

PKB/ Akt 在高脂诱导鼠肾脏损害中的作用*

哈尔滨医科大学附属第一医院内分泌科 (黑龙江 哈尔滨 150001) 韩继武 詹晓蓉 阴惠清

摘要 目的: 通过建立高脂血症大鼠模型, 探讨单纯高脂对肾脏的损伤机制以及胰岛素传导通路中的关键酶 PKB/ Akt (丝氨酸/苏氨酸激酶) 在高脂所致肾脏损害中的变化和意义。方法: 高脂高胆固醇喂养 Wistar 雄性大鼠, 建立胰岛素抵抗模型。分别在 4 周、8 周、12 周测定大鼠的肾功, 包括血尿素氮 (BUN), 肌酐 (CREA); 16 周时测定甘油三酯 (TG), 胆固醇 (TC), 以及血糖 (FBS) 和胰岛素 (FINS)。8 周时行胰岛素增敏剂文迪雅 (3mg/kg) 灌胃干预四周, 并行肾脏病理检查, 应用免疫组化法监测 PKB/ Akt 在肾脏的表达。结果: 高脂喂养大鼠 4 周后, 进食量开始减少, 体重增加减慢; 血 BUN、血 CREA 在 4 周时已升高, 至 8 周时增加更明显 ($p < 0.001$)。文迪雅灌胃四周后肾功改善, 但仍高于正常组 ($p < 0.05$)。血 TG 和血 TC 较正常组升高显著, 统计学差异显著 ($p < 0.05$)。血胰岛素升高, 但胰岛素敏感性降低, 胰岛素抵抗指数增加显著, 提示胰岛素抵抗形成。肾脏免疫组化 PKB/ Akt 的表达呈现为在肾小球和肾小管分布不均, 出现 PKB/ Akt 在损伤较重的肾小球不表达, 而在损伤较轻的肾小管表达减弱的现象。结论: 饮食诱导的高脂血症可导致健康大鼠产生脂质肾毒性损害以及肾功的降低, 并可产生胰岛素抵抗。胰岛素传导通路的损害在肾小球和肾小管表达不同, 说明其可能是产生肾脏损伤及胰岛素抵抗的又一原因。胰岛素增敏剂可改善胰岛素抵抗及肾功。

关键词: 高脂血症; 脂质肾毒性; 胰岛素抵抗; 丝氨酸/苏氨酸激酶; 胰岛素增敏剂

Effects of PKB/ Akt in the Progression of Renal Injury Induced by High Fat

HAN Ji-wu, ZHAN Xiao-rong, YIN Hui-qing

Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, China

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of the key enzyme PKB/ Akt (serine- threonine kinase) in the common pathway of insulin in the progression of renal injury induced by high fat (HF) and its mechanism through the establishment of rat models with hyperlipidemia. **Methods:** 50 Wistar male rats were randomly divided into five groups: ①normal control group ($n = 10$); ②4- week HF- feeding group ($n = 10$); ③8- week HF- feeding group ($n = 10$); ④8- week HF- feeding plus 4- week Avandia group ($n = 10$); ⑤16- week HF- feeding group ($n = 10$). After the establishment of insulin resistance models, a series of renal functions including blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CREA) of these models were measured at the 4th week, the 8th week and the 12th week separately. Triglycerides (TG), total cholesterol (TC), fasting blood sugar (FBS) and fasting insulin (FINS) were measured at the 16th week. These rat models were influenced by feeding with Avandia (i.e. an insulin sensitizer) (3mg/kg, intergastrically for 4 weeks) from the 8th week and were taken renal pathological examination using the expression of PKB/ Akt in kidney monitoring by immunohistochemical method. **Results:** After being fed with high fat and high cholesterol diet for 4 weeks, Rats' taking food amount started to reduce and the increase of their weights slowed down. BUN and CREA had already risen at the 4th week, the increase was more obvious at the 8th week ($P < 0.001$). The renal function was improved after rats were fed with Avandia intergastrically for 4 weeks, but the proportion was still higher than that of the control group ($P < 0.05$). The TC and TG in blood were markedly higher than those of the control group, and the statistic difference is remarkable ($P < 0.05$). The level of insulin in blood rose but insulin sensitivity reduced. The index of insulin resistance rose remarkably. It pointed out the taking shape of the insulin resistance. The expression of the PKB/ Akt of renal immunohistochemical showed the uneven distribution in glomerulus and renal tubules. The expression of the PKB/ Akt disappeared in the seriously injured glomerulus and weakened in the lightly injured renal tubules. **Conclusions:** The hyperlipidemia induced by high fat diet could cause healthy rats suffer from lipid nephrotoxic damage, renal function reducing and the insulin resistance. The expressions of the damage of common pathway of insulin are different in glomerulus and renal tubules, which shows that it could be another reason why renal damage and the insulin resistance formed, but insulin sensitizer can improve insulin resistance and renal function.

