

基于 ROS-NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡探究利拉鲁肽对糖尿病肾病大鼠肾损伤的保护作用

王卓怡, 陆筱波*

张家港市中医医院 药学部, 江苏 张家港 215600

摘要: **目的** 探究利拉鲁肽对糖尿病肾病大鼠的作用及其调控机制。**方法** 采取多次小剂量 ip 链脲佐菌素 40 mg/kg 构建糖尿病肾病大鼠模型, 分为模型组、利拉鲁肽组、活性氧簇 (ROS) 抑制剂 (NAC) 组、利拉鲁肽+NAC 组, 另设置对照组, 每组 10 只。利拉鲁肽组大鼠 sc 200 μ g/(kg·d) 的利拉鲁肽; NAC 组大鼠 ip 20 mg/(kg·d) 的 NAC; 利拉鲁肽+NAC 组大鼠 sc 200 μ g/(kg·d) 的利拉鲁肽的同时 ip 20 mg/(kg·d) 的 NAC; 对照组和模型组大鼠 sc 等量的生理盐水, 1 次/d, 连续治疗 4 周。全自动分析仪检测 24 h 尿微量蛋白排泄率 (MAER); 血糖仪测定空腹血糖 (FBG); 试剂盒检测血清肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN) 水平; HE 染色、Masson 染色观察肾组织病理变化; 二氢乙锭 (DHE) 荧光探针检测肾组织活性氧 (ROS) 水平; 化学比色法检测肾组织丙二醛 (MDA) 含量、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性; Western blotting 检测肾组织 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体和焦亡相关蛋白表达。**结果** 与模型组相比, 利拉鲁肽组和 NAC 组大鼠 MAER、Scr、BUN、FBG 均显著降低 ($P < 0.05$); 肾组织 ROS、MDA 含量显著降低, GSH、SOD 活性升高 ($P < 0.05$); NLRP3 炎症小体相关蛋白 [NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、Caspase-1] 和焦亡相关蛋白 [cleaved-Caspase-1、GSDMD-N、白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-18] 表达均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。与利拉鲁肽组相比, 利拉鲁肽+NAC 组上述指标均得到进一步改善, 肾组织病理损伤进一步减轻。**结论** 利拉鲁肽能够通过 ROS-NLRP3 炎症小体途径抑制肾组织氧化应激介导的 NLRP3 炎症小体活化, 从而抑制细胞焦亡, 并最终发挥抗糖尿病肾病肾损伤作用。

关键词: 利拉鲁肽; 糖尿病肾病; 活性氧簇-NOD 样受体蛋白 3; 细胞焦亡; 凋亡相关斑点样蛋白

中图分类号: R977 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)09-2126-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.09.003

Explore the protective effect of liraglutide on renal injury in diabetic nephropathy rats based on ROS-NLRP3 inflammasome-mediated pyrodeath

WANG Zhuo-yi, LU Xiao-bo

Department of Pharmacy, Zhangjiagang Traditional Chinese Medicine Hospital, Zhangjiagang 215600, China

Abstract: Objective To investigate the effect of liraglutide on diabetic nephropathy in rats and its regulatory mechanism. **Methods** The diabetic nephropathy rat model was constructed with multiple low-dose streptozocin 40 mg/kg, and was divided into model group, liraglutide group, ROS inhibitor (NAC) group, liraglutide + NAC group, and control group, with 10 rats in each group. Liraglutide group rats sc 200 μ g/(kg·d) liraglutide, NAC group rats ip 20 mg/(kg·d) NAC, liraglutide + NAC group was sc 200 μ g/(kg·d) of liraglutide and ip 20 mg/(kg·d) of NAC. Rats in control group and model group were treated with sc equal amount of normal saline once daily for 4 weeks. 24 h MAER was measured by automatic analyzer. FBG was measured by glucose meter. Scr and BUN levels were detected with the kit. The pathological changes of renal tissue were observed by HE staining and Masson staining. DHE fluorescent probe was used to detect ROS in renal tissue. The content of MDA and the activities of GSH and SOD were detected by chemical colorimetry. Expression of NLRP3 inflammasome and pyroptosis related protein were detected by Western blotting. **Results** Compared with model group, MAER, Scr, BUN and FBG in liraglutide group and NAC group were significantly decreased ($P < 0.05$). The contents of ROS and MDA in renal tissue were significantly decreased, while the activities of GSH and SOD were increased ($P < 0.05$). Expressions of NLRP3 inflammasome-associated proteins (NLRP3, ASC, Caspase-1) and pyro related proteins (cleaved Caspase-1, GSDMD-N, IL-1 β , IL-18) were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01). Compared with liraglutide group, the above indexes were further improved in liraglutide + NAC group, and the pathological injury of kidney tissue was further alleviated. **Conclusion**

