

本文引用：叶凯丽, 黄诗琴, 胡婷, 等. 丁酸盐对糖尿病肾病小鼠肾损伤的保护作用及机制[J]. 温州医科大学学报, 2023, 53(1): 42-48.

· 论 著 ·

丁酸盐对糖尿病肾病小鼠肾损伤的保护作用及机制

叶凯丽, 黄诗琴, 胡婷, 赵艳玲

温州医科大学附属第二医院 肾内科, 浙江 温州 325027

[摘要] **目的:** 探讨丁酸盐对2型糖尿病肾病(DN)小鼠肾损伤的保护作用及其机制。**方法:** 将雄性 db/db 小鼠随机分为模型组(DN)、丁酸钠500 mg/(kg·d)组(NaB1)和丁酸钠1 000 mg/(kg·d)组(NaB2), 同周龄雄性 db/m 作为对照组(NC)。NaB1组和NaB2组每日丁酸钠溶液灌胃, NC组和DN组予等体积0.9%氯化钠溶液, 连续灌胃8周后处死小鼠。留取肾组织进行苏木素伊红(HE)染色和过碘酸-希夫(PAS)染色; 分别提取肾组织mRNA和蛋白进行实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)和蛋白质印迹(Western blot)检测; 采用相关试剂盒检测尿肌酐、尿微量白蛋白(mALB)、肾组织白细胞介素-6(IL-6)、血肌酐(Scr)等相关指标。**结果:** 与NC组小鼠比, DN组小鼠精神萎靡, 多饮多食多尿症状明显, 体质量、血糖显著升高, 尿白蛋白/肌酐比值(UACR)明显增高($P < 0.05$)。丁酸钠治疗8周后, 小鼠精神饮食状况改善, 血糖、UACR下降, 肾组织IL-6水平下降, GLP-1R、AMPK、PGC-1 α 、MFN2和OPA1 mRNA表达增加($P < 0.05$)。**结论:** 丁酸钠通过调节DN小鼠的AMPK和GLP-1R发挥肾脏保护作用。

[关键词] 丁酸盐; 短链脂肪酸; 糖尿病肾病; AMPK/PGC-1 α ; db/db 小鼠

[中图分类号] R589 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-9400.2023.01.007

Protective effect of butyrate on renal injury in diabetic nephropathy mice and its mechanism YE Kaili, HUANG Shiqin, HU Ting, ZHAO Yanling. Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China

Abstract: **Objective:** To investigate the protective effect of butyrate on renal injury in mice with type 2 diabetic nephropathy and to explore its mechanism. **Methods:** Male db/db mice were randomly divided into model group (DN), sodium butyrate 500 mg·kg⁻¹·d⁻¹ group (NaB1) and sodium butyrate 1 000 mg·kg⁻¹·d⁻¹ group (NaB2). The db/m mice with the same weeks served as the control group (NC). NaB1 and NaB2 groups were given sodium butyrate solution every day, while NC group and DN group were perfused with equal volume of physiological saline. After 8 weeks for intragastric administration, the mice were sacrificed. Kidney tissue was preserved for staining of hematoxylin eosin (HE) and periodic acid-Schiff (PAS); meanwhile extracting the mRNA and protein for real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and western blotting; using relevant kits to detect urine creatinine, urine microalbumin (mALB), interleukin-6 (IL-6) of renal tissue, serum creatinine (Scr) and other related indicators. **Results:** Compared with the NC group, the DN group presented listlessness, more polydipsia and polyuria, expressed significantly higher body weight and blood glucose ($P < 0.05$), and increased the ratio of urinary protein and creatinine (UACR) ($P < 0.05$). After the treatment of sodium butyrate for 8 weeks, the mice had better mental conditions and diet, lower blood glucose and UACR ($P < 0.05$) and lower IL-6 levels of renal tissue, but higher expressions of GLP-1R, AMPK, PGC-1 α , MFN2 and OPA1 mRNA ($P < 0.05$). **Conclusion:** Sodium butyrate exerts reno-protective effect by regulating AMPK and GLP-1R in diabetic nephropathy mice.

Key words: butyrate; short chain fatty acid; diabetes nephropathy; adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase/ subunit of peroxisome proliferators-activated receptor- γ coactivator-1; db/db mice

收稿日期: 2022-08-16

基金项目: 浙江省基础公益技术应用研究计划项目(LGD19H070003); 温州市基础性科研项目(Y20190128)。

作者简介: 叶凯丽, 硕士生, Email: 1062438089@qq.com。

通信作者: 赵艳玲, 主任医师, Email: zy1131@163.com。

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最常见的死亡原因及常见的微血管并发症, 目前普遍认为慢性炎症、氧化应激、糖脂代谢紊乱是

