

本文引用:马东红,师晶晶,刘云,等.2 型糖尿病肾病大鼠白细胞介素-6、白细胞介素-10、转化生长因子- β_1 、组蛋白乙酰化酶4 表达及其与血糖、尿蛋白-肌酐比值的相关性[J]. 新乡医学院学报,2023,40(8):701-706. DOI:10.7683/xyxyxb.2023.08.001.

【基础研究】

2 型糖尿病肾病大鼠白细胞介素-6、白细胞介素-10、转化生长因子- β_1 、组蛋白去乙酰化酶 4 表达及其与血糖、尿蛋白-肌酐比值的相关性

马东红, 师晶晶, 刘 云, 侯玉龙, 曹子彧, 黎 妞, 郭明好
(新乡医学院第一附属医院肾内科, 河南 卫辉 453100)

摘要: 目的 探讨 2 型糖尿病肾病 (DN) 大鼠白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-10 (IL-10)、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、组蛋白去乙酰化酶 4 (HDAC4) 表达及其与血糖、尿蛋白-肌酐比值 (UACR) 的相关性。方法 采用随机数字表法将 64 只健康雄性 Sprague Dawley 大鼠分为对照组 ($n=32$) 和 DN 组 ($n=32$)。DN 组大鼠给予高脂高糖饲料及腹腔注射链脲佐菌素 $40\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 制备 DN 模型, DN 模型大鼠造模成功后正常饮食饮水。对照组大鼠正常饮食饮水, 经腹腔注射等剂量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。于造模后第 0、4、8、12 周分批处死 2 组大鼠, 于每次处死前称大鼠体质量; 使用血糖仪及配套试纸检测大鼠血糖; 收集尿液, 使用全自动生物化学分析仪检测大鼠尿微量白蛋白、尿肌酐水平, 并计算 UACR; 于大鼠处死后立即取出双侧肾脏, 其中一侧肾脏去除包膜后称肾质量, 并计算肾脏指数 (KI)。采用 Western blot 法检测 2 组大鼠肾组织中 IL-6、IL-10、TGF- β_1 、HDAC4 蛋白表达, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测 2 组大鼠血清中 IL-6、IL-10、TGF- β_1 和 HDAC4 水平, 采用 Pearson 相关分析 DN 大鼠血清 IL-6、IL-10、TGF- β_1 、HDAC4 水平与血糖、UACR 的相关性。结果 造模后第 0、4、8、12 周, DN 组大鼠血糖水平及 UACR 均显著高于对照组 ($P<0.05$)。造模后第 0 周, 2 组大鼠的体质量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 造模后第 4、8、12 周, DN 组大鼠的体质量均显著低于对照组 ($P<0.05$)。造模后第 0、4 周, 2 组大鼠的 KI 比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 造模后第 8、12 周, DN 组大鼠的 KI 显著高于对照组 ($P<0.05$)。造模后第 0、4、8、12 周, DN 组大鼠血清中 IL-6、HDAC4、TGF- β_1 水平均显著高于对照组, IL-10 水平显著低于对照组 ($P<0.05$)。造模后第 0 周, DN 组大鼠肾组织中 IL-10 相对表达量显著高于对照组 ($P<0.05$); 造模后第 8 周, DN 组大鼠肾组织中 IL-10 相对表达量显著低于对照组 ($P<0.05$); 造模后第 4、12 周, 2 组大鼠肾组织中 IL-10 相对表达量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。造模后第 0、4、8、12 周, DN 组大鼠肾组织中 IL-6、HDAC4 相对表达量均显著高于对照组 ($P<0.05$)。造模后第 0 周, 2 组大鼠肾组织中 TGF- β_1 相对表达量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 造模后第 4、8、12 周, DN 组大鼠肾组织中 TGF- β_1 相对表达量显著高于对照组 ($P<0.05$)。Pearson 相关性分析显示, DN 组大鼠血清 IL-6、TGF- β_1 水平与血糖呈正相关 ($r=0.614, 0.514, P<0.05$), 血清 IL-10 水平与血糖呈负相关 ($r=-0.448, P<0.05$), 血清 HDAC4 水平与血糖无相关性 ($r=-0.177, P>0.05$)。DN 组大鼠血清 IL-6、TGF- β_1 水平与 UACR 呈正相关 ($r=0.405, 0.470, P<0.05$), 血清 IL-10、HDAC4 水平与 UACR 无相关性 ($r=-0.134, -0.124, P>0.05$)。结论 DN 大鼠 IL-6、TGF- β_1 、HDAC4 表达上调, IL-10 表达下调; DN 大鼠血清 IL-6、TGF- β_1 水平与血糖、UACR 呈显著正相关, 血清 IL-10 水平与血糖呈显著负相关。

