

内分泌腺疾病及代谢病基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002182

活性维生素 D₃ 调控 NF-κB 信号通路对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用机制研究樊效菊¹, 韩睿¹, 吴阳²

(1. 昆明医科大学第一附属医院糖尿病科, 昆明 650032; 2. 昆明市第二人民医院内分泌科, 昆明 650203)

【摘要】目的:探讨活性维生素 D₃ 调控 NF-κB 炎症信号通路对 2 型糖尿病肾病大鼠肾脏的保护作用及机制;寻找维生素 D 在治疗糖尿病肾病中的最佳浓度。**方法:**将 SD 大鼠 70 只随机分成正常对照组(10 只)、DN 模型组(60 只),且 DN 模型组进一步分为花生油组、厄贝沙坦组、维生素 D 低剂量组、维生素 D 中剂量组、维生素 D 高剂量组(每组各 10 只)。正常组以普通饲料喂养,模型组分别以上述处理方式灌胃。6 周后处死大鼠称取体质量,采血检测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG),收集 24 h 尿液计算尿量、测 24 h 尿蛋白定量;留取肾脏组织,HE 染色观察肾组织病理学变化;实时荧光定量 PCR 检测肾脏组织中 NF-κB 及其下游单核细胞趋化因子-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)的 mRNA 表达;Western blot 检测炎症因子 NF-κB 及 MCP-1 蛋白表达。**结果:**①在血糖、24 h 尿蛋白,维生素 D 低剂量组较花生油组明显下降[分别为 18.20(16.25, 21.25)、32.24(26.09, 37.68)与 23.55(22.75, 24.60)、72.52(50.38, 84.93),均 $P < 0.05$]。②正常组大鼠 HE 染色可见肾小球形态完整,系膜区无明显增生,毛细血管腔规则,毛细血管袢形态规则;花生油组肾小球体积缩小,系膜区明显增宽,肾小球系膜细胞增生,毛细血管壁增厚;厄贝沙坦组较花生油组增生减轻;维生素 D 高剂量组、中剂量组、低剂量组肾小球系膜区均有增宽,但维生素 D 低剂量组增宽程度最轻。③维生素 D 低剂量组的 NF-κB 及 MCP-1 的 mRNA 水平较正常组花生油组明显下降[分别为 1.72 ± 0.002 、 0.67 ± 0.01 ; 3.57 ± 0.40 、 3.57 ± 0.37 ,均 $P < 0.05$];但厄贝沙坦组与维生素 D 低剂量组比较无统计学差异。④NF-κB 的蛋白表达水平在各组间均无统计学差异,维生素 D 低剂量组的 MCP-1 蛋白表达水平较花生油组、维生素 D 中剂量组下降最为明显[分别为 0.47 ± 0.17 与 0.91 ± 0.30 、 1.22 ± 0.18 、 0.93 ± 0.43 ,均 $P < 0.05$]。**结论:**维生素 D 能通过下调 NF-κB 炎症信号通路,有效地缓解糖尿病肾病的肾脏损伤;维生素 D 低剂量[$0.03 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]在糖尿病肾病的保护作用中为最佳浓度。

【关键词】活性维生素 D₃;糖尿病肾病;核因子-κB;MCP-1;信号通路**【中图分类号】**R58**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-07-17A study on the mechanism of action of active vitamin D₃ through regulating the NF-κB signaling pathway in renal protection of diabetic nephropathy ratsFan Xiaoju¹, Han Rui¹, Wu Yang²

(1. Department of Diabetes, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University;

2. Department of Endocrinology, The Second People's Hospital of Kunming)

【Abstract】Objective: ①To investigate the mechanism of action of active vitamin D₃ through regulating the NF-κB signaling pathway in renal protection of rats with type 2 diabetic nephropathy. ②To determine the optimal concentration of vitamin D in the treatment of diabetic nephropathy. **Methods:** Seventy Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group(10 rats) and DN model group(60 rats), and the DN model group was further divided into peanut oil group, irbesartan group, low-dose vitamin D group,

medium-dose vitamin D group, and high-dose vitamin D group, with 10 rats in each group. The normal control group was fed with routine diet, while the rats in the model group were administered above-mentioned drugs by gavage. The rats were then sacrificed and weighed after 6 weeks. And fasting blood glucose (FBG) was measured after blood sampling, and 24-hour urine was also collected to calculate urine volume and quantify 24-hour urine protein. Renal tissue was retained and HE staining was used to observe the pathological changes of renal tissue. Meanwhile, real-time fluorescent quantitative PCR was used to

作者介绍:樊效菊, Email: 1021589617@qq.com,

研究方向:糖尿病并发症临床及分子机制研究。

通信作者:韩睿, Email: hanrui_201207@163.com。

基金项目:云南省高层次卫生与技术人才培养资助项目(编号:D-201625);云南省教育厅科学研究基金资助项目(编号:2017YJS078);云南省卫计委资助项目(编号:2017NS041、2018NS0123);云南省中青年学术和技术带头人后备人才资助项目(编号:2017HB045)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20190527.1539.008.html>

(2019-05-29)

determine the expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) mRNA and its downstream monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) mRNA in renal tissue, and the protein expression of inflammatory factors, NF- κ B and MCP-1, was measured by Western blot.

