

# 利拉鲁肽对肥胖相关性肾病的作用以及与自噬通路的关系

李娜<sup>1</sup>, 郭晶晶<sup>1</sup>, 霍琴琴<sup>2</sup>, 潘天荣<sup>1</sup>, 钟兴<sup>1</sup>

**摘要** 目的 评价 GLP-1 受体激动剂利拉鲁肽对肥胖相关性肾病(ORG)小鼠模型的作用,以及与自噬通路 SIRT-1/AMPK 的关系。方法 选取 34 只雄性小鼠,随机分为正常对照组 12 只,高脂组 22 只,高脂组随机分为利拉鲁肽组(利拉鲁肽干预)及肥胖组(生理盐水干预),干预 12 周后,进行肾脏病理学染色、血清学及尿液指标检测,采用 Western blot 法检测肾脏组织自噬通路蛋白表达量,采用方差齐性检验分析数据。结果 与正常对照组相比,肥胖组小鼠肾小球肥大、系膜基质增多明显,且伴有局灶节段性硬化,与肥胖组相比,利拉鲁肽组小鼠肾脏病变明显减轻。与正常对照组相比,肥胖组小鼠的体质量、右肾湿重、尿微量白蛋白及血脂明显升高( $P < 0.05$ ),而与肥胖组相比,利拉鲁肽组小鼠的上述指标均明显下降( $P < 0.05$ )。与正常对照组相比,肥胖组小鼠肾脏 SIRT-1、P-AMPK 和 LC3B 均明显下降,P62 累积增加,与肥胖组相比,利拉鲁肽组 SIRT-1、P-AMPK 和 LC3B 均明显升高,P62 累积减少( $P < 0.05$ )。结论 利拉鲁肽能减轻高脂诱导的肥胖相关性肾病小鼠的尿微量白蛋白,改善肾小球肥大、局灶节段性硬化及系膜基质增多的病变程度,机制可能通过诱导 ORG 小鼠的自噬发挥作用。

**关键词** 肥胖相关性肾病;利拉鲁肽;自噬

中图分类号 R 589.2; R 97

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)07-1032-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.07.009

肥胖相关性肾病(obesity-related glomerulopathy, ORG)是由于肥胖引起机体一系列代谢问题,并由此导致的肾脏病变。利拉鲁肽为胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)类似物,与天然的 GLP-1 有 97% 的同源性,具备 GLP-1 全部生理作用<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2]</sup>显示 GLP-1 能保护肾脏、减轻糖尿病肾病患者蛋白尿症状,延缓糖尿病肾病的进展,但是对于 ORG 的作用,目前尚不明确。自噬是真核细胞内的蛋白质大分子、细胞器等在自噬溶酶体的作用下被降解的过程。通过研究特异性足细胞 Atg5 基因敲除小鼠显示,自噬可以保护肾脏并且减少蛋白尿的产生<sup>[3]</sup>。该研究通过观察 ORG 小鼠模型的肾脏病理学、血清学指标和尿微量白蛋白,评价利拉鲁肽对 ORG 的作用及可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 34 只(19.04 ± 0.37) g,购自南京大学-南京生物医药研究所。随机分为正常对照组 12 只,高脂组 22 只。

**1.1.2 主要药物、器材与试剂** 利拉鲁肽(商品名

2018-03-14 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2018A0202、KJ2017A174);安徽省科技厅公益性技术应用研究联动项目(编号: 15011d04042)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第二附属医院内分泌科,合肥 230601

<sup>2</sup> 阜阳市人民医院内分泌科,阜阳 236000

作者简介: 李娜,女,硕士研究生;

钟兴,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: zhongxing761@163.com

and p-STAT3 were detected by immunohistochemistry. Western blot was used to detect the expression of p-JAK2 and p-STAT3 while tumor necrotic factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA level was evaluated by qRT-PCR. **Results** In week 12, compared with the control group, the levels of blood glucose, kidney weight/body weight, UAER level and kidney pathological lesions grade were higher in diabetic group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), while kidney weight/body weight, UAER level and kidney pathological lesions grade decreased significantly after PF intervention ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). CD68, p-JAK2, p-STAT3 protein expression and TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1, iNOS mRNA expression were higher in diabetic group ( $P < 0.01$ ) and lower in PF 25, 50, 100 mg/kg intervention groups ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** PF significantly improves diabetic nephropathy progression and these protective effects might associate with the inhibition of JAK2/STAT3 signaling pathway and inflammation.

