

体重对糖尿病肾病大鼠尿蛋白检测的影响分析

周淑红^{1,2}, 吕宏军¹, 施秉银^{1*}, 崔波¹, 徐利¹

(1. 西安交通大学医学院第一附属医院内分泌科, 西安 710061;
2. 甘肃省人民医院内分泌科, 兰州 730000)

[摘要] 目的:探讨体重对实验性糖尿病肾病大鼠尿蛋白检测的影响。方法:清洁级健康雄性SD大鼠72只,随机分为糖尿病组(DM组, $n=45$)和对照组(NC组, $n=27$),糖尿病组大鼠一次性腹腔注射STZ $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。两组大鼠分别在第4, 8, 12, 16周留取24 h尿液,用放免法检测尿白蛋白,监测体重(BW),同时检测肾脏功能和形态。结果:尿白蛋白/肌酐(UACR)在两组间无差异于;尿白蛋白(UTP),尿白蛋白排泄率(UAER), UTP/BW , UAER/BW , UACR/BW 在4个时间点DM组高于NC组($P < 0.05$);5种尿蛋白不同评价指标与肾脏功能形态指标无相关性。结论:体重对糖尿病大鼠UACR的指标评价影响最明显。5种尿蛋白的评价指标在糖尿病肾病早期不能动态完全反映肾脏病理损害变化。

[关键词] 体重;尿蛋白指标;糖尿病;动物模型

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0266-04

Influence of Body Weight on Urine Albumin Levels Detected in Experimental Diabetic Nephropathy Rats

ZHOU Shu-hong^{1,2}, LV Hong-jun¹, SHI Bing-yin^{1*}, CUI Bo¹, XU Li¹

(1. Department of Endocrinology, First Hospital Affiliated to Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China;
2. Department of Endocrinology, People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

[收稿日期] 20111204(009)

[第一作者] 周淑红,副主任医师,博士研究生,从事糖尿病肾病,E-mail:zshlz1973@126.com

[通讯作者] *施秉银,教授,主任医师,博士研究生导师,E-mail:shibingy@126.com

- 究与应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5):78.
- [3] Fulda S. Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer[J]. Drug Discov Today, 2010, 15(17/18):757.
- [4] 李林,殷放宙,陆兔林,等. 莪术与三棱配伍前后姜黄素煎出率变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13):28.
- [5] God A, Kunnumakkara A B, Aggarwal B B. Curcumin as 'Curecumin': from kitchen to clinic [J]. Biochemical Pharmacology, 2008, 5(4):787.
- [6] 杜琴,胡兵,沈克平. 抗癌中药配伍研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13):232.
- [7] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69.
- [8] Brown J M, Attardi L D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(3): 231.
- [9] Indran I R, Tufo G, Pervaiz S, et al. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1807(6):735.
- [10] Zhang C Z, Zhang H T, Chen G G, et al. Trichostatin A sensitizes HBx-expressing liver cancer cells to etoposide treatment [J]. Apoptosis, 2011, 16(7):683.
- [11] Selvendiran K, Ahmed S, Dayton A, et al. HO-3867, a curcumin analog, sensitizes cisplatin-resistant ovarian carcinoma, leading to therapeutic synergy through STAT3 inhibition [J]. Cancer Biol Ther, 2011, 12(9):837.
- [12] 陈旭,王娟,蒋晓山,等. 莪术醇对肺癌A549细胞凋亡诱导因子-聚ADP核糖聚合酶及Caspase-3表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 17(19):157.

[责任编辑 邹晓翠]

[Abstract] Objective: To compare the influence of body weight in diagnostic importance for experimental diabetic nephropathy rats among three urinary protein screening methods. **Method:** Seventy-two SPF male Sprague-dawley rats were randomly divided into control group (NC, $n = 27$) and diabetic group (DM, $n = 45$), which were induced with streptozotocin once intraperitoneal injection. At 4, 8, 12, 16 w after injection, the 24 h urine albumin levels were measured by immunoturbidimetry. The body weight and general renal function index were monitored and the tissue sections of renal were examined with light microscopy. **Result:** The levels of UTP, UAER, UTP/BW, UAER/BW and UACR/BW were higher in diabetic rats than that of the normal group ($P < 0.05$), but there was no difference in UACR between the two groups. There was no correlation between the levels of the five different urinary albumin screening methods and renal-related indicators in diabetic rats. **Conclusion:** These data indicate that the body weight only affect the diagnostic importance of UACR and the five different urinary albumin screening methods could not be a perfect marker in diagnosis of diabetic early-stage nephropathy and indicator of the developing process of glomerulosclerosis.

