

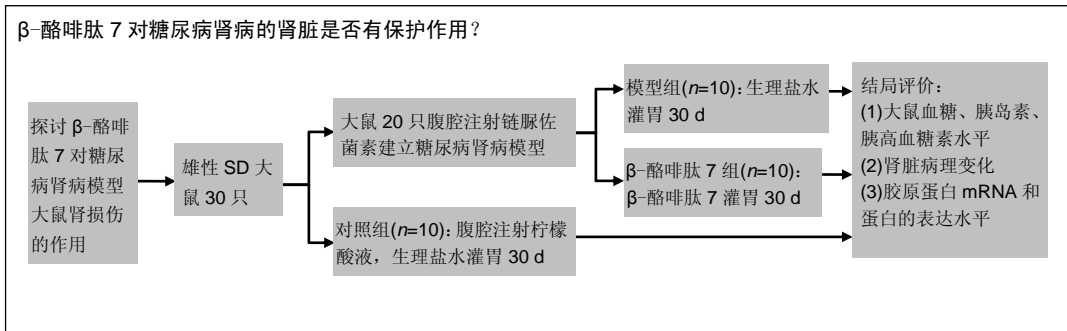
# β-酪啡肽7对链脲佐菌素诱导糖尿病肾病模型大鼠的肾保护

高燕<sup>1</sup>, 袁鲁亮<sup>2</sup>, 张海松<sup>1</sup>(<sup>1</sup>河北大学附属医院肾内科, 河北省保定市 071000; <sup>2</sup>解放军66165部队卫生队, 河北省保定市 071000)

引用本文: 高燕, 袁鲁亮, 张海松. β-酪啡肽7对链脲佐菌素诱导糖尿病肾病模型大鼠的肾保护[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(5): 701-706.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2016.05.016 ORCID: 0000-0002-1700-5567(张海松)

文章快速阅读:



高燕, 女, 1976年生, 河北省保定市人, 汉族, 2004年河北医科大学毕业, 硕士, 副主任医师, 副教授, 主要从事肾小球疾病及肾小管间质肾病方面的研究。

通讯作者: 张海松, 主任医师, 河北大学附属医院肾内科, 河北省保定市 071000

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2016)05-00701-06

稿件接受: 2015-12-04

http://www.crter.org

## 文题释义:

**糖尿病肾病:** 是由多种病因引起以慢性高血糖为特征的代谢紊乱。高血糖是由于胰岛素分泌或作用的缺陷, 或者两者同时存在而引起。除碳水化合物外, 尚有蛋白质、脂肪代谢异常。常见于病史超过10年的患者。约30%的1型糖尿病和20%~50%的2型糖尿病会发生糖尿病肾病。

**链脲佐菌素:** 是一种氨基葡萄糖-亚硝基脲, 是一种DNA烷基化试剂, 能通过葡萄糖转运蛋白2葡萄糖转运蛋白独自进入细胞。对胰腺胰岛胰岛素诱发的β-细胞具毒性。链脲佐菌素对葡萄糖转运蛋白2阳性神经内分泌肿瘤细胞有毒性作用。链脲佐菌素可对一定种属动物的胰岛β细胞有选择性破坏作用, 能诱发许多动物产生糖尿病。

## 摘要

**背景:** 研究发现β-酪啡肽7对糖尿病模型大鼠减轻肾小管上皮细胞的氧化及降血糖的作用, 但关于β-酪啡肽7对糖尿病肾病作用机制的研究比较少。

**目的:** 探讨β-酪啡肽7对糖尿病肾病模型大鼠肾损伤的作用。

**方法:** 将30只大鼠随机以n=10等分为对照组、模型组和β-酪啡肽7组。构建糖尿病模型大鼠20只, 造模成功后模型组和β-酪啡肽7组模型大鼠腹腔注射链脲佐菌素(60 mg/kg), 对照组腹腔注射等量柠檬酸液, β-酪啡肽7组模型大鼠给予β-酪啡肽7灌胃30 d, 模型组和对照组给予等量生理盐水灌胃。

**结果与结论:** ①与对照组相比, 模型组大鼠胰岛素水平降低, 血糖、尿糖、尿蛋白、血清肌酐、血清尿素氮水平以及肾脏中I型胶原蛋白和IV型胶原蛋白的mRNA和蛋白表达水平增加。②与模型组相比, β-酪啡肽7组模型大鼠上述指标明显恢复。表明β-酪啡肽7对糖尿病肾病模型大鼠肾损伤有保护作用。

## 关键词:

实验动物, 内分泌系统损伤与修复动物模型; 糖尿病; 链脲佐菌素; 糖尿病肾病; β-酪啡肽7; 胰岛素; 肾损伤; 并发症

## 主题词:

糖尿病; 糖尿病肾病; 胰岛素; 组织工程

## 基金资助:

河北省医学适用技术跟踪项目(GL201311)

Gao Yan<sup>1</sup>, Yuan Lu-liang<sup>2</sup>, Zhang Hai-song<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, Hebei Province, China; <sup>2</sup>Health Team, PLA 66165 Troops, Baoding 071000, Hebei Province, China)

Gao Yan, Master, Associate chief physician, Associate professor, Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, Hebei Province, China

Corresponding author: Zhang Hai-song, Chief physician, Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, Hebei Province, China

## Protective effects of beta-casomorphin-7 on renal injury in a rat model with streptozotocin-induced diabetic nephropathy

### Abstract

**BACKGROUND:** Studies have found that β-casomorphin 7 can lessen oxidation of renal tubular epithelial cells and lower blood sugar in a rat model of diabetes. There is a few studies concerning the effect of β-casomorphin-7 on diabetic nephropathy.

