·论 著·

# 利拉鲁肽对 2 型糖尿病肾病大鼠细胞焦亡、炎症细胞浸润及对 NF-κB 通路的影响

陈亚晖，杜海波，冯向峰

（江苏省淮安市第五人民医院肾内科，江苏 淮安 223300）

［摘要］ **目的** 探究利拉鲁肽（liraglutide，LIR）对 2 型糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）大鼠细胞焦亡、炎症细胞浸润及对核因子 κB（nuclear factor-κB，NF-κB）通路的影响。**方法** 选取 45 只大鼠，随机选取 10 只为对照组，其余 35 只大鼠建立 DN 模型，30 只大鼠建模成功，并随机分为 3 组（DN 组及 LIR 高、LIR 低剂量组），各 10 只。LIR 低、高剂量组分别给予 LIR 100、200 g·kg$^{-1}$·d$^{-1}$，对照组及 DN 组给予等量的生理盐水。连续灌胃给药 2 周后，测量大鼠肾功能指标血清炎症因子水平，炎症细胞计数评估炎症细胞浸润情况，TUNEL 染色法检测 DNA 损伤情况；检测细胞焦亡相关蛋白天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1（Caspase-1）、白细胞介素 1β（interleukin-1β，IL-1β）、白细胞介素 18（interleukin-18，IL-18）及 NF-κB 通路相关蛋白的表达量。**结果** 与对照组比较，DN 组空腹血糖（fasting blood glucose，FBG）、24 h 尿蛋白（urine total protein，UTP）及血尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）、肿瘤坏死因子 α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素 1β（interleukin-1β，IL-1β）、及白细胞介素 6（interleukin-6，IL-6）水平升高，炎症细胞计数增多，TUNEL 阳性细胞率升高，Caspase-1、IL-1β、IL-18、Toll 样受体 4（Toll like receptor 4，TLR4）、p-NF-κB/NF-κB 及核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3（NLRP3）蛋白表达上调（$P<0.05$）；与 DN 组比较，LIR 低、高剂量组 FBG、UTP 及 BUN 水平降低，TNF-α、IL-1β 及 IL-6 水平降低，炎症细胞计数减少，TUNEL 阳性细胞率降低，Caspase-1、IL-1β、IL-18、TLR4、p-NF-κB/NF-κB 及 NLRP3 蛋白表达下调（$P<0.05$）；与 LIR 低剂量组比较，LIR 高剂量组 FBG、UTP 及 BUN 水平降低，TNF-α、IL-1β 及 IL-6 水平降低，炎症细胞计数减少，TUNEL 阳性细胞率降低，Caspase-1、IL-1β、IL-18、TLR4、p-NF-κB/NF-κB 及 NLRP3 蛋白表达下调（$P<0.05$）。**结论** LIR 能够改善 2 型 DN 大鼠炎症细胞浸润，抑制细胞焦亡，其作用机制可能抑制 NF-κB 通路有关。

［关键词］ 糖尿病肾病；利拉鲁肽；NF-κB doi：10.3969/j.issn.1007-3205.2024.02.015

［中图分类号］ R587.24 ［文献标志码］ A ［文章编号］ 1007-3205(2024)02-0208-07

## Effects of liraglutide on pyroptosis, inflammatory cell infiltration and NF-κB pathway in rats with type 2 diabetic nephropathy

CHEN Ya-hui, DU Hai-bo, FENG Xiang-feng

(*Department of Nephrology, the Fifth People's Hospital of Huai'an, Jiangsu Province, Huai'an* 223300, *China*)

［**Abstract**］ **Objective** To investigate the effects of liraglutide (LIR) on pyroptosis, inflammatory cell infiltration and nuclear factor-κB (NF-κB) pathway in rats with type 2 diabetic nephropathy (DN). **Methods** A total of 45 rats were selected, from which 10 were randomly selected as control group, and the other 35 rats were used to establish DN model. A total of 30 rats were used to estabolish models sucecessfully and randomly divided into three groups (DN group, high-dose LIR group and low-dose LIR group), with 10 rats in each group. High- and low-dose LIR groups were given LIR100 and 200 g·kg$^{-1}$·d$^{-1}$, respectively, while control group and DN group were given the same amount of normal saline. After 2 weeks of continuous

