卡格列净对糖尿病肾病小鼠结缔组织生长因子及单核细胞趋化蛋白-1 的影响分析

云　川，李大伟，韩倩菲，那　涵
（海南医学院第一附属医院内分泌科，海口 570102）

摘要：目的 探讨卡格列净对糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）小鼠的结缔组织生长因子（connective tissue growth factor，CTGF）及单核细胞趋化蛋白 -1（monocyte chemotactic protein-1，MCP-1）的影响及其作用机制。**方法** 将 30 只 C57B/6 小鼠随机分为对照组（normal control，NC，n = 10）和造模组（n = 20），使用链脲佐菌素注射液（腹腔注射）构建 DN 小鼠模型，建模成功后随机分为 DN 组和 DN ＋卡格列净（DN and canagliflozin，DN ＋ C）组，每组 10 只。DN ＋ C 组给予卡格列净灌胃，DN 组和 NC 组给予生理盐水灌胃，连续 8 周。8 周后检测空腹血糖（fasting blood glucose，FBG）、24 h 尿蛋白（urine protein，UP）、尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）和血肌酐（serum creatinine，Scr）水平，并观察肾脏组织形态学变化。分别采用定量反转录聚合酶链反应和蛋白免疫印迹检测 CTGF 和 MCP-1 的信使 RNA（messenger RNA，mRNA）和蛋白的相对表达量。**结果** 造模组 FBG、24 h UP、BUN、Scr 水平显著升高（P ＜ 0.05）；与 DN 组比较，DN ＋ C 组 FBG、24h UP、BUN 水平降低（P ＜ 0.05）。DN 组肾小球肾小管基底膜增厚，肾小球细胞外基质炎症细胞浸润，DN ＋ C 组病理改变减轻。与 NC 组比较，DN 组 CTGF、MCP-1 的 mRNA 和蛋白表达升高（P ＜ 0.05）；与 DN 组比较，DN ＋ C 组 CTGF、MCP-1 的 mRNA 和蛋白表达下降（P ＜ 0.05）。**结论** 卡格列净可改善 DN 小鼠的高糖状态，保护肾功能，延缓 DN 进展，其作用机制可能与降低 CTGF，MCP-1 表达有关。

关键词：卡格列净；糖尿病肾病；结缔组织生长因子；单核细胞趋化蛋白-1
中图分类号：R587.2　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9188（2022）07-0857-06
DOI：10.13683/j.wph.2022.07.008

Analysis of the effect of canagliflozin on connective tissue growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in the kidney of diabetic nephropathy mice

YUN Chuan, LI Dawei, HAN Qianfei, NA Han
(*Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, Hainan Province, China*)

Abstract: ***Objective*** To investigate the effect of canagliflozin on connective tissue growth factor（CTGF）and monocyte chemotactic protein-1（MCP-1）in diabetic nephropathy（DN）mice and its molecular mechanism. ***Methods*** Thirty C57BL/6 mice were randomly divided into normal control（NC, n=10） group and model group（n=20）, streptozotocin（STZ）was used to construct DN model, after successful modeling, the mice were randomly divided into DN group and DN＋canagliflozin（DN＋C）group. The DN＋C group was treated with canagliflozin by gavage, the DN and NC groups were given matching normal saline for 8 weeks. After 8 weeks, fasting blood glucose（FBG）, 24 h urine protein（UP）, blood urea nitrogen（BUN）and serum creatinine（Scr）were detected, and the morphological changes of kidney tissue were observed. The mRNA and protein expressions of CTGF and MCP-1 were determined by quantitative reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction（qRT-PCR）and western blot, respectively. ***Results*** The levels of FBG, 24 h UP, BUN and Scr in model group were significantly increased（P<0.05）. Compared with NC group, the levels of FBG, 24 h UP, BUN in DN＋C

