

甜菜碱对 db/db 小鼠糖尿病肾病损伤的作用

张猛猛¹, 黄敏^{1,2}, 吴晓英¹, 刘光泽³, 张晓元^{1,4}

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006) (2. 广州军区机关门诊部, 广东广州 510080)
(3. 解放军第四五八医院全军肝病中心, 广东广州 510602) (4. 华南理工大学工业技术研究所, 广东广州 510640)

摘要: 为探究甜菜碱对db/db小鼠糖尿病肾病损伤的保护作用, 将7月龄db/db小鼠随机分为模型组(生理盐水), 阳性对照组(脂必妥), 甜菜碱低剂量组(200 mg/kg)、中剂量组(400 mg/kg)、高剂量组(800 mg/kg)。所有小鼠均饲以高脂饲料, 以诱发糖尿病肾病(DN)模型。以甜菜碱连续灌胃6周后, 进行肾脏组织病理学观察, 并检测小鼠体重, 血清中尿素氮(BUN)、血糖(GLU), 总胆固醇(TC), 甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、转化生长因子-β1(TGF-β1)与肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的水平。结果显示, 甜菜碱处理组与模型组相比, 肾小球基底膜无明显增厚, 细胞外基质、糖原物质沉积及纤维含量减少, 蛋白管型和炎性细胞浸润基本消失, 肾小管结构逐渐恢复正常, 体重和BUN、GLU、TC、TG、LDL、TNF-α、TGF-β1水平均显著降低(P<0.05), 最高分别降低11.5 g、3.0 mM、5.3 mM、3.1 mM、0.42 mM、0.64 mM、21 ng/L、30 ng/L。表明甜菜碱对db/db小鼠具有降糖、降脂、改善肾功能的生理作用, 能延缓或抑制糖尿病肾病微血管炎症过程。

关键词: 甜菜碱; db/db小鼠; 糖尿病; 肾病; 微血管

文章编号: 1673-9078(2014)5-23-27

Effects of Betaine on Diabetic Nephropathy in db/db Mice

ZHANG Meng-meng¹, HUANG Min^{1,2}, WU Xiao-ying¹, LIU Guang-ze³, ZHANG Xiao-yuan^{1,4}

(1. School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 51006, China)

(2. Official Outpatient Clinic of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510080, China)

(3. Center of Hepatopathy, 458th Hospital of PLA, Guangzhou 510620, China)

(4. Industrial Technology Research Institute, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: To evaluate the protective effects of betaine on diabetic nephropathy (DN) in db/db mice, 7 months old db/db mice were randomly divided into negative control group (physiological saline), positive control group (Zhibituo), low (200 mg/kg), middle (400 mg/kg) and high dose (800 mg/kg) betaine group. The mice were fed by high-fat diet to induce DN. After being intragastric administrated by betaines for 6 weeks, the kidney paraffin sections were prepared and the pathological changes were analyzed based on staining, the body weight and BUN, GLU, TC, TG, LDL, TNF-α, TGF-β1 level were also investigated. The results showed that the glomerular basement membrane in the betaine and Zhibituo treatment group did not thicken; extracellular matrix, the glycogen material deposition and fiber content reduced; protein casts and inflammatory cell infiltration disappeared. Furthermore, the structure of renal tubule gradually returned to normal; the body weight and BUN, GLU, TG, TC, LDL, TNF-α, TGF-β1 level were significantly decreased (P < 0.05) by 11.5 g, 3.0 mM, 5.3 mM, 3.1 mM, 0.42 mM, 0.64 mM, 21 ng/L and 30 ng/L, respectively. It can be speculated that betaine has a hypoglycemic activity, lipid-lowering effect, and protective effect on the kidney injury of db/db mice. It may delay or inhibit the inflammatory process of the capillary vessel in diabetic nephropathy.

