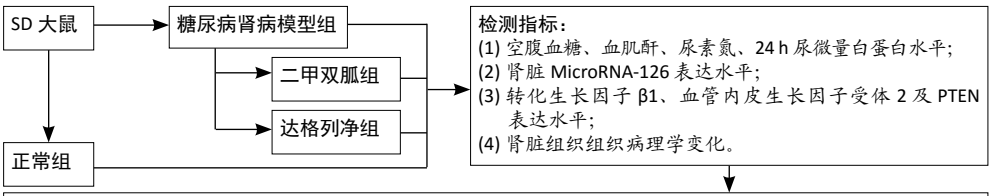
达格列净干预改善糖尿病肾病模型大鼠的肾脏损伤

https://doi.org/10.12307/2022.226
投稿日期：2021-04-08
送审日期：2021-04-12
采用日期：2021-05-18
在线日期：2021-08-10
中图分类号：
R459.9；R318；R587.1
文章编号：
2095-4344(2022)08-01216-07
文献标识码：B

王 琴[1]，沈 呈[2]，廖 静[1]，杨 烨[1]

文章快速阅读：

文章特点—
△研究表明，达格列净有助于缓解糖尿病肾病肾脏损伤程度，且 MicroRNA-126 水平可作为诊断糖尿病肾病新的标志物及治疗靶点。
△此次研究提示，达格列净可能通过上调 MicroRNA-126 的表达水平，来抑制转化生长因子 β1 及血管内皮生长因子受体 2 的表达，刺激磷酸酶和张力蛋白同系物 (PTEN) 蛋白的合成，改善肾小管及肾小球的损伤程度。



结论：
(1) 达格列净可改善糖尿病肾病的肾功能状态；
(2) 可上调 MicroRNA-126 的水平，抑制转化生长因子 β1 及血管内皮生长因子受体 2 的表达，促进 PTEN 的表达；
(3) 可改善肾小管及肾小球的病变程度，延缓糖尿病肾病大鼠的肾脏损伤过程。

文题释义：
达格列净：是一种新型的降糖药，可选择性抑制钠-葡萄糖协同转运蛋白2，通过减少葡萄糖在肾脏的重吸收，发挥降低血糖的作用。达格列净可保护胰岛β细胞的功能，改善胰岛素抵抗，调节脂质代谢紊乱，对轻度血压、体质量、肾脏异常均有保护作用。

摘要
背景：达格列净在糖尿病肾病引起的肾功能损伤中具有明显的肾脏保护作用。
目的：探索达格列净是否可通过MicroRNA-126改善糖尿病肾病大鼠肾脏损伤的可能机制。
方法：建立SD大鼠糖尿病肾病模型，将造模成功的糖尿病肾病大鼠随机分为模型组、二甲双胍组、达格列净组，每组6只，分别给予同等剂量生理盐水、二甲双胍500 mg/(kg • d)、达格列净10 mg/(kg • d)灌胃，1次/d；另取6只正常饮食大鼠作为正常组，12周后各组大鼠均麻醉处死。检测空腹血糖、血肌酐、尿素氮、24 h尿微量白蛋白水平，以实时荧光定量PCR检测大鼠肾脏MicroRNA-126水平，通过实时荧光定量PCR、Western blot及免疫组化检测大鼠肾脏转化生长因子β1、血管内皮生长因子受体2及磷酸酶和张力蛋白同系物水平；采用电镜、苏木精-伊红及Masson染色观察大鼠肾脏超微结构及形态病理学变化。
结果与结论：①模型组空腹血糖、血肌酐、尿素氮、24 h尿微量白蛋白及转化生长因子β1、血管内皮生长因子受体2水平较正常组明显升高($P < 0.05$)，MicroRNA-126及磷酸酶和张力蛋白同系物水平明显下降；二甲双胍组和达格列净组空腹血糖、血肌酐、尿素氮、24 h尿微量白蛋白及转化生长因子β1、血管内皮生长因子受体2水平较模型组明显降低($P < 0.05$)，MicroRNA-126及磷酸酶和张力蛋白同系物水平明显升高；其中达格列净组的上述作用更加明显($P < 0.05$)；②肾脏组织病理学显示，二甲双胍组和达格列净组大鼠肾脏病变程度较模型组减轻；与二甲双胍组相比，达格列净组大鼠肾脏足突排列良好，肾脏形态相对正常；③结果说明，达格列净可能通过上调糖尿病肾病大鼠肾脏MicroRNA-126水平，抑制转化生长因子β1及血管内皮生长因子受体2的表达，促进磷酸酶和张力蛋白同系物的表达，延缓糖尿病肾病大鼠的肾脏损伤过程。
关键词：糖尿病肾病；达格列净；肾脏；MicroRNA-126；转化生长因子β1；血管内皮生长因子受体2 ；磷酸酶和张力蛋白同系物
缩略语：磷酸酶和张力蛋白同系物：phosphate and tension homology deleted on chromosome ten，PTEN

Dapagliflozin improves renal injury in diabetic nephropathy rats

Wang Qin[1], Shen Cheng[2], Liao Jing[1], Yang Ye[1]
[1]Department of Geriatrics, Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; [2]Department of Critical Care Medicine, Urumqi Friendship Hospital, Urumqi 830049, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Wang Qin, Master, Attending physician, Department of Geriatrics, Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Corresponding author: Yang Ye, Master, Attending physician, Department of Geriatrics, Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

[1] 新疆医科大学第二附属医院老年病科 (干部病房)，新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830063；[2] 新疆乌鲁木齐市友谊医院重症医学科，新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830049
第一作者：王琴，女，1984 年生，新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市人，2012 年新疆医科大学毕业，硕士，主治医师，主要从事糖尿病相关研究。
通讯作者：杨烨，硕士，主治医师，新疆医科大学第二附属医院老年病科 (干部病房)，新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830063
https://orcid.org/0000-0001-7616-1191 (王琴)
基金资助：新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2020D01C192)，项目负责人：杨烨
引用本文：王琴，沈呈，廖静，杨烨 . 达格列净干预改善糖尿病肾病模型大鼠的肾脏损伤 [J]. 中国组织工程研究，2022，26(8):1216-1222.

Abstract

BACKGROUND: Dapagliflozin has obvious renal protective effect on renal injury caused by diabetic nephropathy.