DN进展的最主要因素^[1-2]。研究表明^[3-4]DN小鼠与正常小鼠相比肠道菌群结构存在显著差异,并出现不同程度的能量代谢异常,YANG等^[5]认为肠道微生物代谢物可作为一种特殊的信号分子通过肠道屏障-肠黏膜进入血液循环而影响机体重要器官的功能,包括心、脑、肾等器官,其中短链脂肪酸尤为重要。丁酸盐是一种重要短链脂肪酸,它可通过肠道屏障进入血液循环影响肠外器官的功能,如调控胰岛素敏感性、抗炎、抗氧化等^[6-7]。目前,越来越多的研究表明肠道菌群可以通过其代谢产物影响肾脏疾病的发生发展。本研究以 db/db 小鼠为研究对象,从GLP-1R/AMPK途径来探讨肠道菌群代谢物丁酸盐对2型DN小鼠肾脏的保护作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂 罗氏血糖仪购自德国Roche Diagnostics GmbH公司,丁酸钠购自上海Macklin公司(CAS号:156-54-7),苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、过碘酸-希夫(PAS)染色试剂盒均购自北京索莱宝生物科技有限公司,尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(serum creatinine, SCr)、甘油三酯(triglyceride, TG)、血清总胆固醇(total cholesterol, TC)试剂盒购自南京建成生物工程研究所,白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)酶联免疫吸附检测试剂盒购自江苏酶免实业有限公司;尿微量白蛋白、尿肌酐酶联免疫吸附检测试剂盒购自上海抚生实业有限公司。Phospho-AMPK α (Thr172) Rabbit mAb (#2535)、AMPK α Rabbit mAb (#5831)抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;胰高血糖素样肽-1(GLP-1)受体(GLP-1R)抗体(ab218532)购自英国Abcam公司。

1.2 实验动物 24只13周龄SPF级雄性 db/db 小鼠,体质量(45 \pm 7)g,10只同周龄雄性 db/m 小鼠,体质量(27 \pm 2)g,均购自常州卡文斯实验动物有限公司,实验动物许可证号:SCXK(苏)2016-0010,动物质量合格证号:202118368。所有实验小鼠饲养于温州医科大学实验动物中心SPF级实验动物房,温度(22 \pm 2 $^{\circ}$ C),相对湿度(55 \pm 10%),光照/黑暗周期为12 h,小鼠可自由饮水和进食,普通饲料喂养,定期更换垫料。该研究通过温州医科大学动物伦理委员会的批准(wydw2021-0336)。

1.3 实验分组 实验前所有小鼠适应性喂养2周,尾静脉采血测定空腹血糖(fasting blood

glucose, FBG)(禁食6 h),连续3 d测得小鼠空腹血糖 \geq 16.7 mmol/L即认为模型复制成功。将 db/db 小鼠随机分为3组:糖尿病肾病组(DN组)、丁酸钠500 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹组(NaB1组)和丁酸钠1000 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹组(NaB2组),选取同周龄的10只雄性 db/m 小鼠为空白对照组(NC组)。根据之前研究,丁酸钠的灌胃剂量和给药时间在此基础上确定^[6-8]。DN组和NC组各10只,NaB1和NaB2组各7只。

1.4 药物制备及给药 按500 mg \cdot kg⁻¹及1000 mg \cdot kg⁻¹剂量精密称取丁酸钠粉末溶于适量无菌0.9%氯化钠溶液中,在振荡器中震荡至完全溶解,用0.22 μ m微孔滤膜抽滤,现配现用,避光保存。NaB1组和NaB2组小鼠每日予0.3 mL丁酸钠溶液灌胃, DN组和NC组小鼠予等体积的0.9%氯化钠溶液灌胃,每天1次,灌胃持续8周后处死小鼠。

1.5 实验取材及测定 实验结束前24 h,小鼠禁食不禁水,收集24 h尿液后处死,留取小鼠尿液标本低温高速离心后取上清液于-80 $^{\circ}$ C保存。摘除小鼠眼球取血,室温静置2 h后离心取上清液,用于生化分析;小鼠心脏灌流后取肾组织,部分进行石蜡包埋用于HE、PAS染色,部分组织-80 $^{\circ}$ C冷冻保存用于Western blot检测和RT-qPCR实验。

1.6 小鼠一般情况、体质量及肾脏质量 实验过程中观察各组小鼠的精神状态、饮食饮水量、尿量、行为学变化等情况,每两周监测小鼠体质量变化并计算平均值,绘制各组小鼠体质量变化的趋势图;去除小鼠肾脏包膜后称量小鼠肾脏质量,并计算肾肥大指数(肾肥大指数=肾脏质量/体质量 \times 100%)。

1.7 小鼠血糖及尿白蛋白肌酐比值(urine albumin creatine ratio, UACR)测定 罗氏血糖仪检测各组小鼠给药前(0w)及灌胃8周后尾静脉空腹血糖浓度,并绘制血糖柱形图;收集小鼠24 h尿液,4 $^{\circ}$ C离心取上清液。按照制造商的说明,分别用尿微量白蛋白试剂盒、尿肌酐试剂盒检测小鼠尿白蛋白、尿肌酐水平,并计算尿白蛋白和肌酐的比值,即UACR=尿白蛋白/尿肌酐。

1.8 小鼠血液生化分析及肾组织IL-6浓度测定 眼球取血后分离血清,使用相应试剂盒检测血清样本中的BUN、SCr、TG、TC、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)水平。分别取30 mg肾组织加入到200 μ L PBS溶液里面,充分匀浆后离心收集上清液,用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定上清