收稿日期：2021-04-25；**修回日期：**2022-05-16
作者简介：云川，副主任医师，研究方向：糖尿病肾病。
基金项目：海南省卫生健康行业科研项目（20A200012）

group were significantly decreased($P<0.05$). The glomerular and tubular basement membranes in DN group were thickened, and the extracellular matrix of the glomerulus was infiltrated by inflammatory cells. The pathological changes in DN+C group were less than those in DN group. Compared with NC group, the mRNA and protein expression of CTGF and MCP-1 in DN group were significantly increased($P<0.05$); compared with DN group, the mRNA and protein expression of CTGF and MCP-1 in DN+C group were significantly decreased($P<0.05$). ***Conclusion*** Canagliflozin can improve the high glucose state of DN mice, protect renal function, and delay the progression of DN. The mechanism may be related to the reduction of CTGF and MCP-1 expression.

Key words: canagliflozin; diabetic nephropathy; CTGF; MCP-1

糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）是糖尿病，尤其是2型糖尿病严重的微血管并发症，亦是造成终末期肾病的主要原因[1-2]。钠-葡萄糖协同转运蛋白2(sodium-glucose co-transporters，SGLT-2)抑制剂是近年来研发上市的新型降糖药物，研究显示，SGLT-2抑制剂能够抑制肾小管对葡萄糖的重吸收，增加尿糖排泄，降低血糖，改善患者的肾脏预后，降低肾脏疾病的进展风险[3-4]。以卡格列净为代表的SGLT-2抑制剂能够降低2型糖尿病患者的肾小球滤过率，延缓肾功能下降，因该药对肾脏的保护作用独立于降糖作用外，故其在DN中的作用备受关注[5]。另有研究显示，DN的进展与肾小球细胞外基质（extracellular matrix，ECM）的积聚和肾小管间质纤维化密切相关[6]，且DN的发生与糖代谢异常、血流动力学障碍、炎症因子及遗传因素等密切相关，提示介导肾纤维化的炎症因子参与了DN的发生发展[7]。结缔组织生长因子（connective tissue growth factor，CTGF）和单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1，MCP-1）是DN发生的重要细胞因子，研究证实，CTGF与血管、肾脏及肝脏等组织纤维化密切相关，MCP-1作为强效炎症趋化因子，可反映肾脏纤维化的严重程度，是判断DN发生的重要指标[8-9]。因此，本研究从细胞因子角度探究分析SGLT-2抑制剂（卡格列净）对DN小鼠肾脏组织中CTGF和MCP-1表达的影响及对肾功能的保护作用，以期为临床应用提供相关理论依据。

1 材料及方法

1.1 实验动物

采用C57BL/6雄性小鼠，体质量约（20±5）g，由海南新正源生物科技有限公司提供，实验动物生产许可证号为SCXK（琼）2021-0002，实验动物使用许可证号为SYXK（琼）2021-0002。饲养环境温度控制在（25±2）℃，湿度控制在（55±5）%，12 h昼夜交替，分笼饲养，自由饮水和进食。该研究经本院医学伦理委员会批准（HYLL-2021-138）。

1.2 主要试剂及仪器

卡格列净片（100 mg，IGZ0600，美国Janssen公司）和链脲佐菌素注射液[(streptozotocin，STZ)，100 mg，0089MH04，安徽酷尔生物工程有限公司]。空腹血糖（fasting blood glucose，FBG）、尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）、血肌酐（serum creatinine，Scr）酶联免疫吸附试剂盒，均购自北京全式金生物技术有限公司，双缩脲试剂购自上海酶联生物科技有限公司，苏木精-伊红（hematoxylin and eosin，HE）染色试剂盒购自上海联迈生物工程有限公司，CTGF(AF6582)、MCP-1兔抗鼠一抗(AF7437)、HRP标记的羊抗兔IgG抗体（PI480）均购自Sigma-Aldrich公司。KH19A型离心机购自湖南凯达科学仪器有限公司，IX75光学显微镜购自日本奥林巴斯公司，MK-3酶标仪购自美国赛默飞世尔科技有限公司，荧光定量定量反转录聚合酶链反应（quantitative reverse transcriptase-mediated polymerase

