

## Apelin-13 对高血压性肾纤维化的影响及机制研究

韦建辉<sup>1</sup>, 廖兰<sup>2</sup>, 关玉珍<sup>2</sup>, 余坤<sup>2</sup>

(1.柳州市人民医院泌尿内科,广西柳州市 545006;2.广西科技大学生物与化学工程学院,广西柳州市 545006)

[关键词] Apelin-13; 高血压; 肾纤维化; 自噬; 自噬相关蛋白

[摘要] **目的** 探讨血管紧张素受体 AT1 相关的受体蛋白(APJ)激动剂 Apelin-13 对高血压性肾纤维化的影响及其机制。**方法** 12 周龄雄性自发性高血压大鼠随机分为对照组、1  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组、10  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组、100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组;Apelin-13 通过尾静脉给药。测量大鼠 24 h 尿蛋白量、血清肌酐和尿素氮浓度。采用套尾法测量尾动脉收缩压,HE 染色和 Masson 染色观察大鼠肾脏组织学改变,Western blot 检测肾脏组织中自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)、Beclin-1 和 p62 的表达。**结果** 与对照组比较,10  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组、100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组以剂量依赖方式降低大鼠收缩压、24 h 尿蛋白量、血清肌酐和尿素氮水平、肾脏损伤评分和胶原容积分数(均  $P < 0.05$ ),减轻肾小管上皮细胞水肿,减少间质胶原沉积,降低肾间质纤维化程度。10  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组、100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组也以剂量依赖方式增加大鼠肾脏组织中 LC3-II 表达和 LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin-1 表达,降低 p62 表达(均  $P < 0.05$ )。**结论** Apelin-13 抑制高血压性肾纤维化的进展,其机制可能与 Apelin-13 抑制细胞自噬有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effect of Apelin-13 on hypertensive renal fibrosis and mechanism study

WEI Jian-Hui<sup>1</sup>, LIAO Lan<sup>2</sup>, GUAN Yu-Zhen<sup>2</sup>, YU Kun<sup>2</sup>

(1. Department of Renal Internal Medicine, the People's Hospital of Liuzhou City, Liuzhou, Guangxi 545006, China; 2. College of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou, Guangxi 545006, China)

[KEY WORDS] Apelin-13; Hypertension; Renal fibrosis; Autophagy; Autophagy related protein

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of putative receptor protein related to the angiotensin receptor AT1 (APJ) agonist Apelin-13 on the hypertensive renal fibrosis and to explore the possible mechanism in spontaneously hypertensive rat (SHR). **Methods** Male SHRs of 12 weeks old were randomly divided into control group and 1  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 group, 10  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 group, 100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 group. The rats were administrated with Apelin-13 by tail vein for 12 weeks. 24 h urine protein was continuously measured. Serum creatinine and urea nitrogen were measured. Systolic blood pressure (SBP) was continuously measured by tail method. Histological change of kidney was observed by HE staining and Masson staining. The expressions of autophagy related protein microtubule-associated protein light chain-3 (LC3), Beclin-1 and the autophagy substrates p62 in the kidney were determined by Western blot.

**Results** Compared with control group, SBP, 24 h urine protein, serum creatinine and urea nitrogen, renal injury score and collagen volume fraction were significantly decreased in dose-dependent manner in 10  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 group and 100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 group (all  $P < 0.05$ ). The edema of renal tubular epithelial cells was alleviated, the interstitial collagen deposition was decreased, and the degree of renal interstitial fibrosis was decreased in 10  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 group and 100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 group. Compared with control group, LC3-II expression, LC3-II/LC3-I ratio and Beclin-1 expression were significantly increased and p62 expression was significantly decreased in kidney in dose-dependent manner in 10  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 group and 100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 group (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Apelin-13 inhibits the progression of hypertensive renal fibrosis, and its mechanism may be related to the inhibition of autophagy by Apelin-13.