Key words: betaines; db/db mice; diabetes; nephropathy; capillary

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)是糖尿病常见的具有很大危害性的肾小球硬化症, 是糖尿病全身性微血管合并症之一, 在糖尿病人群中的发生率

收稿日期: 2013-12-30

基金项目: 广州市开发区科技项目(2008Q-P059)

作者简介: 张猛猛, (1989-), 男, 硕士生, 研究方向为生物制药与生物资源综合利用; 黄敏, 并列第一作者

通讯作者: 张晓元

较高, 是导致糖尿病人死亡的主要原因之一。近年随着糖尿病患者的增多, DN的发病率逐年上升, 已成为终末期肾病的主要原因。目前, DN的临床处理主要是通过控制血糖、血脂和抗高血压来减轻肾脏损伤^[1], 但疗效有限, 只能减慢向肾功能衰竭的进程, 无法逆转或阻止病情发展。甜菜碱是枸杞、大米、小麦、黄芪和甜菜等的活性成分, 具有多种生理及药理功能: 作为一种重要的甲基供体参与体内蛋氨酸循环途径,

甲基供体如果不足,会导致生长紊乱和一些病理学症状以及蛋白质代谢的紊乱,还会导致遗传物质的不稳定性;甜菜碱是渗透压激变的缓冲物质,能保护细胞、蛋白质和酶不受环境应激的影响;还能促进脂肪代谢,对脂肪肝和动脉粥样硬化都有一定的药理作用^[2-3];甜菜碱可以抑制血管内皮细胞凋亡,并促进受损血管内皮细胞增殖扩张血管,从而起到保护血管的作用,此外,甜菜碱还有抗癌、降压、减轻射线对人的伤害等功能^[2]。但目前关于甜菜碱对糖尿病肾病损伤的保护作用及其机理的研究尚无报道。db/db小鼠是由C57BL/KsJ近亲交配株常染色体隐性遗传衍化而来的先天肥胖2型糖尿病模型,多见微血管并发症,是研究DN的理想模型^[4]。本研究以db/db小鼠为模型,观察甜菜碱对小鼠模型肾病损伤的保护作用,并对其作用机制进行初步探讨,旨在探索甜菜碱作为药物处理糖尿病肾病的可能性,为充分利用甜菜碱资源开辟新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物

SPF级10周龄db/db小鼠55只,雌雄各半,体重在50~60g,由广州458医院动物实验室提供。饲养环境条件:室温控制在18~29℃、相对湿度65~70%、饮用水为专用消毒水,正常昼夜交替,适应性喂养1周后进入实验。饲料由广州医学院动物实验中心提供。

1.1.2 试剂

血清总胆固醇(Total cholesterol, TC)、甘油三酯(Triglyceride, TG)和血尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN)的测定试剂盒,购于四川省迈克科技有限责任公司;低密度脂蛋白(Low density lipoprotein, LDL)测定试剂盒,购于日本积水科技有限公司;血糖仪及配套试纸,购于美国One Touch Ultra公司;小鼠转化生长因子 β 1(Transforming growth factor, TGF- β 1)和小鼠肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor alpha, TNF- α)的酶联免疫分析(ELISA)试剂盒,购于北京索宝生物科技有限公司;HE染色和PAS染色的试剂盒,购于福州迈新生物科技有限公司;甜菜碱,购自美国Sigma公司;脂必妥,为北京拜耳医药保健有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理

将小鼠按性别和体重随机均分为5组,即脂必妥

阳性对照组[400 mg/(kg·day)],模型组(等体积生理盐水),甜菜碱低[100 mg/(kg·day)]、中[200 mg/(kg·day)]、高剂量[400 mg/(kg·day)]处理组。各组按性别分笼饲养,自由饮水进食,适应性喂养7d。灌胃给药,持续饲养六周。

1.2.2 样品采集与处理

给药前后,称取小鼠体重,眼眶静脉取血,3000 r/min离心5 min后取上清,用于BUN、GLU、TC、TG、LDL、TNF- α 、TGF- β 1等相关生理指标的检测;小鼠断颈处死后,立即剖开腹腔,取一侧肾脏置于4%多聚甲醛中固定,酒精梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制片,进行HE、PAS染色,光镜观察。

1.2.3 统计学处理

利用SPSS13.0统计软件进行统计学分析,计量资料结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 甜菜碱对db/db小鼠肾组织形态学的影响