chain reaction，qRT-PCR）仪购自日本 TaKaRa 公司。

1.3 动物模型建立及分组

选取 30 只 6 周龄的 C57BL/6 小鼠，按照 1 ∶ 2 的比例随机分为对照（normal control，NC）组（n = 10）和造模组（n = 20）。NC 组给予常规饲养，造模组给予高脂高糖喂食，期间均自由活动及饮水。饲养 6 周后，造模组小鼠给予隔夜空腹腹腔注射 STZ（50 mg/kg），NC 组小鼠腹腔注射等量生理盐水。连续 2 周后，检测小鼠 FBG 和 24 h 尿蛋白（urine protein，UP）含量，如 FBG 值≥ 16.7 mmol/L，24 h UP 含量显著升高，并随时间延长呈持续升高趋势，则视为 DN 小鼠模型建立成功。将 20 只模型小鼠随机分为 DN 组和 DN ＋卡格列净（DN and canagliflozin，DN ＋ C）组，每组 10 只，DN ＋ C 组每天给予 10 mg/kg 剂量的卡格列净灌胃，DN 组和 NC 组则给予等量的生理盐水灌胃，连续 8 周。

1.4 标本采集

于末次给药 24 h 后，对所有小鼠称重，代谢笼收集 24 h 尿液备检；眼球取血，1.5 ml 血清管采集，4 ℃离心（12 000×g）10 min，吸取上清，置于 −20 ℃中保存备用；分别摘取小鼠左右两个肾脏，用磷酸盐缓冲液清洗后将一侧肾脏放入 10% 的甲醛中浸泡，另一侧放入 −80 ℃中冻存备用。

1.5 指标测定

1.5.1 FBG 及肾功能指标检测

取上述离心后的血清样品，分别测定 FBG 及血清 BUN 和 Scr，具体操作按酶联免疫吸附试剂盒说明书进行。将收集的尿液经高速离心（20 000×g）10 min 后，取上清液，加入双缩脲试剂，室温静置 30 min，测定 540 nm 处的光密度值，同等条件下测定标准蛋白溶液，绘制标准曲线，根据标准曲线计算 24 h UP 值。

1.5.2 肾脏组织 HE 染色

取上述甲醛中浸泡 24 h 的肾脏组织，梯度酒精（75% ～ 100%）进行组织脱水后用二甲苯透明两次，透明结束后，于 60 ～ 65 ℃的蜡液中浸蜡 2.5 ～ 3 h，取出后将组织放入包埋盒包埋，自然冷却。使用切片机将蜡块切成厚度为 5 μm 的薄片，根据 HE 染色试剂盒说明书进行染色、脱水、透明封片等操作，静置 12 h 后于光学显微镜下观察其组织病理变化。

1.5.3 MAP-1 及 CTGF 信使 RNA（messenger RNA，mRNA）表达检测

采用 qRT-PCR 法检测 MCP-1 及 CTGF mRNA 表达，称取上述 −80 ℃冻存的肾脏组织，剪刀剪碎后加入 1 ml TRIzol 裂解液，于组织研磨器中充分研磨至匀浆状态，4 ℃离心（10 000×g）提取总 RNA。吸取 2 μl RNA 样品检测其纯度，A260/A280 为 1.6 ～ 1.8。使用反转录试剂盒合成第一链互补 DNA，使用互补 DNA 为模板，应用 SYBR Green Mix 进行 qRT-PCR 分析。反应体系 20 μl，95 ℃ 10 min、95 ℃ 2 s、60 ℃ 20 s、70 ℃ 10 s，循环 40 次。每组实验重复 3 次，以 *β-actin* 为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 mRNA 相对表达量，取 3 次结果的平均值，ΔCt ＝平均 $Ct_{目的基因}$ − 平均 $Ct_{内参基因}$，$\Delta\Delta Ct$ ＝ $\Delta Ct_{实验样本} - \Delta Ct_{对照样本}$，qRT-PCR 正向（Forward，F）及反向（Reverse，R）引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因	引物序列（5'-3'）
MCP-1	F: TAGGATCCATGCAGGTCTCTGTCACG
	R: CGGCTCGAGCTAGTACTCTGTCATAC
CTGF	F: GTCCGCGTGCTCGCTTCGGCAGC
	R: GTGCGTGTCGTGGAGTCCCTGAT
β-actin	F: GTCGTACCACAGGCATTGTGATGG
	R: GCAATGCCTGGGTACATGGTGGCC