关键词: 糖尿病肾病;白细胞介素-6;白细胞介素-10;转化生长因子- β_1 ;组蛋白去乙酰化酶4

中图分类号: R587.2; R692.9 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2023)08-0701-06

Changes of interleukin-6, interleukin-10, transforming growth factor- β_1 and histone deacetylases 4 expression and their correlations with blood glucose and urinary protein-creatinine ratio in rats with type 2 diabetic nephropathy

MA Donghong, SHI Jingjing, LIU Yun, HOU Yulong, CAO Ziyu, LI Niu, GUO Minghao

(Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China)

DOI:10.7683/xxxyxyxb.2023.08.001

收稿日期:2022-06-14

基金项目:河南省科技厅重点研发与推广项目(编号:182102310585);河南省高等学校重点科研项目(编号:17A320026);河南省卫生厅科技攻关省部共建备选项目(编号:2018010013)。

作者简介:马东红(1980-),女,河南新密人,博士,副教授,研究方向:糖尿病肾病。

通信作者:郭明好(1964-),男,河南封丘人,硕士,教授,研究方向:慢性肾脏病的基础与临床研究;E-mail:gmhdoctor@163.com。

Abstract: Objective To explore the expressions of interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and histone deacetylases 4 (HDAC4) and their correlations with blood glucose and urinary protein-creatinine ratio (UACR) in rats with type 2 diabetic nephropathy (DN). **Methods** A total of 64 healthy male Sprague Dawley rats were randomly divided into the control group ($n=32$) and the DN group ($n=32$) using a random number table method. The rats in the DN group were given high fat and high sugar feed and intraperitoneal injection of $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of streptozotocin to prepare DN model. After successful modeling, DN model rats ate and drank water normally. The rats in the control group were given normal diet and drinking water, and an equal dose of citrate sodium citrate buffer was injected intraperitoneally. The rats in the two groups were euthanized in batches at 0, 4, 8, and 12 weeks after modeling, and their body weight was measured before each execution; the blood glucose level of rats was detected by blood glucose meter and matching test strips; the levels of microalbumin and creatinine in urine of rats were detected by automatic biochemical analyzer, and UACR was calculated; immediately after the rat was euthanized, both kidneys were removed. After removing the capsule from one side of the kidney, the kidney mass was weighted and the kidney index (KI) was calculated. The expressions of IL-6, IL-10, TGF- β_1 and HDAC4 protein in renal tissue of rats in the two groups were detected by Western blot method. The levels of IL-6, IL-10, TGF- β_1 and HDAC4 in serum of rats in the two groups were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The correlation between serum IL-6, IL-10, TGF- β_1 and HDAC4 levels and blood glucose, UACR in DN rats was analyzed by Pearson correlation analysis. **Results** At 0, 4, 8 and 12 weeks after modeling, the blood glucose levels and UACR of rats in the DN group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). At 0 week after modeling, there was no significant difference in body mass of rats between the two groups ($P > 0.05$); at 4, 8 and 12 weeks after modeling, the body mass of rats in the DN group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). At 0 and 4 weeks after modeling, there was no significant difference in KI of rats between the two groups ($P > 0.05$); at 8 and 12 weeks after modeling, the KI of rats in the DN group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). At 0, 4, 8 and 12 weeks after modeling, the levels of IL-6, HDAC4 and TGF- β_1 in the serum of rats in the DN group were significantly higher than those in the control group, while the IL-10 level was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). At 0 week after modeling, the relative expression level of IL-10 in the kidney tissue of rats in the DN group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$); at 8 weeks after modeling, the relative expression level of IL-10 in the kidney tissue of rats in the DN group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$); at 4 and 12 weeks after modeling, there was no significant difference in the relative expression level of IL-10 in the renal tissues of rats between the two groups ($P > 0.05$). At 0, 4, 8 and 12 weeks after modeling, the relative expression levels of IL-6 and HDAC4 in the renal tissue of rats in the DN group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). At 0 week after modeling, there was no significant difference in the relative expression level of TGF- β_1 in renal tissue of rats between the two groups ($P > 0.05$); at 4, 8 and 12 weeks after modeling, the relative expression level of TGF- β_1 in renal tissue of rats in the DN group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that the serum IL-6 and TGF- β_1 levels of rats in the DN group was positively correlated with blood glucose ($r=0.614, 0.514; P < 0.05$), serum IL-10 level was negatively correlated with blood glucose ($r=-0.448, P < 0.05$), and there was no significant correlation between the serum HDAC4 level and blood glucose ($r=-0.177, P > 0.05$). The serum IL-6 and TGF- β_1 levels of rats in the DN group was positively correlated with UACR ($r=0.405, 0.470; P < 0.05$), and there was no significant correlation between the serum IL-10, HDAC4 levels and UACR ($r=-0.134, -0.124; P > 0.05$). **Conclusion** The expressions of IL-6, TGF- β_1 and HDAC4 is upregulated in DN rats, while the expression of IL-10 is downregulated. The serum IL-6 and TGF- β_1 levels in DN rats is significantly positively correlated with blood glucose and UACR, while the serum IL-10 level is significantly negatively correlated with blood glucose.