**Key words** diabetic kidney disease; paeoniflorin; JAK2/STAT3 signaling pathway; inflammation; macrophage

诺和力) 购自丹麦诺和诺德公司(批号: FP51752 - 2); ELISA 测定试剂盒购自上海源叶生物科技有限公司; Western blot 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; ADVIA 2400 全自动生化分析仪购自德国西门子公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 动物模型的建立** 小鼠适应性喂养 10 d 后, 随机分为正常对照组 12 只, 高脂组 22 只, 正常对照组予以普通饲料喂养, 高脂组予以高脂饲料喂养, 高脂饲料配方为猪油 6%, 胆固醇 2%, 蛋黄粉 10%, 胆盐 0.2%, 基础饲料 81.1%, 购自江苏省协同生物工程有限责任公司。高脂喂养 12 周后, 在高脂组及正常对照组随机各选取 2 只小鼠处死, 肾脏病理提示高脂组造模成功, 将高脂组随机分为利拉鲁肽组 10 只及肥胖组 10 只, 并继续予以高脂饮食, 利拉鲁肽组予以皮下注射利拉鲁肽 0.6 mg/(kg · d), 肥胖组予以生理盐水 0.6 mg/(kg · d), 每周测量小鼠体质量, 根据体质量变化调整药物剂量, 干预 12 周, 期间正常对照组一直予以普通饲料喂养, 各组小鼠自由进食水, 标准鼠笼饲养, 每笼 4~5 只, 温度在 20~25 °C, 12/12 h 光照黑暗循环(光照时间 7:00 - 19:00)。

**1.2.2 标本采集** 使用小鼠代谢笼收集小鼠 24 h 尿液, 记尿量, 离心后取上清液测小鼠 24 h 尿微量白蛋白。干预至 12 周末, 称取小鼠体质量, 内眦取血, 离心后取上清液, 将小鼠断头处死, 迅速取出双侧肾脏, 观察双肾大小形态, 称取右肾湿重后, 切取部分组织用 10% 的中性福尔马林固定, 行石蜡包埋切片, 用于 HE 等染色, 余肾脏组织放置 -80 °C 冰箱, 用于 Western blot 实验。

**1.2.3 指标测定** 采用 HE、PAS 染色观察肾脏病理变化; 采用 ELISA 测定小鼠尿微量白蛋白; 采用全自动生化分析仪测定小鼠血脂, 包括胆固醇(cholesterol, CHO)、三酰甘油(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL); 采用 Western blot 法测定小鼠肾脏组织的自噬通路相关因子沉默信息调节因子 1(silent information regulator 2, SIRT-1) 和 AMP 依赖的蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK)、微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule associated protein1 light chain 3, LC3), 以及自噬活性标志物泛素结合蛋白 P62 的表达。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 小鼠体质量、右肾湿重及 24 h 尿微量白蛋白变化** 与正常对照组相比, 肥胖组小鼠体质量明显增加, 而在利拉鲁肽干预 12 周后, 小鼠体质量较肥胖组明显下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与正常对照组相比, 肥胖组小鼠尿微量白蛋白明显升高, 利拉鲁肽干预 12 周后尿微量白蛋白较肥胖组明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

**2.2 各组小鼠血 TG、CHO 和 LDL 的变化** 肥胖组 TG、CHO、LDL 较正常对照组明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 利拉鲁肽干预 12 周后, TG、CHO、LDL 较肥胖组明显下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 1 各组小鼠 24 h 尿白蛋白、体质量及右肾湿重的变化( $\bar{x} \pm s$ )

| 项目                        | 正常对照组( $n=10$ )  | 肥胖组( $n=10$ )       | 利拉鲁肽组( $n=10$ )   | F 值     | P 值   |
|---------------------------|------------------|---------------------|-------------------|---------|-------|
| 尿微量白蛋白( $\mu\text{g/L}$ ) | 52.09 $\pm$ 6.82 | 137.38 $\pm$ 15.18* | 82.21 $\pm$ 8.29# | 162.329 | 0.000 |
| 体质量(g)                    | 24.44 $\pm$ 1.27 | 50.47 $\pm$ 5.59*   | 31.91 $\pm$ 2.89# | 882.628 | 0.000 |
| 右肾湿重(g)                   | 0.17 $\pm$ 0.04  | 0.22 $\pm$ 0.12*    | 0.18 $\pm$ 0.04#  | 160.499 | 0.000 |

