

高糖高脂饮食对兔肾小管间质纤维化的影响

李宏光 蔡元菊 邹锦慧 敬美莲 刘毅*

(韶关学院医学院 韶关 512026)

摘要: 为研究高糖高脂饮食对新西兰兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 肾小管间质纤维化的影响, 将 20 只雄兔随机均分 2 组, 分别喂正常饲料 (对照组) 和高糖高脂饲料 (模型组), 每月测空腹血糖和甘油三酯 (TG), 5 个月后取尿液测尿糖、微量白蛋白 (mAlb) 和 N-乙酰 β -氨基葡萄糖苷酶 (NAG), H. E. VG 染色观察肾髓质病理改变, 计算肾小管间质纤维化指数 (TIF1) 和胶原纤维面积, 免疫组化测 IV 型胶原、纤维连接蛋白 (FN) 和转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 的蛋白表达。结果显示, 与对照组相比, 模型组血糖、TG、尿糖、mAlb 和 NAG 上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 肾小管间质肿胀, 炎症细胞浸润, 胶原纤维面积增加 ($22.47\% \pm 5.66\%$ vs $9.43\% \pm 3.03\%$, $P < 0.01$), TIF1 升高 (2.369 ± 0.6734 vs 0.6810 ± 0.2248 , $P < 0.01$); IV 型胶原、FN 和 TGF- β 1 的表达显著增加 ($P < 0.01$)。上述结果说明, 高糖高脂喂养兔 5 个月可导致肾小管、间质的结构和功能发生改变, 细胞外基质表达增加, 促进纤维化形成。

关键词: 新西兰兔; 高糖高脂饮食; 肾小管间质纤维化

中图分类号: Q954-33 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2010)01-145-06

The Effects of High-Sucrose and High-Fat Diet on Tubulointerstitial Fibrosis in New Zealand White Rabbits

LI Hong-Guang CAI Yuan-Ju ZOU Jin-Hui JING Mei-Lian LIU Yi*

(Medical College, Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong 512026 China)

Abstract To study the effects of high-sucrose and high-fat diet on tubulointerstitial fibrosis, male New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were randomly divided into two groups: the control group ($n = 10$, fed with normal chow) and the experimental model group ($n = 10$, fed with 37% sugar, 10% lard and 53% normal chow). The levels of fasting plasma glucose and triglyceride were tested once a month. Urinary glucose, microalbumin and N-acetyl β -glucosaminidase (NAG) were measured at the end of the 5th month. The tubulointerstitial fibrosis index (TIF1) and the area of collagen fiber were calculated in the renal medulla with HE or VG staining respectively. The protein expression of type IV collagen, fibronectin and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) were determined by immunohistochemical staining. Feeding high-sucrose and high-fat diet to rabbits markedly caused hyperglycaemia, hypertriglyceridemia, albuminuria, glucosuria and increased urinary NAG levels ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The edema, inflammatory cell infiltration and proliferation of collagen fiber were observed in tubulointerstitium of the experimental model group. The area of collagen fiber $22.47\% \pm 5.66\%$ and the grade of TIF1 2.369 ± 0.6734 were significantly higher in the experimental model group than those in the control group ($9.43\% \pm 3.03\%$ and 0.6810 ± 0.2248 , $P < 0.01$, respectively). The protein

基金项目 韶关学院医学院科研项目 (No. E06002), 韶关市医药卫生科研计划项目 (No. Y09070);

* 通讯作者, E-mail: kingliu519@hotmail.com;

第一作者介绍 李宏光, 女, 硕士; 研究方向: 实验动物模型; E-mail: lhongguang9884@gmail.com;

收稿日期: 2009-06-30 修回日期: 2009-11-16

expression of type IV collagen, fibronectin and TGF- β 1 was significantly increased in renal medulla of the experimental model group compared to that of the control group ($P < 0.01$). Thus, these results suggest that high sucrose and high-fat diet can injure the tubulointerstitial structure and function, increase the expression of extracellular matrix and accelerate the process of tubulointerstitial fibrosis in rabbits.

