

高血糖对大鼠肾皮质葡萄糖转运蛋白 1 mRNA 表达的影响

任蕾 刘聪 金实 徐亚沛

作者单位:450052 郑州市,郑州大学第一附属医院(任蕾)

110004 沈阳市,中国医科大学附属盛京医院(刘聪)

110032 沈阳市,中国医科大学附属第四医院(金实)

450000 郑州市,郑州市第三人民医院(徐亚沛)

【摘要】 目的 探讨葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter1, GLUT1) 在糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)发病机制中的作用。**方法** 将 36 只 Wistar 大鼠随机分为对照组 10 只、高血糖组及 2 型糖尿病组各 13 只, 分别采用腹腔内注射链脲佐菌素及高脂饮食加腹腔内注射链脲佐菌素方法制备高血糖及 2 型糖尿病模型。10 w 末实验结束后,取大鼠肾皮质,同时检测大鼠体重、肾重、肾重百分比,血清 BUN;采用逆转录聚合酶链反应半定量分析肾皮质 GLUT1 mRNA 的表达。**结果** 高血糖组大鼠的体重显著降低,肾重、肾重百分比、BUN、FPG 和 ISI 水平均高于 2 型糖尿病组及对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。而 FINS 的水平低于 2 型糖尿病组及对照组,差异亦均有统计学意义($P < 0.05$)。高血糖组和 2 型糖尿病组 GLUT1 mRNA 在肾皮质中的表达均显著高于对照组,且高血糖组 GLUT1 mRNA 在肾皮质的表达显著高于 2 型糖尿病组($P < 0.05$)。**结论** GLUT1 在肾皮质中有表达,高血糖可以上调肾皮质 GLUT1 表达, GLUT1 可能与 DN 的发病相关。

【关键词】 葡萄糖转运蛋白 1;肾皮质;2 型糖尿病;糖尿病肾病;逆转录聚合酶链反应

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2013.01.005

The effect of hyperglycemia on the expression of glucose transporter 1 mRNA in renal cortex of rats

REN Lei¹, LIU Cong², JIN Shi³, et al. ¹The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China ²Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China ³The Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between glucose transporter 1 (GLUT1) mRNA and diabetic nephropathy (DN). **Methods** 36 healthy male Wistar rats weighing 180~220 g were randomly divided into three groups, normal control group (10 cases), type 2 diabetic rat model (13 cases), and high-glucose rat model (13 cases). Type 2 diabetic rat model were induced by intraperitoneally administered low dose of streptozocin and fed with food of high fat. High glucose rat model were induced by intraperitoneally administered high dose of streptozocin in rats and fed with normal food. After ten weeks, the renal cortex of rats were extracted, body weight, the kidney weight, the kidney weight×100/the body weight and BUN were detected. Semiquantitative analysis on the expression of GLUT1 mRNA in renal cortex were investigated by reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Results** The body weight of rats in high glucose group were significance induced. The kidney weight, kidney weight percentage, BUN, FPG levels and ISI in high glucose group were all higher than type 2 diabetic group and normal control group, FINS was lower than these two groups. The differences all had statistical significance ($P < 0.05$). The mRNA expressions in renal cortex of high glucose group were higher than type 2 diabetic group and normal control group, and the differences all had statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** GLUT1 expressed in renal cortex. Hyperglycemia can increase the expression of GLUT1 mRNA in renal cortex of rats, the increase of the expression of GLUT1 mRNA maybe correlate with DN.

【Key words】 Glucose transporter 1; Kidney cortex; Type 2 diabetic; Diabetic nephropathy; Reverse transcriptase polymerase chain reaction

葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter 1, GLUT1) 是一种镶嵌在细胞膜上的转运载体蛋白质,