液总蛋白水平；同时按照ELISA试剂盒的说明测定肾组织中的IL-6水平，绘制标准曲线并求得血清IL-6水平，组织上清液IL-6水平=IL-6数值/相应蛋白浓度。

1.9 Western blot检测 取适量肾组织在含有磷酸酶及蛋白酶抑制剂混合物的RIPA裂解缓冲液中剪碎后匀浆，离心提取蛋白上清液，置于-80℃冷冻保存。按BCA蛋白定量试剂盒说明方法操作并绘制标准蛋白曲线，依据样本OD值计算出样本蛋白浓度并配制蛋白体系。SDS-PAGE电泳分离样品[每个样品取等量蛋白上样(40 μg)]，转移至PVDF膜，用5% BSA溶液封闭2 h后TBST洗涤，将PVDF膜与不同的一抗在4℃条件下孵育过夜。TBST洗膜后与特异性HRP偶联的二抗室温孵育2 h，洗去二抗，随后用Omni-ECL™超灵敏化学发光检测试剂盒显影条带，然后通过Image-Lab软件测量条带强度并进行光密度分析。以β-actin为内参计算蛋白的相对表达量。

1.10 RT-qPCR检测 取适量肾组织按照TRIzol法提取肾脏组织总RNA，按照Prime Script™ RT Master mix试剂盒说明书进行反转录，并配制RT-qPCR反应体系。其循环反应条件如下：95℃ 30 s，95℃ 5 s和60℃ 30 s，反应40个循环。以GADPH为内参基因，采用2^{-ΔΔCT}方法定量分析小鼠肾组织中PGC-1α、MFN1及OPA1 mRNA的表达。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成，引物序列见表1。

1.11 肾脏组织病理学评价 将石蜡包埋后的肾脏组织4 μm切片后置于60℃的烘箱2 h，经二甲苯脱蜡，梯度乙醇水化后用苏木素、伊红染液行常规HE染色，高倍镜(×400)下观察肾脏病理形态变化；脱蜡水化后肾脏切片依次使用氧化剂、Schiff染色液、苏木素染色液和分化液处理行PAS染色，每张

表1 目的基因引物序列

目的基因		引物序列(5'-3')
OPA1	F	GACGACAAAGGCATCCAC
	R	GCAATCATTCCAGCAC
GAPDH	F	AAGAAGGTGGTGAAGCAGG
	R	GAAGGTGGAAGAGTGGGAGT
MFN2	F	CTGGGGACCGGATCTTCTTC
	R	CTGCCTCTCGAAATTCTGAAACT
PGC-1α	F	AAGTGGTGTAGCGACCAATCG
	R	AATGAGGGCAATCCGTCTTCA

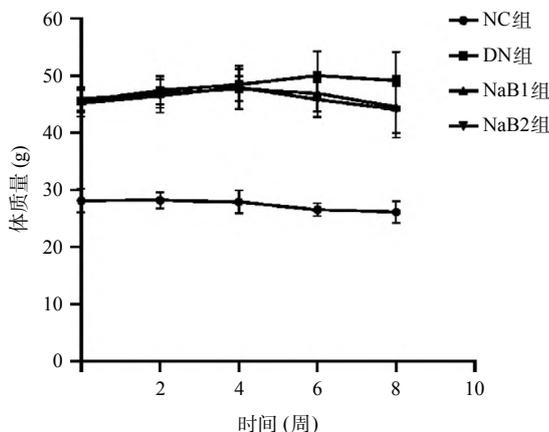
注：视神经萎缩症蛋白(optic atrophy 1, OPA1)；线粒体融合蛋白(mitofusin 2, MFN2)；过氧化物酶增殖物激活受体-γ共激活因子1α(peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator 1α, PGC-1α)

切片高倍镜(×400)下随机选择5~10个视野，应用image-pro plus 6.0软件测定并计算，肾小球系膜基质相对面积=肾小球内PAS阳性染色面积/肾小球毛细血管祥总面积×100%。

1.12 统计学处理方法 采用SPSS26.0统计软件及Graphpad prism 9.0进行数据处理和绘制图片。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述。多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较用LSD-t检验和Dunnett's T3法检验。P<0.05为差异有统计学意义。

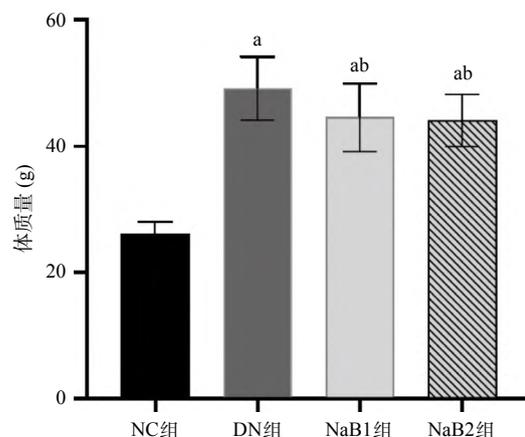
2 结果

2.1 丁酸钠对小鼠一般情况、体质量和肾质量的影响 NC组小鼠一般状况良好，毛色正常、反应灵敏；DN组均表现为典型的DN症状，包括多饮、多食、多尿，精神萎靡，反应迟钝或行动缓慢；经丁酸钠治疗8周后小鼠多饮多食多尿症状改善，活动较前增多。灌胃期间每2周监测一次小鼠体质量，DN组、NaB1组和NaB2组小鼠体质量均显著高于NC组，差异有统计学意义(P<0.05)；与DN组比，NaB1组及