收稿日期: 2023-07-25

作者简介: 王卓怡, 女, 主管药师, 研究方向为糖尿病心血管疾病发生机制及其治疗。E-mail: wangzhuoyi1987011@163.com

*通信作者: 陆筱波, 女, 主管药师, 研究方向为糖尿病中西医结合治疗, E-mail: 445433800@qq.com

Liraglutide can inhibit the activation of NLRP3 inflammasome mediated by oxidative stress in renal tissue through ROS-NLRP3 inflammasome pathway, thereby inhibiting pyroptosis, and finally playing an anti diabetic nephropathy renal injury role.

Key words: liraglutide; diabetic nephropathy; ROS-NLRP3; pyroptosis; ASC

糖尿病肾病是糖尿病患者最为常见的并发症之一，也是介导慢性肾病和终末期肾衰竭的主要原因^[1]。流行病学调查显示，全球有 30%~40% 的糖尿病患者会因为病情的迁延而进展至糖尿病肾病，其中伴有终末期肾脏病患者的 5 年生存率 < 20%^[2]。因此，延缓糖尿病肾病进展对于改善糖尿病患者生存质量具有重大意义。糖尿病肾病发病机制复杂可能与慢性炎症、氧化应激、糖脂代谢紊乱及血流动力学异常相关^[3-4]。研究表明，持续性的炎症反应是导致糖尿病肾病病情进展的关键因素^[5-6]。细胞焦亡是近年来发现的一种与炎症反应密切相关的新型程序性细胞死亡方式，可由 Caspase-1 依赖性经典细胞焦亡途径和 Caspase-4/5/11 依赖性非经典细胞焦亡途径触发，导致细胞肿胀及内容物释放，从而诱发炎症级联反应^[7]。研究已证实，以 Caspase-1 介导经典细胞焦亡途径在糖尿病肾病中被广泛性研究，NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体、Caspase-1 及其下游靶标分子消皮素 D(GSDMD)是介导经典细胞焦亡发生的关键^[8]。活性氧簇(ROS)除了是介导氧化应激反应的关键调控因子外，也是 NLRP3 炎症小体活化的上游启动因子，能够诱导 NLRP3 炎症小体活化，促进炎症因子成熟及分泌，从而诱导细胞焦亡^[9]。因此，以 Caspase-1 介导的细胞焦亡为靶标，通过干预 ROS-NLRP3 炎症小体途径将为糖尿病肾病防治提供新的治疗策略和干预靶点。

利拉鲁肽是一种长效的胰高血糖素样肽-1(GLP-1)受体激动剂^[10]。研究发现，利拉鲁肽除具有良好的降血糖作用外，还具有抑制氧化应激反应和减轻机体炎症等作用^[11-12]。马秀琦等^[13]研究发现，利拉鲁肽能够通过抑制 NLRP3 炎症小体活化，降低炎症因子释放，改善糖尿病肾病大鼠损伤。但目前有关利拉鲁肽对糖尿病肾病细胞焦亡的作用尚未见相关报道。本研究拟通过构建糖尿病肾病大鼠模型，从 ROS-NLRP3 炎症小体途径，阐明利拉鲁肽对糖尿病肾病细胞焦亡的作用，旨在为利拉鲁肽临床治疗糖尿病肾病提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性，SPF 级，SD 大鼠，周龄 6 周，体质量 (200±10) g，购自于北京维通利华实验动

物技术有限公司[SCXK(京)2019-0017]。所有大鼠均放置于清洁级实验动物房内饲养，动物房内温度 (25±2) °C，环境相对湿度 55%~65%，12 h/12 h 昼夜交替光照，适应性喂养 1 周。本动物实验符合替代、减少、优化基本原则，且经过本院实验动物伦理委员会审批 (批号 LLSC2020-10-002)。

1.1.2 主要试剂 利拉鲁肽注射液 (诺和诺德公司，批号 202106ABV1，规格 3 mL: 18 mg/支); 链脲佐菌素 (STZ，美国 Sigma 公司，批号 S1030); N-乙酰半胱氨酸 (NAC，英国 Abcam 公司，批号 ab143032); 血清肌酐 (Scr)、血尿素氮 (BUN) 检测试剂盒 (美国 Sigma 公司，批号 MAK080、MAK006); 丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH) (南京建成生物工程研究所，批号 A003-1-2、A001-1-3、A005-1-2); 二氢乙锭 (DHE) 染色液 (美国 Santa Cruz 公司，批号 sc-204724A); 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司，批号 G1120); Masson 染色检测试剂盒 (武汉塞维尔生物科技有限公司，批号 G1006); BCA 蛋白质浓度检测试剂盒、山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗、ECL 发光液、β-actin 一抗 (碧云天生物技术，批号 P0009、A0208、A0216、P0018S、AF5001); NLRP3 一抗、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 一抗、Caspase-1 一抗、GSDMD 一抗、白细胞介素 (IL)-1β 一抗、IL-18 一抗 (美国 Cell Signaling Technology，批号 15101、67824、83383、39754、12242、57058)。

