

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research苯扎贝特对糖尿病肾病小鼠肾组织的
保护作用Research on the protective effects of bezafibrate on the kidney tissue of mice with
diabetic nephropathy罗根艳, 董林菲, 杨栋梁,
刘 媛, 杨子琦, 钟 燕,
龚志坚(赣州市人民医院 全科医学科, 江西 赣州
341000)LUO Gen-yan, DONG Lin-fei,
YANG Dong-liang, LIU Yuan,
YANG Zi-qi, ZHONG Yan,
GONG Zhi-jian(Department of General Practice,
Ganzhou People's Hospital, Ganzhou
341000, Jiangxi Province, China)基金项目:江西省卫生健康委科技计划基金资
助项目(202311860)作者简介:罗根艳(1981-),女,副主任医师,主
要从事全科医学、内科方面的临床诊
疗工作

通信作者:罗根艳

MP:15970962357

E-mail:285197917@qq.com

摘要:目的 探究苯扎贝特(BEZ)通过微小核糖核酸(miR)-486-5p靶向活化T细胞的核因子5(NFAT5)对糖尿病肾病小鼠肾组织的作用机制。方法 db/m小鼠作为对照组;db/db小鼠构建糖尿病肾病模型,将其按随机数字表法分为模型组、实验组(75 mg·kg⁻¹·d⁻¹ BEZ), miR-486-5p antagomir组(75 mg·kg⁻¹·d⁻¹ BEZ + 10 mg kg⁻¹ miR-486-5p antagomir), sh-NFAT5组(75 mg·kg⁻¹·d⁻¹ BEZ + 10 mg kg⁻¹ miR-486-5p antagomir + NFAT5 敲低质粒的重组腺病毒。用试剂盒检测小鼠肾功能与氧化应激相关指标水平,用蛋白质印迹法检测各组小鼠肾组织糖代谢和肾纤维化相关蛋白的表达水平。**结果** 对照组、模型组、实验组、miR-486-5p antagomir组、sh-NFAT5组的丙二醛水平分别为(2.78±0.56)、(4.96±0.97)、(3.02±0.54)、(4.51±0.79)和(3.24±0.58) nmol·mg⁻¹, 醛糖还原酶蛋白相对表达水平分别为1.00±0.12、3.61±0.43、1.82±0.29、3.09±0.58和2.25±0.47, 丙酮酸脱氢酶蛋白相对表达水平分别为1.00±0.11、0.53±0.10、0.91±0.15、0.64±0.12和0.82±0.14, 丙酮酸脱氢酶E1亚基α1蛋白相对表达水平分别为1.00±0.14、0.36±0.07、0.83±0.16、0.51±0.11和0.74±0.13, 丙酮酸脱氢酶激酶蛋白相对表达水平分别为1.00±0.10、2.59±0.52、1.34±0.31、2.11±0.43和1.56±0.39, 转化生长因子-β1蛋白相对表达水平分别为1.00±0.11、3.15±0.52、1.43±0.38、2.72±0.43和1.89±0.57, 纤连蛋白相对表达水平分别为1.00±0.09、2.84±0.57、1.46±0.41、2.59±0.52和1.73±0.49, I型胶原蛋白相对表达水平分别为1.00±0.13、4.28±0.71、2.03±0.46、3.64±0.68和2.51±0.53。对照组的上述指标与模型组比较,模型组的上述指标与实验组比较,实验组的上述指标与miR-486-5p antagomir组比较,miR-486-5p antagomir组的上述指标与sh-NFAT5组比较,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。**结论** BEZ可有效保护糖尿病肾病小鼠肾组织,其机制可能是通过miR-486-5p/NFAT5信号通路实现的。

