

# 高脂高糖高胆固醇饮食对小型猪肾脏 细胞外基质表达的影响

刘毅<sup>①③</sup> 李勤凯<sup>①</sup> 蔡曼波<sup>①</sup> 张弛<sup>①</sup> 肖俊霞<sup>①</sup> 侯洪杰<sup>①</sup>  
李宏光<sup>①</sup> 祖秀宏<sup>①</sup> 尹卫东<sup>①</sup> 王宗保<sup>②\*</sup>

(<sup>①</sup> 南华大学生命科学与技术学院 心血管病研究所 湖南 衡阳 421001 ;

<sup>②</sup> 南华大学实验动物学部 湖南 衡阳 421001 ;<sup>③</sup> 韶关学院医学院 广东 韶关 512026)

**摘要 :**为研究高脂高糖高胆固醇(HFSCD)诱导的2型糖尿病小型猪肾脏细胞外基质(ECM)的表达情况,将10头广西巴马小型猪分别喂正常和HFSCD饲料,收集血、尿液,测定其生化指标,进行口服葡萄糖耐量试验。5个月后取部分肾组织,行H.E和Masson染色,免疫组织化学方法检测ECM相关蛋白的表达。结果表明,喂养HFSCD后,小型猪血糖、血脂和胰岛素明显升高,出现胰岛素抵抗和 $\beta$ 细胞功能紊乱;蔗糖和微量白蛋白升高,肾脏纤维连接蛋白(FN)和IV型胶原的表达明显增加,而I型胶原无表达。这说明HFSCD喂养广西巴马小型猪5个月能成功建立早期糖尿病肾病模型,促进FN和IV型胶原的表达。

**关键词 :**小型猪模型 致糖尿病饮食 2型糖尿病 糖尿病肾病 细胞外基质

中图分类号 :Q955 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3263(2006)06-41-08

## Differential Expression of Extracellular Matrix in the Kidneys of Diabetic Mini-pigs Induced by High-fat/high-sucrose/high-cholesterol Diet

LIU Yi<sup>①③</sup> LI Qin-Kai<sup>①</sup> CAI Man-Bo<sup>①</sup> ZHANG Chi<sup>①</sup> XIAO Jun-Xia<sup>①</sup> HOU Hong-Jie<sup>①</sup>  
LI Hong-Guang<sup>①</sup> ZU Xiu-Hong<sup>①</sup> YIN Wei-Dong<sup>①</sup> WANG Zong-Bao<sup>②</sup>

(<sup>①</sup> Institute of Cardiovascular Research, School of Life Sciences and Technology, Nanhua University, Hengyang Hunan 421001 ;

<sup>②</sup> Department of Laboratory Animal Science, Nanhua University, Hengyang Hunan 421001 ;

<sup>③</sup> Medical College, Shaoguan University, Shaoguan Guangdong 512026, China)

**Abstract :**To investigate the differential expressions of extracellular matrix in the kidneys of type 2 diabetic mini-pigs induced by high-fat/high-sucrose/high-cholesterol diet (HFSCD), 10 male Guangxi Bama mini-pigs were fed normal control diet or HFSCD (5 for each group) and biochemical parameters in blood and urine and oral glucose tolerance test were monitored after the feeding programme. Five months later, each left kidney was removed, routinely stained with HE and Masson's trichrome staining. Extracellular matrix expression in the kidneys was determined by fibronectin, type I and type IV collagens immunostaining. Feeding HFSCD to mini-pigs markedly caused hyperglycaemia, hyperinsulinaemia, dyslipidaemia, insulin resistance and beta cell dysfunction. Albuminuria,

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30370675), 湖南省自然科学基金项目(No. 05JJ20006, 04JJ3058), 湖南省科技计划项目(No. 04TH4001, 05TH4002);

\* 通讯作者, E-mail: wangzb65@hotmail.com;

第一作者介绍 刘毅, 男, 硕士, 研究方向 糖尿病的分子机制。

收稿日期 2006-03-07, 修回日期 2006-09-25

glucosuria ,extracellular matrix accumulation were observed in HFSCD-fed mini-pigs. The expression of fibronectin and type IV collagen was significantly increased in the kidneys of the HFSCD group ,while immunoreactivity of type I collagen showed no expression in HFSCD- and CD-fed pigs. Thus ,we have shown that feeding HFSCD to the Guangxi Bama mini-pigs for 5 months can induce early-stage diabetic nephropathy ,and increase fibronectin and type IV collagen expression.

