

文章编号 1006-8147(2015)03-0229-04

论著

吡格列酮对肥胖小鼠肾脏中 TNF- α 表达的影响

王安凤¹, 夏天¹, 张秋平¹, 王永明²

(1.天津医科大学第二医院肾内科, 天津 300211; 2.天津动物实验中心, 天津 300192)

摘要 目的:研究吡格列酮对肥胖小鼠肾脏中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达的影响,探讨肥胖相关性肾病的防治意义。方法:选用 OB 小鼠和 C57 小鼠(作为对照组)进行对比观察,并将 OB 小鼠分为模型组和治疗组,治疗组给予吡格列酮灌胃,连续 10 周,实验前后测定小鼠血糖,尿微量白蛋白(mALB)。10 周末处死小鼠,摘取双侧肾脏,免疫组化方法测定 TNF- α 表达水平,比较 3 组小鼠之间测定指标的差异并进行相关性分析。结果:OB 小鼠的 mALB、TNF- α 阳性百分比均明显高于 C57 小鼠,差异有统计学意义($P<0.01$);给予吡格列酮干预后,治疗组尿 mALB、TNF- α 阳性百分比均低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:TNF- α 在肥胖小鼠肾小管上皮细胞、肾小球系膜细胞的表达水平较普通小鼠明显升高,吡格列酮可以下调 TNF- α 在肥胖小鼠肾脏中的表达水平,从而减少尿 mALB 排泄。

关键词 肥胖相关性肾病;肿瘤坏死因子- α ;吡格列酮;尿微量白蛋白;小鼠

中图分类号 R692.9

文献标志码 A

Effects of pioglitazone on the expression of TNF- α in kidney of obese mice

WANG An-feng¹, XIA Tian¹, ZHANG Qiu-ping¹, WANG Yong-ming²

(1.Department of Nephrology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China; 2. Animal Experiment Center of Tianjin, Tianjin 300192, China)

Abstract Objective: To study the effects of pioglitazone on the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the kidney of obese mice and to explore the prevention of obesity related glomerulopathy. **Methods:** The OB mice and C57 mice (as control group) were observed, and OB mice were divided into model group and treatment group, and the latter was given pioglitazone orally for 10 weeks. Before and after the experiment, blood glucose and urinary microalbumin (mALB) in mice were measured. Mice were sacrificed at week 10, both kidneys were removed, and TNF- α expression level was determined by immunohistochemical method. The indicators were compared among 3 groups of mice, and the correlations were calculated. **Results:** OB mice urinary mALB and TNF- α positive percentage were significantly higher than those of C57 mice ($P<0.01$); pioglitazone intervention treatment group, urinary mALB and TNF- α positive percentages were lower than those in the model group, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion:** The expression level of TNF- α in obese mice renal tubular epithelial cells, mesangial cells significantly are increased than normal mice and pioglitazone can lower the expression level of TNF- α in kidney of obese mice, thus reducing urinary albumin excretion.

Key words obesity related glomerulopathy; tumor necrosis factor- α ; pioglitazone; urinary microalbumin; mice

早在 1974 年 Weisinger 等^[1]首次报道严重肥胖患者出现大量蛋白尿并命名为肥胖相关性肾病(obesity related glomerulopathy, ORG)。ORG 以男性多见^[2],动物实验也提示雄性肥胖大鼠肾脏改变更明显^[3]。近年来肥胖导致肾脏损害越来越受到重视。肥胖导致肾损害的机制中,胰岛素抵抗可引起促炎因子的增加和抗炎因子的减少,其中 TNF- α 作为促炎因子成为近年研究的热点。吡格列酮为过氧化物酶体增殖物活化受体 γ (PPAR γ)激动剂,有研究显示吡格列酮可以升高血清脂联素的水平,从而减少尿白蛋白的排泄,抑制 ORG 的进展,而是否可以通过影响 TNF- α 在肾脏上的表达而抑制 ORG 进展方面的报道较少。本文将探讨吡格列酮对肥胖小鼠肾

