

高脂血症大鼠肾脏 Angptl4 变化及辛伐他汀的保护作用*

彭 兰^{1,2}, 范能全³, 杜晓刚²

(1. 重庆医药高等专科学校, 重庆 401331; 2. 重庆医科大学 附属第一医院 肾内科, 重庆 400016;
3. 重庆市食品药品检验所, 重庆 401121)

摘要:为探讨高脂血症大鼠(*Rattus norvegicus*)肾脏中 Angptl4 的变化及辛伐他汀的保护作用,将 45 只雄性 SD 大鼠随机平均分为 3 组:正常对照组(NG)给予普通饲料喂养;高脂饮食组(HG)给予高脂饲料喂养;辛伐他汀组(SG)在高脂饲料喂养的基础上给予辛伐他汀 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 水溶液灌胃。分别于第 4、6、10 周时各组随机选取 5 只大鼠,检测大鼠 24 h 尿蛋白及血清总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平,石蜡切片 HE 染色观察大鼠肾小球的损害,免疫组化及 Western blot 检测大鼠肾脏 Angptl4 蛋白分布及表达。结果显示,于第 4 周开始,HG 组和 SG 组大鼠血清 TC 和 LDL-C 水平升高。实验第 10 周时,HG 组和 SG 组大鼠 24 h 尿蛋白定量升高;大鼠肾组织 HE 染色光镜下观察显示:肾小球呈轻微分叶状,系膜区增宽和基质增多不明显,但肾小球内有较明显的空泡变性,SG 组大鼠的病变明显轻于 HG 组;免疫组化和免疫印迹检查发现,大鼠肾脏 Angptl4 明显增多,SG 组的表达较 HG 组有减少。研究认为,高脂血症可引起肾脏肾小球明显病变,可能是肾小球内的足细胞分泌 Angptl4 的增多引起;而辛伐他汀则可能使高脂饮食时足细胞分泌 Angptl4 减少,从而减轻高脂血症时肾小球受到的损害。

关键词:高脂血症;肾小球;Angptl4;辛伐他汀;大鼠

中图分类号:R589.2

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2014)03-0082-05

包括总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)升高在内的脂代谢紊乱常可导致肾脏损害,但作用机制尚不清楚。Angptl4 作为 Angptl 家族成员之一,可以调节糖代谢稳态、脂代谢和胰岛素抵抗,抗内皮细胞凋亡,参与抑制血管的再生与增生以及肿瘤的迁移调控转移、表达,和代谢疾病、糖尿病都有一定的关系。在体内多种组织中广泛表达,在糖脂代谢、动脉粥样硬化等疾病的发生中可能发挥重要作用^[1]。当前的研究也显示,Angptl4 可能在足细胞相关疾病如微小病变性肾病(MCD)^[2-3]、局灶节段性肾小球硬化(FSGS)的蛋白尿和肾小球硬化的发生中具有关键性的作用^[4],有可能成为这类足细胞病的特异性标志蛋白。然而关于 Angptl4 在高脂血症肾损害中的作用目前仍不清楚。本研究观察了高脂血症大鼠肾小球的变化及肾脏 Angptl4 的表达,并给予辛伐他汀干预,以探讨 Angptl4 在高脂下肾脏损害中的作用。

1 材料和方法

1.1 动物模型复制及分组

同品系 SD 大鼠(*Rattus norvegicus*)45 只(购于重庆中药研究院,实验动物许可证:scxk(渝)2012-2006),雄性,体重 180~200 g,适应性喂养 1 周后,随机平均分为 3 组,其中:正常对照组(NG)予以基础饲料喂养;高脂饮食组(HG)按高脂血症动物模型方法自由进食高脂饲料(85%基础饲料和 2%胆固醇、0.5%去氧胆酸钠、10%猪油、0.2%丙基硫氧嘧啶、5%蛋黄粉);辛伐他汀组(SG)在上述高脂饲料喂养的同时给予辛伐他汀水溶液按 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量灌胃,每日 1 次,治疗 10 周。正常对照组和高脂血症组均自由进水。在第 4、6、10 周时各组随机取 5 只大鼠处死,留取标本备用。