Key words New Zealand White Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*); High-sucrose and high-fat diet; Tubulointerstitial fibrosis

肾小管间质纤维化 (tubulointerstitial fibrosis, TIF) 是各种不同病因的慢性肾病进展到终末期肾功能衰竭的共同病变过程。对人类和实验动物模型进行的大量研究证明, TIF 在肾疾病转归中起主导作用, 其病变程度比肾小球损伤与肾功能减退的关系更为密切^[1-2]。然而 TIF 病因复杂, 临床病程漫长, 建立合适的动物模型非常具有研究价值。目前常见的实验性 TIF 动物模型包括单侧输尿管梗阻、单侧肾切除、药物诱导、免疫介导、放射损伤等方法。研究证实, 异常的饮食结构亦能造成肾病变。高胆固醇喂养单侧肾切除的大鼠 (*Rattus norvegicus*) 或猪 (*Sus scrofa*) 可致肾小管间质纤维化^[3-4], 高糖高脂高胆固醇饮食可引起新西兰兔 (*Oryctolagus cuniculus*)、巴马小型猪 (*S. domestica*) 肾小球结构损伤, 促进细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的表达, 形成肾小球硬化^[5-6]。高糖、高饱和脂肪饮食能否直接导致肾小管间质纤维化, 目前甚少报道。因此, 本研究采用高糖高脂饮食喂养新西兰兔, 观察肾髓质病理结构和 ECM 成分表达的改变, 研究该饮食对肾小管间质纤维化进程的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 雄性新西兰兔 20只, 体重 (2.06 ± 0.14) kg 购自南华大学实验动物学部, 生产许可证 SCXK(湘)2004-0009。单笼饲养 1周后, 随机分 2组, 10只饲以基础饲料作为对照组; 10只饲以高糖高脂饲料 (37%蔗糖、10%猪油混合 53%基础饲料) 作为模型组。每天喂食 100 g 饲料, 自由饮水。实验期 5个月, 期间观察新西兰兔的食量、体重、行为、状态、毛发等情况。

1.2 血液生化检测 每月末从禁食过夜的兔耳缘静脉取血, 肝素抗凝, BECKMAN LX20全自动生化仪上检测血糖、甘油三酯 (triglyceride, TG)。

1.3 肾功能检测 5个月后, 经麻醉从膀胱穿刺取尿, 免疫透射比浊法测尿微量白蛋白 (microalbumin, mAlb), 己糖激酶法测尿糖 (上述试剂盒购自上海名典公司), PNP 两点终止法测 N-乙酰 β -氨基葡萄糖苷酶 (N-acetyl- β -glucosaminidase, NAG, 试剂盒购自南京建成公司), Jaffe 反应速率法测血浆肌酐 (creatinine, Cr, 试剂盒购自北京九强公司)。

1.4 组织病理学检测与分析 取尿后, 颈动脉放血处死动物, 分离肾髓质, 10% 中性甲醛固定, 石蜡包埋切片, H. E 染色观察组织结构改变。每张切片随机选取 10个低倍视野 ($\times 200$), 参照 Maric 等的半定量积分法^[7], 根据肾小管间质病变所占面积分为 0~4级, 0表示无病变; 1表示受损面积为 1% ~ 10% (轻微病变); 2为 11% ~ 25% (中度病变); 3为 26% ~ 75% (重度病变); 4为 76% ~ 100% (严重病变), 计算肾小管间质纤维化指数 (tubulointerstitial fibrosis index, TFI)。肾小管间质病变是指肾小管空泡样变或萎缩, 炎症细胞浸润, ECM 过度蓄积^[7]。

VG (Van Gieson) 染色观察纤维化情况, 每张切片随机选取 10个低倍视野, Polaroid 公司 PIPS-2020 病理图像系统计算胶原纤维面积 (即红染区域) 百分比。

1.5 免疫组织化学检测与分析 采用福州迈新公司的 ELV ison 二步法非生物素检测体系进行免疫组织化学染色, IV型胶原、纤维连接蛋白和转化生长因子 β 1 (transforming growth

factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 多抗购自武汉博士德公司, 抗体稀释度均为 1:100 操作步骤按试剂盒说明书进行。每张切片随机取 5 个低倍视野, 采用病理图像系统测定光密度值 (optical density value OD), 计算相对光密度值 (relative optical density value ROD), 即 (阳性染色 OD - 背景 OD) / 背景 OD, 作为 3 种蛋白的相对表达量。

1.6 统计方法 SPSS 软件统计分析实验数据, 以 Mean \pm SD 表示。T F I 的组间比较用 W ilcoxon 秩和检验, 其他数据比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 一般状况 对照组动物健康状况良好, 饮