高血压性肾纤维化是常见的高血压肾脏并发症,可导致肾单位丢失,肾脏结构毁损和肾功能的恶化,最终导致肾脏功能丧失<sup>[1]</sup>。肾纤维化的发病机制还未阐明,与细胞外基质在肾脏的过度沉积有关<sup>[2-3]</sup>。自噬是真核生物中用于降解和回收利用细胞内生物大分子和受损细胞器的过程<sup>[4]</sup>。自噬参与了细胞外基质代谢的调控,与肾纤维化的发生发展密切相关<sup>[5]</sup>。Apelin 是 G 蛋白耦联受体血管紧张素受体 AT1 相关的受体蛋白 (putative receptor protein related to the angiotensin receptor AT1, APJ) 的天然配体<sup>[6]</sup>。Apelin/APJ 系统在肾脏有广泛的表达,与肾脏纤维化关系密切<sup>[7]</sup>;在进行血液透析的肾纤维化患者,血浆 Apelin 水平明显低于正常人群<sup>[8]</sup>。因此本研究拟观察 APJ 激动剂 Apelin-13 对肾纤维化的影响,并从细胞自噬的角度探讨 Apelin-13 抑制大鼠肾纤维化的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR) 由中国科学院上海实验动物中心提供,12 周龄,雄性,体重  $240 \pm 20$  g。

### 1.2 药品、试剂和仪器

Apelin-13 (北京康肽生物科技有限公司),兔抗鼠 Beclin-1、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein light chain-3, LC3)、p62 和  $\beta$ -actin 一抗单克隆抗体以及辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗 (Santa Cruz 公司)。RBP-1B 型大鼠尾压计 (中日友好临床医学研究所),垂直电泳仪与转膜系统 (美国 Hoefer 公司),CK2 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司)。

### 1.3 实验动物和分组

SHR 大鼠适应性喂养 1 周后分为 4 组,每组 10 只。1、10、100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组:大鼠尾静脉注射给予 1、10、100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13,处理 12 周;对照组:大鼠通过尾静脉注射等体积生理盐水,处理 12 周。大鼠每笼饲养 4~6 只,用大鼠代谢笼留取 24 h 尿液,自由进食水,由专人负责饲养,每天保持 12 h 光照,温度为  $22^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ 。

### 1.4 标本留取

每周称量体重,根据体重调整给药剂量。每 3 周采用套尾法测量尾动脉收缩压。通过代谢笼每 3 周留取 24 h 尿液,采用双缩脲法检测 24 h 尿蛋白量。12 周后,采用 0.4% 戊巴比妥钠按 50 mg/kg 体

重腹腔注射麻醉大鼠。左侧颈总动脉插管,放血 5 mL,分离血清,全自动生物化学分析仪测定血清肌酐和尿素氮水平。放血处死大鼠,迅速摘取双侧肾脏,一侧肾脏放入液氮中速冻,然后放入  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存;另一侧肾脏放入 10% 中性甲醛中固定。

### 1.5 HE 染色和 Masson 染色

固定后的肾组织常规包埋,切片,分别进行 HE 染色和 Masson 染色。显微镜下观察并拍照,采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件对图像进行分析,HE 染色切片分别用等级 0 到 4 进行肾小球和肾间质损伤的半定量评分,并计算损伤的平均积分<sup>[9]</sup>。Masson 染色切片在 200 倍视野进行观察,蓝染区域为胶原沉积,测量胶原沉积面积和图像总面积,计算胶原容积分数 (collagen volume fraction, CVF),  $\text{CVF} = \text{胶原沉积面积} / \text{图像总面积} \times 100\%$ <sup>[10]</sup>。

### 1.6 Western blot 检测

收集肾组织,剪成小碎,在冰上碾碎,加入蛋白裂解液,提取细胞总蛋白。BCA 法测定样本的蛋白浓度。蛋白样本在 2 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液中煮沸。SDS-PAGE 分离蛋白,用半干转膜仪将蛋白转移到聚偏氟乙烯 (polyvinyl fluoride, PVDF) 膜。5% 脱脂牛奶室温下孵育 PVDF 膜 2 h。加入兔抗鼠 Beclin-1 (1:300)、LC3 (1:200)、p62 (1:300) 和  $\beta$ -actin (1:400) 的一抗,4 $^\circ\text{C}$  过夜。加入辣根过氧化物酶标记的二抗,4 $^\circ\text{C}$  下孵育 4 h。蛋白质印迹荧光光检测试剂盒曝光于 X 光片,经显影、定影后,凝胶图像分析系统对胶片扫描及半定量分析。

### 1.7 统计学处理

计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,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。采用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行分析, $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Apelin-13 对高血压大鼠收缩压的影响

