

网络出版时间: 2019-09-03 17:25 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190830.1433.006.html>

白藜芦醇减轻高脂饮食小鼠肾损伤的作用及机制

许 伶^{1,2}, 凌梦玉¹, 陈 超¹, 吕正梅¹

摘要 目的 研究高脂(HL)导致脂质代谢紊乱所引发慢性肾损伤的机制,并探讨白藜芦醇(RSV)在肾脏损伤中起保护作用的机制。方法 选取6周龄雄性C57BL/6J小鼠造模,分设正常对照组(CTRL组)、高脂组(HL组)、白藜芦醇干预组(RSV组),18周后检测各组血脂、体质量和肾功能,采用HE染色、PAS染色和免疫组化法检测肾组织形态学变化;通过Western blot和RT-PCR方法检测小鼠肾组织氧化应激和内质网应激相关蛋白的表达。结果 RSV明显降低高脂饮食小鼠的体质量、血脂和尿酸水平;改善肾小球系膜增生和肾小管纤维化,减少肾小球糖原沉积以及下调纤维黏连蛋白(FN)的表达;RSV明显上调抗氧化相关蛋白沉默信息调节因子2相关酶1(SIRT1)、超氧化物歧化酶2(SOD2)和谷胱甘肽过氧化物酶4(GPx4)的表达、下调内质网应激分子标志葡萄糖调节蛋白78(GRP78)和CCAAT增强子结合蛋白的同源蛋白(CHOP)的蛋白和mRNA表达。结论 RSV通过抑制肾组织纤维化、氧化应激和内质网应激,减轻高脂饮食导致的慢性肾脏损伤。

关键词 高脂; 肾脏; 白藜芦醇; 氧化应激; 内质网应激

中图分类号 R 329

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)10-1521-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.005

随着生活方式的改变,高脂饮食、缺少运动等不健康生活方式引起的肥胖相关疾病发病率逐年升高。脂质代谢紊乱是许多原发性和继发性肾脏疾病的共同特征之一^[1]。当机体出现脂质代谢紊乱时,会导致肾脏内的脂质沉积,进而进展为肾损伤。国内外围绕脂质代谢紊乱引发的慢性肾损伤的研究越来越多,但对其治病机制仍不十分明确。白藜芦醇(resveratrol, RSV)是多酚类化合物。目前已经证实其具有抗炎、抗氧化的作用,具有保护心脏和脑缺血以及抗肿瘤作用^[2]。近年来,研究^[3-4]表明其还具

有肾脏保护作用。目前研究显示 RSV 可以通过激动沉默信息调节因子 2 相关酶 1(silent information regulator factor 2 related enzyme 1, SIRT1) 信号通路发挥保护作用^[5];抑制炎症因子白介素 6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)或减少一氧化氮(nitric oxide, NO)释放,减轻肾脏炎症状态^[6]。但 RSV 如何发挥肾脏保护作用的机制尚不明确。该研究探索 RSV 减轻高脂饮食引起肾损伤的作用及机制具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物造模 6周龄雄性C57BL/6J小鼠, SPF级,体质量18~20 g,购自安徽医科大学实验动物中心。将实验小鼠分为3组:正常对照组(control, CTRL组)、高脂组(high lipid, HL组)、RSV干预组(RSV组)。CTRL组:普通饲料喂养;HL组:高脂饲料(1%胆固醇、10%猪油、10%蛋黄粉、20%蔗糖、59%维持料)喂养;RSV组:高脂饲料同HL组,并以RSV 5 mg/(kg·d)灌胃,RSV购自南京泽朗植提技术有限公司,每周称量小鼠体质量,根据体质量调整 RSV 用量。

1.2 血脂检测 18周后实验结束,摘除小鼠眼球收集血液,取血清测血脂(日本OLYMPUS AU640全自动生化分析仪)、肾功能。

1.3 肾组织学观察 各组肾组织制作5 μ m厚石蜡切片,常规HE染色、PAS染色,在普通光学显微镜下观察肾脏组织病理变化。

1.4 免疫组织化学染色 取各组肾组织石蜡切片,常规脱蜡至水,枸橼酸盐修复,3% H₂O₂ 孵育阻断内源性过氧化物酶(武汉博士德生物工程有限公司),正常山羊血清封闭;加抗纤维黏连蛋白(fibronectin, FN)抗体(1:200)(美国proteintech公司),4℃孵育过夜;羊抗兔IgG(武汉博士德生物工程有限公司)工作液37℃孵育1 h;SP工作液(北京中杉金桥生物技术有限公司)37℃孵育30 min;DAB显色(北京中杉金桥生物技术有限公司),脱水、透明、封片。以PBS代替一抗作阴性对照。