1.5.4 MCP-1 及 CTGF 蛋白表达检测

使用蛋白免疫印迹检测 MCP-1 及 CTGF 蛋白表达。取 100 mg 肾脏组织，加入含蛋白抑制剂的 RIPA 裂解液冰上研磨，研至蛋白匀浆，4 ℃ 离心（12 000×g），上清液即为总蛋白溶液，采用 BCA 试剂盒检测各蛋白的浓度。随后进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白，孵育 MCP-1 及

CTGF 一抗（1 ∶ 1000 稀释）和二抗（1 ∶ 500 稀释），凝胶成像仪曝光，每组实验重复 3 次，采用 Image-J 软件分析蛋白的相对表达量，取 3 次数据的平均值。

1.6 统计学分析

应用 SPSS22.0 软件进行统计学分析。本研究中计量资料均符合正态分布，以（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用方差分析，两两比较采用 LSD-*t* 检验，整体比较以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义，两两比较进行检验水准调整，以 $P<0.017$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠常规指标比较

与 NC 组比较，DN 组和 DN ＋ C 组的 FBG、24 h UP、BUN 及 Scr 水平显著升高（$P<0.05$）；与 DN 组比较，DN ＋ C 组的 FBG、24h UP 及 BUN 水平显著降低（$P<0.05$），Scr 水平有所下降，但差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 2。

表 2 各组小鼠常规指标比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Table 2 Comparison of routine indicators of mice in each group（$\bar{x}\pm s$, $n=10$）

组别	FBG/mmol·L^{-1}	UP/mg·24 h^{-1}	BUN/mmol·L^{-1}	Scr/μmol·L^{-1}
NC组	5.21±0.43	12.12±1.02	7.06±0.14	60.26±1.43
DN组	18.11±0.87*	112.23±2.87*	12.20±0.58*	79.42±1.63*
DN+C组	14.98±1.28*#	78.45±1.24*#	10.20±0.42*#	76.02±1.36*

注：与 NC 组比较，*$P<0.05$；与 DN 组比较，#$P<0.05$

Note: *vs* the NC group, *$P<0.05$; *vs* the DN group, #$P<0.05$

2.2 肾脏组织病理观察

HE 染色结果显示，NC 组的肾小球、肾小管及肾间质的结构清楚，无明显病理改变。DN 组可见肾小球系膜基质增多，系膜区增宽，肾小球 ECM 炎症细胞浸润，肾小管间质细胞纤维化。与 DN 组相比，DN ＋ C 组肾小球结构仍有破坏，但系膜区宽度变窄，ECM 炎症细胞浸润有所减轻，见图 1。

2.3 肾脏组织中 CTGF 和 MCP-1 的 mRNA 表达

NC 组 CTGF 和 MCP-1 的 mRNA 表达量为（0.62±0.11）和（0.38±0.08），DN 组 CTGF 和 MCP-1 的 mRNA 表达量为（1.05±0.25）和（0.72±0.18），较 NC 组显著增加（$P<0.05$）；DN ＋ C 组 CTGF 和 MCP-1 的 mRNA 表达量为（0.81±0.18）和（0.52±0.13），较 DN 组显著降低（$P<0.05$），见图 2。

