·论 著·

利拉鲁肽通过抑制内质网应激介导的 PERK/eIF2α/ATF4/CHOP 通路改善糖尿病大鼠的肾组织损伤

田 颖
(首都医科大学附属北京口腔医院药学部,北京 100050)

[摘要] **目的** 探讨利拉鲁肽通过蛋白激酶 R 样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase,PERK)/真核翻译起始因子 eIF2 的 α 亚基(phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2α,eIF2α)/活化转录因子 4(activated transcription factor 4,ATF4)/C/EBP 同源蛋白(C/EBP-homologous protein,CHOP)通路介导的内质网应激对糖尿病大鼠肾组织损伤的改善作用及其机制。**方法** 通过高糖高脂饮食和腹腔注射低剂量链脲佐菌素(Streptozotocin,STZ)(30 mg/kg)诱导 2 型糖尿病大鼠模型。STZ 注射后 5 周,糖尿病大鼠随机接受皮下注射或不皮下注射利拉鲁肽(0.2 mg/kg,1 次/12 h)治疗 8 周。将大鼠分为:NC 组、DN 组和 DN+Lira 组。测定糖尿病相关物理生化指标、肾脏组织病理学和超微结构变化。相应试剂盒分别检测超氧化物歧化酶(superoxide diamutase,SOD)、活性氧(reactive oxygen species,ROS)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)和髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)水平。蛋白质免疫印迹分析内质网应激相关蛋白和 PERK/eIF2α/ATF4/CHOP 通路相关蛋白的表达。**结果** STZ 注射后 5 周后 DN 组的尾静脉空腹血糖(fasting blood glucos,FBG)始终高于 NC 组;STZ 注射后 13 周(利拉鲁肽给药后 8 周),DN 组和 DN+Lira 组 FBG、血液糖化血红蛋白 A_1c(hemoglobin A_1c,HbA_1c)、肾体重指数、血清肌酐(erum creatinine,SCr)和血尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)显著高于 NC 组,体重显著低于 NC 组;DN+Lila 组 FBG、HbA_1c、肾体重指数、SCr 和 BUN 显著低于 DN 组($P<0.05$)。STZ 注射后 5 周(利拉鲁肽给药后 0 周)时,DN 组和 DN+Lira 组的尿白蛋白/尿肌酐比率显著高于 NC 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。研究结束(利拉鲁肽给药后 8 周)时,DN 组和 DN+Lira 组的尿白蛋白/尿肌酐比率显著高于 NC 组,DN+Lila 组的尿白蛋白/尿肌酐(urinary albumin /creatinine,ACR)显著低于 DN 组($P<0.05$)。DN 组和 DN+Lira 组系膜基质指数显著高于 NC 组,DN+Lira 组系膜基质指数显著低于 DN 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。DN 组葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein,GRP78)、磷酸化的肌醇需要酶 1α(phosphorylated inositol-requiring enzyme 1α,p-IRE1α),激活转录因子 6(activating transcription factor 6,ATF6)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12(caspase 12,Caspase-12)的蛋白水平显著高于 NC 组,DN+Lira 组 GRP78、p-IRE1α,ATF6 和 Caspase-12 的蛋白水平显著低于 DN 组($P<0.05$)。DN 组的 MDA、ROS、MPO 水平显著高于 NC 组,SOD 水平低于 NC 组,DN+Lira 组中 MDA、ROS、MPO 水平显著低于 DN 组,SOD 水平高于 DN 组($P<0.05$)。DN 组肾皮质中 p-PERK、p-eIF2α、ATF4 和 CHOP 水平显著高于 NC 组,DN+Lira 组的肾皮质中 p-PERK、p-eIF2α、p-ATF4 和 CHOP 的水平显著低于 DN 组($P<0.05$)。**结论** 利拉鲁肽可能通过抑制内质网应激介导的 PERK/eIF2α/ATF4/CHOP 通路而发挥肾脏保护作用。

[关键词] 糖尿病肾病;利拉鲁肽; 内质网应激 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2024.07.014
[中图分类号] R587.24 [文献标志码] A [文章编号] 1007-3205(2024)07-0823-09

Liraglutide ameliorates renal tissue damage in diabetic rats by inhibiting the PERK/eIF2α/ATF4/CHOP pathway mediated by endoplasmic reticulum stress

TIAN Ying
(*Department of Pharmacy, Beijing Stomatological Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing* 100050, *China*)

[收稿日期]2023-06-13
[基金项目]北京市卫生科技发展专项基金(2018-4-369)
[作者简介]田颖(1983-),女,北京人,首都医科大学附属北京口腔医院药师,理学学士,从事临床药学研究。