**Key words** :Mini-pig model ;Diabetogenic diet ;Type 2 diabetes mellitus ;Diabetic nephropathy ;Extracellular matrix

随着人们生活水平的提高和过度进食高脂高能量饮食 ,2 型糖尿病的发病率急剧升高<sup>[1]</sup>。糖尿病肾病( diabetic nephropathy ,DN)是糖尿病主要的慢性并发症之一 ,亦是终末期肾功能衰竭最主要的发病原因<sup>[1]</sup>。然而 DN 的发生、发展机制仍不清楚 ,因此建立合适的动物模型是非常有研究价值的。目前国内外的研究多数是用化学毒素( 如链脲佐菌素 )注射建立 1 型糖尿病小鼠、大鼠模型来研究 DN ,这些模型从解剖、生理和病理生理等方面与人类 2 型糖尿病的发病特点并不符合<sup>[2]</sup>。鉴于猪和人在解剖学、生理学、疾病发生机理等方面极其相似 ,尤其是肾脏形态和功能与人类相似<sup>[3,4]</sup> ,因此本研究选用中国特有的小型猪品种之一——广西巴马小型猪 ,采用高脂高糖高胆固醇喂养法 ,建立 2 型糖尿病肾病模型 ,研究细胞外基质( extracellular matrix ,ECM)在小型猪肾脏中的表达情况 ,目前国内外尚未有类似报道。

## 1 材料与方法

**1.1 动物与分组** 广西巴马小型猪 ,10 头 ,雄性 3 月龄 ,由第三军医大学实验动物中心提供( 实验动物生产许可证号 SCXK( 渝 )20020002 )。按体重随机分为 2 组 ,5 只/组 :正常对照组( CD group) ,喂正常猪饲料 ;高脂高糖高胆固醇组( HFSCD group) ,喂高脂高糖高胆固醇饲料<sup>[5]</sup>。高脂高糖高胆固醇饲料含 10% 猪油、37% 蔗糖、2% 胆固醇和 51% 正常饲料。正常饲料的消化能为 13.13 MJ/kg ,蛋白含量为 16.21% ,脂肪 3.61% ,糖类 62.19% ;HFSCD 饲料的消化能为 21.55 MJ/kg ,蛋白含量为 8.14% ,脂肪 11.55% ,糖类 72.59%。动物分栏喂养 ,每日投食 3 次 ,日粮为体重的 4% ,自由饮水。实验期

为 5 个月。

**1.2 血、尿液标本检测** 每月末从禁食过夜的巴马小型猪眶静脉窦抽取血样 ,葡萄糖氧化酶法检测空腹血糖( glucose ) ;GPO-PAP 酶法测定血浆甘油三酯( triglyceride ,TG ) ;CHOD-PAP 酶法测定血浆总胆固醇( total cholesterol ,TC ) ,以上试剂购自上海荣盛生物试剂公司。放射免疫法测血浆胰岛素( 试剂购自中国原子能研究院 )。

第 0、2、4、5 月末取随机晨尿 ,己糖激酶法测尿糖 ,乳胶增强型免疫透射比浊法测尿微量白蛋白 ,以上试剂购自上海名典生物工程公司。Jeffe 反应速率法测血浆和尿液肌酐( 试剂购自南京建成生物试剂公司 )。计算尿糖/肌酐比值和尿微量白蛋白/肌酐比值<sup>[6]</sup>。

**1.3 口服葡萄糖耐量实验( oral glucose tolerance test ,OGTT)** 为检测巴马小型猪的葡萄糖耐量 ,每月末进行 OGTT。经 18 h 禁食后 ,给予含 25 g 正常猪饲料和 2 g/kg 葡萄糖的混合饲料<sup>[5]</sup> ,于第 0、30、60、90 和 120 min 从耳缘静脉取血 ,测血浆葡萄糖和胰岛素水平。

**1.4 肾脏组织学检查** 5 个月 after ,股动脉放血处死动物 ,分离左肾 ,清洗 ,称重 ,计算肾脏重量系数( 左肾重量/体重 ,g/kg )。从左肾下极的相同部位取部分组织( 包括皮质和髓质 ) ,10% 中性甲醛固定 24 h ,常规石蜡包埋 ,制片 ,H. E 染色以观察细胞结构 ,Masson 三色染色以观察胶原纤维的组织分布。