与NC组比：^aP<0.05；与DN组比：^bP<0.05

图1 丁酸钠降低db/db小鼠体质量



NaB2 组小鼠体质量下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。与 NC 组比, DN 组、NaB1 组和 NaB2 组小鼠肾脏质量增加, 肾肥大指数减小, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 DN 组比, NaB1 组和 NaB2 组肾质量及肾肥大指数减小; 且这种差异在 NaB2 组更加明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 丁酸钠对 DN 小鼠肾质量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

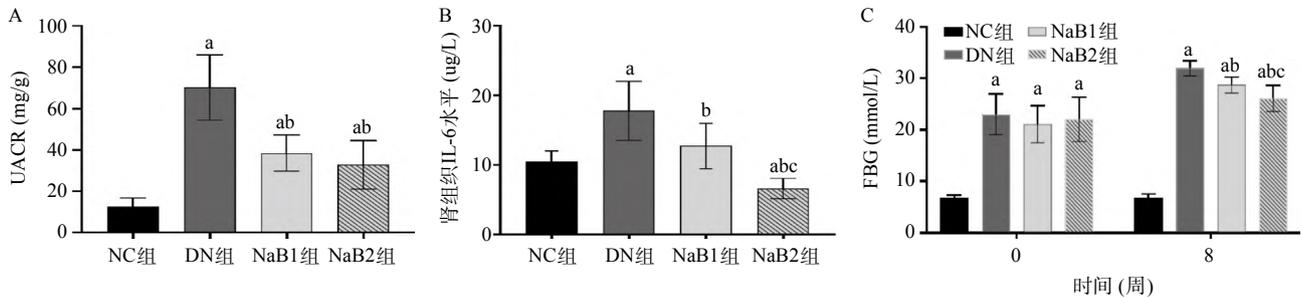
组别	n	肾质量 (g)	肾肥大指数 (%)
NC 组	10	0.20 ± 0.02	7.64 ± 0.84
DN 组	10	0.28 ± 0.04 ^a	6.05 ± 1.39 ^a
NaB1 组	7	0.23 ± 0.05 ^{ab}	5.25 ± 1.36 ^{ab}
NaB2 组	7	0.21 ± 0.02 ^{ab}	4.83 ± 0.61 ^{ab}

与 NC 组比: ^a $P < 0.05$; 与 DN 组比: ^b $P < 0.05$

2.2 丁酸钠对小鼠 UACR、血糖及肾组织 IL-6 水平的影响 与 DN 组比, NaB1 组及 NaB2 组小鼠 UACR 值下降显著, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 但两治疗组之间的 UACR 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。DN 组血糖明显高于 NC 组, 经丁酸钠 8 周灌胃治疗后,

NaB1 组及 NaB2 组小鼠血糖浓度下降显著, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 且与 NaB1 组比, NaB2 组血糖下降更加明显, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。连续给予 8 周丁酸钠溶液灌胃治疗, 检测小鼠肾组织 IL-6 的变化, DN 组小鼠肾组织 IL-6 水平较 NC 组显著升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 经丁酸钠 8 周治疗后, NaB1 组及 NaB2 组的肾组织 IL-6 水平较 DN 组下降, 且与 NaB1 组比, NaB2 组 IL-6 水平下降显著, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 丁酸钠对小鼠血液 BUN、SCr、TC、TG 等指标的影响 与 DN 组比, NaB1 组及 NaB2 组的 ALT、AST 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示这两种剂量下的丁酸钠对两治疗组小鼠的肝功能无明显损伤作用。NC 组小鼠血 BUN、SCr 与 DN 组比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 经过 8 周治疗后两治疗组均出现不同程度的下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。DN 组小鼠 TC 和 TG 值高于 NC 组 ($P < 0.05$), 经 8 周丁酸钠治疗后, 两治疗组小鼠血 TC、TG 值下降但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。