在实验第 3 周,100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组大鼠收缩压与对照组比较显著降低 ( $P < 0.05$ );在实验第 6、9 和 12 周,10  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组、100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组大鼠收缩压与对照组、1  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较均显著降低 (均  $P < 0.05$ )。在实验第 12 周,100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组大鼠收缩压与 10  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较显著降低 ( $P < 0.05$ )。Apelin-13 对大鼠收缩压的影

响呈现剂量依赖性(表 1)。

表 1. Apelin-13 对高血压大鼠收缩压的影响( $n=10$ , mmHg)

Table 1. Effect of Apelin-13 on the systolic blood pressure of hypertensive rats ( $n=10$ , mmHg)

分 组	0 周	3 周	6 周	9 周	12 周
对照组	169.63±15.84	186.64±16.74	198.85±18.25	213.62±18.35	231.84±19.26
1 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ Apelin-13 组	171.32±21.37	184.43±15.93	195.13±17.51	208.41±19.17	221.42±18.34
10 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ Apelin-13 组	167.85±17.96	182.63±21.63	185.43±22.81 <sup>ab</sup>	187.33±15.97 <sup>ab</sup>	184.42±16.72 <sup>ab</sup>
100 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ Apelin-13 组	172.34±15.82	178.64±17.94 <sup>a</sup>	180.72±18.62 <sup>ab</sup>	181.53±18.03 <sup>ab</sup>	172.85±20.15 <sup>abc</sup>

a 为  $P<0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 1  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较; c 为  $P<0.05$ , 与 10  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较。

## 2.2 Apelin-13 对高血压大鼠肾脏功能的影响

实验第 3 周, 100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组 24 h 尿蛋白量与对照组比较显著降低( $P<0.05$ ); 实验第 6、9、12 周, 10  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组、100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组 24 h 尿蛋白量与对照组、1  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较均显著降低(均  $P<0.05$ ); 实验第 12 周, 100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组 24 h 尿蛋白量与 10  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较显著降低( $P<0.05$ )。Apelin-13 对大鼠 24 h 尿蛋白量的影响呈现

剂量依赖性(表 2)。

实验 12 周后, 动脉采血测定大鼠血清肌酐和尿素氮水平。与对照组、1  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较, 10  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组、100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组血清肌酐和尿素氮水平均显著降低(均  $P<0.05$ ); 100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组血清肌酐和尿素氮水平比 10  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组显著降低( $P<0.05$ )。Apelin-13 对大鼠血清肌酐和尿素氮水平的影响呈现剂量依赖性(表 3)。

表 2. Apelin-13 对高血压大鼠 24 h 尿蛋白量的影响( $n=10$ , mg)

Table 2. Effect of Apelin-13 on the level of 24 h urine protein of hypertensive rats ( $n=10$ , mg)

分 组	0 周	3 周	6 周	9 周	12 周
对照组	17.94±1.34	23.81±1.94	29.65±3.25	34.26±2.84	38.83±4.32
1 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ Apelin-13 组	16.94±2.07	22.91±2.34	27.34±2.11	32.66±3.61	35.39±3.95
10 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ Apelin-13 组	18.71±1.52	21.52±3.14	22.87±2.29 <sup>ab</sup>	24.93±2.38 <sup>ab</sup>	25.14±1.84 <sup>ab</sup>
100 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ Apelin-13 组	17.26±1.13	19.72±1.42 <sup>a</sup>	20.77±1.75 <sup>ab</sup>	19.86±2.13 <sup>ab</sup>	18.34±2.07 <sup>abc</sup>

a 为  $P<0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 1  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较; c 为  $P<0.05$ , 与 10  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较。

表 3. Apelin-13 对高血压大鼠血清肌酐和尿素氮水平的影响( $n=10$ )

Table 3. Effect of Apelin-13 on the levels of serum creatinine and urea nitrogen of hypertensive rats ( $n=10$ )

分 组	肌酐(mmol/L)	尿素氮( $\mu\text{mmol/L}$ )
对照组	68.72±6.21	13.64±2.05
1 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ Apelin-13 组	61.23±5.34	12.97±1.64
10 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ Apelin-13 组	42.81±5.16 <sup>ab</sup>	8.13±1.13 <sup>ab</sup>
100 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ Apelin-13 组	29.73±2.04 <sup>abc</sup>	6.48±0.86 <sup>abc</sup>

a 为  $P<0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 1  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较; c 为  $P<0.05$ , 与 10  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较。