脏中 TNF- α 表达的影响进而为 ORG 的治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物的选择 于北京华阜康生物科技股份有限公司购入 6 周龄健康雄性 OB 小鼠 24 只和同系 C57 小鼠 8 只。OB 小鼠即 OB 瘦素自发突变小鼠,品系名称为 B6、V-Lepob/j,品系类型属于自发突变,背景品系 C57BL/6J。

1.2 主要试剂及仪器设备 微量血糖试纸(美国强生公司);小鼠尿微量白蛋白(mALB)酶联免疫分析试剂盒(武汉华美);免疫组化试剂(北京中杉金桥生物技术有限公司);显微镜(日本奥林巴斯 BX51T-PHD-J11);CMOS(日本奥林巴斯);多功能真彩色细胞图像分析管理系统(美国 Media Cybernetics 公司 Image-Pro Plus);血糖仪(美国强生公司)

作者简介 王安凤(1989-),女,硕士在读,研究方向:内科学肾病;
通信作者:夏天, E-mail:xiatian01@medmail.com.cn。

one Touch II 型)等。

1.3 动物饲养及模型建立 动物于中国医学科学院生物医学工程研究所动物实验室屏障系统单笼饲养,动物自由进食,饮水。适应性饲养 2 周,然后将 OB 小鼠按体质量分层随机分为 2 组:模型组(M 组):OB 小鼠 8 只,高脂饲料喂养;给药组(T 组):OB 小鼠 8 只,高脂饲料喂养,吡格列酮治疗。以 C57 小鼠作为对照组(C 组):C57 小鼠 8 只,普通饲料喂养。

各组小鼠 1 次/d 灌胃,灌胃时间为每天上午 8:30,T 组小鼠以吡格列酮 12.5 mg/(kg·d) 灌胃,蒸馏水稀释,用前搅拌至完全溶解。C 组和 M 组以等量蒸馏水灌胃。每周测体质量 1 次,并根据体质量调整给药剂量,连续 10 周。

1.4 观察指标测定 实验前后分别使用小鼠代谢笼留取 24 h 尿液,记尿量,离心取上清液于-20℃冻存,成批测定小鼠尿 mALB,每只小鼠重复 3 次,取平均值,并用酶联免疫分析试剂盒测定小鼠尿 mALB;用电子记重器称量小鼠体质量;实验前后分别禁食隔夜,剪尾取血,用血糖仪测定小鼠血糖。

1.5 免疫组化染色 各组小鼠喂养至 12 周末,禁食 12 h,称重后断头处死小鼠,迅速从摘取的肾脏组织中取小于 0.5 cm×0.5 cm×0.1 cm 组织块,固定、包埋、切片后清洗再进行 DNA 显色,苏木素复染细胞核等,最后显微镜下观察 TNF-α 在肾组织免疫组化染色的表达部位,棕褐色为染色阳性。选择实验组和对照组的阳性和阴性组织相,进行 100×和 400×的显微照相,选择有意义的组织相,经登录、编号、采集、分析、读取数据,最后存盘。TNF-α 表达水平采用阳性染色面积(a)评分与阳性染色强度(b)评分的积分表示。a 为阳性细胞数分级:0~1%=0、1%~10%=1、10%~50%=2、50%~80%=3、80%~100%=4; b 为阳性细胞显色强度分级:0(阴性)、1(弱阳性)、2(阳性)、3(强阳性),取 10 个肾小球的 a、b 均值作为每张切片的 a、b 值,将每张切片的 a、b 两项相乘作为最后积分。

1.6 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析(one way ANOVA),组间多重比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠体质量及血糖的比较 实验前 M 组和 T 组小鼠体质量均超过 C 组小鼠,差异有统计学意义($P < 0.01$),入组后 M 组和 T 组小鼠较 C 组小鼠体质量增加迅速,实验结束时其体质量超过 C 组小鼠更为明显($P < 0.01$),实验前后 M 组与 T 组小鼠体质量