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of liraglutide on ameliorating renal tissue damage of diabetic rats by inhibiting kinase R-like ER kinase (PERK)/phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2α (eIF2α)/activated transcription factor 4 (ATF4) /C/ EBP-homologous protein (CHOP) pathway mediated by endoplasmic reticulum stress and its mechanism. **Methods** A rat model of type 2 diabetes mellitus (T2DM) was induced by a high-carbohydrate, high-fat diet and intraperitoneal injection of low-dose Streptozotocin (STZ) (30 mg/kg). At 5 weeks after STZ injection, diabetic rats were randomly treated with subcutaneous injection or no subcutaneous injection of Liraglutide (0.2 mg/kg/12 h) for 8 weeks. The rats were divided into NC group, DN group and DN+Lira group. Diabetes-related physical and biochemical indexes, renal histopathology and ultrastructural changes were measured. The levels of superoxide diamutase (SOD), reactive oxygen species (ROS) level, malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) were detected by corresponding kits, respectively. The expression of endoplasmic reticulum stress-related proteins and PERK/eIF2α/ATF4/CHOP pathway were analyzed by Western blotting. **Results** At 5 weeks after STZ injection, the fasting blood glucose (FBG) in the DN group was consistently higher than that in the NC group. At 13 weeks after STZ injection (8 weeks after Liraglutide administration), the DN group and DN+Lira group showed significantly higher FBG, hemoglobin A_1c (HbA_1c), renal body mass index, serum creatinine (SCr), and blood urea nitrogen (BUN) compared with the NC group, but significantly lower body weight compared with the NC group; The FBG, HbA_1c, renal body mass index, SCr, and BUN in the DN+Lila group were significantly lower than those in the DN group ($P<0.05$). At 5 weeks after STZ injection (0 week after Liraglutide administration), the urinary albumin/creatinine ratio (ACR) in the DN group and DN+Lira group was significantly higher than that in the NC group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). At the end of the study (8 weeks after administration of Liraglutide), the urinary ACR in the DN group and DN+Lira group was significantly higher than that in the NC group, while the urinary ACR in the DN+Lila group was significantly lower than that in the DN group ($P<0.05$). The mesangial matrix index of DN group and DN+Lira group was significantly higher than that of NC group, while the mesangial matrix index of DN+Lira group was significantly lower than that of DN group, with statistical significance ($P<0.05$). The protein levels of glucose regulated protein 78 (GRP78), phosphorylated inositol requiring enzyme 1 α (p-IRE1 α), activating transcription factor 6 (ATF6), and caspase-12 in the DN group were significantly higher than those in the NC group, while the protein levels of GRP78, p-IRE1 α, ATF6, and Caspase-12 in the DN+Lira group were significantly lower than those in the DN group ($P<0.05$). The levels of MDA, ROS, and MPO in the DN group were significantly higher than those in the NC group, while the levels of SOD were lower than those in the NC group. In the DN+Lira group, the levels of MDA, ROS, and MPO were significantly lower than those in the DN group, and the levels of SOD were higher than those in the DN group ($P<0.05$). The levels of p-PERK, p-eIF2 α, ATF4, and CHOP in the renal cortex of the DN group were significantly higher than those of the NC group, while the levels of p-PERK, p-eIF2 α, p-ATF4, and CHOP in the renal cortex of the DN+Lira group were significantly lower than those of the DN group ($P<0.05$). **Conclusion** Liraglutide may play a renal protective role by inhibiting the PERK/eIF2α/ATF4/CHOP pathway mediated by endoplasmic reticulum stress.

[**Key words**] diabetic kidney disease; liraglutide; endoplasmic reticulum stress

糖尿病肾病(diabetic kidney disease,DKD)是 糖尿病(diabetes mellitus,DM)最严重的微血管并

发症之一，也是世界各地终末期肾病的主要病因[1]。此外，DKD是心血管疾病的重要危险因素。因此，预防DKD的发生和发展具有重要意义。然而，目前的治疗策略，即降低血糖和血压以及抑制肾素－血管紧张素－醛固酮系统，并不能阻止病情的发生和发展[2]。因此，迫切需要针对DKD的致病机制建立新的治疗策略。内质网是细胞中重要的细胞器，是调节蛋白质合成、折叠、修饰和加工的场所。内质网是一种非常敏感的细胞器，许多内部或外部因素，如氧化应激、Ca^{2+}代谢紊乱和缺氧条件，都可能导致内质网应激[3]。近年来，越来越多的证据表明，内质网应激在DKD的发病机制中也起着关键作用[4]。此外，最近研究表明，蛋白激酶R样内质网激酶（protein kinase R-like ER kinase，PERK）/真核翻译起始因子eIF2的α亚基（Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2α，eIF2α）/活化转录因子4（activated transcription factor 4，ATF4）/C/EBP同源蛋白（C/EBP-homologous protein，CHOP）通路在内质网应激中发挥关键作用[5-6]。在DKD小鼠中，肾康注射液抑制肾小管上皮间充质转化和内质网应激诱导的细胞凋亡，并并抑制PERK-eIF2α-ATF4-CHOP信号通路的激活，从而减轻DKD[7]。因此，PERK/eIF2α/ATF4/CHOP通路可以作为预防和减轻DKD的新的治疗靶点。胰高血糖素样肽1（glucagon-like peptide-1，GLP-1）是一种由肠道L细胞分泌的肠促生长素，是治疗2型DM的新型药物。GLP-1通过GLP-1受体（GLP-1 receptor，GLP-1 R）发挥作用，该受体在包括肾脏在内的许多组织中广泛表达[8]。最近的临床试验报道，GLP-1 R激动剂能够降低2型DM患者的尿白蛋白[9]。先前的研究还表明，利拉鲁肽可以显著降低链脲佐菌素（streptozotocin，STZ）诱导的DM大鼠的尿蛋白水平[10]。此外，其他研究表明，GLP-1 R激动剂可能通过抑制DM啮齿动物氧化应激的增加而具有肾脏保护作用[11-12]。然而，GLP-1受体激动剂抑制DKD氧化应激的确切分子机制尚不清楚。基于上述证据，推测GLP-1类似物利拉鲁肽可能通过抑制蛋白激酶R样内质网激酶（protein kinase R-like ER kinase，PERK）/真核翻译起始因子eIF2的α亚基（phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2α，eIF2α）/活化转录因子4（activated transcription factor 4，ATF4）/C/EBP同源蛋白（C/EBP-homologous protein，CHOP）通路对早期肾损伤发挥肾脏保护作用。本研究的目的是探讨利拉鲁肽能否通过抑制PERK/eIF2α/ATF4/CHOP通路介导的氧化应激在DKD大鼠模型中起到预防早期肾损伤的作用。报告如下。