1.1.3 主要仪器 Cobas c702 全自动生化分析仪 (德国 Roch 公司); BX53 光学显微镜 (日本 Olympus 公司); BX43 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 1730R 高速冷冻离心机 (上海贝晶生物技术公司); GelDoc XR+凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司); Rt2100c 多功能酶标仪 (美国 Rayto 公司)。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病肾病模型构建、分组及给药 将 60 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周，随机分为对照组 10 只和模型组 50 只。采用多次小剂量 ip STZ 40 mg/kg，连续 5 d 构建糖尿病大鼠模型，注射 3 d 后连续 3 d 空腹血糖值均 ≥ 16.7 mmol/L，则判定糖尿病大鼠模型构建成功^[14]。定期进行血糖检测，剔除血糖缓解

者, 饲养 4 周后检测糖尿病大鼠 24 h 尿蛋白水平, 若尿蛋白定量 ≥ 30 mg, 且尿糖为阳性者, 则判定糖尿病肾病大鼠模型构建成功^[15]。造模过程中, 大鼠死亡 2 只, 造模失败 2 只, 共计 46 只大鼠造模成功。从造模成功大鼠中随机选取 40 只分为模型组、利拉鲁肽组、ROS 抑制剂 (NAC) 组、利拉鲁肽 + NAC 组, 每组各 10 只。利拉鲁肽组大鼠 sc 200 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 的利拉鲁肽^[13]; NAC 组大鼠 ip 20 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 的 NAC; 利拉鲁肽 + NAC 组大鼠 sc 200 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 的利拉鲁肽的同时 ip 20 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 的 NAC; 对照组和模型组大鼠 sc 等量的生理盐水, 1 次/d, 连续治疗 4 周。治疗 4 周后, 收集大鼠 24 h 尿液、肾组织及血液进行后续实验研究。

1.2.2 生化指标检测 收集各组大鼠 24 h 尿液, 测定尿微量蛋白排泄率 (MAER); 空腹尾静脉采血, 血糖仪测定空腹血糖 (FBG), 检验试剂盒测定 Scr、BUN 水平。

1.2.3 肾组织病理形态学观察 取适量肾组织, 除去被膜, 4% 多聚甲醛固定 48 h, 经脱水、石蜡包埋、切片后, 分别进行 HE 染色和 Masson 染色, 通过光学显微镜下观察肾组织病理学变化并采集图像。

1.2.4 肾组织氧化应激指标检测 取出液氮中冻存的肾组织, 称取 1 g 肾组织采用预冷的生理盐水将其充分碾磨制备成 10% 的组织匀浆, 化学比色法检测肾组织 MDA 含量及 SOD 和 GSH 活性。

1.2.5 肾组织 ROS 含量检测 取出固定好的肾组织, 常规方式制备成石蜡切片, 于避光条件下将组织切片置于 DHE (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 溶液中孵育 20 min, PBS 溶液清洗切片 3 次, 荧光显微镜下观察各组大鼠肾组织细胞红色荧光情况, 并通过 Image Pro Plus 6.0 软件进行 ROS 荧光强度半定量检测。

1.2.6 Western blotting 检测肾组织 NLRP3 炎症小体和焦亡相关蛋白表达 取适量的肾组织加入蛋

白裂解液进行组织匀浆, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液即为总蛋白, BCA 法测定蛋白质浓度, 蛋白质变性后进行凝胶电泳, 每个泳道上样蛋白为 30 μg , SDS-PAGE 凝胶电泳后, 行湿转膜只 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 60 min, TBST 洗膜, 加入一抗 NLRP3 (1 : 1 000)、ASC (1 : 500)、Caspase-1 (1 : 500)、GSDMD (1 : 1000)、IL-1 β (1 : 500)、IL-18 (1 : 500)、 β -actin (1 : 5 000), 4 $^{\circ}\text{C}$, 孵育过夜; TBST 洗膜, 加入山羊抗兔或山羊抗鼠二抗 (1 : 5 000), 室温下, 孵育 60 min, TBST 洗膜, 滴加显影液对目的蛋白进行可视化处理, 并采用 Image Pro Plus 6.0 软件进行蛋白质条带灰度值半定量分析。