1.2 血脂、尿蛋白测定

于处理后第 4、6、10 周分批杀鼠,麻醉开胸,从心脏采血,离心提取血清,采用全自动生化分析仪检测实验血

* 收稿日期:2014-01-02 修回日期:2014-02-07 网络出版时间:2014-5-8 14:38

资助项目:国家自然科学基金(No. 81370816);重庆市高等教育教学改革研究项目(No. 133272);重庆医药高等专科学校校级教研教改项目(No. ygzjg201304)

作者简介:彭兰,女,讲师,研究方向为肾脏内科学,E-mail:pl2007pl@163.com;通讯作者:杜晓刚,E-mail:dxcxm@163.com

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20140508.1438.019.html>

清中 TC、LDL-C 水平;于实验前和实验第 4、6、10 周中处死大鼠前 1 天,置于代谢笼内收集 24 h 尿液,采用考马斯亮蓝法测定 24 h 尿蛋白定量。

1.3 肾组织 HE 染色观察

10%中性福尔马林缓冲液固定肾组织标本,石蜡切片,进行常规 HE 染色,光镜下观察肾小球的病理损害情况。

1.4 免疫组化法检测

取部分肾组织 10%中性福尔马林缓冲液固定,石蜡包埋切片。用免疫组化法检测肾脏 Angptl4 蛋白表达。石蜡切片脱蜡,0.3% H₂O₂ 封闭。置于 0.01 mmol·L⁻¹ pH 6.0 柠檬酸盐缓冲液中进行微波修复抗原(高火 5 min,低火 13 min)。山羊血清封闭。依次加入 1:100 兔多抗 Angptl4 多克隆抗体(博奥森)、生物素标记兔抗 IgG(中杉金桥)和辣根过氧化物酶标记的卵蛋白-生物素,37℃ 孵育 15 min。以 DAB 显色;脱水、透明、封片。

1.5 Western blotting 法检测

收集饲养 10 周时不同处理条件大鼠的肾组织,分别称取 0.1 g,在冰浴下研碎后加入含有蛋白酶抑制剂混合物的裂解液中裂解。组织匀浆后 4℃、14 000×g 低温离心 3 次,每次 10 min,取上清液。用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(北京百泰克)定量调蛋白浓度,SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离蛋白。再将凝胶内的蛋白质转至 PVDF 膜上,1%BSA 室温封闭 2 h 后,加入兔抗 Angptl4 多克隆抗体(博奥森),4℃ 过夜。TBST 液洗脱,与羊抗兔 IgG 抗体室温孵育 2 h。TBST 液洗脱后,化学发光试剂显色,X 线胶片显影,扫描分析软件系统进行图像分析。

1.6 统计学处理

数据结果以“平均数±标准差”表示,多组资料比较采用方差分析,两组资料比较采用 *t* 检验,显著性水平为 $p < 0.05$ 。所有数据采用 SAS 9.0 软件处理。

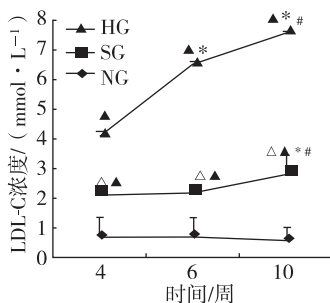
2 结果

2.1 血脂的变化

图 1、图 2 显示,NG 组大鼠血清 LDL-C 和 TC 水平在实验第 4、6 和 10 周不同时点两两比较无显著性差异。HG 和 SG 组大鼠的血清 LDL-C 和 TC 水平,从实验第 4 周开始均逐渐增加;SG 和 HG 组大鼠的血清 LDL-C 和 TC 水平分别与同时间点 NG 组比较,明显升高,两者差异达到显著性水平($p < 0.05$);SG 组大鼠的血清 LDL-C 和 TC 较同时间点 HG 组明显减低,两两比较发现有显著性差异($p < 0.05$)。

2.2 尿蛋白定量变化

从图 3 可知,NG 组大鼠尿蛋白半定量检测在实验第 4、6、10 周不同时间点纵向比较,无显著性差异;第 4 周和第 6 周时 HG 组、SG 组分别与 NG 组比较,无显著性差异。



注:▲ $p < 0.05$ vs NG; △ $p < 0.05$ vs HG; * $p < 0.05$ vs 第 4 周; # $p < 0.05$ vs 第 6 周。下同。