Key words: diabetic nephropathy; interleukin-6; interleukin-10; transforming growth factor- β_1 ; histone deacetylases 4

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 发病率逐年升高, 糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是 T2DM 常见的并发症之一, 早期主要临床表现为尿蛋白-肌酐比值 (urinary protein-creatinine ratio, UACR) 升高。在 DN 发病过程中, 肾脏局部炎症反应发挥了重要的作用^[1]。白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 是一种关键的促炎因子, IL-6 与 DN 患者肾组织系膜增生和间质损伤程度有关^[2]。白细胞介

素-10 (interleukin-10, IL-10) 是由调节性 T 细胞等多种细胞分泌的具有抗炎和免疫调节作用的因子。转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 为参与细胞外基质沉积、成纤维细胞活化的重要因子, 与 DN 的进展密切相关^[3,4]。有研究发现, 组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDAC) 介导的组蛋白乙酰化修饰在 DN 发生发展过程中发挥重要作用, 使用 HDACs 抑制剂可延缓或逆转 DN 的

进程^[5],其中,HDAC4在DN发病过程中可抑制足细胞自噬并加剧炎症反应^[6]。目前,关于DN发展过程中IL-6、IL-10、TGF- β_1 、HDAC4表达水平变化及其与临床指标相关性的研究较少。基于此,本研究旨在探讨DN大鼠IL-6、IL-10、TGF- β_1 、HDAC4表达变化及其与血糖、UACR的相关性,以期对2型DN的治疗提供潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

64只健康雄性Sprague Dawley大鼠购自山西医科大学生物实验中心,体质量180~200 g,7~8周龄。

1.2 主要试剂与仪器

高脂高糖饲料购自北京博泰宏达生物有限公司,链脲佐菌素购自美国Sigma公司,放射免疫沉淀裂解液购自福州飞净生物科技有限公司,十二烷基硫酸钠、聚偏二氟乙烯膜购自北京索莱宝有限公司,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白定量试剂盒购自新赛美生物技术有限公司,脱脂牛奶购自上海碧云天生物技术有限公司,兔多克隆IL-10抗体、鼠单克隆IL-6抗体、兔单克隆TGF- β_1 抗体、兔多克隆HDAC4抗体均购自英国Abcam公司,电化学发光试剂购自广州捷倍斯科技有限公司,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(immunoglobulin,Ig)G二抗购自北京博奥森生物技术有限公司,大鼠IL-10酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒、大鼠TGF- β_1 ELISA试剂盒均购自武汉华美生物工程有限公司,大鼠HDAC4ELISA试剂盒购自上海扶生实业有限公司;全波长扫描酶标仪、恒温水浴槽、低温超速离心机购自美国Thermo公司,精密电子天平购自德国Sartorius公司,移液器购自德国Eppendorf公司,贝克曼AU5800全自动生物化学分析仪购自美国贝克曼库尔特有限公司,电泳槽、电转移装置购自上海天能科技有限公司,AlfaEaseFC成像分析系统购自美国Alfa Innotech Corporation公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及各组干预措施