Results: ①The levels of FBG and 24-hour urine protein in the low-dose vitamin D group were significantly lower than those in the peanut oil group [18.20 (16.25, 21.25), 32.24 (26.09, 37.68) vs. 23.55 (22.75, 24.60), 72.52 (50.38, 84.93), $P < 0.05$]. ②In the normal control group, HE staining showed that the glomerular morphology was intact, the mesangial area had no obvious hyperplasia, and the capillary lumen and loops were both regularly shaped; in the peanut oil group, the glomerular volume was reduced, the mesangial area significantly broadened, the glomerular mesangial cells proliferated, and capillary wall became thickened as well. The irbesartan group showed less hyperplasia compared with the peanut oil group. The high-, medium-, and low-dose vitamin D groups all had a broadened glomerular mesangial area, but the low-dose group exhibited the lowest degree of broadening. ③The mRNA levels of NF- κ B and MCP-1 in the low-dose vitamin D group were significantly lower than those in the normal control group and the peanut oil group (1.72 ± 0.002 , 0.67 ± 0.01 vs. 3.57 ± 0.40 , 3.57 ± 0.37 , all $P < 0.05$). However, there was no significant difference between the irbesartan group and the low-dose vitamin D group. ④There were no significant differences between these groups regarding the expression of NF- κ B protein. The low-dose vitamin D group had a significant reduction in the expression of MCP-1 protein compared with the peanut oil group and the medium-dose vitamin D group (0.47 ± 0.17 vs. 0.90 ± 0.30 , 1.22 ± 0.18 , 0.93 ± 0.43 , all $P < 0.05$).

Conclusion: ①Vitamin D can effectively alleviate renal injury in diabetic nephropathy by down-regulation of the NF- κ B inflammatory signaling pathway. ②As indicated in the study, $0.03 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ in the low-dose vitamin D group is the optimal concentration for renal protection in diabetic nephropathy.

[Key words] active vitamin D₃; diabetic nephropathy; nuclear factor- κ B; monocyte chemoattractant protein-1; signaling pathway

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 微血管并发症之一, 在糖尿病人群中的发生率日益增长, 已成为导致终末期肾病的首要原因。DN 的发病机制是多方面且复杂的。经典的肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin systems, RAS) 的激活、炎性因子的释放均为加速肾脏损伤起到推波助澜的作用。有研究表明, 血清中 1,25-二羟维生素 D₃ 的水平与炎症疾病的发生发展存在着一定的相关性^[1], 1,25-二羟维生素 D₃ 对肾脏具有明确的保护作用, 提高 1,25-二羟维生素 D₃ 水平可减少炎性因子的表达, 改善 DN 的进展^[2]。研究发现, 1,25-二羟维生素 D₃ 抑制炎症细胞因子机制可能与 NF- κ B 信号通路有关, NF- κ B 主要参与机体的防御反应、组织损伤和应激等过程的信息传递^[3]。本研究通过建立 2 型糖尿病肾病大鼠模型并观察不同浓度的维生素 D 对 2 型糖尿病肾病大鼠肾脏中 NF- κ B 信号通路的影响, 进一步探讨活性维生素 D₃ 改善糖尿病肾病肾脏病变的保护机制, 为 DN 的早期干预与靶向治疗提供新的证据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 6 周龄 SD 大鼠 70 只, 体质量 160~220 g,

由昆明医科大学实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK (滇)2015-0002。

1.1.2 主要试剂 链脲佐菌素 (美国 Sigma 公司), 骨化三醇胶丸 (上海罗氏制药公司)、厄贝沙坦片 (赛诺菲公司), 尿蛋白测定试剂盒、总 RNA 提取试剂盒 (北京 TIANGEN 生物科技有限公司), 蛋白提取试剂盒 (北京 Solarbio 公司), 核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 抗体 (美国 CST 公司), 单核细胞趋化因子 (MCP-1) 抗体 (美国 Abcam 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组、模型建立 实验分组、模型建立如图 1 所示。

1.2.2 喂养方式及标本采集 维生素 D 低、中、高组分别以 0.03、0.06、0.12 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 骨化三醇 (溶于花生油) 灌胃 6 周, 花生油组按体质量给予花生油灌胃, 厄贝沙坦组按 50 mg/(kg·d) 灌胃, 此过程中花生油组因高血糖死亡 2 只、厄贝沙坦组因高血糖和感染各死亡 1 只, 维生素 D 低剂量组因低血糖死亡 2 只, 维生素 D 中剂量组、维生素 D 高剂量组因感染各死亡 2 只, 最终模型组为 40 只, 各实验组均为 8 只。6 周实验结束时收集尿液后处死大鼠, 分离血清测定相关生化指标, 留取肾脏组织保存备用。