1　材料与方法

1.1　实验动物与实验设计　雄性Sprague-Dawley大鼠（6周龄，体重160～200 g）购自北京维通利华实验动物技术有限公司（China）（许可证号：SYXK（京）2022-0052）。所有实验程序均按照中国实验协会动物护理与使用指南进行，并经首都医科大学附属北京口腔医院机构动物护理与利用委员会批准（批准号：kqyy-2022-06-009）。所有大鼠均饲养在无病原体条件下的笼子里，温度（22～23 ℃）和光照（12 h黑暗/光照循环）。适应1周后，将大鼠随机分为正常饮食（NC）组（$n=8$）和高糖高脂饮食（high-sugar and high-fat diet，HSHF）组（$n=27$）。NC组大鼠采用正常饮食喂养，HSHF组大鼠则采用高糖高脂饮食喂养（包括20％的糖、15％的猪油、2.5％的胆固醇和62.5％的正常饮食组成的高糖高脂饮食），直至研究结束。所有的老鼠都可以自由获取饮食和引用水。8周后，HSHF组大鼠在禁食12 h后腹膜内注射30 mg/kg的STZ（Sigma，St. Louis，MO，USA）[STZ在柠檬酸盐缓冲液（pH＝4.5）中溶解]，NC组大鼠单独腹膜内注射柠檬酸盐缓冲液。3 d后，连续3 d空腹血糖浓度≥11.1 mmol/L的大鼠被视为DM[13]。注射STZ 5周后，将DM大鼠随机分为DKD对照组（DN组，$n=8$）和利拉鲁肽治疗组（DN＋Lira组，$n=8$）。DN＋Lira组大鼠皮下注射利拉鲁肽（Victoza，NovoNordic，Bagsvaerd，Denmark），6 mg利拉鲁肽溶于11 mL生理盐水，0.6 mg·kg^{-1}·d^{-1}，持续8周，而NC组和DN组大鼠则皮下注射等量的生理盐水[14]。

1.2　样本采集　在注射STZ后5周（利拉鲁肽给药后0周）和13周（利拉鲁肽给药后8周），使用单独的代谢笼收集24 h尿液样本，然后在－80 ℃下储存，直到进行分析。测量体重后处死所有大鼠。从大鼠的下腔静脉采集血样，并采集其肾脏，称重。将右肾皮质切成碎片，然后在液氮中快速保存，用于分子生物学研究。将左肾皮质切成小块（1 mm^3），然后快速固定在预冷的2.5％戊二醛中进行电子显微镜分析。剩余的左肾组织在10％福尔马林中固定24 h，并包埋在石蜡中进行过碘酸六胺银染色（periodic acid-silver metheramine，PASM）和免疫组织化学分析。

1.3 物理和生化测量 每周用血糖仪(Yuyue301, Jiangsu, China)测定尾静脉空腹血糖(fasting blood glucos,FBG)。在实验结束时,用DCA2000(Bayer, Pittsburgh, PA, USA)测量血液糖化血红蛋白(hemoglobin A_1c, HbA_1c)。食物摄入量计算为3 d内的平均值。通过自动生化分析仪(Olympus2700, Tokyo, Japan)检测血清肌酐(erum creatinine, SCr)和血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)。尿白蛋白排泄量表示为尿白蛋白/尿肌酐的比值。使用自动分析仪(BN Ⅱ, Siemens, Marburg, Germany)测量尿白蛋白,并使用自动生化分析仪(Olympus2700, Tokyo, Japan)测定尿SCr。

1.4 组织病理学分析 肾脏切片(2 μm)用过碘酸六胺银染色(periodic acid-silver metheramine, PASM),通过光学显微镜进行组织学检查(Olympus, Tokyo, Japan)。肾小球损伤的程度如前所述进行评估[15]。简言之,使用Image Pro Plus 6.0(Media Cybernetics, Silverspring, MD, USA)以每只大鼠20个肾小球测量肾小球簇面积和系膜基质面积(PASM阳性面积)。系膜基质指数表示为系膜基质面积/肾小球簇面积的比值。为了评估肾皮质的超微结构,按照先前研究中的描述对肾皮质进行了治疗[16]。用透射电子显微镜(HT7700, Hitachi, Tokyo, Japan)观察肾皮质的超微结构。

1.5 蛋白质免疫印迹法(Western blot, WB) 将肾皮质组织在裂解缓冲液(Beyotime, Shanghai, China)中匀浆,并以13 000 r/min离心10 min。用二辛可宁酸测定试剂盒(Beyotime, Shanghag, China)测定蛋白质浓度。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白(40 μg),并将其转移到聚偏二氟乙烯膜(Millipore, Bedford, MA, USA)上。在室温下用5%脱脂乳封闭30 min后,将膜与抗TGF-β1的兔多克隆抗体GRP78、抗IRE1α/p-IRE1α的兔多克隆抗体、抗ATF6的兔多抗体,抗Caspase-12的兔单克隆抗体、抗GAPDH的兔多克隆抗体、抗PERK/p-PERK的兔多克隆抗体、抗eIF2α的兔多克隆抗体、抗ATF4的的兔多克隆抗体和抗CHOP的的兔多克隆抗体(Abcam, Cambridge, UK),在4 ℃下孵育过夜。充分洗涤后,将膜与辣根过氧化物酶连接的二抗(1∶5 000; Boster, Wuhan, China)在37 ℃下孵育2 h。使用增强化学发光底物(Thermo Fisher Sciencific, USA)检测蛋白质。通过Image J软件对相对蛋白质水平进行量化,并将其标准化为GAPDH水平。