［收稿日期］2022－11－24

［基金项目］ 江苏省自然科学基金（BK20201497）

［作者简介］陈亚晖（1990－），男，江苏淮安人，江苏省淮安市第五人民医院主治医师，医学硕士，从事肾脏疾病诊治研究。

intragastolic administration, renal function indexes and the serum inflammatory factors were measured, and the inflammatory cell infiltration was evaluated by inflammatory cells. DNA damage was detected by TUNEL staining, and the expression levels of Caspase-1, interleukin-1β (IL-1β), interleukin-18 (IL-18), NF-κB pathway related proteins were detected. **Results** Compared with the control group, the levels of fasting blood glucose(FBG), 24 h urine total protein (UTP), blood urea nitrogen (BUN), tumor necrosis factor-α (TNF-α), IL-1β, interleukin-6 (IL-6), the number of inflammatory cells, and the rate of TUNEL positive cells in DN group were increased, and the protein expressions of Caspase-1, IL-1β, IL-18, Toll like receptor 4 (TLR4), P-NF-κB/NF-κB and nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) were up-regulated ($P<0.05$). Compared with DN group, the levels of FBG, UTP and BUN, TNF-α, IL-1β and IL-6, inflammatory cell count and TUNEL positive cell rate were decreased in low-dose and high-dose LIR groups, and the expression of Caspase-1, IL-1β, IL-18, TLR4, P-NF-κB/NF-κB and NLRP3 protein were decreased ($P<0.05$). Compared with low-dose LIR group, the levels of FBG, UTP and BUN, TNF-α, IL-1β and IL-6, inflammatory cell count and TUNEL positive cell rate were decreased in high-dose LIR group, and the expression of Caspase-1, IL-1β, IL-18, TLR4, P-NF-κB/NF-κB and NLRP3 protein were decreased ($P<0.05$). **Conclusion** LIR can improve inflammatory cell infiltration and inhibit pyroptosis in type 2 DN rats, and its mechanism may be related to inhibition of NF-κB pathway.

[**Key words**] diabetic nephropathies; liraglutide; NF-kappa B

糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)是由糖尿病引起的微血管并发症,主要表现为肾功能异常、蛋白尿等,若不及时干预会发展为终末期肾病,危及患者生命[1]。DN病因复杂,随着对DN的深入了解,研究发现,DN是一种慢性炎症性疾病,高糖会刺激产生炎症反应,是DN发展的重要因素[2]。细胞凋亡是细胞程序性死亡的另一种方式,又称细胞炎性坏死,是指细胞膨胀细胞膜破裂后,细胞内容物质大量释放,激活机体炎症反应[3-4]。目前有研究显示,DN体内肾脏细胞能够观察到大量细胞焦亡,且靶向干预后有所改善[5]。胰高血糖素样肽1(glucagon-like peptide-1,GLP-1)是一种内源性促胰岛素激素,能够与GLP-1受体结合,发挥一定的降糖作用,目前GLP-1受体已成为2型糖尿病的治疗靶点[6]。利拉鲁肽(liraglutide,LIR)是GLP-1受体激动剂,基础研究显示,LIR能够改善大鼠肾脏功能,对肾脏具有一定的保护作用,但如何发挥这种保护作用目前尚不清楚[7]。NF-κB通路是炎症反应相关的重要通路,LIR可能通过NF-κB通路,影响DN大鼠细胞焦亡、炎症细胞浸润,从而发挥对肾脏的保护作用。目前相关研究较少,本文对此进行研究,以期对DN的治疗提供新的研究方向。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物　大鼠:45只SD级大鼠,体重171～232 g,平均(202±14)g,购于中国人民解放军海军军医大学,许可证为[生产许可SCXK(沪)2022-0002;使用许可SYXK(沪)2022-0011]。

