

# 雷帕霉素抑制糖尿病大鼠肾Akt/NF- $\kappa$ B信号通路介导的炎症反应的机制研究

徐麟皓<sup>1</sup> 张晓明<sup>2</sup> 王 征<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>浙江医学高等专科学校解剖教研室, 杭州 310053; <sup>2</sup>浙江大学医学院解剖教研室, 杭州 310058)

**摘要** 该文探讨了雷帕霉素在抑制糖尿病大鼠肾脏中炎症反应的分子机制。30只SD大鼠随机分为三组: 对照组、糖尿病组、雷帕霉素治疗组(1 mg/kg/d)。采用一次腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, 65 mg/kg)制备糖尿病模型。注射STZ 2 d后, 雷帕霉素治疗组于皮下注射雷帕霉素, 对照组和糖尿病组注射等量的生理盐水。实验结果表明, 造模6周后, 糖尿病组大鼠血清中肌酐和尿素氮含量增高, 而雷帕霉素能够明显降低肌酐和尿素氮的表达水平( $P < 0.05$ )。苏木精-伊红染色显示, 糖尿病大鼠中肾小囊变狭, 基底膜完整性受损, 肾小管上皮细胞肥大。同时, 在糖尿病大鼠中, 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、磷酸化蛋白激酶B(phosphorylated protein kinase B, p-Akt)及核转录因子- $\kappa$ B p65(nuclear transcription factor- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ B p65)的表达均上升。而雷帕霉素能够改善肾病病理结构, 并降低TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、p-Akt和NF- $\kappa$ B p65的表达。雷帕霉素能够缓解糖尿病大鼠肾功能的损伤, 而这与抑制Akt/NF- $\kappa$ B信号通路介导的炎症反应有关。

**关键词** 雷帕霉素; 糖尿病肾病; 蛋白激酶B; 核转录因子- $\kappa$ B p65

## The Study in Mechanism of Rapamycin on Suppressing Inflammation via Akt/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in Renal Tissue of Diabetic Rats

Xu Linhao<sup>1</sup>, Zhang Xiaoming<sup>2</sup>, Wang Zheng<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Anatomy, Zhejiang Medical College, Hangzhou 310053, China;

<sup>2</sup>Department of Anatomy, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract** This article explored the mechanisms of rapamycin on suppressing inflammation in renal tissue of diabetic rats. 30 male SD rats were randomly divided into 3 groups: control group, diabetes group and diabetes with rapamycin treatment group (1 mg/kg/d). Streptozotocin (65 mg/kg) was injected to induce diabetes in rats. After 2 days of streptozotocin injection, rats in diabetes with rapamycin treatment group received subcutaneous injection of rapamycin, while rats in control and diabetes groups were injected an equal volume of saline. After 6 weeks, it was found that the levels of creatinine and urea nitrogen in serum increased in diabetic rats ( $P < 0.05$ ), which could be reduced by rapamycin treatment. Hematoxylin and eosin staining showed that glomerular capsule was narrowed, the integrity of basement membrane was disturbed, tubular epithelial cell was hypertrophic in diabetic rats. Meanwhile, the expression levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6),

收稿日期: 2015-05-27 接受日期: 2015-08-10

浙江省教育厅科研项目(批准号: Y201326586)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-87692675, E-mail: quanquan7869@sohu.com

Received: May 27, 2015 Accepted: August 10, 2015

This work was supported by Scientific Research Foundation of the Education Department of Zhejiang Province (Grant No. Y201326586)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-87692675, E-mail: quanquan7869@sohu.com

网络出版时间: 2015-09-17 16:40:50

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150917.1640.006.html>

phosphorylated protein kinase B (p-Akt) and nuclear transcription factor- $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65) were significantly increased in renal tissue of diabetic rats. However, the pathological structure was alleviated and the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, p-Akt, NF- $\kappa$ B p65 were significantly reduced by rapamycin treatment. These results suggested that rapamycin could ameliorate renal dysfunction in diabetic rats, which might be related to suppress inflammation via Akt/NF- $\kappa$ B signaling pathway in renal tissue.

**Keywords** rapamycin; diabetic nephropathy; protein kinase B; nuclear transcription factor- $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65)

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的主要慢性并发症之一,具有较高的发病率<sup>[1]</sup>。其主要的病理表现为肾小球肥大、肾小球基底膜受损、系膜基质扩张及肾小管上皮细胞肿胀。这些病理变化会引起肾功能紊乱,最终导致终末期肾病的发生<sup>[2]</sup>。临床研究发现,糖尿病病人的肾脏中核转录因子- $\kappa$ B p65(nuclear transcription factor- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ B p65)的表达上升,出现大量T淋巴细胞和巨噬细胞增生所导致的炎症反应<sup>[3-4]</sup>,而降低糖尿病病人肾脏组织中的炎症反应能够恢复其肾功能<sup>[5]</sup>。因此,降低糖尿病肾脏的炎症反应是目前临床上常用的一种治疗手段。

