

## 脂肪炎症因子在肾病综合征大鼠肾组织的变化及意义

闫波<sup>1</sup> 孟德娣<sup>1</sup> 袁丽萍<sup>2</sup> 楼研<sup>1</sup> 韩静<sup>1</sup>

**[摘要]**目的:观察脂肪炎症因子(Apelin)在阿霉素肾病大鼠模型肾组织中的表达,探讨Apelin与肾病综合征中蛋白尿及高脂血症之间的关系。方法:Wistar大鼠40只,随机分为肾病组32只和正常对照组8只,尾静脉单次注射阿霉素5 mg/kg,建立肾病模型,测定24 h尿蛋白排泄量、血清中胆固醇含量,应用免疫组织化学法观察肾皮质中Apelin表达变化,并对Apelin表达与尿蛋白、胆固醇水平进行相关性分析。结果:肾病组大鼠24 h尿蛋白排泄量、胆固醇含量、肾组织中Apelin蛋白表达量与正常对照组差异均有统计学意义( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ),肾病组大鼠肾小球系膜基质增生明显,且Apelin蛋白表达与24h尿蛋白排泄量、血清胆固醇含量呈正相关关系( $P < 0.05$ )。结论:Apelin在肾组织中的表达主要位于肾小球血管袢,随着尿蛋白量、胆固醇水平的增加,肾组织中Apelin蛋白水平亦增加。尿蛋白量及血脂水平与Apelin表达密切相关。

**[关键词]** 肾病综合征; 脂肪炎症因子; 阿霉素; 大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 692 [文献标识码] A

### Apelin expression in adriamycin-induced nephrotic rats and its significance in the development of nephrosis

YAN Bo<sup>1</sup>, MENG De-di<sup>1</sup>, YUAN Li-ping<sup>2</sup>, LOU Yan<sup>1</sup>, HAN Jing<sup>1</sup>

(1. Department of Medical Technology, Anhui Medical College, Hefei Anhui 230601;

2. Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui 230022, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of Apelin in kidney tissues of adriamycin-induced nephrotic rats and the relationship between Apelin and urine protein excretions, serum cholesterin in the development of nephrosis. **Methods:** Forty Wistar rats were divided into nephrosis group and control group. Rat model of Nephrosis was induced by single intravenous injection of adriamycin (ADR) 5 mg/kg, while control rat was intravenously injected with normal saline. The levels of urine protein excretions and serum cholesterin in 24 h were measured by chemical chromatometry. The changes of apelin expression in kidney were detected by method of HE and its correlations to urine protein and serum cholesterin were analyzed. **Results:** Compared with control group, the levels of 24 h urine protein excretions and serum cholesterin were significantly increased in nephrosis group ( $P < 0.05 - P < 0.01$ ). There was positive correlation between the expression of apelin protein in kidney tissues and the level of urine protein excretions or serum cholesterin ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** The Apelin expression is located in glomerular capillary loops. There is the levels of expression of urine protein excretions and serum cholesterin are closely related with the apelin expression in kidney is correlated with proteinuria and hyperlipidemia in the development of nephrosis.

**[Key words]** nephrotic syndrome; Apelin; adriamycin; rats

脂肪炎症因子(Apelin)具有广泛的生物学活性,在心血管系统中的作用已有相对较全面的研究<sup>[1-2]</sup>。后来研究<sup>[3]</sup>发现在肾脏的血管内皮细胞和上皮细胞中亦有Apelin的表达,其受体(APJ)在肾小球内皮细胞、足细胞、集合管等部位均有表达,在肾小球中表达最高。Apelin可通过APJ参与调节肾

脏的血流量或肾小球滤过,同时还能调节小管功能<sup>[3]</sup>。除此之外,Apelin还是一类新的脂类代谢调节剂,可通过增加胰岛素抵抗提高血脂水平。肾病综合征是由不同病因、多种病理变化所致的具有类似临床表现的一组综合征,以肾小球毛细血管壁对血浆蛋白通透性明显增高、血黏稠度不同程度的增高为病理特点。Apelin在肾病综合征中的表达及与蛋白尿和高脂血症产生的关系迄今未见报道。因此,本研究采用阿霉素诱导的微小病变型肾病综合征大鼠模型,初步探讨Apelin在肾脏组织中的表达水平,分析其与蛋白尿及高脂血症的关系。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 动物模型及分组 健康雄性Wistar大鼠40