1.2.3 相关指标测定 称体质量, 收集 24 h 尿液, 记 24 h 尿量, 按照尿蛋白试剂盒采用全波长酶标仪 (molecular devices) 测定尿蛋白; 空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 采用罗氏血糖仪测定。

1.2.4 肾脏组织病理学观察 将固定于 10% 多聚甲醛的肾脏组织, 每组取 4 个肾脏样本, 经过梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡包埋, 制成 3 μm 石蜡切片, 行 HE 染色。

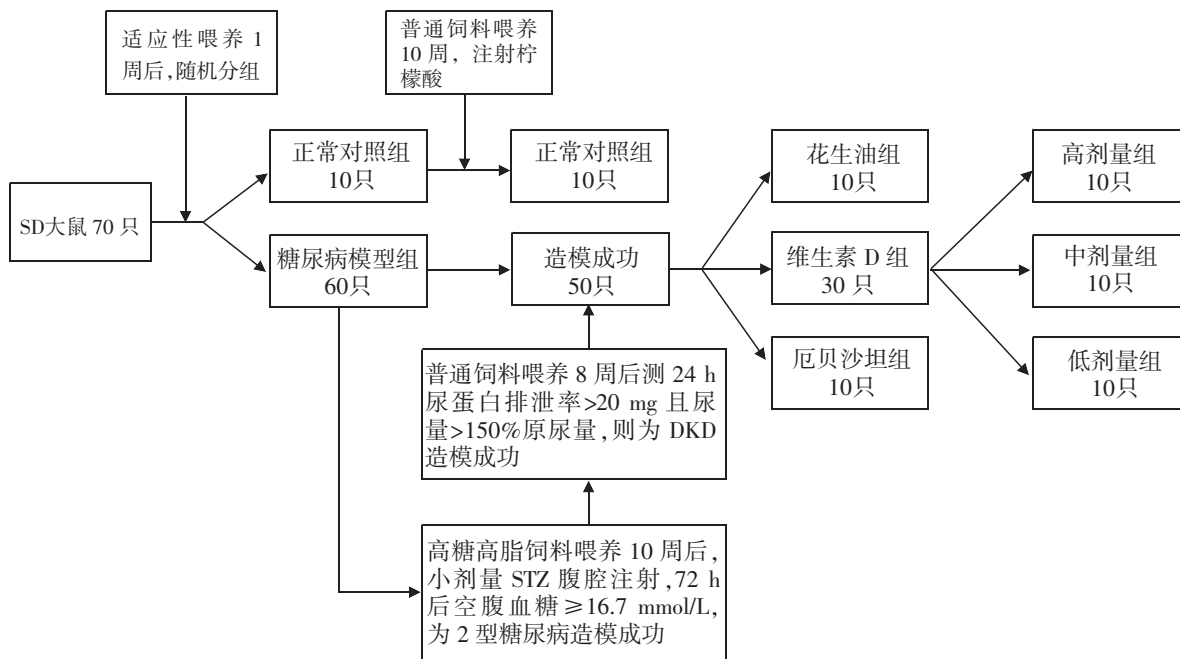


图 1 实验大鼠分组及 DKD 模型建立

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测肾脏组织中 NF- κ B、MCP-1 的 mRNA 表达 用 Trizol-A+Reagent 提取肾脏组织中的总 RNA,测定总 RNA 的浓度,检测 RNA 完整性,按照试剂盒进行逆转录,所得 cDNA 用于做实时荧光定量 PCR。参考文献设计引物:

β -actin:F:5'-TGGGTATGGAATCCTGTGGCA-3',
R:5'-TGTTGGCATAGAGGTCTTTACGG-3';
NF- κ B:F:5'-TCATGCCCAACTTCTCCGAC-3',
R:5'-ATGCAATCCACCGTAAGCA-3';
MCP-1:F:5'-GGGCCTGTTGTCACAGTTG-3',
R:5'-TTCTCCAGCCGACTCATTTGG-3'。

1.2.6 Western blot 检测肾脏组织 NF- κ B、MCP-1 的蛋白表达 超声破碎处理组织样本,用 RIPA 蛋白裂解液冰浴裂解破碎组织,离心后提取上清,用优化的 BCA 法测定蛋白浓度,通过电泳、转膜、抗体孵育(一抗、二抗 Goat-anti-rabbit HRP, 1:1 000)、化学发光底物曝光检测蛋白,Image Pro-plus 扫描灰度值进行蛋白定量分析。