## 2.3 Apelin-13 对高血压大鼠肾脏形态结构的影响

HE 染色结果显示, 对照组大鼠肾脏小动脉的管壁增厚, 管腔变窄, 肾皮质和髓质变薄, 有炎性细胞浸润, 肾小管上皮细胞水肿, 部分肾小管萎缩, 肾间质成纤维细胞增生。Masson 染色结果显示, 肾间质中可见明显胶原沉积; 肾脏损伤评分增加, 符合

高血压性肾纤维化的特征。与对照组比较, 10  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组、100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组肾脏小动脉管壁明显变薄, 管腔增宽, 肾小球结构清晰, 肾小管上皮细胞水肿减轻, 没有明显的肾小管萎缩, 肾间质成纤维细胞减少, 间质胶原沉积明显减少, 肾间质纤维化程度明显降低(图 1)。与对照组、1

$\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较,  $10 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组、 $100 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组肾脏损伤评分和 CVF 均显著降低 (均  $P < 0.05$ ); 与  $10 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较,  $100 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$

Apelin-13 组肾脏损伤评分和 CVF 均显著降低 (均  $P < 0.05$ )。Apelin-13 对肾脏损伤评分和 CVF 的影响呈现剂量依赖性 (表 4)。

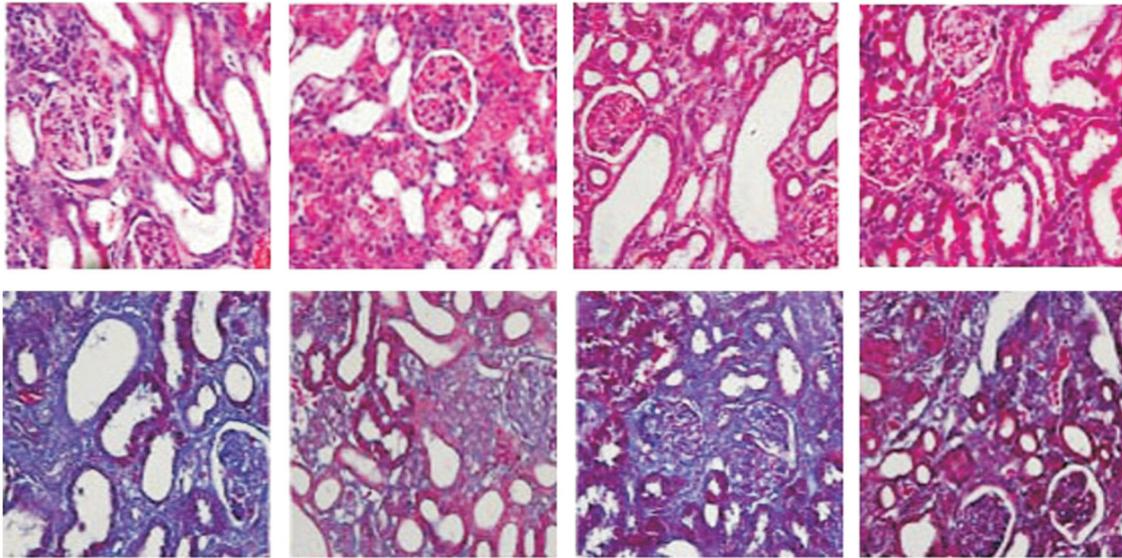


图 1. Apelin-13 对高血压大鼠肾脏组织形态学的影响 (200 $\times$ ) 上图为 HE 染色, 下图为 Masson 染色。从左到右依次为对照组、 $1 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组、 $10 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组、 $100 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组。

Figure 1. Effect of Apelin-13 on the tissue morphology of kidney in hypertensive rats (200 $\times$ )

表 4. Apelin-13 对高血压大鼠肾脏损伤评分和 CVF 的影响 ( $n = 10$ )

Table 4. Effect of Apelin-13 on the renal injury score and CVF in hypertensive rats ( $n = 10$ )