OBJECTIVE: To explore the possible mechanism by which dapagliflozin can improve renal injury in diabetic nephropathy rats through microRNA-126.

METHODS: Sprague-Dawley rat models of diabetic nephropathy were successfully established, and randomly divided into a model group, a metformin group and a dapagliflozin group, with six rats in each group. They were given the same dose of normal saline, metformin (500 mg/kg) and dapagliflozin (10 mg/kg) by gavage once a day. Another six rats with normal diet were selected as control group. Twelve weeks later, the rats in each group were killed under anesthesia. Fasting blood glucose, serum creatinine, urea nitrogen and 24-hour urinary microalbumin levels were detected. The level of microRNA-126 in rat kidney was detected by qRT-PCR. The levels of transforming growth factor-β 1, vascular endothelial growth factor receptor 2 and phosphate and tension homology deleted on chromosome ten (PTEN) in rat kidney were detected by qRT-PCR, western blot and immunohistochemistry. The ultrastructural and pathological changes of the rat kidney were observed by electron microscope, hematoxylin-eosin staining and Masson staining.

RESULTS AND CONCLUSION: The levels of fasting blood glucose, serum creatinine, urea nitrogen, 24-hour urinary microalbumin, transforming growth factor-β1, and vascular endothelial growth factor receptor 2 in the model group were significantly higher than those in the normal group ($P < 0.05$), and the levels of microRNA-126 and PTEN were significantly lower than those in the normal group. The levels of fasting blood glucose, serum creatinine, urea nitrogen, 24-hour urinary microalbumin, transforming growth factor-β 1, and vascular endothelial growth factor receptor 2 in the metformin group and dapagliflozin group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$), and the levels of microRNA-126 and PTEN were significantly higher than those in the model group. The above changes were more significant in the dapagliflozin group compared with the metformin group ($P < 0.05$). Renal histopathological findings indicated that compared with the model group, the renal lesions in the metformin group and the dapagliflozin group was milder, the foot process of the dapagliflozin group was better than that of the metformin group, and the renal morphology was relatively normal in the dapagliflozin group. These findings indicate that dapagliflozin can up-regulate the level of microRNA-126, inhibit the expression of transforming growth factor-β 1, and vascular endothelial growth factor receptor 2, promote the expression of PTEN, and delay the process of renal injury in diabetic nephropathy rats.

Key words: diabetic nephropathy; dapagliflozin; kidney; microRNA-126; transforming growth factor-β1; vascular endothelial growth factor receptor 2; phosphate and tension homology deleted on chromosome ten

Funding: *the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2020D01C192 (to YY)*

How to cite this article: *WANG Q, SHEN C, LIAO J, YANG Y. Dapagliflozin improves renal injury in diabetic nephropathy rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2022;26(8):1216-1222.*

0 引言 Introduction

糖尿病肾病是糖尿病常见的并发症之一，存在着发展为终末期肾病的风险[1]。糖尿病肾病的发生可表现出肾小球硬化、肾小管萎缩及肾间质纤维化的病理学改变，导致肾功能水平的持续下降，严重影响糖尿病患者的健康水平及生活质量[2]。最新研究显示，达格列净是钠－葡萄糖转运蛋白2抑制剂，可通过抑制钠－葡萄糖转运蛋白2降低血液中葡萄糖的水平，预防高糖引起的早期肾小球足细胞及肾小管损伤，调节肾葡萄糖超负荷引起的炎症、氧化应激及纤维化过程，延缓糖尿病肾病肾脏病变的发展[3-4]。有研究发现，达格列净激活PTEN/PI3K/Akt通路，可有效改善糖尿病肾病大鼠的肾脏组织损伤[5]。近年来，微小RNA(MicroRNA)成为研究的热点，它是基因组调控的非编码RNA分子，可以通过结合目的mRNA的3′端非编码区(3′-UTR)来阻滞蛋白翻译或转录[6]。有研究表明，微小RNA在调节糖尿病肾病肾脏损伤的作用机制中占有重要地位[7-8]，其中MicroRNA-126可参与血管内皮细胞的激活，其表达水平的变化与糖尿病微血管损害密切相关，且在糖尿病肾病患者血液中循环MicroRNA-126水平明显降低[9-10]。研究发现，转化生长因子β1是重要的致纤维化因子[11]，转化生长因子β1的过表达是诱导糖尿病肾病的关键因素，可通过激活其下游纤维化因子、血管紧张素Ⅱ及内皮素1的表达，加速肾间质的纤维化发展。转化生长因子β超家族还可刺激血管内皮生长因子－血管内皮生长因子受体2信号转导，影响糖尿病肾病的病变过程[12]。同时，MicroRNA-126可调节内皮细胞的凋亡、增殖及血管内皮生长因子/转化生长因子β水平[13]。据报道，磷酸酶和张力蛋白同系物(phosphate and tension homology deleted on chromosome ten，PTEN)通过影响转化生长因子β的表达参与高血糖诱发的上皮细胞－间充质转化与糖尿病肾病肾脏的纤维化密不可分[14]。有研究发现，MicroRNA-126在牙髓干细胞中可通过PTEN-Akt轴诱导细胞凋亡，同时胶质瘤细胞中MicroRNA-126还可通过PTEN/PI3K/Akt通路发挥靶向调控胶质瘤的作用[15-16]。

此次研究通过观察达格列净对糖尿病肾病大鼠肾脏中MicroRNA-126、转化生长因子β1、血管内皮生长因子受体2、PTEN表达水平的变化，探讨达格列净是否可通过MicroRNA-126对糖尿病肾病大鼠肾脏起保护作用，为达格列净用于糖尿病肾病的防治提供理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验，两组之间比较采用独立样本*t*检验，多组间比较采用单因素方差分析，组内两两比较采用LSD法。

1.2 时间及地点 于2019年12月至2021年1月在新疆医科大学动物实验中心及临床研究院代谢性疾病实验室完成。

1.3 材料 清洁级(SPF级)雄性SpragueDawley(SD)大鼠，体质量180–220 g，由新疆医科大学动物中心实验室提供，许可证号：SYXK(新)2016-0003，此次实验经新疆医科大学实验动物使用和管理(IACUC)批准。

cDNA反转录试剂盒及实时荧光定量PCR试剂盒均购自德国Qiagen公司，MicroRNA-126、转化生长因子β1、血管内皮生长因子受体2及PTEN引物由华大基因有限公司提供，转化生长因子β1、血管内皮生长因子受体2及PTEN抗体购自美国Abcam公司，二甲双胍购自中美上海施贵宝制药有限公司，达格列净购自美国Astra Zeneca Pharmaceuticals LP。