与 NC 组比: ^a $P < 0.05$; 与 DN 组比: ^b $P < 0.05$; 与 NaB1 组比: ^c $P < 0.05$

图 2 各组 UACR、血糖浓度及肾组织 IL-6 水平

表 3 丁酸钠对各组小鼠血液生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

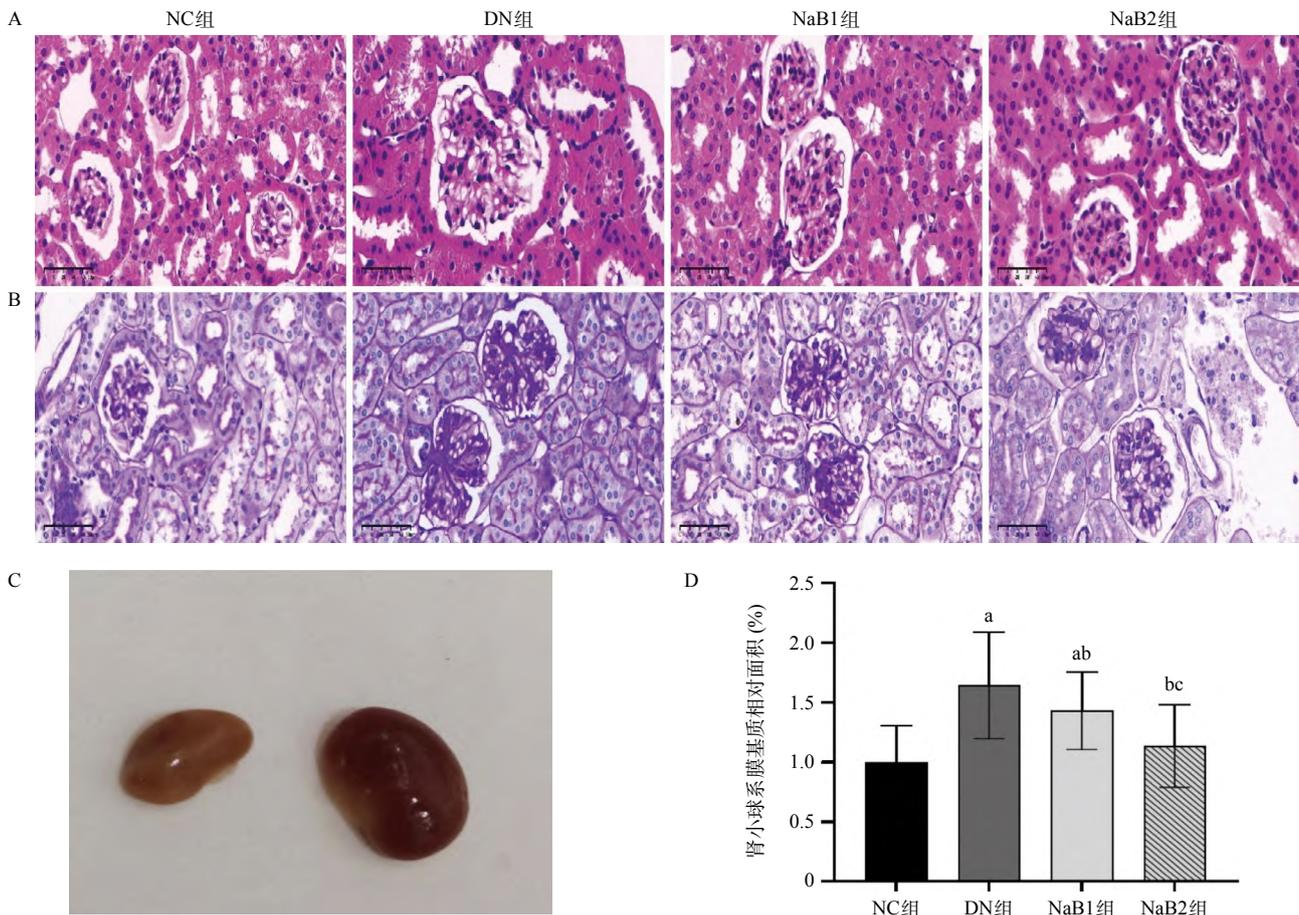
项目	NC 组 (n=10)	DN 组 (n=10)	NaB1 组 (n=7)	NaB2 组 (n=7)
TC (mmol/L)	1.92 ± 0.53	3.46 ± 1.32 ^a	3.06 ± 0.44 ^a	2.87 ± 1.20
TG (mol/L)	0.65 ± 0.27	1.77 ± 0.66 ^a	1.63 ± 0.51 ^a	1.41 ± 0.43 ^a
BUN (mmo1/L)	7.06 ± 1.33	11.51 ± 2.77 ^a	7.91 ± 1.10 ^b	6.91 ± 1.00 ^b
SCr (umo1/L)	29.04 ± 6.91	129.63 ± 18.67 ^a	103.36 ± 11.61 ^{ab}	106.44 ± 6.18 ^{ab}
ALT (U/L)	27.81 ± 6.56	63.87 ± 23.06 ^a	45.39 ± 13.52 ^a	46.96 ± 17.26 ^a
AST (U/L)	49.12 ± 14.55	94.50 ± 31.18 ^a	74.02 ± 18.57	79.84 ± 20.83

与 NC 组比: ^a $P < 0.05$; 与 DN 组比: ^b $P < 0.05$

2.4 丁酸钠对 DN 小鼠肾脏病理的影响 与 NC 组比较, 肉眼见 DN 组小鼠肾组织体积明显增大。对各组小鼠肾组织进行 HE 及 PAS 染色, DN 组小鼠出现典型的 DN 病理改变, 表现为肾小球肿胀肥大, 肾小管上皮排列紊乱且伴有管腔扩张, 基底膜增厚, 系膜基质相对面积增加, NaB1 和 NaB2 组小鼠的肾小球面积

减小, 肾小管扩张程度减轻, 系膜基质糖原沉积面积减小, 且在 NaB2 治疗组减少更加显著, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.5 丁酸钠对肾脏 GLP-1R、p-AMPK/AMPK 蛋白的表达的影响 DN 组小鼠中的 p-AMPK/AMPK 比值明显低于 NC 组、NaB1 组及 NaB2 组, 差异有统计学意义 ($P <$