本研究经伦理委员会批准进行。

1.2 药物试剂及仪器药物　利拉鲁肽(国药准字J20160037,丹麦诺和诺德公司,规格:3 mL:18 mg)。

试剂:24 h尿蛋白(urinetotalprotein,UTP)及尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)试剂盒均购于上海晶抗生物工程有限公司(UTP货号:JKSJ-1820,BUN货号:JK-R7143);肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素1β(interleukin-1β, IL-1β)、及白细胞介素6(interleukin-6,IL-6)试剂盒购于博辉生物科技(广州)有限公司(TNF-α货号:EK-R38696;IL-1β货号:EK-R36877;IL-6货号:EK-R36902);TUNEL试剂盒(上海康朗生物科技有限公司,货号:KL-D6100);天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶1(Caspase-1)、IL-1β、白细胞介素18(interleukin-18, IL-18)、Toll样受体4(Toll like receptor 4,TLR4)、NF-κB、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3,NLRP3)一抗及二抗均购于湖北艾美捷科技有限公司;仪器:小动物血糖仪(型号:ACCU-CHER,上海玉研科学仪器有限公司);全自

动轮转式石蜡切片及(型号:HM3555,上海聚慕医疗器械有限公司);电泳仪(型号:E2502-400,美国ACCURIS公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 模型建立及分组 选取45只大鼠,随机选取10只为对照组,其余35只大鼠建立DN模型。所有大鼠适应性喂养3 d后,对照组给予常规饲料喂养,除对照组外,其余大鼠采用高糖高脂饲料喂养4周,4周后腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)(35 mg/kg),采集大鼠尾静脉血测量大鼠空腹血糖,>16.7 mmol/L表明2型血糖尿病模型建立成功。35只大鼠中2只死亡,2只空腹血糖<16.7 mmol/L。其余31只大鼠继续给予高糖高脂饲料喂养1周,1周后收集大鼠24 h尿液,测量24 h尿量及尿白蛋白含量,并计算尿白蛋白排泄率(24 h尿量×尿蛋白含量/1 440 min),尿白蛋白排泄率>20 μg/min,DN建模成功[8]。31只大鼠中1只建模失败,其余均成功建立DN模型,并随机分为3组(DN组及LIR高、LIR低剂量组),各10只。

1.2.2 药物干预 建模成功后,参照人与大鼠药物剂量换算系数[9],LIR低、高剂量组分别给予LIR 100 kg/d、200 kg/d,对照组及DN组给予等量的生理盐水。

1.2.3 样本采集及处理 药物干预完成后,采用代谢笼收集大鼠24 h尿液,并采集大鼠尾静脉血用于后续检测。样本采集完成后腹腔给药2%戊巴比妥钠,完成麻醉,迅速处死所有大鼠,取出肾脏,左侧肾脏采用4%多聚甲醛溶液进行固定,用于DNA损伤检测,右侧肾脏于-80 ℃冷冻保存,用于蛋白质表达量的检测。

1.2.4 大鼠血清生化指标检测 血清生化指标包括肾功能指标及炎症指标:①空腹血糖(fasting blood glucose,FBG)水平采用血糖仪检测,检测大鼠尾静脉血,得到FBG水平;②UTP采用酶联免疫法法检测,取代谢笼收集的24 h尿液,离心后(2 500 r/min,10 min)取上清液检测,参考相应试剂盒检测UTP水平;③BUN采用分光光度法检测,TNF-α、IL-1β及IL-6采用酶联免疫法检测,取尾静脉血离心后取上清液,参照试剂盒说明书检测BUN、TNF-α、IL-1β及IL-6水平。

1.2.5 大鼠肾脏组织炎症细胞浸润情况检测 取部分固定好的肾脏组织,经脱水、透明、石蜡包埋等一系列处理后,制成厚度约4 μm的切片,HE染色后与光镜下观察,进行炎症细胞计数,随机选取5个不含肾小球的视野,于400倍下拍照并计数中性粒细胞、单核巨噬细胞等炎症细胞个数。

1.2.6 TUNEL染色法检测大鼠肾组织细胞DNA损伤情况 取制作好的石蜡切片,采用不同浓度的酒精进行梯度脱水,并加入20 mg/L的蛋白酶K进行修复,反应15 min后,先后加入TUNEL反应液、POD阳性信号转化剂各50 μL,孵育后加入DBA显色,苏木素复染,并再次梯度脱水,采用二甲苯透明处理,封片后于显微镜下进行观察。正常细胞核为蓝色,阳性细胞为棕黄色,表明细胞DNA损伤。取5个视野统计阳性细胞数,并计算TUNEL阳性细胞率(阳性细胞数/总细胞数)[10]。