1.4 方法

1.4.1 糖尿病肾病模型的制备及分组 24只清洁级(SPF级)雄性SD大鼠适应性喂养1周后，应用随机数字表法分为正

常组 (*n*=6) 和糖尿病肾病组 (*n*=18)。正常组正常饮食，糖尿病肾病组大鼠给予高脂高糖饲料 (购自北京博泰宏达生物技术有限公司) 喂养 8 周，体质量增长到 400−450 g；一次性腹腔注射链脲佐菌素 STZ 30 mg/kg 后，继续予高脂高糖饲料喂养，3 d 后尾静脉取血，测随机血糖≥ 16.7 mmol/L，提示糖尿病造模成功，并持续给予高脂高糖饲料喂养及监测血糖，4 周后测 24 h 尿白蛋白排泄率 > 20 mg 且尿糖阳性提示糖尿病肾病造模成功。将糖尿病肾病大鼠随机分为 3 组 (每组均 6 只)，模型组、二甲双胍组、达格列净组分别给予同等剂量生理盐水、二甲双胍 [500 mg/(kg • d)，生理盐水配比]、达格列净 [10 mg/(kg • d)，生理盐水配比] 灌胃，1 次 /d，并持续给予高脂高糖饲料喂养，12 周后麻醉处死。

组织工程实验动物造模过程的相关问题	
造模目的	完成糖尿病肾病大鼠模型制造
选择动物的条件	雄性健康 SD 大鼠
模型与所研究疾病的关系	糖尿病肾病大鼠模型用于糖尿病肾病的研究
动物来源及品系	雄性 SD 大鼠，由新疆医科大学动物中心实验室提供
造模技术描述	高脂高糖饲料喂养后，一次性腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 30 mg/kg 后导致大鼠胰岛 B 细胞受损
动物数量及分组方法	24 只清洁级 (SPF 级) 雄性 SD 大鼠适应性喂养 1 周后，随机分为正常组 (*n*=6) 和糖尿病肾病组 (*n*=18)
造模成功评价指标	3 d 后尾静脉取血，测随机血糖≥ 16.7 mmol/L，提示糖尿病造模成功，并持续给予高脂高糖饲料喂养及监测血糖，4 周后测 24 h 尿白蛋白排泄率 >20 mg 且尿糖阳性提示糖尿病肾病造模成功
造模后观察指标	血糖监测，24 h 尿微量白蛋白检测
造模后动物处理	将糖尿病肾病大鼠随机分为 3 组，每组 6 只，模型组、二甲双胍组、达格列净组分别给予同等剂量生理盐水、二甲双胍 [500 mg/(kg•d)，生理盐水配比]、达格列净 [10 mg /(kg•d)，生理盐水配比] 灌胃，1 次 /d，并持续给予高脂高糖饲料喂养，12 周后麻醉处死
伦理委员会批准	实验方案经新疆医科大学动物实验中心动物实验伦理委员会批准，批准号：20200531-12

1.4.2　标本的收集与处理　经二甲双胍、达格列净或生理盐水对照处理 12 周，代谢笼收集 24 h 尿液。禁食过夜，称质量，以 3% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠，腹主动脉采血。取出肾脏组织，将部分组织放入 RNA 保存液中，置于 −80 ℃冰箱中储存，另取部分组织放入 40 g/L 多聚甲醛及 2.5% 戊二醛固定用于后续检测。

1.4.3　24 h 尿微量白蛋白的检测　收集 24 h 大鼠尿液，离心机 2 500 r/min，离心 20 min，取上清。加样，温育，洗涤，显色，37 ℃避光显色 15 min 后终止反应。酶标分析仪波长为 450 nm 处测定吸光度，按照回归方程计算尿微量白蛋白的含量。

1.4.4　生化指标的检测　4 ℃解融血液标本，利用 BS-420 型全自动生化分析仪，依生化试剂盒操作说明进行空腹血糖、血肌酐、尿素氮水平检测。

1.4.5　实时荧光定量 PCR　Trizol 法提取肾脏组织总 RNA，反转录为相应的 cDNA，进行实时荧光定量 PCR，引物序列见**表 1**。

表 1 | 引物序列
Table 1 | **Primer sequences**

基因	Forward primer	Reverse primer
转化生长因子 β1	5′- GGC ACC ATC CAT GAC ATG AAC CG -3′	5′- GCC GTA CAC AGC ACT TCT TCT CTG -3′
血管内皮生长因子受体 2	5′-TTC ATA ATA GAA GGC GTC CAG G -3′	5′-GCA TCA TAA GGC AAG CGT TC -3′
PTEN	5′-CAG CCA TCA TCA AAG AGA TCG TTA GC -3′	5′- CAA CAT GAT TGT TGT CGT TCA CTT AGC -3′
β-actin	5′-CAA CCT TCT TGC AGC TCC TC-3′	5′-CGG TGT CCC TTC TGA GTG TT-3′
MicroRNA-126	5′ -CAC TTC AAA CTC GTA CCG TGA GTA A-3′	5′-CAG GGC TAT GCC GCC TAA-3 ′

MicroRNA-126 PCR 反应总体系 20 μL，94 ℃变性 15 min，55 ℃退火 30 s，70 ℃延伸 30 s，40 个循环，每个样本设 3 复孔，has-U6 为参照。转化生长因子 β1、血管内皮生长因子受体 2 及 PTEN 的 PCR 反应总体系 20 μL，95 ℃变性 10 min，60 ℃退火 1 min，95 ℃延伸 15 s，40 个循环，每个样本设 3 复孔，β-actin 为参照。实验结果由 Bio-Rad 荧光定量分析软件读取，转化生长因子 β1、血管内皮生长因子受体 2 及 PTEN mRNA 及 MicroRNA-126 表达水平的定量计算用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来表示 (CT 为循环数)。

