

糖尿病肾病 ETF β 表达变化与脂毒性关系研究

王 华^{1,2}, 张浩军², 赵婷婷², 严美花², 董 晔², 孙斯凡^{1,2}, 张并璇², 李 平^{1,2}

(1. 中国医学科学院 & 北京协和医学院研究生院, 北京 100730; 2. 中日友好医院临床医学研究所, 北京 100029)

【摘要】 目的 通过检测 ETF β 在糖尿病肾病中的改变, 探讨其与脂毒性的关系。**方法** 体内实验采用腹腔注射链脲佐菌素合并单侧肾切除建立糖尿病肾病模型, 并评价肾小管损伤情况, 检测 ETF β 在肾皮质中的表达变化。体外建立脂肪酸诱导肾小管细胞 NRK 52E 凋亡模型, 构建 ETF β 重组质粒, 并将其转染至 NRK 52E 细胞, 观察 ETF β 过表达对脂肪酸诱导细胞凋亡的作用。**结果** 链脲佐菌素合并单侧肾切除诱导的糖尿病肾病大鼠模型中, 肾小管明显损伤, ETF β mRNA 和蛋白表达均下降。脂肪酸可诱导 NRK 52E 细胞凋亡, 过表达 ETF β 可减少凋亡。**结论** 糖尿病肾病模型中 ETF β 表达下降, 过表达 ETF β 可降低脂肪酸诱导的肾小管细胞凋亡。

【关键词】 ETF β ; 糖尿病肾病; 脂肪酸; 凋亡

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 05-0005-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.002

Study on the expression of ETF β in diabetic nephropathy and its relationship with lipotoxicity

WANG Hua^{1,2}, ZHANG Hao-jun², ZHAO Ting-ting², YAN Meihua², DONG Xi², SUN Si-fan^{1,2}, ZHANG Bing-xuan², LI Ping^{1,2}

(1. Graduate School of Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China;

2. Institute of Clinical Medical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

【Abstract】 Objective To detect the expression change of ETF β in diabetic nephropathy rats and study the role of ETF β in fatty acid-induced apoptosis in renal tubules. **Methods** Diabetic nephropathy model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin and unilateral nephrectomy. In vivo ETF β expression was detected in renal cortex, as well as tubular injury evaluated. In vitro fatty acid-induced apoptosis in renal tubular cells NRK 52E model was established and ETF β recombinant plasmid was constructed to be transfected into NRK 52E cells and furtherly to observe the effect of ETF β over-expression on the fatty acid-induced apoptosis. **Results** In the rats model of diabetic nephropathy induced by streptozotocin injection and unilateral nephrectomy, ETF β mRNA and protein expression were decreased as obvious tubular damage occurred. Fatty acids could induce apoptosis in NRK 52E, and ETF β over-expression reduced the apoptosis. **Conclusion** The expression of ETF β is decreased in diabetic nephropathy model, and ETF β over-expression can reduce apoptosis induced by fatty acid in renal tubular cells.