1.2.7 免疫印迹法检测大鼠肾脏组织细胞焦亡相关蛋白Caspase-1、IL-1β、IL-18及NF-κB表达 取部分冷冻保存的肾脏布置,研磨成匀浆后加入细胞裂解液,裂解肾脏细胞,提取肾脏总蛋白,检测蛋白浓度后进行免疫电泳,分离Caspase-1、IL-1β、IL-18、TLR4、NF-κB、NLRP3及内参条带,转膜后室温封闭,先后加入稀释后的对应一抗、二抗(一抗稀释比为1∶500,二抗稀释比为1∶2 000),孵育,冲洗。显色、定影,上述操作完成后分析蛋白表达量[11]。

1.3 统计学方法 应用SPSS 20.0统计软件处理数据。计量资料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 各组大鼠DN相关指标比较 与对照组比较,DN组FBG、UTP及BUN水平升高;与DN组比较,LIR低、高剂量组FBG、UTP及BUN水平降低;与LIR低剂量组比较,LIR高剂量组FBG、UTP及BUN水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表1。

2.2 各组大鼠血清炎症因子水平比较 与对照组比较,DN组TNF-α、IL-1β及IL-6水平升高;与DN组比较,LIR低、高剂量组TNF-α、IL-1β及IL-6水平降低;与LIR低剂量组比较,LIR高剂量组TNF-α、IL-1β及IL-6水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表2。

**表 1　各组大鼠 DN 相关指标比较**

**Table 1　Comparison of DN-related indexes in each group**

($n=10, \bar{x}\pm s$)

| 组别 | FBG(mmol/L) | UTP 尿蛋白(mg/24 h) | BUN(mmol/L) |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 5.47±0.31 | 9.17±1.02 | 5.84±0.69 |
| DN 组 | 25.70±2.79* | 51.68±5.26* | 10.97±1.34* |
| LIR 低剂量组 | 22.43±2.03*# | 42.56±3.96*# | 9.15±1.01*# |
| LIR 高剂量组 | 19.38±1.46*#△ | 26.72±2.15*#△ | 8.33±0.79*#△ |
| $F$ 值 | 224.142 | 284.765 | 46.330 |
| $P$ 值 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

* $P$ 值<0.05 与对照组比较　# $P$ 值<0.05 与 DN 组比较　△$P$ 值<0.05 与 LIR 低剂量组比较(SNK-$q$ 检验)

**表 2　各组大鼠血清炎症因子水平比较**

**Table 2　Comparison of the levels of serum inflammatory factors in each group**

($n=10, \bar{x}\pm s$, ng/L)

| 组别 | TNF-α | IL-1β | IL-6 |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 74.86±6.80 | 153.34±16.81 | 118.37±10.03 |
| DN 组 | 129.39±10.65* | 339.36±26.75* | 253.56±20.44* |
| LIR 低剂量组 | 113.26±9.35*# | 306.46±22.79*# | 231.26±18.72*# |
| LIR 高剂量组 | 84.55±7.99*#△ | 210.95±17.83*#△ | 169.81±13.70*#△ |
| $F$ 值 | 81.874 | 159.929 | 141.830 |
| $P$ 值 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

* $P$ 值<0.05 与对照组比较　# $P$ 值<0.05 与 DN 组比较　△$P$ 值<0.05 与 LIR 低剂量组比较(SNK-$q$ 检验)

2.3　浸润情况比较　与对照组比较，DN 组炎症细胞计数增多；与 DN 组比较，LIR 低、高剂量组炎症细胞计数减少；与 LIR 低剂量组比较，LIR 高剂量组炎症细胞计数减少，差异均有统计学意义($P<0.05$)，见表 3。

**表 3　各组大鼠炎症细胞计数比较**

**Table 3　Comparison of inflammatory cell count in each group**

($n=10, \bar{x}\pm s$, %)

| 组别 | 炎症细胞计数 |
|---|---|
| 对照组 | 8.60±1.26 |
| DN 组 | 18.65±3.25* |
| LIR 组 | 14.85±2.05*# |
| LIR 高剂量组 | 11.24±2.10*#△ |
| $F$ 值 | 36.831 |
| $P$ 值 | <0.001 |