与正常对照组比较: \*  $P < 0.05$ , 与肥胖组比较: #  $P < 0.05$

表 2 各组小鼠血清 TG、CHO、LDL 变化( $\bar{x} \pm s$ )

| 项目                     | 正常对照组( $n=10$ ) | 肥胖组( $n=10$ )     | 利拉鲁肽组( $n=10$ )  | F 值     | P 值   |
|------------------------|-----------------|-------------------|------------------|---------|-------|
| TG( $\text{mmol/L}$ )  | 0.47 $\pm$ 0.42 | 1.79 $\pm$ 0.16*  | 1.25 $\pm$ 0.23# | 57.591  | 0.000 |
| CHO( $\text{mmol/L}$ ) | 2.45 $\pm$ 0.21 | 12.09 $\pm$ 0.48* | 5.76 $\pm$ 0.53# | 1439.94 | 0.000 |
| LDL( $\text{mmol/L}$ ) | 0.86 $\pm$ 0.27 | 9.86 $\pm$ 1.02*  | 4.26 $\pm$ 0.28# | 557.700 | 0.000 |

与正常对照组比较: \*  $P < 0.05$ , 与肥胖组比较: #  $P < 0.05$

**2.3 各组小鼠肾脏组织病理变化** 小鼠肾脏 HE 及 PAS 染色显示,与正常对照组小鼠相比,肥胖组小鼠肾脏肾小球肥大、系膜基质增多显著,伴有局灶节段性硬化,而在利拉鲁肽干预 12 周后,肾小球肥大、局灶节段性硬化及系膜基质增多明显改善,见图 1。

**2.4 各组小鼠肾脏自噬通路相关因子 SIRT-1、P-AMPK、LC3B、P62 蛋白含量比较** Western blot 法检测结果显示,与正常对照组相比,肥胖组 SIRT-1、P-AMPK/AMPK、LC3B 含量明显下降, P62 含量明显升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与肥胖组相比,利拉鲁肽组 SIRT-1、P-AMPK、LC3B 含量明显上升,而 P62 含量下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 2。

### 3 讨论

随着经济水平的快速发展和生活方式的改变,肥胖的发病率日益增加,肥胖可对包括肾脏在内的多个重要器官造成病理损害<sup>[4]</sup>。Bonnet et al<sup>[5]</sup>报道了 162 例 IgA 肾病患者 20 年随访,肾活检时发现在 BMI  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$  的患者中,肾病理改变及肾功能恶化更明显。肥胖的流行导致 ORG 流行性大幅度增加,ORG 早期表现为肾小球滤过率增加及微量白蛋白尿,随着病情进展可出现不同程度蛋白尿,最终可发展为肾功能不全。ORG 主要的组织学特点包括肾小球肥大伴或不伴肾小球局灶节段性硬化,系膜基质增加及系膜细胞增殖等<sup>[6]</sup>。

2001 年首次公开利拉鲁肽的动物实验结果,显示给肥胖大鼠模型注射利拉鲁肽可有效减轻肥胖个体的体质量<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8]</sup>表明,在利拉鲁肽干预治疗 4 周后,大鼠血清 TG、CHO 水平明显下降。与上述研究结果一致,本研究也显示,在肥胖组中,小鼠体质量、右肾湿重及血清 TG、CHO、LD 指标均明显升高,利拉鲁肽干预 12 周后,小鼠体质量、右肾湿重及血脂水平较肥胖组均显著下降。一项 564 例肥胖患者的双盲、随机对照研究<sup>[9]</sup>表明,利拉鲁肽能显著降低肥胖患者的体质量。

动物模型研究<sup>[10]</sup>显示, GLP-1 受体激动剂可有效改善糖尿病大鼠的肾小球肥大,系膜增生及肾小球硬化。本研究在 ORG 小鼠模型中也观察到,在肥胖组小鼠中,肾脏出现明显的肾小球肥大,伴有局灶节段性硬化,系膜基质增多,肥胖组小鼠 24 h 尿微量白蛋白明显升高,而在利拉鲁肽干预 12 周后,小鼠肾脏病理变化及 24 h 尿微量白蛋白均明显改善。提示利拉鲁肽对 ORG 有显著的改善。