关键词:苯扎贝特;微小核糖核酸-486-5p;糖尿病肾病;活化T细胞的核因子5;氧化应激;肾纤维化

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.06.015

中图分类号:R972 文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2025)06-0828-06

Abstract: Objective To investigate the mechanism of action of bezafibrate (BEZ) targeting nuclear factor of activated T cells 5 (NFAT5) through microribonucleic acid (miR)-486-5p on the kidney tissues of mice with diabetic nephropathy. **Methods** Db/m mice were used as control group. Db/db mice were used to construct a diabetic nephropathy model, which was divided into 4 groups according to the

random number table method: Model group, experimental group ($75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ BEZ), miR-486-5p antagomir group ($75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ BEZ + $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ miR-486-5p antagomir), sh-NFAT5 group ($75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ BEZ + $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ miR-486-5p antagomir + recombinant adenovirus containing NFAT5 knockdown plasmid). The kit was used to detect the levels of renal function and oxidative stress in mice; and the expression levels of glucose metabolism and renal fibrosis-related proteins in renal tissues of mice in each group were detected by Western blot.

Results The levels of malondialdehyde (MDA) in the control group, model group, experimental group, miR-486-5p antagomir group, and sh-NFAT5 group were (2.78 ± 0.56), (4.96 ± 0.97), (3.02 ± 0.54), (4.51 ± 0.79) and (3.24 ± 0.58) $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively; the levels of aldose reductase (AR) were 1.00 ± 0.12 , 3.61 ± 0.43 , 1.82 ± 0.29 , 3.09 ± 0.58 and 2.25 ± 0.47 , respectively; the levels of pyruvate dehydrogenase (PDH) were 1.00 ± 0.11 , 0.53 ± 0.10 , 0.91 ± 0.15 , 0.64 ± 0.12 and 0.82 ± 0.14 , respectively; the levels of pyruvate dehydrogenase E1 subunit $\alpha 1$ (PDHA1) were 1.00 ± 0.14 , 0.36 ± 0.07 , 0.83 ± 0.16 , 0.51 ± 0.11 and 0.74 ± 0.13 , respectively; the levels of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) were 1.00 ± 0.10 , 2.59 ± 0.52 , 1.34 ± 0.31 , 2.11 ± 0.43 and 1.56 ± 0.39 , respectively; the levels of transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) were 1.00 ± 0.11 , 3.15 ± 0.52 , 1.43 ± 0.38 , 2.72 ± 0.43 and 1.89 ± 0.57 , respectively; the levels of fibronectin (FN) were 1.00 ± 0.09 , 2.84 ± 0.57 , 1.46 ± 0.41 , 2.59 ± 0.52 and 1.73 ± 0.49 , respectively; the levels of collagen type I (Collagen I) were 1.00 ± 0.13 , 4.28 ± 0.71 , 2.03 ± 0.46 , 3.64 ± 0.68 and 2.51 ± 0.53 , respectively. The above indicators of the control group were compared with the model group, the above indicators of the model group were compared with the experimental group, the above indicators of the experimental group were compared with the miR-486-5p antagomir group, and the above indicators of the miR-486-5p antagomir group were compared with the sh-NFAT5 group. The differences were statistically significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** BEZ can effectively protect the kidney tissue of mice with diabetic nephropathy, and the mechanism may be realized through the miR-486-5p/NFAT5 signaling pathway.

Key words: bezafibrate; microRNA-486-5p; diabetic nephropathy; nuclear factor of activated T cells 5; oxidative stress; renal fibrosis

糖尿病肾病是糖尿病的微血管并发症之一,其发生发展与多种因素有关,包括蛋白质非酶促糖基化、血脂代谢异常、氧化应激、炎症等,最终导致肾小管间质纤维化、肾小球基底膜增厚等病理变化,形成蛋白尿^[1]。近年来,糖尿病肾病的发病率呈上升趋势。糖尿病肾病随着病情加重最终可能会发展为终末期肾病,严重影响患者的生存质量^[2],早期药物防治对延缓其进程意义重大。苯扎贝特是临床常用的调脂药物之一,可以改善糖尿病患者的脂质代谢紊乱^[3],但其在糖尿病肾病中的作用研究较少。据报道,微小核糖核酸(microRNA, miR)-486-5p与血糖异常和白蛋白尿的出现相关,可能是糖尿病肾病的生物标志物^[4]。本研究旨在探讨苯扎贝特通过miR-486-5p对糖尿病肾病的作用机制。