**OBJECTIVE:** To explore the effects of β-casomorphin-7 on renal injury in a rat model of diabetic nephropathy.

**METHODS:** The 30 rats were equally and randomly divided into control group, model group and β-casomorphin-7 group. Twenty rat models of diabetes were established. In the model and β-casomorphin-7 groups, rats were intraperitoneally injected with streptozotocin (60 mg/kg). In the control group, rats were intraperitoneally injected

**Subject headings:** Diabetes Mellitus; Diabetic Nephropathies; Insulin; Tissue Engineering  
**Funding:** the Hebei Province Medical Application Technology Tracking Project, No. GL201311

with an equal volume of citric acid. Rats in the  $\beta$ -casomorphin-7 group were intragastrically administered  $\beta$ -casomorphin-7 for 30 days. Rats in the model and control groups were given an equal volume of saline by intragastric administration.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Compared with the control group, insulin levels decreased, glucagon, blood glucose, urine glucose, urine protein, serum creatinine, serum urea nitrogen levels, mRNA and protein expression levels of type I collagen and type IV collagen in kidney increased in the model group. (2) Compared with the model group, above indexes were apparently recovered in the  $\beta$ -casomorphin-7 group. These findings indicate that  $\beta$ -casomorphin-7 has a protective effect on renal injury in diabetic nephropathy rats.

**Cite this article:** Gao Y, Yuan LL, Zhang HS. Protective effects of beta-casomorphin-7 on renal injury in a rat model with streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(5):701-706.

## 0 引言 Introduction

糖尿病肾病是糖尿病的主要并发症,是终末肾病的主要原因,严重影响糖尿病患者的健康,也是糖尿病死亡的主要原因<sup>[1-2]</sup>。糖尿病肾病起病隐匿,早期没有明显的临床症状,往往临床上发现时已为III期以上,已出现肾脏的病理变化,治疗效果不如早期治疗(以控制血糖为主)效果明显。 $\beta$ -酪啡肽7可以促进胰岛素分泌,降低血糖,缓解血糖过高引起的氧化应激,对糖尿病动物的肾脏由保护作用<sup>[3-4]</sup>。 $\beta$ -酪啡肽7对糖尿病肾病的肾脏是否有保护作用?作者以 $\beta$ -酪啡肽7干预链脲佐菌素诱导建立糖尿病肾病大鼠模型,观察 $\beta$ -酪啡肽7对糖尿病肾病大鼠肾脏的作用。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验在2013年6月至2015年3月在河北大学附属医院实验室完成。

1.3 材料

**实验动物:** SPF级雄性SD大鼠30只,鼠龄7周,体重180-220 g,由河北省动物中心提供,动物许可证号:SCXK(冀)2013-1-003。实验前饲养于实验室鼠专用鼠笼,12 h日夜交替,自由进食和饮水。实验大鼠经过河北大学附属医院动物伦理学委员会批准。30只大鼠随机等分为对照组、模型组和 $\beta$ -酪啡肽7组。

1.4 方法

1.4.1 造模方法 模型组和 $\beta$ -酪啡肽7组大鼠腹腔注射链脲佐菌素(60 mg/kg,美国Sigma公司)<sup>[5-6]</sup>,对照组腹腔注射等量柠檬酸液。注射后观察大鼠饮水和进食情况。

1.4.2 造模成功检测标准 注射链脲佐菌素72 h后检测大鼠空腹血糖,连续3 d空腹血糖 $\geq 16.7$  mmol/L视为糖尿病模型制作成功<sup>[5-6]</sup>。血糖仪购自北京怡成生物电子有限公司。

1.4.3  $\beta$ -酪啡肽7灌胃 造模7 d后, $\beta$ -酪啡肽7组大鼠每天给予 $\beta$ -酪啡肽7( $7.5 \times 10^{-6}$  mol/kg;美国凤凰制药公司)灌胃<sup>[7-8]</sup>,模型组和对照组每天给予等量生理盐水。每天记录大鼠体重、饮水及进食量,空腹血糖5 d检查一次,末次灌胃后留取大鼠24 h尿液。大鼠肾脏指数=左肾重量(mg)/体质量(g) $\times 100\%$ <sup>[8]</sup>。

1.4.4 取材 灌胃30 d后,乙醚麻醉,颈静脉采集血液,离心后留取血清,然后处死大鼠,剖腹取出肾脏,称质量

后取部分肾脏多聚甲醛固定。

1.4.5 血清及尿液中生化指标测定 血清中胰岛素和胰高血糖素采用放射免疫法测定;血清肌酐采用苦味酸法测定,血清尿素氮采用Fearon法测定,尿蛋白采用考马斯亮蓝法测定,尿葡萄糖浓度采用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法测定。试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.4.6 苏木精-伊红染色观察 大鼠肾脏组织经甲醛固定后,切成3  $\mu$ m厚切片(德国LEICA公司),常规进行脱蜡、水洗、苏木精染色、盐酸乙醇分化、清水浸泡、伊红染色、脱水、封固后,光镜(日本奥林巴斯公司)下观察大鼠肾脏组织学形态。