采用随机数字表法将64只大鼠分为对照组($n=32$)和DN组($n=32$)。DN组大鼠给予高脂高糖饲料6周后,经腹腔注射链脲佐菌素40 mg·kg⁻¹,72 h后,取尾静脉血测血糖,血糖 ≥ 16.7 mmol·L⁻¹表示T2DM模型大鼠制备成功,血糖 <16.7 mmol·L⁻¹的大鼠以30 mg·kg⁻¹的剂量再次经腹腔注射链脲佐菌素;T2DM模型大鼠制备成功后,继续给予高脂高糖饲料喂养4周后,收集尿

液,应用全自动生物化学分析仪检测大鼠尿微量白蛋白、肌酐水平,并计算UACR, $UACR(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}) = \text{尿微量白蛋白}(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) / \text{尿肌酐}(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) \times 8\,840$, $UACR \geq 30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 表示DN模型大鼠制备成功,DN模型大鼠造模成功后正常饮食饮水。对照组大鼠正常饮食饮水,经腹腔注射等剂量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。

1.3.2 大鼠体质量、血糖、UACR及肾脏指数(kidney index, KI)检测

于造模后第0、4、8、12周分批处死2组大鼠,每次每组分别处死8只。于每次处死前称大鼠体质量;使用罗氏血糖仪及配套试纸检测大鼠血糖;收集尿液,应用全自动生物化学分析仪检测大鼠尿微量白蛋白、尿肌酐水平,并计算UACR。大鼠处死后立即取出双侧肾脏,其中一侧肾脏去除包膜后称肾质量,并计算KI, $KI = \text{肾质量}(\text{mg}) / \text{体质量}(\text{g})$ 。

1.3.3 Western blot法检测大鼠肾组织中IL-6、IL-10、TGF- β_1 和HDAC4蛋白表达

2组大鼠于不同时间点分批处死后,取出一侧肾组织,使用放射免疫沉淀裂解液裂解,研磨匀浆,使用低温高速离心机4℃、12 000 r·min⁻¹离心20 min,取上清液。采用BCA法测定蛋白浓度。每孔取20 μg 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移蛋白至聚偏二氟乙烯膜上,脱脂牛奶室温封闭1 h,滴加IL-6、IL-10、TGF- β_1 、HDAC4、 β -actin一抗,4℃孵育过夜。使用含吐温-20的Tris缓冲液洗膜10 min×3次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育1 h,采用含吐温-20的Tris缓冲液洗膜10 min×5次。采用电化学发光法显色,应用AlfaEase FC成像分析系统成像,应用Image J软件分析各条带灰度值,以 β -actin为内参,以目的蛋白灰度值与 β -actin的灰度值比值表示目的蛋白相对表达量。

1.3.4 ELISA法检测大鼠血清中IL-6、IL-10、TGF- β_1 和HDAC4水平

2组大鼠于不同时间点分批处死后,立即抽取;心脏血5 mL,置于抗凝管中,离心取上清,-80℃保存;采用ELISA法检测血清中IL-6、IL-10、TGF- β_1 、HDAC4水平,严格按照ELISA试剂盒说明书进行操作。

1.4 统计学处理

应用SPSS 23.0软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2组间比较采用独立样本 t 检验;采用Pearson相关分析2型DN大鼠血清IL-6、IL-10、TGF- β_1 、HDAC4水平与血糖、UACR的相关性; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组大鼠血糖、体质量、UACR 和 KI 比较

造模后第 0、4、8、12 周, DN 组大鼠血糖水平和 UACR 均显著高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。造模后第 0 周, 2 组大鼠的体质量比较差异

无统计学意义($P > 0.05$)。造模后第 4、8、12 周, DN 组大鼠的体质量均显著低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。造模后第 0、4 周, 2 组大鼠的 KI 比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。造模后第 8、12 周, DN 组大鼠的 KI 显著高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 2 组大鼠血糖、体质量、UACR 和 KI 比较