DN早期主要病理特征是肾小球和肾小管肥大、肾小球和肾小管基底膜增厚以及以肾小球系膜区为主的细胞外基质进行性积聚^[5-6]。经HE染色观察,模型组:肾小球毛细血管基底膜弥漫性较厚,系膜区增宽,肾小球毛细血管淤血,管腔狭窄,以及炎性细胞大量浸润;肾小球基底膜增厚明显,肾小球周围纤维化,部分肾小球发生硬化。血管壁呈玻璃样变,且其周围脂肪组织发生空泡变性;肾小管上皮细胞脱落、变性和坏死,在管腔内形成蛋白管型(图1, a、b)。甜菜碱处理组与模型组比较,肾小球基底膜变薄,系膜区无明显增宽,肾小球毛细血管轻微淤血,间质有少许的炎性细胞浸润。肾小球基底膜和肾小管结构基本恢复正常,新月体现象和炎性细胞浸润得到缓解(图1, c、d、e)。脂必妥处理组:部分肾小管上皮细胞脱落,肾小管之间成纤维细胞轻度增生;肾小管上皮细胞病变明显改善,蛋白管型基本消失,仅见少量的炎性细胞浸润(图1, f)。

经PAS染色观察,模型组:肾小球毛细血管基底膜增厚,系膜区内红色的糖原物质沉积,系膜基质增加,系膜区明显增宽;部分肾小管上皮细胞肿胀、脱落,其管腔内有红色的糖原物质沉积;系膜基质增生呈弥漫或结节状糖原沉积(深红色),肾小球囊内充满均质红染的糖原物质,间质有大量的红色细线状物质(图2, a、b)。甜菜碱处理组:肾小球和肾小管病变有不同程度的改善,表现为肾小球系膜区糖原物质

沉积较少, 色淡; 肾小球囊内红染的糖原沉积消失, 肾小管管腔内糖原物质沉积减少 (图 2, c、d、e)。脂必妥处理组: 肾小球毛细血管基底膜轻度增厚, 系膜细胞减少, 肾小管管腔内少量的糖原物质沉积, 肾小管结构恢复正常, 管腔内无红色糖原物质沉积 (图 2, f)。

由此表明, 甜菜碱能使小鼠肾脏的病理变化显著地减轻, 对肾脏损伤有较好的修复作用。

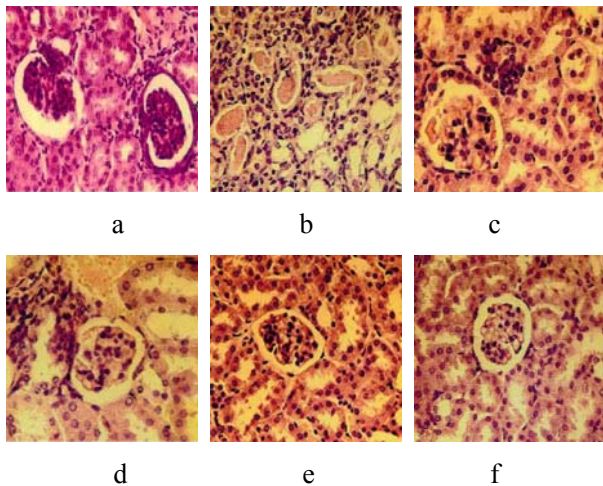


图 1 甜菜碱对 db/db 小鼠肾组织形态的作用 (HE 染色), ×400
Fig.1 Effect of Betaine on the liver tissues of db/db mice (HE staining)

注: a、b: 模型组; c: 低剂量组; d: 中剂量组; e: 高剂量组; f: 脂必妥组。

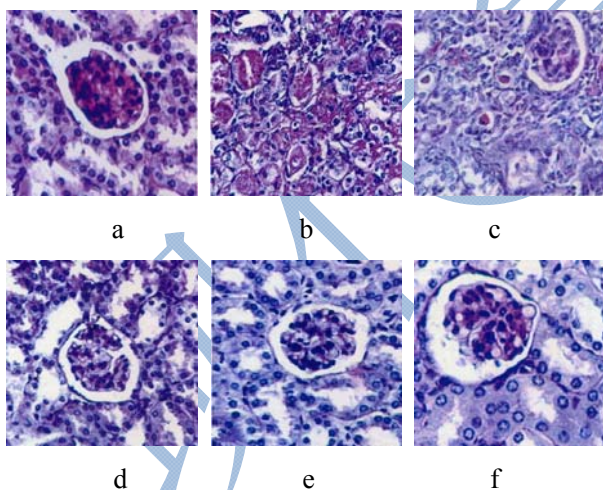


图 2 甜菜碱对 db/db 小鼠肾组织形态的作用 (PAS 染色结果), ×400
Fig.2 Effect of Betaine on the liver tissues of db/db mice (PAS staining)