食正常, 体重随时间增长, 无死亡。模型组动物随饲养时间的延长, 精神变差, 活动少, 毛色黯淡, 体重先增后减, 期间 3 只兔死亡。

2.2 空腹血糖和甘油三酯 如图 1 所示, 与对照组相比, 模型组空腹血糖水平从第 3 个月末始明显升高, 此后持续上升, 第 5 个月末高达 (11.71 \pm 3.42) mmol/L, 是对照组的 1.88 倍 ($P < 0.01$)。模型组血浆 TG 水平于第 1 月即见明显升高, 第 5 个月末最高达 (4.67 \pm 1.46) mmol/L, 是对照组的 3.41 倍 ($P < 0.01$)。

2.3 肾功能 如表 1 所示, 喂养高糖高脂饲料 5 个月后, 新西兰兔尿糖、m A l b 和 N A G 水平明显上升, 而肌酐浓度无升高 ($P > 0.05$)。

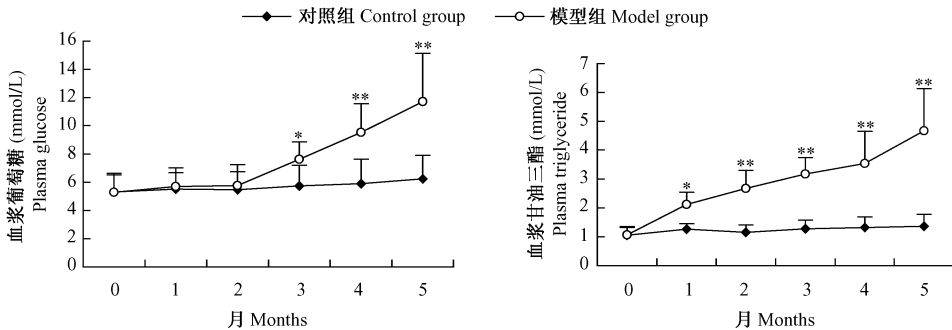


图 1 高糖高脂饮食对新西兰兔空腹血糖、甘油三酯的影响

Fig 1 Effects of high-sucrose and high-fat diet on fasting plasma glucose and triglyceride in New Zealand White Rabbits

与对照组相比 Model group vs control group * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

表 1 高糖高脂饮食对新西兰兔肾功能的影响 (Mean \pm SD)

Table 1 Effects of high-sucrose and high-fat diet on renal function in New Zealand White Rabbits

分组 G group	例数 Num ber	尿糖	尿微量白蛋白	尿 N-乙酰 β - 氨基葡萄糖苷酶	血浆肌酐
		U rinary gl u cose (mm ol/L)	U rinary m icroalbum in (mg /L)	U rinary NAG (U /L)	Plas m a Cr (μ m ol/L)
对照组 Control group	10	0.16 \pm 0.05	28.27 \pm 3.54	1440.37 \pm 237.68	26.67 \pm 4.51
模型组 Model group	7	0.31 \pm 0.04 [*]	48.87 \pm 5.67 [*]	2766.05 \pm 264.73 [*]	26.51 \pm 4.64

与对照组比较 Model group vs control group * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

2.4 肾髓质病理结构 新西兰兔 H. E 染色的组织切片中, 模型组 (图版 I: 1) 与对照组 (图版 I: 2) 相比, 肾小管上皮细胞空泡样变性, 管腔明显扩张, 腔内可见蛋白管型; 肾间质水肿, 炎

症细胞浸润, 纤维状细胞和胶原纤维显著增生。在 VG 染色的切片中胶原纤维呈红色, 模型组 (图版 I: 3) 与对照组 (图版 I: 4) 相比, 胶原纤维明显增生, 呈灶状分布, 面积为 22.47% \pm

5.66%, 与对照组 9.43% \pm 3.03% 相比显著增加 ($P < 0.01$)。模型组 TFI 为 2.369 0 \pm 0.673 4 比对照组的 0.681 0 \pm 0.224 8 明显升高 ($P < 0.01$)。

模型组 (图版 I: 5) 与对照组 (图版 I: 6) 相比, IV 型胶原的免疫阳性染色呈棕黄色, 在肾小管基底膜和间质内明显加深, 阳性细胞数增多, ROD 升高 (模型组 0.444 9 \pm 0.058 8 *vs* 对照组 0.289 7 \pm 0.038 0 $P < 0.01$)。模型组纤维连接蛋白 (图版 I: 7) 在肾小管上皮细胞内的表达亦明显增加 (ROD 0.303 6 \pm 0.046 3), 而对照组 (图版 I: 8) 仅有少量表达 (ROD 0.163 7 \pm 0.034 0 $P < 0.01$)。模型组 (图版 I: 9) 肾小管和间质内的 TGF- β 1 蛋白的表达 (ROD 0.396 9 \pm 0.065 8) 比对照组 (图版 I: 10) 显著增加 (ROD 0.252 3 \pm 0.030 8 $P < 0.01$)。