Tab.1 Comparison of blood glucose, body weight, UACR and KI of rats between the two groups ($\bar{x} \pm s$)					
组别	<i>n</i>	血糖/(mmol · L ⁻¹)	体质量/g	UACR/(mg · g ⁻¹)	KI/(mg · g ⁻¹)
对照组	8				
第 0 周		5.22 ± 0.12	386.81 ± 7.20	11.20 ± 3.03	4.13 ± 0.10
第 4 周		5.23 ± 0.34	500.94 ± 14.66	14.03 ± 4.49	4.55 ± 0.19
第 8 周		5.73 ± 0.39	596.44 ± 15.58	10.03 ± 2.57	4.59 ± 0.11
第 12 周		5.37 ± 0.34	627.00 ± 14.92	13.58 ± 5.55	4.74 ± 0.14
DN 组	8				
第 0 周		23.88 ± 1.89 ^a	395.50 ± 21.01	48.02 ± 12.70 ^a	4.22 ± 0.07
第 4 周		23.57 ± 2.70 ^a	474.21 ± 21.71 ^a	35.19 ± 11.33 ^a	4.58 ± 0.10
第 8 周		25.79 ± 2.97 ^a	509.93 ± 37.46 ^a	47.34 ± 6.43 ^a	4.88 ± 0.27 ^a
第 12 周		23.39 ± 3.33 ^a	467.21 ± 35.04 ^a	73.12 ± 13.61 ^a	6.99 ± 1.04 ^a

注:与对照组比较^a $P < 0.05$ 。

2.2 2 组大鼠血清中 IL-10、IL-6、TGF-β₁ 和 HDAC4 水平比较

造模后第 0、4、8、12 周, DN 组大鼠血清中 IL-6、

HDAC4 和 TGF-β₁ 水平均显著高于对照组, IL-10 水平显著低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 2 组大鼠血清 IL-10、IL-6、TGF-β₁ 和 HDAC4 水平比较

Tab.2 Comparison of serum IL-10, IL-6, TGF-β ₁ and HDAC4 levels of rats between the two groups ($\bar{x} \pm s$)					
组别	<i>n</i>	IL-10/(ng · L ⁻¹)	IL-6/(ng · L ⁻¹)	TGF-β ₁ /(ng · L ⁻¹)	HDAC4/(mg · L ⁻¹)
对照组	8				
第 0 周		32.88 ± 2.07	5.84 ± 0.61	92.91 ± 11.68	12.66 ± 2.03
第 4 周		24.54 ± 1.11	5.79 ± 0.62	123.33 ± 15.56	14.08 ± 1.32
第 8 周		21.68 ± 2.17	5.81 ± 0.67	117.69 ± 13.85	15.35 ± 1.07
第 12 周		29.61 ± 1.39	5.74 ± 0.58	121.04 ± 14.55	11.67 ± 1.35
DN 组	8				
第 0 周		27.36 ± 3.12 ^a	9.07 ± 0.89 ^a	111.19 ± 13.30 ^a	21.49 ± 2.75 ^a
第 4 周		20.20 ± 0.88 ^a	9.89 ± 1.26 ^a	206.53 ± 37.51 ^a	26.25 ± 2.10 ^a
第 8 周		9.89 ± 2.45 ^a	11.32 ± 1.90 ^a	253.56 ± 15.04 ^a	25.71 ± 2.43 ^a
第 12 周		9.81 ± 1.63 ^a	12.75 ± 2.41 ^a	246.99 ± 26.90 ^a	28.77 ± 1.67 ^a

注:与对照组比较^a $P < 0.05$ 。

2.3 2 组大鼠肾组织中 IL-10、IL-6、TGF-β₁ 和 HDAC4 相对表达量比较

造模后第 0 周, DN 组大鼠肾组织中 IL-10 相对表达量显著高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$);造模后第 8 周, DN 组大鼠肾组织中 IL-10 相对表达量显著低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$);造模后第 4、12 周, 2 组大鼠肾组织中 IL-10 相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。造模后第 0、4、8、12 周, DN 组大鼠肾组织中 IL-6、HDAC4 相对表达量均显著高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。造模后第 0 周, 2 组大鼠肾组织中 TGF-β₁ 相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$);造模后第 4、8、12 周, DN 组大鼠肾组织中 TGF-β₁ 相对表达量显著高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见图 1 和表 3。