【Key words】 ETF β ; Diabetic nephropathy; Fatty acid; Apoptosis

糖尿病肾病发病机制复杂, 具体机制尚未阐明清楚。本课题组前期蛋白组学发现电子转运黄素

蛋白 β 亚单位 (electron transfer flavoprotein β subunit, ETF β) 在 2 型自发性糖尿病肾病 OLETF 大

[基金项目] 国家自然科学基金(81302942); 国际科技合作项目(2011DFA31860); 国家自然科学基金(81173422)。

[作者简介] 王华(1982-), 女, 博士生, 研究方向: 中药防治糖尿病肾病。

[通讯作者] 李平(1956-), 女, 研究员, 研究方向: 中药防治糖尿病肾病。E-mail: lp8675@163.com。

鼠模型中发生了氨基酸突变(未发表),但 *ETFβ* 是否参与糖尿病肾病发生发展目前未见报道。*ETF* 由 α 和 β 亚单位组成,是一种含有黄素核苷酸辅基的电子载体蛋白,存在于生物体细胞线粒体内,接受上游脂肪酸氧化脱氢反应产生的电子,然后在辅基 FAD 的帮助下传递给电子转运黄素蛋白泛醌氧化还原酶 (electron transfer flavoprotein ubiquinone oxidoreductase, *ETF:QO*),通过辅酶 Q10 (Coenzyme Q10, CoQ10) 而进入呼吸链,最终与氧结合生成水^[1-2]。*ETF* 作为脂肪酸氧化第一步反应的电子接受体,其在糖尿病肾病脂代谢紊乱中是否发挥重要作用尚无明确报道。本研究旨在通过检测 *ETFβ* 在糖尿病肾病中的改变,探讨其可能的作用机制,为进一步揭示糖尿病肾病脂毒性的机制及提供药物作用的新靶点打下基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠 16 只,8 周龄,体重 160 ~ 200 g,分为假手术组 (Sham) 和糖尿病肾病模型组 (DN),每组 8 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2009-0007】,饲养于中日友好医院临床研究所 SPF 级动物室【SYXK(京)2010-0011】。

1.2 试剂

链脲佐菌素 (美国 Sigma 公司)。NRK 52E 细胞、绿色荧光蛋白 (GFP) 为中日友好医院临床医学研究所药理室保存;真核表达载体 pcDNA3.1/V₅-His、新型 pUC-T 快速克隆试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司);大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞 (北京鼎国昌盛生物技术有限公司);高保真 PCR 扩增试剂盒 (德国 Roche 公司);T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 Eco R V、Pst I、Xba I (美国 New England Biolabs 公司);凝胶回收纯化试剂盒、质粒中提试剂盒 (德国 QIAGEN 公司)。抗 V5 单克隆抗体 (美国 Invitrogen 公司),抗 *ETFβ* 多克隆抗体 (中国 Proteintech 公司)。lip2000 (美国 Invitrogen 公司),棕榈酸钠 (palmitate, PA)、无脂肪酸-BSA (美国 sigma)。TUNEL 检测试剂盒 (德国 Roche 公司)。

1.3 糖尿病肾病大鼠模型的建立

通过腹腔注射链脲佐菌素合并单侧肾切除建立糖尿病肾病大鼠模型^[3-4]。大鼠购入后顺应性喂养一周,测定血糖和尿蛋白等基础状态,将血糖偏高的 1 只大鼠剔除,其余动物按体重随机分为假手术组和模型组。腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉大鼠,

右侧背部术前备皮,常规消毒,背部切口 1 cm 左右以充分暴露右肾,假手术组剥离肾脏包膜,缝合切口。模型组大鼠结扎右肾门血管,切除右肾,缝合伤口。术后 1 周,手术组以 40 mg/kg 的剂量腹腔注射 1% 链脲佐菌素,假手术组注射相同剂量的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。3 d 后大鼠禁食不禁水 12 h,测空腹血糖,高于 16.7 mmol/L 作为糖尿病模型成功建立的标准,记为“0 周”时间点。连续观察 20 周,检测到大量蛋白尿,视为糖尿病肾病模型建立。

1.4 *ETFβ* 重组质粒的构建和转染

以大鼠 *ETFβ* mRNA 序列设计引物以扩增出该基因的全长,分别在上、下游引物前加上 EcoR V、Xba I 酶切位点,应用高保真酶和 RT-PCR 方法扩增出编码 *ETFβ* 的 cDNA,将 PCR 产物回收纯化并验证其分子量。将 PCR 产物克隆至 pUC-T 载体,转化到感受态细胞,筛选阳性菌落并扩增,进行质粒抽提,经酶切鉴定并进行测序证实为 *ETFβ* 基因序列后,*ETFβ*/pUC-T 和 pcDNA3.1/V₅-His 载体分别用 EcoR V 和 Xba I 进行双酶切,用 T4 DNA 连接酶连接双酶切后的目的片段和载体,构建 *ETFβ*/pcDNA3.1/V₅-His 重组质粒 (简称 *ETFβ* 重组质粒)。将 NRK 52E 细胞接种于 6 孔板,细胞贴壁后采用脂质体 lip2000 转染 *ETFβ* 重组质粒,同时转染 GFP 作为转染效率参照物,转染 48 h 后倒置显微镜下观察转染效率。对照组转染 pcDNA3.1/V₅-His 空载体,转染 *ETFβ* 重组质粒 48 h 后收细胞提取蛋白质,用于检测 V5 标签融合蛋白的表达。以 BSA 为载体溶解 PA,储液浓度为 5 mmol/L。转染 24 h 后,PA 组和重组质粒组加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 PA,对照组加入等体积的 BSA,再过 24 h 后用 TUNEL 试剂盒检测细胞凋亡情况。