比较没有显著性差异($P > 0.05$)。3 组小鼠实验后体质量均高于实验前,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。实验前 3 组小鼠血糖无显著差异($P > 0.05$)。实验后 M 组和 T 组小鼠血糖明显高于 C 组小鼠 ($P < 0.01$),而 T 组小鼠血糖明显低于 M 组小鼠($P < 0.01$)。M 组和 T 组小鼠实验后血糖均显著高于实验前($P < 0.01$),C 组小鼠实验前后血糖无显著差异($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠体质量、血糖值($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Body weight, blood glucose in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量/g		血糖/(mmol/L)	
		实验前	实验后	实验前	实验后
C 组	8	24.75±0.57	37.70±2.38 ^{###}	3.99±0.40	4.32±0.59
M 组	8	37.63±1.64 ^a	65.40±3.30 ^{###}	4.64±0.60	8.78±0.97 ^{###}
T 组	8	36.83±2.32 ^a	61.95±4.09 ^{###}	4.68±0.67	6.84±0.31 ^{###}
F		148.344**	164.404**	2.999	72.768**

** $P < 0.01$; a 与 C 组比较, b 与 M 组比较, $P < 0.05$; 与实验前比较, ^{###} $P < 0.01$

2.2 各组小鼠尿 mALB 的比较 实验前 M 组和 T 组小鼠尿 mALB 均高于 C 组小鼠($P < 0.01$),M 组和 T 组小鼠尿 mALB 无显著差异($P > 0.05$)。实验后 M 组和 T 组小鼠尿 mALB 显著高于 C 组小鼠($P < 0.01$),M 组和 T 组小鼠尿 mALB 明显高于实验前 ($P < 0.01$),T 组小鼠尿 mALB 明显低于 M 组($P < 0.01$),C 组实验前后尿 mALB 无明显差异($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组小鼠尿 mALB 水平($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Urinary mALB levels in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	mALB/(μg/L)	
		实验前	实验后
C 组	8	53.25±8.97	54.75±9.95
M 组	8	70.00±6.70 ^a	151.13±23.71 ^{###}
T 组	8	73.88±7.94 ^a	111.18±5.49 ^{###}
F		15.312**	81.401**

** $P < 0.01$; a 与 C 组比较, b 与 M 组比较, $P < 0.05$; 与实验前比较, ^{###} $P < 0.01$

2.3 免疫组化染色 TNF-α 主要在肾小管上皮细胞胞浆表达,在肾小球系膜细胞胞浆也有少量表达。M 组和 T 组小鼠 TNF-α 表达水平均高于 C 组小鼠,差异有统计学意义($P < 0.05$),T 组小鼠 TNF-α 表达水平低于 M 组小鼠,差异有统计学意义($P < 0.05$)。3 组小鼠免疫组化结果见图 1,表 3。

表 3 各组小鼠 TNF-α 阳性百分比($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The positive percentage of TNF-α in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF-α 阳性百分比/%
C 组	8	23.88±5.84
M 组	8	42.63±5.24 ^a
T 组	8	31.63±4.90 ^{ab}
F		25.953**

** $P < 0.01$; a 与 C 组比较, b 与 M 组比较, $P < 0.05$

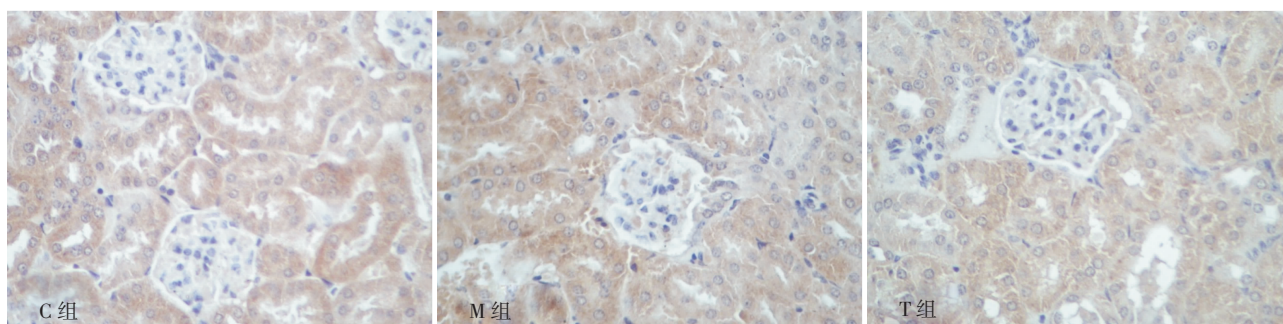


图1 各组免疫组化图(免疫组化染色 $\times 400$)