3 讨论

肾小管间质纤维化是各种肾病进展至终末期肾功能衰竭的共同通路, 本质是 ECM 在肾小管和间质中异常堆积, 导致肾组织结构破坏和有效肾单位丧失。IV 型胶原是肾小管基底膜的主要组分, 纤维连接蛋白是 ECM 中的非胶原糖蛋白, 与 IV 型胶原结合形成基底膜的骨架^[8]。本研究中, IV 型胶原和纤维连接蛋白在对照组肾小管上皮细胞少量表达, 而模型组中不仅肾小管上皮细胞表达明显增多, 而且间质中亦出现不同程度的表达。模型组胶原纤维面积为 22.47% \pm 5.66%, TFI 升高达 2.369 \pm 0.673 4 呈中度以上病变。这说明高糖高脂饮食能增强兔肾小管间质中 ECM 的表达和蓄积, 促进其纤维化的形成。

目前公认 TGF- β 1 是最重要的致纤维化细胞因子, 不仅可直接刺激 IV 型胶原和纤维连接蛋白等 ECM 成分的合成与分泌, 促进其与细胞的粘连和沉积, 还可抑制其降解, 从而加快纤维化的发生发展^[9-10]。本研究发现模型组 TGF- β 1 的表达增加, 这表明高糖高脂饮食可通过促进肾小管间质中 TGF- β 1 的表达而增加 ECM 的积聚。

高糖高脂饮食除了能促进 ECM 的蓄积, 破坏肾小管间质的结构外, 还能对其功能造成影响。本实验中模型组出现尿 mA lb 和尿糖明显升高, 意味着肾小球滤过功能受损和肾小管上皮细胞重吸收功能障碍。NAG 是一种位于溶酶体内的酸性水解酶, 存在于所有组织中, 尤以近曲小管上皮细胞中含量高, 可随溶酶体释放到尿液中, 此酶在尿中稳定。因肾小球不能滤过 NAG, 故临床上已将尿 NAG 排泄量作为诊断肾小管损害敏感而可靠的早期指标^[11]。本实验中模型组新西兰兔尿糖、mA lb 和 NAG 水平显著升高, 但血肌酐无明显上升, 这说明兔肾小管的功能损伤尚处于早期阶段。

目前认为肾小管间质纤维化涉及细胞、细胞因子、炎症介质等诸多因素之间相互作用, 导致 ECM 代谢失衡, 在肾小管和间质异常积聚所致。本实验用高糖高脂饮食诱导新西兰兔出现中度肾小管间质纤维化的机制可能为: 由于新西兰兔对外源性脂肪吸收率高且清除能力低, 进食高饱和脂肪一个月后即出现高甘油三酯血症; 长期摄入葡萄糖可破坏兔胰岛的结构, 造成胰岛素抵抗, 因此出现空腹血糖升高^[5]。外源性高糖、高脂血症, 具有肾毒性, 损伤肾小管, 并引起炎症细胞浸润^[1, 12-13]。继之, 多种具有促纤维化作用的可溶性细胞因子 (如 TGF- β 1 等) 释放, 间质成纤维细胞激活和肾小管上皮细胞表型转化, 生成肌成纤维细胞, 后者合成大量的 ECM 成分, 破坏 ECM 合成和降解的动态平衡, 导致 ECM 成分积聚, 促进肾小管间质纤维化的形成, 而纤维化的程度预示着肾功能受损的严重性^[8-9]。

综上所述, 长期进食富含糖及饱和脂肪的高热量饮食会导致外源性血糖、甘油三酯升高, 作用于肾组织细胞, 产生糖、脂肾毒性, 其肾小管间质的病变特点为: 促纤维化因子 TGF- β 1 的表达明显增加, 细胞外基质蛋白 (IV 型胶原和纤维连接蛋白) 蓄积, 胶原纤维增生, 间质炎症细胞浸润, 并出现早期肾小管功能损害。这些特征与人类肾小管间质纤维化的病变特点相似^[8], 因此本模型能较好地反映糖、脂代谢异