注: a、b: 模型组; c: 低剂量组; d: 中剂量组; e: 高剂量组; f: 脂必妥组。

2.2 甜菜碱对 db/db 小鼠血液生理生化指标的

作用

2.2.1 甜菜碱对血清 BUN 水平的影响

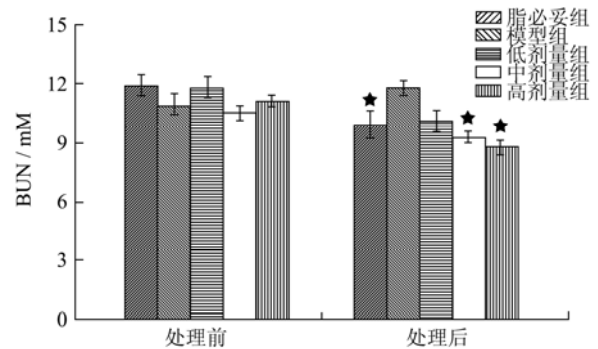


图 3 甜菜碱对 db/db 小鼠 BUN 水平的影响

Fig.3 Effect of Betaine on BUN level of db/db mice

注: ★表示与模型组相比, 具有显著差异性 (P<0.05); ★★表示与模型组相比, 具有极显著差异性 (P<0.01), 下同。

当肾脏受到损伤时, 肾功能排泄机能减低, 血液中尿素氮含量升高。BUN 是肾功能主要指标之一。处理前各组 BUN 水平无统计学差异, 处理六周后, 甜菜碱中剂量、高剂量组处理组和脂必妥处理组与模型组相比, BUN 明显降低 (P<0.05), 脂必妥组降低 1.91 mM, 甜菜碱高剂量组降低甜菜碱 3.01 mM。低剂量组与模型组相比, 无显著性差异; 中、高剂量组与脂必妥组差异不显著 (图 3)。说明甜菜碱能显著降低因糖尿病肾脏损伤导致的高 BUN 水平, 并与脂必妥效果接近。

2.2.2 甜菜碱对小鼠体重的影响

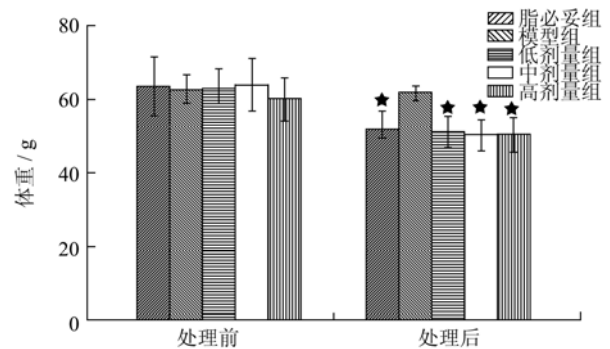


图 4 甜菜碱对 db/db 小鼠体重的影响

Fig.4 Effect of Betaine on weight of db/db mice

糖尿病小鼠因为体内代谢紊乱导致过度肥胖。处理前各组之间小鼠体重无显著差异。处理六周后, 甜菜碱各组和脂必妥组与模型组相比, 体重下降 10 g 左右 (P<0.05), 但甜菜碱各组间体重变化无统计学差异, 并与脂必妥组无明显差异 (图 4)。说明甜菜碱对因糖尿病引起的过度肥胖有较好的治疗作用, 并与脂必妥效果接近。

2.2.3 甜菜碱对小鼠血糖水平的影响

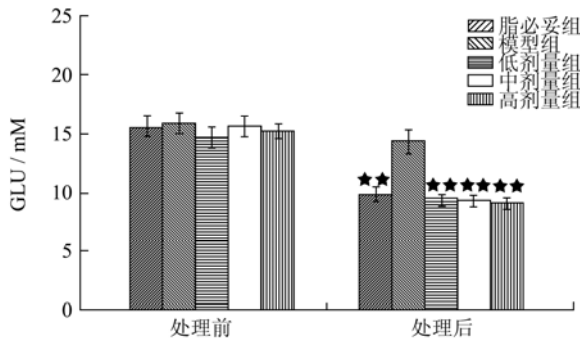


图5 甜菜碱对 db/db 小鼠 GLU 水平的影响

Fig.5 Effect of Betaine on GLU level of db/db mice

高血糖是发生肾脏损坏的先决条件。高血糖作为启动因素，可引起肾脏血流动力学发生改变，导致多元醇通路的激活、蛋白质非酶糖基化终末产物的积累及蛋白激酶 C 的激活，进而导致肾脏发生一系列病理变化^[7]。处理前各组血糖水平无明显差异，处理后甜菜碱各组与脂必妥组与模型组相比，血糖水平显著降低 ($P < 0.01$) (图 5)，脂必妥组降低 4.6 mM，甜菜碱各组降低 4.9~5.3 mM。甜菜碱各组间无统计学差异，并与脂必妥组无明显差异。说明甜菜碱对因糖尿病引起的糖代谢紊乱有明显的调节作用，并与脂必妥效果接近。