雷帕霉素作为一种新型免疫抑制剂,能够通过抑制雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的信号通路来控制T淋巴细胞及其他细胞的增生,从而抑制炎症反应<sup>[6]</sup>。有研究表明,雷帕霉素可以减少糖尿病肾脏中细胞基质外蛋白的表达以及细胞的凋亡<sup>[7-9]</sup>,但其是否能够减轻糖尿病肾脏的炎症反应却没有相关的报道。而最新的研究证实,雷帕霉素可以抑制高血压性青光眼中蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)磷酸化和NF- $\kappa$ B p65的表达<sup>[10]</sup>,而NF- $\kappa$ B p65可以直接诱导各种炎症因子的表达<sup>[11]</sup>。因此,我们推测,雷帕霉素可能通过Akt/NF- $\kappa$ B通路来调控糖尿病肾脏中炎症反应。

本文主要通过糖尿病大鼠模型中皮下注射雷帕霉素,观察其对肾组织的形态结构以及肾功能的影响,并验证雷帕霉素能否抑制Akt/NF- $\kappa$ B通路的激活,初步探究其治疗糖尿病肾病的分子机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

雄性Sprague-Dawley大鼠30只,体重160±20 g,由浙江大学实验动物中心提供。

### 1.2 试剂和仪器

雷帕霉素(rapamycin)、链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自Sigma公司;大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor

necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)及ELISA试剂盒购自R&D公司;兔抗大鼠p-Akt和NF- $\kappa$ B p65多克隆抗体购自Santa Cruz公司;生物素标记的羊抗小鼠IgG及抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶复合物购自武汉博士德公司;DAB显色剂购自Sigma公司。

所用仪器有:血糖检测仪(MediSense, USA)、显微镜(Leica, Germany)及红外成像系统(Obyssey, LICOR Biosciences Biotechnology, USA)。

### 1.3 糖尿病模型制备

30只SD大鼠随机分为三组:对照组、糖尿病组和雷帕霉素治疗组,每组10只。糖尿病组、雷帕霉素治疗组中的大鼠禁食24 h后,通过腹腔注射单次链脲佐菌素来诱导糖尿病模型,临用前用0.5 mmol/L的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液(pH4.5)配制链脲佐菌素注射液(65 mg/kg),注射48 h后测量血糖,血糖浓度高于16.7 mmol/L,且有多饮、多尿、多食表现,说明造模成功。对照组中,10只大鼠同样禁食24 h后,腹腔注射等量上述缓冲液。雷帕霉素治疗组(1 mg/kg/d)每天分别定时皮下注射雷帕霉素,注射剂量参考文献[7],糖尿病组和正常对照组注射等量生理盐水,连续6周。每周测定体重和血糖。

### 1.4 血清中肌酐和尿素氮的检测

各组大鼠用1%戊巴比妥钠40 mg/kg腹腔注射麻醉。暴露心脏,用针头心脏采血,将血液采集到真空的肝素抗凝管中,在冰上放置30 min后,于4 °C、4 000 r/min转速下离心10 min,收集上清血清,保存在-80 °C冰箱中,用于血肌酐值、尿素氮检测。

### 1.5 苏木素-伊红染色、免疫组化染色

心脏采血后,各组取5只大鼠,生理盐水心脏灌注后换用300 mL 4%多聚甲醛灌注固定,脱水,取肾脏石蜡包埋,切5  $\mu$ m厚的连续切片,每5片取1片。石蜡切片脱蜡和水化后,贴附于载玻片上,制备两套切片,每套切片中,每个样本取两个切片。一套切片进行苏木素-伊红染色,观察肾脏形态结构。另一套切

片按照SABC法进行p-Akt和NF- $\kappa$ B p65免疫组织化学显色, 石蜡切片脱蜡和水化后用PBS(pH7.4)冲洗3次, 每次3 min; 每张切片加3%过氧化氢溶液。室温下温育10 min, 以阻断内源性过氧化物酶。PBS冲洗3次, 每次3 min, 然后每张加滴兔抗大鼠p-Akt和NF- $\kappa$ B p65多克隆抗体, 室温下温育60 min; PBS冲洗3次, 每次5 min; 加入生物素标记的羊抗兔IgG, 室温下温育20 min后用PBS洗3次, 每次3 min; 加入抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶复合物室温下温育30 min后用DAB呈色。显色3~10 min后用苏木素复染, 常规梯度酒精脱水干燥, 树胶封片。根据之前的研究报道, 我们用UTHSCSA Image Tool 3.0观察(University of Texas Medical School at San Antonio, TX, USA)单位面积中阳性细胞数量<sup>[12-13]</sup>。每张切片随机选取5个视野, 统计各视野阳性细胞数量, 并以其平均值作为该切片单位面积中的阳性细胞值。

### 1.6 ELISA测定肾组织中炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6的表达

将各组剩余5只大鼠的右侧肾组织, 制成10%匀浆, 采用酶联免疫吸附法(ELISA法)检测肾组织TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6的表达, 操作步骤按照试剂盒说明进行。

### 1.7 免疫印迹

每组剩余5只大鼠的左侧肾脏组织用细胞与组织全裂解液(碧云天生物有限公司)提取蛋白质; Bradford方法测蛋白质浓度, 调节蛋白质浓度一致, 取等量蛋白质样品(30 mg), SDS-PAGE电泳分离蛋白质, 湿法将蛋白质条带转移至PVDF膜上, 50g/L脱脂奶粉封闭1 h, 1:250的兔抗大鼠p-Akt和NF- $\kappa$ B于4 °C孵育过夜; 1:10 000荧光标记的羊抗兔IgG室温1 h。PVDF膜于红外成像系统下扫描(Obyssey), 进行吸光度分析(Image J), 用同一标本内参进行校正, 并按公式相对值=目的条带表达强度/ $\beta$ -肌动蛋白表达强度计算出相对值。