[收稿日期] 2011-03-03

[基金项目] 安徽省高等学校优秀青年人才基金项目资助(2009SQRZ209)

[作者单位] 1. 安徽医学高等专科学校 医学技术系,安徽 合肥 230601; 2. 安徽医科大学第一附属医院 儿科,安徽 合肥 230022

[作者简介] 闫波(1976-)男,硕士,讲师。

[通讯作者] 袁丽萍,博士,主治医师。

只, 体重 180 ~ 200 g (安徽医科大学实验动物中心提供) 随机分为肾病组 32 只和正常对照组 8 只。参照 Boucher 等<sup>[4]</sup>方法, 肾病组尾静脉单次注射阿霉素 5 mg/kg, 正常对照组尾静脉单次注射等量生理盐水。造模 3 d 后, 每日用尿蛋白试纸检测尿蛋白情况, 若尿蛋白出现, 并且呈进行性加重, 尿蛋白定性 > (3+), 证明造模成功。于注射阿霉素后 7 d (ADR7)、14 d (ADR14)、21 d (ADR21)、28 d (ADR28) 随机处死肾病组大鼠各 8 只, 正常对照组于 28 d 时一次性处死。处死前收集 24 h 尿液, 并留取肾组织标本。

## 1.2 观察指标与方法

1.2.1 尿蛋白测定 分别于造模前、造模后第 7、14、21、28 天用代谢笼收集 24 h 尿液, 采用磺柳酸法各测定 24 h 尿蛋白定量。

1.2.2 血清生化指标 实验结束时取血, 用日本产 Olympus AU 640 型全自动生化分析仪检测大鼠血清中尿素氮 (BUN)、肌酐 (Scr)、白蛋白 (Alb)、胆固醇 (Cho), ELISA 试剂盒 (R&D 公司) 检测血清中 Apelin 水平。

1.2.3 肾脏病理学检查 实验结束时处死大鼠, 取肾皮质, 以 10% 甲醛溶液固定。标本脱水, 石蜡包埋, 切片, 进行 HE 和 PAS 染色。光学显微镜下观察各组大鼠肾标本的病理形态学变化, PAS 染色切片用天地公司病理图像分析系统进行分析, 计算肾小球系膜基质面积与肾小球面积之比 ( $M_s/G_s$ ), 此值即肾小球基质相对面积, 比较各组基质相对面积的差异。

1.2.4 肾组织中 Apelin 因子的表达 肾组织采集、固定、脱水、包埋、切片同上, Apelin 因子表达按

以下方法进行操作: 采用枸橼酸钠缓冲液热修复抗原, SP 法免疫组织化学染色, 苏木精对比染色; 已知阳性切片作阳性对照; 用 PBS 代替一抗作阴性对照。应用计算机图像分析系统对肾组织免疫组织化学结果进行半定量分析, 计算肾组织 Apelin 蛋白染色强弱。每只大鼠随机取 2 张切片, 每张切片取 5 个 400 倍物镜视野, 计算平均光密度的平均值, 即为 Apelin 蛋白阳性表达的相对含量。