其功能是维持基础状态下组织的葡萄糖摄入^[1]。在肾小球系膜细胞上主要存在的葡萄糖转运体是 GLUT1 和 GLUT4^[2,3]。糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 最初的病理学改变是肾脏肥大、肾小球和肾小管基底膜增厚及系膜区细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的进行性积聚。肾小球系膜细胞 (mesangial cells, MCs) 对 ECM 的合成起关键作用, 且与细胞外高糖有关。GLUT1 是介导 MCs 葡萄糖转运的主要载体蛋白质, 研究^[4]证实, MCs 合成过多的 ECM 及糖尿病肾小球硬化进展的决定因素在本质上是 GLUT1 的表达或活性增加。因此本文研究应用糖尿病大鼠模型, 从分子水平系统观察糖尿病状态下肾皮质中 GLUT1 的表达变化, 及其与肾脏病变发生发展之间的关系, 为阐明 DN 的发病机制及寻找防治方法提供实验理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 健康雄性 Wistar 大鼠 36 只, 体质量 180~220 g (中国医科大学动物部)。

1.2 仪器与试剂 拜安捷快速血糖监测仪 (德国拜耳公司); 尿糖试纸 (桂林中辉科技发展有限公司); 日立 7600 全自动生化分析仪 (日本日立公司); 链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) (美国 Sigma 公司); RNA 提取液、DL2000 DNA Marker、GLUT1 及 β -actin 上下游引物、逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司); 胰岛素放射免疫试剂盒 (北京北方生物制品有限公司)。

1.3 动物分组及处理 将 36 只 Wistar 大鼠随机 (随机对照表法) 分为对照组 10 只、高血糖组及 2 型糖尿病组各 13 只, 各组均自由摄食 (常规饲料)、饮水, 12 h 光照周期, 室温保持 18~28 °C, 1 w 后禁食 12 h, 断尾取血测空腹血糖。其后 2 型糖尿病组饲喂高脂饮食: 于常规饲料中分别以 30%、10%、3% 的比例 (以下三种物质各占高脂饲料总质量的百分比) 加入猪油、白砂糖、鸡蛋黄, 按质量百分比计算蛋白质、脂肪、碳水化合物所占比例分别为 9.3%、59.1%、31.6%; 对照组和高血糖组则继续饲喂常规饲料, 其中高血糖组同时于腹腔内注射 STZ 55 mg/kg, 其余两组腹腔内注射等量柠檬酸缓冲液, 72 h 后高血糖组大鼠断尾取血, 测血糖 >16.7 mmol/L、尿糖 (+++)~(++++), 持续 3 d 视为高血糖造模成功^[5]。其后各组同前饲养, 6 w 后各组禁食 12 h, 称体质量, 2 型糖尿病组腹腔内注射 STZ 30 mg/kg, 其余两组腹腔内注射等量柠檬酸缓冲液, 72 h 后 2 型糖尿病组断尾、取

血, 测血糖及尿糖达上述标准视为 2 型糖尿病造模成功^[6,7]。各组均继续饲养 4 w, 至第 10 周末实验结束。实验过程中 2 型糖尿病组造模失败 2 只, 死亡 1 只; 高血糖组造模全部成功, 死亡 4 只。

1.4 检测指标及方法 实验过程中每周应用血糖仪检测各组大鼠随机血糖。于第 10 周, 禁食 12 h 后, 测大鼠体重, 用 10% 水合氯醛 (0.3 ml/100 g) 腹腔注射麻醉大鼠, 并进行心脏采血, 常温下 5000×g 离心 10 min 分离血清, -70 °C 保存待测。采用拜安捷快速血糖仪检测空腹血糖 (fasting plasma glucose, FPG), 用放射免疫法检测空腹胰岛素 (fasting insulin, FINS)、血清尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)。计算胰岛素敏感指数 (insulin sensitivity index, ISI), 公式如下。