Key Words: Hyperlipidemia; Lipid nephrotoxic; Insulin resistance; Serine- threonine kinase; Insulin sensitizer

随着社会的进步和人口的老齡化, 高脂血症的发病率和并发症正逐渐增多且日益严重化。脂质代谢紊乱通常与肾脏疾病相伴随, 并被认为是肾脏损伤的病理机制之一。我们通过建立高脂血症大鼠模型, 证实了高脂血症对肾脏病理和肾功的影响以及 PKB/ Akt 在高脂大鼠肾脏皮质信号传导中的调控异常。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器:

人胰岛素检测试剂盒购自中国原子能研究所, 兔抗鼠 PKB/ Akt 多克隆抗体和羊抗兔 IgG/HRP (SA1022, 二抗) 均购自武汉博士德生物工程有限公司。所有生化试剂构自 BECH-

* 基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (1051210)

通讯作者: 韩继武, (1967-), 男, 博士研究生, 副教授, Email: hanjiwu@126.com

收稿日期: 2005- 12- 16, 接受日期: 2006- 01- 21

MAN 公司。药品罗格列酮片,商品名文迪雅,葛兰素史克公司生产。

1.2 胰岛素抵抗动物模型建立:

选用清洁级雄性 Wistar 大鼠 50 只,体重 160– 180g,购自哈尔滨医科大学附属第一临床医学院实验动物中心,合格证号:黑动字第 P00102008 号。随机分为 5 组,分别为正常对照组 10 只,4 周高脂饲养组 10 只,8 周高脂饲养组 10 只,8 周高脂+ 罗格列酮 4 周组 10 只,16 周高脂饲养组 10 只。正常普通饲料由本实验中心提供,其组成中小麦面占 10%,麸子占 30%,玉米面占 30%,豆饼占 20%,鱼粉占 5%,骨粉占 2%,酵母占 2%,氯化钠占 1%。高脂饲料为在普通饲料中添加 10% 猪油,2% 胆固醇,0.2% 甲基硫氧嘧啶,0.5% 胆盐。模型组喂饲高脂饲料,用以建立胰岛素抵抗模型。

1.3 指标监测和标本制备

高脂喂养大鼠分别在第 4 周、第 8 周、第 12 周和第 16 周(包括正常组)将各自对应组禁食 4 小时,戊巴比妥钠(60 $\frac{2}{3}$ 3 $\frac{5}{6}$ 腹腔注射)麻醉,开胸心脏采血 4 毫升,开腹取肾脏。所取血样均置于 - 80℃ 冰箱,待行生化检测血 BUN,血 CREA,血 TG,血 TC,血 FBS 以及 FINS。所取肾脏置于 4% 多聚甲醛溶液中,待行免疫组化检查;将部分肾组织切成 0.2×0.2 毫米大小置于 4% 戊二醛溶液中,待行电镜检查。

1.4 胰岛素抵抗指数(HOMA- IR)和胰岛素敏感指数(ISI)的判定:HOMA- IR= (FBS× FINS)/ 22.5 ISI= 1/ FBS× FINS。

1.5 免疫组化法检测 PKB/ Akt 的表达(肾石蜡切片免疫组化染色程序)