1.3 统计学方法 采用方差分析、 $q$  检验、 $t$  检验和直线相关分析。

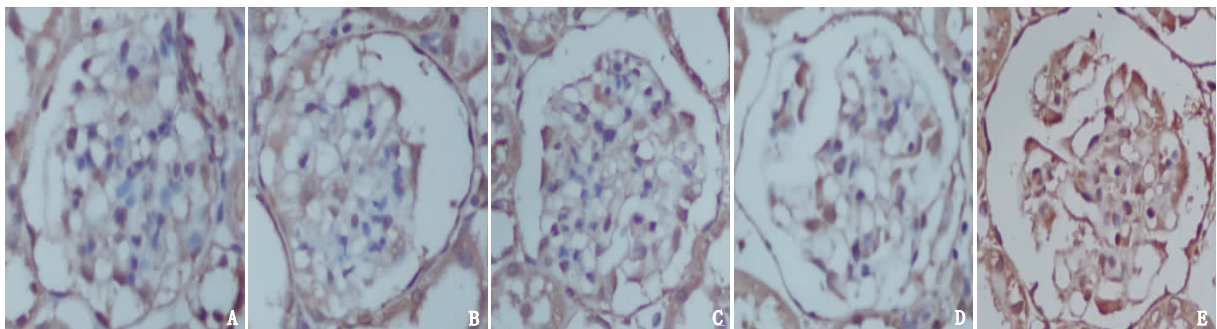
## 2 结果

2.1 Apelin 在阿霉素肾病大鼠肾小球的表达 光镜下, 阿霉素肾病组与正常对照组大鼠肾组织中 Apelin 染色均沿肾小球血管襻分布, 正常肾小球内可见少量的棕黄色颗粒表达。注射阿霉素 7 d 后, 大鼠肾小球内沿血管襻分布的棕黄色颗粒逐渐增多, Apelin 表达量逐渐增加, 至 28 d 时, 可见肾小球内沿血管襻广泛分布的棕黄色颗粒, Apelin 的表达量达最高水平, ADR14 ~ ADR28 组与对照组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (见图 1、表 1)。

表 1 各组大鼠肾小球内 Apelin 蛋白表达比较 ( $n_i = 8; \bar{x} \pm s$ )

分组	Apelin 蛋白表达量	$F$	$P$	$MS_{组内}$
正常对照组	0.17 ± 0.02			
ADR7	0.20 ± 0.04			
ADR14	0.28 ± 0.03 **	148.76	<0.01	0.001
ADR21	0.37 ± 0.05 **			
ADR28	0.55 ± 0.03 **			

$q$  检验: 与正常对照组比较 \*\*  $P < 0.01$



A: 正常对照组; B: ADR7; C: ADR14; D: ADR21; E: ADR28

图 1 免疫组织化学法检测各组大鼠肾小球内 Apelin 蛋白表达

2.2 阿霉素注射后各组大鼠血清中 Apelin 含量变化 阿霉素注射 7 d 时, 大鼠血清中 Apelin 水平开始升高, 但与同一时间正常对照组差异无统计学意义

( $P > 0.05$ ); 14 d 和 21 d 时, 注射阿霉素大鼠血清中 Apelin 水平仍在升高, 28 d 时, 其血清中 Apelin 水平最高, 显著高于同一时间正常对照组 Apelin 水平

( $P < 0.01$ ) (见表 2)。

表 2 各组大鼠血清中 Apelin 水平比较( $n_i = 8; \bar{x} \pm s; \text{pg/ml}$ )

分组	ADR0	ADR7	ADR14	ADR21	ADR28
正常对照组	252.14 ± 50.24	254.20 ± 45.23	255.02 ± 49.26	260.03 ± 60.51	263.09 ± 54.48
肾病组	253.61 ± 54.12	260.25 ± 56.98	288.72 ± 63.47	314.85 ± 43.64	348.63 ± 56.51
<i>t</i>	0.06	0.24	1.19	2.08	3.08
<i>P</i>	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05

2.3 各组大鼠病理组织学变化 正常对照组大鼠肾小球系膜基质无增生,肾小管管腔正常,肾间质小血管无改变;肾病组大鼠肾小球系膜基质增生明显,肾间质血管淤血严重。PAS 染色结果显示模型组大鼠肾小球基质相对面积( $M_s/G_s$ )从注射阿霉素 7 d 后逐渐升高,28 d 时达高峰,与正常对照组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ) (见表 3)。

表 3 各组大鼠  $M_s/G_s$  变化比较( $n_i = 8; \bar{x} \pm s$ )

分组	$M_s/G_s$	<i>F</i>	<i>P</i>	$MS_{\text{组内}}$
正常对照组	27.71 ± 3.50			
ADR7	30.36 ± 2.58*			
ADR14	33.28 ± 1.86**	61.89	<0.01	0.264
ADR21	39.17 ± 2.05**			
ADR28	44.94 ± 2.18**			