Fig 1 Immunohistochemical figure in each group(Immunohistochemical staining $\times 400$)

2.4 各项指标的相关性 将实验结束时小鼠尿mALB、体质量、TNF- α 阳性百分比进行相关性分析。发现小鼠尿mALB与体质量呈正相关($r=0.903$, $P<0.001$);尿mALB与TNF- α 阳性百分比呈正相关($r=0.847$, $P<0.001$);TNF- α 阳性百分比与体质量呈正相关($r=0.731$, $P<0.001$)。

3 讨论

本研究选用OB小鼠作为模型组(M组)及治疗组(T组),其体质量在实验前超过其同系C57小鼠平均体质量的20%,即达到小鼠肥胖诊断标准^[4],实验过程中体质量增加迅速。实验前后OB小鼠血糖虽然较其同系C57小鼠血糖高,但仍小于16.7 mmol/L,即未达小鼠糖尿病判定标准^[5],较好地模拟了人类非糖尿病肥胖的发病机制和临床特点,是理想的研究人类肥胖的动物模型。实验前后肥胖模型小鼠尿mALB均显著高于对照组($P<0.01$),且肥胖与尿mALB呈正相关($r=0.903$, $P<0.001$),结果显示肥胖与慢性肾损害的发生有相关性,肥胖的严重程度与肾脏损害程度明显相关。

肥胖时脂肪组织过度分泌瘦素、TNF- α 等多种细胞因子,肾脏不仅是这些生物活性物质的清除场所,还是重要靶器官,这些细胞因子的单独或共同作用导致ORG的发生、发展。TNF- α 作为一种特殊的细胞因子,同时也是一种重要的炎症介质,其来源广泛,有研究表明生理条件下,肾脏组织有少量TNF- α mRNA的表达^[6],而肥胖、感染、缺氧等可刺激其在肾小管上皮细胞、肾小球系膜细胞、肾间质浸润的巨噬细胞表达。本研究中TNF- α 在肥胖模型小鼠的肾小管上皮细胞、肾小球系膜细胞的阳性百分比均显著高于对照组($P<0.01$),且TNF- α 阳性百分比与体质量呈正相关($r=0.731$, $P<0.001$),TNF- α 阳性百分比与尿mALB排泄成正相关($r=0.847$, $P<0.001$),证实肥胖时脂肪组织分泌的TNF- α 与肾小管上皮细胞、肾小球系膜细胞表达的TNF- α 共同引起肾脏损害,且与肥胖相关。TNF- α 导致肾脏损害

的机制如下:(1)TNF- α 可抑制肾小球上皮细胞合成硫酸类肝素蛋白多糖,导致肾脏滤过屏障受损;(2)促进巨噬细胞在有干扰素的情况下分化为细胞毒性细胞或者炎症细胞,导致肾小球结构和功能的严重破坏;(3)TNF- α 可刺激血管内皮因子释放,使肾小球系膜细胞增生、肾小球内皮细胞通透性增加;(4)TNF- α 可促进系膜细胞释放活性氧,改变肾小球电荷屏障,破坏肾小球滤过屏障产生或加重蛋白尿^[7];(5)促进系膜细胞合成前列腺素活性物质,改变肾脏血流动力学,作用于肾小球上皮细胞,促进凝集素的增生、聚集以及酪氨酸磷酸化,使细胞骨架蛋白重组,改变上皮细胞足突的孔径,加重尿蛋白的产生^[8]。