1.3 统计学分析

Graphpad prism 6.0 软件进行统计学数据处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据满足正态分布且方差齐性, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 利拉鲁肽对糖尿病肾病大鼠空腹血糖及肾功能生化指标的影响

与对照组大鼠相比, 模型组大鼠 FBG、24 h 尿液 MAER、血清 Scr、BUN 水平均显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 利拉鲁肽组和 NAC 组大鼠的 24 h 尿液 MAER、血清 Scr、BUN 水平均显著降低 ($P < 0.05$)。与利拉鲁肽组相比, 利拉鲁肽 + NAC 组大鼠的 24 h 尿液 MAER、血清 Scr、BUN 水平均显著降低 ($P < 0.05$), 而 FBG 水平无显著性变化, 见表 1。

2.2 利拉鲁肽对糖尿病肾病大鼠肾组织病理形态学的影响

对照组大鼠肾组织肾小球无明显的肥大增生等病理改变。与对照组相比, 模型组大鼠肾组织肾

表 1 各组大鼠空腹血糖及肾功能生化指标比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Comparison of FBG and biochemical indicators of renal function in each group of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1})$	FBG/ (mmol L^{-1})	24 h MAER/ μg	Scr/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	BUN/ (mmol L^{-1})
对照	—	4.20 \pm 0.65	12.68 \pm 4.02	8.98 \pm 1.78	6.75 \pm 0.28
模型	—	29.88 \pm 3.17*	158.12 \pm 30.10*	26.12 \pm 4.51*	15.44 \pm 2.01*
利拉鲁肽	200	11.24 \pm 2.01#	67.49 \pm 12.01#	17.46 \pm 3.35#	10.81 \pm 1.04#
NAC	2.0 \times 10 ⁴	28.97 \pm 3.65	82.88 \pm 10.48#	18.71 \pm 3.17#	12.33 \pm 1.16#
利拉鲁肽 + NAC	200 + 2.0 \times 10 ⁴	11.87 \pm 1.98#	41.91 \pm 8.11#&	11.41 \pm 2.51#&	8.14 \pm 0.62#&

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与利拉鲁肽组比较: & $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs liraglutide group

小球肥大、增生、肾小管基底膜增厚及系膜基质增多明显。与模型组相比,利拉鲁肽组、NAC 组、利拉鲁肽+NAC 组大鼠肾组织肾小球肥大、增生,系

膜扩张和系膜基质增多等病理改变均得到明显改善。与利拉鲁肽组相比,利拉鲁肽+NAC 组大鼠肾组织形态和结构病理改变更为显著,见图 1。

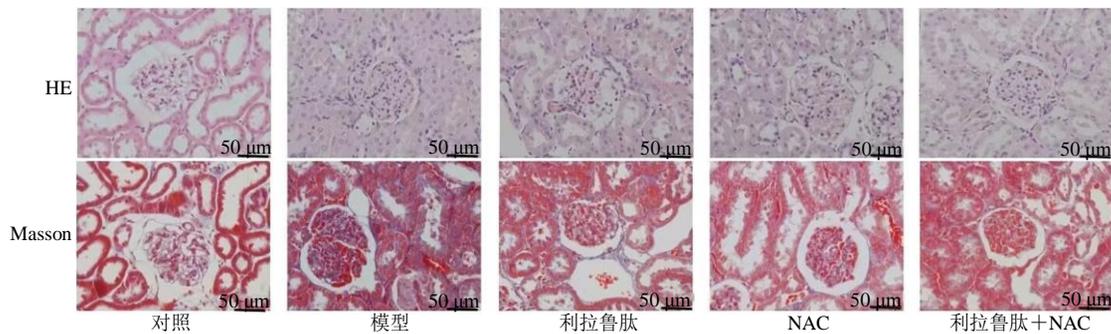


图 1 各组大鼠肾组织形态和结构变化 (×400)

Fig. 1 Changes of renal tissue morphology and structure of rats in each group (×400)

2.3 利拉鲁肽对糖尿病肾病大鼠肾组织氧化应激水平的影响

与对照组相比,模型组大鼠肾组织 MDA 含量显著升高, SOD、GSH 含量均显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组大鼠相比,利拉鲁肽组和 NAC 组大鼠肾