1.6 氧化应激水平分析 从中国南京建成生物工程研究所购买超氧化物歧化酶(superoxide diamutase, SOD)测定试剂盒、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)测定试剂盒分别测定SOD活性、ROS活性、MDA水平和MPO水平。

1.7 统计学方法 应用SPSS 17.0统计软件分析数据。计量资料比较采用单因素方差分析和SNK-q检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 利拉鲁肽对生化指标的影响 STZ注射后5周(利拉鲁肽给药后0周)直至STZ注射13周(利拉鲁肽给药后8周)时,DN组和DN+Lira组的FBG值显著高于NC组,DN组和DN+Lira组的FBG值之间差异无统计学意义($P>0.05$)。在使用利拉鲁肽治疗后,DN+Lira组的FBG在干预的第1周表现出急剧显著下降,第2周短暂增加,第3周后则逐渐降低,呈现出一定的时间依赖效应。FBG值显著降低于DN组,但显著高于NC组,组间、时点间、组间·时点间交互作用差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

STZ注射后13周(利拉鲁肽给药后8周),DN组和DN+Lira组FBG、HbA_1c、肾体重指数、SCr和BUN显著高于NC组,体重显著低于NC组;DN+Lila组FBG、HbA_1c、肾体重指数、SCr和BUN显著低于DN组,差异有统计学意义($P<0.05$)。DN组和DN+Lira组体重差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

STZ注射后5周(利拉鲁肽给药后0周)时,DN组和DN+Lira组的尿白蛋白/尿肌酐比率显著高于NC组,差异有统计学意义($P<0.05$),DN组和DN+Lira组尿白蛋白/尿肌酐比率差异无统计学意义($P>0.05$)。研究结束(利拉鲁肽给药后8周)时,DN组和DN+Lira组的尿白蛋白/尿肌酐比率显著高于NC组,DN+Lila组的ACR显著低于DN组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表1　干预期间各组大鼠FBG比较

Table 1　Comparison of FBG levels among different groups of rats during intervention

($n=8, \bar{x}\pm s$, mmol/L)

组别	0周	1周	2周	3周	4周	5周	6周	7周	8周
NC组	6.91±0.11	6.92±0.19	6.90±0.17	6.91±0.22	6.90±0.25	6.92±0.21	6.90±0.23	6.90±0.27	6.91±0.23
DN组	23.12±2.03	24.25±2.04	25.36±2.16	26.07±2.42	26.71±2.15	24.74±2.18	25.19±2.19	25.62±2.19	25.90±2.03
DN+Lira组	23.01±2.12	12.03±1.32	22.14±3.11	18.13±1.57	17.53±1.47	17.03±1.49	16.76±1.76	17.03±1.54	17.26±1.68
组间				F值=893.800		P值<0.001			
时点间				F值=3.900		P值<0.001			
组间·时点间				F值=4.700		P值<0.001			

表2　利拉鲁肽治疗后8周各组大鼠各项指标比较

Table 2　Comparison of various indicators in each group at 8 weeks after treatment with Liraglutide

($n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	FBG(mmol/L)	HbA_1c(%)	体重(g)	肾体重指数	SCr(μmol/L)	BUN(mmol/L)
NC组	6.61±0.59	3.43±0.23	496.61±24.58	6.46±0.26	42.71±5.53	7.19±0.76
DN组	26.65±1.51*	10.61±0.46*	366.67±40.57*	11.61±0.42*	65.64±5.79*	9.87±1.15*
DN+Lira组	17.62±0.79*#	8.31±0.38*#	346.17±26.53*	9.61±0.45*#	51.66±4.57*#	8.21±1.09*#
F值	743.305	789.013	54.079	362.329	37.714	14.220
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

*P值<0.05与NC组比较　#P值<0.05与DN组比较(SNK-q检验)

表3　利拉鲁肽治疗后8周各组大鼠尿白蛋白/尿肌酐比率比较

Table 3　Comparison of urinary albumin/creatinine ratio in different groups of rats at 8 weeks after treatment with Liraglutide

($n=8, \bar{x}\pm s$, U-Alb mg/U-Creag)

组别	0周	8周
NC组	4.59±0.54	4.67±0.64
DN组	20.12±2.03*	35.26±2.84*
DN+Lira组	20.02±2.11*	10.01±1.72*#
F值	216.250	560.393
P值	<0.001	<0.001

*P值<0.05与NC组比较　#P值<0.05与DN组比较(SNK-q检验)

2.2　肾脏组织病理学和超微结构变化　注射STZ 13周(利拉鲁肽给药后8周)后，与NC组相比，DN组的PASM染色显示肾小球系膜明显扩张。相反，DN+Lira组的病理变化显著改善(图1A)。电子显微镜显示，DN组的超微结构异常，包括肾小球基底膜(glomerular basement membrane，GBM)增厚和足细胞足突融合，然而，DN+Lira组的这些异常得到了改善(图1B)。系膜基质指数，即系膜基质面积/肾小球簇面积的比率，DN组和DN+Lira组系膜基质指数显著高于NC组，DN+Lira组系膜基质指数显著低于DN组，差异有统计学意义($P<0.05$)，见表4。