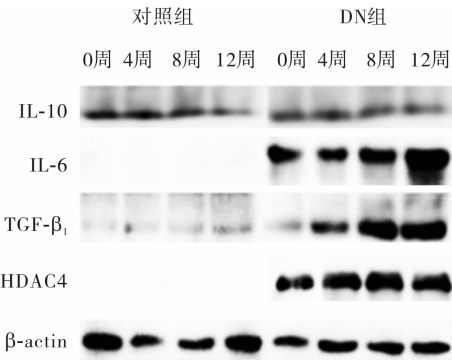


图 1 2 组大鼠肾组织中 IL-6、IL-10、TGF-β₁ 和 HDAC4 蛋白表达 (Western blot)

Fig.1 Expressions of IL-6, IL-10, TGF-β₁ and HDAC4 protein in renal tissue of rats in the two groups (Western blot)

表 3 2 组大鼠肾组织中 IL-10、IL-6、TGF-β₁ 和 HDAC4 相对表达量比较

Tab. 3 Comparison of relative expression levels of IL-10, IL-6, TGF-β₁ and HDAC4 in renal tissue of rats between the two groups

组别	<i>n</i>	IL-10	IL-6	TGF-β ₁	HDAC4
对照组	8				
第 0 周		0.52 ± 0.05	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.00
第 4 周		0.96 ± 0.14	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.01
第 8 周		0.85 ± 0.07	0.05 ± 0.07	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.01
第 12 周		0.43 ± 0.07	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.01 ± 0.00
DN 组	8				
第 0 周		0.78 ± 0.07 ^a	1.65 ± 0.35 ^a	0.02 ± 0.14	1.30 ± 0.03 ^a
第 4 周		0.66 ± 0.02	1.16 ± 0.04 ^a	0.25 ± 0.03 ^a	1.50 ± 0.05 ^a
第 8 周		0.40 ± 0.01 ^a	2.48 ± 0.64 ^a	0.28 ± 0.01 ^a	1.89 ± 0.21 ^a
第 12 周		0.38 ± 0.00	3.74 ± 0.35 ^a	0.29 ± 0.01 ^a	1.51 ± 0.03 ^a

注:与对照组比较^a*P* < 0.05。

2.4 DN 大鼠血清 IL-6、IL-10、TGF-β₁、HDAC4 水平与血糖、UACR 的相关性

Pearson 相关性分析显示, DN 组大鼠血清 IL-6、TGF-β₁ 水平与血糖呈正相关(*r* = 0.614、0.514, *P* < 0.05),血清 IL-10 水平与血糖呈负相关(*r* = -0.448, *P* < 0.05),血清 HDAC4 水平与血糖无显著相关性(*r* = -0.177, *P* > 0.05)。DN 组大鼠血清 IL-6、TGF-β₁ 水平与 UACR 呈正相关(*r* = 0.405、0.470, *P* < 0.05),血清 IL-10、HDAC4 水平与 UACR 无显著相关性(*r* = -0.134、-0.124, *P* > 0.05)。

3 讨论

DN 是糖尿病常见的微血管并发症之一,其发病机制复杂。肾脏局部炎症在促进 DN 的发生和发展中起着重要的作用,其涉及到炎症细胞、炎症因子和多种蛋白激酶^[7]。

本研究结果显示,造模后第 0、4、8、12 周, DN 组大鼠血糖水平及 UACR 均显著高于对照组,证明 DN 组大鼠 DN 模型造模成功。本研究结果显示,造模后第 0 周,2 组大鼠的体质量比较差异无统计学意义;造模后第 4、8、12 周, DN 组大鼠的体质量均显著低于对照组,原因可能为 DN 模型大鼠机体不能充分利用葡萄糖,通过加速脂肪和蛋白质的分解来补充能量,从而导致体内脂肪和蛋白质大量消耗,出现体质量下降,也进一步证明了大鼠 DN 模型造模成功。造模后第 0、4 周,2 组大鼠的 KI 比较差异无统计学意义,说明 DN 早期尽管高血糖可引起体质量逐渐下降,但对肾质量无明显影响;造模后第 8、12 周, DN 组大鼠的 KI 显著高于对照组,说明随着时间延长高血糖可促进 DN 模型大鼠肾脏肥大,加速肾脏损伤,也进一步证明了大鼠 DN 模型造模成功。