组织 MDA 均含量显著降低, SOD、GSH 含量均显著升高 ($P < 0.05$)。与利拉鲁肽组大鼠相比,利拉鲁肽+NAC 组大鼠的肾组织 MDA 含量均显著降低,而 SOD、GSH 含量均显著升高 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠肾组织氧化应激水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Comparison of oxidative stress levels in renal tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	MDA/($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	GSH/($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	SOD/($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)
对照	—	2.10 ± 0.31	13.45 ± 2.24	173.28 ± 20.34
模型	—	$6.48 \pm 1.12^*$	$4.06 \pm 0.52^*$	$61.56 \pm 9.01^*$
利拉鲁肽	200	$4.28 \pm 0.28^\#$	$8.18 \pm 1.13^\#$	$100.88 \pm 10.45^\#$
NAC	2.0×10^4	$4.77 \pm 0.34^\#$	$7.95 \pm 1.23^\#$	$105.34 \pm 11.38^\#$
利拉鲁肽+NAC	$200 + 2.0 \times 10^4$	$3.42 \pm 0.33^\#\&$	$10.87 \pm 1.52^\#\&$	$138.21 \pm 10.69^\#\&$

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: $^\#P < 0.05$; 与利拉鲁肽组比较: $^\&P < 0.05$

$^\#P < 0.05$ vs control group; $^\#P < 0.05$ vs model group; $^\&P < 0.05$ vs liraglutide group

2.4 利拉鲁肽对糖尿病肾病大鼠肾组织 ROS 和 NLRP3 炎症小体活化的影响

与对照组相比,模型组大鼠肾组织 ROS 水平、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比,利拉鲁肽组和 NAC 组大鼠肾组织 ROS 水平、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$)。与利拉鲁肽组相比,利拉鲁肽+NAC 组大鼠肾组织 ROS 水平、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$),见图 2、表 3。

2.5 利拉鲁肽对糖尿病肾病大鼠肾组焦亡相关蛋白表达的影响

与对照组相比,模型组大鼠肾组织焦亡相关蛋

白 cleaved-Caspase-1/pro-Caspase-1、GSDMD-N/GSDMD、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比,利拉鲁肽组和 NAC 组大鼠肾组织焦亡相关蛋白 cleaved-Caspase-1/pro-Caspase-1、GSDMD-N/GSDMD、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。与利拉鲁肽组相比,利拉鲁肽+NAC 组大鼠肾组织焦亡相关蛋白 cleaved-Caspase-1/pro-Caspase-1、GSDMD-N/GSDMD、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$),见图 3、表 4。

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病患者发病和死亡的主要原因之一,在 1 型和 2 型糖尿病患者中的发病率高

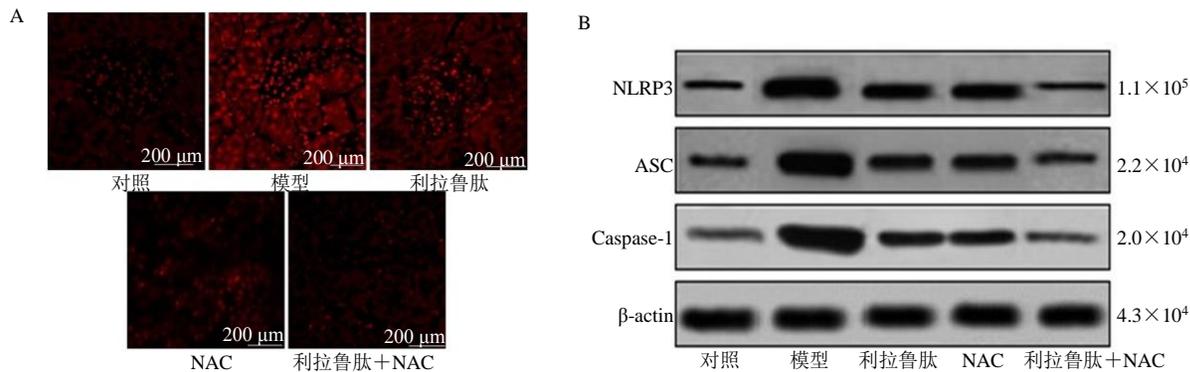


图 2 各组大鼠肾组 ROS 染色 (A) 及 NLRP3 炎症小体相关蛋白电泳图 (B)

Fig. 2 ROS staining (A) and NLRP3 inflammasome associated protein electrophoresis (B) of rat kidney groups in each group

表 3 各组大鼠肾组织 ROS 水平及 NLRP3 炎症小体相关蛋白相对表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 ROS levels and NLRP3 inflammasome related protein expression in renal tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	蛋白相对表达量			
		ROS	NLRP3	ASC	Caspase-1
对照	—	1.10 ± 0.14	1.00 ± 0.10	1.03 ± 0.15	1.05 ± 0.14
模型	—	5.87 ± 0.49*	3.15 ± 0.21*	2.76 ± 0.26*	2.91 ± 0.25*
利拉鲁肽	200	2.48 ± 0.31 [#]	1.94 ± 0.20 [#]	1.88 ± 0.21 [#]	1.88 ± 0.23 [#]
NAC	2.0 × 10 ⁴	1.88 ± 0.27 [#]	1.99 ± 0.24 [#]	1.89 ± 0.23 [#]	1.90 ± 0.31 [#]
利拉鲁肽+NAC	200+2.0 × 10 ⁴	1.46 ± 0.21 ^{&}	1.35 ± 0.20 ^{&}	1.23 ± 0.15 ^{&}	1.32 ± 0.26 ^{&}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与利拉鲁肽组比较: [&] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs liraglutide group