材料与方法

1 材料

动物 SPF级C57BL/KsJ db/db雄性小鼠,SPF级db/m雄性小鼠,鼠龄均为8周,体质量均为20~30 g,均

购自赣南创新与转化医学研究院。动物生产许可证号:SCXK(赣)2024-0003。本实验经赣州市人民医院伦理委员会批准[伦理批号:伦审科2024第(15)号]。

细胞 人胚肾细胞(293T),购自武汉尚恩生物技术有限公司。

药品与试剂 苯扎贝特,纯度:99.44%,规格:每瓶1 g,批号:S415903,美国Selleck公司生产。24 h尿蛋白(24-hour urinary protein, 24 h-pro)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒,上海科艾博生物技术有限公司生产;血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血肌酸酐(serum creatinine, SCr)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)ELISA试剂盒,均为上海雅吉生物科技有限公司生产;活化T细胞的核因子5(nuclear factor of activated T cells 5, NFAT5)、醛糖还原酶(aldose reductase, AR)、丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)、丙酮酸脱氢酶E1亚基 $\alpha 1$ (pyruvate dehydro-

genase E1 subunit alpha 1, PDHA1)、丙酮酸脱氢酶激酶(pyruvate dehydrogenase kinase, PDK)、转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor beta 1, TGF- $\beta 1$)、纤连蛋白(fibronectin, FN)、I型胶原蛋白(Collagen I)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)兔抗体、羊抗兔辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记二抗、羊抗兔 Alexa Fluor™ 488 标记二抗,均为赛默飞世尔科技公司生产;miR-486-5p 拮抗物(miR-486-5p antagonist)、sh-NFAT5 重组腺病毒表达载体、双荧光素酶表达载体、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物,均由上海生工生物工程股份有限公司合成;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色法检测试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白法检测试剂盒,均为上海酶联生物科技有限公司生产。

仪器 SLAN-96S 实时荧光定量 PCR 反应(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)仪,上海宏石医疗科技有限公司产品;GFM-200 荧光显微镜,上海光密仪器有限公司产品;Varioskan LUX 全能酶标仪、CL750 蛋白质印迹显影仪,均为美国赛默飞世尔科技公司产品;CKX53 细胞显微镜,日本 Olympus 公司产品。

2 实验方法

2.1 模型构建

小鼠饲养于温度 22~25℃、湿度 50%、光照 12 h 的环境中,不限制饮水和采食,适应性喂养 1 周后,db/m 小鼠作为对照组,db/db 小鼠构建糖尿病肾病小鼠模型,db/db 小鼠尾静脉取血检测空腹血糖,连续 3 次空腹血糖 $\geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,尿量为空白对照组的 150%,且持续出现白蛋白尿,判定糖尿病肾病小鼠模型制备成功。

2.2 动物分组与给药方法

将 db/db 小鼠按随机数字表法分为模型组、实验组、miR-486-5p antagonist 组和 sh-NFAT5 组,每组 10 只。对照组:正常饲养的 db/m 小鼠;模型组:db/db 小鼠构建糖尿病肾病小鼠模型;实验组:在模型组的基础上,给予苯扎贝特 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃干预治疗,治疗周期为 4 周;miR-486-5p antagonist 组:在实验组基础上,尾静脉注射 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ miR-486-5p antagonist;sh-NFAT5 组:在 miR-486-5p antagonist 组基础上,尾静脉注射含有 NFAT5 敲低质粒的重组腺病毒(sh-NFAT5;5'-CGGACAACAAAG-

GCAACTCAA-3')。

2.3 试剂盒检测小鼠 BUN、SCr、24 h-pro 水平^[5]

将各组小鼠放入代谢笼,24 h 禁食不禁水,收集 24 h 尿液,离心去残渣处理,按试剂盒说明书进行操作测定 24 h-pro 水平。各组小鼠麻醉后尾静脉取血,血样静置 2 h 后,于 4℃下,以 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 提取血清,按各试剂盒说明书操作测定 BUN、SCr 水平。每个样本独立重复 3 次,用全能酶标仪测定 450 nm 处的光密度(optical density, OD)值。