石蜡切片常规脱蜡至水,行 3% H₂O₂ 去除内源性过氧化氢酶,进行热修复和 BSA 封闭。滴加一抗(浓度为 1: 800)和二抗(生物素化山羊抗兔(鼠)血清),再滴加试剂 SABC。用苏木素复染 1 分钟,自来水冲洗返蓝 5 分钟。切片经过梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明 5 分钟,中性树胶封片。免疫组化染色判定结果:胞膜/ 胞浆内呈明显棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞。

电子透射显微镜:使用日本电子公司生产的 JEM- 1220 型透射电镜。

统计处理:数据均采用均数± 标准差表示,资料分析采用多元方差分析和 t 检验,并行 SPSS12. 0 统计软件处理。

2 结果

大鼠高脂喂养 16 周血胆固醇 1.98 ± 0.20mmol/L 较对照组 1.42 ± 0.15mmol/L 明显增加;甘油三脂 1.92 ± 0.20mmol/L 较对照组 0.56 ± 0.20 显著升高, $p < 0.001$ (见表 3)。伴随脂质的变化,高脂喂养血尿素氮从 4 周时的 8.134 ± 1.438mmol/L 升高至 8 周时的 10.810 ± 1.700mmol/L,血肌酐则从 4 周时的 55.87 ± 12.45mmol/L 升高至 8 周时的 107.68 ± 11.40mmol/L。文迪雅灌胃四周血尿素氮降至 6.474 ± 1.353,血肌酐降至 29.73 ± 7.444, $p < 0.001$ (见表 1)。16 周高脂组血糖 8.88 ± 1.18mmol/L 较对照组 4.34 ± 0.63mmol/L 明显升高,但 ISI 0.0105 ± 0.0027 较对照组 0.0325 ± 0.0113 下降了 3 倍,IRI 4.4769 ± 1.0153 较对照组 1.5218 ± 0.5242 升高了 2 倍多(见表 2)。

表1 各个组之间尿素氮和肌酐的比较

分组	尿素氮(mmol/L)	肌酐(umol/L)
4 周高脂组	8.134 ± 1.438	55.87 ± 12.45
8 周高脂组	10.810 ± 1.700	107.68 ± 11.40
12 周正常组	6.189 ± 0.815	28.950 ± 7.994
8 周高脂+ 文迪雅组	6.474 ± 1.353	29.73 ± 7.444

采用多元方差分析,比较各组的肾功能,Wilks’ Lambda= 0.03770647, F= 42.88, $P < 0.0001$ 。各组肾功能差别有统计学意义。经 dunnett- t 检验,尿素氮和肌酐 4 周高脂组、8 周高脂组与正常组差别有统计学意义($P < 0.05$),而 8 周高脂+ 文迪雅组与正常组差别无统计学意义($P > 0.05$)。

表2 高脂喂养 16W 后大鼠 IRI、ISI 指标的变化($\bar{X} \pm s$)

指标	正常对照组	模型组
IRI	1.5218 ± 0.5242	4.4769 ± 1.0153 - 8.18 < 0.001
ISI	0.0325 ± 0.0113	0.0105 ± 0.0027 5.94 0.001

表3 高脂喂养 16W 后大鼠生化指标的变化($\bar{X} \pm s$)

指标	正常对照组	模型组
甘油三酯(mmol/L)	0.56 ± 0.20	1.92 ± 0.20 15.2053 < 0.001
胆固醇(mmol/L)	1.42 ± 0.15	1.98 ± 0.20 7.0835 < 0.001
空腹血糖(mmol/L)	4.34 ± 0.63	8.88 ± 1.18 - 10.71 < 0.001
胰岛素(Mu/ L)	7.69 ± 1.64	11.31 ± 1.98 - 4.46 0.0003

透射电镜下见高脂喂养 8 周大鼠肾小球、肾小管及部分血管等结构发生明显变化,细胞结构变化也较突出。图 1 肾小球基底膜灶性增厚,有复合物沉积,部分区域出现滤孔膜融合现象。图 2 肾小管上皮细胞内线粒体大量减少,微绒毛大量脱失,可见溶酶体、脂滴出现。