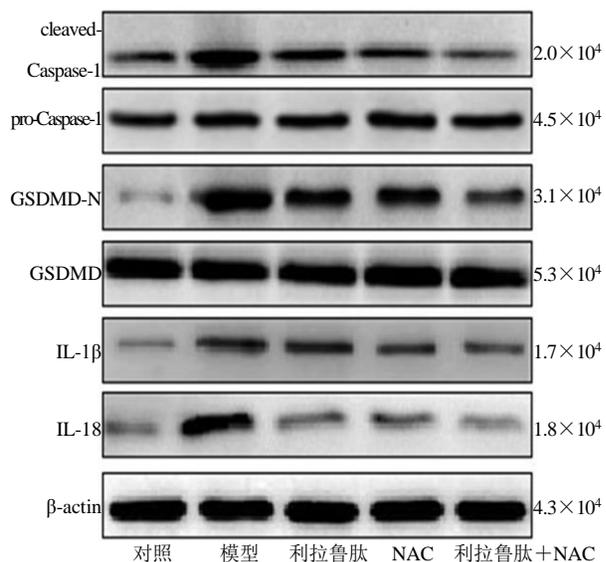


图 3 各组大鼠肾组织焦亡相关蛋白电泳图

Fig. 3 Electrophoretic maps of pyroptosis related proteins in renal tissue of rats in each group

达 30% 和 50%，严重危害糖尿病患者生命健康^[16]。目前尚无治疗糖尿病肾病的特异性药物，临床现有的治疗方式尚不能得到满意的效果，大约有 50% 的

糖尿病肾病患者需要肾脏替代治疗^[3]。1 项荟萃分析显示，GLP-1 受体激动剂能够明显改善 2 型糖尿病的肾脏结局^[17]。研究表明，利拉鲁肽作为长效 GLP-1 受体激动剂能够通过降低血糖、抑制氧化应激和炎症反应等途径改善糖尿病肾病肾损伤^[11-12]。但是，目前有关利拉鲁肽对 2 型糖尿病肾病肾损伤的保护作用机制尚不完全清楚。本研究通过多次小剂量 ip STZ 构建糖尿病肾病大鼠模型，观察利拉鲁肽对糖尿病肾病大鼠肾损伤的保护作用。结果显示，造模 4 周后，大鼠肾功能指标 24 h MAER、Scr、BUN 水平均显著升高，肾组织形态结构出现明显的病理损伤，表明糖尿病肾病大鼠模型构建成功。与模型组相比，利拉鲁肽能够通过降低肾功能指标、血糖水平，改善糖尿病肾病肾损伤。

炎症反应作为糖尿病肾病进展的重要病理机制，在糖尿病肾病肾功能损伤中发挥关键作用。多项研究表明，通过抑制炎症反应过程中的炎症因子、信号通路及其下游产物能够明显改善糖尿病肾病肾损伤^[18-20]。细胞焦亡是新近发现的一种促炎性程序性细胞死亡方式，主要由 NLRP3 炎症小体、

表 4 各组大鼠肾组织焦亡相关蛋白相对表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Relative expression of pyroptosis related proteins in renal tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	cleaved-caspase-1/pro-caspase-1	GSDMD-N/GSDMD	IL-1 β 蛋白相对表达	IL-18 蛋白相对表达
对照	—	0.87 \pm 0.15	0.30 \pm 0.07	1.02 \pm 0.18	1.05 \pm 0.16
模型	—	1.65 \pm 0.31*	1.15 \pm 0.30*	2.26 \pm 0.34*	2.53 \pm 0.37*
利拉鲁肽	200	1.05 \pm 0.23 ^{##}	0.82 \pm 0.17 [#]	1.85 \pm 0.24 [#]	1.45 \pm 0.26 ^{##}
NAC	2.0 \times 10 ⁴	0.92 \pm 0.21 ^{##}	0.79 \pm 0.21 [#]	1.72 \pm 0.23 ^{##}	1.56 \pm 0.31 ^{##}
利拉鲁肽+NAC	200+2.0 \times 10 ⁴	0.56 \pm 0.15 ^{&&}	0.46 \pm 0.10 ^{&&}	1.32 \pm 0.22 ^{&&}	1.14 \pm 0.21 ^{&}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与利拉鲁肽组比较: & $P < 0.05$ && $P < 0.01$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; & $P < 0.05$ && $P < 0.01$ vs liraglutide group

