决定, 滤过能力下降, 则肌酐水平升高, 反映肾脏受损。肾功能损伤的关键因素之一是分泌大量尿蛋白, 其中 24 h 尿蛋白是检测尿蛋白的有效方式^[14-15]。本研究结果显示, 与对照组比较, 血糖波动组小鼠肾小球体积增大, 毛细血管基底膜明显增厚, 系膜基质增生, 肾小管上皮细胞可见空泡化, 经恩格列净药物干预后, 小鼠上述病理变化有所改善; 与对照组比较, 血糖波动组小鼠 24 h 尿蛋白、血尿素氮、血肌酐水平均升高, 但经恩格列净药物干预后, 小鼠 24 h 尿蛋白、血尿素氮、血肌酐水平均降低, 说明恩格列净可能对血糖波动性糖尿病小鼠肾损伤发挥保护作用。

有研究表明, 炎症反应在 DN 发生、发展中发挥重要作用。既往有研究显示, 抑制炎症因子 IL-1 β 等能改善 DN 小鼠微炎症状态, 改善肾脏病理损伤^[16]。细胞焦亡是一种致炎性细胞模式死亡, 主要依赖 Cleaved caspase-1 介导的经典信号通路活化引起的一系列反应, 最终作用于细胞, 触发细胞焦亡。NLRP3 是一种糖尿病状态下表达上调的多蛋白复合物, 其炎性小体可剪切 Cleaved caspase-1, 促使其活化, 并进一步切割 GSDMD 形成有活性的

GSDMD-N, 同时在肾小管细胞膜上聚合形成细胞膜微孔道, 导致细胞焦亡及炎症因子如 IL-1 β 等释放, 导致肾损伤^[17]。赵为陈等^[18]研究表明, 高糖可诱导 GSDMD 依赖性细胞焦亡, 促使糖尿病肾损伤发生。本研究结果显示, 与对照组相比, 血糖波动组、恩格列净组小鼠肾组织 NLRP3、Cleaved caspase-1、GSDMD-N 蛋白相对表达量升高, 但经恩格列净干预后, 小鼠肾组织 NLRP3、Cleaved caspase-1、GSDMD-N 蛋白相对表达量降低, 说明恩格列净对血糖波动性糖尿病小鼠肾损伤发挥保护作用, 可能是通过抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路活化来实现的。

综上所述, 恩格列净可能通过抑制 Caspase-1 通路活化, 对血糖波动性糖尿病小鼠肾损伤发挥保护作用。然而本研究并未能明确恩格列净对 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路的具体调控作用, 后期应进行深入阐述。

参 考 文 献 :

- [1] WHEELER D C, STEFÁNSSON B V, JONGS N, et al. Effects of dapagliflozin on major adverse kidney and cardiovascular events in patients with diabetic and non-diabetic chronic kidney disease: a prespecified analysis from the DAPA-CKD trial[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2021, 9(1): 22-31.
- [2] LI Y, PAN Y, CAO S R, et al. Podocyte EGFR inhibits autophagy through upregulation of rubicon in type 2 diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2021, 70(2): 562-576.
- [3] 王先令, 陆菊明. 血糖波动对糖尿病预后及其慢性并发症发生发展的影响[J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2005, 25(3): 169-171.
- [4] 蒲阅丽, 刘淬平, 徐勇, 等. 恩格列净通过抑制细胞焦亡改善糖尿病小鼠肾脏损伤[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2021, 37(2): 149-155.
- [5] 杨智勇, 张微, 赵晟, 等. 血糖波动对糖尿病大鼠心肌组织中转化生长因子 β_1 的影响[J]. *陕西医学杂志*, 2012, 41(4): 387-389.
- [6] 周阳. 恩格列净通过抑制内质网应激对糖尿病心肌细胞凋亡的影响[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2017.
- [7] 孙文, 冯丽园, 赵宗江, 等. 三七总皂苷干预糖尿病肾病大鼠氧化应激及足细胞凋亡机制的实验研究[J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(5): 1062-1067.
- [8] 赵为陈, 何春远, 王法财. 以 caspase-1 介导细胞焦亡筛选治疗糖尿病肾病潜在的中药及单体成分[J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40(9): 1280-1287.
- [9] PATTI G, IBBA A, MORANA G, et al. Central diabetes insipidus in children: diagnosis and management[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2020, 34(5): 101440-101446.
- [10] PONT C, ASCASO F J, GRZYBOWSKI A, et al. Corneal endothelial cell density during diabetes mellitus and ocular diabetes complications treatment[J]. *J Fr Ophthalmol*, 2020, 43(8): 794-798.
- [11] 包丽雯, 李勇. SGLT2 抑制剂恩格列净心血管保护作用及研究: EMPA-HEART CardioliNK 6 研究简评[J]. *中国糖尿病杂志*, 2019, 27(7): 557-560.
- [12] 张瑜, 廖晓阳, 郭茹, 等. 钠葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂治疗 2 型糖尿病伴慢性肾脏病患者的临床应用及挑战[J]. *中国全科医学*, 2020, 23(29): 3655-3660.
- [13] 何建芳. 津力达联合恩格列净对 2 型糖尿病患者血糖及肾功能指标血压体重指数的影响[J]. *医药论坛杂志*, 2020, 41(4): 134-136.
- [14] MORETTI D, RÉ M D, ROCCHETTI N S, et al. Value of the urea/creatinine index in isolated urine to estimate severe protein hypercatabolism in ventilated patients[J]. *Rev Bras Ter Intensiva*, 2020, 32(4): 506-513.
- [15] GENEEN L J, WEBSTER K E, REEVES T, et al. Protein-creatinine ratio and albumin-creatinine ratio for the diagnosis of significant proteinuria in pregnant women with hypertension: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy[J]. *Pregnancy Hypertens*, 2021, 25(123): 196-203.
- [16] 赵雪杉, 安至超, 柳红芳, 等. 芪地糖肾颗粒对糖尿病肾病大鼠模型炎症因子 IL-6, IL-18, TNF α , CRP 的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2020, 21(1): 8-11.
- [17] LI N, ZHAO T, CAO Y, et al. Tangshen formula attenuates diabetic kidney injury by imparting anti-pyroptotic effects via the TXNIP-NLRP3-GSDMD Axis[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 29(11): 623489-623495.
- [18] 赵为陈, 沈炳香, 何春远, 等. GSDMD 依赖性细胞焦亡在糖尿病肾病肾脏损伤中的作用机制[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(7): 964-970.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 史丽, 胡婷婷, 李红, 等. 恩格列净对血糖波动糖尿病小鼠肾损伤的影响及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(4): 40-44.

Cite this article as: SHI L, HU T T, LI H, et al. Effects of empagliflozin on renal injury in diabetic mice with blood glucose fluctuation[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(04): 40-44.