2.4 肾脏组织中 CTGF 和 MCP-1 的蛋白表达

NC 组 CTGF 和 MCP-1 蛋白表达量为（1.02±0.08）和（1.00±0.10），DN 组 CTGF 和 MCP-1 蛋白表达量为（1.42±0.23）和（1.35±0.19），较 NC 组显著增加，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；DN ＋

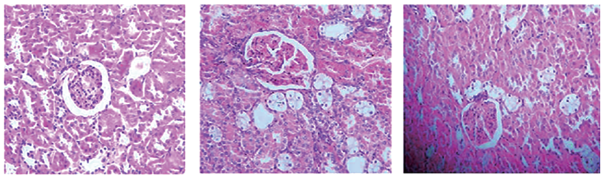
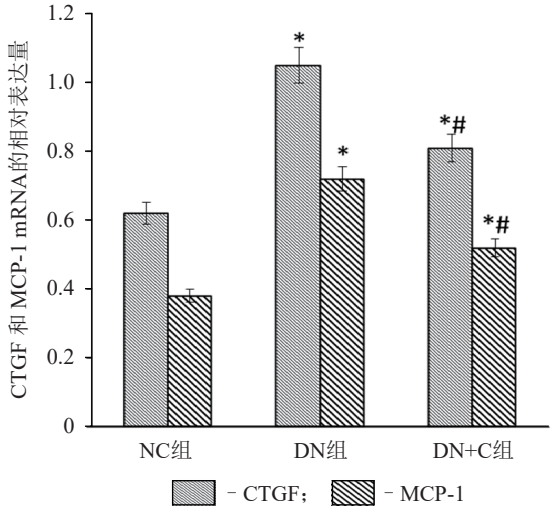


图 1 小鼠肾脏组织病理学观察（HE×200）

Figure 1 Pathological observation of mouse kidney tissue（HE×200）

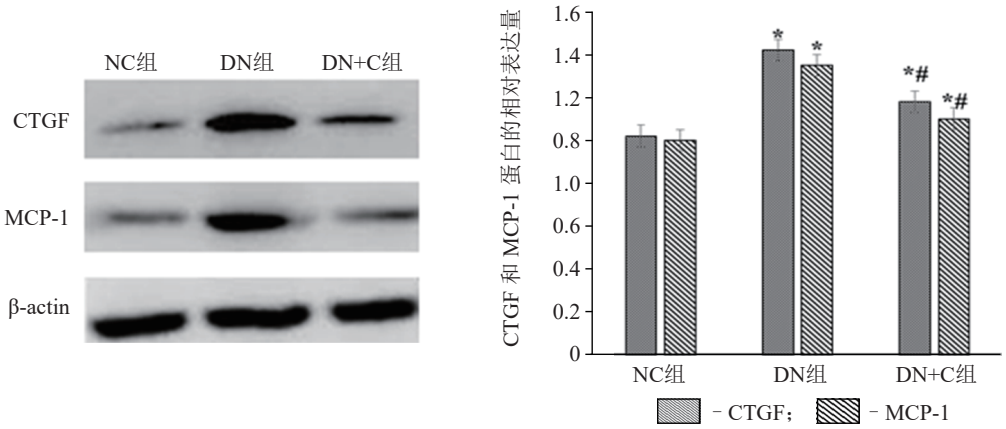


注：与 NC 组比较，*$P<0.05$；与 DN 组比较，#$P<0.05$

Note: *vs* the NC group, *$P<0.05$; *vs* the DN group, #$P<0.05$

图 2 各组小鼠肾脏组织中 CTGF 和 MCP-1 mRNA 的相对表达量

Figure 2 Relative expression of CTGF and MCP-1 mRNA in renal tissue of mice in each group