1.5 统计学方法

数据用均数 + 标准差表示,两样本均数比较用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 视为有统计学差异。

2 结果

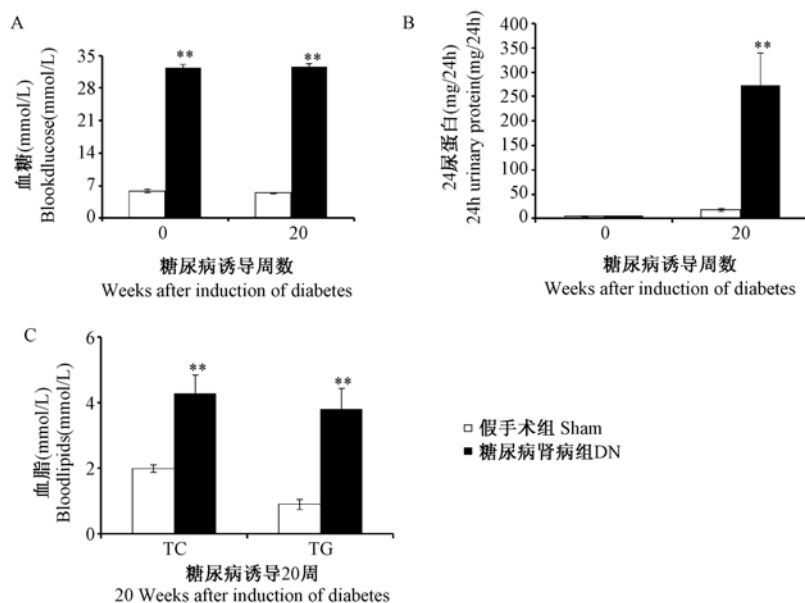
2.1 糖尿病肾病大鼠的脂代谢异常和肾小管损伤评价

腹腔注射链脲佐菌素合并单侧肾切除建立的糖尿病肾病模型组大鼠随着血糖持续性升高,一般情况较差:模型组大鼠出现食量和饮水量增加,毛发散乱、无光泽,尿量增加,活动减少。

在切除单侧肾脏 1 周时,腹腔注射链脲佐菌素 3 d 后,大鼠的血糖明显高于假手术组,且该组大鼠 20 周后仍然维持较高的血糖水平 (图 1A)。在糖尿

病模型建立,即 0 周时,糖尿病肾病组大鼠的尿蛋白很低,与假手术组无差异,但血糖持续升高 20 周后,该组大鼠出现大量尿蛋白,糖尿病肾病模型建立成

功(图 1B)。与此同时,发现血糖升高 20 周后糖尿病肾病大鼠出现血甘油三酯和总胆固醇的明显升高(图 1C)。



注:A:血糖;B:24 h 尿蛋白;C:血脂。与假手术组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 1 两组大鼠的血糖、24 h 蛋白尿和血脂情况

Note: A. blood glucose; B. 24 h urinary protein; C. blood lipids. Compared with the sham group, ** $P < 0.01$.