常与肾小管间质纤维化的关系, 为研究饮食治疗或降糖、降脂药物延缓肾小管间质纤维化的进展提供了一个良好的平台。

参 考 文 献

- [1] Becker G J, Hewitson T D. The role of tubulointerstitial injury in chronic renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000 9(2): 133- 138.
- [2] Eitner F, Feige J. Novel insights into renal fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003 12(3): 227- 232.
- [3] Eddy A A. Interstitial inflammation and fibrosis in rats with diet induced hypercholesterolemia. *Kidney Int* 1996 50(4): 1139- 1149.
- [4] Chade A R, Mushin O P, Zhu X, et al. Pathways of renal fibrosis and modulation of matrix turnover in experimental hypercholesterolemia. *Hypertension* 2005 46(4): 772- 779.
- [5] 刘毅, 张弛, 肖俊霞, 等. 高糖高脂高胆固醇致兔糖、脂代谢紊乱和胰、肝、肾组织结构的变化. *实验动物与比较医学*, 2005 25(3): 151- 156.
- [6] 刘毅, 李勤凯, 蔡曼波, 等. 高脂高糖高胆固醇饮食对小模型猪肾脏细胞外基质表达的影响. *动物学杂志*, 2006, 41(6): 41- 48.
- [7] Maric C, Sandberg K, Hinojosa-Laborde C. Glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis are attenuated with 17 β -estradiol in the aging Dahl salt sensitive rat. *J Am Soc Nephrol* 2004 15(6): 1546- 1556.
- [8] 李才. 器官纤维化——基础与临床. 北京: 人民卫生出版社, 2003, 93- 135.
- [9] Razzaque M S, Taguchi T. Cellular and molecular events leading to renal tubulointerstitial fibrosis. *Med Electron Microsc* 2002, 35(2): 68- 80.
- [10] Böttinger E P. TGF- β in renal injury and disease. *Semin Nephrol* 2007, 27(3): 309- 320.
- [11] Bazzi C, Petrini C, Rizza V, et al. Urinary N-acetyl β -glucosaminidase excretion is a marker of tubular cell dysfunction and a predictor of outcome in primary glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2002 17(11): 1890- 1896.
- [12] Gilbert R E, Cooper M E. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury? *Kidney Int* 1999 56(5): 1627- 1637.
- [13] Abrass C K. Cellular lipid metabolism and the role of lipids in progressive renal disease. *Am J Nephrol* 2004 24(1): 46- 53.

图 版 说 明

1. 模型组, H. E. 肾小管上皮细胞空泡样变性, 粗箭头示纤维状细胞和胶原纤维, 细箭头示炎症细胞浸润; 2. 对照组, H. E. 肾小管、间质形态正常; 3. 模型组, VG 染色: 可见明显红染的胶原纤维, 粗箭头示胶原纤维, 细箭头示炎症细胞浸润; 4. 对照组, VG 染色: 可见少量红染的胶原纤维; 5. 模型组, IV型胶原免疫组化染色: 肾小管基底膜和间质内可见强阳性的棕黄色染色; 6. 对照组, IV型胶原免疫组化染色: 肾小管基底膜和间质内仅见弱阳性的浅棕黄色染色; 7. 模型组, 纤维连接蛋白免疫组化染色: 肾小管上皮细胞内可见明显的棕黄色阳性染色; 8. 对照组, 纤维连接蛋白免疫组化染色: 肾小管上皮细胞内仅见浅棕黄色阳性染色; 9. 模型组, 转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 免疫组化染色: 肾小管和间质细胞内可见明显的棕黄色阳性染色; 10. 对照组, TGF- β 1 免疫组化染色: 肾小管和间质细胞内仅见浅棕黄色阳性染色。 $\times 200$ 标尺 = 100 μ m

Explanation of Plate

1. Showing the edema of the epithelial cells of tubules proliferation of fiber cell and collagen fiber (thick arrows) as well as inflammatory cell infiltration (thin arrows) in the renal medulla of the model group (H. E. staining); 2. Normal histology in the renal medulla of the control group (H. E. staining); 3. Showing proliferation of collagen fiber (thick arrows red dyeing) and inflammatory cell infiltration (thin arrows) in the renal medulla of the experimental model group (VG staining); 4. Weak red dyeing of collagen fiber in the renal medulla of the control group (VG staining); 5. Strong immunoreactivity of type IV collagen (brown staining same as below) in the tubular basement membrane and interstitium of the model group. 6. Poor immunoreactivity of type IV collagen in the tubular basement membrane and interstitium of the control group. 7. Obvious immunohistochemical staining of fibronectin in the epithelial cells of tubules from the model group with immunohistochemical staining. 8. Weak immunohistochemical staining of fibronectin in the epithelial cells of tubules from the control group. 9. Obvious immunohistochemical staining of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) in the tubulointerstitium of the experimental model group. 10. Weak immunohistochemical staining of TGF- β 1 in the tubulointerstitium of the control group. $\times 200$, Bar = 100 μ m.