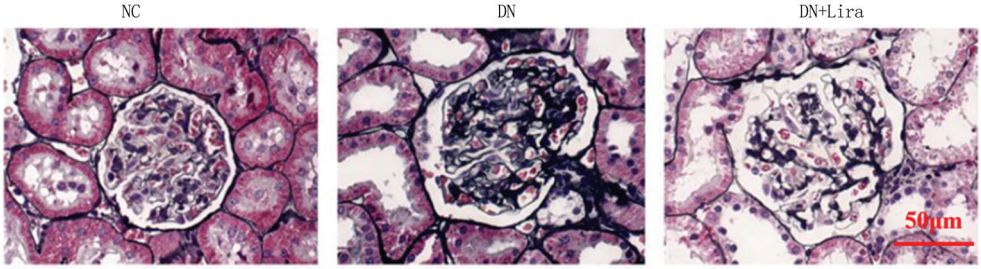
表4　各组系膜基质指数比较

Table 4　Comparison of mesangial matrix index in each group

($n=8, \bar{x}\pm s$, %)

组别	系膜基质指数
NC组	6.85±0.42
DN组	17.32±1.06*
DN+Lira组	9.37±0.84*#
F值	357.347
P值	<0.001

*P值<0.05与NC组比较　#P值<0.05与DN组比较(SNK-q检验)



Ⓐ

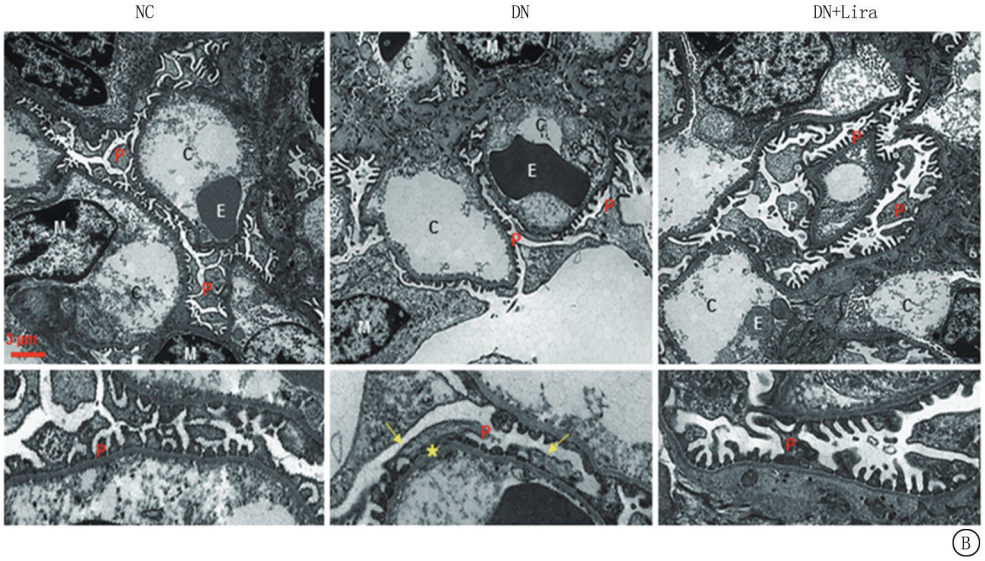


图1　肾脏组织病理学和超微结构变化

A.大鼠肾小球的PASM染色结果(×400)；B.TEM分析显示了肾小球组织的超微结构(×20 000)；C.毛簇；M.系膜细胞；P.足细胞；E.红细胞

Figure 1　Renal histopathological and ultrastructural changes

2.3　利拉鲁肽对DKD大鼠内质网应激和氧化损伤的影响　内质网氧化应激在DKD的发展中起着至关重要的作用。本研究探究了利拉鲁肽对大鼠肝脏内质网应激相关蛋白GRP78、IRE1α、p-IRE1α，ATF6和Caspase-12的影响。蛋白质免疫印迹结果显示，DN组GRP78、p-IRE1α，ATF6和Caspase-12的蛋白水平显著高于NC组，DN＋Lira组GRP78、p-IRE1α，ATF6和Caspase-12的蛋白水平显著低于DN组，差异有统计学意义($P<0.05$)，NC组和DN＋Lira组GRP78、p-IRE1α，ATF6和Caspase-12的蛋白水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见图2，表5。

此外，还检测了利拉鲁肽对氧化损伤的影响。评估大鼠血清中氧化应激相关标志物的水平。结果显示，DN组的MDA、ROS、MPO水平显著高于NC组，SOD水平低于NC组，DN＋Lira组中MDA、ROS、MPO水平显著低于DN组，SOD水平高于DN组，差异有统计学意义($P<0.05$)，见表6。

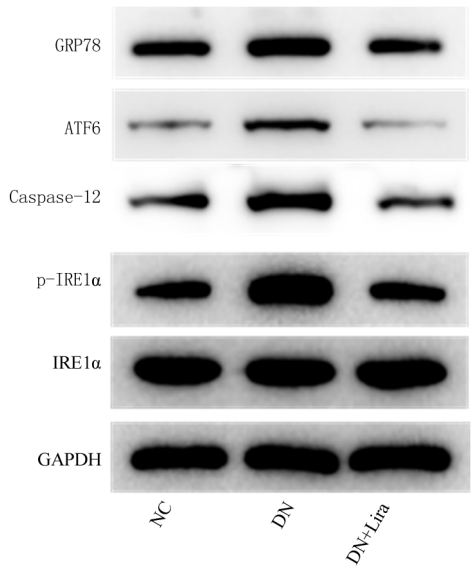


图2　利拉鲁肽对DKD大鼠内质网应激的影响

Figure 2　Effect of Liraglutide on endoplasmic reticulum stress in DKD rats

表5　各组大鼠肝脏内质网应激相关蛋白表达比较

Table 5　Comparison of endoplasmic reticulum stress-related protein expression in liver of rats in each group