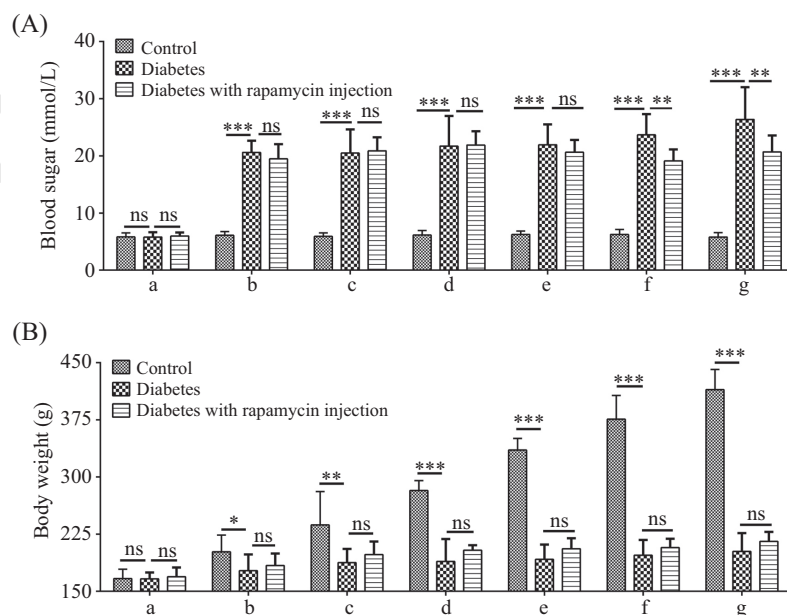
### 1.8 统计学分析

各组数据用mean $\pm$ S.D.表示, 多组比较用One-Way ANOVA法检验, 两两之间比较采用Tukey法检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 雷帕霉素对体重和血糖影响

实验结果显示, 在注射STZ之前, 三组大鼠间血糖值和体重都没有显著性差异[血糖值:  $F(2, 27)=0.2$ ,



A: 各组大鼠的血糖值; B: 各组大鼠的体重值。a: STZ注射前; b: STZ注射1周后; c: STZ注射2周后; d: STZ注射3周后; e: STZ注射4周后; f: STZ注射5周后; g: STZ注射6周后。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; ns:  $P > 0.05$ 。  $n = 10$ 。

A: blood sugar of rats in each group; B: body weight of rats in each group. a: before STZ injection; b: after 1 week of STZ injection; c: after 2 weeks of STZ injection; d: after 3 weeks of STZ injection; e: after 4 weeks of STZ injection; f: after 5 weeks of STZ injection; g: after 6 weeks of STZ injection. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; ns:  $P > 0.05$ 。  $n = 10$ 。

图1 各组大鼠血糖及体重的比较

Fig.1 Comparison of blood sugar and body weight of rats in each group

$P=0.8118$ ; 体重:  $F(2, 27)=0.2, P=0.8358$ ]。而在造模1周到6周的过程中, 单因素方差分析显示, 三组大鼠的血糖值在每周测定时都存在着显著性差异[第1周:  $F(2, 27)=175.0, P<0.0001$ ; 第2周:  $F(2, 27)=94.5, P<0.0001$ ; 第3周:  $F(2, 27)=72.1, P<0.0001$ ; 第4周:  $F(2, 27)=129.0, P<0.0001$ ; 第5周:  $F(2, 27)=136.2, P<0.0001$ ; 第6周:  $F(2, 27)=83.2, P<0.0001$ ]。而在两组间的比较中, 可以看到, 从第1周到第6周, 与对照组大鼠相比, 糖尿病组大鼠的血糖值显著升高( $P<0.001$ , 图1A)。在前4周, 雷帕霉素治疗组中大鼠的血糖值与糖尿病大鼠没有显著性差异( $P>0.05$ , 图1A); 而到第5周和第6周时, 雷帕霉素治疗组中大鼠的血糖值虽然没有减低到正常的水平, 但是与糖尿病组相比, 有明显的降低( $P<0.05$ , 图1A)。同样, 单因素方差分析显示, 三组大鼠在每周测定时的体重也存在着显著性差异[第1周: ( $F(2, 27)=4.1, P=0.027$ ; 第2周:  $F(2, 27)=8.0, P=0.0018$ ; 第3周:  $F(2, 27)=69.5, P<0.0001$ ; 第4周:  $F(2, 27)=234.0, P<0.0001$ ; 第5周:  $F(2, 27)=200.2, P<0.0001$ ; 第6周:  $F(2, 27)=297.6, P<0.0001$ ]。而在两组间的比较中, 发现糖尿病组大鼠的体重在这六周期间较对照组大鼠有明显的减轻( $P<0.001$ , 图1B), 但是, 雷帕霉素治疗组中大鼠的体重与糖尿病大鼠组大鼠的体重没有显著性的差异( $P>0.05$ , 图1B)。以上数据说明, 雷帕霉素能够在一定程度上降低糖尿病大鼠的血糖浓度, 但是并不能够增加大鼠的体重。