免疫组化 Akt 在正常组无异常,见图 3;而在肾小球不表达,在肾小管的表达有减弱的现象,见图 4 和图 5。图 4: 低倍镜× 10: 肾小球表达阴性,肾小管上皮细胞约 80% 以上表达阳性。图 5: 高倍镜× 40: 肾小球表达阴性,肾小管近曲小管上皮细胞胞浆内可见棕色颗粒,部分小管内可见蛋白管型。

高脂喂养 Wistar 大鼠 8 周 HE 染色(高倍镜× 40) 光镜下可见肾小球入球动脉发生玻璃样变,管壁增厚;毛细血管内皮细胞增厚,呈现轻度玻璃样变。肾小管上皮细胞水样变性(脓肿) 脱落,核浓缩,间质内毛细血管淤血、炎性细胞浸润,肾小管内可见蛋白管型(见图 6)。

3 讨论

1982 年 Moorhead 等首次提出“ 脂质肾毒性” 的概念,其认为慢性进行性肾损伤时,常伴随脂代谢异常,脂质不仅在介导肾小球损伤中起重要作用,且在肾小管及肾间质的损伤中亦起作用。但高脂血症导致肾脏病理变化的过程相当缓慢。我们在实验中发现高脂喂饲 4 周内 Wistar 大鼠生长迅速,体重增加明显;4 周后至 16 周大部分鼠饮水量开始下降,体重增长减慢或停滞,并逐渐出现毛发变黄以及活动量减少等现象。HE 染色及电镜下 8 周高脂鼠肾小球、肾小管结构均发生明显的病理变化,与之相对应的高脂鼠肾功能受损,血尿素氮和血肌酐呈现显著增加。同时,文迪雅组灌胃 4 周,血尿素氮,血肌酐降低非常显著,尿素氮和肌酐与正常组差别无统计学意义($p > 0.05$),说明文迪雅已经把肾功能控制到正常范围内了。16 周高脂组血胆固醇及甘油三脂较正常组升高明显;胰岛素增高,胰岛素敏感性明显降低,胰岛素抵抗指数增加显著,证实胰岛素抵抗形成。本文探讨高脂喂养大鼠在胰岛素抵抗状态下肾脏病理和肾功的改变与胰岛素信号通路蛋白 PKB 的关联。近年有关胰岛素抵抗研究发现丝氨酸/ 苏氨酸蛋白激酶 B (PKB/ Akt) 是胰岛素信号通路 PI3 途径中关键信号蛋白^[1]。经胰岛素诱导后,该途径上游信号逐级激活,磷酸化 PBK 的 Thr308 和 Ser473 位点使之活化,转膜脱落至细胞质,启动其下游相关底物蛋白级联反应,参与糖原合成、葡萄糖转运、糖酵

解蛋白合成、糖异生抑制及抗凋亡等作用^[2], 故 PKB 是维持血糖内环境稳定的重要调节因素。在 PKB 基因缺失鼠模型中, 胰岛素降糖能力明显减低, 表现为胰岛素抵抗及糖尿病样症状^[3]。体内外实验^[2,3] 证实在胰岛素抵抗及 2 型糖尿病时 PKB 蛋白水平明显受损, 且存在表达和活性改变的组织及亚型变化特异性。