**1.5 肾脏细胞外基质的检测与分析** 采用福州迈新生物技术公司的 EliVision 二步法非生物素检测体系进行免疫组织化学染色 ,以检测肾脏细胞外基质相关蛋白的表达。纤维连接蛋白、IV 型胶原多抗和 I 型胶原单抗购自武汉博士德生物技术公司 ,抗体稀释度均为 1:100 ,染

色按试剂盒说明书进行,主要步骤如下:热修复后用 3%  $H_2O_2$  孵育 10 min,分别加入一抗 4℃ 过夜,随后相继加入聚合物增强剂室温孵育 20 min,辣根过氧化物酶标记的二抗聚合物室温孵育 30 min,DAB 显色,苏木素复染。阳性染色呈棕黄色。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

采用 Olympus 公司显微成像系统和 Polaroid 公司 PIPS-2020 病理图像分析系统分析免疫组化结果。经标准灰度校正后,每张切片随机取 5 个高倍视野,在相同条件下测定阳性染色的平均积分光密度值(平均总积分减去平均背景积分)平均背景积分],作为 3 种 ECM 成分的相对表达量。染色越深,平均积分光密度值越大,反映蛋白的表达越高。

为了确保病理检查内容可靠,由两位观察者对每批标本的免疫组化染色进行盲法测定,取两者的平均值。

**1.6 统计方法** 用 SPSS 软件统计分析数据,实验数据以  $\bar{X} \pm S$  表示。尿糖/肌酐比值和尿微量白蛋白/肌酐比值经对数转换后呈对称分布。组间比较用  $t$ -检验, $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

**2.1 空腹血糖、胰岛素、甘油三酯及总胆固醇水平** 如表 1 所示,与 CD 组相比,HFSCD 组血浆葡萄糖水平随着喂养时间的延长而直线升高,第 5 个月达到(10.27 ± 2.25)mmol/L,是 CD 组的 2.15 倍。血浆胰岛素浓度自 2 个月后明显升高,第 4 个月达到峰值,为(24.43 ± 3.55)U/L,随后呈下降趋势。血浆甘油三酯和总胆固醇水平从第 1 个月起即持续上升。这说明喂养高脂高糖高胆固醇饲料能导致巴马小型猪发生高葡萄糖血症、高胰岛素血症和高脂血症。

表 1 高脂高糖高胆固醇饲料对广西巴马小型猪糖、脂代谢的影响

Table 1 Effects of the high-fat/high-sucrose/high-cholesterol diet on glucose and lipid metabolism parameters in Guangxi Bama mini-pigs

指标 Parameters	0	第 1 个月 1 month	第 2 个月 2 months	第 3 个月 3 months	第 4 个月 4 months	第 5 个月 5 months
葡萄糖 (mmol/L) Glucose						
CD	4.71 ± 0.39	4.24 ± 0.90	4.83 ± 0.87	5.24 ± 1.00	4.65 ± 0.71	4.77 ± 0.57
HFSCD	5.12 ± 0.84	5.97 ± 0.73*	6.88 ± 0.57*	8.89 ± 2.05**	9.54 ± 2.12**	10.27 ± 2.25**
胰岛素 (U/L) Insulin						
CD	6.97 ± 0.33	7.31 ± 0.94	7.50 ± 0.93	8.68 ± 0.82	7.25 ± 0.80	7.65 ± 1.33
HFSCD	7.47 ± 1.16	9.12 ± 1.63	15.12 ± 3.22*	21.16 ± 5.08*	24.43 ± 3.55**	17.43 ± 3.80**
甘油三酯 (mmol/L) Triglycerides						
CD	0.59 ± 0.04	0.59 ± 0.06	0.63 ± 0.10	0.69 ± 0.16	0.71 ± 0.15	0.73 ± 0.13
HFSCD	0.59 ± 0.05	0.94 ± 0.07**	1.50 ± 0.18**	1.87 ± 0.14**	2.03 ± 0.42**	2.10 ± 0.32**
总胆固醇 (mmol/L) Total cholesterol						
CD	2.06 ± 0.34	1.99 ± 0.33	2.01 ± 0.35	1.68 ± 0.21	1.82 ± 0.49	2.07 ± 0.46
HFSCD	2.31 ± 0.44	6.24 ± 1.77**	9.06 ± 1.44**	11.20 ± 2.02**	15.23 ± 2.00**	20.45 ± 2.83**

数据以均值 ± 标准差表示;与 CD 组相比,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ 。

Values are expressed as means ± SD;\*  $P < 0.05$  HFSCD vs. CD,\*\*  $P < 0.01$  HFSCD vs. CD.