IL-6 是一种在炎症过程中起关键作用的细胞因子。PFÄFFLIN 等^[8]研究发现,高血糖刺激下,肾小

球系膜增生可引起肾小球系膜细胞等固有细胞及肾间质和肾小管细胞均表达 IL-6,从而引起炎症反应。NAVARRO 等^[9]研究发现,与非 DN 大鼠相比, DN 大鼠血清中 IL-6 水平显著升高,且与尿白蛋白排泄量呈正相关。此外, ABDELRAHMAN 等^[10]研究发现,人源化抗体妥珠单抗可通过阻断 IL-6 受体减轻 DN 大鼠肾脏的炎症和氧化应激,从而延缓 DN 的病理进展。本研究结果显示,造模后第 0、4、8、12 周, DN 组大鼠血清和肾组织中 IL-6 表达水平均显著高于同时点对照组大鼠;此外, Pearson 相关性分析显示, DN 组大鼠血清 IL-6 水平与血糖和 UACR 均呈正相关,说明 IL-6 参与了 2 型 DN 的进展。

IL-10 是一种由多种免疫细胞如 B 细胞、肥大细胞、粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞和多种 T 细胞产生的关键抗炎介质^[11]。IL-10 可显著抑制肾小球系膜细胞增殖和巨噬细胞浸润^[12]。MU 等^[13]研究发现, IL-10 能够减轻慢性肾脏病大鼠肾脏纤维化。JIN 等^[14]研究发现, IL-10 缺乏的小鼠会出现严重肾小管损伤,并伴随有炎症和促纤维化标志物的增加,以及胶原沉积。本研究结果显示,造模后第 0、4、8、12 周, DN 组大鼠血清中 IL-10 水平显著低于对照组;造模后第 0 周 DN 组大鼠肾组织中 IL-10 相对表达量显著高于对照组,造模后第 8 周 DN 组大鼠肾组织中 IL-10 相对表达量显著低于对照组;此外, DN 组大鼠血清 IL-10 水平与血糖呈负相关;说明, DN 进展过程中大鼠血清和肾组织中 IL-10 表达量较低,且可能介导了肾脏炎症反应和纤维化。

肾脏局部炎症可以激活 TGF-β₁/Smad 信号通路,从而促进 DN 患者肾小球系膜细胞增殖和细胞外基质沉积^[15-16],并进一步引起肾小管上皮-间充质转化和肾间质纤维化^[17-19]。表观遗传组蛋白修饰和 TGF-β₁ 信号通路在调节 DN 肾脏纤维化方面起着重要作用。TGF-β₁ 通过激活组蛋白乙酰转移酶,使其在肾纤维化基因启动子上富集,从而促进纤维

化基因的转录,进而促进肾间质纤维化的进展^[20]。其中,介导组蛋白乙酰化的 HDAC4 在 DN 发病过程中起重要作用。HDAC4 可通过诱导炎症反应和细胞凋亡,尤其是通过抑制足细胞自噬,促进肾小球病变和蛋白尿排泄^[21-22]。本研究结果显示,造模后第 0、4、8、12 周, DN 组大鼠血清中 HDAC4、TGF-β₁ 水平均显著高于对照组;造模后第 4、8、12 周, DN 组大鼠肾组织中 TGF-β₁、HDAC4 相对表达量均显著高于对照组;此外, DN 组大鼠 TGF-β₁ 水平与血糖、UACR 呈显著正相关;说明, TGF-β₁ 介导的炎症反应参与 DN 的发生发展过程。HDAC4 主要介导足细胞损伤,足细胞是肾小球滤过膜的重要组成部分,足细胞损伤会导致大量蛋白尿。本研究结果显示, DN 大鼠血清 HDAC4 水平与血糖、UACR 无显著相关性,推测与 DN 造模时间短、UACR 水平相对偏低有关。

4 结论

DN 大鼠 IL-6、TGF-β₁、HDAC4 表达上调, IL-10 表达下调;此外, DN 大鼠血清 IL-6、TGF-β₁ 水平与血糖、UACR 呈显著正相关,血清 IL-10 水平与血糖呈显著负相关。本研究结果可为 DN 抗炎治疗提供新思路。DN 发生发展过程较复杂,涉及代谢、炎症、纤维化和表观遗传学改变等多种途径及相互作用,具体作用机制还有待进一步深入探讨。

参考文献:

[1] LV W, BOOZ G W, WANG Y, *et al.* Inflammation and renal fibrosis; recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 820: 65-76.