A: HE染色($\times 400$); B: PAS染色($\times 400$); C: NC组(左)和DN组(右)肾脏肉眼观; D: 各组小鼠肾小球系膜基质相对面积。与NC组比: ^a $P < 0.05$; 与NaB1组比: ^c $P < 0.05$

图3 各组小鼠肾组织病理改变

0.05); 且与NaB1组比, NaB2组P-AMPK/AMPK蛋白水平明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。GLP-1R蛋白在NC组、NaB1组及NaB2组中均有丰富的表达, 在DN组小鼠中可见蛋白表达减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 且与NaB1组比, GLP-1R蛋白在NaB2组显著上调, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图4。

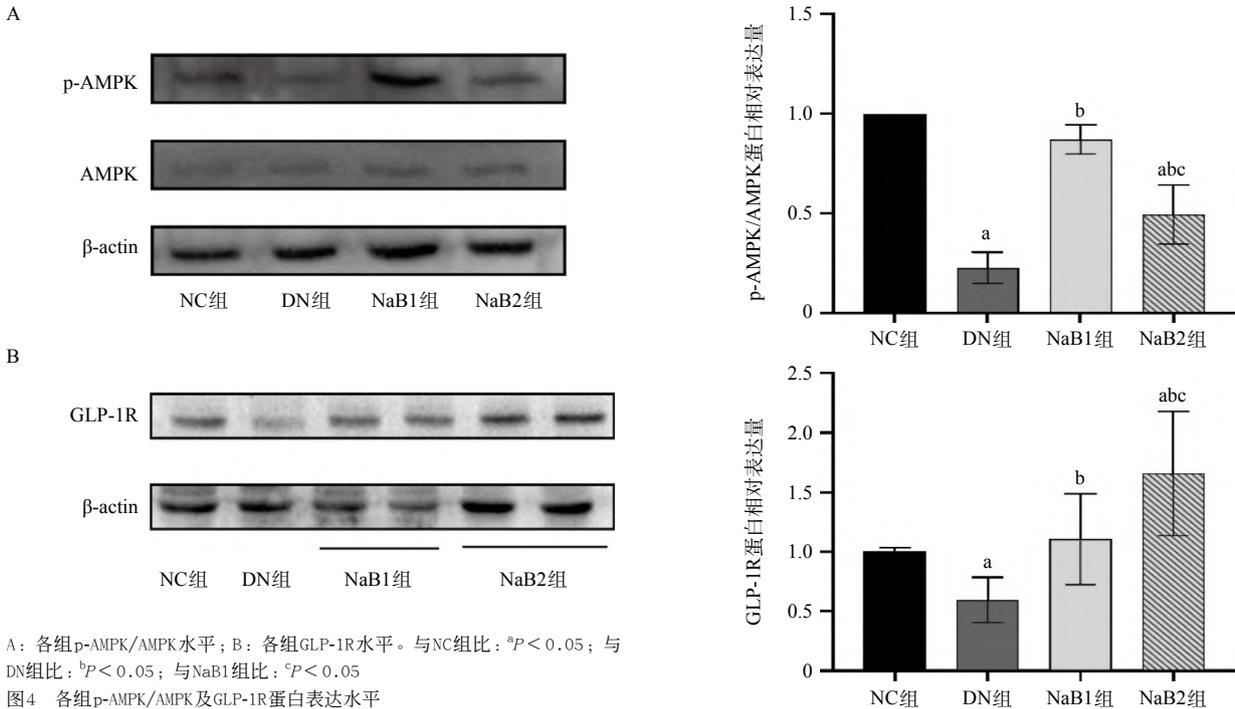
2.6 丁酸钠对肾组织PGC-1 α 、MFN2及OPA1 mRNA表达的影响 与NC组比, DN组肾小球PGC-1 α 、MFN2及OPA1 mRNA明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗8周后, NaB1组及NaB2组的PGC-1 α 、MFN2及OPA1 mRNA水平明显上升; 且NaB2组PGC-1 α 、MFN2及OPA1 mRNA水平升高更加显著, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图5。

3 讨论

DN是糖尿病常见的慢性微血管并发症之一, 研究发现其发生发展可能与GLP-1作用受抑制有关。DN发生时肠道内分泌L细胞释放的GLP-1减少^[9], 同时机体内NF- κ B及其介导的炎症级联反应激活, 导

致各种炎症因子在体内蓄积, 尤其是IL-6^[10]。有研究证实小鼠发生DN时, 肾小球内皮细胞上的GLP-1R通过泛素化或血管紧张素II介导的降解机制被激活, 导致GLP-1R降解增多, GLP-1不能与GLP-1R结合发挥生物学功能^[11]。在本研究中, 我们发现在DN小鼠中, 血糖血脂和炎症因子IL-6水平显著升高, 肾功能受损, 肾脏GLP-1R蛋白表达显著降低。