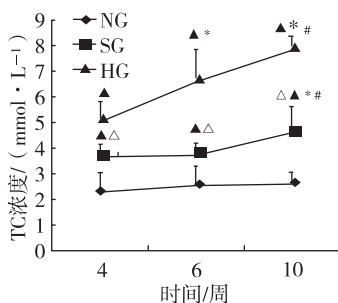


图 2 大鼠血清 TC 水平的变化

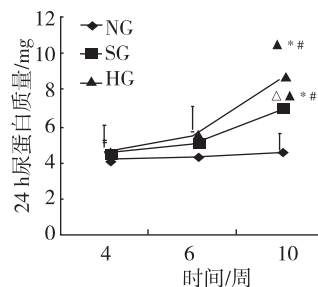


图 3 高脂饮食饲养的大鼠尿蛋白的变化

图 1 大鼠血清 LDL-C 水平的变化

实验第 10 周时 HG 和 SG 组大鼠尿蛋白水平较实验第 4 周和第 6 周明显升高($p < 0.05$);而 SG 组大鼠尿蛋白水平较同时间点 HG 组明显降低,两两比较差异具有显著性($p < 0.05$)。

2.3 病理变化

处理第 4 周时的大鼠肾组织 HE 染色结果显示,NG、SG、HG 组肾小球结构均较清晰,无系膜增生及毛细血管球分叶,差异不明显;处理第 10 周时的大鼠肾组织 HE 染色结果显示,NG 组肾小球结构清晰,无系膜增生及毛细血管球分叶;HG 组大鼠,肾小球呈轻微分叶状,系膜区增宽和基质增多不明显,但肾小球内有较明显的空泡

变性;SG 组大鼠的病变明显轻于 HG 组(图 4)。

2.4 免疫组化结果

免疫组化结果显示,在第 4 周时 NG 组、SG 组和 HG 组大鼠肾小球几乎不见蛋白表达(图 5A、B、C)。与 NG 组相比(图 5D),第 10 周时的 SG 组和 HG 组肾小球及周围组织中有 Angptl4 的表达, HG 组比 SG 组的表达明显增多(图 5E、F,表 1)。且 Angptl4 的表达主要集中表达于肾小球内,在肾小球附近的近曲小管也有分布(图 6)。

2.5 免疫印迹检测高脂饮食对肾脏 Angptl4 蛋白表达的影响

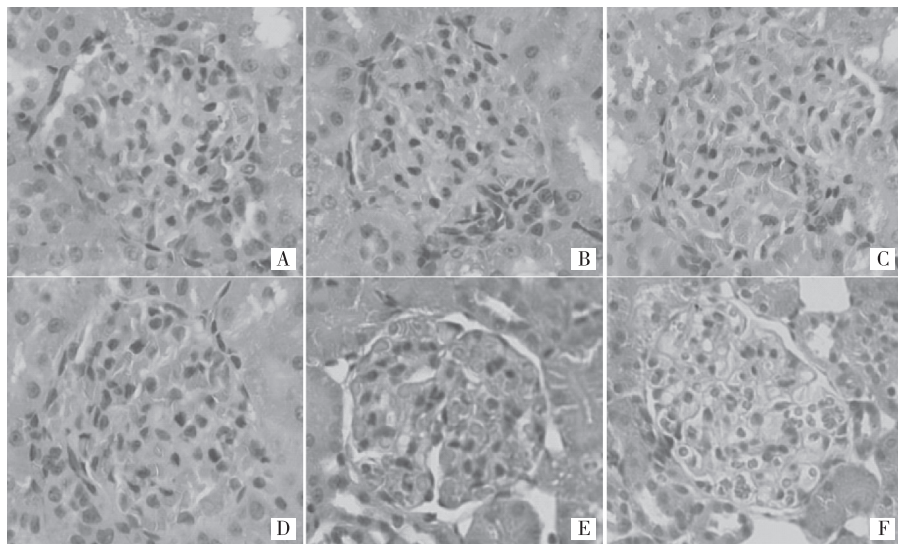
免疫印迹结果显示(图 7),第 10 周时 HG 组和 SG 组大鼠肾脏表达 Angptl4 水平较 NG 组明显升高。尤其是 HG 组升高更为明显。经灰度扫描和统计学分析,NG 组、HG 组和 SG 组两两比较,差异具有显著性($p < 0.05$)。