## 2.2 雷帕霉素对血肌酐和血尿素氮的影响

同样, 在造模成功6周后, 单因素方差分析的结果也显示, 各组大鼠的血肌酐值[ $F(2, 27)=32.0, P<0.0001$ ]和尿素氮[ $F(2, 27)=26.9, P<0.0001$ ]都存在着显著性的差异。而在两组间的比较中, 糖尿病组大鼠的血肌酐值( $49.2\pm 7.8 \mu\text{mol/L}$ )和尿素氮( $12.2\pm 2.2 \text{mmol/L}$ )与对照组大鼠的血肌酐值( $25.6\pm 5.8 \mu\text{mol/L}$ )和尿素氮( $6.2\pm 2.2 \text{mmol/L}$ )相比, 均有显著增高( $P<0.001$ , 表1)。而经过雷帕霉素治

疗后, 大鼠的血肌酐值( $36.1\pm 6.0 \mu\text{mol/L}$ )和尿素氮( $8.0\pm 1.1 \text{mmol/L}$ )与糖尿病组大鼠相比, 都有明显的降低( $P<0.01$ , 表1)。

## 2.3 雷帕霉素对肾组织病理变化与相关炎症因子表达的影响

对照组中大鼠肾大小形状正常, 表面光滑; 光镜下可见肾小球结构清晰, 肾小管细胞形态正常, 排列整齐(图2A)。糖尿病组多数大鼠肾体积增大, 外观苍白、肿胀; 在光镜下可见肾小球体积增大, 细胞数量增多, 肾小囊变狭, 基底膜完整性受损, 并且肾小管上皮细胞肥大、肿胀、多空泡, 导致肾小管管腔变窄(图2B)。而雷帕霉素能够减少肾小管细胞肿胀, 抑制肾小球的肥大, 并且使肾小球系膜增厚, 细胞形态趋向正常(图2C)。为了进一步确认炎症反应的发生, 我们检测一些相关炎症因子, 如TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6在肾脏中的表达。单因素方差分析的结果显示, 在对照组、糖尿病组以及雷帕霉素治疗组中, 各组肾脏组织中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6的表达都存在显著性的差异[TNF- $\alpha$ :  $F(2, 12)=10.9, P=0.002$ ; IL-1 $\beta$ :  $F(2, 12)=11.5, P=0.0016$ ; IL-6:  $F(2, 12)=13.4, P=0.0009$ ]。而在两组间的比较中, 与对照组相比, 炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6在糖尿病组大鼠肾脏组织中表达明显升高( $P<0.01$ , 图2D~图2F); 而经过雷帕霉素治疗后, 与糖尿病大鼠相比, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6的表达都有显著性的下降( $P<0.05$ , 图2D~图2F)。

## 2.4 免疫组织化学分析雷帕霉素对肾组织中p-Akt和NF- $\kappa$ B p65表达的影响

p-Akt主要在肾小管上皮细胞胞质中(棕色点状阳性产物)表达。NF- $\kappa$ B p65也主要在肾小管胞质中表达, 同时在肾小球中也有少量表达(棕色点状阳性产物)。对照组大鼠肾脏组织中p-Akt和NF- $\kappa$ B p65表达很少(图3A和图3D)。而在糖尿病组大鼠中, p-Akt和NF- $\kappa$ B p65表达明显增多(图3B和图3E)。因此, 单因素方差分析的结果显示, 单位面积中表达p-Akt和

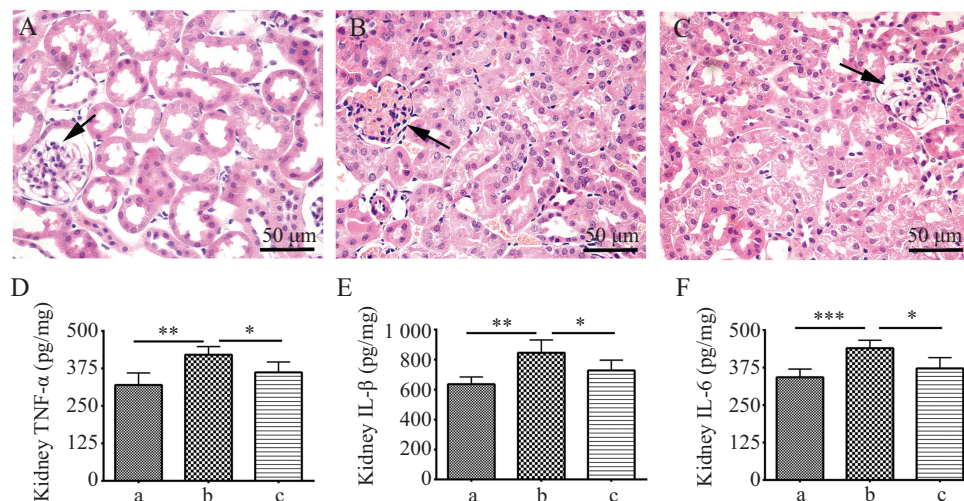
表1 各组大鼠血肌酐和血尿素氮比较

Table 1 Comparison of serum creatinine and blood urea nitrogen of rats in each group