**2.2 葡萄糖耐量和胰岛素分泌** 二组动物第 0、1、2 和 3 个月的 OGTT 曲线图无明显差别,第 4、5 个月的曲线图相似,表现为(图 1):口服葡

萄糖后,CD 组小型猪血糖水平迅速升高,于 30 min 达到峰值,其后急剧下降,于 120 min 接近基准值。随着血糖的升高,血浆胰岛素也显著

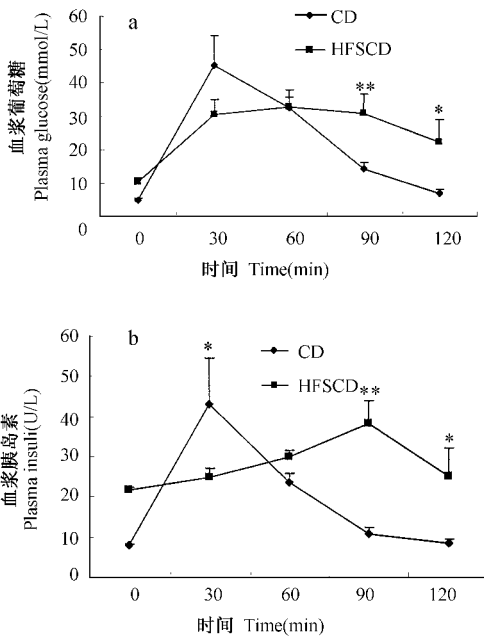


图 1 高脂高糖高胆固醇饲料喂养 5 个月对广西巴马小型猪葡萄糖耐量和胰岛素分泌的影响  
Fig. 1 Effects of five-month high-fat/high-sucrose/high-cholesterol feeding on glucose tolerance and insulin secretion in Guangxi Bama mini-pigs as

examined by the oral glucose tolerance test

a. 糖负荷后血糖变化曲线; b. 糖负荷后血浆胰岛素变化曲线。

a. The levels of plasma glucose in response to oral glucose loading ; b. The levels of plasma insulin in response to oral glucose loading.

数据以均值 ± 标准差表示 ;

与 CD 组相比 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Values are expressed as means ± SD ;

\*  $P < 0.05$  HFSCD vs. CD, \*\*  $P < 0.01$  HFSCD vs. CD.

上升,于 30 min 出现急性分泌峰,这说明糖负荷后的血糖清除及胰岛素分泌是有效和及时的。而 HFSCD 组小型猪口服葡萄糖后,血糖峰值明显降低、延迟,而下降峰不明显,120 min 血糖值显著高于 CD 组,胰岛素急性分泌相延后至 90 min。OGTT 结果结合空腹血糖、胰岛素显著升高说明了喂养高脂高糖高胆固醇饲料能造成小型猪糖耐量异常和胰岛素抵抗,并能导致胰岛  $\beta$  细胞分泌胰岛素功能下降,不能有效清除糖负荷后的血浆葡萄糖升高。

2.3 肾功能 如表 2 所示,喂养高脂高糖高胆固醇饲料 4 个月后,巴马小型猪尿糖和微量白蛋白明显上升,这反映肾小球滤过功能受损和肾小管重吸收能力下降。而血、尿肌酐浓度并无显著性升高,说明小型猪肾脏功能发生早期损伤,但未进展到氮质血症和肾功能衰竭。

2.4 肾脏显微形态 二组间的左肾重量系数无显著性差异( CD  $3.42 \pm 0.51$  g/kg vs. HFSCD  $2.89 \pm 0.71$  g/kg,  $P = 0.259$ )。H. E 染色显示(图版 I :1,  $\times 400$ ):HFSCD 组小型猪的部分肾小球肥大,肾小球内细胞增多,空泡变性;部分肾小球毛细血管丛萎缩,囊腔闭塞,小球内细胞减少,核浓染(如黑色箭头所示)。并可见部分远曲小管和致密斑空泡化,间质中有淋巴细胞浸润。Masson 三色染色(图版 I :3,基底膜、肾小球系膜和胶原纤维呈蓝色,  $\times 400$ )显示:HFSCD 组肾小球系膜区增宽(红色箭头所示),细胞外基质增多(绿色箭头所示),胶原纤维增生。而 CD 组巴马小型猪肾脏组织学观察并无明显异常(图版 I :2 A)。