Caspase-1 和 GSDMD 共同介导^[21]。研究发现, 当细胞受到病原相关分子模式和损伤相关分子模式分子刺激后, 诱导炎性 Caspase-1 活化, 导致细胞焦亡执行者 GSDMD 发生剪切形成具有 GSDMD-C 和细胞毒性 GSDMD-N, 后者募集至细胞上形成细胞焦亡小孔, 促进成熟 IL-1 β 和 IL-18 释放至细胞外, 诱导炎症级联反应^[22]。研究证实, 适度的炎症反应能够对机体产生保护性免疫作用, 过度的炎症如炎症风暴、级联反应会导致机体免疫功能的破坏进而加重糖尿病肾病肾损伤^[23]。多项研究发现, 在糖尿病肾病大鼠模型中肾组织焦亡相关蛋白表达均显著升高, 而抑制 Caspase-1 表达能够降低高糖诱导的肾小管上皮细胞和足细胞焦亡, 改善糖尿病肾病肾损伤^[24-25]。以上研究表明, 以炎症反应为特点的细胞焦亡可能是糖尿病肾病新型的治疗策略和靶点。本研究结果显示, 利拉鲁肽能够降低细胞焦亡相关蛋白表达, 改善糖尿病肾病肾损伤。NLRP3 炎症小体是由 NLRP3、ASC 和 pro-Caspase-1 三者共同组成的蛋白复合物, 是启动细胞焦亡的上游反应原件。当机体在多种治病因素的作用下, 激活 NLRP3 炎症小体, 从而诱导 Caspase-1 依赖性细胞焦亡^[26]。ROS 是介导氧化应激和炎症反应的重要调控因子, ROS 能够通过激活 NLRP3 炎症小体, 诱导 Caspase-1 介导的细胞焦亡^[27]。本研究结果显示, 利拉鲁肽能够降低 ROS 水平, 抑制氧化应激和 NLRP3 炎症小体活化, 提示利拉鲁肽抑制糖尿病肾病细胞焦亡可能与调控 ROS-NLRP3 炎症小体途径相关。Shen 等^[28]研究发现, 石榴皮鞣素能够通过抑制 ROS/NLRP3 途径, 减轻脂多糖/ATP 诱导的小鼠 J774A.1 细胞焦亡, ROS 清除剂 NAC 能够发挥与石榴皮鞣素同向作用抑制脂多糖/ATP 诱导的小鼠 J774A.1 细胞焦亡。为进一步明确 ROS/NLRP3 炎症小体途径在利拉鲁肽抑制糖尿病肾病细胞焦亡中

的作用, 本实验通过大鼠 ip NAC 观察糖尿病肾病大鼠细胞焦亡情况。结果显示, NAC 能够通过抑制 ROS/NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡, 进而发挥与利拉鲁肽同向糖尿病肾病肾损伤保护作用。与利拉鲁肽组相比, 利拉鲁肽+NAC 组大鼠上述相关指标减轻各更为显著, 糖尿病肾病肾损伤得到进一步改善, 表明利拉鲁肽能够通过 ROS-NLRP3 炎症小体途径, 抑制细胞焦亡, 进而改善糖尿病肾病大鼠肾损伤。

综上所述, 本利拉鲁肽能够通过 ROS-NLRP3 炎症小体途径, 抑制肾组织氧化应激介导的 NLRP3 炎症小体活化, 从而抑制细胞焦亡, 并最终发挥抗糖尿病肾病肾损伤作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 宋纯东, 宋丹, 贾评评, 等. 雷公藤多苷通过 NLRP3/caspase-1/GSDMD 细胞焦亡通路对糖尿病肾病大鼠肾损伤的影响[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(10): 2639-2645.
- [2] Bonner R, Albajrami O, Hudspeth J, et al. Diabetic kidney disease [J]. *Prim Care*, 2020, 47(4): 645-659.
- [3] Samsu N. Diabetic nephropathy: Challenges in pathogenesis, diagnosis, and treatment [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 1497449.
- [4] 李佳佳, 黄皓, 陶立坚, 等. 糖尿病肾病主要发病机制的研究进展 [J]. 生命科学, 2023, 35(3): 396-404.
- [5] Wu L, Liu C, Chang D Y, et al. Annexin A1 alleviates kidney injury by promoting the resolution of inflammation in diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2021, 100(1): 107-121.
- [6] Feng H, Zhu X, Tang Y, et al. Astragaloside IV ameliorates diabetic nephropathy in db/db mice by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated inflammation [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48(2): 164.
- [7] Al Mamun A, Ara Mimi A, Wu Y, et al. Pyroptosis in