3 讨论

1982 年 Moorhead 等人^[5]提出“脂质肾毒性”假说后,血脂异常与肾脏损害相关性的研究得到国内外研究者的重视。并认识到高脂血症不仅是心血管疾病的危险因素,也是许多肾脏疾病的一种临床表现,还可以作为肾小球硬化发生发展的独立致病因素之一,但作用机制还不清楚。高胆固醇饮食可导致高脂血症,而高脂血症可引起肾小管间质病变和导致肾小球硬化,还会使已有的肾脏损害加重。

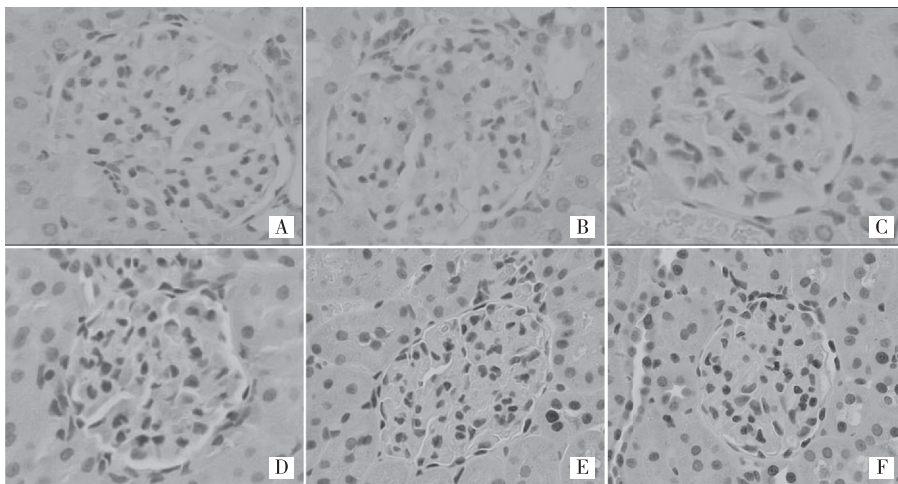
本研究采用高脂饮食喂养大鼠 4 周后,大鼠 LDL-C 和 TC 均增高,第 10 周时大鼠 24 h 尿蛋白定量均增加。同时在光镜下观察发现,随着高脂饮食喂养时间的延长,高脂饮食 10 周后, HG 组肾小球呈轻微分叶状,系膜区增宽和基质增多不明显,但肾小球内有较明显的空泡变性,而 SG 组与同时间点 HG 组比较,上述病变均明显减轻。表明脂代谢紊乱可导致明显的肾小球损伤。

足细胞(Podocyte)是肾小球固有的细胞之一,它依靠足突及足突间的裂孔膜共同构成肾小球滤过屏障的最外层,是阻止血浆蛋白丢失而形成蛋白尿的最后屏障^[6]。近来的一些研究证实,脂代谢紊乱早期主要导致肾小球足细胞的损伤而非系膜细胞的损伤^[7],但高脂导致足细胞损伤机制仍不清楚。Angptl4 是 Kim 等人^[8]在 2000 年发现的一种多功能分泌因子,它是一种循环型糖基化蛋白质激素,属于血管生成素家族。Angptl4 影响脂代谢



注:A:4 周 NG 组;B:4 周 SG 组;C:4 周 HG 组;D:10 周 NG 组;E:10 周 SG 组;F:10 周 HG 组。

图 4 高脂饮食饲养的大鼠肾小球损害(HE×400)



注:A:4 周 NG 组;B:4 周 SG 组;C:4 周 HG 组;D:10 周 NG 组;E:10 周 SG 组;F:10 周 HG 组。

图 5 高脂饮食大鼠肾小球 Angptl4 的表达(×400)