2019-06-05 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81471504)

作者单位: ¹ 安徽医科大学基础医学院组织与胚胎学教研室,合肥 230032

² 合肥职业技术学院护理学院基础医学科,合肥 238000

作者简介: 许 伶,男,硕士,讲师;

吕正梅,女,博士,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail:

lvzm99@yahoo.cn

1.5 Western blot 取约 50 mg 肾组织,加入 RIPA 裂解液(含 PMSF,100:1)充分匀浆,BCA 法定量测定蛋白浓度。等量蛋白上样后 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白后恒流转至 PVDF 膜,室温 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,一抗葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78,GRP78) (1:1 000)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPx4) (1:1 000)、超氧化物歧化酶 2(superoxide dismutase 2, SOD2) (1:1 000)、SIRT1 (1:1 000) 均购自美国 CST 公司,GAPDH 抗体(美国 Proteintech 公司) 4 ℃ 孵育过夜,洗膜后 37 ℃ 二抗(1:10 000) 孵育 1 h; TBST 洗膜后,现配显影液,上海培清科技有限公司 ECL 曝光机曝光,保存图片。实验结果用 Gel-Pro-Analyzer 软件进行分析。

1.6 RT-PCR 取肾脏组织约 50 mg,TRIzol(大连宝生物工程有限公司)匀浆后酚-氯仿法提取总 RNA。用 TaKaRa 公司 5 × PrimeScript RT Master Mix 进行逆转录反应。TaKaRa 公司 Premix Taq™ (TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye) 进行 cDNA 样品扩增,琼脂糖凝胶电泳,上海培清科技有限公司凝胶成像仪拍照,凝胶成像系统 SensiAnsys 分析处理。引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 的引物序列

基因	引物序列(5'-3')
β-actin	F: GAACCTTCAACACCCAGC R: ATGTCACGCACGATTCCC
CHOP	F: CGACAGAGCCAGAATAACAGC R: CAAGGTGAAAGGCAGGGACT
GRP78	F: AGCGACAAGCAACCAAAGAT R: CCAGGTCAAACACAAGGATG

1.7 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,

以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组体质量、血脂和肾功能比较 HL 组与 CTRL 组相比,体质量增加 ($P < 0.05$),高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 下降,低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 增高 ($P < 0.05$),总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG) 和尿酸(uric acid, UA) 水平增高 ($P < 0.05$); RSV 组与 HL 组相比,血脂水平 HDL-C 升高,LDL-C 下降,TC、TG 和 UA 水平下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(creatinine, CRE) 差异无统计学意义。见表 2。

表 2 各组小鼠体质量、血脂、肾功能比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

项目	CTRL 组	HL 组	RSV 组
体质量(g)	29.91 ± 1.53 [#]	46.56 ± 2.11	34.37 ± 3.67 [#]
TC(mmol/L)	3.36 ± 0.02	5.92 ± 0.14 [*]	3.62 ± 0.23 [*]
TG(mmol/L)	1.07 ± 0.01	1.34 ± 0.04 [*]	1.07 ± 0.04 [*]
HDL-C(mmol/L)	4.36 ± 0.02	2.60 ± 0.01 [*]	2.91 ± 0.23 [*]
LDL-C(mmol/L)	0.26 ± 0.02	1.16 ± 0.14 [*]	0.31 ± 0.07 [*]
VLDL(mmol/L)	0.50 ± 0.02	0.40 ± 0.01	0.40 ± 0.00
BUN(mmol/L)	10.93 ± 0.24	10.21 ± 0.46	8.99 ± 0.47
UA(μmol/L)	304.33 ± 10.12 [#]	344.67 ± 13.14	262.00 ± 28.06 [#]
CRE(mmol/L)	11.00 ± 1.00	10.00 ± 0.87	10.33 ± 0.49

与 CTRL 组比较: * $P < 0.05$; 与 HL 组比较: [#] $P < 0.05$

2.2 3 组肾脏组织学变化 HE 染色显示 CTRL 组小鼠肾脏组织结构基本正常。HL 组小鼠肾小球系膜细胞和基质稍增多,偶见节段性肾小球硬化,肾小管间质纤维化,可见间质细胞增多,炎症细胞浸润;肾小管上皮细胞淡染,胞质增多。RSV 组肾小球面积略有缩小,系膜增生明显减轻。表明 RSV 可以改善高脂饮食诱导的慢性肾脏损伤,见图 1。PAS 染色