组别 Group	数目 <i>n</i>	血肌酐( $\mu\text{mol/L}$ ) Scr ( $\mu\text{mol/L}$ )	血尿素氮( $\text{mmol/L}$ ) BUN (mmol/L)
Control	10	25.6 $\pm$ 5.8	6.2 $\pm$ 2.2
Diabetes	10	49.2 $\pm$ 7.8***	12.2 $\pm$ 2.2***
Diabetes with rapamycin injection (1 mg/kg/d)	10	36.1 $\pm$ 6.0*** <sup>#</sup>	8.0 $\pm$ 1.1 <sup>#</sup>

\*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , 与对照组相比较; <sup>#</sup> $P<0.01$ , 与糖尿病组相比。

\*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  compared with control group; <sup>#</sup> $P<0.01$  compared with diabetes group.

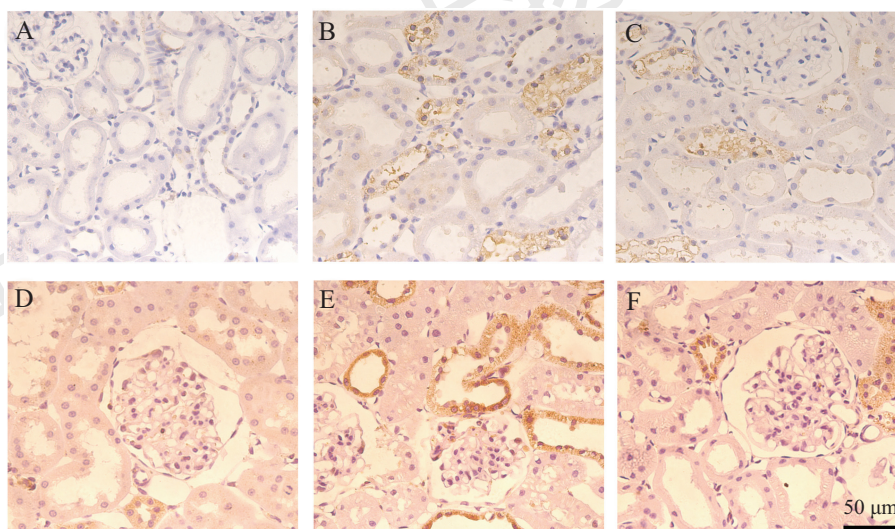


A~C: 各组大鼠肾脏组织的形态结构, 苏木精-伊红染色(箭头所指为肾小球)。A: 对照组; B: 糖尿病组; C: 雷帕霉素治疗组(1 mg/kg/d); D: TNF- $\alpha$ 在各组大鼠肾脏组织中的表达; E: IL-1 $\beta$ 在各组大鼠肾脏组织中的表达; F: IL-6在各组大鼠肾脏组织中的表达。A: 对照组; B: 糖尿病组; C: 雷帕霉素治疗组(1 mg/kg/d)。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001。n=5。

A~C: the morphological structure of renal tissue of rats in each group. HE staining. Arrows indicated glomerulus. A: control group; B: diabetes group; C: diabetes with rapamycin injection group (1 mg/kg/d); D: the expression level of TNF- $\alpha$  in renal tissue of rats in each group; E: the expression level of IL-1 $\beta$  in renal tissue of rats in each group; F: the expression level of IL-6 in renal tissue of rats in each group. a: control group; b: diabetes group; c: diabetes with rapamycin injection group (1 mg/kg/d). \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001. n=5.

图2 各组大鼠肾脏组织形态结构以及炎症因子表达的比较

Fig.2 Comparison of the pathological structure and the expression of inflammation cytokines in renal tissue of rats in each group



A~C: p-Akt在各组大鼠肾脏组织中的表达。A: 对照组; B: 糖尿病组; C: 雷帕霉素治疗组(1 mg/kg/d)。D~F: NF- $\kappa$ B p65在各组大鼠肾脏组织中的表达。D: 对照组; E: 糖尿病组; F: 雷帕霉素治疗组(1 mg/kg/d)。苏木素复染。

A~C: the expression of p-Akt in renal tissue of rats in each group. A: control group; B: diabetes group; C: diabetes with rapamycin injection group (1 mg/kg/d). D~F: the expression of NF- $\kappa$ B p65 in renal tissues of each group. D: control group; E: diabetes group; F: diabetes with rapamycin injection (1 mg/kg/d) group. Hematoxylin counterstaining.

图3 p-Akt和NF- $\kappa$ B p65在各组大鼠肾脏组织中表达的比较

Fig.3 Comparison of the expression of p-Akt and NF- $\kappa$ B p65 in renal tissue of rats in each group

NF- $\kappa$ B p65的阳性数在各组中有显著性差异[p-Akt: F(2, 27)=19.5,  $P$ <0.000 1; NF- $\kappa$ B p65: F(2, 27)=16.0,  $P$ <0.000 1]。在两组之间的比较中可以看出, 糖尿病大鼠中单位面积的阳性细胞数明显高于对照组大