IV 型胶原是基底膜和细胞外基质的主要组成部分, HFSCD 组(图版 I :5,  $\times 400$ )与 CD 组(图版 I :6)相比,IV 型胶原的免疫阳性染色(呈棕黄色,下同)在肾小球、肾小管和间质内明显加深,且阳性反应细胞数增多,说明其蛋白的表达增加(平均积分光密度值 CD  $0.2838 \pm 0.0498$  vs. HFSCD  $0.4196 \pm 0.0584$ ,  $P = 0.004$ )。纤维连接蛋白是肾小球系膜的重要组成部分,在 CD 组(图版 I :8,  $\times 400$ )的肾小球系膜区有少量表达,而在 HFSCD 组(图版 I :7)系膜区的表达明显增加,并出现在肾小管的上皮细胞(平均积分光密度值 CD  $0.2065 \pm 0.0245$  vs. HFSCD  $0.2955 \pm 0.0525$ ,  $P = 0.009$ )。二组动物肾脏无明显的 I 型胶原表达(图版 I :9, 10,  $\times 400$ )。这些现象说明饲喂高脂高糖高胆固醇饲料后,巴马小型猪肾脏的细胞外基质成分 IV 型胶原和纤维连接蛋白表达明显增加。

### 3 讨论

过度进食富含饱和脂肪和胆固醇的西方化

表 2 高脂高糖高胆固醇饲料对广西巴马小型猪肾功能的影响

Table 2 Effects of the high-fat/high-sucrose/high-cholesterol diet on renal function in Guangxi Bama mini-pigs

指标 Parameters	0	第 2 个月 2 months	第 4 个月 4 months	第 5 个月 5 months
尿葡萄糖/肌酐比值 (mmol/mmol) Urinary glucose/creatinine ratio				
CD	0.036 5 ± 0.005 7	0.039 7 ± 0.009 8	0.041 1 ± 0.005 4	0.040 8 ± 0.007 8
HFSCD	0.037 8 ± 0.006 6	0.042 9 ± 0.007 9	0.062 5 ± 0.007 9*	0.066 2 ± 0.010 7**
尿白蛋白/肌酐比值 (mg/g) Urinary albumin/creatinine ratio				
CD	12.26 ± 2.54	12.77 ± 3.33	13.52 ± 4.67	12.60 ± 3.27
HFSCD	12.73 ± 3.14	14.16 ± 3.53	25.13 ± 4.65*	48.08 ± 11.77**
血浆肌酐 (μmol/L) Plasma creatinine				
CD	28.56 ± 5.54	28.97 ± 7.44	28.81 ± 6.02	29.69 ± 3.81
HFSCD	26.67 ± 6.53	27.71 ± 6.36	30.76 ± 8.91	33.38 ± 9.10
尿肌酐 (mmol/L) Urinary creatinine				
CD	3.77 ± 0.53	4.08 ± 0.84	4.13 ± 1.00	4.43 ± 0.87
HFSCD	4.05 ± 0.72	4.20 ± 0.92	4.08 ± 0.76	4.71 ± 0.69

数据以均值 ± 标准差表示 ;与 CD 组相比 , \*  $P < 0.05$  , \*\*  $P < 0.01$ 。

Values are expressed as means ± SD ; \*  $P < 0.05$  HFSCD vs. CD , \*\*  $P < 0.01$  HFSCD vs. CD.

饮食是当代社会 2 型糖尿病发病率急剧升高的主要原因之一<sup>[1]</sup>。因此建立合适的动物模型来研究饮食对 2 型糖尿病及其肾脏并发症的影响和发病机制具有重要意义。

广西巴马小型猪是采用基础群内闭锁纯繁选育及半同胞为主的近交方式进行选育而成的基因高度纯合的小型猪品系,具有一致的头臀黑、躯干白的独特的“两头乌”表型<sup>[7,8]</sup>。而且,猪与人类在以下方面相似(1)猪是杂食动物,能吸收、消化人类食物<sup>[9]</sup>(2)食物的代谢,尤其脂质代谢与人相似<sup>[5,9]</sup>(3)最重要的是猪与人类的肾脏在解剖、生理和病理生理等特点上极为相似<sup>[4,10]</sup>。因此,广西巴马小型猪是非常适合于研究糖尿病肾病的模型动物。当前的研究是报道了高脂高糖高胆固醇导致广西巴马小型猪出现类似人类 2 型糖尿病的肾脏结构和功能的改变。

高脂高糖高胆固醇饲料喂养能导致巴马小型猪发生一系列的糖、脂代谢紊乱:血糖升高、血浆胰岛素浓度上升,OGTT 证实小型猪葡萄糖耐量减低,胰岛素敏感性降低,胰岛 β 细胞分泌