1.3 统计学处理

所有资料采用 SPSS 23.0 软件包进行统计学分析,实验结果以数据和图表表示。依据资料的性质,药物治疗前后比较采用配对 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析,首先进行正态性检验及方差齐性检验,符合正态分布的计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),若 $P < 0.05$ 再进一步两两比较,采取 LSD- t 法;不符合正态分布计量资料采用秩和(Kruskal-Wallis)检验,计量资料采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况及生化指标比较

实验动物饲养过程中,正常组大鼠体重明显增长,毛发柔顺且有光泽,食欲及精神状态良好;花生油组体重质量下降,毛发暗黄,反应迟钝,食欲及精神差;厄贝沙坦组/维生素 D 组情况较花生油组稍有改善。

2.1.1 DN 模型组药物干预前生化指标比较 花生油组,厄贝沙坦组,维生素 D 低剂量组/维生素 D 中剂量组/维生素 D 高剂量组间血糖、体质量、24 h 尿蛋白比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。具体见表 1。

2.1.2 DN 模型组药物干预后生化指标分析 花生油组与维生素 D 低剂量组相比,血糖、体质量、24 h 尿蛋白均明显下降($P < 0.05$);厄贝沙坦组/维生素 D 低剂量组 24 h 尿蛋白较维生素 D 高剂量组明显下降($P < 0.05$);厄贝沙坦组与维生素 D 低剂量组比较,体质量、血糖、24 h 尿蛋白均无统计学差异($P > 0.05$)。具体见表 1。

2.1.3 DN 模型组药物干预前后生化指标比较 花生油组、厄贝沙坦组干预前后血糖无明显变化($P > 0.05$),维生素 D 各浓度干预治疗后血糖均较干预前明显下降($P < 0.05$);花生油组/维生素 D 高剂量组 24 h 尿蛋白定量均较干预前明显升高($P < 0.05$),而厄贝沙坦组/维生素 D 低剂量组 24 h 尿蛋白定量较干预前无统计学意义($P > 0.05$)。具体见表 1。

2.2 肾脏组织病理学观察

正常组大鼠肾小球形态完整,系膜区无明显增生,毛细血管腔规则,毛细血管祥形态规则;花生油组大鼠肾小球体

表 1 DKD 模型组干预前、干预后及同组干预前后生化指标比较

组别	时间	血糖 (mmol/L)	体质量 (g)	24 h 尿蛋白 (mg/L)
花生油组	干预前	22.55 (20.25, 24.53)	228.90 (210.95, 279.85)	34.65 (24.76, 41.83)
	干预后	23.55 (22.75, 24.60)	269.60 (215.20, 294.45)	72.52 (50.38, 84.93) ^e
厄贝沙坦组	干预前	25.40 (23.15, 26.50)	232.65 (218.75, 243.20)	52.73 (35.05, 61.72)
	干预后	23.90 (19.15, 27.15)	235.80 (229.95, 244.50)	39.80 (32.30, 50.04) ^d
维生素 D 低剂量组	干预前	28.65 (26.75, 31.55)	238.00 (200.52, 243.15)	42.19 (23.24, 58.13)
	干预后	18.20 (16.25, 21.25) ^{bc}	228.60 (209.95, 234.65) ^b	32.24 (26.09, 37.68) ^{bd}
维生素 D 中剂量组	干预前	24.45 (22.28, 27.85)	217.10 (238.65, 269.10)	45.72 (30.16, 58.22)
	干预后	19.80 (18.95, 25.85) ^e	202.50 (170.85, 244.45) ^e	43.97 (37.68, 70.40)
维生素 D 高剂量组	干预前	25.85 (24.33, 28.40)	237.85 (231.55, 247.98)	49.50 (30.68, 6.09)
	干预后	20.05 (16.30, 21.10) ^e	238.30 (186.00, 253.10)	78.83 (73.17, 92.96) ^e
干预前 <i>H</i> 值		5.084	1.107	5.633
<i>P</i> 值		0.245	0.893	0.228
干预后 <i>H</i> 值		26.445	24.891	35.246
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000
干预前后 <i>t</i> 1 值		1.478	-0.476	-4.108
<i>P</i> 值		0.183	0.648	0.001
<i>t</i> 2 值		-0.883	-0.693	0.654
<i>P</i> 值		0.407	0.510	0.522
<i>t</i> 3 值		-3.372	-0.647	1.445
<i>P</i> 值		0.012	0.538	0.168
<i>t</i> 4 值		-2.459	-2.414	-0.504
<i>P</i> 值		0.044	0.046	0.621
<i>t</i> 5 值		-2.677	-0.647	-4.295
<i>P</i> 值		0.032	0.538	0.001

注:干预后组间相比,b:与花生油组相比, $P<0.05$;d:与维生素 D 高剂量组相比, $P<0.05$;e:同组干预前后比较, $P<0.05$;t1 值为花生油组干预前后比较 *t* 值;t2 值为厄贝沙坦组干预前后比较 *t* 值;t3 值为维生素 D 低组干预前后比较 *t* 值;t4 值为维生素 D 中组干预前后比较 *t* 值;t5 值为维生素 D 高组干预前后比较 *t* 值