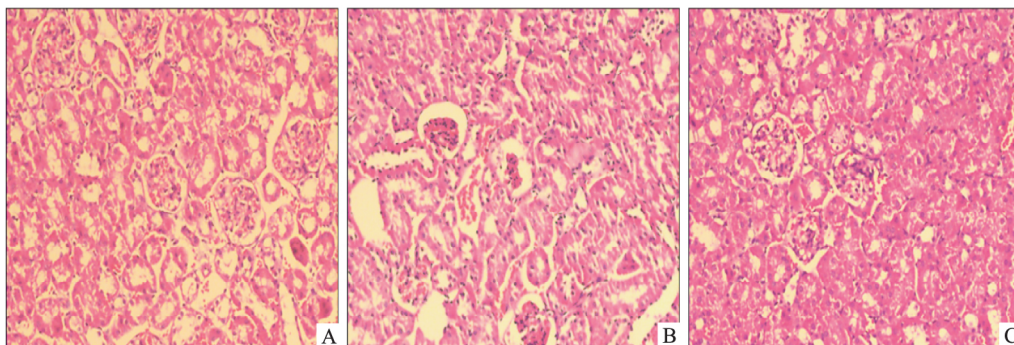


图 1 各组肾脏组织病理改变 ×200

A: CTRL 组; B: HL 组; C: RSV 组

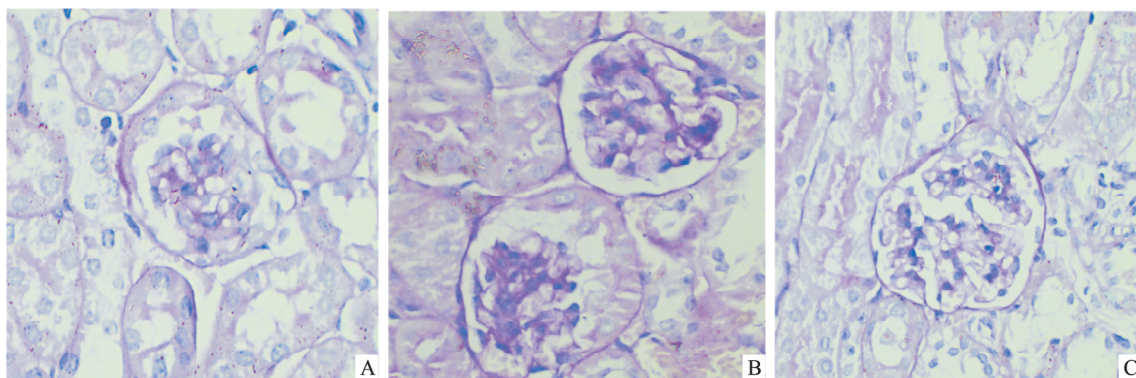


图2 各组肾脏组织 PAS 染色改变 ×400

A: CTRL 组; B: HL 组; C: RSV 组

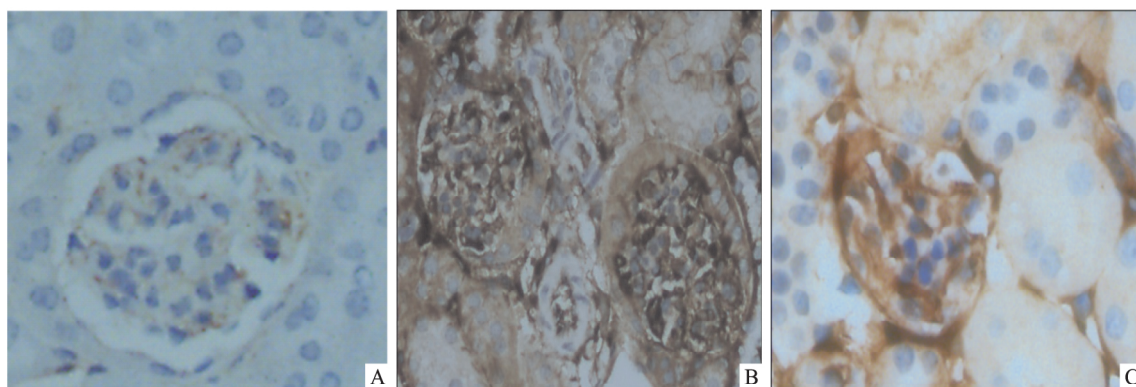


图3 各组肾脏组织 FN 表达免疫组化染色 ×400

A: CTRL 组; B: HL 组; C: RSV 组

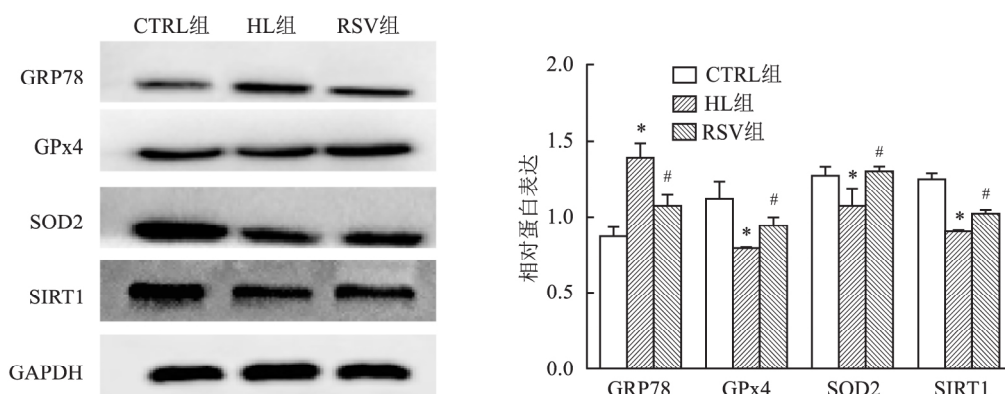


图4 Western blot 法检测各组肾脏组织 GRP78、GPx4、SOD2、SIRT1 蛋白水平

与 CTRL 组比较: * $P < 0.05$; 与 HL 组比较: # $P < 0.05$

显示正常组小鼠肾组织结构基本正常,少量红染,高脂组小鼠肾小球糖原沉积增多见明显红染区,RSV组肾小球红染明显变淡,见图2。

2.3 3组小鼠肾组织 FN 的表达 免疫组化结果显示 FN 主要在肾小体细胞间质表达,CTRL 组和 RSV 组小鼠肾组织呈弱阳性表达,HL 组表达增加,阳性染色呈棕黄色。见图3。