$$ISI = \ln[1/(FPG \times FINS)]$$

采血结束后, 断椎处死动物, 快速取大鼠左肾皮质, 立即将标本置于液氮中, 然后将组织标本置于 -80 °C 保存。计算肾重百分比 (肾重×100/体重)。

1.5 大鼠肾皮质 GLUT1 mRNA 表达的测定 ①引物的设计: GLUT1 引物: 上游 5'-GGCTGCTGAGGTGATGTTT-3', 下游 5'-CAGGCTCTGCCCGTTGAT-3', 扩增产物片段长度为 280 bp, 内参照 β -actin 扩增产物片段长度为 690 bp。②RNA 提取及反转录: 取大鼠肾皮质 100 mg, 应用 RNA 提取液提取总 RNA。逆转录反应体系 12 μ l, 包括总 RNA 2 μ l, 2×Bca 1st Buffer 5 μ l, MgSO₄ (25 mM) 2 μ l, RNase Free dH₂O 0.25 μ l, dNTP Mixture (各 10 mM) 0.5 μ l, RNase-Inhibitor (40 U/ μ L) 0.25 μ l, Bca BEST Polymerase (22 U/ μ L) 0.5 μ l, Oligo dT Primer (50 mM) 0.5 μ l, Positive Control RNA (2×10⁵ copies/ μ L) 1 μ l。逆转录条件为 65 °C 1 min, 30 °C 5 min, 15~30 min 匀速升温至 65 °C, 65 °C 30 min, 98 °C 5 min, 5 °C 5 min。③PCR 反应: PCR 反应体系 25 μ l, 包括 cDNA 3 μ l, 灭菌蒸馏水 17.1 μ l, 10×Buffer 2.5 μ l, dNTP Mixture 2 μ l, Bca-Optimized Taq 0.2 μ l, GLUT1 或 β -actin 上下游各 0.1 μ l。反应条件是 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 40 s (β -actin 94 °C 变性 30 s), 55.9 °C 退火 1 min (β -actin 55 °C 退火 1 min), 72 °C 延伸 1 min (β -actin 72 °C 延伸 5 min), 扩增 35 个循环。最后 72 °C 延伸 7 min。④反应产物检测与分析: PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 取 PCR 产物 5 μ l 电泳 30 min, 将凝胶放入 PCR 分析仪中拍照记录结果, 用激光密度扫描仪记录 GLUT1 和 β -actin 电泳带密度进行分析。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 11.5 软件进行统计学

处理,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布数据经对数转换后进行分析,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 SNK-q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体重、肾重、肾重百分比及血清 BUN 的比较 喂养 10 w 后,与 2 型糖尿病组 and 对照组比较,高血糖组大鼠的体重显著降低,肾重、肾重百分比及 BUN 显著升高,差异均具有统计学意义(P 均 < 0.05),而 2 型糖尿病组各指标与对照组比较,差异均无统计学意义(P 均 > 0.05),见表 1。

2.2 各组大鼠 FPG、FINS 及 ISI 的比较 高血糖组大鼠的 FPG 水平和 ISI 显著高于对照组和高血糖组,而 FINS 显著降低,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。2 型糖尿病组 FPG 和 FINS 水平均高于对照组,而 ISI 显著降低,差异亦均有统计学意义(P 均 < 0.05),见表 2。

2.3 各组大鼠肾皮质 GLUT1 mRNA 的表达情况 各组大鼠肾皮质提取的 RNA 经 RT-PCR 检测均扩增出 280 bp 的条带,说明 GLUT1 在各组大鼠肾皮质中均有表达(见图 1)。与对照组比较,高血糖组和 2 型糖尿病组 GLUT1 的表达显著升高,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),且高血糖组 GLUT1 的表达显著高于 2 型糖尿病组,经比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

3 讨论

葡萄糖是机体能量的主要来源,其转运活动是机体能够利用这一能源物质的限速步骤,而这又是由 GLUT 介导完成的。GLUT1 是已知的分布最广的转运体,其高效表达于人类红细胞、脑、眼、周围神经及胎盘等细胞和组织中,维持基础状态下组织的葡



图 1 肾皮质 GLUT1 PCR 产物凝胶电泳结果

注:1 为 DL2000 DNA Marker;2,6,7,10 为对照组 (280 bp);3,4,8,11 为 2 型糖尿病组 (280 bp);5,9,12,13 为高血糖组 (280 bp);各条带 β -actin 为 690 bp

表 3 各组大鼠肾皮质 GLUT1 mRNA 表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	GLUT1 mRNA
2 型糖尿病组	10	$0.60 \pm 0.17^{\Delta}$
高血糖组	9	$0.93 \pm 0.24^{\Delta\circ}$
对照组	10	0.32 ± 0.16