积缩小,系膜区明显增宽,肾小球系膜细胞增生,毛细血管壁增厚;厄贝沙坦组大鼠肾小球体积增大,系膜区增宽程度较花生油组减轻;维生素 D 低剂量组与花生油组相比,肾小球形态有明显改善,系膜区增宽有所减轻,毛细血管壁增厚不明显(图 2)。

2.3 实时荧光定量 PCR 检测 NF- κ B、MCP-1 mRNA

与正常组相比,花生油组、厄贝沙坦组、维生素 D 低剂量组、维生素 D 中剂量组、维生素 D 高剂量组 NF- κ B mRNA 表达量均明显升高($P<0.05$);与花生油组相比,厄贝沙坦组、维生素 D 低剂量组、维生素 D 中剂量组、维生素 D 高剂量组 NF- κ B mRNA 表达量明显下降($P<0.05$);与维生素 D 中剂量组相比,维生素 D 低剂量组明显下降($P<0.05$);厄贝沙坦组与维生素 D 低剂量组、维生素 D 低剂量组与高剂量组比较无统计学差异。

与正常组相比,花生油组、维生素 D 中剂量组、维生素 D 高剂量组 MCP-1 mRNA 表达量明显升高($P<0.05$);与花生油组相比,厄贝沙坦组、维生素 D 低剂量组、维生素 D 中剂量组、维生素 D 高剂量组 MCP-1 mRNA 表达量明显下降

($P<0.05$),以厄贝沙坦组及维生素 D 低剂量组下降最为明显,但 2 组间比较无统计学差异;与维生素 D 中剂量组相比,厄贝沙坦组、维生素 D 低剂量组、维生素 D 高剂量组 MCP-1 mRNA 表达下降($P<0.05$);与维生素 D 高剂量组相比,厄贝沙坦组与维生素 D 低剂量组 MCP-1 mRNA 表达明显下降($P<0.05$)。具体见表 2。

2.4 Western blot 检测 NF- κ B、MCP-1 蛋白

正常对照组、花生油组、厄贝沙坦组、维生素 D 低剂量组、维生素 D 中剂量组、维生素 D 高剂量组间比较,NF- κ B 蛋白的表达量变化不明显,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

与正常组相比,维生素 D 低剂量组 MCP-1 蛋白表达量明显下降($P<0.05$);与花生油组相比,维生素 D 低剂量组 MCP-1 蛋白表达量明显下降($P<0.05$);与维生素 D 中剂量组相比,厄贝沙坦组、维生素 D 低剂量组 MCP-1 蛋白水平下降($P<0.05$);与维生素 D 高剂量组相比,维生素 D 低剂量组 MCP-1 蛋白水平明显下降($P<0.05$)。但维生素 D 低剂量组与厄贝沙坦组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。具体见表 3、图 3。