分 组	肾脏损伤评分		CVF (%)	
	肾小球	肾小管	肾小球	肾小管
对照组	$3.15 \pm 0.43$	$3.52 \pm 0.51$	$18.64 \pm 2.65$	$13.43 \pm 2.07$
$1 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ Apelin-13 组	$3.12 \pm 0.35$	$3.47 \pm 0.41$	$17.38 \pm 2.03$	$12.65 \pm 1.86$
$10 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ Apelin-13 组	$2.37 \pm 0.28^{\text{ab}}$	$2.86 \pm 3.12^{\text{ab}}$	$10.24 \pm 1.47^{\text{ab}}$	$6.81 \pm 0.79^{\text{ab}}$
$100 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ Apelin-13 组	$2.03 \pm 0.27^{\text{abc}}$	$2.35 \pm 0.22^{\text{abc}}$	$5.67 \pm 0.89^{\text{abc}}$	$3.26 \pm 0.51^{\text{abc}}$

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与  $1 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与  $10 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较。

#### 2.4 大鼠肾脏组织 LC3、Beclin-1 和 p62 表达的变化

与对照组、 $1 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较,  $10 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组、 $100 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组大鼠肾脏组织中 LC3-II 表达和 LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin-1 表达均显著增加 (均  $P < 0.05$ ), 而 p62 表达显著降低 ( $P < 0.05$ )。与  $10 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较,  $100 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组大鼠肾脏组织中 LC3-II 表达和 LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin-1 表达均显著增加 (均  $P < 0.05$ ), 而 p62 表达显著降低 ( $P < 0.05$ )。Apelin-13 对自噬相关蛋白表达的影响呈现剂量依赖性 (图 2)。

### 3 讨 论

肾纤维化是高血压引起肾病理损害的主要表现, 是导致肾功能衰竭的重要病因。高血压性肾纤维化严重危害人类的健康, 一方面是由于血压控制不理想, 另一方面是目前还缺乏有效治疗高血压肾纤维化的药物。阐明高血压肾纤维化的发生机制, 寻找新的安全有效的防治高血压性肾纤维化的方法已成为目前的焦点问题。SHR 是由 Okamoto 在 1963 年用 Wistar 大鼠培育而产生的, 其高血压的发生率高, 很多生理学特征接近人类, 是目前公认的人类原发性高血压的理想动物模型, 广泛用于高血