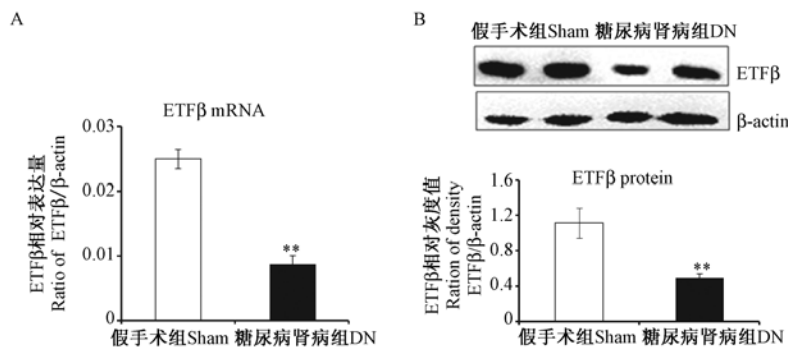
Fig. 1 Comparison of blood glucose, 24 h urinary protein and blood lipids between Sham and DN groups

糖尿病肾病大鼠与假手术组在肾小管 PAS 染色上有明显形态学差异,假手术组肾小管结构正常,排列整齐,间质无炎症和纤维化;DN 组大鼠肾小管上皮细胞出现玻璃滴样变和空泡变性,此外,部分肾小管扩张或萎缩,管腔内可见蛋白样物质或蛋白管型,部分间质可见散在的淋巴细胞和单核细胞浸润及纤维化(彩插 1 图 2A)。半定量^[5]分析结果显示肾小管损

伤指数在两组之间具有统计学差异(彩插 1 图 2B)。

2.2 糖尿病肾病大鼠肾皮质 ETF β 的差异性表达

通过以上方法建立的糖尿病肾病模型,大鼠出现大量蛋白尿时取材,提取肾皮质的 RNA 和蛋白,分别通过 real time PCR 和 western blot 检测发现,糖尿病肾病大鼠肾皮质中的 ETF β 在 mRNA(图 3A)和蛋白水平(图 3B)均出现表达量的下降。



注:A: ETF β mRNA 水平的变化;B: ETF β 蛋白水平的变化。与假手术组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 3 糖尿病肾病大鼠肾皮质 ETF β 的差异性表达

Note: A. the relative expression of ETF β mRNA; B. the relative expression of ETF β protein. Compared with the sham group, ** $P < 0.01$.

Fig. 3 The expression of ETF β in the kidney cortex of diabetic nephropathy rats compared with control rats

2.3 ETF β 重组质粒转染效率的观察和正确表达的鉴定

为观察 ETF β 重组质粒的转染效率,将绿色荧光蛋白 GFP 的质粒以相同条件转染至 NRK 52E 细

胞,荧光显微镜下发现有较高的转染效率(彩插 2 图 4A)。为进一步验证 *ETFβ* 重组质粒的成功构建,转染 48 h 后收集细胞提取蛋白,用 V_5 抗体通过 western blot 检测融合蛋白的表达,空载体组未见目的蛋白表达,*ETFβ* 重组质粒能在 NRK 52E 细胞中正确表达(彩插 2 图 4B)。

2.4 *ETFβ* 过表达对 PA 诱导 NRK 52E 凋亡的影响

0.5 mmol/L PA 刺激 NRK 52E 细胞 24 h 出现明显凋亡。转染 *ETFβ* 重组质粒 24 h 后,再加入 PA,与对照组比较,TUNEL 法检测发现凋亡率明显下降(彩插 2 图 5A)。半定量分析表明 *ETFβ* 过表达能够明显降低 PA 诱导的 NRK 52E 细胞的凋亡(彩插 2 图 5B)。

3 讨论

大剂量注射 STZ(40 mg/kg)可导致胰腺分泌胰岛功能严重受损,出现类似临床糖尿病症状,合并单侧肾切除后可以缩短诱发糖尿病肾病的周期。本研究通过该方法建立的糖尿病肾病模型在观察 20 周时即出现大量蛋白尿,且血糖在整个试验周期内均高于 16.7 mmol/L。此外,在该模型中观察到血甘油三酯和总胆固醇的升高,与文献报道^[6]的第四周即开始出现血脂代谢异常的结果一致。糖尿病脂代谢紊乱在并发症中所起的作用越来越受到重视,2001 年第 61 届美国糖尿病学会年会上,Banting 科学成就奖得主 McGarry 教授指出,脂肪酸代谢障碍是糖尿病及其并发症的原发病理生理改变。其中游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)增高导致的脂毒性既是糖尿病患者发病的可能病因之一,同时也是脂代谢紊乱的特征之一。主链超过 15 个碳的长链脂肪酸有细胞毒性,不同饱和态的脂肪酸毒性强弱、作用途径和方式不同^[7]。PA 是糖尿病和代谢综合征患者血循环中 FFA 的主要存在形式,已被证明与包括细胞凋亡在内的肾小管细胞损伤等有关^[8]。本研究建立的糖尿病肾病模型在第 20 周时观察到肾小管萎缩等严重受损情况,但其发病机制中是否和脂代谢异常有直接关系尚不清楚。