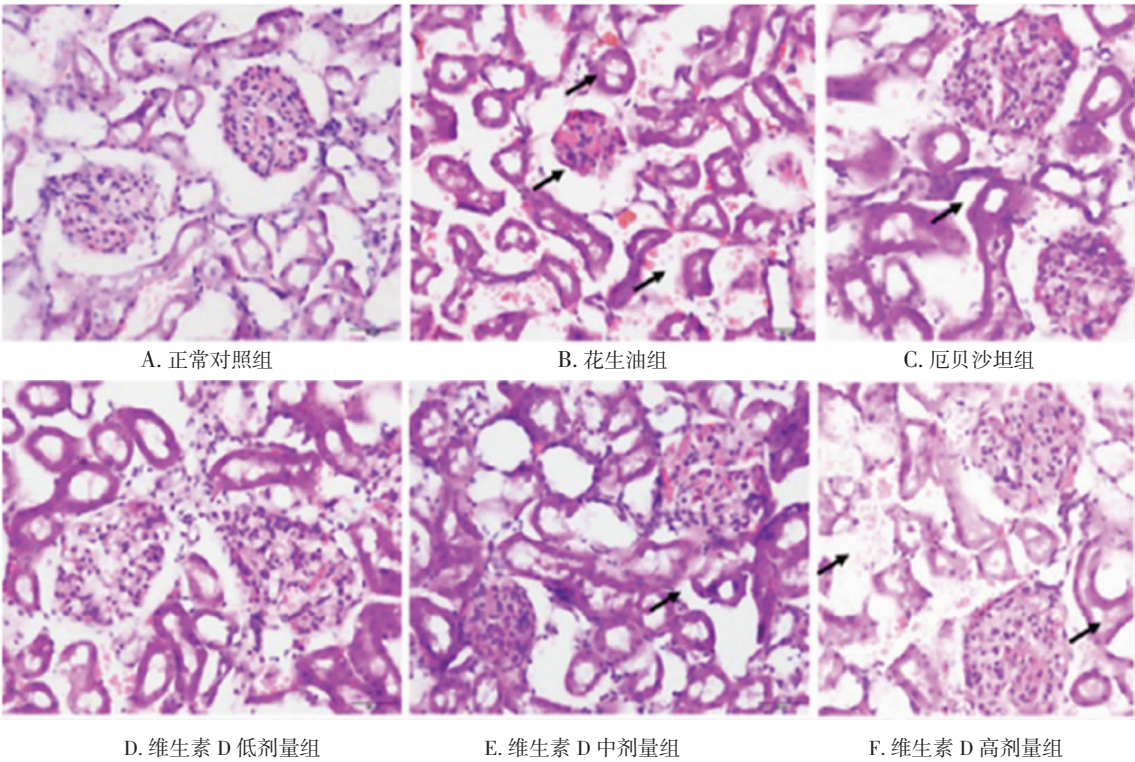


图 2 各组大鼠肾脏形态学改变 (20 ×)

表 2 6 组大鼠肾脏组织中 NF-κB、MCP-1 的 mRNA 表达

mRNA 表达	正常组	花生油组	厄贝沙坦组	维生素 D 低剂量组	维生素 D 中剂量组	维生素 D 高剂量组	F 值	P 值
NF-κB	1.00 ± 0.00	3.57 ± 0.40 ^a	2.03 ± 0.10 ^{ab}	1.72 ± 0.002 ^{abc}	2.37 ± 0.12 ^{ab}	1.53 ± 0.17 ^{ab}	104.827	0.000
MCP-1	1.00 ± 0.00	3.57 ± 0.37 ^a	0.86 ± 0.02 ^{bd}	0.67 ± 0.01 ^{bcd}	2.39 ± 0.04 ^{ab}	1.91 ± 0.27 ^{abc}	64.195	0.000

注: a, 与正常对照组相比, $P < 0.05$; b, 与花生油组相比, $P < 0.05$; c, 与维生素 D 中剂量组相比, $P < 0.05$; d, 与维生素 D 高剂量组相比, $P < 0.05$

表 3 6 组大鼠肾脏组织中 NF-κB、MCP-1 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

蛋白表达	正常对照组	花生油组	厄贝沙坦组	维生素 D 低剂量组	维生素 D 中剂量组	维生素 D 高剂量组	F 值	P 值
NF-κB/β-actin	0.33 ± 0.09	0.46 ± 0.18	0.50 ± 0.32	0.48 ± 0.29	0.50 ± 0.21	0.72 ± 0.43	0.838	0.540
MCP-1/β-actin	0.95 ± 0.32	0.91 ± 0.30	0.56 ± 0.11 ^c	0.47 ± 0.17 ^{abcd}	1.22 ± 0.18	0.93 ± 0.43	3.300	0.027

注: a, 与正常对照组相比, $P < 0.05$; b, 与花生油组相比, $P < 0.05$; c, 与维生素 D 中剂量组相比, $P < 0.05$; d, 与维生素 D 高剂量组相比, $P < 0.05$

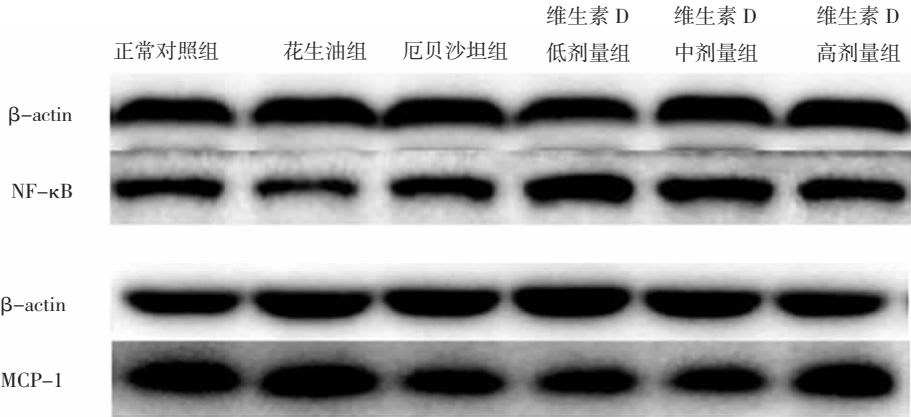


图 3 Western blot 检测肾脏组织中 NF-κB、MCP-1 的蛋白表达

3 讨 论

T2DM 导致的糖尿病肾病的肾损伤机制存在多样性,迄今尚未完全清楚,目前认为主要与代谢紊乱、肾素-血管紧张素系统的激活、炎症反应、氧化应激等因素相关^[4]。其中,炎症对糖尿病肾病的肾损伤有促进作用,炎症信号通路的激活促进了肾脏肾小球硬化及肾小管间质纤维化的形成^[5],加速了糖尿病肾病的肾损伤。