相关研究报道丁酸盐不仅能上调肠道细胞紧密连接蛋白1(recombinant tight junction protein 1, TJP1)的表达, 改善肠道黏膜屏障功能, 还能进一步降低慢性肾脏病患者血液中IL-1、TNF- α 的水平, 减轻肾脏的氧化应激和纤维化损伤, 降低尿蛋白排泄, 改善肾功能^[8, 12-13], 同时还抑制了组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase inhibitor, HDAC)活性。除此之外, 丁酸与细胞表面G蛋白偶联蛋白41(GPR41)和GPR43结合促进远端回肠及结肠L细胞分泌释放GLP-1, 从而提高机体对GLP-1R敏感性, 发挥降血糖、抗炎及抗氧化作用。本研究中, 经丁酸盐治疗后小鼠的一般情况改善, 血糖、



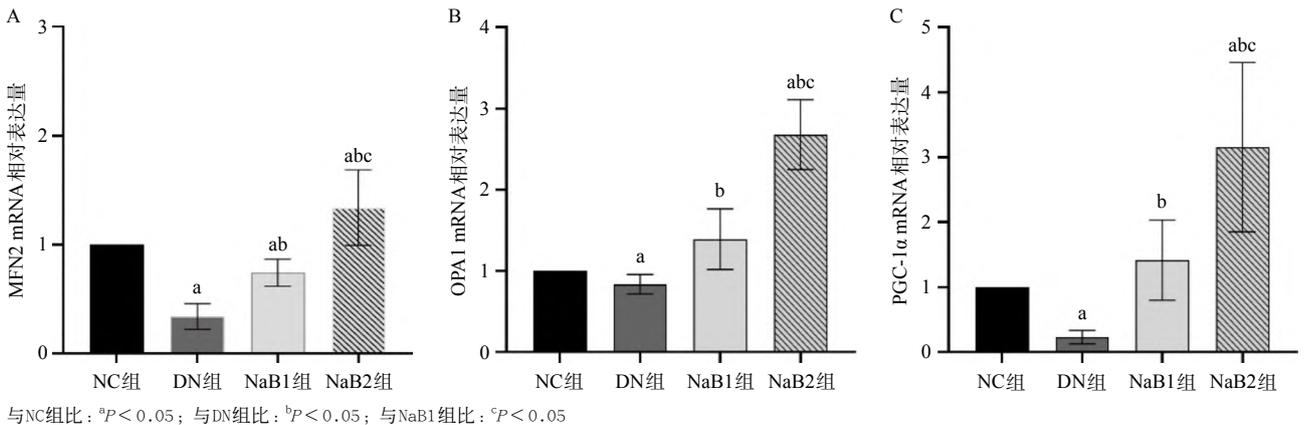
A: 各组 p-AMPK/AMPK 水平; B: 各组 GLP-1R 水平。与 NC 组比: ^a*P* < 0.05; 与 DN 组比: ^b*P* < 0.05; 与 NaB1 组比: ^c*P* < 0.05
图4 各组 p-AMPK/AMPK 及 GLP-1R 蛋白表达水平

体质量及 UACR 显著下降, SCr、BUN 和肾组织 IL-6 水平降低, 但小鼠肝功能无明显损伤, 表明丁酸盐能减轻 DN 小鼠体质量, 降低血糖浓度, 抑制 DN 小鼠发生发展过程中伴随的炎症反应, 减轻肾组织损伤。还发现与 500 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 丁酸钠治疗量相比, 1 000 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 丁酸钠治疗量在降低 DN 小鼠血糖浓度及肾组织 IL-6 水平方面疗效更加显著, 或许为寻找适宜丁酸钠治疗浓度提供了证据。

AMPK 是细胞重要的能量感受器, 能调节细胞能量代谢^[14]。既往的大量研究证实 DN 小鼠存在能量代谢失衡, 肾脏中 AMPK 磷酸化水平在不同程度上被抑制, 应用 5-氨基咪唑-354-甲酰胺-1-β-d-呋喃核糖核苷 (AICAR) 或白藜芦醇等 AMPK 激动剂可以减轻 DN 小鼠尿蛋白和肾脏纤维化, 减少肾细胞凋亡并改善肾脏肥大^[15-16]。研究发现 DN 组小鼠 p-AMPK/AMPK 蛋

白表达显著降低, 补充丁酸盐治疗后小鼠 p-AMPK/AMPK 蛋白表达增加, 因此推测丁酸盐与 AMPK 激动剂有类似的效果, 能促进 AMPK 磷酸化从而影响肾脏功能, 但具体的通路和机制还有待进一步研究。

线粒体是生物发生合成、脂肪酸氧化和能量代谢的重要场所, KANG 等^[17]证实 DN 时脂肪酸氧化过程被抑制, 肾小球 PGC-1α mRNA 表达明显减少, 而 PPAR 与 PGC-1α 是影响脂肪酸吸收氧化相关蛋白转录的关键^[18]。OPA1 蛋白及用于编码线粒体的融合基因 MFN1、MFN2 作为 PGC-1α 的重要下游因子对线粒体功能维持至关重要, 研究表明 PGC-1α 表达下降可导致线粒体功能障碍和结构异常, 同时生成过量的活性氧作用于生物膜及大分子物质发生脂质过氧化损伤, 从而促进 DN 的进展。丁酸盐可在一定条件下活化 AMPK, AMPK 具有促进下游因子 PGC-1α 合成的功能,