- diabetic nephropathy [J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 523: 131-143.
- [8] Zhao W, He C, Jiang J, *et al.* The role of discoid domain receptor 1 on renal tubular epithelial pyroptosis in diabetic nephropathy [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2022, 26(6): 427-438.
- [9] Gao Y, Ma Y, Xie D, *et al.* ManNAc protects against podocyte pyroptosis via inhibiting mitochondrial damage and ROS/NLRP3 signaling pathway in diabetic kidney injury model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 107: 108711.
- [10] Nauck M A, Quast D R, Wefers J, *et al.* GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes-state-of-the-art [J]. *Mol Metab*, 2021, 46: 101102.
- [11] An J R, Su J N, Sun G Y, *et al.* Liraglutide alleviates cognitive deficit in db/db mice: Involvement in oxidative stress, iron overload, and ferroptosis [J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(2): 279-294.
- [12] Baylan U, Korn A, Emmens R W, *et al.* Liraglutide treatment attenuates inflammation markers in the cardiac, cerebral and renal microvasculature in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Eur J Clin Invest*, 2022, 52(9): e13807.
- [13] 马秀琦, 薛君, 张莹, 等. 利拉鲁肽对糖尿病肾病大鼠 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 表达的影响 [J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2023, 22(4): 284-289.
- [14] 张馨允, 郭启仓, 张景义, 等. 刺芒柄花素对糖尿病肾病大鼠肾脏氧化应激损伤的作用及机制 [J]. *中成药*, 2021, 43(12): 3326-3332.
- [15] 潘艳伶, 陈洪民, 伏红颖, 等. 糖通饮经 miRNA-21/TGF- β 1/Smad 信号转导对糖尿病肾病大鼠肾脏功能的保护作用 [J]. *中药新药与临床药理*, 2023, 34(4): 452-458.
- [16] Umanath K, Lewis J B. Update on diabetic nephropathy: Core curriculum 2018 [J]. *Am J Kidney Dis*, 2018, 71(6): 884-895.
- [17] Kristensen S L, Rørth R, Jhund P S, *et al.* Cardiovascular, mortality, and kidney outcomes with GLP-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2019, 7(10): 776-785.
- [18] Ma L, Wu F, Shao Q, *et al.* Baicalin alleviates oxidative stress and inflammation in diabetic nephropathy via Nrf2 and MAPK signaling pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 3207-3221.
- [19] Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez R R, Fernandez-Fernandez B, *et al.* Targeting inflammation to treat diabetic kidney disease: The road to 2030 [J]. *Kidney Int*, 2023, 103(2): 282-296.
- [20] 杨帆, 曹晨, 方敬, 等. JAK-STAT 通路在糖尿病肾病中的作用及中药干预的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(5): 1485-1491.
- [21] Li S, Sun Y, Song M, *et al.* NLRP3/caspase-1/GSDMD-mediated pyroptosis exerts a crucial role in astrocyte pathological injury in mouse model of depression [J]. *JCI Insight*, 2021, 6(23): e146852.
- [22] 赵为陈, 何春远, 王法财. 以 caspase-1 介导细胞焦亡筛选治疗糖尿病肾病潜在的中药及单体成分 [J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40(9): 1280-1287.
- [23] Pérez-Morales R E, Del Pino M D, Valdivielso J M, *et al.* Inflammation in diabetic kidney disease [J]. *Nephron*, 2019, 143(1): 12-16.
- [24] Yuan S, Wang Y, Li Z, *et al.* Gasdermin D is involved in switching from apoptosis to pyroptosis in TLR4-mediated renal tubular epithelial cells injury in diabetic kidney disease [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2022, 727: 109347.
- [25] Zhu W, Li Y Y, Zeng H X, *et al.* Carnosine alleviates podocyte injury in diabetic nephropathy by targeting caspase-1-mediated pyroptosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 101(Pt B): 108236.
- [26] Coll R C, Schroder K, Pelegrín P. NLRP3 and pyroptosis blockers for treating inflammatory diseases [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43(8): 653-668.
- [27] Wang F, Liang Q, Ma Y, *et al.* Silica nanoparticles induce pyroptosis and cardiac hypertrophy via ROS/NLRP3/Caspase-1 pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 182: 171-181.
- [28] Shen R, Yin P, Yao H, *et al.* Punicalin ameliorates cell pyroptosis induced by LPS/ATP through suppression of ROS/NLRP3 pathway [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 711-718.

[责任编辑 高源]