1.4.6　Western blot 检测　取适量肾脏组织标本，加入含磷酸酶抑制剂和蛋白酶的裂解液，超声破碎后在 4 ℃条件下 14 000 r/min 离心 15 min，收集上清液，BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度，取变性蛋白 20 μg/ 孔，10% 的十二烷基硫酸钠 − 聚丙烯酰胺凝胶电泳后按湿转法将产物转印到聚偏氟丙烯膜上，使用含 5% 牛血清蛋白室温条件下封闭 2 h，加入一抗 (转化生长因子 β1，1 ∶ 1 000；血管内皮生长因子受体 2，1 ∶ 1 000；PTEN，1 ∶ 1 000；β-actin，1 ∶ 5 000) 在 4 ℃条件下孵育过夜，TBST 洗膜 3 次后加入 HRP 标记 IgG(1 ∶ 10 000)，在室温条件下孵育 2 h，洗膜 3 次，采用高敏化学发光法处理后用凝胶定量分析系统检测蛋白含量，以所得条带的吸光度与内参照 β-actin 吸光度的比值代表表达量。

1.4.7　免疫组织化学检测　肾脏组织标本固定，石蜡包埋，脱蜡水化，除去内源性过氧化物酶，枸橼酸抗原修复，封闭血清，滴加特异性一抗，4 ℃过夜，滴加二抗，显色。阴性对照采用 PBS 代替一抗，阳性着色为棕黄色颗粒。

1.4.8　电镜观察　取肾脏组织经 2.5% 戊二醛固定 2 h，漂洗过夜，1% 锇酸固定 2 h，漂洗后，丙酮酸梯度脱水，浸透包埋，切片，铅铀双重电子染色，透射电镜观察组织超微结构，拍片。

1.4.9　苏木精 − 伊红染色　取肾脏组织经 40 g/L 多聚甲醛中固定 48 h 后，常规石蜡包埋、切片，行苏木精 − 伊红染色，进行组织形态病理学观察。

1.4.10　Masson 染色　常规石蜡包埋、切片，Masson 染色后光镜下观察肾脏结构及肾脏纤维化程度。

1.5 主要观察指标 ①各组大鼠空腹血糖、血肌酐、尿素氮及 24 h 尿微量白蛋白水平；②各组大鼠肾脏 MicroRNA-126、转化生长因子 β1、血管内皮生长因子受体 2 及 PTEN 的表达水平；③各组大鼠肾脏组织病理学变化。

1.6 统计学分析 实验数据采用 SPASS 25.0 统计软件进行处理，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组之间比较采用独立样本 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，组内两两比较采用 LSD 法，以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 纳入健康 SPF 级 SD 大鼠 24 只，随机分为 2 组，正常组 6 只，糖尿病肾病模型组 18 只，再将糖尿病肾病大鼠随机分为模型组、二甲双胍组、达格列净组 (n=6)，24 只大鼠均被纳入结果分析。

2.2 各组大鼠空腹血糖、血肌酐、尿素氮及 24 h 尿微量白蛋白水平比较 模型组大鼠空腹血糖、血肌酐、尿素氮及 24 h 尿微量白蛋白水平较正常组明显升高 ($P < 0.05$)；与模型组相比，二甲双胍组和达格列净组大鼠空腹血糖、血肌酐、尿素氮及 24 h 尿微量白蛋白水平明显降低 ($P < 0.05$)；达格列净组大鼠空腹血糖、血肌酐、尿素氮及 24 h 尿微量白蛋白水平较二甲双胍组明显降低 ($P < 0.05$)，见**表 2**。

表 2 | 各组大鼠空腹血糖、血肌酐、尿素氮及 24 h 尿微量白蛋白水平比较 ($\bar{x}\pm s$，n=6)

Table 2 | Comparison of fasting blood glucose, serum creatinine, urea nitrogen, and 24-hour urinary microalbumin levels among groups

组别	空腹血糖 (mmol/L)	血肌酐 (μmol/L)	尿素氮 (mmol/L)	24 h 尿微量白蛋白 (mg)
模型组	8.70±0.25[a]	127.15±6.30[a]	18.48±2.45[a]	76.41±3.92[a]
二甲双胍组	7.12±0.29[b]	85.19±4.63[b]	9.49±1.10[b]	40.88±3.46[b]
达格列净组	6.34±0.26[bc]	68.56±3.45[bc]	7.64±0.35[bc]	26.11±2.24[bc]
正常组	5.03±0.43	32.83±2.38	5.87±0.36	10.26±1.19

表注：与正常组相比，[a]$P < 0.05$；与模型组相比，[b]$P < 0.05$；与二甲双胍组相比，[c]$P < 0.05$

2.3 肾脏组织病理学观察

2.3.1 电镜观察大鼠肾脏组织超微结构改变 模型组大鼠肾脏系膜增宽程度、内皮细胞呈水肿状态较正常组明显加重，同时可见系膜区细颗粒状沉积及足突阶段性融合；与模型组相比，二甲双胍组和达格列净组大鼠肾脏系膜细胞增生程度减轻，系膜区可见低密度电子沉积物，足突轻度融合；达格列净组较二甲双胍组大鼠肾脏系膜增宽减轻，偶见沉积物，足突排列较良好，见**图 1**。

2.3.2 苏木精－伊红染色观察大鼠肾脏形态病理学改变 模型组大鼠肾脏肾小球形态极不规则，鲍曼囊腔发生严重粘连，肾小管呈重度水肿并伴有坏死；二甲双胍组大鼠肾脏肾小球形态较为规则，鲍曼囊腔逐渐缩小，肾小管中度水肿；达格列净组大鼠肾脏肾小球形态相对规则，鲍曼囊腔逐渐缩小，肾小管轻度水肿；正常组大鼠肾脏肾小球及肾小管形态规则，见**图 2**。

2.3.3 Masson 染色观察肾脏纤维化改变 模型组大鼠肾脏肾小球内出现大量蓝染的胶原纤维和极少量红染的正常肾脏组织；二甲双胍组大鼠肾脏组织呈局灶状蓝染胶原纤维沉积；达格列净组大鼠肾脏组织呈部分蓝染胶原纤维沉积；正常组大鼠肾脏组织呈红染状态，见**图 3**。