注: Δ 与对照组比较, $P < 0.05$; $\circ$ 与 2 型糖尿病组比较, $P < 0.05$

萄糖摄入^[1]。最初的研究^[2,3]表明,关于肾脏易化扩散的葡萄糖转运体在肾小球 MCs 上主要存在的是 GLUT1 和 GLUT4。但在体外培养的肾小球 MCs 中, GLUT1 是占主要地位的转运体。GLUT1 是介导 MCs 葡萄糖转运的主要载体蛋白质。DN 的发生与糖代谢紊乱密切相关,在临床和动物实验均观察到血糖控制不佳可加速 DN 的进展。尽管 1 型和 2 型糖尿病病的发病机理不同,但都以持续的、异常的细胞外高血糖为明显特征,高血糖在 DN 发生发展中的作用已得到公认。DN 最初的病理学改变是肾脏肥大、肾小球和肾小管基底膜增厚及系膜区 ECM 的进行性积聚。ECM 的积聚被认为是糖尿病肾小球硬化和肾功能衰竭的关键。肾小球 MCs 对 ECM 的合成起关

表 1 各组大鼠体重、肾重、肾重百分比以及血清 BUN 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	体重(g)	肾重(g)	肾重百分比(%)	BUN(mmol/L)
2 型糖尿病组	10	$446.15 \pm 34.58^*$	$1.55 \pm 0.15^*$	$0.36 \pm 0.04^*$	$6.19 \pm 1.70^*$
高血糖组	9	$312.00 \pm 51.99^{\Delta\circ}$	$1.78 \pm 0.29^{\Delta\circ}$	$0.58 \pm 0.15^{\Delta\circ}$	$14.66 \pm 2.32^{\Delta\circ}$
对照组	10	429.25 ± 36.40	1.48 ± 0.24	0.34 ± 0.02	7.28 ± 1.07

注: Δ 与对照组比较, $P < 0.05$; $\circ$ 与 2 型糖尿病组比较, $P < 0.05$; *与对照组比较, $P > 0.05$

表 2 各组 FBG、FINS 及 ISI 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	FPG(mmol/L)	FINS(IU/L)	ISI
2 型糖尿病组	10	$9.39 \pm 1.86^{\Delta}$	$17.16 \pm 1.95^{\Delta}$	$0.58 \pm 0.12^{\Delta}$
高血糖组	9	$24.01 \pm 6.49^{\Delta\circ}$	$3.01 \pm 1.34^{\Delta\circ}$	$4.13 \pm 0.44^{\Delta\circ}$
对照组	10	5.02 ± 0.67	7.66 ± 0.75	3.64 ± 0.22

注: Δ 与对照组比较, $P < 0.05$; $\circ$ 与 2 型糖尿病组比较, $P < 0.05$

键作用,且与细胞外高糖有关。近年研究^[8,9]表明细胞摄糖能力除了取决于微环境中的糖浓度外, GLUT1 作为调节葡萄糖进入 MCs 的主要载体,其位于细胞表面的数量多少及功能状态也是影响糖摄入的重要因素。有研究^[4]表明, MCs 合成过多的 ECM 及糖尿病肾小球硬化进展的决定因素可能是 GLUT1 的表达或活性增加。GLUT1 的表达或活性增加通过以下途径促进 DN 的进展: ①蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是高糖或 GLUT1 表达增强时 MCs 内信号传导通路中的重要介质, 几乎所有 MCs 的功能改变均与 PKC 的激活有关^[10]。②PKC 激活后造成转化生长因子 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 的表达和转录活性加强。TGF- β 1 能直接刺激 ECM 的合成, 如各型胶原、纤维连接蛋白、层黏连蛋白、黏多糖及多种蛋白多糖。既可通过抑制降解基质的酶如胶原酶、PA 等的合成, 又可通过促进促进纤溶酶原激活物抑制物-1、基质金属蛋白酶组织抑制剂等蛋白酶抑制物的表达, 促进 ECM 的积聚。TGF- β 1 还可刺激细胞合成整合素, 即细胞外基质受体, 触发细胞与细胞与 ECM 的相互作用。糖尿病或高糖分泌 TGF- β 1 及其特异性受体表达增加, 研究^[11-13]证实 TGF- β 1 可诱导 MCs 的 GLUT1 mRNA 表达增加, 在糖尿病时该系统被激活, 形成恶性循环, 加剧 DN 的病变进程。本文研究结果显示, 与 2 型糖尿病组和对照组比较, 高血糖组大鼠的 FPG 水平和 ISI 显著升高, 而 FINS 降低 (P 均 < 0.05), 说明高血糖组大鼠均呈高血糖状态, 且已产生胰岛素抵抗。RT-PCR 结果显示, 高血糖组和 2 型糖尿病组 GLUT1 mRNA 在肾皮质中的表达均显著高于对照组, 且高血糖组 GLUT1 mRNA 在肾皮质的表达显著高于 2 型糖尿病组 (P 均 < 0.05)。从而进一步证实高血糖可以造成肾皮质 GLUT1 mRNA 的表达增加。在本文研究中, 高血糖组大鼠的肾脏体积增大, 肾脏重量显著高于其他两组, 且高血糖组大鼠的 BUN 水平显著升高, 基本符合 DN 初期的病理学模型改变。故推测 GLUT1 的表达增加可能是 DN 发生发展的原因之一。由此可以推测, 积极控制血糖, 下调 GLUT1 的表达有可能延缓 DN 的进展。因此, 探讨如何应用药物下调 GLUT1 的表达将为 DN 的治疗提供更广