*q* 检验:与正常对照组比较\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$

2.4 尿蛋白量以及血脂水平与 Apelin 表达量的相

表 4 各组大鼠 24h 尿蛋白量比较( $n_i = 8; \bar{x} \pm s; \text{mg/24 h}$ )

分组	ADR0	ADR7	ADR14	ADR21	ADR28
正常对照组	10.01 ± 1.52	10.10 ± 1.31	11.27 ± 1.60	14.97 ± 3.08	15.89 ± 3.06
肾病组	10.12 ± 1.25	16.00 ± 1.56	49.55 ± 9.32	86.13 ± 15.60	120.81 ± 16.91
<i>t</i>	0.16	8.19	11.45	12.66	17.27
<i>P</i>	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 5 各组大鼠血清中 cho 水平比较( $n_i = 8; \bar{x} \pm s; \text{mmol/L}$ )

分组	ADR0	ADR7	ADR14	ADR21	ADR28
正常对照组	1.51 ± 0.24	1.42 ± 0.32	1.52 ± 0.36	1.60 ± 0.51	1.63 ± 0.58
肾病组	1.44 ± 0.15	2.11 ± 0.63	3.47 ± 1.64	5.21 ± 1.64	6.06 ± 4.38
<i>t</i>	0.70	2.76	3.28	5.95	2.84
<i>P</i>	>0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.05

关分析 注射阿霉素 7 d 后,大鼠 24 h 尿蛋白排泄量开始增加,并明显高于与同一时间正常对照组尿蛋白的排泄量( $P < 0.01$ );至 28 d,大鼠 24 h 尿蛋白排泄量达到最大值,亦显著高于同一时间的正常对照组排泄量( $P < 0.01$ ) (见表 4)。注射阿霉素 7 d 后肾病组大鼠出现血清总 Cho 水平亦逐渐升高;随着时间的进展,血清总 Cho 持续升高,注射阿霉素 14 ~ 28 d 后,各时间点总 Cho 水平高于正常对照组( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ) (见表 5)。

Apelin 在肾小球中的表达量与大鼠 24 h 尿蛋白量( $\text{mg/24 h}$ )呈显著正相关关系( $\hat{Y} = 0.062X + 0.323$ ,  $r = 0.905$ ,  $P < 0.05$ ),且 Apelin 在肾小球中的表达量与阿霉素大鼠血清中 Cho 含量亦呈正相关关系( $\hat{Y} = 0.205 + 0.006X$ ,  $r = 0.587$ ,  $P < 0.05$ ) (见图 2)。

3 讨论

Apelin 是新近发现的小分子血管活性多肽,它是 1993 年发现的一种新的 G 蛋白偶联受体<sup>[2]</sup>,其

基因序列和血管紧张素 I 受体 1 的疏水跨膜区有 40% ~ 50% 同源,故被命名为血管紧张素受体样蛋白 J 受体,简称 APJ 受体。Apelin 及其受体系统广泛分布于人和鼠类等哺乳动物体内,大鼠的心、肺、