胰岛素功能下降,并出现血浆总胆固醇和甘油三酯明显升高。这些代谢异常与人类 2 型糖尿病特点类似<sup>[11]</sup>。

尿白蛋白是判断肾功能的主要指标之一,也是糖尿病肾病的主要诊断依据,计算单次晨尿标本中尿白蛋白/肌酐比值(albumin/creatinine ratio, ACR)是 24 h 尿白蛋白排泄率常用的替代检测方法<sup>[6]</sup>,文献报道微量白蛋白尿作为早期糖尿病肾病的主要指标,其 ACR 数值为 30 ~ 300 mg/g<sup>[12]</sup>。而检测血、尿中肌酐水平是判断肾功能衰竭的重要指标。本实验建立的小型猪糖尿病模型 ACR 升高,为(48.08 ± 11.77) mg/g,但血、尿中的肌酐无显著性升高。这说明巴马小型猪模型肾功能处于早期损伤阶段。

细胞外基质蓄积是糖尿病肾病的主要病理学特征之一<sup>[13,14]</sup>。本研究中, HFSCD 组小型猪肾脏 IV 型胶原和纤维连接蛋白在肾小球及肾小管-间质中的表达明显高于 CD 组,说明高脂高糖高胆固醇能促进细胞外基质成分的表达和蓄积。而二组动物肾脏未发现 I 型胶原表达,文献报道 I 型胶原仅在晚期肾脏纤维化中表

达<sup>[14]</sup> 这提示本模型肾脏病理改变尚处于早期。因此,高脂高糖高胆固醇喂养法建立的小型猪模型肾脏病变的特点为:早期肾功能改变,肾小球肥大或萎缩,肾小球系膜区增宽,胶原纤维增生,细胞外基质蛋白(Ⅳ型胶原和纤维连接蛋白)在肾小球的系膜区和肾小管-间质过度表达。这与人类糖尿病肾病的病变特点非常类似<sup>[12]</sup>,说明我们成功建立了一个新的 2 型糖尿病合并肾脏病变的动物模型。

高脂高糖高胆固醇所诱导的糖、脂代谢紊乱与肾脏病变有着极其密切的关系。葡萄糖能刺激肾小球系膜细胞、近曲小管上皮细胞和肾皮质成纤维细胞促进细胞外基质成分,如Ⅳ型胶原和纤维连接蛋白的基因表达及蛋白合成<sup>[15]</sup>。胰岛素能促进大鼠系膜细胞合成和分泌细胞外基质<sup>[16]</sup>。脂代谢紊乱是 DN 一种独立的损伤因素<sup>[17]</sup>,高饱和脂肪饮食诱发的高脂血症能导致肾小球内Ⅳ型胶原合成增加<sup>[18]</sup>。细胞外基质增加,肾小球系膜区增宽,胶原纤维增生可导致肾小球滤过屏障和肾小管功能受损,尿蛋白排出增多,葡萄糖重吸收减少,并促进肾小球硬化的形成。