阔的研究空间。

综上所述, GLUT1 在肾皮质中有表达, 高血糖可以上调肾皮质 GLUT1 的表达, GLUT1 可能与 DN 的发病相关。

4 参考文献

- 1 Kumagai AK. Glucose transport in brain and retina: implication in the management and complication of diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 1999, 15: 261-273.
- 2 Brosius FC, Heilig CW. Glucose transporters in diabetic nephropathy. *Pediatr Nephrol*, 2005, 20: 447-451.
- 3 Heilig C, Zaloga C, Lee M, et al. Immunogold localization of high affinity GLUT isoforms in normal rat kidney. *Lab Invest*, 1995, 73: 674-684.
- 4 王良君, 杨亮, 刘学政. 小檗碱对 2 型糖尿病大鼠肾脏 GLUT1 表达的影响. *解剖学研究*, 2011, 33: 248-251.
- 5 李英, 薛静, 汪晶华, 等. 缬沙坦下调糖尿病大鼠肾皮质葡萄糖转运蛋白 1 和 TGF- β 1 mRNA 的表达 1. *基础医学与临床*, 2004, 124: 287-290.
- 6 丁玉琴, 孔三囡, 郑锦锋. 2 型糖尿病大鼠血糖血脂水平与抗性淀粉的相关性. *中国临床康复*, 2005, 9: 92-93.
- 7 杨雁, 胡蜀红, 张建华, 等. 肥胖及 2 型糖尿病大鼠 Alzheimer 病样 Tan 蛋白过度磷酸化修饰及机制探讨. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33: 458-464.
- 8 Kang YS, Song HK, Lee MH, et al. Visfatin is upregulated in type-2 diabetic rats and targets renal cells. *Kidney Int*, 2010, 78: 170-181.
- 9 Ehnert S, Baur J, Schmitt A, et al. TGF- β 1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation. *PLoS One*, 2010, 5: e14073.
- 10 Kumagai AK. Glucose transport in brain and retina: implications in the management and complications of diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 1999, 15: 261-273.
- 11 Heilig C, Liu Y, England RL, et al. D29 glucose stimulates, mesangial cell GLUT1 expression and basal and IGF2 1 2 sensitive glucose uptake in rat mesangial cells. *Diabetes*, 1997, 46: 1030-1039.
- 12 匡鼎伟, 吴永贵, 陆福明. 葡萄糖转运蛋白与糖尿病肾病. *《国外医学》泌尿系统分册*, 2000, 20: 109-112.
- 13 韩文兵, 李平, 赵婷婷, 等. 柴黄益肾颗粒对糖尿病并发肝损伤大鼠 TGF- β 1 及 GLUT-1 的调控作用研究. *中日友好医院学报*, 2012, 26: 348-352.

(收稿日期: 2013-02-12)

(本文编辑: 杨军)