1.4.7 Masson纤维染色 Masson纤维染色主要观察肾脏纤维化程度<sup>[9]</sup>。大鼠肾脏切片经苏木精-伊红染色,冲洗后,丽春红染色(南京建成生物工程研究所),冲洗,磷钼酸分色,亮绿蓝染色,乙醇冲洗,中性树脂封固。高倍镜下每个切片选取10个视野进行观察,计算每个视野胶原纤维绿染区/视野面积值,结果取平均值。

1.4.8 天狼星红染色 天狼星红染色反应大鼠肾脏纤维化情况<sup>[10]</sup>。大鼠肾脏切片经波恩氏液固定,流水冲洗,天狼星红(美国Sigma公司)染色,冲洗,苏木精染色,脱水,中性树脂封固。高倍镜下每个切片选取10个视野进行观察,计算每个视野胶原纤维红染区/视野面积值,结果取平均值。

1.4.9 实时PCR分析 取各组大鼠肾脏组织进行检测。组织匀浆器由瑞士Kinematica AG公司提供。Trizol试剂盒由Takara公司提供。引物由Primer 5.0 软件设计引物, I型胶原蛋白的上游引物为5'-TAC AGC ACG CTT GTG GTT G-3',下游引物为5'-TTG GGA TGG AGG GAG TTT A-3',产物长度190 bp; IV型胶原蛋白的上游引物为5'-GGT CAC TTT CAC TGG TTG ACG A-3',下游引物为5'-TTG AAT ATC AAA CAC GCA AGG C-3',产物长度201 bp。引物由上海英俊技术有限公司合成。总RNA采用一步抽提法抽取,经反转录成cDNA,转录的cDNA用实时PCR法进行分析。垂直板电泳槽、半干转印仪、Versa Doc成像系统由美国Bio-Rad公司提供。荧光定量PCR仪由美国ABI公司提供。

1.4.10 Western-blot分析 将各组大鼠肾脏组织加入RIPA裂解液,冰上匀浆,离心(德国Andreas Hettich GmbH8 CO.KG)后取上清液,加入蛋白上样缓冲液使其变性,经浓缩胶和分离胶分离电泳后取目的蛋白凝胶转印到

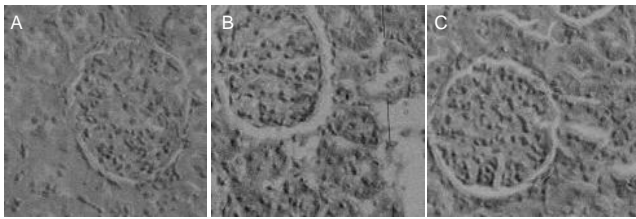


图1  $\beta$ -酪啡肽 7 对糖尿病肾病大鼠模型肾脏组织病理变化的影响(苏木精-伊红染色,  $\times 400$ )

Figure 1 Effects of  $\beta$ -casomorphin-7 on pathological changes in kidney tissue of a rat model of diabetic nephropathy (hematoxylin-eosin staining,  $\times 400$ )

图注: 图中 A 为对照组大鼠的肾脏组织正常; B 为模型组大鼠的肾小球结构紊乱, 细胞增生, 肾小管水肿; C 为  $\beta$ -酪啡肽 7 组大鼠肾小球结构接近正常, 细胞轻度增生, 肾小管轻度水肿。

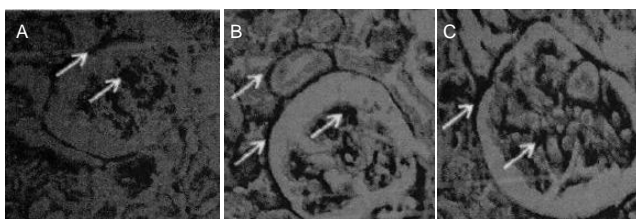


图3  $\beta$ -酪啡肽 7 对糖尿病肾病大鼠模型肾脏胶原纤维分布的影响(天狼星红染色,  $\times 400$ )

Figure 3 Effects of  $\beta$ -casomorphin-7 on the distribution of collagen fibers in the kidney of a rat model of diabetic nephropathy (Sirius red staining,  $\times 400$ )

图注: 图中 A 为对照组, 肾脏组织中见少量(白色箭头)的胶原纤维; B 为模型组, 肾脏组织中见大量胶原纤维; C 为  $\beta$ -酪啡肽 7 组, 肾脏组织中的胶原纤维少于模型组。

PVDF膜, PVDF膜转印完成后漂洗, 脱脂奶粉封闭, 加兔抗 I 型胶原蛋白和 IV 型胶原蛋白(美国 Bioworld 公司), 孵育完成后对图像进行采集和处理, 以 GAPDH 为内参, 结果以目的条带与 GAPDH 的吸光度比值表示。