自噬在清除废物,结构重建,细胞生长发育,蛋白代谢平衡维持和细胞内环境稳定中有重要作用<sup>[11]</sup>。自噬可受营养感受信号如 SIRT-1、mTOR 和 AMPK 的调节。目前有多项研究<sup>[12]</sup>显示, SIRT-1 与 AMPK 关系密切,白藜芦醇通过 SIRT-1 刺激 AMPK,改善线粒体功能, SIRT-1/AMPK 是自噬的经典通路。AMPK 是自噬的上游调节因子, AMPK 的丧失导致自噬缺陷<sup>[13]</sup>;微管相关蛋白轻链 3 (LC3) 是一种自噬相关蛋白,有 LC3I 和 LC3II (LC3B) 两个亚

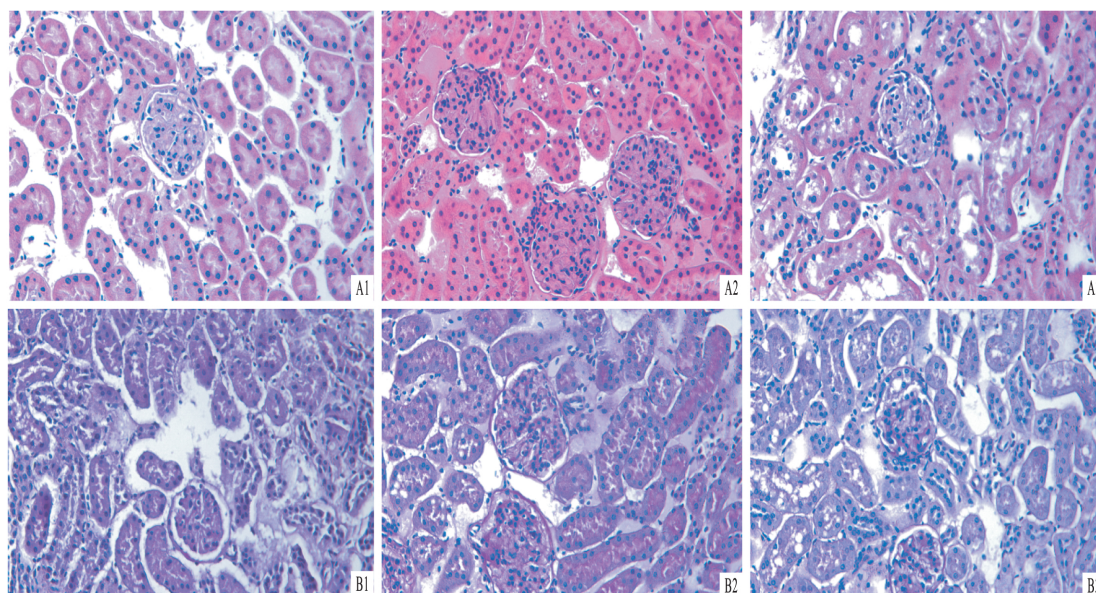


图 1 各组小鼠肾脏组织病理变化  $\times 400$

A: HE 染色; B: PAS 染色; 1: 正常对照组; 2: 肥胖组; 3: 利拉鲁肽组

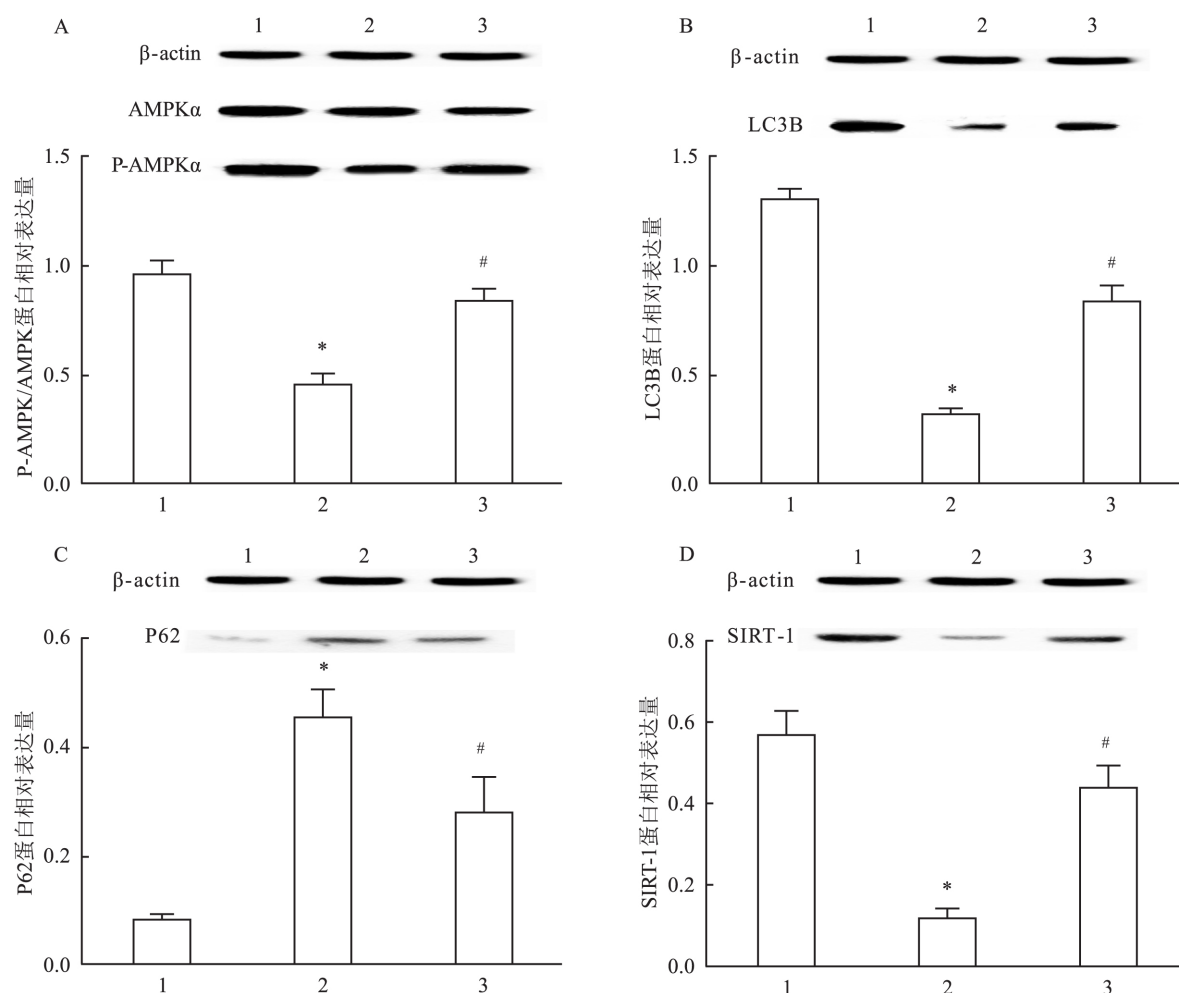


图2 各组小鼠肾脏组织自噬相关蛋白变化