2.2.4 甜菜碱对小鼠血脂水平的影响

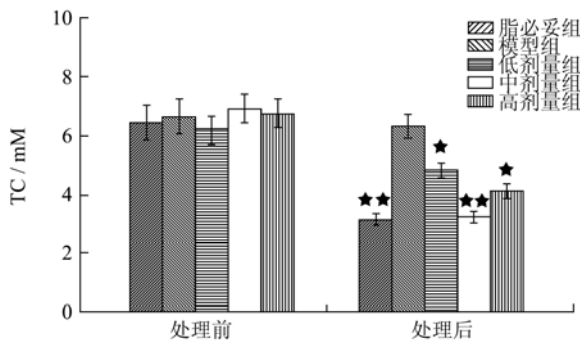


图6 甜菜碱对 db/db 小鼠 TC 水平的影响

Fig.6 Effect of Betaine on TC level of db/db mice

db/db 小鼠在出现高糖血症的同时，会并发高脂血症，以高甘油三脂、高胆固醇、高低密度脂蛋白胆固醇为特征的脂代谢紊乱是 DN 的重要高危因素^[8]。脂代谢紊乱超过脂肪组织的存储能力，沉积于非脂肪组织沉积于肾脏，则对肾脏造成损伤。处理前各组 TC、TG、LDL 水平无明显差异，处理后甜菜碱处理各组与脂必妥组 TC、TG、LDL 水平均显著低于模型组 ($P < 0.05$) (图 6~8)，脂必妥组分别降低 3.2 mM，0.52 mM，0.65 mM，甜菜碱各组最高分别降低 3.1 mM，0.42 mM，0.64 mM。其中，低、高剂量组的 TC 水平

要高于脂必妥组，中剂量组与脂必妥组无明显差异；甜菜碱各组的 TG、LDL 水平与脂必妥组无差异。说明甜菜碱对因糖尿病引起的脂代谢紊乱有显著的调节作用，并与脂必妥效果接近。