压及其并发症的研究<sup>[11]</sup>。

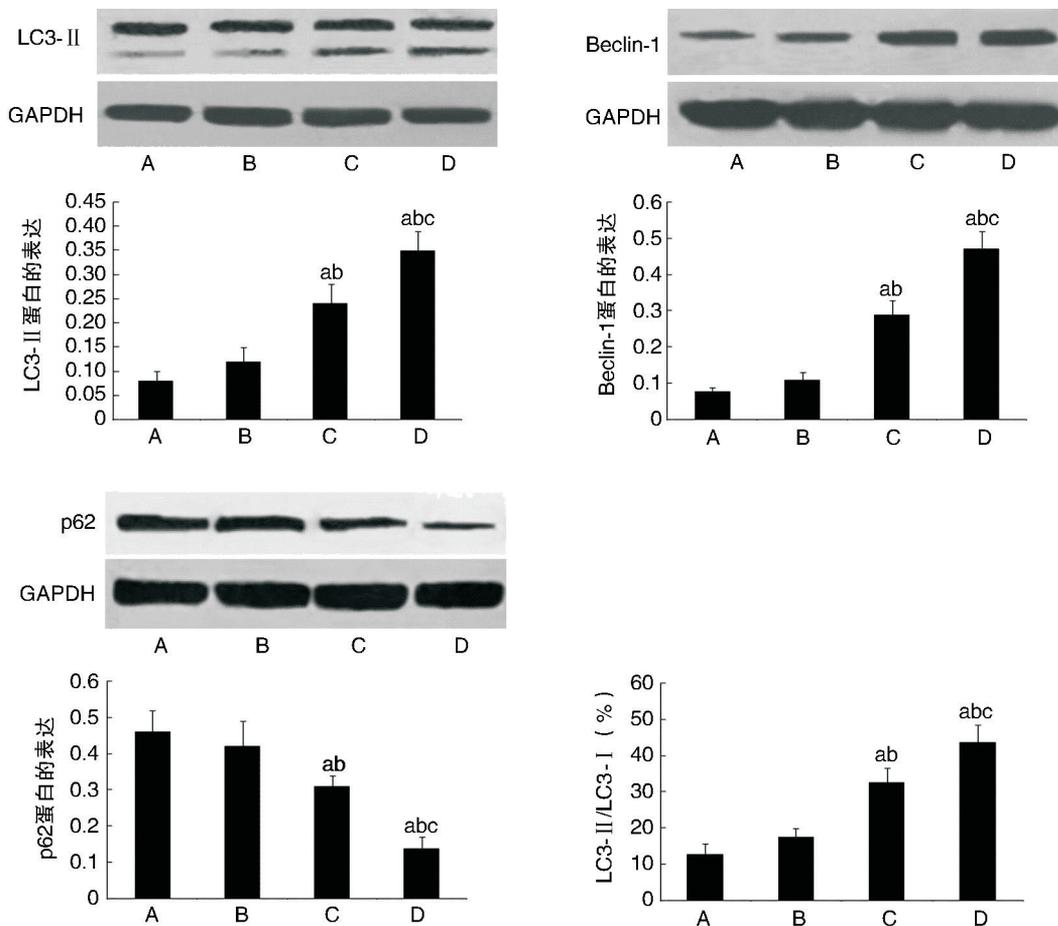


图 2. Apelin-13 对高血压大鼠肾脏 Beclin-1、LC3 和 p62 表达的影响 ( $n=10$ ) A 为对照组, B 为  $1 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组, C 为  $10 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组, D 为  $100 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组。a 为  $P<0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.05$ , 与  $1 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较; c 为  $P<0.05$ , 与  $10 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  Apelin-13 组比较。

Figure 2. Effect of Apelin-13 on the expressions of Beclin-1, LC3 and p62 of kidney in hypertensive rats ( $n=10$ )

Apelin 是从牛胃分泌物中提取的多肽, 是 APJ 的内源性配体。Apelin/APJ 系统在全身的多个系统和器官均有分布。Apelin/APJ 系统与多种促纤维化细胞因子之间存在相互联系, 参与了多种器官纤维化的发生, 包括心肌纤维化、肝脏纤维化和肾脏纤维化等。研究发现外源性 Apelin-13 对糖尿病大鼠心肌纤维化的发生具有抑制作用, 其机制可能与抑制 TGF- $\beta$ 1/T $\beta$ R/Smads 信号通路的过度激活有关<sup>[12]</sup>。Apelin-13 通过下调转化生长因子  $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) 的表达而上调基质金属蛋白酶的表达改善糖尿病心肌间质纤维化<sup>[13]</sup>。外源性 Apelin-13 抑制腹主动脉缩窄法诱导的大鼠心肌纤维化, 其机制可能通过调节基质金属蛋白酶 2/基质金属蛋白酶抑制物 1 的表达, 抑制细胞外基质合成<sup>[14]</sup>。在进行维持性血液透析的肾纤维化患者的血浆中 Apelin 的水平明显低于正常人

群<sup>[8]</sup>。伴有冠心病的肾衰进行透析的患者, 其血浆的 Apelin 水平会显著低于不伴有冠心病的患者<sup>[15]</sup>。本研究的结果显示 Apelin-13 减少了 SHR 肾间质成纤维细胞, 减少了间质胶原沉积, 降低了肾间质纤维化的程度, 降低了肾脏损伤评分和 CVF, 这表明 Apelin-13 能抑制高血压性肾纤维化。

自噬是一种真核细胞进化过程中高度保守的机制, 在自噬相关基因的调控下利用溶酶体降解细胞内长寿蛋白质、受损细胞器和入侵微生物。LC3 和 Beclin-1 是自噬标志性蛋白, LC3 最初合成一个未处理的形式即前体 LC3, 但立即被 Atg4 裂解, 产生一种活跃的细胞溶质形式被称为 LC3-I。随着 Atg7 的催化和 E2 酶 At93 的结合, LC3-I 和丰富的膜磷脂即磷脂酰乙醇胺相互作用产生了 LC3-II。因为 LC3-II 的相对量反映了自噬体的含量, LC3-II/LC3-I 常用于自噬水平的标记。p62 是自噬降