A: P-AMPK/AMPK; B: LC3B; C: P62; D: SIRT-1; 1: 正常对照组; 2: 肥胖组; 3: 利拉鲁肽组; 与正常对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与肥胖组比较: #  $P < 0.05$

型;与 LC3I 相比,LC3II 定位于自噬泡膜上,对于评价自噬活性更为敏感。P62 是自噬的另一种相关蛋白,当自噬低或缺乏时,会发生 P62 聚集的积累<sup>[14]</sup>。肾小球足细胞在生理状态下就有较高水平的自噬,自噬抑制剂或敲除自噬相关基因的足细胞的滤过功能降低<sup>[15]</sup>。相关研究<sup>[16]</sup>显示在高脂诱导的小鼠肝脏中,GLP-1 受体激动剂艾塞那肽通过上调 SIRT-1 和 AMPK 磷酸化而改善脂肪肝,在肾脏组织中, GLP-1 受体激动剂发挥作用是否与 SIRT-1/AMPK 通路有关尚不清楚。本研究显示,与正常对照组相比,肥胖小鼠的肾脏中自噬通路蛋白 SIRT-1、P-AMPK 以及 LC3B 蛋白明显下降,而 P62 蛋白的累积明显增多,提示在肥胖小鼠中,自噬活性明显降低;而在利拉鲁肽干预 12 周后,肾脏自噬通路蛋白 SIRT-1、P-AMPK 以及 LC3B 明显升高,P62 的累积明显下降,提示利拉鲁肽保护 ORG 的肾脏,机制可