($n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	GRP78	p-IRE1α/ IRE1α	ATF6	Caspase-12
NC组	0.87±0.12	0.96±0.15	0.39±0.09	0.57±0.08
DN组	1.32±0.13*	1.98±0.21*	0.68±0.10*	0.89±0.11*
DN＋Lira组	0.76±0.14#	0.82±0.18#	0.32±0.04#	0.50±0.06#
F值	41.509	97.196	44.386	46.950
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

*P值<0.05与NC组比较　#P值<0.05与DN组比较(SNK-q检验)

表6　各组大鼠肝脏内质网应激相关指标变化

Table 6　Changes of endoplasmic reticulum stress-related indexes in liver of rats in each group

($n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)	ROS(nmol/mg)	MPO(U/mg)
NC组	2.02±0.09	17.63±1.34	1.04±0.09	1.02±0.10
DN组	7.07±0.16*	6.73±1.29*	6.98±0.21*	6.05±0.24*
DN+Lira组	3.08±0.13#	13.11±1.65#	2.35±0.21#	2.23±0.18#
F值	3 363.336	116.428	2 427.273	1 654.296
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

*P值<0.05与NC组比较　#P值<0.05与DN组比较(SNK-q检验)

2.4　利拉鲁肽对肾皮质中PERK/eIF2α/ATF4/CHOP通路活性的影响　为了进一步揭示利拉鲁肽在DKD大鼠中抗蛋白尿作用的机制，进一步探究了PERK/eIF2α/ATF4/CHOP通路是否在利拉鲁肽介导DKD大鼠中抗蛋白尿中发挥作用。WB检测结果显示，在利拉鲁肽治疗后8周，DN组肾皮质中p-PERK、p-eIF2α、ATF4和CHOP水平显著高于NC组，DN+Lira组的肾皮质中p-PERK、p-eIF2α、p-ATF4和CHOP的水平显著低于DN组，差异有统计学意义($P<0.05$)，见表7、图3。

表7　各组大鼠肾皮质中PERK/eIF2α/ATF4/CHOP通路活性的变化

Table 7　The changes of PERK/eIF2α/ATF4/CHOP pathway activity in renal cortex of rats in each group

($n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	CHOP	p-PERK/ PERK	p-eIF2α/ eIF2α	p-ATF4/ATF4
NC组	0.39±0.09	0.67±0.15	0.32±0.09	0.47±0.08
DN组	1.38±0.19*	1.26±0.21*	0.89±0.10*	0.96±0.11*
DN+Lira组	0.37±0.08#	0.70±0.19#	0.30±0.04#	0.50±0.07#
F值	158.150	25.807	136.731	77.368
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

*P值<0.05与NC组比较　#P值<0.05与DN组比较(SNK-q检验)

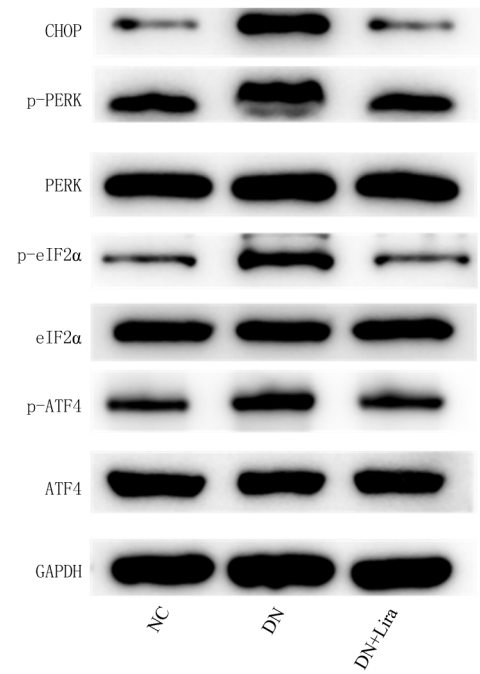


图3　利拉鲁肽对肾皮质中PERK/eIF2α/ATF4/CHOP通路活性的影响

Figure 3　Effect of Liraglutide on the activity of PERK/eIF2α/ATF4/CHOP pathway in renal cortex

3　讨　论

本研究结果显示，利拉鲁肽显著降低了2型DKD大鼠模型中的SCr、BUN、尿白蛋白排泄、肾与体重指数，并改善了肾脏组织病理学和超微结构的变化。利拉鲁肽可以抑制肾皮质中PERK/eIF2α/ATF4/CHOP通路活性。目前的结果表明利拉鲁肽可能通过抑制PERK/eIF2α/ATF4/CHO的活性而发挥肾脏保护作用氧化应激在DKD的发病机制中起着至关重要的作用。高血糖可通过一系列异常代谢途径导致ROS的形成增加，如AGEs的形成增加、多元醇的积累以及肾脏中PKC和NADPH氧化酶的激活[17]。此外，ROS产生增加或抗氧化酶产生减少可导致氧化应激[18]。升高的氧化应激可以激活一系列信号通路，包括PI3K/Akt和JNK通路，这些通路导致核因子κB的激活。此外，该转录因子上调TGF-β1和结缔组织生长因子的表达，导致系膜基质蛋白的产生增加、系膜基质沉积、系膜扩张、肾小球基底膜增厚、足细胞损伤和凋亡[19]。此外，已经证实SOD活性的上调可以减轻DM大鼠的肾损伤[20]。因此，通过抑制ROS的形成或提高抗氧化酶的活性来抑制氧化应激可能是预防DKD进展的一种有效且有前景的治疗策略。SOD和过氧化氢酶是能够抑制氧化应激的主要抗氧化分子[21]。越来越多的证据证实，在DKD动物模型中，增强SOD和过氧化氢酶的表达可以减少蛋白尿、