**1.5 主要观察指标** 大鼠血糖、胰岛素、胰高血糖素水平、肾脏病理变化及胶原蛋白 mRNA 和蛋白的表达水平。

**1.6 统计学分析** 所有数据输入 SPSS 18.0 软件进行处理, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 造模成功动物数量及过程** 30 只 SD 大鼠分为 3 组, 对照组、模型组、 $\beta$ -酪啡肽 7 组各 10 只, 全部进入结果分析。

**2.2 模型方法的改进** 实验通过腹腔一次性大剂量注射链脲佐菌素的方式诱导糖尿病, 成模率高(100%), 且成活率高, 并且易于实验操作。

**2.3 模型更接近临床实践** 模型大鼠出现糖尿病典型的三多一少的症状, 食多、饮水多、尿多, 与临床实践相类似, 而且可持续稳定。

**2.4 主要观察结果和次要观察结果**

**2.4.1 大体情况** 对照组大鼠的饮水、进食、体质量及精神状态无明显改变, 模型组大鼠饮水及进食量增加, 体质量

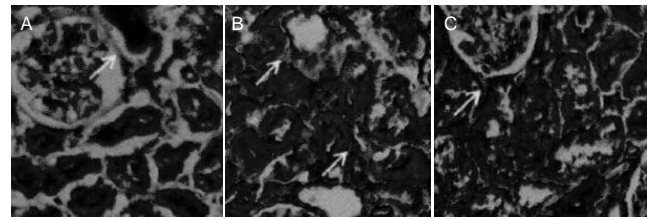


图2  $\beta$ -酪啡肽 7 对糖尿病肾病大鼠模型肾脏胶原纤维分布的影响(Masson 染色,  $\times 400$ )

Figure 2 Effects of  $\beta$ -casomorphin-7 on the distribution of collagen fibers in the kidney of a rat model of diabetic nephropathy (Masson staining,  $\times 400$ )

图注: 图中 A 为对照组, 肾脏组织中见少量的胶原纤维; B 为模型组, 肾脏组织中见大量胶原纤维; C 为  $\beta$ -酪啡肽 7 组, 肾脏组织中的胶原纤维少于模型组。白色边缘(箭头指示)为胶原纤维, 黑色为肌纤维。

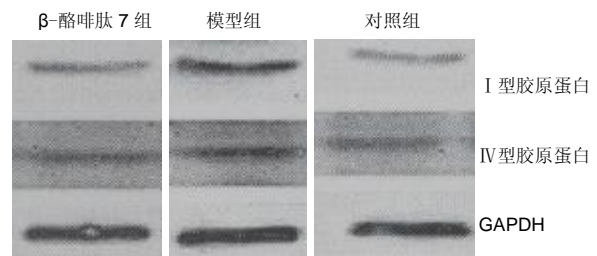


图4  $\beta$ -酪啡肽 7 对糖尿病肾病大鼠模型肾脏胶原蛋白表达的影响  
Figure 4 Effects of  $\beta$ -casomorphin-7 on collagen expression in the kidney of a rat model of diabetic nephropathy

量下降, 精神状态不佳, 症状随病程的延长而加重;  $\beta$ -酪啡肽 7 组大鼠与模型组相比, 饮水及进食量减少, 体质量增加, 精神状态较好, 表明  $\beta$ -酪啡肽 7 能够改善糖尿病大鼠的一般状况。

**2.4.2 血糖** 由表 1 可以看出, 正常组大鼠血糖维持在正常水平(3.6–5.8 mmol/L); 模型组大鼠的血糖水平明显高于对照组( $P < 0.05$ );  $\beta$ -酪啡肽 7 组大鼠血糖水平从造模后 10 d 时低于模型组( $P < 0.05$ ), 但仍高于对照组( $P < 0.05$ )。

**2.4.3 胰岛素和胰高血糖素水平** 由表 2 可以看出, 与对照组相比, 模型组大鼠血清胰岛素降低( $P < 0.05$ ), 而血清胰高血糖素水平升高( $P < 0.05$ ); 而与模型组相比,  $\beta$ -酪啡肽 7 组大鼠血清胰岛素水平增加( $P < 0.05$ ), 而血清胰高血糖素水平增加( $P < 0.05$ ), 且两种指标仍与对照组差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

**2.4.4 肾脏生化指标** 由表 3 可以看出, 模型组大鼠尿糖、尿蛋白、血清肌酐和血清尿素氮均高于对照组( $P < 0.05$ ); 而  $\beta$ -酪啡肽 7 组大鼠尿糖、尿蛋白、血清肌酐和血清尿素氮介于对照组和模型组之间( $P < 0.05$ )。

**2.4.5 肾脏指数** 对照组、模型组及  $\beta$ -酪啡肽 7 组大鼠的肾脏指数分别为 6.2%、14% 和 11.2%, 3 组差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

表 1  $\beta$ -酪啡肽 7 对糖尿病肾病大鼠模型血糖水平的影响 $(\bar{x} \pm s, n=10, \text{mmol/L})$ Table 1 Influence of  $\beta$ -casomorphin-7 on blood glucose levels in a rat model of diabetic nephropathy