[Key words] body weight; urinary albumin methods; diabetes nephropathy; animal model

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最主要的全身性微血管合并症之一。尿蛋白和肾脏病理检测是糖尿病肾病评估最主要的指标值^[1]。用于评估尿蛋白方法有24 h尿总蛋白(UTP)、尿蛋白排泄率(UAER)、尿蛋白/肌酐比值(UACR)。在动物实验中糖尿病大鼠的体重变化很明显,所以本实验主要探讨3种尿蛋白评价方法及经过体重校正后对尿蛋白的检测的影响,并探讨其与相对应肾脏的病理变化之间的相关性,为糖尿病肾病动物模型的尿蛋白评价指标的合理选择提供依据。

1 材料与方 法

1.1 动物和糖尿病模型的建立 选用健康雄性SD大鼠72只,清洁级,体重(210 ± 30)g,由西安交通大学医学院实验动物中心提供[SCXK(陕)2007-001],适应性喂养3 d后根据体重随机分为实验组(DM组, $n = 45$)和对照组(NC组, $n = 27$)。禁食12 h后DM组大鼠一次性腹腔注射新配制STZ $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[2] (pH 4.5, 0.1% 枸橼酸钠缓冲液配制), NC组大鼠注射等剂量的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液。DM组大鼠在给药后72 h和第6天血糖试纸(美国强生稳步血糖仪)检测尾静脉随机血糖(GLU)均 $> 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 确定为DM模型建立成功,未成模鼠退出DM组。普通自由饮食,实验观察至第16周。

1.2 标本收集及检测 两组大鼠分别于成模后第4, 8, 12, 16周随机抽取5~9只,于实验结束前2 d选取同一时间称随机体重(BW),在代谢笼中留取24 h尿量(UV)。实验结束时均称空腹体重(FBW);心脏取血,测定生化指标;取右肾中下3/4

放入10%多聚甲醛中,石蜡包埋,切成4 μm 厚的切片,脱蜡水化,行HE染色、PAS和PASM染色。血清(全自动生化仪)检测血肌酐(SCr)和尿素氮(BUN)。24 h尿标本 $2\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液5 mL检测尿肌酐(UCr,全自动生化仪)和尿白蛋白。

1.3 尿白蛋白的评价指标计算方法 尿白蛋白(Ualb)采用放射免疫法,由北京福瑞生物工程公司提供大鼠专用尿白蛋白试剂盒,用FM-2000/10放射免疫 γ 7计数器检测。计算方法见以下算式:

$$\text{UTP} = \text{UV} \times \text{Ualb} / 10^{6[3]}$$

$$\text{UTP/BW} = \text{UV} \times \text{Ualb/BW}^{[4]}$$

$$\text{UAER} = \text{UTP} \times 1\ 000 / 1\ 440^{[5]}$$

$$\text{UAER/BW} = \text{UTP} \times 1\ 000 / 1\ 440 / \text{BW}$$

$$\text{UACR} = \text{Ualb} \times 1\ 000 / \text{UCr}^{[6]}$$

$$\text{UACR/BW} = \text{Ualb} \times 1\ 000 / \text{UCr/BW}$$

1.4 肾脏形态及功能相关指标计算方法

1.4.1 肾肥大指数(KW/FBW) 动物麻醉后,取出左、右肾称质量,根据公式计算肾肥大指数。

$$(\text{KW/BW}) = [\text{双侧肾脏质量(KW)之和} / \text{体重(FBW)}] \times 100\%$$

1.4.2 肾小球基底膜堆积指数(ECM) 根据HE染色、PAS和PASM染色结果,对各组大鼠肾小球病变进行综合评估。每只大鼠随机选取20个不重复高倍视野下的肾小球($\times 400$),将肾小球病变按ECM堆积情况为4级:ECM占肾小球面积的0%~25%,计0分;ECM占肾小球面积的25%~50%,计1分;ECM占肾小球面积的50%~75%,计2分;ECM占肾小球面积 $> 75\%$,计3分,并计算平均积分作为肾小球基底膜堆积指数^[7]。

1.4.3 肾小球滤过率(GFR) $= (\text{UCr/SCr}) \times$

UV/BW^[8]

1.5 统计学方法 统计分析采用 SPSS FOR windows 17.0 统计软件,正态资料的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组在不同时间段结果变量的比较采用析因设计的方差分析。相关性分析采用线性 pearson 相关分析。以 $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 4 个时间点两组大鼠体重和肾脏病理及功能检测指标的比较 BW, SCr 和 GFR 在各个时间段上在 DM 组高于 NC 组,有统计学差异 ($P < 0.05$); BW 在正常对照组逐渐增高,在糖尿病组无变化,在正常对照组高于糖尿病组;SCr 和 GFR 从第 8 周开始在 DM 组中有下降趋势 ($P < 0.05$)。BUN, ECM, KW/FBW 在 DM 组高于 NC 组 ($P < 0.05$),但在 DM 组中各个时间段上无差异(表 1)。