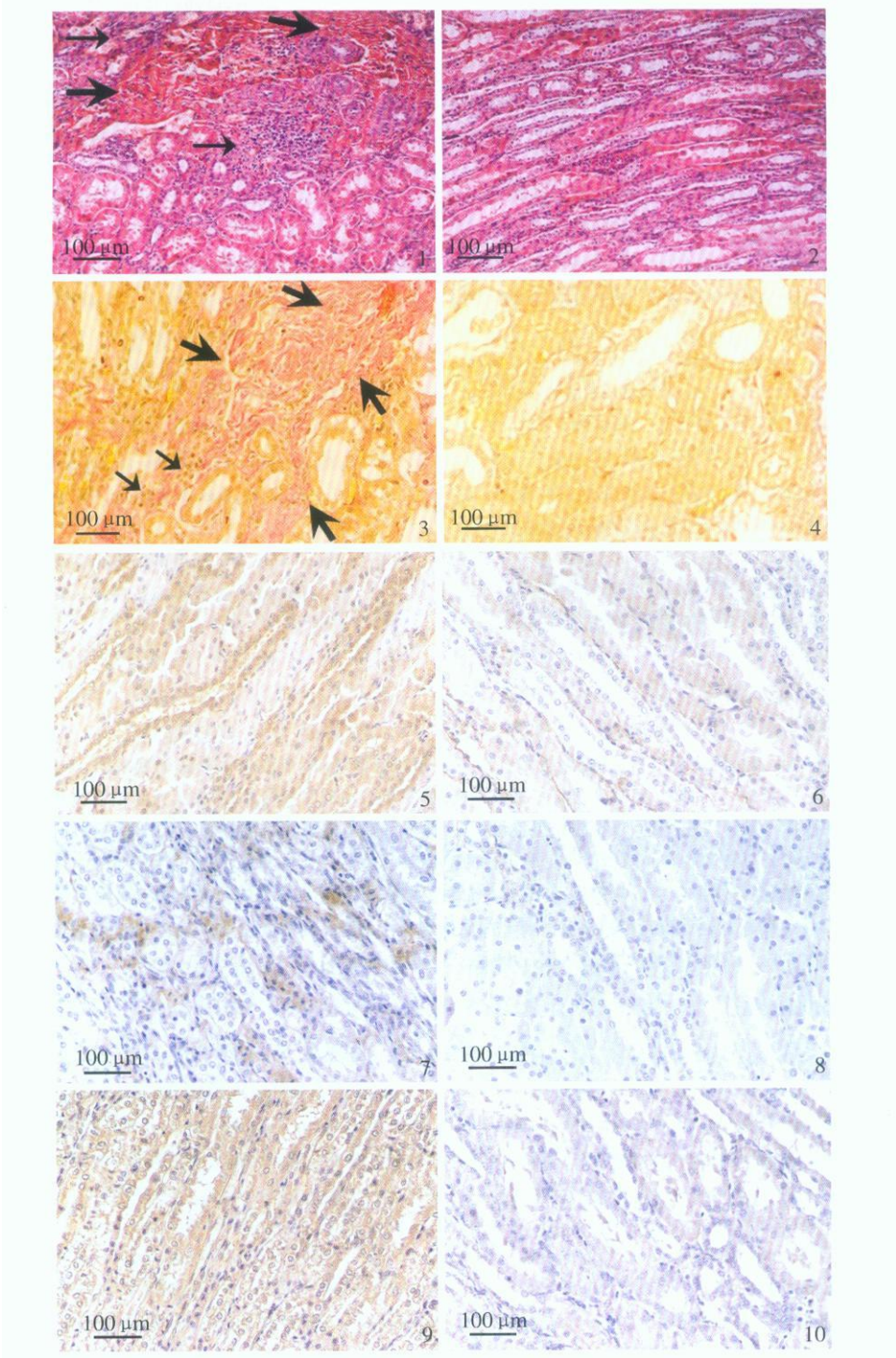
李宏光等: 高糖高脂饮食对兔肾小管间质纤维化的影响

图版 I

LI Hong-Guang *et al*: The Effects of High-Sucrose and High-Fat Diet on

Tubulointerstitial Fibrosis in New Zealand White Rabbits

Plate I



图版说明见文后