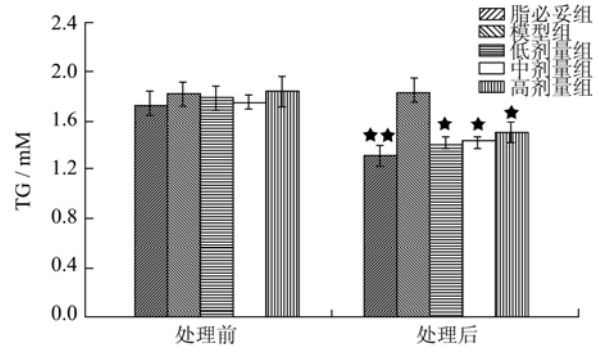


图7 甜菜碱对 db/db 小鼠 TG 水平的影响

Fig.7 Effect of Betaine on TG level of db/db mice

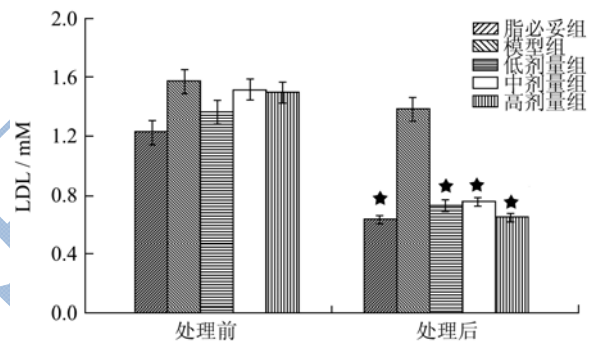


图8 甜菜碱对 db/db 小鼠 LDL 水平的影响

Fig.8 Effect of Betaine on LDL level of db/db mice

2.2.5 甜菜碱对小鼠血清 TGF-β1 水平的影响

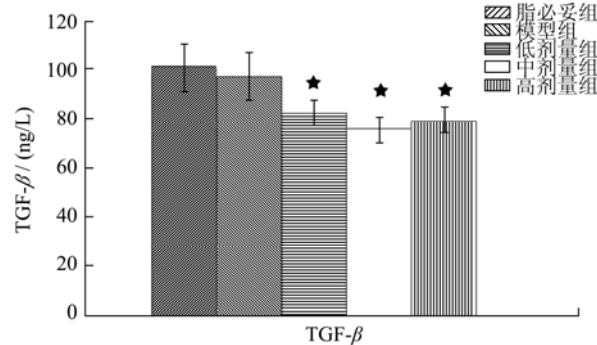


图9 甜菜碱对 db/db 小鼠血清 TGF-β1 水平的影响

Fig.9 Effect of Betaine on TGF-β1 level of db/db mice

TGF-β1 是一种多效性细胞因子，可调节多种靶基因的表达，在细胞增殖、凋亡、分化及细胞外基质成分合成中发挥重要作用^[9-11]。TGF-β1 的过度表达，使细胞外基质增加，最终导致肾小球的硬化，被认为是介导 DN 发生和发展的关键机制。处理六周后，甜菜碱各组与模型组和脂必妥组相比，血清 TGF-β1 水平显著下降 ($P < 0.05$)，中剂量组下降最多为 21 ng/L；

脂必妥组与模型组相比,血清 TGF- β 1 水平升高,但是结果未有统计学差异;甜菜碱各组间差异无统计学变化。表明甜菜碱对小鼠肾病损伤的修复作用的机制与 TGF- β 1 水平的降低有关,而脂必妥的药效与此无关。

2.2.6 甜菜碱对 db/db 小鼠血清 TNF- α 水平的影响

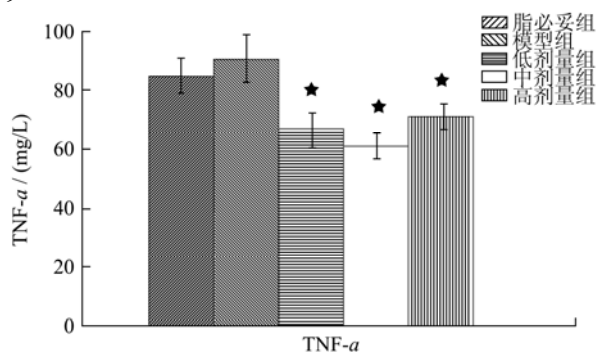


图 10 甜菜碱对 db/db 小鼠血清 TNF- α 水平的影响

Fig.10 Effect of Betaine on TNF- α level of db/db mice

近年来,有研究认为 DN 是一种低度炎症性疾病, DN 的发病是在代谢紊乱与血流动力学异常的基础上,而其持续进展的关键因素是慢性炎症^[12]。TNF- α 已经被证明对炎症性疾病中细胞因子的级联放大效应发挥关键作用,其作用被称为炎症因子的“主调节”作用。研究表明糖尿病患者及动物血清中的 TNF- α 浓度与临床肾小球及间质损伤程度直接相关,从 TNF- α 升高水平可以判断 DN 进展程度^[13]。处理六周后,甜菜碱各组与模型组和脂必妥组相比,血清 TNF- α 水平显著下降 ($P < 0.05$),中剂量组下降最多为 30 ng/L;脂必妥组与模型组相比,血清 TNF- α 水平降低,但是结果未有统计学意义;甜菜碱各处理组间无统计学差异。脂必妥组与模型组无显著差异,说明脂必妥对慢性炎症并无缓解作用,而甜菜碱能显著降低 TNF- α 水平,说明甜菜碱可通过降低炎症反应来减轻肾脏损伤,而脂必妥无此效果。

3 结论

3.1 本实验研究结果表明,甜菜碱使小鼠糖尿病肾脏损伤的病理变化有显著地减轻,降低了血液中尿素氮含量,对糖尿病引起的肾功能损伤具有修复作用;甜菜碱能显著减轻小鼠肥胖程度,降低血糖和血脂水平,具有改善因糖尿病引起的代谢紊乱的作用;甜菜碱对糖尿病肾脏损伤的保护作用与 TGF- β 1 和 TNF- α 水平的下降密切相关。