2.2 4 个时间点两组间 3 种尿白蛋白评价指标及相应体重校正指标的比较 UTP/BW,

UAER/BW, UACR/BW, UTP 和 UAER 在 4 个时间点 DM 组高于 NC 组 ($P < 0.05$), UACR 在两组间无差异;在不同时间点均无动态变化(表 2)。

2.3 直线相关性分析 在糖尿病大鼠组不同时间点分别以 UTP, UAER, UTP/BW, UAER/BW 和 UACR/BW 为因变量, KW/FBW, ECM, BUN, Cr, GFR 为自变量进行相关性分析,均无相关性。

3 讨论

DN 的动物模型是通过 DM 动物模型获得,用 STZ 化学物质诱导的 DM 动物模型是目前最主要的方法之一。糖尿病肾病诊断的标准是病理学的改变。在本实验中 KW/WT, GFR 和 ECM 在 DM 组明显高于 NC 组,出现了肾脏肥大、高滤过和肾小球基质增生,在第 16 周实验结束时肾脏病理损害处于早期糖尿病肾病^[9]。

表 1 4 个时间点两组间体重和肾脏病理及功能检测指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间/周	分组	n	BW/g	KW/FBW/%	BUN/mmol·L ⁻¹	SCr/ μ mol·L ⁻¹	ECM	GFR/mL·kg ⁻¹
4	NC	5	455.20 ± 29.54	7.35 ± 0.86	9.85 ± 1.00	44.92 ± 14.35	0.22 ± 0.20	3.04 ± 1.57
	DM	7	303.29 ± 46.61 ¹⁾	12.99 ± 3.06 ¹⁾	18.52 ± 6.82 ¹⁾	50.36 ± 10.65 ¹⁾	0.60 ± 0.29 ¹⁾	13.22 ± 4.75 ¹⁾
8	NC	7	521.71 ± 42.59	6.61 ± 0.36	6.75 ± 0.92	45.99 ± 4.60	0.30 ± 0.22	5.26 ± 1.60
	DM	8	331.88 ± 71.39 ¹⁾	12.87 ± 1.60 ¹⁾	17.89 ± 8.47 ¹⁾	62.67 ± 13.55 ¹⁾	0.69 ± 0.38 ¹⁾	16.94 ± 7.56 ¹⁾
12	NC	6	582.33 ± 85.35	6.46 ± 0.60	4.84 ± 0.90	57.78 ± 9.39	0.28 ± 0.15	4.29 ± 0.75
	DM	9	328.22 ± 55.96 ¹⁾	12.02 ± 0.72 ¹⁾	16.57 ± 6.09 ¹⁾	47.23 ± 6.19 ¹⁾	0.79 ± 0.28 ¹⁾	13.09 ± 3.34 ¹⁾
16	NC	6	588.00 ± 52.05	6.63 ± 0.52	6.90 ± 0.77	58.30 ± 6.69	0.29 ± 0.08	3.40 ± 0.79
	DM	9	339.67 ± 51.33 ¹⁾	13.46 ± 1.98 ¹⁾	20.92 ± 9.50 ¹⁾	42.77 ± 9.50 ¹⁾	0.79 ± 0.30 ¹⁾	6.17 ± 2.23 ¹⁾