2.4 3组小鼠肾组织 GRP78、GPx4、SOD2 和

SIRT1 蛋白表达 与 CTRL 组比较,HL 组肾组织抗氧化相关蛋白 GPx4、SOD2、SIRT1 表达水平明显下调 ($P < 0.05$),内质网应激分子标志物 GRP78 的蛋白表达上调;与 HL 组比较,RSV 组抗氧化相关蛋白 GPx4、SOD2、SIRT1 的表达上调,内质网应激分子标志物 GRP78 蛋白的表达下调 ($P < 0.05$)。见图4。

2.5 3组肾脏组织中 GRP78 和 CHOP mRNA 表达 与 CTRL 组比较,HL 组肾组织 GRP78 和 CCAAT

增强子结合蛋白的同源蛋白(CCAAT/enhancer binding protein-homologous protein, CHOP) mRNA 表达明显上调($P < 0.05$); 而与 HL 组比较, RSV 组肾组织 GRP78 和 CHOP mRNA 表达水平均明显下调($P < 0.05$)。见图 5。

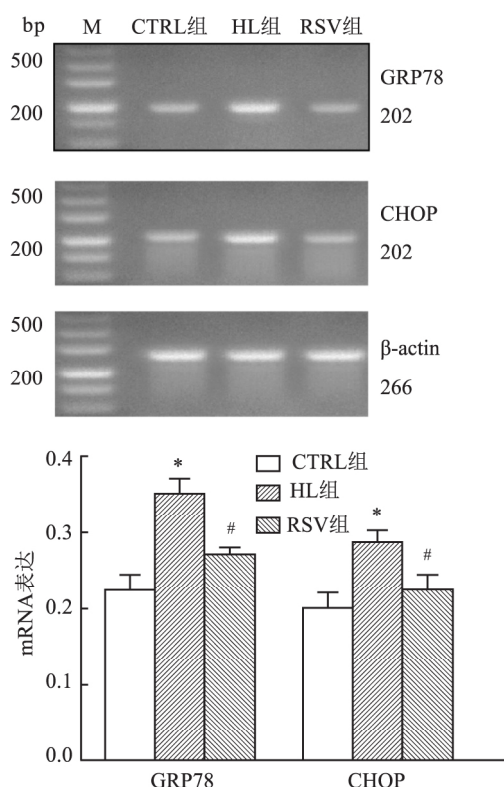


图5 RT-PCR法检测各组肾组织 GRP78 和 CHOP mRNA 水平
M: Marker; 与 CTRL 组比较: * $P < 0.05$; 与 HL 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