2.4 HE 染色法检测小鼠肾组织病理形态^[5]

取各组小鼠麻醉后经 4% 多聚甲醛溶液灌注固定,取肾组织备用。取肾组织常规脱水、包埋、切片、烘片、脱蜡、染色,用光学显微镜观察小鼠肾组织病理形态。

2.5 试剂盒检测 MDA、GSH-Px、CAT 和 SOD 水平^[5]

按“2.4”中的方法取小鼠肾组织,加入裂解液后,置于冰盒上研磨成匀浆,于 4℃下,以 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 8 min,取上清液,按各试剂盒说明书操作测定 MDA、GSH-Px、CAT 和 SOD 水平。

2.6 qRT-PCR 法检测小鼠肾组织中 miR-486-5p 和 NFAT5 mRNA 的相对表达水平^[6]

用 TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂从各组组织中提取总 RNA,用 Prime Script™ RT Master Mix 试剂盒按照说明书将其反转录为 cDNA,用 TB Green Premix Ex Taq™ II,在实时荧光定量 PCR 仪中定量 PCR。以 U6、GAPDH 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 miR-486-5p、NFAT5 mRNA 的相对表达水平。

2.7 免疫荧光法检测 NFAT5 的表达水平^[6]

用“2.4”中的方法制作各组小鼠肾组织切片,用 3% 双氧水溶液、室温避光的条件下孵育 15 min,磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤 10 min,暴露于 5% 牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)封闭 30 min,然后与 NFAT5 一抗(1:500)在 4℃下孵育过夜。第 2 天用 PBS 洗脱 3 次,用羊抗兔 Alexa Fluor™ 488 标记二抗(1:2000)在 37℃下孵育细胞 1 h,用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染料将细胞核染色 10 min,并在荧光显微镜下观察。

2.8 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-486-5p 和 NFAT5 的靶向关系^[6]

通过 Targetscan 数据库(<https://www.targetscan.org/>)预测 miR-486-5p 和 NFAT5 的靶向关系,PCR 扩增含 miR-486-5p 结合位点的 NFAT5 的 3'-UTR 序列构建野生型质粒(NFAT5-WT),用基因突变技

术将结合位点突变后,构建突变型质粒(NFAT5 - MUT)。用 Lipofectamine™ 2000 细胞转染试剂将上述质粒分别与 NC mimic、miR - 486 - 5p mimic 共转染至对数生长期的 293T 构建细胞株,记为 NC mimic 组、miR - 486 - 5p mimic 组。转染 48 h 后通过双荧光素酶报告分析系统检测荧光素酶活性。

2.9 蛋白质印迹法检测各组小鼠肾组织 AR、PDH、PDHA1、PDK、TGF - β 1、FN 和 Collagen I 蛋白的相对表达水平

取小鼠肾组织,然后从各组组织中提取总蛋白,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,按照参考文献[5]的方法进行蛋白质印迹。以 GAPDH 为内参,用凝胶成像系统成像,用 Image J 软件分析条带的灰度值。

2.10 免疫组化法检测各组小鼠肾组织中 α - SMA 蛋白的相对表达水平^[6]

用“2.4”中的方法取各组组织标本常规脱蜡、水洗后,微波抗原修复,冷却后 PBS 冲洗,然后加入 α - SMA 一抗(1:500),4℃ 孵育过夜,次日加入羊抗兔 HRP 标记二抗(1:2 000)37℃ 孵育 30 min, PBS 清洗 3 次,然后 DAB 显色,苏木精复染、脱水、封片,用光学显微镜观察。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,2 组间比较用独立样本 t 检验。

结 果

1 苯扎贝特对糖尿病肾病小鼠肾功能及病理学变化的影响

对照组为正常饲养的 db/m 小鼠;模型组为 db/db 小鼠构建糖尿病肾病小鼠模型;实验组小鼠在模型组的基础上,给予苯扎贝特 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃干预治疗;miR - 486 - 5p antagomir 组小鼠在实验组基础上,尾静脉注射 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ miR - 486 - 5p antagomir; sh - NFAT5 组小鼠在 miR - 486 - 5p antagomir 组基础上,尾静脉注射含有 NFAT5 敲低质粒的重组腺病毒。