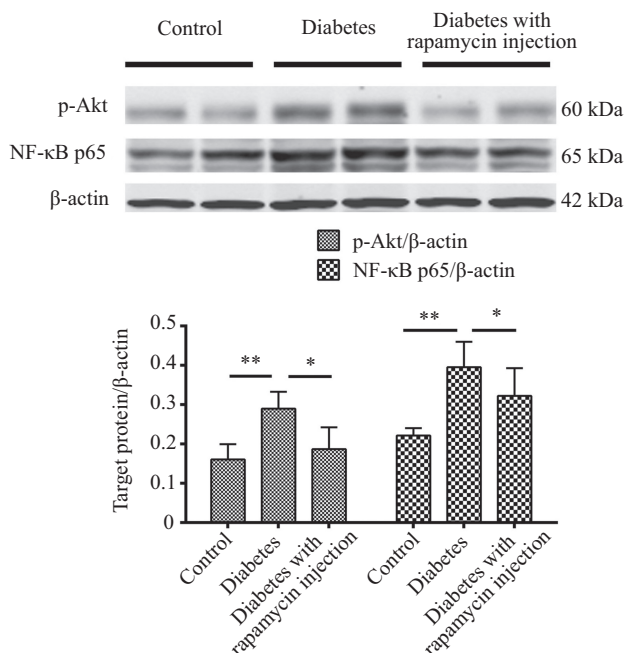
鼠( $P$ <0.01, 图3B、图3E和表2)。同时, 经雷帕霉素治疗后, p-Akt和NF- $\kappa$ B p65的阳性细胞数与糖尿病组大鼠相比, 有明显减少( $P$ <0.05, 图3C、图3F和表2)。

表2 各组肾组织中p-Akt和NF-κB p65的阳性细胞密度的比较

组别 Group	p-Akt	NF-κB p65
	阳性细胞密度(num/mm <sup>2</sup> ) The density of positive cell	阳性细胞密度(num/mm <sup>2</sup> ) The density of positive cell
Control	5.9±2.1	7.9±2.0
Diabetes	20.5±7.2***	22.5±6.3***
Diabetes with rapamycin injection (1 mg/kg/d)	13.3±5.1*#	14.7±7.1**#

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , 与对照组相比; # $P<0.05$ , 与糖尿病组相比;  $n=10$ 。

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  compared with control group; # $P<0.05$  compared with diabetes group.  $n=10$ 。



\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .  $n=5$ 。

图4 免疫印迹分析各组大鼠肾组织p-Akt和NF-κB p65表达  
Fig.4 The expression of p-Akt and NF-κB p65 in the renal tissue of each group detected by Western blot

## 2.5 免疫印迹分析雷帕霉素对肾组织中p-Akt和NF-κB p65表达的影响

单因素方差分析的结果显示,在造模6周后,各组中p-Akt和NF-κB p65表达都存在着显著性差异,其中[p-Akt:  $F(2, 12)=10.9, P=0.002$ ; NF-κB p65:  $F(2, 12)=11.9, P=0.001$  4]。其中,对照组大鼠中p-Akt有微弱表达,条带较弱,而在糖尿病组大鼠中,p-Akt表达明显增高,与对照组大鼠相比有显著差异( $P<0.01$ ,图4)。而在雷帕霉素治疗组大鼠中,p-Akt较糖尿病组大鼠明显降低( $P<0.05$ ,图4)。同样,我们观察到NF-κB p65在对照组大鼠中少量表达,而在糖尿病组大鼠中,NF-κB p65表达明显增高,与对照组大鼠相比有显著差异( $P<0.01$ ,图4)。结果同时显示,雷帕霉素能够减少NF-κB p65的表达( $P<0.05$ ,图4),这与

免疫组化的结果相一致。

## 3 讨论

DN是糖尿病常见的一种并发症,也是引起慢性肾功能衰竭和致死的主要原因之一。糖尿病肾病的发病机制比较复杂,研究证实,氧化应激<sup>[14]</sup>、肾小球高滤过率<sup>[15]</sup>、糖化终末产物<sup>[16]</sup>、蛋白激酶C的激活<sup>[17]</sup>及细胞外基质蛋白的过度表达<sup>[18]</sup>等均能促进糖尿病肾病的发生。目前,许多研究表明,炎症反应在糖尿病肾病的发病机制中起到了关键作用,多种促炎分子、趋化因子和细胞因子在糖尿病病人体内均有发现<sup>[18-19]</sup>。而在本研究中,我们也发现,TNF-α、IL-1β、IL-6等相关的炎症因子的表达在糖尿病大鼠肾脏组织中升高,并且观察到肾小球体积增大,基底膜完整性受损和肾小管上皮细胞肥大等一系列的病理变化,说明在糖尿病肾病中发生炎症反应,并对肾脏形态结构有一定的损伤。因此,抑制炎症反应的发生可能成为日后糖尿病肾病治疗的新靶点。

蛋白激酶B(Akt)是一种丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶,在葡萄糖代谢,细胞凋亡、存活、增殖以及细胞骨架的变化等活动中发挥重要的生物学功能<sup>[20]</sup>。Akt广泛表达于体内各种组织,磷酸化的蛋白激酶B(p-Akt)是其活性形式。之前的研究证实,在糖尿病大鼠中,胰岛素样生长因子能够刺激Akt的磷酸化,导致了Akt通路的激活<sup>[21]</sup>。同时,Akt磷酸化又能刺激多个信号通路,其中就包括刺激NF-κB的转录活性。在生理条件下,NF-κB与其抑制蛋白核因子κB抑制蛋白(nuclear factor κB inhibitor protein, IκB)形成NF-κB-IκB复合物,以非活性形式存在于细胞质中。而磷酸化的Akt能够激活IκB激酶,使IκB与NF-κB解离,形成具有活性的NF-κB p65亚基,使得其进入细胞核,促进相关炎症因子的转录,从而导致炎症反应的发生<sup>[22]</sup>。而在本研究中,我们发现,在糖