与 NC 组比: ^a*P* < 0.05; 与 DN 组比: ^b*P* < 0.05; 与 NaB1 组比: ^c*P* < 0.05
图5 各组小鼠 PGC-1α、MFN2 及 OPA1 mRNA 表达水平

从而调控PGC-1 α 及其下游信号因子进而影响线粒体的功能,且这种效应可以被AMPK抑制剂Compound C抑制^[19]。为了研究丁酸盐对线粒体功能的影响,进一步分析了线粒体内融合基因表达,本研究发现PGC-1 α mRNA和线粒体融合基因MFN2和OPA1 mRNA表达在DN小鼠中受到抑制,而在丁酸盐治疗组中小鼠PGC-1 α 、MFN2和OPA1 mRNA表达抑制得到一定程度的缓解。推测丁酸盐可能是通过AMPK/PGC-1 α 信号通路恢复损伤线粒体的功能,增加线粒体代谢产物,干预机体代谢,减少肾脏脂肪酸堆积,减轻肾组织损伤。

DN小鼠中普遍存在肠道菌群失衡,主要表现为产丁酸的细菌的减少,机体内丁酸含量下降,本研究证实补充外源性的丁酸盐能抑制DN小鼠炎症反应,促进GLP-1R蛋白合成,激活AMPK信号通路改善线粒体结构及能量代谢障碍,表明丁酸钠可作为连接“肠-肾”轴的重要介质参与DN发生发展,同时还探究了丁酸钠对肾脏起保护作用的适宜浓度,为治疗DN提供新证据及思路。

参考文献

- [1] FERNANDES R, VIANA S D, NUNES S, et al. Diabetic gut microbiota dysbiosis as an inflammaging and immunosenescence condition that fosters progression of retinopathy and nephropathy[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(7): 1876-1897.
- [2] SAMSU N. Diabetic nephropathy: Challenges in pathogenesis, diagnosis, and treatment[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 1497449.
- [3] CAI T T, YE X L, LI R R, et al. Resveratrol modulates the gut microbiota and inflammation to protect against diabetic nephropathy in mice[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1249.
- [4] MENG X, MA J, KANG A N, et al. A novel approach based on metabolomics coupled with intestinal flora analysis and network pharmacology to explain the mechanisms of action of bekhogainsam decoction in the improvement of symptoms of streptozotocin-induced diabetic nephropathy in mice[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 633.
- [5] YANG T, RICHARDS E M, PEPINE C J, et al. The gut microbiota and the brain-gut-kidney axis in hypertension and chronic kidney disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(7): 442-456.
- [6] KHAN S, JENA G. Sodium butyrate, a HDAC inhibitor ameliorates eNOS, iNOS and TGF-beta1-induced fibrogenesis, apoptosis and DNA damage in the kidney of juvenile diabetic rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 73: 127-139.
- [7] XU Y H, GAO C L, GUO H L, et al. Sodium butyrate supplementation ameliorates diabetic inflammation in db/db mice[J]. *J Endocrinol*, 2018, 238(3): 231-244.
- [8] ZHANG W Q, ZHAO T T, GUI D K, et al. Sodium butyrate improves liver glycogen metabolism in Type 2 diabetes mellitus[J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(27): 7694-7705.
- [9] DRUCKER D J. Mechanisms of action and therapeutic application of glucagon-like peptide-1[J]. *Cell Metab*, 2018, 27(4): 740-756.
- [10] KANG Z, ZENG J, ZHANG T, et al. Hyperglycemia induces NF-kappaB activation and MCP-1 expression via downregulating GLP-1R expression in rat mesangial cells: Inhibition by metformin[J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(8): 940-953.
- [11] MIMA A, HIRAOKA-YAMOMOTO J, LI Q, et al. Protective effects of GLP-1 on glomerular endothelium and its inhibition by PKCbeta activation in diabetes[J]. *Diabetes*, 2012, 61(11): 2967-2979.
- [12] DONG W, JIA Y, LIU X, et al. Sodium butyrate activates NRF2 to ameliorate diabetic nephropathy possibly via inhibition of HDAC[J]. *J Endocrinol*, 2017, 232(1): 71-83.
- [13] MORRISON D J, PRESTON T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism[J]. *Gut Microbes*, 2016, 7(3): 189-200.
- [14] CARLING D. AMPK signalling in health and disease[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 45: 31-37.
- [15] 于中飞, 刘鲁英. 白藜芦醇对链脲佐菌素诱导糖尿病小鼠肾脏损伤的保护作用[J]. *糖尿病新世界*, 2021, 24(2): 22-27.
- [16] CHANG C C, CHANG C Y, WU Y T, et al. Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein kinase[J]. *J Biomed Sci*, 2011, 18(1): 47.
- [17] KANG H M, AHN S H, CHOI P, et al. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development[J]. *Nat Med*, 2015, 21(1): 37-46.
- [18] QI W, KEENAN H A, LI Q, et al. Pyruvate kinase M2 activation may protect against the progression of diabetic glomerular pathology and mitochondrial dysfunction[J]. *Nat Med*, 2017, 23(6): 753-762.
- [19] 于跃. 丁酸盐预防糖尿病肾脏损伤的作用及机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2022.

(本文编辑: 吴彬)