造模后时间(d)	$\beta$ -酪啡肽 7 组	模型组	对照组
0	17.77 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	16.99 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	5.33 $\pm$ 0.03
5	15.45 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>	17.22 $\pm$ 0.85 <sup>a</sup>	5.21 $\pm$ 0.04
10	14.87 $\pm$ 0.57 <sup>ab</sup>	18.11 $\pm$ 1.48 <sup>a</sup>	4.77 $\pm$ 0.38
15	15.34 $\pm$ 1.61 <sup>ab</sup>	19.63 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup>	4.43 $\pm$ 0.18
20	16.47 $\pm$ 0.55 <sup>ab</sup>	24.09 $\pm$ 1.21 <sup>a</sup>	4.15 $\pm$ 0.32
25	18.29 $\pm$ 0.76 <sup>ab</sup>	25.01 $\pm$ 1.04 <sup>a</sup>	4.56 $\pm$ 0.23
30	18.75 $\pm$ 1.21 <sup>ab</sup>	23.12 $\pm$ 1.07 <sup>a</sup>	5.32 $\pm$ 0.34

表注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。表 3  $\beta$ -酪啡肽 7 对糖尿病肾病大鼠模型肾脏生化指标的影响 $(\bar{x} \pm s, n=10)$ Table 3 Effect of  $\beta$ -casomorphin-7 on biochemical markers in the kidney of a rat model of diabetic nephropathy

项目	$\beta$ -酪啡肽 7 组	模型组	对照组
尿糖(mmol/L)	6.55 $\pm$ 0.28 <sup>ab</sup>	11.39 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	0
尿蛋白(mg/L)	277.8 $\pm$ 88.3 <sup>ab</sup>	392.8 $\pm$ 63.7 <sup>a</sup>	26.55 $\pm$ 3.88
血清肌酐(mmol/L)	11.34 $\pm$ 0.56 <sup>ab</sup>	17.32 $\pm$ 1.01 <sup>a</sup>	2.98 $\pm$ 0.23
血清尿素氮(mmol/L)	303.45 $\pm$ 27.86 <sup>ab</sup>	377.20 $\pm$ 30.09 <sup>a</sup>	254.56 $\pm$ 23.43

表注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

#### 2.4.6 肾脏病理变化

**苏木精-伊红染色显示:** 对照组大鼠肾小球结构正常, 未见萎缩、增大, 肾小管腔没有明显扩张, 上皮细胞无明显水肿、脱落、坏死等情况; 模型组大鼠肾小球结构紊乱, 细胞增生, 肾小管水肿, 表明糖尿病大鼠肾脏出现了病理性损伤的表现;  $\beta$ -酪啡肽 7 组大鼠的肾小球结构接近正常, 细胞轻度增生, 肾小管轻度水肿, 病理改变较模型组有改善(图1)。

**Masson 染色显示:** 对照组大鼠肾脏见少量的胶原纤维; 模型组大鼠肾脏的相对胶原纤维面积(约7%)明显多于对照组(约1%)( $P < 0.05$ ), 表明肾小球和肾小管有胶原纤维沉积;  $\beta$ -酪啡肽 7 组大鼠肾脏肾小球与肾小管间质中的相对胶原纤维面积(约2%)与模型组相比明显减少( $P < 0.05$ )(图2)。

**天狼星红染色显示:** 对照组大鼠肾脏存在少量的胶原纤维; 模型组大鼠肾脏出现大量胶原纤维面积约3.7%, 明显多于对照组(约0.6%)( $P < 0.05$ );  $\beta$ -酪啡肽 7 组大鼠肾脏的胶原纤维相对面积(约1.4%)较模型组明显减少( $P < 0.05$ )(图3)。

**2.4.7 胶原蛋白 mRNA 及蛋白的表达水平** 模型组大鼠肾脏 I 型胶原蛋白和 IV 型胶原蛋白 mRNA 的表达及蛋白均明显高于对照组大鼠, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见表 4, 图 4。

$\beta$ -酪啡肽 7 组大鼠肾脏 I 型胶原蛋白和 IV 型胶原蛋白 mRNA 的表达及蛋白明显低于模型组大鼠( $P < 0.05$ ), 与对照组接近( $P > 0.05$ ), 见表 4, 图 4。

表 2  $\beta$ -酪啡肽 7 对糖尿病肾病大鼠模型血清胰岛素和胰高血糖素水平的影响 $(\bar{x} \pm s, n=10)$ Table 2 Effect of  $\beta$ -casomorphin-7 on serum insulin and glucagon levels in a rat model of diabetic nephropathy

项目	$\beta$ -酪啡肽 7 组	模型组	对照组
胰岛素(mIU/L)	14.36 $\pm$ 2.31 <sup>ab</sup>	10.25 $\pm$ 0.79 <sup>a</sup>	17.22 $\pm$ 1.07
胰高血糖素(ng/L)	1362.1 $\pm$ 110.3 <sup>ab</sup>	1060.3 $\pm$ 35.3 <sup>a</sup>	798.2 $\pm$ 44.5