尿病大鼠模型中, p-Akt和NF- $\kappa$ B p65亚基都有明显的升高, 说明Akt/NF- $\kappa$ B通路在糖尿病模型中激活。

雷帕霉素作为帕霉素靶蛋白复合体1的抑制剂, 能够抑制mTOR通路的激活。近年来, 一些研究发现, 雷帕霉素可以延缓糖尿病肾病的发展<sup>[7-9]</sup>。而在本研究中, 我们观察到, 雷帕霉素虽然并不能增加大鼠的体重, 但是却能明显改善血肌酐、尿素氮等肾功能指标, 并且到第五周和第六周时能在一定程度上降低血糖, 说明雷帕霉素对糖尿病肾脏的功能起到一定的保护作用, 这与其他研究者的报道相一致<sup>[7]</sup>。之前的研究表明, 雷帕霉素对脂质和葡萄糖代谢有着重要的调节作用<sup>[23]</sup>, 雷帕霉素能够增加db/db小鼠中胰岛素敏感性, 从而减低其血糖值<sup>[24]</sup>。而动物模型和临床研究都证实, 当体内的血糖值降低后, 都能够恢复糖尿病肾功能<sup>[25-26]</sup>。我们观察到, 在用雷帕霉素治疗后, 血肌酐、尿素氮这两个肾功能指标都得到了明显的改善, 这可能与血糖值的降低有关。但是, 这一过程是否有炎症反应介导, 目前国内外还没有相关的报道。

本研究的结果显示, 在注射雷帕霉素后, p-Akt和NF- $\kappa$ B p65表达降低, 这一结果与之前在癫痫模型大脑皮层中所观察到的现象一致<sup>[27]</sup>, 但是其具体的机制仍不清楚。我们推测这可能与mTOR通路对Akt反馈调节有关。研究证实, mTOR通路的激活会加速Akt的磷酸化<sup>[28]</sup>。因此, 当我们用雷帕霉素阻断mTOR通路后, Akt的磷酸化就相应减少, 接着抑制NF- $\kappa$ B信号通路在糖尿病肾脏中的激活。而我们知道, 一旦NF- $\kappa$ B信号通路被抑制, 就会减少各种炎症因子的表达, 包括TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6等多种促炎因子<sup>[11]</sup>。而这些因子的过量表达与糖尿病肾脏组织的形态结构变化有着紧密的联系。研究证实, 这些因子能够促进白细胞合成, 释放超氧化物和蛋白水解酶, 引起肾小球和肾小管组织损伤。同时, 单核巨噬细胞释放的IL-6能够增强局部炎性反应, 加速细胞外基质的沉积, 导致肾小球体积增大和肾小管管腔变<sup>[29]</sup>。此外, 炎症反应可引发机体的氧化应激, 氧化低密度脂蛋白, 后者可直接损伤内皮细胞, 增强单核细胞对血管内皮的黏附及浸润, 从而影响肾脏功能<sup>[29]</sup>。本研究的结果显示, 在雷帕霉素治疗组大鼠中, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6的表达明显较少, 同时, 肾小球的基底膜趋向完整, 肾小管管腔变大, 肾功能也有明显的改善。这一结果显然与抑制Akt/NF- $\kappa$ B

依赖的炎症反应有关。

综上所述, 研究表明, 在糖尿病大鼠模型的肾脏组织中, 雷帕霉素能够抑制Akt/NF- $\kappa$ B通路的激活, 减少相关炎症因子的表达, 改善肾脏组织结构, 从而在一定程度上恢复糖尿病肾脏功能。