模型组与对照组相比,小鼠的 BUN、SCr 和 24 h - pro 含量均显著升高(均 $P < 0.001$);实验组与模型组相比,小鼠的 BUN、SCr 和 24 h - pro 含量均显著下降(均 $P < 0.001$),见表 1。通过小鼠肾组织 HE 染色发现,对照组小鼠肾小球结构形态正常,基底膜光滑,肾间质无异常,无炎性细胞浸润;模型组 db/db 小鼠肾小球体积增

大,基底膜增厚,肾小管结构紊乱出现扩张,肾间质可见炎性细胞浸润;与模型组相比,实验组小鼠肾小球体积明显减小,基底膜厚度降低,炎性细胞浸润减少,见图 1。

2 苯扎贝特对糖尿病肾病小鼠肾组织 miR - 486 - 5p 和 NFAT5 表达水平的影响

对照组、模型组和实验组小鼠肾组织中 miR - 486 - 5p 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 0.39 ± 0.08 和 0.72 ± 0.16 , NFAT5 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.12 、 2.57 ± 0.49 和 1.36 ± 0.31 , NFAT5 相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.17 、 6.34 ± 1.20 和 2.09 ± 0.38 。模型组与对照组相比,小鼠肾组织中 miR - 486 - 5p 表达水平显著降低($P < 0.001$), NFAT5 mRNA 相对表达水平和 NFAT5 相对荧光强度均显著升高(均 $P < 0.001$);实验组与模型组相比,小鼠肾组织中 miR - 486 - 5p 相对表达水平显著升高($P < 0.001$), NFAT5 mRNA 相对表达水平和 NFAT5 相对荧光强度均显著降低(均 $P < 0.001$)。

3 miR - 486 - 5p 和 NFAT5 靶向关系验证

通过 Targetscan 预测发现,miR - 486 - 5p 和 NFAT5 存在结合位点,见图 2。为验证互补结合位点

表 1 各组小鼠血尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)和 24 h 尿蛋白(24 h - pro)含量的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Changes in blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr) and 24 - hour urinary protein (24 h - pro) content in mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	BUN ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	SCr ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	24 h - pro ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
Control	6.73 ± 1.48	22.28 ± 5.61	12.36 ± 2.35
Model	$14.51 \pm 2.72^{***}$	$56.65 \pm 10.23^{***}$	$36.19 \pm 6.27^{***}$
Experimental	$9.14 \pm 1.69^{\Delta\Delta\Delta}$	$31.17 \pm 5.74^{\Delta\Delta\Delta}$	$23.24 \pm 4.46^{\Delta\Delta\Delta}$

Control group: db/m mice; Model group: db/db mice; Experimental group: On the basis of the model group, $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ bezafibrate; Compared with control group, $^{***} P < 0.001$; Compared with model group, $^{\Delta\Delta\Delta} P < 0.001$.

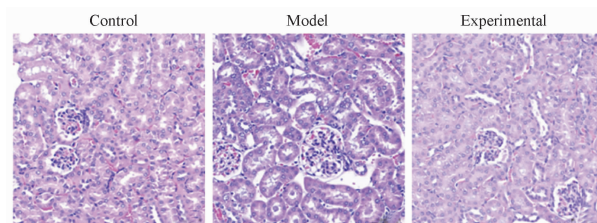


图 1 各组小鼠肾组织病理学变化(苏木精 - 伊红染色, $\times 200$)

Figure 1 Histopathological changes of mice in each group (hematoxylin - eosin staining, $\times 200$)

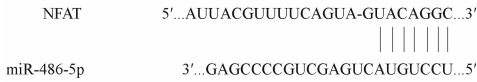


图2 miR-486-5p和活化T细胞的核因子5(NFAT5)结合位点预测

Figure 2 Prediction of miR-486-5p and nuclear factor of activated T cells 5 (NFAT5) binding sites