表注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。表 4  $\beta$ -酪啡肽 7 对糖尿病肾病大鼠模型肾脏胶原蛋白 mRNA 及蛋白表达水平的影响 $(\bar{x} \pm s, n=10)$ Table 4 Effect of  $\beta$ -casomorphin-7 on collagen mRNA and protein expression levels in the kidney of a rat model of diabetic nephropathy

项目	$\beta$ -酪啡肽 7 组	模型组	对照组
mRNA( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )			
I 型胶原蛋白	1.03 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	1.61 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.01
IV 型胶原蛋白	0.89 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.43 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.02 $\pm$ 0.07
蛋白(与 GAPDH 的吸光度比值)			
I 型胶原蛋白	0.47 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.64 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.38 $\pm$ 0.01
IV 型胶原蛋白	0.58 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.03 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.57 $\pm$ 0.04

表注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨论 Discussion

糖尿病肾病严重影响糖尿病患者的生活质量。糖尿病肾病的治疗包括: ①饮食疗法<sup>[11]</sup>。②控制血糖: 包括降糖药和胰岛素<sup>[12]</sup>。③控制血压: 控制血压可以保护肾功能<sup>[13]</sup>。④控制血脂<sup>[14]</sup>。⑤中医治疗: 中医辨证治疗可以保护肾脏功能, 延缓或阻止病情发展<sup>[15-17]</sup>。⑥终末肾病的治疗: 包括肾脏透析和器官移植<sup>[18-19]</sup>。糖尿病肾病的早期病变是可逆的, 病情进入中晚期肾脏的损害很难逆转。糖尿病肾病的发病机制比较复杂: ①血流动力学改变<sup>[20-24]</sup>: 肾素-血管紧张素系统被认为是糖尿病肾病肾损伤的主要原因, 通过多种途径参与糖尿病肾病的病理变化。②非酶糖基化<sup>[25-27]</sup>: 非酶糖基化可以诱导糖尿病肾病的许多病理变化, 造成肾小球硬化。③氧化应激<sup>[28-29]</sup>: 糖尿病患者代谢紊乱, 氧自由基生成过多, 同时糖尿病肾病产生过多的活性氧, 炎症细胞因子、生长因子等多种因素也导致活性氧的生产增加, NADPH 氧化酶抑制剂可以减少氧化应激, 防止肾小球硬化, 延缓糖尿病肾病的发生发展。④多元醇通路激活<sup>[30-31]</sup>: 醛糖还原酶通过转化生长因子 $\beta 1$ 、活性氧和非酶糖基化在糖尿病肾病肾脏的病理变化中发挥作用。⑤细胞因子<sup>[32]</sup>: 细胞因子均有调节细胞免疫和炎症反应的作用, 糖尿病肾病的发病机制之一是大量细胞因子的激活, 转化生长因子 $\beta$ 通过 Nrf2 调节血管紧张素的表达<sup>[33-36]</sup>; 血管内皮生长因子及其受体对血管的生成和调控起重要作用<sup>[37-39]</sup>; 肿瘤坏死因子介导炎症反应引起肾脏损害<sup>[40]</sup>。⑤炎症因子: 炎症因子可以增加毛细血管通透性, 诱导内皮细胞凋亡, 引起肾脏损伤<sup>[41-44]</sup>。

$\beta$ -酪啡肽7可以从多个环节减少糖尿病高血糖对机体的损害。 $\beta$ -酪啡肽7有7个氨基酸组成,为牛乳酪蛋白的降解产物,可以影响肠道的分泌和运动功能,在肠道内被吸收后可以发挥免疫调节作用,抑制下丘脑促性腺激素释放激素的分泌影响生殖内分泌功能,作为阿片活性物质可以增加动物的采食量以及镇静镇痛作用,能够促进神经元的生长和修复。在糖尿病方面: $\beta$ -酪啡肽7能够降低葡萄糖的转运,抑制在小肠内的吸收,降低血糖,机制可能为下调葡萄糖转运蛋白的表达,降低酶的活性,增加葡萄糖的消耗。在糖尿病大鼠实验中发现 $\beta$ -酪啡肽7可以降低氧化应激反应,降低血糖水平<sup>[4]</sup>,能够抑制胰高血糖素分泌,促进胰岛素分泌,降低机体对氧化应激水平<sup>[45]</sup>,并通过氧化应激减轻糖尿病大鼠的心肌损伤,改善糖尿病大鼠的心脏功能。此次实验用链脲佐菌素诱导建立大鼠糖尿病肾病模型,研究 $\beta$ -酪啡肽7对糖尿病肾病大鼠肾脏损伤的作用。结果发现:模型组大鼠出现糖尿病肾病相关的临床症状及糖尿病肾病的肾脏病理变化, $\beta$ -酪啡肽7可以缓解糖尿病肾病大鼠多饮多食、体质量减轻等糖尿病症状,可以降低血糖水平,降低血清胰岛素水平,升高胰高血糖素水平;降低血清肿瘤坏死因子 $\alpha$ 水平;减轻肾脏的病理损伤,改善相应的血清学指标;模型组大鼠出现I型胶原蛋白和IV型胶原蛋白及其mRNA的表达明显升高,肾脏纤维化程度明显增加, $\beta$ -酪啡肽7可以减少肾脏I型胶原蛋白和IV型胶原蛋白及其mRNA的表达,减少胶原纤维沉积所致的肾脏纤维化程度。