## 参考文献 (References)

- 1 Kolset SO, Reinholt FP, Jenssen T. Diabetic nephropathy and extracellular matrix. *J Histochem Cytochem* 2012; 60(12): 976-86.
- 2 Molitch ME, DeFronzo RA, Franzet al MJ. Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27(1): 79-83.
- 3 Tervaert TW, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Cook HT, Drachenberg CB, *et al*. Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(4): 556-63.
- 4 Verzola D, Cappuccino L, D'Amato E, Villaggio B, Gianiorio F, Mij M, *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): 1229-43.
- 5 Impellizzeri D, Esposito E, Attley J, Cuzzocrea S. Targeting inflammation: New therapeutic approaches in chronic kidney disease (CKD). *Pharmacol Res* 2014; 81: 91-102.
- 6 Aoki Y, Nakahara T, Asano D, Ushikubo H, Mori A, Sakamoto K, *et al*. Preventive effects of rapamycin on inflammation and capillary degeneration in a rat model of NMDA-induced retinal injury. *Biol Pharm Bull* 2015; 38(2): 321-4.
- 7 Yang Y, Wang J, Qin L, Shou Z, Zhao J, Wang H, *et al*. Rapamycin prevents early steps of the development of diabetic nephropathy in rat. *Am J Nephrol* 2007; 27(5): 495-502.
- 8 Liu G, Han F, Yang Y, Xie Y, Jiang H, Mao Y, *et al*. Evaluation of sphingolipid metabolism in renal cortex of rats with streptozotocin-induced diabetes and the effects of rapamycin. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26(5): 1493-502.
- 9 梁馨月, 顾乐怡, 王丽华, 高嘉元, 钱家麒, 张敏芳, 等. 高糖环境及雷帕霉素干预对肾小球足细胞IV型胶原和MMP-9表达的影响. *上海交通大学学报(医学版)*(Liang Xinyue, Gu Leyi, Wang Lihua, Gao Jiayuan, Qian Jiaqi, Zhang Minfang, *et al*. Effects of high glucose and Rapamycin intervention on expression of type IV collagen and matrix metalloproteinase-9 in podocytes. *Journal of Shanghai Jiaotong University, Medical Science*) 2010; 30(5): 518-21.
- 10 Su W, Li Z, Jia Y, Zhuo Y. Rapamycin is neuroprotective in a rat chronic hypertensive glaucoma model. *PLoS One* 2014; 9(6): e99719.
- 11 Tanti JF, Ceppo F, Jager J, Berthou F. Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 3: 181.
- 12 Wang X, Yan L, Chen W, Xu L, Zhang X. The renal protective effects of cilostazol on suppressing pathogenic thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Int Med Res* 2009; 37(1): 145-53.
- 13 Lackova M, Schreiberova A, Kolesar D, Lukacova N, Marsala J. Moderately different NADPH-diaphorase positivity in the selected peripheral nerves after ischemia/reperfusion injury of the spinal cord in rabbit. *Cell Mol Neurobiol* 2006; 26(7-8): 1311-25.
- 14 Zemin C, Mark EC. Pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Dia-*

- betes Invest 2011; 2(4): 243-7.
- 15 Magee GM, Bilous RW, Cardwell CR, Hunter SJ, Kee F, Fogarty DG. Is hyperfiltration associated with the future risk of developing diabetic nephropathy? A meta-analysis. *Diabetologia* 2009; 52(4): 691-7.
- 16 Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE): Signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1243: 88-102.
- 17 Gupta A, Gupta P, Biyani M. Targeted therapies in diabetic nephropathy: An update. *J Nephrol* 2011; 24(6): 686-95.
- 18 Kato M, Natarajan R. Diabetic nephropathy—emerging epigenetic mechanisms. *Nat Rev Nephrol* 2014; 10(9): 517-30.
- 19 Navarro-González JF, Mora-Fernández C, Muros de Fuentes M, García-Pérez J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2011; 7(6): 327-40.
- 20 Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: A key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 2001; 14(16): 2903-10.
- 21 Landau D, Eshet R, Troib A, Gurman Y, Chen Y, Rabkin R, *et al*. Increased renal Akt/mTOR and MAPK signaling in type I diabetes in the absence of IGF type 1 receptor activation. *Endocrine* 2009; 36(1): 126-34.
- 22 Sun J, Ramnath RD, Tamizhselvi R, Bhatia M. Neurokinin A engages neurokinin-1 receptor to induce NF-kappaB-dependent gene expression in murinemacrophages: Implications of ERK1/2 and PI 3-kinase/Akt pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295(3): 679-91.
- 23 Vergès B, Walter T, Cariou B. Endocrine side effects of anti-cancer drugs: Effects of anti-cancer targeted therapies on lipid and glucose metabolism. *Eur J Endocrinol* 2014; 170(2): R43-55.
- 24 Deepa SS, Walsh ME, Hamilton RT, Pulliam D, Shi Y, Hill S, *et al*. Rapamycin modulates markers of mitochondrial biogenesis and fatty acid oxidation in the adipose tissue of db/db mice. *J Biochem Pharmacol Res* 2013; 1(2): 114-23.
- 25 Afsar B. Disruption of circadian blood pressure, heart rate and the impact on glycemic control in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Syndr* 2014; doi: 10.1016/j.dsx.2014.05.002.
- 26 Liu K, Xu H, Lv G, Liu B, Lee MK, Lu C, *et al*. Loganin attenuates diabetic nephropathy in C57BL/6J mice with diabetes induced by streptozotocin and fed with diets containing high level of advanced glycation end products. *Life Sci* 2015; 123: 78-85.
- 27 Russo E, Andreozzi F, Iuliano R, Dattilo V, Procopio T, Fiume G, *et al*. Early molecular and behavioral response to lipopolysaccharide in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy and depressive-like behavior, involves interplay between AMPK, AKT/mTOR pathways and neuroinflammatory cytokine release. *Brain Behav Immun* 2014; 42: 157-68.
- 28 Huang T, Lin X, Meng X, Lin M. Phosphoinositide-3 kinase/protein kinase-B/mammalian target of rapamycin pathway in psoriasis pathogenesis. A potential therapeutic target? *Acta Derm Venereol* 2014; 94(4): 371-9.
- 29 赵龙, 关广聚. 糖尿病肾病发病机制研究进展. *中华肾脏病杂志* (Zhang Long, Guan Guangju. Advances in pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *Chinese Journal of Nephrology*) 2013; 29(7): 554-8.