大量研究表明,维生素 D 缺乏与多种疾病的发生有关^[6],尤其在肾脏疾病中,且以糖尿病肾病最具代表性^[7]。而且,随着病程延长,病情加重,维生素 D 的水平越低。活性维生素 D₃ 可抑制细胞炎性因子的合成及表达,促进细胞因子的凋亡来抑制炎症反应,改善系膜细胞增生沉积,防止肾成纤维细胞的增殖分化,减轻肾间质纤维化,缓解肾小球硬化,从而改善肾脏功能^[8]。

研究证实,厄贝沙坦治疗糖尿病肾病疗效显著^[9-10]。厄贝沙坦是血管紧张素受体拮抗剂,主要通过降低肾小球膜通透性、抑制基质蛋白扩张,从而达到降低尿蛋白的目的。其次,厄贝沙坦还可通过降低血压、减少周围血管阻力、减轻肾小球内压、改善肾小球高滤状态、减轻肾动脉硬化、减少尿蛋白排泄,从而保护肾脏功能。也有实验证实,厄贝沙坦可抑制高糖环境 NF- κ B 的活化及炎症因子 MCP-1 的表达,抑制细胞凋亡^[11]。因此本实验将厄贝沙坦作为阳性对照药物。

NF- κ B 是一种与炎症介质形成、细胞增生、细胞外基质交联和细胞凋亡有关的转录因子^[12],主要参与调节细胞生长、细胞凋亡及炎性细胞因子的表达^[13]。在糖尿病患者中,NF- κ B 的激活能够促进趋化因子 MCP-1 的活化^[14],使其表达量增加,促进单核巨噬细胞对肾组织的浸润,导致细胞外基质增加,加重肾脏损伤。Donadalli 等^[15]的研究显示,在肾小球肾炎中,随着 NF- κ B 活性的增强,MCP-1 的表达量明显增高。李竞等^[16]发现,在糖尿病大鼠模型组中,NF- κ B 的表达与 MCP-1 呈正相关关系,使用 NF-

κ B 的特异性抑制剂干预糖尿病大鼠后,其肾脏组织中 NF- κ B 的活性明显降低,MCP-1 的表达也明显下降,肾脏的病变得明显改善,故抑制 NF- κ B 的活化可减少 MCP-1 的表达,从而缓解 DN 的发展,保护肾脏。本研究通过观察不同浓度的维生素 D 对糖尿病肾病大鼠肾脏中 NF- κ B 信号通路的影响,更加清晰地阐述活性维生素 D₃ 改善糖尿病肾病肾脏病变的保护机制且寻找最佳治疗浓度。

本研究发现,花生油组肾脏组织系膜区明显增宽,肾小球系膜细胞增生,毛细血管壁增厚,同时 NF- κ B 及下游 MCP-1 的 mRNA 水平明显增高,而活性维生素 D₃ 治疗后肾脏组织病理学改变得到改善,并且 NF- κ B、MCP-1 的 mRNA 及 MCP-1 蛋白表达下降,以维生素 D 低剂量组效果最佳,提示维生素 D 可通过抑制 NF- κ B 信号通路的激活来减少炎症因子释放,减轻炎症因子对肾脏的炎性损伤。Zhang 等^[17]研究发现,活性维生素 D₃ 能促进 I κ B2 蛋白的表达而抑制 P65 向细胞核转移,减少 NF- κ B 的激活,抑制系膜细胞中 MCP-1 的表达,减少炎症趋化因子和细胞因子的释放,减少促氧化反应物质的生成,从而保护肾功能。NF- κ B 作为主要的炎症介质,参与各种炎症细胞因子、趋化因子的表达,因此下调或阻断其激活可抑制炎症反应,这使 NF- κ B 成为又一潜在的抗炎治疗靶点。其次,本研究中与花生油组相比,维生素 D 组血糖、24 h 尿蛋白下降明显,说明活性维生素 D₃ 通过下调 NF- κ B 信号通路,减少炎症因子 MCP-1 的释放,从而改善血糖,减少尿蛋白排泄,保护肾脏。有研究证实,维生素 D 促进胰岛素的合成和分泌^[18]。维生素 D 作用于胰岛 β 细胞,促进前胰岛素的分裂,从而增加胰岛素的合成,提高胰岛素的敏感性,使得血糖也相应降低^[19]。Krul-Poel 等^[20]荟萃分析发现,血糖控制欠佳的 T2DM 患者予维生素 D 补充治疗可以明显降低空腹血糖水平,改善血糖控制。大量动物实验证实了维生素 D 能够抑制肾脏足细胞的损伤,降低尿蛋白排泄,保护肾脏^[21-22]。