* $P$ 值<0.05 与对照组比较　# $P$ 值<0.05 与 DN 组比较　△$P$ 值<0.05 与 LIR 低剂量组比较(SNK-$q$ 检验)

2.4　各组大鼠肾足细胞 DNA 损伤比较　与对照组比较，DN 组阳性细胞数增多，TUNEL 阳性细胞率升高；与 DN 组比较，LIR 低、高剂量组阳性细胞数减少，TUNEL 阳性细胞率降低；与 LIR 低剂量组比较，LIR 高剂量组阳性细胞数减少，TUNEL 阳性细胞率降低，差异均有统计学意义($P<0.05$)，见表 4，图 1。

2.5　各组大鼠肾脏组织细胞焦亡相关蛋白 Caspase-1、IL-1β、IL-18 表达量比较　与对照组比较，DN 组 Caspase-1、IL-1β 及 IL-18 蛋白表达上调；与 DN 组比较，LIR 低、高剂量组 Caspase-1、IL-1β 及 IL-18 蛋白表达下调；与 LIR 低剂量组比较，LIR 高剂量组 Caspase-1、IL-1β 及 IL-18 蛋白表达下调，差异均有统计学意义($P<0.05$)，见表 5，图 2。

**表 4　各组大鼠血清炎症因子水平比较**

**Table 4　Comparison of serum inflammatory factors in each group**

($n=10, \bar{x}\pm s$, %)

| 组别 | 阳性细胞率 |
|---|---|
| 对照组 | 14.78±1.73 |
| DN 组 | 33.76±3.65* |
| LIR 低剂量组 | 23.46±3.02*# |
| LIR 高剂量组 | 19.63±2.24*#△ |
| $F$ 值 | 85.324 |
| $P$ 值 | <0.001 |

* $P$ 值<0.05 与对照组比较　# $P$ 值<0.05 与 DN 组比较　△$P$ 值<0.05 与 LIR 低剂量组比较(SNK-$q$ 检验)

2.6　各组大鼠肾脏组织 NF-κB 通路相关蛋白表达量比较　与对照组比较，DN 组 TLR4、p-NF-κB/NF-κB 及 NLRP3 蛋白表达上调；与 DN 组比较，LIR 低、高剂量组 TLR4、p-NF-κB/NF-κB 及 NLRP3 蛋白表达下调；与 LIR 低剂量组比较，LIR 高剂量组 TLR4、p-NF-κB/NF-κB 及 NLRP3 蛋白表达下调，差异均有统计学意义($P<0.05$)，见表 6，图 3。

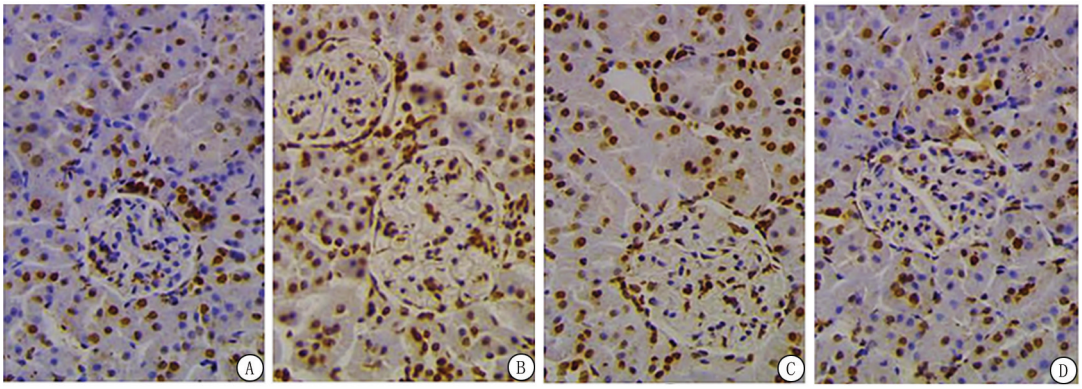



**图1　各组肾组织细胞DNA损伤图(HE染色 ×400)**

A.对照组;B.DN组;C.LIR低剂量组;D.LIR高剂量组

**Figure 1　DNA damage of renal tissue cells in each group (HE staining ×400)**

**表5　各组大鼠肾脏组织细胞焦亡相关蛋白**

**Table 5　Comparison ofexpression levels of pyroptosis-related proteins Caspase-1, IL-1β and IL-18 in renal tissue cells of rats in each group**