综上所述, $\beta$ -酪啡肽7对糖尿病肾病大鼠的肾脏由保护作用,可以改善其肾功能的损害,减轻肾脏纤维化程度。本实验以链脲佐菌素诱导大鼠糖尿病肾病损伤模型,探讨 $\beta$ -酪啡肽7对糖尿病肾病大鼠肾脏损伤的保护作用。为生物活性物质 $\beta$ -酪啡肽7的开发利用提供实验依据,也为探寻糖尿病肾病发病的新机制和防治的新策略提供新的思路。

**致谢:** 对本次研究提供帮助的河北大学附属医院和人员表示感谢。

**作者贡献:** 第一作者负责设计和实施,第二、通讯作者负责实施及文章的修改。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

**伦理问题:** 试验方案经河北大学附属医院实验动物伦理委员会批准。实验动物在水合氯醛麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其痛苦和死亡。

**文章查重:** 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 本刊实行双盲外审制度,文章经国内小同行外审专家审核,符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数

据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

#### 4 参考文献 References

- [1] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China. *N Engl J Med*. 2010;362(12):1090-1101.
- [2] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care*. 2011;34 Suppl 1:S11-61.
- [3] 范英兰. $\beta$ -酪啡肽-5对糖尿病大鼠血糖和氧化应激的影响[D].南京:南京农业大学,2010.
- [4] Yin H, Miao J, Zhang Y. Protective effect of beta-casomorphin-7 on type 1 diabetes rats induced with streptozotocin. *Peptides*. 2010;31(9):1725-1729.
- [5] Somania R, Singhai AK, Shivgunde P, et al. Asparagus racemosus Willd (Liliaceae) ameliorates early diabetic nephropathy in STZ induced diabetic rats. *Indian J Exp Biol*. 2012;50(7):469-475.
- [6] Han DN, Zhang DH, Wang LP, et al. Protective effect of  $\beta$ -casomorphin-7 on cardiomyopathy of streptozotocin-induced diabetic rats via inhibition of hyperglycemia and oxidative stress. *Peptides*. 2013;44:120-126.
- [7] Yin H, Miao J, Ma C, et al.  $\beta$ -Casomorphin-7 cause decreasing in oxidative stress and inhibiting NF- $\kappa$ B-iNOS-NO signal pathway in pancreas of diabetes rats. *J Food Sci*. 2012;77(2):C278-282.
- [8] 张景云. 结缔组织生长因子在糖尿病肾病发病中的作用及己酮可可碱对其表达影响的研究[D].天津:天津医科大学,2007.
- [9] Mankhey RW, Bhatti F, Maric C. 17 $\beta$ -Estradiol replacement improves renal function and pathology associated with diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288(2):F399-405.
- [10] Ma YY, Sun D, Li J, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells alleviates renal interstitial fibrosis in a mouse model of unilateral ureteral obstruction. *Life Sci*. 2010;86(21-22):798-807.
- [11] 王华. 糖尿病肾病的饮食探讨[J]. 中国误诊学杂志, 2011, 11(11): 2603.
- [12] 中国医师协会内分泌代谢科医师分会. 2型糖尿病合并慢性肾脏病患者口服降糖药用药原则中国专家共识[J]. 中国糖尿病杂志, 2013, 21(10): 865-870.
- [13] 方燕红. 硝苯地平联合贝那普利治疗糖尿病肾病的临床观察[J]. 中国药房, 2011, (40): 3802-3803.
- [14] 叶俊鹏, 黄培良, 赖瑞平. 门诊常用降血脂药物的用药分析[J]. 现代医院, 2013, 13(12): 65-67.
- [15] 李建国, 胡齐鸣, 张宝霞, 等. 益气养阴收敛固涩方治疗气阴两虚型糖尿病肾病30例临床观察[J]. 实用中西医结合临床, 2014, 14(3): 77-78.
- [16] 郭彦军. 益肾化痰方治疗糖尿病肾病疗效观察[J]. 陕西中医, 2013, 34(8): 954-955.
- [17] 蒋丙义. 血府逐瘀汤治疗43例糖尿病肾病临床效果观察[J]. 基础医学论坛, 2014, 18(14): 1854-1855.
- [18] 金秀名. 血液透析与腹膜透析治疗糖尿病肾病的疗效观察[J]. 中国实用医药, 2014, 9(1): 118-119.
- [19] 陆翰澜, 陈瑜, 傅尚希, 等. 亲属活体肾移植后供者安全性评价[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(44): 7681-7686.