本研究中观察到脂代谢异常和肾小管损伤的同时,检测到大鼠肾皮质中 *ETFβ* 的基因和蛋白表达均明显降低。目前 *ETFβ* 与疾病相关的研究主要集中在脂质沉积性肌病,如编码 *ETF* 的基因 *ETFα* 和/或 *ETFβ* 突变可引起该疾病发生。有研究表明,2 型糖尿病模型 db/db 小鼠的心脏线粒体蛋白组学发现 *ETFα* 表达量增加 5.9 倍,但综合相关蛋白的

表达情况分析,综合来看,随着糖尿病表型的持续长期存在,*ETFα* 将会下调^[9]。但 *ETFβ* 是否参与糖尿病肾病发生发展,其扮演的角色和作用机制目前尚不清楚。在正常培养的肾小管上皮细胞 NRK 52E 培养基中加入 0.5 mmol/L PA,TUNEL 法检测结果显示细胞出现明显凋亡。转染 *ETFβ* 重组质粒后再加入 PA 刺激细胞,发现 *ETFβ* 过表达能够降低 PA 诱导的肾小管上皮细胞的凋亡,综合体内实验结果糖尿病肾病大鼠肾皮质 *ETFβ* 表达的下降来看,*ETFβ* 在脂毒性诱导的细胞凋亡中可能发挥一定的保护作用。

以上体内外实验结果提示 *ETFβ* 在糖尿病肾病大鼠肾小管损伤时表达下降,过表达 *ETFβ* 能够减少饱和脂肪酸 PA 诱导的肾小管上皮细胞的凋亡。该实验发现为糖尿病肾病的机制研究提供部分证据,但 *ETFβ* 的具体作用机制尚需进一步研究,为开发治疗糖尿病肾病的有效药物提供新的方向。

参考文献:

- [1] Rhein V F, Carroll J, He J, et al. Human METTL20 methylates lysine residues adjacent to the recognition loop of the electron transfer flavoprotein in mitochondria [J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(35): 24640–24651.
- [2] Rodrigues J V, Gomes C M. Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide generation by human electron-transfer flavoprotein and pathological variants [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2012, 53(1): 12–19.
- [3] Zhao T, Zhang H, Zhao TT, et al. Intrarenal metabolomics reveals the association of local organic toxins with the progression of diabetic kidney disease [J]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 23(60): 32–43.
- [4] 吴凡,龚超,陈志远,等.肉桂提出物甲基查尔酮对单侧肾切除糖尿病大鼠肾脏损害的保护作用[J].中华实验外科杂志,2009,26(11):1515–1518.
- [5] Meng XM, Huang XR, Xiao J, et al. Diverse roles of TGF-β receptor II in renal fibrosis and inflammation in vivo and in vitro [J]. J Pathol, 2012, 227: 175–188.
- [6] 张丽芬,吕仁和,黄文政.链脲佐菌素糖尿病肾病大鼠模型的建立及稳定性评价[J].中国比较医学杂志,2014,24(4):8–12.
- [7] Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, et al. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acid on β-cell turnover and function [J]. Diabetes, 2001, 50: 69–76.
- [8] Soumura M, Kume S, Isshiki K, et al. Oleate and eicosapentaenoic acid attenuate palmitate-induced inflammation and apoptosis in renal proximal tubular cell [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010; 402: 265–271.
- [9] MF ESSOP, WA CHAN, S HATTINGH. Proteomic analysis of mitochondrial proteins in a mouse model of type 2 diabetes[J]. Cardiovasc J Afr, 2011, 22: 175–178.

[修回日期]2015-03-31