($n=10, \bar{x}\pm s$, ng/L)

| 组别 | Caspase-1 | IL-1β | IL-18 |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 0.11±0.02 | 0.09±0.01 | 0.12±0.03 |
| DN组 | 0.89±0.09* | 0.79±0.12* | 0.99±0.11* |
| LIR低剂量组 | 0.35±0.04*# | 0.47±0.06*# | 0.41±0.05*# |
| LIR高剂量组 | 0.26±0.07*#△ | 0.21±0.03*#△ | 0.16±0.02*#△ |
| *F* 值 | 307.800 | 202.667 | 404.696 |
| *P* 值 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

* *P* 值<0.05 与对照组比较　# *P* 值<0.05 与DN组比较　△ *P* 值<0.05 与LIR低剂量组比较(SNK-*q* 检验)

**表6　各组大鼠肾脏组织NF-κB通路相关蛋白表达量比较**

**Table 6　Comparison of NF-κB pathway-related protein expression levels in renal tissues of rats in each group**

($n=10, \bar{x}\pm s$)

| 组别 | TLR4 | p-NF-κB/NF-κB | NLRP3 |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 0.27±0.03 | 0.58±0.06 | 0.34±0.04 |
| DN组 | 1.13±0.12* | 0.91±0.10* | 0.88±0.09* |
| LIR低剂量组 | 0.75±0.08*# | 0.80±0.09*# | 0.75±0.08*# |
| LIR高剂量组 | 0.49±0.05*#△ | 0.67±0.07*#△ | 0.36±0.04#△ |
| *F* 值 | 225.895 | 31.579 | 1069.397 |
| *P* 值 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

* *P* 值<0.05 与对照组比较　# *P* 值<0.05 与DN组比较　△ *P* 值<0.05 与LIR低剂量组比较(SNK-*q* 检验)

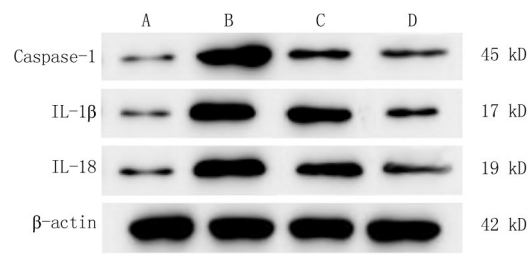



**图2　各组大鼠肾脏组织细胞焦亡相关蛋白Caspase-1、IL-1β、IL-18表达情况**

A.对照组;B.DN组;C.LIR组;D.LIR高剂量组

**Figure 2　Expression of pyroptosis-related proteins Caspase-1, IL-1β and IL-18 in renal tissue cells of rats in each group**

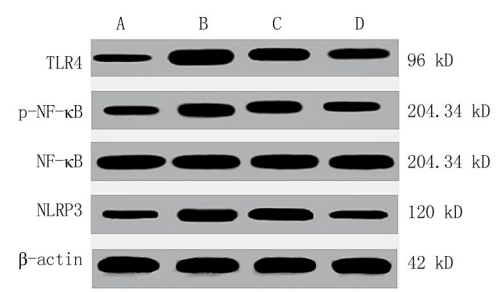



**图3　各组大鼠肾脏组织TLR4、NF-κB及NLRP3蛋白表达情况**

A.对照组;B.DN组;C.LIR低剂量组;D.LIR高剂量组

**Figure 3　Protein expression of TLR4, NF-κB and NLRP3 in renal tissues of rats in each group**

## 3 讨　论

近年来，随着生活环境及饮食习惯的改变，糖尿病的发病率呈逐年上升趋势，DN是糖尿病最常见的并发症之一。DN早期，尿蛋白含量升高，肾小球基底膜改变，影响肾足细胞的结构与功能改变，甚至造成细胞肿胀破裂，细胞内的内容物大量释放，引起细胞焦亡，造成肾组织损伤[12]。LIR是临床常用的降血糖药物，近年来LIR对DN的改善作用已被证实，但其作用机制尚不清楚[13]。NF-κB通路是介导细胞焦亡的重要通路，刘长青等[14]研究显示，黄芪甲苷联合氯沙坦能改善DN大鼠肾组织损伤，对DN起到治疗作用，保护肾脏，其作用与调控PI3K/Akt/NF-κB通路有关。因此推测LIR对DN的作用可能与NF-κB通路有关，为探究LIR对DN的作用机制，本研究建立DN大鼠模型，探究LIR对2型DN大鼠细胞焦亡、炎症细胞浸润及对NF-κB通路的影响。