- [20] Lo CS, Liu F, Shi Y, et al. Dual RAS blockade normalizes angiotensin-converting enzyme-2 expression and prevents hypertension and tubular apoptosis in Akita angiotensinogen-transgenic mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;302(7):F840-852.
- [21] Nadarajah R, Milagres R, Dilauro M, et al. Podocyte-specific overexpression of human angiotensin-converting enzyme 2 attenuates diabetic nephropathy in mice. *Kidney Int.* 2012;82(3):292-303.
- [22] Mori J, Patel VB, Ramprasath T, et al. Angiotensin 1-7 mediates renoprotection against diabetic nephropathy by reducing oxidative stress, inflammation, and lipotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;306(8):F812-821.
- [23] Lakshmanan AP, Thandavarayan RA, Watanabe K, et al. Modulation of AT-1R/MAPK cascade by an olmesartan treatment attenuates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;348(1):104-111.
- [24] Fernandez Juarez G, Luño J, Barrio V, et al. Effect of dual blockade of the renin-angiotensin system on the progression of type 2 diabetic nephropathy: a randomized trial. *Am J Kidney Dis.* 2013;61(2):211-218.
- [25] Sasai Y, Iwakawa K, Yanagida K, et al. Advanced glycation endproducts stimulate renal epithelial cells to release chemokines that recruit macrophages, leading to renal fibrosis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012;76(9):1741-1745.
- [26] Ishibashi Y, Matsui T, Takeuchi M, et al. Metformin inhibits advanced glycation end products (AGEs)-induced renal tubular cell injury by suppressing reactive oxygen species generation via reducing receptor for AGEs (RAGE) expression. *Horm Metab Res.* 2012;44(12):891-895.
- [27] Zhang MH, Feng L, Zhu MM, et al. The anti-inflammation effect of Moutan Cortex on advanced glycation end products-induced rat mesangial cells dysfunction and High-glucose-fat diet and streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats. *J Ethnopharmacol.* 2014;151(1):591-600.
- [28] Sedeek M, Gutsol A, Montezano AC, et al. Renoprotective effects of a novel Nox1/4 inhibitor in a mouse model of Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond).* 2013;124(3):191-202.
- [29] Eid AA, Ford BM, Bhandary B, et al. Mammalian target of rapamycin regulates Nox4-mediated podocyte depletion in diabetic renal injury. *Diabetes.* 2013;62(8):2935-2947.
- [30] Abdillahi M, Ananthakrishnan R, Vedantham S, et al. Aldose reductase modulates cardiac glycogen synthase kinase-3 $\beta$  phosphorylation during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;303(3):H297-308.
- [31] Oudot C, Lajoix AD, Jover B, et al. Oxidative stress and beneficial effect of sodium restriction on kidney damage associated with insulin resistance in rats. *Ann Cardiol Angeiol (Paris).* 2012;61(3):162-166.
- [32] Hellemons ME, Kerschbaum J, Bakker SJ, et al. Validity of biomarkers predicting onset or progression of nephropathy in patients with Type 2 diabetes: a systematic review. *Diabet Med.* 2012;29(5):567-577.
- [33] Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, et al. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(6):705-717.
- [34] Li Y, Paonessa JD, Zhang Y. Mechanism of chemical activation of Nrf2. *PLoS One.* 2012;7(4):e35122.
- [35] Wang F, Tian F, Whitman SA, et al. Regulation of transforming growth factor  $\beta$ 1-dependent aldose reductase expression by the Nrf2 signal pathway in human mesangial cells. *Eur J Cell Biol.* 2012;91(10):774-781.
- [36] Soetikno V, Sari FR, Lakshmanan AP, et al. Curcumin alleviates oxidative stress, inflammation, and renal fibrosis in remnant kidney through the Nrf2-keap1 pathway. *Mol Nutr Food Res.* 2013;57(9):1649-1659.
- [37] Nakagawa T, Sato W, Kosugi T, et al. Uncoupling of VEGF with endothelial NO as a potential mechanism for abnormal angiogenesis in the diabetic nephropathy. *J Diabetes Res.* 2013;2013:184539.
- [38] Tufro A, Veron D. VEGF and podocytes in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol.* 2012;32(4):385-393.
- [39] Schlingemann RO, Van Noorden CJ, Diekman MJ, et al. VEGF levels in plasma in relation to platelet activation, glycemic control, and microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2013;36(6):1629-1634.
- [40] Niewczas MA, Gohda T, Skupien J, et al. Circulating TNF receptors 1 and 2 predict ESRD in type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(3):507-515.
- [41] Xu XX, Qi XM, Zhang W, et al. Effects of total glucosides of paeony on immune regulatory toll-like receptors TLR2 and 4 in the kidney from diabetic rats. *Phytomedicine.* 2014;21(6):815-823.
- [42] Kaur H, Chien A, Jialal I. Hyperglycemia induces Toll like receptor 4 expression and activity in mouse mesangial cells: relevance to diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;303(8):F1145-1150.
- [43] Xie X, Peng J, Chang X, et al. Activation of RhoA/ROCK regulates NF- $\kappa$ B signaling pathway in experimental diabetic nephropathy. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;369(1-2):86-97.
- [44] Verzola D, Cappuccino L, D'Amato E, et al. Enhanced glomerular Toll-like receptor 4 expression and signaling in patients with type 2 diabetic nephropathy and microalbuminuria. *Kidney Int.* 2014;86(6):1229-1243.
- [45] Han DN, Zhang DH, Wang LP, et al. Protective effect of  $\beta$ -casomorphin-7 on cardiomyopathy of streptozotocin-induced diabetic rats via inhibition of hyperglycemia and oxidative stress. *Peptides.* 2013;44:120-126.