的功能,构建 miR-486-5p 模拟物(miR-486-5p mimics),并用 qRT-PCR 验证其转染效率,结果显示,相比于 NC mimics 组(1.00 ± 0.10),miR-486-5p mimics 组(5.63 ± 1.17)中的 miR-486-5p 相对表达量显著升高($P < 0.001$)。用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-486-5p 和 NFAT5 靶向关系,结果显示,miR-486-5p mimics 与 WT-NFAT5 共转染的荧光素酶活性(0.52 ± 0.10)较 NC mimics(1.00 ± 0.13)明显降低($P < 0.001$),而 miR-486-5p mimics 与 MUT-NFAT5共转染的荧光素酶活性(1.03 ± 0.17)较 NC mimics (1.00 ± 0.11)无显著性差异($P > 0.05$)。qRT-PCR 检测发现,相较于 NC mimics 组(1.00 ± 0.12),miR-486-5p mimics 组(0.51 ± 0.08)中的 NFAT5 mRNA 相对表达水平显著降低($P < 0.001$)。

4 苯扎贝特通过 miR-486-5p/NFAT5 轴对糖尿病肾病小鼠氧化应激的影响

模型组与对照组相比,小鼠 MDA 水平显著上升,GSH-Px、CAT 和 SOD 酶活性均显著降低(均 $P < 0.001$);实验组与模型组相比,小鼠 MDA 水平显著降低,GSH-Px、CAT 和 SOD 酶活性均显著升高(均 $P < 0.001$);miR-486-5p antagomir 组与实验组相比,小鼠 MDA 水平显著上升($P < 0.001$),GSH-Px、CAT 和 SOD 酶活性均显著降低($P < 0.01, P < 0.001$);

sh-NFAT5组与 miR-486-5p antagomir 组相比,小鼠 MDA 水平显著降低($P < 0.001$),GSH-Px、CAT 和 SOD 酶活性均显著升高(均 $P < 0.01$),见表2。

5 苯扎贝特通过 miR-486-5p/NFAT5 轴对糖尿病肾病小鼠糖代谢途径关键酶的影响

对照组、模型组、实验组、miR-486-5p antagomir 组和 sh-NFAT5 组的 AR 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.12 、 3.61 ± 0.43 、 1.82 ± 0.29 、 3.09 ± 0.58 和 2.25 ± 0.47 ,PDH 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 0.53 ± 0.10 、 0.91 ± 0.15 、 0.64 ± 0.12 和 0.82 ± 0.14 ,PDHA1 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14 、 0.36 ± 0.07 、 0.83 ± 0.16 、 0.51 ± 0.11 和 0.74 ± 0.13 ,PDK 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.10 、 2.59 ± 0.52 、 1.34 ± 0.31 、 2.11 ± 0.43 和 1.56 ± 0.39 ,对照组的上述指标与模型组比较,模型组的上述指标与实验组比较,实验组的上述指标与 miR-486-5p antagomir 组比较,miR-486-5p antagomir组的上述指标与 sh-NFAT5 组比较,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.01, P < 0.001$)。

6 苯扎贝特通过 miR-486-5p/NFAT5 轴对糖尿病肾病小鼠肾纤维化的影响

对照组、模型组、实验组、miR-486-5p antagomir 组和 sh-NFAT5 组的 α -SMA 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 8.31 ± 1.52 、 1.84 ± 0.33 、 4.37 ± 0.81 和 2.26 ± 0.40 。模型组与对照组相比,小鼠 α -SMA 蛋白相对表达水平显著升高;实验组与模型组相比,小鼠 α -SMA 蛋白相对表达水平显著降低;miR-486-5p antagomir 组与实验组相比,小鼠 α -SMA 蛋白相对表达水平显著升高;sh-NFAT5 组与 miR-486-5p antagomir 组相比,小鼠 α -SMA 蛋白相对表达水平显著降低(均 $P < 0.001$)。蛋白质印