解的标志物,它常用来反映自噬活性。自噬作为一种存活机制,在损伤因素作用下,能改变肾脏的细胞自噬水平,维持细胞内稳态平衡,因此自噬参与了肾脏纤维化的发生发展。细胞自噬水平低可促进肾纤维化的发生,自噬可调节 TGF- $\beta$  的表达抑制肾脏纤维化的形成<sup>[16-17]</sup>。本研究的结果显示 Apelin-13 增加 SHR 肾脏组织中的 LC3-II 的表达和 LC3-II/LC3-I 的比值及 Beclin-1 的表达,降低 SHR 肾脏组织中 p62 的表达。这些结果说明 Apelin-13 能抑制 SHR 肾脏组织中细胞自噬的水平,这可能是 Apelin-13 抑制肾纤维化机制。细胞自噬的调控机制十分复杂,涉及到人雷帕霉素靶蛋白、磷脂酰肌醇 3 激酶 III、磷酸腺苷活化的蛋白激酶和死亡相关蛋白激酶等信号分子,但详细的机制还有待进一步的研究。

总之,我们的研究阐明了 APJ 激动剂 Apelin-13 能抑制大鼠高血压性肾纤维化的进展,其机制可能与 Apelin-13 抑制细胞自噬有关。我们的研究为肾纤维化的防治提供了新的策略和思路。

#### [参考文献]

- [1] Shi Y, Lo CS, Padda R, et al. Angiotensin-(1-7) prevents systemic hypertension, attenuates oxidative stress and tubulointerstitial fibrosis, and normalizes renal angiotensin-converting enzyme 2 and Mas receptor expression in diabetic mice[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 128(10): 649-663.
- [2] Zhou X, Zhang J, Xu C, et al. Curcumin ameliorates renal fibrosis by inhibiting local fibroblast proliferation and extracellular matrix deposition[J]. *J Pharmacol Sci*, 2014, 126(4): 344-350.
- [3] Dihazi H, Dihazi GH, Bibi A, et al. Secretion of ERP57 is important for extracellular matrix accumulation and progression of renal fibrosis, and is an early sign of disease onset [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(16): 3 649-663.
- [4] 李小红,郭凤霞,杨沁,等.自噬干预对低剪切应力下血管内皮细胞 eNOS 和 ET-1 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(9): 875-880.
- [5] Tashiro K, Shishido M, Fujimoto K, et al. Age-related disruption of autophagy in dermal fibroblasts modulates extracellular matrix components[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(1): 167-172.
- [6] Kim J. Apelin-APJ signaling: a potential therapeutic target for pulmonary arterial hypertension[J]. *Mol Cells*, 2014, 37(3): 196-201.
- [7] 王丽妍,丁嘉祥,张东亮,等. Apelin/APJ 系统与器官纤维化关系的研究进展[J]. *中国全科医学*, 2013, 16(7): 2 424-426.
- [8] El-Shehaby AM, El-Khatib MM, Battah AA, et al. Apelin: a potential link between inflammation and cardiovascular disease in end stage renal disease patients[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2010, 70(6): 421-427.
- [9] 高艳霞,蔡宏瑜,万强,等.黄芪山甲方对 UUO 模型中肾间质纤维化 TGF- $\beta$ 1 及 FN 的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2013, 14(12): 1 090-091.
- [10] 姚旻,周欣,涂悦,等.广谱基质金属蛋白酶抑制剂对高血压肾纤维化的影响[J]. *中华高血压杂志*, 2006, 14(11): 909-914.
- [11] Manrique N, Pereira CC, Luvizuto ER, et al. Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats [J]. *Clin Oral Investig*, 2015, 19(6): 1 319-327.
- [12] 林朵朵,张志,刘紫东. Apelin-13 对 2 型糖尿病大鼠心肌纤维化防治的作用机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(10): 1 009-014.
- [13] 里宏晴,张志,焦慧,等. Apelin-13 对糖尿病大鼠心肌纤维化的影响[J]. *解放军医学院学报*, 2013, 34(6): 621-624.
- [14] 杨攀,张志. Apelin-13 对肾上腹主动脉缩窄诱导的心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响[J]. *山东医药*, 2013, 53(11): 19-21.
- [15] Codognotto M, Piccoli A, Zaninotto M, et al. Evidence for decreased circulating apelin beyond heart involvement in uremic cardiomyopathy[J]. *Am J Nephrol*, 2007, 27(1): 1-6.
- [16] De Rechter S, Decuypere JP, Ivanova E, et al. Autophagy in renal diseases [J]. *Pediatr Nephrol*, 2016, 31(5): 737-752.
- [17] Ding Y, Kim SL, Lee SY, et al. Autophagy regulates TGF- $\beta$  expression and suppresses kidney fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25(12): 2 835-846.

(此文编辑 曾学清)