[2] SUZUKI D, MIYAZAKI M, NAKA R, *et al.* *In situ* hybridization of interleukin 6 in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 1995, 44 (10): 1233-1238.

[3] HUYNH P, CHAI Z. Transforming growth factor β (TGFβ) and related molecules in chronic kidney disease (CKD) [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133 (2): 287-313.

[4] MOU X, ZHOU D Y, ZHOU D Y, *et al.* Serum TGF-β₁ as a biomarker for type 2 diabetic nephropathy: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (2): e149513.

[5] SUN J, WANG Y, CUI W, *et al.* Role of epigenetic histone modifications in diabetic kidney disease involving renal fibrosis [J]. *J Diabetes Res*, 2017, 2017: 7242384.

[6] WANG X, LIU J, ZHEN J, *et al.* Histone deacetylase 4 selectively contributes to podocyte injury in diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2014, 86 (4): 712-725.

[7] MORENO J A, GOMEZ-GUERRERO C, MAS S, *et al.* Targeting inflammation in diabetic nephropathy: a tale of hope [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2018, 27 (11): 917-930.

[8] PFÄFFLIN A, BRODBECK K, HEILIG C W, *et al.* Increased glucose uptake and metabolism in mesangial cells overexpressing glucose transporter 1 increases interleukin-6 and vascular endothelial growth factor production: role of AP-1 and HIF-1α [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2006, 18 (4-5): 199-210.

[9] NAVARRO J F, MILENA F J, MORA C, *et al.* Renal pro-inflammatory cytokine gene expression in diabetic nephropathy: effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and pentoxifylline administration [J]. *Am J Nephrol*, 2006, 26 (6): 562-570.

[10] ABDELRAHMAN A M, AL SULEIMANI Y, SHALABY A, *et al.* Effect of tocilizumab, an interleukin-6 inhibitor, on early stage streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2019, 392 (8): 1005-1013.

[11] SARAIVA M, VIEIRA P, O'GARRA A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10 [J]. *J Exp Med*, 2020, 217 (1): e20190418.

[12] KITCHING A R, KATERELOS M, MUDGE S J, *et al.* Interleukin-10 inhibits experimental mesangial proliferative glomerulonephritis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2002, 128 (1): 36-43.

[13] MU W, OUYANG X, AGARWAL A, *et al.* IL-10 suppresses chemokines, inflammation, and fibrosis in a model of chronic renal disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16 (12): 3651-3660.

[14] JIN Y, LIU R, XIE J, *et al.* Interleukin-10 deficiency aggravates kidney inflammation and fibrosis in the unilateral ureteral obstruction mouse model [J]. *Lab Invest*, 2013, 93 (7): 801-811.

[15] WANG L, WANG H L, LIU T T, *et al.* TGF-β as a master regulator of diabetic nephropathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (15): 7881.

[16] LAN H Y. Transforming growth factor-β/Smad signalling in diabetic nephropathy [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39 (8): 731-738.

[17] WEI J, SHI Y, HOU Y, *et al.* Knockdown of thioredoxin-interacting protein ameliorates high glucose-induced epithelial to mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells [J]. *Cell Signal*, 2013, 25 (12): 2788-2796.

[18] QI W, NIU J, QIN Q, *et al.* Astragaloside IV attenuates glycated albumin-induced epithelial-to-mesenchymal transition by inhibiting oxidative stress in renal proximal tubular cells [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2014, 19 (1): 105-114.

[19] LIU X X, ZHOU H J, CAI L, *et al.* NADPH oxidase-dependent formation of reactive oxygen species contributes to transforming growth factor β₁-induced epithelial-mesenchymal transition in rat peritoneal mesothelial cells, and the role of astragalus intervention [J]. *Chin J Integr Med*, 2014, 20 (9): 667-674.

[20] SUN G, REDDY M A, YUAN H, *et al.* Epigenetic histone methylation modulates fibrotic gene expression [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21 (12): 2069-2080.

[21] WEI Q, DONG Z. HDAC4 blocks autophagy to trigger podocyte injury: non-epigenetic action in diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2014, 86 (4): 666-668.

[22] SHI W, HUANG Y, ZHAO X, *et al.* Histone deacetylase 4 mediates high glucose-induced podocyte apoptosis via upregulation of calcineurin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 533 (4): 1061-1068.

(本文编辑: 郭 潇)