本研究结果显示，与对照组比较，DN组FBG、UTP及BUN水平升高，TNF-α、IL-1β及IL-6水平升高，炎症细胞计数增多，表明DN导致机体产生大量炎症因子，肾功能受损，炎症细胞浸润明显，彭园等[15]研究表明，高糖刺激大鼠产生ROS，释放大量炎症因子，TNF-α、IL-6水平升高，加重DN的发生，本研究结果与其相符。不同剂量的LIR干预后，FBG、UTP及BUN水平降低，TNF-α、IL-1β及IL-6水平降低，表明LIR能够改善大鼠肾功能，降低炎症因子水平，炎症细胞计数减少。分析原因为，GLP-1受体激动剂能够直接作用于肾系膜细胞，减轻RGMC扩张，抑制TNF-α、IL-6等炎症因子的发生，减轻炎症反应的发生，炎症细胞浸润改善，延缓DN进一步发展，从而对肾脏起到一定的保护作用[16-17]。细胞焦亡是细胞程序性死亡，且伴随着炎症反应，因此，细胞焦亡会同时出现细胞核固缩，DNA断裂等坏死与凋亡的特点[18]。Caspase-1是经典的细胞焦亡激活机制之一，Caspase-1活化后在对GSDMD进行剪切诱导细胞膜穿孔的同时，促进剪切底物IL-1β及IL-18成熟，并分泌至细胞外。本研究采用TUNEL染色法，观察肾足细胞DNA损伤情况及TUNEL阳性细胞率，并检测焦亡相关蛋白Caspase-1、IL-1β、IL-18表达情况从而体现细胞焦亡情况，结果显示，DN组阳性细胞数增多，TUNEL阳性细胞率及Caspase-1、IL-1β、IL-18蛋白表达量升高，表明大鼠肾小球细胞DNA损伤及焦亡明显，而LIR低、高剂量组阳性细胞数减少，TUNEL阳性细胞率及Caspase-1、IL-1β、IL-18蛋白表达量降低，提示LIR能够减少肾小球细胞DNA损伤，从而抑制细胞焦亡。

NF-κB是炎症反应相关的重要标志物，NF-κB通路在机体炎症通路中具有重要作用，细胞焦亡一般由NF-κB通路介导。本研究对NF-κB通路相关蛋白进行检查，其中DN组TLR4、p-NF-κB/NF-κB及NLRP3蛋白表达上调，提示DN能够激活NF-κB通路。TLR4是NF-κB上游蛋白，在TLR4的刺激下，NF-κB被激活，介导NF-κB下游TNF-α、IL-1β及IL-6炎症因子的大量释放，另一方面，NLRP3是刺激细胞焦亡的重要炎性物质，当NLRP3活化后，促使炎症因子的分泌，进一步形成炎症联机反应，促进细胞焦亡[19-20]。给予DN大鼠不同剂量的LIR后，TLR4、p-NF-κB/NF-κB及NLRP3蛋白表达下调，表明LIR能够抑制NF-κB通路的激活，从而抑制细胞焦亡，减少炎症因子的释放，对DN大鼠的肾脏起到一定的保护作用。

综上所述，LIR能够改善2型DN大鼠炎症细胞浸润，抑制细胞焦亡，其作用机制可能抑制NF-κB通路有关。为进一步探究LIR对DN大鼠的作用，未来可通过增加GLP-1受体抑制剂进一步证实LIR对肾脏的保护作用，为LIR用于DN的治疗提供数据支持。

**[参考文献]**


[1] Bonner R, Albajrami O, Hudspeth J, et al. Diabetic kidney disease[J]. Prim Care, 2020, 47(4): 645-659.

[2] Zhang L, Han L, Wang X, et al. Exploring the mechanisms underlying the therapeutic effect of Salvia miltiorrhiza in diabetic nephropathy using network pharmacology and molecular docking [J]. Biosci Rep, 2021, 41 (6): BSR20203520.