2.4 各组大鼠肾脏 MicroRNA-126、转化生长因子 β1、血管内皮生长因子受体 2 及 PTEN 表达水平比较

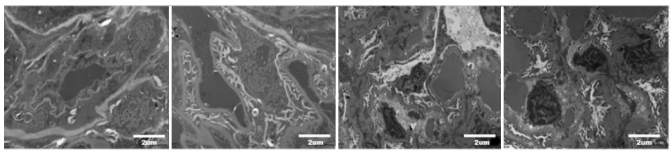
2.4.1 MicroRNA-126 的表达水平 模型组大鼠肾脏 MicroRNA-126 的表达水平较正常组明显降低 ($P < 0.05$)；与模型组相比，二甲双胍组和达格列净组大鼠肾脏 MicroRNA-126 的表达水平明显升高 ($P < 0.05$)；达格列净组大鼠肾脏 MicroRNA-126 的表达水平较二甲双胍组明显升高 ($P < 0.05$)，见**图 4**。

2.4.2 转化生长因子 β1、血管内皮生长因子受体 2 及 PTEN mRNA 及蛋白的表达水平 模型组大鼠肾脏转化生长因子 β1 及血管内皮生长因子受体 2 mRNA 及蛋白的表达水平较正常组明显升高 ($P < 0.05$)，PTEN mRNA 及蛋白的表达水平则明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比，二甲双胍组和达格列净组大鼠肾脏转化生长因子 β1 及血管内皮生长因子受体 2 mRNA 及蛋白的表达水平明显降低 ($P < 0.05$)，PTEN mRNA 及蛋白的表达水平则明显升高 ($P < 0.05$)。达格列净组大鼠肾脏转化生长因子 β1 及血管内皮生长因子受体 2 mRNA 及蛋白的表达水平较二甲双胍组明显降低 ($P < 0.05$)，而 PTEN mRNA 及蛋白的表达水平则明显升高 ($P < 0.05$)，见**图 5**，**6**。

免疫组化检测显示，蛋白表达阳性着色为棕黄色颗粒，模型组大鼠肾脏肾小球及肾小管转化生长因子 β1 及血管内皮生长因子受体 2 蛋白的表达水平较正常组明显升高，PTEN 蛋白的表达水平则明显降低；与模型组相比，二甲双胍组和达格列净组大鼠肾脏肾小球及肾小管转化生长因子 β1 及血管内皮生长因子受体 2 蛋白的表达水平明显降低，PTEN 蛋白的表达水平则明显升高；达格列净组大鼠肾脏肾小球及肾小管转化生长因子 β1 及血管内皮生长因子受体 2 蛋白的表达水平较二甲双胍组明显降低，而 PTEN 蛋白的表达水平则明显升高，见**图 7**。

3 讨论 Discussion

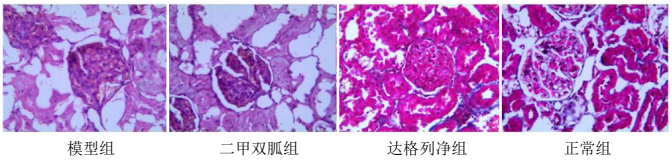
目前尽管有多种有效控制糖尿病的治疗方法，但糖尿病肾病仍然是全世界终末期肾病肾功能衰竭最主要的病因。据报道，经肾脏过滤的葡萄糖 90% 会通过钠－葡萄糖协同转运蛋白 2 被重新吸收，而达格列净作为一种新型的降糖药，它可以通过选择性抑制钠－葡萄糖转运蛋白 2 的表达，减少肾近端小管对葡萄糖的重吸收，钠－葡萄糖转运蛋白 2 阻断剂可能是治疗糖尿病及其肾脏并发症的一个潜在靶点 [17-19]。达格列净通过降低糖毒性，可改善胰岛 β 细胞的功能，使胰岛素的代谢及糖异生保持相对稳定的状态，在防止葡萄糖内向流入肾小管细胞过程中，还有助于缓解糖尿病肾病肾脏损伤程度 [20]。有研究显示，达格列净可延缓 1 型糖尿病小鼠蛋白尿和肾损害的发生，在糖尿病肾病大鼠模型中，达格列净通过调节高血糖引起的炎症、氧化损伤、纤维化及凋亡机制发挥对糖尿病肾病大鼠早期的肾脏保护作用 [3]。



图注：达格列净可明显改善糖尿病肾病大鼠的肾脏超微结构，作用优于二甲双胍。标尺 =2 μm

图 1 ｜电镜观察各组大鼠肾脏结构的变化

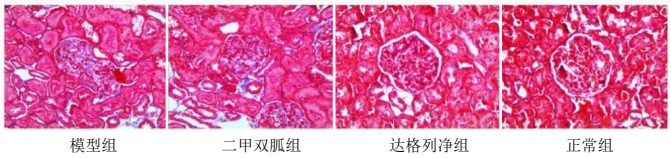
Figure 1 ｜ The changes of renal structure in rats under electron microscope



图注：达格列净可改善糖尿病肾病大鼠的肾脏组织形态，作用优于二甲双胍

图 2 ｜苏木精－伊红染色观察各组大鼠大鼠肾脏形态 (x400)

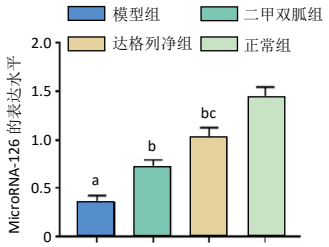
Figure 2 ｜ Hematoxylin-eosin staining of the rat kidney (×400)



图注：达格列净可改善糖尿病肾病大鼠的肾脏纤维化改变，作用优于二甲双胍

图 3 ｜ Masson 染色观察各组大鼠肾脏纤维化改变 (x400)

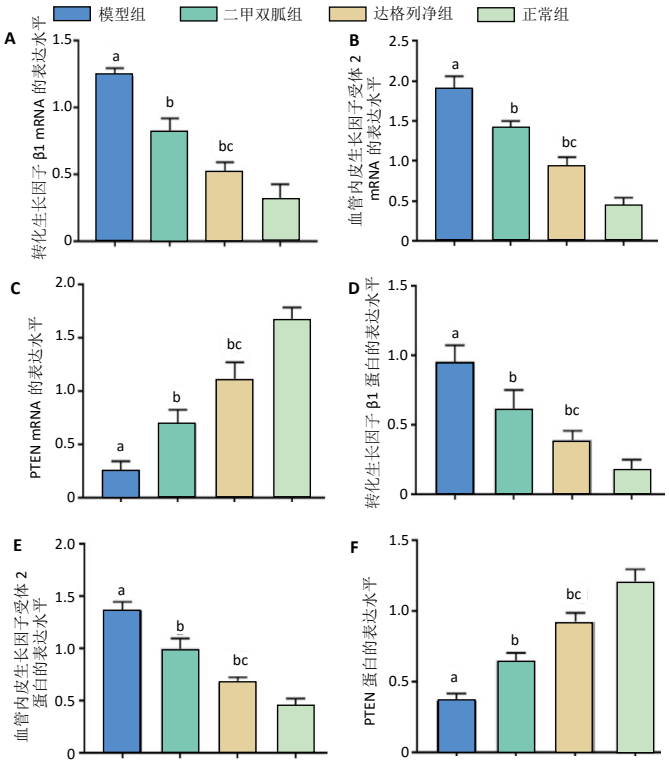
Figure 3 ｜ Masson staining of the changes of renal fibrosis in rats (×400)