总之,与目前常用的化学毒素,如链脲佐菌素和四氧嘧啶诱导的糖尿病模型相比,高脂高糖高胆固醇喂养广西巴马小型猪建立的 2 型糖尿病肾病动物模型,其优势在于本模型出现了高胰岛素血症和胰岛素抵抗,肾脏病变与人类 2 型糖尿病特点极为类似。因此,本模型是研究高脂高能量膳食的致病机制和糖尿病肾病发生、发展过程非常有价值的动物平台。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Lameire N. Diabetes and diabetic nephropathy-a worldwide problem. *Acta Diabetol* 2004 **41** :S3 ~ S5.
- [ 2 ] Janssen U,Phillips A O , Floege J. Rodent models of nephropathy associated with type II diabetes. *J Nephrol* ,1999 , **12** :159 ~ 172.
- [ 3 ] Larsen M O ,Rolin B. Use of the Göttingen minipig as a model of diabetes ,with special focus on type I diabetes research. *ILAR J* 2004 **45** ( 3 ) 303 ~ 313.
- [ 4 ] Samstein B ,Platt J. Physiologic and immunologic hurdles to xenotransplantation. *J Am Soc Nephrol* 2001 **12** :182 ~ 193.
- [ 5 ] Xi S ,Yin W ,Wang Z ,et al . A minipig model of high-fat/high-sucrose diet-induced diabetes and atherosclerosis. *Int J Exp Path* 2004 **85** :223 ~ 231.
- [ 6 ] Nathan D M ,Rosenbaum C , Protasowicki V D. Single-void urine samples can be used to estimate quantitative microalbuminuria. *Diabetes Care* ,1987 **10** :414 ~ 418.
- [ 7 ] 魏泓.我国小型猪研究的现状.中国实验动物学杂志,1997 **7** ( 4 ) 252 ~ 255.
- [ 8 ] 王爱德.广西巴马小型猪的选育研究.中国比较医学杂志 2004 **14** ( 3 ) :160.
- [ 9 ] Dixon J L ,Stoops J D ,Parker J L ,et al . Dyslipidemia and vascular dysfunction in diabetic pigs fed an atherogenic diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* ,1999 **19** :2 981 ~ 2 992.
- [ 10 ] Dobyán D C ,Bulger R E. Morphology of the minipig kidney. *J Electron Microscop Tech* ,1988 **9** ( 3 ) 213 ~ 234.
- [ 11 ] Porte D ,Sherwin R S ed. Ellenberg & Rifkin 's diabetes mellitus ,Fifth edition. New York :McGraw-Hill Companies , Inc. ,1998 :357 ~ 372.
- [ 12 ] Ruggenenti P ,Remuzzi G. Nephropathy of type-2 diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol* ,1998 **9** :2 157 ~ 2 169.
- [ 13 ] Remuzzi G , Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* ,1998 **339** :1 448 ~ 1 456.
- [ 14 ] Mason R M ,Wahab N A. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* ,2003 **14** :1 358 ~ 1 373.
- [ 15 ] Haneda M ,Koya D ,Isono M , et al . Overview of glucose signaling in mesangial cells in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003 **14** :1 374 ~ 1 382.
- [ 16 ] Abrass C K ,Spicer D , Raugi G J. Induction of nodular sclerosis by insulin in rat mesangial cells *in vitro* :studies of collagen. *Kidney Int* ,1995 **47** :25 ~ 37.
- [ 17 ] Kramer-Guth A ,Quaschnig T ,Greiber S ,et al . Potential role of lipids in the progression of diabetic nephropathy. *Clin Nephrol* ,1996 **46** :262 ~ 265.
- [ 18 ] Wei P ,Lane P H ,Lane J T ,et al . Glomerular structural and functional changes in a high-fat diet mouse model of early-stage type 2 diabetes. *Diabetologia* 2004 **47** :1 541 ~ 1 549.

## 图版说明

高脂高糖高胆固醇喂养 5 个月对广西巴马小型猪肾脏病理形态和细胞外基质表达的影响。

1. 与 CD 组(图 2)相比, HFSCD 组部分肾小球萎缩, 小球内细胞减少, 核浓染( H. E 染色, 黑色箭头所示); 3. 与 CD 组(图 4)相比, 肾小球系膜区增宽(红色箭头所示), 细胞外基质增多(绿色箭头所示), 胶原纤维增生( Masson 三色染色); 5. 与 CD 组(图 6)相比, IV 型胶原的免疫阳性染色(呈棕黄色, 下同)在肾小球、肾小管和间质内明显加深, 且阳性反应细胞数增多; 7. 与 CD 组(图 8)相比, 纤维连接蛋白在肾小球系膜区和肾小管上皮细胞的表达明显增加; 9、10. 二组动物肾脏无明显的 I 型胶原表达。

g: 表示肾小球(放大倍数均为  $\times 400$ , 标尺 =  $1\ 000\ \mu\text{m}$ )

## Explanation of Plate

Effects of five-month high-fat/high-sucrose/high-cholesterol feeding on the renal pathology and extracellular matrix expression in Guangxi Bama mini-pigs.

1. A few glomeruli ( g ) from the HFSCD group ( black arrow ) were atrophy with thick-dyeing nucleus and hypocellularity compared with the CD group ( plate I : 2 , H. E staining ); 3. Masson trichrome-staining in the kidneys of the HFSCD group showed overt increase in the mesangial area ( red arrow ), extracellular matrix accumulation ( green arrow ) and proliferation of collagen fiber ( plate I : 3 , blue dye ); 5. Immunoreactivity of type IV collagen ( brown staining , same as below ) showed a significant increase in the glomeruli ( g ) and tubulointerstitium of HFSCD pigs ( plate I : 5 ) in comparison with CD pigs ( plate I : 6 ); 7. Fibronectin was present in the normal mesangium ( plate I : 8 ) but obviously increased in the expanding mesangium and epithelial cells of tubules from HFSCD group ( plate I : 7 ); 9. There was no significant expression of type I collagen in HFSCD- and CD-fed mini-pigs ( plate I : 9 , 10 ). g : Original magnification ,  $\times 400$  , Bar =  $1\ 000\ \mu\text{m}$ .