注：与 NC 组比较，*$P < 0.05$；与 DN 组比较，#$P < 0.05$

Note: *vs* the NC group, *$P < 0.05$; *vs* the DN group, #$P < 0.05$

图 3 各组小鼠肾脏组织 CTGF 和 MCP-1 蛋白的相对表达量

Figure 3 Expression of CTGF and MCP-1 protein in renal tissue of mice in each group

C 组 CTGF 和 MCP-1 蛋白表达量为（1.18±0.15）和（1.10±0.13），较 DN 组显著降低，差异具有统计学意义（$P < 0.05$），见图 3。

3 讨论

近年来我国 DN 的患病率逐年升高，干预并延缓 DN 进展刻不容缓。研究证实，DN 患者持续高血糖可导致肾脏内皮细胞损伤、滤过能力降低致使血液中 BUN 代偿性升高，尿液中 24 h UP 含量持续增加[10]。本研究通过高糖高脂饲养和腹腔注射 STZ 建立 DN 模型，指标测定显示小鼠 FBG、BUN 及 Scr 显著增加，24 h UP 持续升高，提示小鼠肾功能下降，DN 模型构建成功。连续给予卡格列净灌胃后，FBG、24 h UP、BUN 及 Scr 水平显著降低，提示卡格列净可改善 DN 小鼠的高糖状态，且对肾脏具有保护作用。

有文献[11]报道，DN 的发生主要由于 ECM 在肾脏组织积聚，转化生长因子（transforming growth factor，TGF）-β 在此过程中起着关键作用。因 CTGF 为 TGF-β 通路的下游介质，TGF-β 可通过多种信号途径诱导 CTGF 表达，起到了促纤维化的作用[12]。Mao 等[13]研究显示，心、肺及肾脏等器官的纤维化疾病中 TGF-β 多与 CTGF 协同表达。在 TGF-β 诱导下，CTGF 可由成纤维细胞分泌，介导细胞增殖并促进了 ECM 合成，而在缺少 CTGF 时，TGF-β 不能单独促进组织纤维化进程。Ramzy 等[14]发现 CTGF 在正常组织中极少表达，而在纤维化组织中高度表达，提示 CTGF 水平与纤维化病变直接相关。因此，通过阻断 CTGF 来减轻 TGF-β 诱导的纤维化效应，可能作为防治 DN 的新的作用靶点。本研究证实，卡格列净延缓 DN 进展可能通过抑制 DN 患者肾脏组织中的 CTGF 表达，以减少肾小球 ECM 堆积来实现。

MCP-1 是重要的促炎细胞因子，在机体发生炎症时由单核细胞、巨噬细胞和成纤维细胞等分泌产生，属于趋化因子 CC 亚家族，主要通过趋化因子受体 2 激活不同的信号转导通路，如促分裂原活化的蛋白激酶途径、核因子 κB（nuclear factor κB，NF-κB）途径，从而导致不同的生物学效应[15]。c-Jun *N* 端激酶（c-Jun *N*-terminal kinase，JNK）是促分裂原活化的蛋白激酶家族成员，在 DN 模型中显著高表达，其信号通路促进了 DN 的进展。JNK 抑制剂可下调 MCP-1 的表达，提示 MCP-1 可能为 JNK 通路的下游因子，参与 DN 的发生发展[16]。研究显示，高糖状态下 NF-κB 被激活，包括 MCP-1 在内的下游炎症因子表达增高，促进了 DN 的发生发展，通过抑制

NF-κB 等核因子的转位减少 MCP-1 的释放，可起到延缓 DN 进展的作用[17]。本研究中，DN 小鼠肾脏组织中 MCP-1 表达较 NC 组显著升高，而 DN ＋ C 组小鼠 MCP-1 表达显著下降，提示卡格列净可有效降低炎症水平，对改善 DN 肾脏结局具有一定的积极意义。