吡格列酮即噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂,可增强胰岛素敏感性,改善肝脏和脂肪组织对葡萄糖的利用,有效降低血浆胰岛素和葡萄糖水平,最早应用于2型糖尿病的临床治疗,此外对炎症状态亦有所改善^[9]。已有文献证实吡格列酮对肾脏有明显的保护作用^[10-11]。PPAR γ 是脂肪分化的重要转录调节因子,参与调节脂肪细胞数量的增多及体积的增大^[12],前人研究证实吡格列酮激活PPAR γ 后会间接增加TNF- α 等细胞因子的分泌,而本研究中给予吡格列酮干预治疗后,治疗组肾小管上皮细胞、肾小球系膜细胞的TNF- α 阳性百分比模型组有明显地降低($P<0.01$),治疗组较模型组尿mALB排泄有明显降低($P<0.01$),TNF- α 阳性百分比与尿mALB排泄明显相关,证实吡格列酮可以下调TNF- α 在肾小管上皮细胞、肾小球系膜细胞的表达,抑制炎症反应,减轻对肾小球、肾小管的损伤而改善肾脏病理,降低蛋白尿。有研究显示:PPAR γ 蛋白在肾小球系膜细胞及内皮细胞、近端及远端小管、髓襻、髓质集合管和肾脏血管均明显表达^[13],所以肾脏是PPAR γ 激动剂的直接靶器官。PPAR γ 通过与靶基因上的PPRE序列结合(依赖模式)和非依赖模式调节靶基因的转录,目前尚未发现TNF- α 有PPRE序列,而

TNF- α 的启动子中含有核转录因子 NF- κ B 的结合序列,之前已有研究证实 TNF- α 的表达在基因水平上受到 NF- κ B 的调控,且 PPAR γ 对 NF- κ B 有明显的抑制作用^[14],所以 PPAR γ 主要是通过抑制 NF- κ B 的过度激活即非依赖模式调控 TNF- α 的表达。

综上所述,吡格列酮作为 PPAR γ 强力激动剂,与肾小管上皮细胞、肾小球系膜细胞上的 PPAR γ 蛋白结合后,抑制 NF- κ B 的激活,下调 TNF- α 在肾小管上皮细胞、肾小球系膜细胞的表达,在一定程度上阻止或者延缓 ORG 的进展,从而为临床 ORG 的治疗提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Weisinger J R, Kempson R L, Eldr I F, et al. The nephrotic syndrome: A complication of massive obesity[J]. Ann Intern Med, 1974, 81(4): 440
- [2] Babayev R, Whaley-Connell A, Kshirsagar A, et al. Association of race and body mass index with ESRD and mortality in CKD stages 3-4: results from the Kidney Early Evaluation Program (KEEP) [J]. Am J Kidney Dis, 2013, 61(3): 404
- [3] Harishankar N, Kumar P U, Sesikaran B, et al. Obesity associated pathophysiological & histological changes in Wistar-Kyoto obese mutant rats[J]. Indian J Med Res, 2011, 134(3): 330
- [4] 张莉莉. 辣椒素及其受体 TRPV1 预防肥胖的机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2006
- [5] Kawano K, Hirashima T, Mori S, et al. Spontaneous long-term hy-

- perglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain[J]. Diabetes, 1992, 41(11): 1422
- [6] 李卫, 刘佳, 白家媛, 等. α 肿瘤坏死因子的研究进展[J]. 动物医学进展, 2010(12): 108
- [7] McCarthy E T, Sharma R, Sharma M, et al. TNF- α increases albumin permeability of isolated rat glomeruli through the generation of superoxide[J]. J Am Soc Nephrol, 1998, 9(3): 433
- [8] Koukouritaki S B, Vardaki E A, Papakonstanti E A, et al. TNF- α induces actin cytoskeleton reorganization in glomerular epithelial cells involving tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase[J]. Mol Med, 1999, 5(6): 382
- [9] Palee S, Chattipakorn S, Phrommintikul A, et al. PPAR γ activator, rosiglitazone: Is it beneficial or harmful to the cardiovascular system [J]. World J Cardiol, 2011, 3(5): 144
- [10] Sarafidis P A, Stafylas P C, Georgianos P I, et al. Effect of thiazolidinediones on albuminuria and proteinuria in diabetes: a meta-analysis[J]. Am J Kidney Dis, 2010, 55(5): 835
- [11] 邢燕, 叶山东, 胡闻, 等. 吡格列酮对糖尿病大鼠肾组织 podoclyxin 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(7): 992
- [12] 蒋金航, 马云, 王新庄. PPAR γ 基因调控脂肪细胞分化的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2014, 50(9): 91
- [13] Sato K, Sugawara A, Kudo M, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor isoform proteins in the rat kidney[J]. Hypertens Res, 2004, 27(6): 417
- [14] 尹雪瑶, 郑芬萍, 吴芳, 等. LXRs 激动对 PPAR γ 转录抑制脂肪炎症因子表达的作用及机制研究[C]. 中华医学会第十次全国内分泌学学术会议论文汇编, 2011