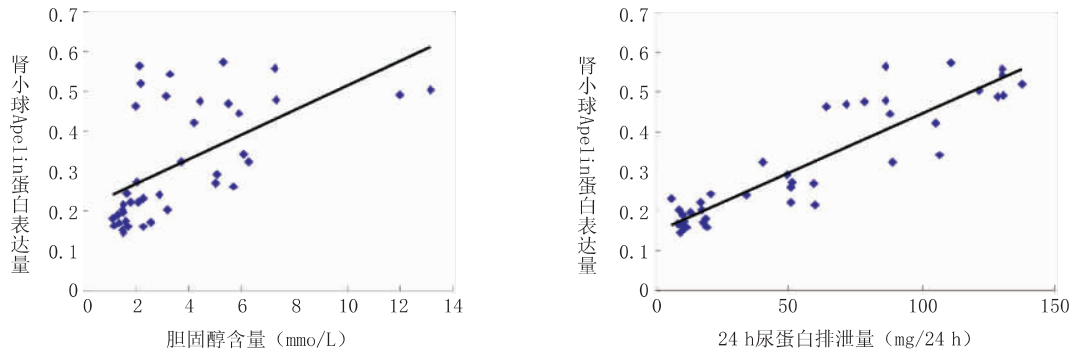


图 2 肾小球中Apelin蛋白与尿蛋白、胆固醇的相关分析

肾、脑各器官的小动脉内皮及心、肺、肾和肾上腺的血管内皮细胞等都有它们的存在,并以内分泌、旁分泌/自分泌方式参与了机体心血管系统稳态、水盐平衡、减少抗利尿激素释放、免疫反应等多种生理功能的调节<sup>[5]</sup>。而有关 Apelin 与肾病发生蛋白尿及高脂血症产生的关系却未见报道。因此,研究 Apelin 在肾病综合征中的作用对于进一步阐明其发病机制,寻求新的治疗肾病综合征的药物提供新的方向。

本研究在阿霉素肾病大鼠和正常大鼠肾组织中均观察到 Apelin 蛋白的表达,但前者随着尿蛋白量的增加和高脂血症程度的加重,肾小球中 Apelin 蛋白表达水平呈逐渐增高的趋势,第 14 天开始明显高于正常对照组大鼠,第 28 天达高峰,与 24 h 尿蛋白量呈显著正相关关系,提示 Apelin 可能参与阿霉素肾病大鼠蛋白尿的形成。本实验对阿霉素肾病大鼠血清中 Apelin 水平进行了检测,发现注射阿霉素后 14 d 大鼠血清中 Apelin 水平显著升高,其幅度明显高于肾组织中 Apelin 的表达,推测 Apelin 参与蛋白尿的发生可能是由于血清中升高的 Apelin 作用于肾小球内皮细胞中其相应的受体 APJ 损伤肾小球滤过膜所致。

另一方面,多项研究<sup>[6]</sup>证实 Apelin 在调节脂类代谢方面具有重要作用,可造成血脂水平升高。Li 等<sup>[7]</sup>发现 Apelin 在肥胖中起着重要作用,空腹血浆中 Apelin 水平与甘油三酯和低密度脂蛋白呈正相关。在阿霉素肾病大鼠的病理过程中存在严重的高脂血症,我们在研究中发现肾小球内 Apelin 蛋白水平与胆固醇水平之间存在正相关关系。因而推测肾小球内 Apelin 水平增高可能与高脂血症损伤肾小球

血管内皮细胞,激活内皮细胞,导致内皮细胞合成 Apelin 增多。

综上所述,在阿霉素肾病大鼠蛋白尿及高脂血症产生过程中存在 Apelin 表达的增高,然而在蛋白尿和血脂水平逐渐恢复的过程中,Apelin 蛋白在肾组织中的表达是否还存在相应的改变以及 Apelin 与祖细胞分子网络之间的关系尚需要深入探讨研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, *et al.* Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251(2): 471-476.
- [2] Medhurst AD, Jennings CA, Robbins MJ *et al.* Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin [J]. *J Neurochem*, 2003, 84(12): 1162-1172.
- [3] Kleinz MJ, Davenport AP. Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide Apelin to human vascular and endocardial endothelial cells [J]. *Regul Peptides*, 2004, 118(3): 119-125.
- [4] Boucher J, Masri B, Daviaud D *et al.* Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(4): 1764-1771.
- [5] Bertani T, Poggi A, Biol-Sci D *et al.* Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats [J]. *Lab Invest*, 1982, 46(1): 16-23.
- [6] Zhang DL, Liao H, Wei YY *et al.* Elevation of serum Apelin-13 is positively correlated with ADMA in patients on maintenance hemodialysis [J]. *Clin Nephrol*, 2009, 71(4): 405-412.
- [7] Li L, Yang G, Li Q *et al.* Changes and relationships of circulating visfatin, apelin and resistin levels in morbid obesity and effect of gastric banding [J]. *Regul Pept*, 2005, 130(1/2): 7-13.

(本文编辑 马启)