肥胖对健康的影响日益严重,在发展中国家也变得越来越普遍。近年来,较多的研究^[7]表明肥胖与肾功能障碍之间有密切的关系。目前研究^[8]显示,脂质代谢紊乱是慢性肾脏病进展的危险因素。本实验结果显示,经过 18 周的高脂饲料喂养后,HL 组小鼠的体质量明显高于 CTRL 组;血清中 TC、TG 和 UA 水平高于 CTRL 组;HL 组小鼠 HE 染色、PAS 染色和 FN 免疫组化结果证实,肾组织存在损伤性改变。提示高脂饮食可诱导小鼠的脂质代谢紊乱,可能通过多种途径,对肾小球内皮细胞、系膜细胞造成损伤,引起系膜增生,细胞外基质增厚,糖原沉积,肾小球硬化和间质纤维化,进而损伤其肾功能。有临床研究^[9]显示慢性肾功能障碍和血脂异常进展之间的密切关系。研究^[10]表明,高三酰甘油血症可促进 LDL 沉积并降低 HDL 水平,增加慢性肾病进展风险。

虽然脂质介导的肾损伤初始机制尚不清楚,但目前认为氧化应激、内质网应激以及炎症反应是参与脂质介导肾损伤的主要机制^[11]。研究^[12]表明高脂血症能增加单核细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成速率,它是一种内皮损伤的重要因子,随着 ROS 生成增多,触发氧化应激反应,致使内皮细胞损伤严重,这可能是脂质诱导肾损伤的重要机制。哺乳动物在呼吸和新陈代谢过程中产生的很多 ROS 由体内的自由基清除剂和抗氧化酶进行清除。抗氧化剂 SOD2 是重要的超氧化物歧化酶;GPx4 是催化氧化氢转化为水的另外一种抗氧化酶。SIRT1 是一种 NAD⁺ 依赖的蛋白去乙酰基酶,可调节细胞内的代谢,诱导 ROS 的凋亡,抑制氧化应激。研究^[13]已经证实 SIRT1 在肾损伤中的重要作用,无论是糖尿病肾病、急性肾损伤激活 SIRT1 都能够抑制肾损伤的进展。本实验研究也表明,与 CTRL 组比较,HL 组肾组织 SIRT1、SOD2 和 GPx4 蛋白表达明显下调;与 HL 组比较,RSV 组能够上调肾组织 GPx4 和 SOD2 蛋白的表达,RSV 作为 SIRT1 的激动剂,则使 SIRT1 蛋白表达明显上调。

氧化应激虽然目前被认为是多种疾病致病的重要环节,而任何干扰氧化还原的调控都能够导致内质网应激,有研究^[14]指出内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)可通过未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)以及与线粒体之间的相互作用产生过多的 ROS,诱导局部组织和细胞的氧化应激(oxidative stress, OS)。GRP78 和 CHOP 是内质网应激和 UPR 激活的标志,CHOP 是促凋亡 UPR 的反应基因,在内质网应激参与急性肾小管坏死和急性肾损伤机制中发挥重要作用。本实验发现,与 CTRL 组比较,HL 组肾组织 CHOP 和 GRP78 mRNA 水平表达上调,以及 GRP78 的蛋白表达也明显上调。而与 HL 组比较,RSV 组显著下调肾组织 CHOP 和 GRP78 mRNA 的表达水平,下调 GRP78 的蛋白表达。

研究^[8]显示,RSV 具有较强的清除自由基和抗脂质过氧化功能,可控制高热量饮食引起的动物体质量增加,增强脂蛋白的抗氧化能力,改善血管内皮功能,降低 LDL、TC 水平。因此 RSV 可能通过调节脂质代谢紊乱清除过多的 ROS 和改善与高脂相关的 OS、ERS;改善肾脏上皮细胞线粒体结构和功能的损伤,从而发挥对肾脏的保护作用。