表2 各组小鼠肾组织中丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in renal tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	MDA(nmol · mg ⁻¹)	GSH-Px(U · mg ⁻¹)	CAT(U · mg ⁻¹)	SOD(U · mg ⁻¹)
Control	10	2.78 ± 0.56	384.74 ± 51.92	41.02 ± 7.86	79.06 ± 13.59
Model	10	4.96 ± 0.97***	258.51 ± 38.63***	18.45 ± 3.73***	47.63 ± 9.85***
Experimental	10	3.02 ± 0.54△△△	362.12 ± 46.35△△△	34.81 ± 6.91△△△	71.52 ± 14.21△△△
MiR-486-5p antagomir	10	4.51 ± 0.79▲▲▲	281.39 ± 40.17▲▲▲	22.14 ± 4.32▲▲▲	50.73 ± 10.42▲▲
Sh-NFAT5	10	3.24 ± 0.58◇◇◇	342.97 ± 43.84◇◇	30.86 ± 5.97◇◇	66.89 ± 13.27◇◇

MiR-486-5p antagomir group;10 mg kg⁻¹ miR-486-5p antagomir was injected into the tail vein on the basis of experimental group;Sh-NFAT5 group; on the basis of miR-486-5p antagomir group,recombinant adenovirus containing NFAT5 knockdown plasmid was injected into the tail vein;Compared with control group,*** $P < 0.001$;Compared with model group,△△△ $P < 0.001$;Compared with experimental group,▲▲ $P < 0.01$,▲▲▲ $P < 0.001$;Compared with miR-486-5p antagomir group,◇◇ $P < 0.01$,◇◇◇ $P < 0.001$.

迹结果显示:对照组、模型组、实验组、miR-486-5p antagomir 组和 sh-NFAT5 组的 TGF- β 1 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 3.15 ± 0.52 、 1.43 ± 0.38 、 2.72 ± 0.43 和 1.89 ± 0.57 , FN 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.09 、 2.84 ± 0.57 、 1.46 ± 0.41 、 2.59 ± 0.52 和 1.73 ± 0.49 , Collagen I 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.13 、 4.28 ± 0.71 、 2.03 ± 0.46 、 3.64 ± 0.68 和 2.51 ± 0.53 ,对照组的上述指标与模型组比较,模型组的上述指标与实验组比较,实验组的上述指标与 miR-486-5p antagomir 组比较,miR-486-5p antagomir 组的上述指标与 sh-NFAT5 组比较,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.001$)。

讨 论

苯扎贝特是一种过氧化物酶体增植物激活受体(peroxisome proliferators-activated receptors, PPARs)泛激动药。PPARs 属于核受体家族,具有调节脂质和葡萄糖代谢、抗炎症、抗纤维化等作用,其3种受体亚型均在肾中有一定表达^[7]。有研究发现,苯扎贝特可减少糖尿病肾病患者的微量白蛋白尿^[8]。本研究提示,苯扎贝特对肾具有显著保护作用。miRNAs 可以通过靶向调控其靶基因来参与肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭^[6, 9-10]。NFAT5 是一种渗透保护性转录因子,其在细胞核组织的胚胎发育、细胞分化、炎症过程和细胞应激反应中以非依赖性的方式发挥重要作用,参与保护细胞免受高渗应激^[11]。本研究显示,苯扎贝特干预后可促进 miR-486-5p,抑制 NFAT5 的表达,且 miR-486-5p 靶向负调控 NFAT5 的表达,推测苯扎贝特可能通过 miR-486-5p/NFAT5 信号通路在糖尿病肾病小鼠体内发挥作用。

氧化应激和纤维化是糖尿病肾病的重要病理机制,机体抵御氧化应激的重要防御机制依赖于维持活性氧代谢平衡的酶系统(包括 SOD、CAT、GSH-PX),酶系统的活性氧清除能力不足会导致氧化损伤和脂质过氧化的最终产物的产生^[12]。本研究显示,在苯扎贝特的干预后 MDA 水平显著降低,说明苯扎贝特可以有效改善小鼠氧化应激水平。AR、PDH、PDHA1 和 PDK 是调节葡萄糖代谢的必需酶。研究发现,AR 的高表达可能会诱导糖尿病肾病足细胞的凋亡和线粒体损伤,PDH 酶活性的降低与肾纤维化有关^[13]。肾纤维化发生在各种慢性肾损伤之后,反复的肾损伤导致机体修复机制失调,损伤部位炎性细胞持续释放促肾纤维化因子^[14]。