图注：与正常组相比，$^{a}P < 0.05$；与模型组相比，$^{b}P < 0.05$；与二甲双胍组相比，$^{c}P < 0.05$

图 4 ｜各组大鼠 MicroRNA-126 的表达水平

Figure 4 ｜ Expression level of microRNA-126 in rats



图注：图 A–C 分别表示转化生长因子 β1、血管内皮生长因子受体 2 及 PTEN mRNA 的表达水平，图 D–F 分别表示转化生长因子 β1、血管内皮生长因子受体 2 及 PTEN 蛋白的表达水平。与正常组相比，$^{a}P < 0.05$；与模型组相比，$^{b}P < 0.05$；与二甲双胍组相比，$^{c}P < 0.05$。PTEN：磷酸酶和张力蛋白同系物

图 5 ｜各组大鼠转化生长因子 β1、血管内皮生长因子受体 2 及 PTEN mRNA 及蛋白的表达水平比较

Figure 5 ｜ mRNA and protein expression levels of transforming growth factor-β1, vascular endothelial growth factor receptor 2, and phosphate and tension homology deleted on chromosome ten in rats

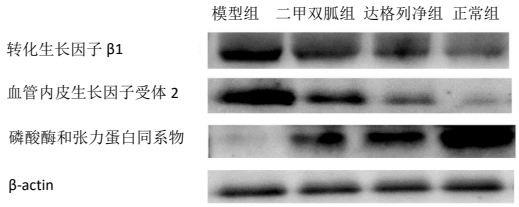
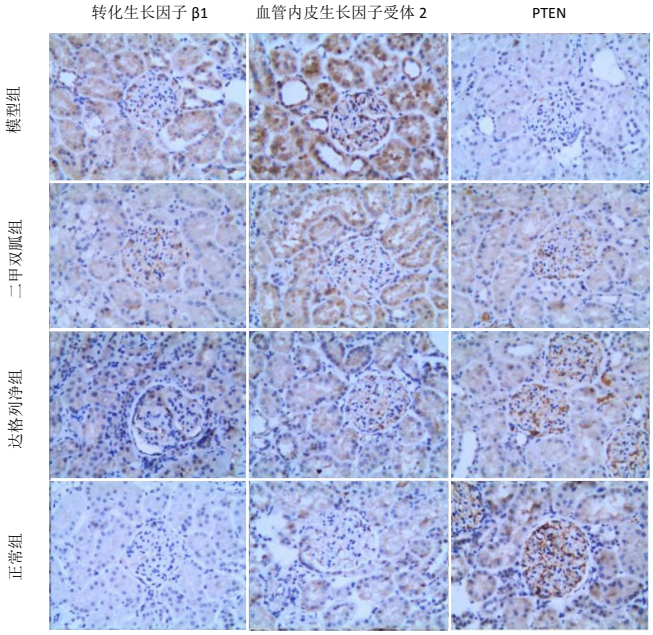


图 6 ｜各组大鼠转化生长因子 β1、血管内皮生长因子受体 2 及磷酸酶和张力蛋白同系物蛋白印迹图

Figure 6 ｜ Western blot detection of transforming growth factor-β1, vascular endothelial growth factor receptor 2, and phosphate and tension homology deleted on chromosome ten in rats



图注：蛋白表达阳性着色为棕黄色颗粒。与模型组相比，二甲双胍组和达格列净组大鼠肾脏肾小球及肾小管转化生长因子 β1 及血管内皮生长因子受体 2 蛋白的表达水平明显降低，PTEN 蛋白的表达水平则明显升高；达格列净组的上述作用更加明显。PTEN：磷酸酶和张力蛋白同系物

图 7 ｜各组大鼠转化生长因子 β1、血管内皮生长因子受体 2 及 PTEN 蛋白的表达 (免疫组化，×400)

Figure 7 ｜ Immunohistochemical detection of transforming growth factor-β 1, vascular endothelial growth factor receptor 2, and phosphate and tension homology deleted on chromosome ten (×400)

研究表明，MicroRNA-126 与糖尿病的发展进程密切相关，它可以作用于胰岛素受体底物 1，抑制胰岛素抵抗 [21-22]。在内皮细胞中，MicroRNA-126 特异性表达的降低是导致糖尿病微血管并发症发生的重要因素，此外，MicroRNA-126 还可经囊泡转运参与启动血管内皮损伤修复机制，从而发挥生物学功能 [23-24]。研究发现，糖尿病患者的血糖水平与血清 MicroRNA-126 的含量呈负相关，且 MicroRNA-126 水平越低，越易发生周围动脉相关疾病 [25]。在 2 型糖尿病患者有无肾病的临床研究中发现，有肾脏并发症的糖尿病患者 MicroRNA-126 的表达水平明显低于无肾病的糖尿病患者，血液 MicroRNA-126 水平可作为诊断糖尿病肾病新的标志物及治疗靶点。