TGF-β1 的表达和氧化应激[19]。本研究结果显示，DN 组的 MDA、ROS 和 MPO 水平显著升高，SOD 水平显著降低，但利拉鲁肽治疗显著减轻了 STZ 诱导的大鼠血清中 MDA、ROS 和 MPO 水平的增加，并提高 SOD 的水平。因此，提高抗氧化酶的活性可能是预防 DKD 发作和进展的一种有前途的方法。

利拉鲁肽是一种用于治疗 2 型 DM 的 GLP-1 类似物，被认为具有有益的肾脏保护作用[22]。最近，临床试验证据证实，利拉鲁肽治疗与 2 型 DM 患者的抗蛋白尿作用有关[9]。在动物模型中，GLP-1 R 激动剂通过改善代谢异常[8]、抑制炎症[23]、阻断 AGEs 的产生[24]、抑制氧化应激[11-12]来减缓 DKD 的进展。本研究结果表明，DN＋Lira 组的 SCr、BUN、ACR 水平和肾体重指数显著低于 DN 组，系膜基质指数、内质网应激标记蛋白(GRP78、IRE1α、p-IRE1α、ATF6 和 Caspase-12)的蛋白表达均低于 DN 组。表明利拉鲁肽可能具有肾脏保护作用。一项研究表明，在 STZ 诱导的 DM 大鼠中，GLP-1 R 激动剂 exendin-4 通过减少巨噬细胞释放促炎细胞因子来抑制氧化应激，从而改善肾损伤[23]。另一份报道表明，利拉鲁肽通过抑制 STZ 诱导的 DM 大鼠肾脏 NADPH 氧化酶的激活来抑制氧化应激[12]。然而，GLP-1 R 激动剂对氧化应激的抑制作用的确切分子机制尚未完全阐明。最近的研究表明，在动物模型中，尿白蛋白的减少以及肾皮质氧化应激的抑制与 FoxO1 生物活性的上调有关[25]。此外，肾脏 FoxO1 的过表达改善了 DM 大鼠的肾损伤，同时降低了 MDA，增加了 MnSOD 和过氧化氢酶的表达[26]。本研究结果显示，DN 组大鼠 MDA、ROS 和 MPO 水平升高，同时伴有尿白蛋白升高，与 DKD 相关的显著形态学变化、抗氧化酶 SOD 水平降低。相反，利拉鲁肽部分逆转了这些变化。总之，利拉鲁肽可能通过抑制内质网应激和氧化损伤对大鼠 DKD 发挥保护作用。

PERK/eIF2α/ATF4/CHOP 通路是调节细胞存活的重要信号通路。PERK 是一种在内质网应激时被磷酸化的内质网跨膜蛋白。随后，磷酸化 eIF2α 的表达受到刺激，导致激活 ATF4 的翻译活性增强。然后，CHOP 的 ATF4 依赖性表达上调，这是一个关键的促凋亡转录[27]。据报道，CHOP 通过多种途径诱导细胞凋亡，包括线粒体依赖性途径、死亡受体途径和其他途径[28]。缺失突变分析表明，CHOP 在细胞凋亡中起着至关重要的作用，并与内质网应激引起的许多疾病有关[29]。在正常情况下，CHOP 的表达是不可观察到的。然而，在病理条件下，CHOP 被急剧释放并引发细胞凋亡。同样，本研究观察利拉鲁肽处理的大鼠肾皮质中 p-PERK、p-eIF2α、ATF4 和 CHOP 蛋白的水平明显降低。这些结果表明 PERK/eIF2α/ATF4/CHOP 通路在 STZ 诱导的内质网应激中起作用。

本研究存在一些局限性。首先，由于血糖水平的下降和缺乏细胞实验，无法证明利拉鲁肽是否直接诱导肾脏中 PERK/eIF2α/ATF4/CHOP 通路活性，而与降血糖作用无关。其次，利拉鲁肽是否能改善晚期 DKD 患者的肾损伤还有待进一步研究。因此，基于上述问题，需要进一步研究利拉鲁肽在大鼠系膜细胞和 DKD 不同阶段改善 DM 肾损伤的分子机制。综上所述，利拉鲁肽可有效改善 2 型 DKD 大鼠模型的肾功能和与 DKD 相关的肾脏病理变化。这些作用的潜在机制可能与肾脏中 PERK/eIF2α/ATF4/CHOP 通路活性的抑制有关。尽管利拉鲁肽作用的确切分子机制尚不清楚，但本研究的发现为未来的人体试验提供了有价值的信息。

[参考文献]

[1] Bjornstad P, Cherney DZ, Maahs DM, et al. Diabetic kidney disease in adolescents with type 2 diabetes: new insights and potential therapies[J]. Curr Diab Rep, 2016, 16(2): 11.

[2] Kirkman MS, Mahmud H, Korytkowski MT. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2018, 47(1): 81-96.