3.2 糖尿病肾病发病机制与代谢紊乱、血流动力学异常、氧化应激、细胞因子参与及炎症反应等因素有关

^[14]。本研究观察到甜菜碱对糖尿病肾病损伤修复作用,其作用机制之一是对由糖尿病引起的高血糖、高血脂具有一定的改善作用,从而改善了诱使 DN 发生的环境因素;此外,甜菜碱还有降低 TGF- β 1 和 TNF- α 水平的作用,糖尿病状态下,高葡萄糖浓度、糖基化蛋白、活性氧、肾血流动力学异常等刺激因素都会使肾内 TGF- β 1 及其 II 型受体表达增加和过度激活^[15],而 TNF- α 与炎症反应密切相关,说明甜菜碱对 DN 发病机制中的众多因素都有调节作用。因此,甜菜碱具有作为修复糖尿病肾病损失的功能食品或药物的应用前景。甜菜碱各组之间的指标差异不显著,可能是由于药物浓度设置不合理所致。

参考文献

- [1] Choudhury D, Tuncel M, Levi M. Diabetic nephropathy—a multifaceted target of new therapies [J]. *Discov. Med.*, 2010; 10(54): 406-415
- [2] 黄红娜,张丹参,郑晓霞,等.甜菜碱药理作用的研究进展[J]. *医学综述*, 2009, 15(24): 3788-3789
HUANG Hong-na, ZHANG Dan-shen, ZHENG Xiao-xia, et al. Pharmacology research progress of betaine [J]. *Medical Recapitulate*, 2009, 15(24): 3788-3789
- [3] 刘光洁,刘光泽,兰丹,等.甜菜碱对老龄 db/db 小鼠脂肪性肝损害的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(6): 1114-1118
LIU Guang-jie, LIU Guang-ze, LAN Dan, et al. Effect of betaine on liver injuries in aging db/db mice induced by lipids [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2013, 29(6): 1114-1118
- [4] Sharma K, McCue P, Dunn SR. Diabetic kidney disease in the db/db mouse [J]. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2003, 284(6): F1138-1144
- [5] Shields J, Maxwell AP. Managing diabetic nephropathy [J]. *Clin. Med.*, 2010, 10(5): 500-50
- [6] Kamenetsky I, Rangayyan RM, Benediktsson H. Analysis of the glomerular basement membrane in images of renal biopsies using the split-and-merge method: a pilot study [J]. *J. Digit. Imaging*, 2010, 23(4): 463-474
- [7] 李娜,孙汇,王拓,等.糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. *北华大学学报*, 2012, 13(1): 68-72
LI Na, SUN Hui, WANG Tuo, et al. Progress on pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Journal of Beihua University*, 2012, 13(1): 68-72
- [8] Attman P O, Knight-Gibson, Tavella M, et al. The compositional abnormalities of lipoproteins in diabetic renal failure [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1998, 13(11): 2833

- [9] Ito Y, Goldschmeding R, Kasuga H, et al. Expression patterns of connective tissue growth factor and of TGF-beta isoforms during glomerular injury recapitulate glomerulogenesis [J]. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2010, 299(3): 545-558
- [10] Hills C E, Bland R, Bennett J, et al. TGF-beta1 mediates glucose-evoked up-regulation of connexin-43 cell-to-cell communication in HCD-cells [J]. *Cell Physiol. Biochem.*, 2009, 24(3/4): 177
- [11] Kondo T, Takemura G, Kosai K, et al. Application of an adenoviral vector encoding soluble transforming growth factor-beta type II receptor to the treatment of diabetic nephropathy in mice [J]. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2008, 35(11): 1288-1293
- [12] Utimura R, Fujihara C, Clarice KF, et al. Mycophenolate mofetil prevent the development of glomerular injury in experimental diabetes [J]. *Kidney Int.*, 2003, 63(1): 209-216
- [13] Navarro JF, Mora C, et al. Urinary tumour necrosis factor-alpha excretion independently correlates with clinical makers of glomerular and tubulointerstitial injury in type 2 diabetic patients [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2006, 21(12): 3428
- [14] Piwkowska A, Rogacka D, Audzeyenka I, et al. High glucose concentration affects the oxidant-antioxidant balance in cultured mouse podocytes [J]. *J. Cell Biochem.*, 2011, 112(6): 1661
- [15] De Muro P, Faedda R, Fresu P, et al. Urinary transforming growth factor-beta 1 in various types of nephropathy [J]. *Pharmacol. Res.*, 2004, 49(3): 293-298