综上所述,低剂量维生素 D 对糖尿病肾病大鼠肾脏具有保护作用,其机制可能是低剂量的维生素

D下调了 NF- κ B 炎症信号通路,减少趋化因子MCP-1 的表达,改善肾脏损伤。

参 考 文 献

- [1] Van Halteren AG, Tysma OM, van Etten E, et al. $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D₃ or analogue treated dendritic cells modulate human autoreactive T cells via the selective induction of apoptosis[J]. J Autoimmun, 2004, 23(3): 233–239.
- [2] 朱哈玉, 张冬, 耿文佳, 等. $1, 25$ -二羟维生素 D₃ 治疗对早期糖尿病肾病相关炎症因子的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2012, 26(1): 12–14.
- [3] Moreira TS, Hamadeh MJ. The role of vitamin D deficiency in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus[J]. ESPEN, 2010, 5: e155.
- [4] Zhang X, Song Z, Guo Y, et al. The novel role of TRPC6 in vitamin D ameliorating podocyte injury in STZ-induced diabetic rats[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 399(1–2): 155–165.
- [5] Tian Y, Lv G, Yang Y, et al. Effects of vitamin D on renal fibrosis in diabetic nephropathy model rats[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(6): 3028–3037.
- [6] Zehnder D, Landray MJ, Wheeler DC, et al. Cross-sectional analysis of abnormalities of mineral homeostasis, vitamin D and parathyroid hormone in a cohort of pre-dialysis patients. The chronic renal impairment in Birmingham (CRIB) study[J]. Nephron Clin Pract, 2007, 107(3): c109–116.
- [7] Doorenbos CR, van den Bom J, Navis G, et al. Possible renoprotection by vitamin D in chronic renal disease: beyond mineral metabolism[J]. Nat Rev Nephrol, 2009, 5(12): 691–700.
- [8] Panichi V, Migliori M, Taccola D, et al. Effects of $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in experimental mesangial proliferative nephritis in rats[J]. Kidney Int, 2001, 60(1): 87–95.
- [9] Chen XW, Du XY, Wang YX, et al. Irbesartan ameliorates diabetic nephropathy by suppressing the RANKL–RANK–NF- κ B pathway in type 2 diabetic *db/db* mice[J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016(108): 1405924.
- [10] Wang C, Min C, Rong X, et al. Irbesartan can improve blood lipid and the kidney function of diabetic nephropathy[J]. Discov Med, 2015, 20(108): 67–77.
- [11] 雷梅先, 王云开, 王琦, 等. 厄贝沙坦通过核转录因子 κ B 信号通路减轻高糖诱导的 H9C2 细胞炎症反应及凋亡的研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2017, 25(7): 630–634.
- [12] Wilmer WA, Dixon CL, Hebert C. Chronic exposure of human mesangial cells to high glucose environments activates the p38 MAPK pathway[J]. Kidney Int, 2001, 60(3): 858–871.
- [13] Xu L, Zhang P, Guan H, et al. Vitamin D and its receptor regulate lipopolysaccharide-induced transforming growth factor β , angiotensinogen expression and podocytes apoptosis through the nuclear factor- κ B pathway[J]. J Diabetes Investig, 2016, 7(5): 680–688.
- [14] Yi B, Hu X, Zhang H, et al. Nuclear NF- κ B p65 in peripheral blood mononuclear cells correlates with urinary MCP-1, RANTES and the severity of type 2 diabetic nephropathy[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99633.
- [15] Donadalli R, Abbate M, Zanchi C, et al. Protein traffic activates NF- κ B genes signaling and promotes MCP-1-dependent interstitial inflammation[J]. Am J Kidney Dis, 2000, 36(6): 1226–1241.
- [16] 李竞, 包艳, 叶迎春, 等. NF- κ B 对糖尿病大鼠肾组织单核细胞趋化蛋白-1 与细胞间黏附分子-1 表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(5): 627–629.
- [17] Zhang Z, Yuan W, Sun L, et al. $1, 25$ -dihydroxyvitamin D₃ targeting of NF- κ B suppresses high glucose-induced MCP-1 expression in mesangial cells[J]. Kidney Int, 2007, 72(2): 193–201.
- [18] Li YC. Vitamin D receptor signaling in renal and cardiovascular protection[J]. Semin Nephrol, 2013, 33(5): 433–447.
- [19] Chiu KC, Chu A, Go VL, et al. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction[J]. Am J Clin Nutr, 2004, 79(5): 820–825.
- [20] Krul-Poel YH, Ter Wee MM, Lips P, et al. Management of endocrine disease: the effect of vitamin D supplementation on glycaemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis[J]. Eur J Endocrinol, 2017, 176(1): R1–14.
- [21] Sonneveld R, Ferre S, Hoenderop JG, et al. Vitamin D down-regulates TRPC6 expression in podocyte injury and proteinuric glomerular disease[J]. Am J Pathol, 2013, 182: 1196–1204.
- [22] Wang Y, Deb DK, Zhang Z, et al. Vitamin D receptor signaling in podocytes protects against diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(12): 1977–1986.

(责任编辑: 唐秋姗)