在免疫组化实验中我们发现丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt 在肾小管上皮细胞胞浆内表达降低, 而在肾小球却几乎没有表达 (见附图 4 和图 5)。这就说明高脂血症不仅可以直接损伤肾脏, 也可以导致胰岛素抵抗, 并使胰岛素传导通路 Akt 的表达减低。其原因可能有以下几个方面: 高脂血症状态下游离脂肪酸(FFA) 的释放和甘油三酯的水解等。特别是 FFA 以及泡沫细胞释放的细胞因子 TNF α 等可以抑制胰岛素信号通路中包括 PKB 在内的多个位点^[4]。ChoH 等^[5] 证明缺乏 AKT2 (PKB β) 的大鼠胰岛素降低血糖的能力严重受损, 出现胰岛素抵抗。胰岛素增敏剂药理学研究^[6] 证明了在减轻或逆转 PKB 的受损状态后, 葡萄糖的转运、糖原合成等活动增加。罗格列酮通过激活过氧化物酶体增殖物受体 γ (PPAR γ), 减少参与 FFA 转运和氧化的基因表达, 影响脂肪细胞内 FFA 的代谢, 从而降低血 FFA 水平, 并同时增加脂联素。最近的研究证实, 脂联素可增加对胰岛素敏感的小的脂肪细胞, 降低餐后血清游离脂肪酸水平, 提高靶组织对胰岛素的敏感性^[7]。高脂血症状态下胰岛素以及胰岛素样生长因子 (IGF-1) 通过 PKB/AKT 通路介导的潜在的抗凋亡作用减低或消失^[8]。

综上所述, 饮食诱导的高脂血症可导致健康大鼠产生肾脏毒性损伤, 即脂质代谢异常通常与肾脏疾病相伴行, 并成为肾脏损伤的病理机制之一。通过低脂饮食、体育锻炼并服用胰岛素增敏剂罗格列酮等方法可改善肾功。高脂饮食诱导的胰岛素信号转导障碍, 说明其可能是产生胰岛素抵抗的又

一原因, 以及胰岛素抵抗在不同脏器甚至同一脏器的不同部位非均衡分布之可能。

(本文图 1~6 见封 3)

参考文献

- [1] Panarotto D, Remillard P, Bouffard L, et al. Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in an adipose tissue-specific manner[J]. Eur J Clin Invest, 2002, 32(2): 84-92
- [2] Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance[J]. AM J Med, 1999, 107(5): 450-455
- [3] Finegood DT, McArthur MD, Kojwang, D, et al. Beta cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats. Rosiglitazone prevents the rise in net cell death[J]. Diabetes, 2001, 50: 1021-1029
- [4] Schmitz Peiffer C. Signaling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: metabolisms induced by lipid oversupply[J]. Cellular Signaling, 2000, 12(9-10): 583-594
- [5] Cho H, Mu j, Kim Jk, et al. Insulin resistant and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2(PKB beta) [J]. Science, 2001, 292(5522): 1728-1731
- [6] Kausch C, Krutzfeldt J, Witke A, et al. Effects of troglitazone on cellular differentiation, insulin signaling and glucose metabolism in cultured human skeletal muscle cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 280(3): 664-674
- [7] Stumvoll M, Tschrirer O, Fritsche A, et al. Association of the T-G polymorphism in adiponectin with obesity, and insulin sensitivity interaction with family history of type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2002, 51: 37-41
- [8] Keijiu Hiromura, Toshiaki Monkawa, et al. Insulin is a potent survival factor in mesangial cells: Role of the PI3-kinase/Akt pathway[J]. Kidney International, 2002, 61(4): 1312-1321

脑囊虫的 MRI 表现

哈尔滨医科大学附属第二医院 (黑龙江 哈尔滨 150086) 许 冰

摘要 目的: 探讨脑囊虫不同分期、分型的磁共振表现及应用价值。方法: 收集脑囊虫病 127 例, 行 MR 轴、矢、冠位扫描及增强扫描。结果: 脑囊虫分型: 单发小囊型 44 例, 单发大囊型 6 例, 多发小囊型 34 例, 脑实质钙化型 18 例; 脑室型 11 例; 蛛网膜下腔型 7 例; 混合型 7 例。脑囊虫分期: 活动期 32 例, 退变死亡期 49 例, 钙化期 18 例, 混合期 28 例。结论: 磁共振扫描能够清晰显示各种细节, 是诊断脑囊虫的有力手段。