注:与相同时间点 NC 组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

表 2 4 个时间点尿白蛋白及相应体重校正各项指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间/周	分组	大鼠/只	UTP/ /mg·(24 h) ⁻¹	UTP/WT/ /mg·(24 h) ⁻¹ ·kg ⁻¹	UAER/ /μg·min ⁻¹	UAER/WT/ /μg·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	UACR/ /mg·mmol ⁻¹	UACR/WT/ /mg·mmol ⁻¹ ·kg ⁻¹
4	NC	5	0.14 ± 0.05	0.31 ± 0.11	0.10 ± 0.03	0.22 ± 0.09	1.3.3 ± 0.45	1.13 ± 1.05
	DM	7	0.67 ± 0.41 ¹⁾	1.22 ± 1.42 ¹⁾	0.53 ± 0.25 ¹⁾	0.60 ± 0.08 ¹⁾	2.02 ± 2.75	5.05 ± 9.94 ¹⁾
8	NC	7	0.29 ± 0.12	0.56 ± 0.29	0.22 ± 0.10	0.51 ± 0.12	1.73 ± 1.87	2.35 ± 3.80
	DM	8	0.60 ± 0.40 ¹⁾	1.72 ± 0.84 ¹⁾	0.51 ± 0.01 ¹⁾	1.20 ± 0.38 ¹⁾	2.81 ± 0.91	5.60 ± 2.48
12	NC	6	0.12 ± 0.07	0.20 ± 0.09	0.10 ± 0.03	0.18 ± 0.05	0.80 ± 0.37	1.34 ± 0.47
	DM	9	0.51 ± 0.46 ¹⁾	1.43 ± 1.07 ¹⁾	0.43 ± 0.04 ¹⁾	1.29 ± 0.88 ¹⁾	2.49 ± 2.18 ¹⁾	4.50 ± 5.05 ¹⁾
16	NC	6	0.20 ± 0.15	0.35 ± 0.26	0.15 ± 0.06	0.32 ± 0.20	1.47 ± 0.85	1.55 ± 1.50
	DM	9	0.62 ± 0.09	1.57 ± 0.26 ¹⁾	0.51 ± 0.02 ¹⁾	1.39 ± 0.24 ²⁾	1.64 ± 0.69	4.70 ± 1.98 ¹⁾

注:与相同时间点正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

目前最常用的尿白蛋白评价方法是 UTP, UAER, UACR, 笔者在 16 周的动物实验中每 4 周观察一次尿白蛋白指标的变化,析因分析结果提示:从

第 4 ~ 16 周 UTP 和 UAER 在糖尿病组大鼠高于正常对照组间,而 UACR 在两组间均无差异。临床糖尿病患者中随机尿蛋白/肌酐与 UTP 的相关性较

好^[10],但在糖尿病动物模型中 UACR 结果不相一致。体重在糖尿病大鼠中无明显动态变化,而正常对照组随时间明显增大,两组之间的差异明显,故校正了体重的因素后 UTP/BW, UAER/BW, UACR/BW 不同的时间点糖尿病组均高于正常对照组。由于在动态观察中糖尿病大鼠与正常对照组之间有差异的 5 种尿蛋白评价指标与 ECM, KW/FWT, 尿素氮、血肌酐 Cr 和 GFR 均无相关性,提示在糖尿病肾病早期尿蛋白的检测不能动态完全反映肾脏病理损害变化,这与 Mima 等在糖尿病动物模型中的研究相一致^[11]。所以体重对尿蛋白/肌酐的评价作用影响最明显。

[参考文献]

- [1] Sarafidis Pantelis A, Riehle Jessica, Bogojevic Zvezdana, et al. A comparative evaluation of various methods for microalbuminuria. screening [J]. Am J Nephrol, 2008, 28: 324.
- [2] 郭学军,邹移海,吴凌,等. 链脲佐菌素诱导 SD 和 Wistar 大鼠糖尿病模型的影响因素 [J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(4): 301.
- [3] 屈智慧,杨立志,赵颖,等. 糖尿病大鼠蛋白尿与肾脏病理及 nephrin 表达的相关性研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2009, 15(9): 1441.
- [4] Shankar Munusamy, Hamida Saba, Tanecia Mitchell, et al. Alteration of renal respiratory complex-III during experimental type-1 diabetes [J]. BMC Endocrine Disorders, 2009, 9:2.
- [5] 查冬青,吴小燕,徐联芳,等. 霉酚酸酯对 2 型糖尿病大鼠肾组织的保护作用 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2006, 7(5): 263.
- [6] A K H Lim, F Y Ma, D J Nikolic-Paterson, et al. Lymphocytes promote albuminuria, but not renal dysfunction or histological damage in a mouse model of diabetic renal injury [J]. Diabetologia, 2010(53): 1772.
- [7] Cai Yu, Chen Jianwen, Jiang Jianmin, et al. Zhen-wutang, a blended traditional Chinese herbal medicine, ameliorates proteinuria and renal damage of streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 131: 88.
- [8] Akira Mima, Takeshi Matsubara, Hidenori Arai, et al. Angiotensin II -dependent Src and smad signaling pathway is crucial for the development of diabetic nephropathy [J]. Laboratory Investigation, 2006, 86: 927.
- [9] 马淑珍,杜娟,马俐儒. 链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠血、尿渗透压的变化及其意义 [J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(8): 976.
- [10] 廖群,陈芳华. 尿蛋白、微量白蛋白及尿蛋白电泳联合检测诊断糖尿病早期肾损害 [J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(11): 1944.
- [11] Mima A, Arai H, Matsubara T, et al. Urinary smad1 is a novel marker to predict later onset of mesangial matrix expansion in diabetic nephropathy [J]. Diabetes, 2008, 57: 1712.

[责任编辑 邹晓翠]