此次研究通过观察达格列净对糖尿病肾病大鼠肾功能状态及 MicroRNA-126 表达水平的变化，探索达格列净通过 MicroRNA-126 对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护作用，结果显示，模型组大鼠空腹血糖、血肌酐、尿素氮及 24 h 尿微量白蛋白水平较正常组明显升高 ($P < 0.05$)；二甲双胍和达格列净组大鼠较模型组空腹血糖、血肌酐、尿素氮及 24 h 尿微量白蛋白水平明显降低 ($P < 0.05$)；达格列净组大鼠空腹血糖、血肌酐、尿素氮及 24 h 尿微量白蛋白水平较二甲双胍组明显降低 ($P < 0.05$)。经实时荧光定量 PCR 结果显示，模型组大鼠肾脏 MicroRNA-126 的表达水平较正常组明显降低 ($P < 0.05$)；二甲双胍和达格列净组大鼠肾脏较模型组 MicroRNA-126 的表达水平明显升高 ($P < 0.05$)；达格列净组大鼠肾脏 MicroRNA-126 的表达水平较二甲双胍组明显升高 ($P < 0.05$)。电镜结果显示，模型组大鼠肾脏系膜增宽程度、内皮细胞呈水肿状态较正常组明显加重，同时可见系膜区细颗粒状沉积及足突阶段性融合；二甲双胍和达格列净组大鼠肾脏较模型组系膜细胞增生程度减轻，在系膜区可见低密度电子沉积物，足突轻度融合；达格列净较二甲双胍组大鼠肾脏系膜增宽减轻，偶见沉积物，足突排列较良好。苏木精－伊红染色结果显示，模型组大鼠肾脏肾小球形态极不规则，鲍曼囊腔发生严重粘连，肾小管呈重度水肿并伴有坏死；二甲双胍组大鼠肾脏肾小球形态较为规则，鲍曼囊腔逐渐缩小，肾小管中度水肿；达格列净组大鼠肾脏肾小球形态相对规则，鲍曼囊腔逐渐缩小，肾小管轻度水肿；正常组大鼠肾脏肾小球及肾小管形态规则。Masson 染色显示，模型组大鼠肾脏肾小球内出现大量蓝染的胶原纤维和极少量红染的正常肾脏组织；二甲双胍组大鼠肾脏组织呈局灶状蓝染胶原纤维沉积；达格列净组大鼠肾脏组织呈部分蓝染胶原纤维沉积；而正常组大鼠肾脏组织则呈红染状态。提示达格列净可改善糖尿病肾病的肾功能状态，并可能通过上调 MicroRNA-126 的表达水平发挥对肾小球及肾小管的保护作用。

同时有研究证实，转化生长因子 β1 作为糖尿病肾病肾脏纤维化的重要致病因子已被多项研究证实，血管内皮生长因子受体 2 则是具有酪氨酸激酶活性的血管内皮生长因子的受体，经血管内皮生长因子诱导参与糖尿病肾病蛋白尿的生成以及肾小球系膜细胞的增生，而 PTEN 在高糖环境下的肾小管上皮细胞内及糖尿病肾病小鼠肾脏中表达水平的下降，可刺激转化生长因子 β1 表达水平的升高，诱发肾脏的纤维化 [14，26-29]。据报道，MicroRNA-126 可通过调节血管内皮生长因子和转化生长因子 β 的协同作用，影响细胞免疫调节及周期、细胞的增殖与凋亡，MicroRNA-126 还可靶向 PTEN 诱导 PI3K/AKT 活化刺激骨髓间充质干细胞进行损伤修复 [30-31]。因而，此次研究在发现达格列净可能通过 MicroRNA-126 保护糖尿病肾病大鼠肾脏的前提下，进一步探索达格列净是否经调节 MicroRNA-126 的相关因子转化生长因子 β1、血管内皮生长因子受体 2 及 PTEN 改善糖尿病肾病大鼠的肾脏损伤过程。实时荧光定量 PCR、Western blot 及免疫组化结果显示，模型组大鼠肾脏转化生长因子 β1 及血管内皮生长因子受体 2 mRNA 及蛋白的表达水平较正常组明显升高 ($P < 0.05$)，PTEN mRNA 及蛋白的表达水平则明显降低 ($P < 0.05$)；与模型组相比，二甲双胍组和达格列净组大鼠肾脏转化生长因子 β1 及血管内皮生长因子受体 2 mRNA 及蛋白的表达水平明显降低 ($P < 0.05$)，PTEN mRNA 及蛋白的表达水平则明显升高 ($P < 0.05$)；达格列净组大鼠肾脏转化生长因子 β1 及血管内皮生长因子受体 2 mRNA 及蛋白的表达水平较二甲双胍组明显降低 ($P < 0.05$)，而 PTEN mRNA 及蛋白的表达水平则明显升高 ($P < 0.05$)；提示达格列净可能通过上调 MicroRNA-126 的表达水平，来抑制转化生长因子 β1 及血管内皮生长因子受体 2 的表达，刺激 PTEN 蛋白的合成，改善肾脏的纤维化及肾脏损伤的程度，但具体的调节机制尚未明确，仍是需要研究的方向。

综上所述，达格列净可改善糖尿病肾病大鼠肾脏的功能，还可能通过上调大鼠肾脏 MicroRNA-126 的表达水平，抑制转化生长因子 β1 及血管内皮生长因子受体 2 的表达，诱导 PTEN 的表达，延缓糖尿病肾病大鼠的肾脏损伤过程，该结果可为达格列净用于糖尿病肾病的防治提供理论依据。

作者贡献：实验设计为第一作者通讯作者，实验实施为全体作者，第一作者收集资料及完成论文，通讯作者审校。

经费支持：该文章接受了“新疆维吾尔自治区自然科学基金(2020D01C192)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

机构伦理问题：实验方案经新疆医科大学动物实验中心动物实验伦理委员会批准 (批准号：20200531-12)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明：文章统计学方法已经新疆医科大学统计学专家审核。

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。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名－非商业性使用－相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] WU JX, JIA A, TAN YF, et al. Effect of Alpina oxyphylla extract on streptozotocin-induced kidney injure via regulating TGF-β1 and MyD88. BMC Complement Med Ther. 2020;20:217.

[2] DESIRÉE LR, ALBERTO MC, JOSÉ LG, et al. Pathophysiological role and therapeutic implications of inflammation in diabetic nephropathy. World J Diabetes. 2012;3(1):7-18.

[3] MAMDOUH A, MOHAMMED F, MARWA M, et al. Dapagliflozin attenuates early markers of diabetic nephropathy in fructose-streptozotocin-induced diabetes in rats. Biomed Pharmacother. 2019; 109:910-920.

[4] WANNER C, INZUCCHI SE, LACHIN JM, et al. Empagliflozin and progressionof kidney disease in type 2 diabetes. N Engl J Med. 2016; 375:323-334.