4 结论

卡格列净可改善 DN 小鼠的高糖状态，保护肾脏功能，延缓 DN 进展，可能与其降低 CTGF、MCP-1 表达水平，改善小鼠肾脏纤维化及降低炎症水平相关。但本研究尚存在一定的局限性，目前针对卡格列净与 CTGF 及 MCP-1 的相关研究报道较少，后期可通过体外实验进一步证实卡格列净对肾癌细胞中 CTGF 及 MCP-1 表达的影响，深入探讨其具体作用机制，为卡格列净的临床应用提供一定理论依据。

参考文献：

[1] 中华医学会糖尿病学分会微血管并发症学组. 中国糖尿病肾脏疾病防治临床指南[J]. 中华糖尿病杂志, 2019, 11(1): 15-28.

[2] Koye DN, Magliano DJ, Nelson RG, *et al*. The global epidemiology of diabetes and kidney disease[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2018, 25(2): 121-132.

[3] Tat V, Forest CP. The role of SGLT2 inhibitors in managing type 2 diabetes[J]. JAAPA, 2018, 31(6): 35-40.

[4] 冯聪, 李玲. SGLT-2抑制剂治疗2型糖尿病的研究进展[J]. 实用药物与临床, 2019, 22(7): 673-676.

[5] Perkovic V, Jardine MJ, Neal B, *et al*. Canagliflozin and renal outcomes in type 2 diabetes and nephropathy[J]. N Engl J Med, 2019, 380(24): 2295-2306.

[6] 孙迎春, 解汝娟. 糖尿病肾病发病机制的研究进展[J]. 医学综述, 2017, 23(16): 3286-3290.

[7] 刘莉莉, 陈飞, 谢希. 糖尿病肾病诊断及治疗研究进展[J]. 医学综述, 2020, 26(6): 1188-1192.

[8] Li X, Pan J, Li H, *et al*. DsbA-L mediated renal tubulointerstitial fibrosis in UUO mice[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4467.

[9] Raina P, Sikka R, Gupta H, *et al*. Association of eNOS and MCP-1 genetic variants with type 2 diabetes and diabetic nephropathy susceptibility: a case-control and meta-analysis study[J]. Biochem Genet, 2021, 59(4): 966-996.

[10] Wang J, Ye S. Up-regulation of hypoxia inducible factor-1α in patients with diabetic nephropathy[J]. Niger J Clin Pract, 2019, 22(6): 750-753.

[11] Miao XJ, Bi TT, Tang JM, *et al*. Regulatory mechanism of TGF-β1/SGK1 pathway in tubulointerstitial fibrosis of diabetic nephropathy[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(23): 10482-10488.

[12] Shen YW, Zhou YD, Chen HZ, *et al*. Targeting CTGF in cancer: an emerging therapeutic opportunity[J]. Trends Cancer, 2021, 7(6): 511-524.

[13] Mao L, Liu L, Zhang T, *et al*. MKL1 mediates TGF-β-induced CTGF transcription to promote renal fibrosis[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(5): 4790-4803.

[14] Ramzy MM, Abdalla AM, Zenhom NM, *et al*. Therapeutic effect of liraglutide on expression of CTGF and BMP-7 in induced diabetic nephropathy[J]. J Cell Biochem, 2019,120(10): 17512-17519.

[15] Mao S, Wu L. Association between *MCP-1* 2518 A>G gene polymorphism and chronic kidney disease[J]. Int Urol Nephrol, 2018, 50(12): 2245-2253.

[16] Sheng J, Li H, Dai Q, *et al*. DUSP1 recuses diabetic nephropathy via repressing JNK-Mff-mitochondrial fission pathways[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3): 3043-3057.

[17] Su J, Ren J, Chen H, *et al*. MicroRNA-140-5p ameliorates the high glucose-induced apoptosis and inflammation through suppressing TLR4/NF-κB signaling pathway in human renal tubular epithelial cells[J]. Biosci Rep, 2020, 40(3): BSR20192384.

（编辑：史琦琪）