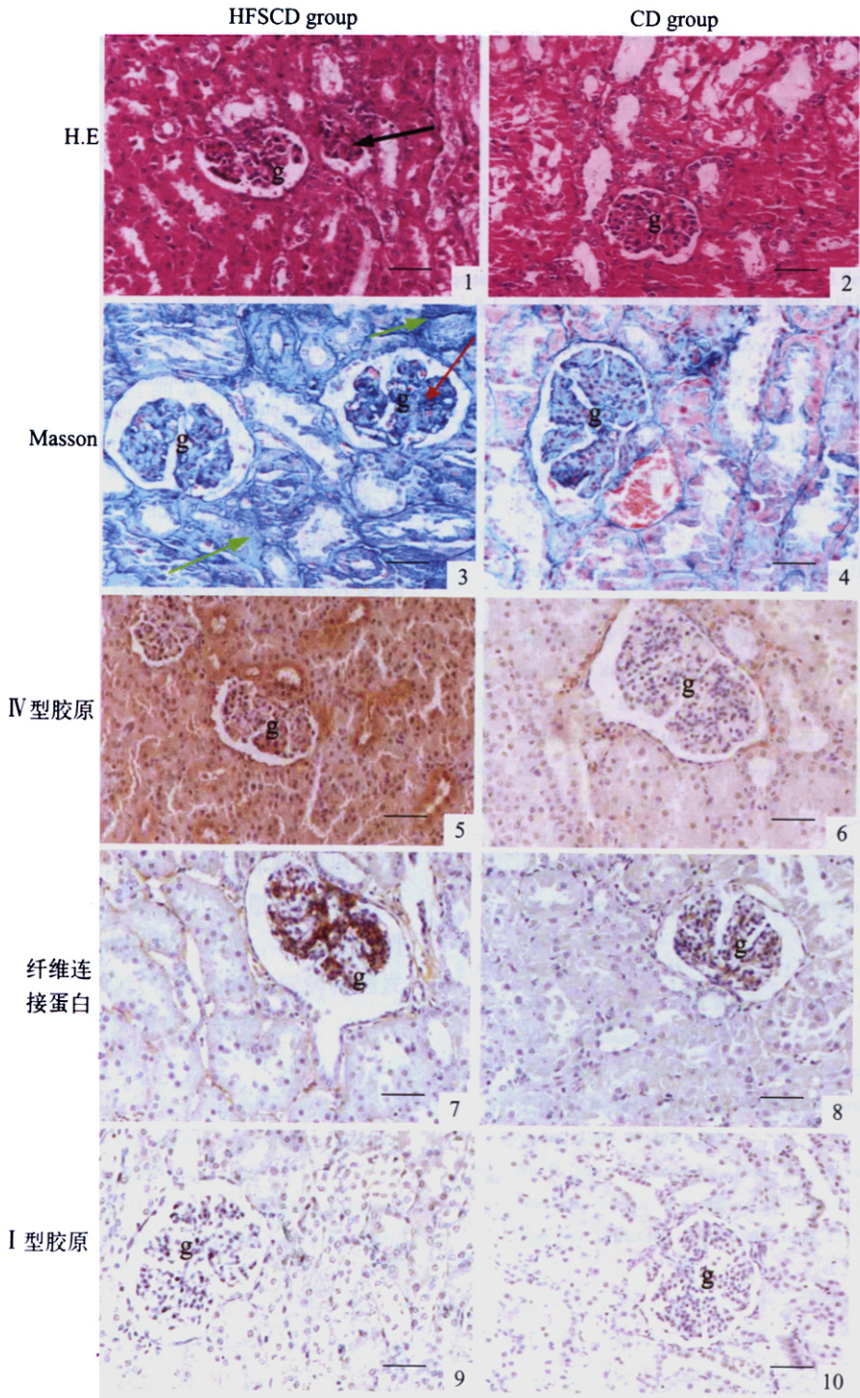
刘毅等: 高脂高糖高胆固醇饮食对小型猪肾脏细胞外基质表达的影响

图版 I

LIU Yi *et al.*: Differential Expression of Extracellular Matrix in the Kidneys of Diabetic

Mini-pigs Induced by High-fat/high-sucrose/high-cholesterol Diet

Plate I



图版说明见文后