(2014-10-17 收稿)

(上接第 228 页)

本组病例中 1 例肾嗜酸性细胞瘤造影表现为‘快进快退’,达峰时瘤体呈不均匀的低增强,超声造影诊断错误,分析其原因,可能与瘤体内部含纤维瘢痕及病理成分有关。2 例肾血管平滑肌脂肪瘤均表现为造影后瘤体内造影剂退出时间早于自身肾皮质,这考虑与瘤体内脂肪组织含量少,而血管较丰富、迂曲、排列紊乱有关。在临床诊断中应格外注意,诊断时应结合常规超声和超声造影,必要时与增强 CT 联合诊断。

综上所述,超声造影技术克服了传统二维超声及彩色多普勒超声的局限性,能更好地显示肾小病灶细小低速血流的灌注情况,为观察肾脏恶性肿瘤的血管生成特点提供了新的手段。针对最大直径小于 3 cm 的肾肿瘤,超声造影提供了大量关于病灶本身的表象特征信息,有助于诊断其良恶性,鉴别其病理类型,因此具有较高的临床价值,值得在实践操作中推广和普及。本次研究的不足之处在于取样病例较少,结论有待进一步的研究和证实。

参考文献:

- [1] 戴晴,姜玉新. 超声造影的临床应用[J]. 中国医学科学院学报,

- 2008, 30(1): 1
- [2] 刘军,付庆国,邓尚廉,等. 小肾癌的超声表现及其临床诊断价值[J]. 中国超声诊断杂志, 2004, 5(3): 184
- [3] Forman H P, Middleton W D, Melson G L, et al. Hyperechoic renal cell carcinomas: increase in detection at US[J]. Radiology, 1993, 188(2): 431
- [4] 张华,赵玉珍. 肾细胞癌血管生成的临床进展研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2003, 12(3): 172
- [5] 何云,石尖兵,王曦曦,等. 肾脏占位性病变 SonoVue 实时超声造影的探讨[J]. 中国超声医学杂志, 2007, 23(10): 780
- [6] Wolters K, Herget-Rosenthal S, Langenbeck M. Renal sonography [J]. Internist (Berl), 2012, 53(3): 282
- [7] 孙迪,申锴,魏聪,等. 超声造影诊断肾肿瘤的临床研究[J]. 中华临床医师杂志, 2013, 7(17): 27
- [8] 蒋瑁,陈亚青,朱云开,等. 超声造影鉴别诊断肾透明细胞癌和血管平滑肌脂肪瘤[J]. 中国医学影像技术, 2010, 26(1): 134
- [9] 郭君,王敏娜,梁媛,等. 实时超声造影在肾脏占位性病变诊断中的应用价值[J]. 中华医学超声杂志, 2010, 7(9): 1508
- [10] 纪晓惠,乔治斌,韩若凌,等. SonoVue 实时超声造影在肾脏占位性病变中的应用[J]. 中国医疗设备, 2008, 23(9): 152
- [11] 杨斌,傅宁华,沈德娟,等. 肾肿瘤的超声造影研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2007, 16(7): 599
- [12] Ascenti G, Zimbaro G, Mazziotti S, et al. Usefulness of power Doppler and contrast-enhanced sonography in the differentiation of hyperechoic renal masses[J]. Abdom Imaging, 2002, 26(6): 654

(2014-09-18 收稿)