Using MRI to Detect Cerebral Cysticercosis: Analysis of 127 cases

XV Bing

The Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150081, China

ABSTRACT Objective: To study MRI features and its clinical value of cerebral cysticercosis(CC) with different staging and typing. **Methods:** 127 patients with CC(males 88, females 39, 6~68 years old) were collected and detected by routine MR scanning and enhanced scanning. **Results:** CC typing: 44 cases of single small cyst; 6 cases of single big cyst; 34 cases of multiple small cyst; 18 cases of cerebral parenchyma calcification; 11 cases of ventricle; 7 cases of subarachnoid and 7 cases of mixed type. CC staging: 32 cases of active stage; 49 cases of regressive and dying stage; 18 cases of calcification and 28 cases of mixed stage. **Conclusion:** All the details of CC are clearly showed by MR imaging scanning, which can play an important role in the diagnosis of CC.

Key words: Cerebral cysticercosis(CC); Magnetic Resonance Imaging(MRI)

PKB/Akt 在高脂诱导鼠肾脏损害中的作用

(正文见 22 页)

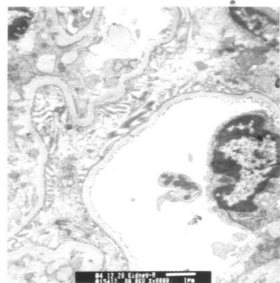


图1

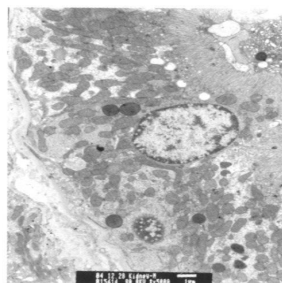


图2

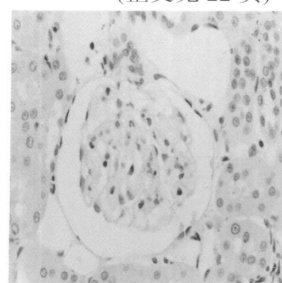


图3

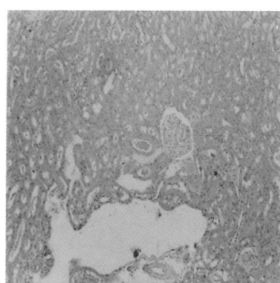


图4

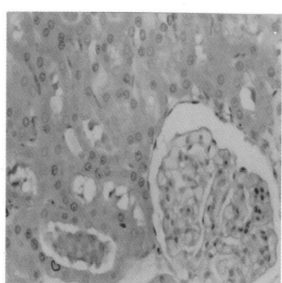


图5

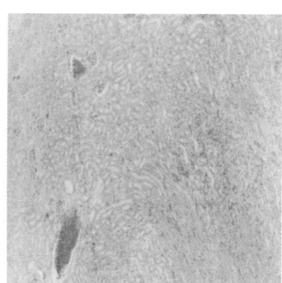


图6

鸡红细胞融合最适条件的探讨

(正文见 43 页)

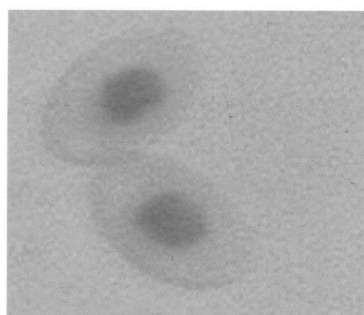


图 1



图 2

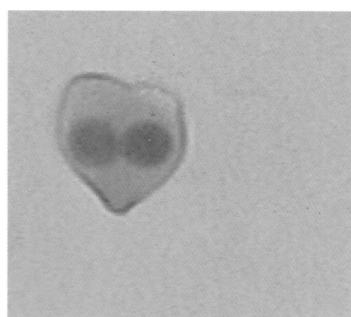


图 3

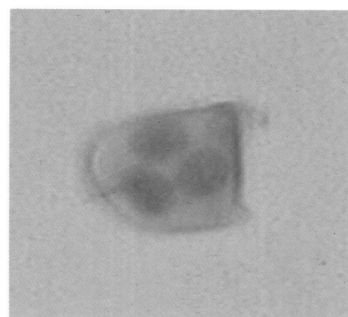


图 4