[5] 祝再然，张明，赵桂金，等. SGLT2 抑制剂对糖尿病肾病大鼠足细胞损伤及 PTEN/PI3K/Akt 信号通路的影响 [J]. 广东医学 ,2020,41(24): 2490-2494.

[6] BHATT K, MI QS, DONG Z. MicroRNAs in kidneys: biogenesis, regulation, and pathophysiological roles. Am J Physiol. 2011;300(3):F602-610.

[7] SUN T, LIU Y, LIU L, et al. MicroRNA-544 attenuates diabetic renal injury via suppressing glomerulosclerosis and inflammation by targeting FASN. Gene. 2020;723:143986.

[8] FENG Y, JIN MY, LIU DW, et al. Correction: Proteasome subunit-alpha type-6 protein is post-transcriptionally repressed by the microRNA-4490 in diabetic nephropathy. Biosci Rep. 2019;1:39.

[9] WANG S, AURORA AB, JOHNSON BA, et al. The endo-thelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrityand angiogenesis. Dev Cell. 2008;15:261-271.

[10] GHADA AK, GHAZI AM, HALFA ABDULLA AM, et al. Decreased expression of circulating microRNA-126 in patients with type 2 diabetic nephropathy: A potential blood-based biomarker. Exp Ther Med. 2016; 12:815-822.

[11] SUN F, YU PF, WANG D, et al. MicroRNA-488 regulates diabeticnephropathy via TGF-β1 pathway. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2019;23:4333-4340.

[12] LAVOZ C, RODRIGUES-DIEZ R, ANITA PLAZA A, et al. VEGFR2 Blockade Improves Renal Damage in an Experimental Model of Type 2 Diabetic Nephropathy. J Clin Med. 2020;9:302.

[13] YUAN Y, SHEN C, ZHAO SL, et al. MicroRNA-126 affects cell apoptosis, proliferation, cell cycle and modulates VEGF/TGF-β levels in pulmonary artery endothelial cells. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2019;23: 3058-3069.

[14] LI YJ, HU QS, LI CL, et al. PTEN-induced partial epithelial-mesenchymal transition drives diabetic kidney disease. J Clin Invest. 2019;129(3):1129-1151.

[15] GE R, LV YT, LI PP, et al. Upregulated microRNA-126 induces apoptosis of dental pulp stem cell via mediating PTEN-regulated Akt activation. J Clin Lab Anal. 2021;35:e23624.

[16] CHEN SR, CAI WP, DAI XJ, et al. Research on miR-126 in glioma targeted regulation of PTEN/PI3K/Akt and MDM2-p53 pathways. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2019;23:3461-3470.

[17] 章江南. 达格列净对早期 2 型糖尿病肾病临床效果及尿微量白蛋白的影响 [J]. 北方药学 ,2020,17(6):8-9.

[18] HATANAKA T, OGAWA D, TACHIBANA H, et al. Inhibition of SGLT2 alleviates diabetic nephropathy by suppressing high glucose-induced oxidative stress in type 1 diabetic mice. Pharmacol. Res Perspect. 2016; 4:e00239.

[19] ISHIBASHI Y, MATSUI T, YAMAGISHI S. Tofogliflozin, a highly selective inhibitor of SGLT2 blocks proinflammatory and proapoptotic effects of glucose overload on proximal tubular cells partly by suppressing oxidative stress generation. Horm Metab Res. 2016;48:191-195.

[20] VJERA N, TEA O, HRVOJE R, et al. Renal Benefits of SGLT 2 Inhibitors and GLP-1Receptor Agonists: Evidence Supporting a Paradigm Shift in the Medical Management of Type 2 Diabetes. Int J Mol Sci. 2019;20:5831.

[21] PAPAIT R, SERIO S, PAGIATAKIS C, et al. Histone methyltransferase G9a is required for cardiomyocyte homeostasis and hypertrophy. Circulation. 2017;136:33-34.

[22] TOMASETTI M, NOCCHI L, STAFFOLANI S, et al. MicroRNA-126 suppresses mesothelioma malignancy by targeting IRs1 and interfering with the mitochondrial function. Antioxid Redox Signal. 2014;21(15):2109-2125.

[23] 崇显瑾，余青原，杨历新. 2 型糖尿病肾病患者血清中 miR-126 和 sVCAM-1 的表达关系及意义 [J]. 河北医药 ,2019,41(3):334-342.

[24] HU Z, WONG KW, ZHAO HM, et al. Sendai virus mucosal vaccination establishes lung-resident memory CD8 T cell immunity and boosts BCG-Primed protection against TB in mice. Mol Ther J Am Soc Gene Ther. 2017;25:1222-1233.

[25] 郭晓莉，陈艳，马卫国. 等. 血液循环中 miR-126 作为标志物对 2 型糖尿病肾脏疾病患者诊断的临床意义 [J]. 临床肾脏病杂志 ,2017, 17(6):361-365.

[26] JAMES V, PAUL H, MATTHEW S, et al. Anti–TGF-b1 Antibody Therapy in Patients with Diabetic Nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2017;28: 953-962.

[27] JIN J, CHAO PENG C, WU SZ, et al. Blocking VEGF/Caveolin-1 signaling contributes to renal protection of fasudil in streptozotocin-induced diabetic rats. Acta Pharmacologica Sinica. 2015;36:831-840.

[28] YU SJ, ZHAO HR, YANG WJ, et al. The Alcohol Extract of Coreopsis tinctoria Nutt Ameliorates Diabetes and Diabetic Nephropathy in db/db Mice through miR-192/miR-200b and PTEN/AKT and ZEB2/ECM Pathways. BioMed Res Int. 2019;2019:5280514.

[29] CHEN KH, DAI HZ, YUAN JJ, et al. Optineurin-mediated mitophagy protects renal tubular epithelial cells against accelerated senescence in diabetic nephropathy. Cell Death Dis. 2018;9:105.

[30] MAHMOUDI RM, MAHMOUDI RN, MIRDAMADI Y. Expression of TGF-beta3 in isolated fibroblasts from foreskin. Rep Biochem Mol Biol. 2015;3:76-81.

[31] DING JN, WANG X, CHEN B, et al. Exosomes Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Stimulated by Deferoxamine Accelerate Cutaneous Wound Healing by Promoting Angiogenesis. BioMed Res Int. 2019;2019:9742765.

（责任编辑：GD，ZN，SX）