表 1 10 周时各组大鼠肾脏 Angptl4 蛋白表达的平均吸光度值

	NG	SG	NG
Angptl4 吸光度值	0.028±0.003	0.124±0.007*	0.267±0.013*#

注:* $p < 0.05$ vs NG; # $p < 0.05$ vs SG。

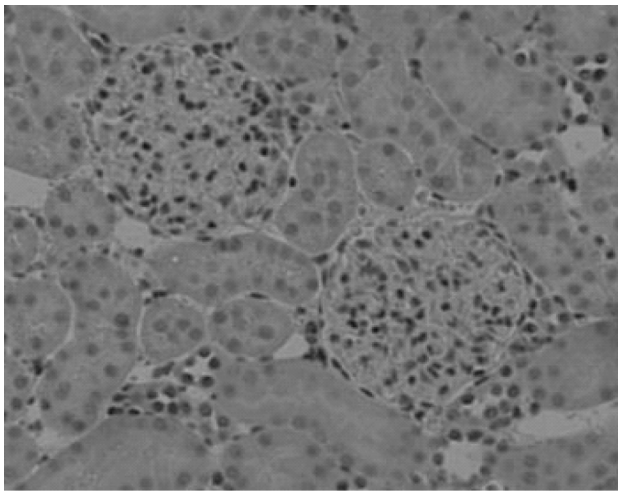
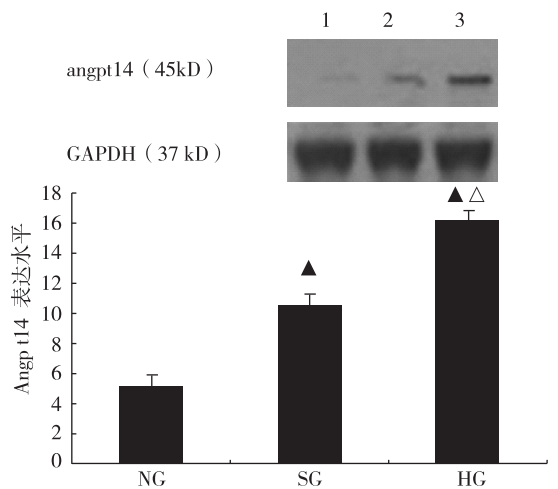


图 6 第 10 周时 HG 组大鼠肾小球 Angptl4 的表达($\times 100$)



注:1:NG;2:SG;3:HG。▲ $p < 0.05$ vs NG;△ $p < 0.05$ vs SG。

图 7 10 周后高脂饮食大鼠肾小球 Angptl4 蛋白的表达

的机制目前并不完全清楚,初步研究表明是通过抑制脂蛋白脂肪酶(LPL)活性而减少循环血中 TG 的清除,使血浆中 TG 水平升高。有学者发现,Angptl4 可能在微小病变型肾病(MCD)的发生中发挥了重要作用^[9]。

Chugh 等人^[3]发现用转 NPHS2-Angptl4 基因转染使小鼠足细胞特异性高表达 Angptl4,动物则出现有明显的蛋白尿,肾脏病理学检查表现为 MCD;免疫电子显微镜显示,Angptl4 横穿过基底膜并在基底膜沉积,表明肾小球足细胞特异性高表达 Angptl4 在 MCD 蛋白尿形成过程中发挥了重要作用。如在 SD 大鼠肾次全切除后予嘌呤霉素-氨基核苷(PAN)诱导的进行性肾小球硬化模型中发现,大鼠足细胞皮质 Angptl4 的表达明显增加^[10-11]。又如 Li 等人^[12]在用常见的恶性肿瘤化疗药物顺铂注射引起的急性肾损伤小鼠模型研究中发现,顺铂可能通过影响肾脏组织中 Angptl4 变化,进而调节肾组织 LPL 介导的脂代谢变化;进一步通过免疫染色定位显示,顺铂组小鼠 Angptl4 主要分布在未受损的近曲小管,本研究结果亦显示 Angptl4 在肾小球附近的近曲小管也有分布。

本研究进一步发现,高脂饮食喂养第 4 周时,各组间病理变化基本无差别;第 10 周时,NG 组肾小球内几乎没有 Angptl4 的表达,HG 组肾小球内 Angptl4 的表达明显增高,SG 组中 Angptl4 表达略有降低但明显高于 NG 组,两两比较差异有显著性($p < 0.05$)。免疫组化实验发现,Angptl4 主要表达于肾小球内,因此可以推测,在高脂的环境下,足细胞分泌 Angptl4 的增多而导致了肾小球的损害。这可能是脂代谢紊乱肾损害早期的环节之一。此外本研究还发现,在第 10 周时,Angptl4 的表达除在肾小球外,肾小管中也可表达一定量的 Angptl4,这可能和高脂饮食时导致肾小管间质病变有关。辛伐他汀则可能使高脂饮食时足细胞分泌 Angptl4 减少,来减轻高脂血症时肾小球受到的损害,从而起到保护作用。

参考文献:

- [1] Zhu P, Goh Y Y, Chin H F. Angiopoietin-like 4: a decade of research[J]. Biosci Rep, 2012, 32(3): 211-219.
- [2] Reiser J. Filtering new facts about kidney disease[J]. Nat Med, 2011, 17(1): 44-45.
- [3] Chugh S S, Clement L C, Macé C, et al. New insights into human minimal change disease: lessons from animal models[J]. Am J Kidney Dis, 2012, 59(2): 284-292.
- [4] Yang H C, Ma L J, Ma J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist is protective in podocyte injury-associated Sclerosis[J]. Kidney International, 2006, 69(10): 1756-1764.
- [5] Moorhead J F, Chan M K, Nahas M E. Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease[J]. Lancet, 1982, 320(8311): 139.
- [6] Doyonnas R, Kerhaw D B, Duhme C, et al. Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related protein podocalyxin[J]. J Exp Med, 2001, 194(1): 13-27.
- [7] Joles J A, Kunter U, Janssen U, et al. Early mechanism of renal injury in hypercholesterolemic or hypertriglyceridemic rats[J]. J Am Soc Nephrol, 2000, 11(4): 669-683.
- [8] Kim I, Kim H G, Kim H, et al. Hepatic expression, synthesis and secretion of a novel fibrinogen/angiopoietin related protein that prevents endothelial cell apoptosis[J]. Biochem J, 2000, 346(Pt3): 603-610.

- [9] Reiser J. Filtering new facts about kidney disease[J]. *Nat Med*, 2011, 17(1): 44-45.
- [10] Yang H C, Ma L J, Ma J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist is protective in podocyte injury-associated sclerosis[J]. *Kidney International*, 2006, 69(10): 1756-1764.
- [11] 章丽萍, 杜晓刚. 血管生成素样蛋白 4 及其在肾损害中的研究进展[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(8): 3555-3557.
- Zhang L P, Du X G. The research progress of angiotensin-like protein 4 and its effects on kidney injury[J]. *Chinese Journal of Clinicians: Electronic Edition*, 2013, 7(8): 3555-3557.
- [12] Li S, Nagothu K, Ranganathan G, et al. Reduced kidney lipoprotein lipase and renal tubule triglyceride accumulation in cisplatin-mediated acute kidney injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 303(3): F437-F448.

The Changes of Angptl4 in the Kidney of Hyperlipidemic Rats and the Protective Effect of Simvastatin

PENG Lan^{1,2}, FAN Neng-quan³, DU Xiao-gang²

(1. Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331;

2. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016;

3. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China)

Abstract: To investigate the changes in the expression of Angptl4 in the kidney of hyperlipidemic rats (*Rattus norvegicus*) and the protective effect of simvastatin, 45 individuals of SD rats were randomly divided into 3 groups. The control group ($n=15$) was fed with normal diet. The high fat group ($n=15$) was fed with high fat diet. The simvastatin group ($n=15$) was fed with high fat diet plus with simvastatin solution gavage ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). 5 rats were sampled randomly from each group at week 4, 6, and 10, respectively. The urinary protein excretion during 24 h, the serum cholesterol concentration, and the low density lipoprotein concentration were determined. The changes in histopathology of glomeruli were detected by paraffin section and microscope and the distribution and expression of Angptl4 were determined by immunohistochemistry and Western blot. The results showed that: The serum cholesterol concentration and the low density lipoprotein concentration increased significantly in high fat group and simvastatin group at week 4. At week 10, The 24 h urinary protein concentrations of high fat group and simvastatin group were significantly higher than the control group; The results of HE staining showed that the width of mesangial region and matrix did not significantly increase, there were obvious degenerations in the glomeruli especially in the high fat group, The glomeruli of high fat group showed light differential leaflike and weakly increase in the size of mesangial region and matrix, but obvious degeneration, suggesting heavier lesions in high fat group compared to simvastatin group. The results of immunohistochemical examination and Western blot showed that Angptl4 expressed more in the kidneys of high fat group than that of simvastatin group. The research indicated that hyperlipidemia can cause significant kidney glomerular lesions, which could be due to the increase of glomerular podocyte secretion. And simvastatin may make high fat diet podocyte secretion of Angptl4 reduced, to protect the hypercholesterolemia glomerular damage.

Key words: hyperlipidemic; glomerular; Angptl4; simvastatin; *Rattus norvegicus*

(责任编辑 方 兴)