[3] Han J, Kaufman RJ. The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity[J]. J Lipid Res, 2016, 57(8): 1329-1338.

[4] Xie Y, E J, Cai H, et al. Reticulon-1A mediates diabetic kidney disease progression through endoplasmic reticulum-mitochondrial contacts in tubular epithelial cells[J]. Kidney Int, 2022, 102(2): 293-306.

[5] Chen S, Li X, Zhang X, et al. PCV2 and PRV coinfection induces endoplasmic reticulum stress via PERK-eIF2alpha-ATF4-CHOP and IRE1-XBP1-EDEM pathways[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(9): 4479.

[6] Li J, Zhuo JY, Zhou W, et al. Endoplasmic reticulum stress triggers delanzomib-induced apoptosis in HCC cells through the PERK/eIF2alpha/ATF4/CHOP pathway[J]. Am J Transl Res, 2020, 12(6): 2875-2889.

[7] Wang WW, Liu YL, Wang MZ, et al. Inhibition of renal tubular epithelial mesenchymal transition and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis with shenkang injection attenuates diabetic tubulopathy[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 662706.

[8] Park CW, Kim HW, Ko SH, et al. Long-term treatment of glucagon-like peptide-1 analog exendin-4 ameliorates diabetic

nephropathy through improving metabolic anomalies in db/db mice[J]. J Am Soc Nephrol,2007,18(4):1227－1238.

[9] Imamura S, Hirai K, Hirai A. The glucagon-like peptide-1 receptor agonist, liraglutide, attenuates the progression of overt diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients[J]. Tohoku J Exp Med,2013,231(1):57－61.

[10] Wang W, Wu RD, Chen P, et al. Liraglutide combined with human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation inhibits beta-cell apoptosis via mediating the ASK1/JNK/BAX pathway in rats with type 2 diabetes[J]. Diabetes Metab Res Rev,2020,36(2):e3212.

[11] Fujita H, Morii T, Fujishima H, et al. The protective roles of GLP-1R signaling in diabetic nephropathy: possible mechanism and therapeutic potential[J]. Kidney Int,2014,85(3):579－589.

[12] Hendarto H, Inoguchi T, Maeda Y, et al. GLP-1 analog liraglutide protects against oxidative stress and albuminuria in streptozotocin-induced diabetic rats via protein kinase A-mediated inhibition of renal NAD(P)H oxidases[J]. Metabolism,2012,61(10):1422－1434.

[13] Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening[J]. Pharmacol Res,2005,52(4):313－320.

[14] Xiao S, Yang Y, Liu YT, at al. Liraglutide regulates the kidney and liver in diabetic nephropathy rats through the miR-34a/SIRT1 pathway[J]. J Diabetes Res, 2021, 2021: 8873956.

[15] Okada S, Shikata K, Matsuda M, et al. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are resistant against renal injury after induction of diabetes[J]. Diabetes,2003,52(10):2586－2593.

[16] Wu L, Zhang Y, Ma X, et al. The effect of resveratrol on FoxO1 expression in kidneys of diabetic nephropathy rats[J]. Mol Biol Rep,2012,39(9):9085－9093.

[17] Sasaki S, Inoguchi T. The role of oxidative stress in the pathogenesis of diabetic vascular complications[J]. Diabetes Metab J,2012,36(4):255－261.

[18] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications[J]. Nature, 2001, 414(6865): 813－820.

[19] Singh DK, Winocour P, Farrington K. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire[J]. Nat Rev Endocrinol,2011,7(3):176－184.

[20] Ebenezer PJ, Mariappan N, Elks CM, et al. Diet-induced renal changes in Zucker rats are ameliorated by the superoxide dismutase mimetic TEMPOL[J]. Obesity (Silver Spring), 2009,17(11):1994－2002.

[21] Miranda-Diaz AG, Pazarin-Villasenor L, Yanowsky-Escatell FG, et al. Oxidative stress in diabetic nephropathy with early chronic kidney disease[J]. J Diabetes Res, 2016, 2016: 7047238.

[22] Muskiet MH, Smits MM, Morsink LM, et al. The gut-renal axis: do incretin-based agents confer renoprotection in diabetes? [J]. Nat Rev Nephrol,2014,10(2):88－103.

[23] Kodera R, Shikata K, Kataoka HU, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model of type 1 diabetes[J]. Diabetologia, 2011, 54(4):965－978.

[24] Ojima A, Ishibashi Y, Matsui T, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist inhibits asymmetric dimethylarginine generation in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats by blocking advanced glycation end product-induced protein arginine methyltranferase-1 expression[J]. Am J Pathol,2013,182(1):132－141.

[25] Hussein MM, Mahfouz MK. Effect of resveratrol and rosuvastatin on experimental diabetic nephropathy in rats[J]. Biomed Pharmacother,2016,82:685－692.

[26] Qin G, Zhou Y, Guo F, et al. Overexpression of the FoxO1 ameliorates mesangial cell dysfunction in male diabetic rats[J]. Mol Endocrinol,2015,29(7):1080－1091.

[27] Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease[J]. J Hepatol,2011,54(4):795－809.

[28] Hu H, Tian M, Ding C, et al. The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection[J]. Front Immunol,2018,9:3083.

[29] Rao J, Zhang C, Wang P, et al. C/EBP homologous protein (CHOP) contributes to hepatocyte death via the promotion of ERO1alpha signalling in acute liver failure[J]. Biochem J, 2015,466(2):369－378.

（本文编辑：赵丽洁）