[3] 赵为陈，沈炳香，何春远，等.GSDMD依赖性细胞焦亡在糖尿病肾病肾脏损伤中的作用机制[J].中国药理学通报，2020，36(7)：964-970.

[4] 沈金峰，朱慧萍，胡芳，等.大蒜素对糖尿病肾病大鼠肾组织细胞焦亡的影响[J].广州中医药大学学报，2022，39(7)：1643-1650.

[5] 丁宝珠，丁英钧，马国平，等.肾消解毒通络方调控NLRP3-Caspase-1-GSDMD通路抑制糖尿病肾病金黄地鼠肾脏细胞焦亡的机制[J].中华中医药杂志，2022，37(7)：4086-4090.

[6] 周灿，李青.GLP-1受体激动剂周制剂度拉糖肽对早期糖尿病肾病的影响[J].湖南师范大学学报(医学版)，2021，18(6)：85-87.

[7] 祁冰雪，王杨威，张艺献，等.利拉鲁肽对糖尿病肾病大鼠肾脏功能和足细胞损伤的改善作用及其机制[J].吉林大学学报(医学版)，2022，48(2)：331-339.

[8] 闫永恒,李渐鹏,刘战伟,等.不同 2 型糖尿病肾病模型建立方法及成模特点比较[J].中国食物与营养,2016,22(1):65－69.

[9] 熊远珍.实验动物与人用药量的新换算[J].江西医学院学报,1997,39(4):41.

[10] 梁丹,赵思琪,李志阳,等.miR-22 通过靶向抑制 DDIT4 促进糖尿病肾病肾小管上皮细胞 DNA 损伤[J].中国病理生理杂志,2021,37(11):1933－1941.

[11] 池杨峰,刘爽,黄洁波,等.黄芪汤通过 TLR4/NF-κB 信号通路改善糖尿病肾病大鼠炎症反应的研究[J].临床肾脏病杂志,2022,22(1):39－45.

[12] 路琪,李菲菲,孙虹燕.薯蓣皂苷对糖尿病肾病大鼠 TLR4/NF-κB/TNF-α 通路及肾间质淋巴细胞浸润的影响[J].中国免疫学杂志,2022,38(7):816－821.

[13] Mali N, Su F, Ge J, et al. Efficacy of liraglutide in patients with diabetic nephropathy: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. BMC Endocr Disord, 2022, 22(1): 93.

[14] 刘长青,黄书佳,蒋典.黄芪甲苷联合氯沙坦对糖尿病大鼠肾组织 PI3K/Akt/NF-κB 通路的影响[J].中南药学,2019,17(10):1626－1630.

[15] 彭园,盛笑,叶新华,等.高糖调节 PINK1/Parkin 途径刺激大鼠肾小球系膜细胞氧化应激和炎症反应的研究[J].实用临床医药杂志,2021,25(20):6－12.

[16] 杨熹,俞立波,李莉.利拉鲁肽联合替格瑞洛对 2 型糖尿病合并冠心病血清 Vaspin 及 Ghrelin 的影响[J].河北医科大学学报,2021,42(2):140－144.

[17] Yamada S, Tanabe J, Ogura Y, et al. Renoprotective effect of GLP-1 receptor agonist, liraglutide, in early-phase diabetic kidney disease in spontaneously diabetic Torii fatty rats[J]. Clin Exp Nephrol, 2021, 25(4): 365－375.

[18] An X, Zhang Y, Cao Y, et al. Punicalagin protects diabetic nephropathy by inhibiting pyroptosis based on TXNIP/NLRP3 pathway[J]. Nutrients, 2020, 12(5): 1516.

[19] 马玉,杨雯雯,范哲,等.褪黑素对高糖刺激系膜细胞 NF-κB 与 TGF-β/Smad3 通路的影响[J].安徽医科大学学报,2019,54(6):840－845.

[20] 陈金晖,陈青青,梅统,等.利拉鲁肽基于 NF-κB/NLRP3 通路介导的焦亡途径对小鼠动脉粥样硬化的干预作用研究[J].浙江医学,2021,43(17):1835－1840,前插 2.

(本文编辑:刘斯静)