本课题阐明了长期高脂饮食导致的肾组织损伤和肾功能下降的分子机制及 RSV 通过减轻肾组织

氧化应激和内质网应激等机制发挥保护作用机制， 为慢性肾损伤治疗方法提供了新的思路。

参考文献

- [1] Mount P F, Juncos L A. Obesity-related CKD: when kidneys get the munchies [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(12): 3429–32.
- [2] Keylor M H, Matsuura B S, Stephenson C R. Chemistry and biology of resveratrol-derived natural products [J]. *Chem Rev*, 2015, 115(17): 8976–9027.
- [3] Saldanha J F, Leal V d O, Peter S, et al. Resveratrol: why is it a promising therapy for chronic kidney disease patients [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013: 963217.
- [4] Jimenez-Gomez Y, Mattison J A, Pearson K J, et al. Resveratrol improves adipose insulin signaling and reduces the inflammatory response in adipose tissue of rhesus monkeys on high-fat, high-sugar diet [J]. *Cell Metab*, 2013, 18(4): 533–45.
- [5] Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α [J]. *Cell*, 2006, 127(6): 1109–22.
- [6] Cheng K, Song Z, Chen Y, et al. Resveratrol protects against renal damage *via* attenuation of inflammation and oxidative stress in high-fat-diet-induced obese mice [J]. *Inflammation*, 2019, 42(3): 937–45.
- [7] Glastras S J, Chen H, Teh R, et al. Mouse models of diabetes, obesity and related Kidney disease [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0162131.
- [8] Moradi H, Vaziri N D. Molecular mechanisms of disorders of lipid metabolism in chronic kidney disease [J]. *Front Biosci*, 2018, 23: 146–61.
- [9] Ananthakrishnan S, Kaysen G A. Treatment of hyperlipidemia changes with level of kidney function—rationale [J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2016, 23(4): 247–54.
- [10] Lanktree M B, Thériault S, Walsh M, et al. HDL cholesterol, LDL cholesterol, and triglycerides as risk factors for CKD: a mendelian randomization study [J]. *Am J Kidney Dis*, 2018, 71(2): 166–72.
- [11] Ruan X Z, Varghese Z, Moorhead J F. An update on the lipid nephrotoxicity hypothesis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2009, 5(12): 713–21.
- [12] Schieber M, Chandel N S. ROS function in redox signaling and oxidative stress [J]. *Curr Biol*, 2014, 24(10): R453–62.
- [13] Kim M Y, Lim J H, Youn H H, et al. Resveratrol prevents renal lipotoxicity and inhibits mesangial cell glucotoxicity in a manner dependent on the AMPK-SIRT1-PGC1 α axis in db/db mice [J]. *Diabetologia*, 2013, 56(1): 204–17.
- [14] Tang J Y, Farooqi A A, Ou-Yang F, et al. Oxidative stress-modulating drugs have preferential anticancer effects-involving the regulation of apoptosis, DNA damage, endoplasmic reticulum stress, autophagy, metabolism, and migration [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018 [Epub ahead of print].

Effect and mechanism of resveratrol on chronic kidney injury induced by high-lipid diet in mice

Xu Ling^{1,2}, Ling Mengyu¹, Chen Chao¹, et al

(¹Dept of Histology and Embryology, School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Basic Subjects, School of Nursing, Hefei Technology College, Hefei 238000)

Abstract Objective To investigate the protective effect of resveratrol(RSV) on kidney injury induced by high-lipid, and the mechanism underlying. **Methods** Six-week-old male C57BL/6J mice were divided into following groups: normal diet (CTRL), high-lipid (HL) and RSV intervention (RSV) groups. After 18 weeks of high-fat diet, blood lipids, body weight and kidney function of mice were measured. Histomorphological changes in kidney were evaluated by HE staining and PAS staining. The expression of renal tissue oxidative stress and expression of endoplasmic reticulum stress-related proteins in mice was detected using immunohistochemistry, Western blot and RT-PCR. **Results** RSV significantly reduced the body weight, and blood lipid and uric acid of mice induced by high-fat diet. Furthermore, RSV improved mesangial proliferation and tubular fibrosis, and reduced glomerular glycogen deposition and down-regulated the expression of fibronectin. Most importantly, RSV significantly up-regulated the expression of antioxidant-related proteins silent information regulator factor 2 related enzyme 1, superoxide dismutase 2 and glutathione peroxidase 4, and down-regulated the endoplasmic reticulum stress molecular markers, glucose regulated protein 78 and CCAAT/enhancer binding protein-homologous protein at protein and gene levels. **Conclusion** These findings revealed that RSV has protective effect on high fat diet-induced chronic renal injury, the mechanism may relate to its inhibition of renal fibrosis, oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. **Key words** high lipid; kidney; resveratrol; oxidative stress; endoplasmic reticulum stress