本研究提示:小鼠糖代谢酶与肾纤维化相关因子

在苯扎贝特干预后均得到调控,说明苯扎贝特可以有效减轻小鼠糖尿病肾病的肾纤维化损伤,其机制可能是通过调控 miR-486-5p/NFAT5 信号通路实现的。

参考文献:

- [1] 王金玉,侯志梅. 糖尿病肾病的发病机制及其早期生物标志物的研究进展[J]. 临床医学进展,2024,14(4): 703—709.
- [2] 曹春阳,田苗,李富震,等. 中医药治疗糖尿病肾病实验研究进展[J]. 世界中医药,2023,18(14): 2092—2097.
- [3] 赛藏措,黄红英,刘海兰. 尿毒清联合苯扎贝特调节糖尿病肾病凝血功能、内皮功能水平的作用[J]. 宁夏医科大学学报,2021,43(7): 688—691.
- [4] WEALE C J, SCHROEDER C, MATSHAZI D M, et al. Investigating the altered expression of miR-486-5p and miR-novel-chr1_40444 in dysglycemia in a South African population[J]. J Diabetes Investig,2024,15(10): 1377—1389.
- [5] 吴乙偲,谭菲,易露露,等. 黄芪提取物调控 Nrf2/ARE 信号通路对糖尿病肾病大鼠氧化应激的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2024,40(15): 2217—2221.
- [6] LI Q, LIU J, SU R, et al. Small extracellular vesicles-shuttled miR-23a-3p from mesenchymal stem cells alleviate renal fibrosis and inflammation by inhibiting KLF3/STAT3 axis in diabetic kidney disease[J/OL]. Int Immunopharmacol, 2024, 139: 112667. 2024-07-16 [2024-08-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39018690/>.
- [7] 丁淑梅,张杰,邱红梅,等. 20-HETE 在苯扎贝特保护糖尿病肾病中的作用[J]. 中国药理学通报,2019,35(1): 29—34.
- [8] 雷振. 苯扎贝特对糖尿病肾病微量白蛋白尿的影响作用[J]. 中国现代药物应用,2012,6(13): 63—64.
- [9] CHEN Y, PENG Y, LI P, et al. Ginsenoside Rg3 induces mesangial cells proliferation and attenuates apoptosis by miR-216a-5p/MAPK pathway in diabetic kidney disease[J]. Aging (Albany NY),2024,16(11):9933—9943.
- [10] ZHANG Y, XIA S, TIAN X, et al. miR-4645-3p attenuates podocyte injury and mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease by targeting Cdk5[J/OL]. FASEB J, 2024, 38(10): e23668. 2024-03-31 [2024-08-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38742811/>.
- [11] 郭隽馥,李乡南,杨宇峰,等. 基于 NFAT5 介导的 EMT 研究益糖康改善高血糖对肾脏早期损伤的作用机制[J]. 中华中医药学刊,2024,42(1): 35—40,265.
- [12] REN H, SHAO Y, WU C, et al. VASH-1 regulates oxidative stress and fibrosis in diabetic kidney disease via SIRT1/HIF1 α and TGF β 1/Smad3 signaling pathways[J/OL]. Front Mol Biosci,2020, 7: 137. 2020-07-10 [2024-08-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32754616/>.
- [13] HE J Y, HONG Q, CHEN B X, et al. Ginsenoside Rb1 alleviates diabetic kidney podocyte injury by inhibiting aldose reductase activity[J]. Acta Pharmacol Sin,2022,43(2): 342—353.
- [14] GU Y Y, LIU X S, LAN H Y. Therapeutic potential for renal fibrosis by targeting Smad3-dependent noncoding RNAs[J]. Mol Ther,2024,32(2): 313—324.

(收稿日期 2024-10-30)