能与改善肾脏的自噬活性有关。

综上所述,从血清学、尿液学检查、肾脏病理学检查及 Western blot 检测得出, GLP-1 受体激动剂利拉鲁肽能够改善 ORG 微量蛋白尿和肾脏病理改变,可能与诱导 ORG 小鼠的自噬活性增加有关,利拉鲁肽有可能成为治疗 ORG 患者的新型药物。

### 参考文献

- [1] Wajsborg E, Amarah A. Liraglutide in the management of type 2 diabetes[J]. Drug Des Devel Ther, 2010, 4: 279-90.
- [2] Scherthaner G, Mogensen CE, Scherthaner GH. The effects of GLP-1 analogues, DPP-4 inhibitors and SGLT2 inhibitors on the renal system[J]. Diab Vasc Dis Res, 2014, 11(5): 306-23.
- [3] Hartleben B, Godel M, Meyer-Schwesinger C, et al. Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice[J]. J Clin Invest, 2010, 120(4): 1084-96.
- [4] Morandi A, Maffei C. Urogenital complications of obesity[J].

- Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2013, 27(2): 209–18.
- [5] Bonnet F, Deprele C, Sassolas A, et al. Excessive body weight as a new independent risk factor for clinical and pathological progression in primary IgA nephritis [J]. *Am J Kidney Dis*, 2001, 37(4): 720–7.
- [6] Tefft K M, Shaw D H, Ihle S L, et al. Association between excess body weight and urine protein concentration in healthy dogs [J]. *Vet Clin Path*, 2014, 43(2): 255–60.
- [7] Larsen P J, Fledelius C, Knudsen L B, et al. Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivative NN2211 induces lasting and reversible weight loss in both normal and obese rats [J]. *Diabetes*, 2001, 50(11): 2530–9.
- [8] Astrup A, Rossner S, Van Gaal L, et al. Effects of liraglutide in the treatment of obesity: a randomised, double-blind, placebo-controlled study [J]. *Lancet*, 2009, 374(9701): 1606–16.
- [9] Szczepaniak L S, Babcock E E, Schick F, et al. Measurement of intracellular triglyceride stores by H spectroscopy: validation *in vivo* [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276(5 Pt 1): E977–89.
- [10] Zhou S J, Bai L, Lv L, et al. Liraglutide ameliorates renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats by activating endothelial nitric oxide synthase activity *via* the downregulation of the nuclear factor kappaB pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(5): 2587–94.
- [11] Zhang Z, Shao Z, Xiong L, et al. Expression of Beclin1 in osteosarcoma and the effects of down-regulation of autophagy on the chemotherapeutic sensitivity [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2009, 29(6): 737–40.
- [12] Price N L, Gomes A P, Ling A J, et al. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function [J]. *Cell Metab*, 2012, 15(5): 675–90.
- [13] Egan D F, Shackelford D B, Mihaylova M M, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy [J]. *Science*, 2011, 331(6016): 456–61.
- [14] Komatsu M, Waguri S, Koike M, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice [J]. *Cell*, 2007, 131(6): 1149–63.
- [15] Fang L, Zhou Y, Cao H, et al. Autophagy attenuates diabetic glomerular damage through protection of hyperglycemia-induced podocyte injury [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60546.
- [16] Xu F, Li Z, Zheng X, et al. SIRT1 mediates the effect of GLP-1 receptor agonist exenatide on ameliorating hepatic steatosis [J]. *Diabetes*, 2014, 63(11): 3637–46.

## Effect of liraglutide on obesity-related glomerulopathy and its relationship with autophagy pathway

Li Na<sup>1</sup>, Guo Jingjing<sup>1</sup>, Huo Qinqin<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

<sup>2</sup>Dept of Endocrinology, The People's Hospital of Fuyang City, Fuyang 236000)

**Abstract Objective** To evaluate the effect of the glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor agonist liraglutide on obesity-related glomerulopathy (ORG) in mice and its relationship with autophagy pathway SIRT-1/AMPK. **Methods** Thirty-four male mice were randomly divided into normal control group ( $n = 12$ ) and hyperlipidemia group ( $n = 22$ ). The high-fat group was randomly divided into GLP-1 receptor agonist group (liraglutide group) and high-fat control group. After intervention for 12 weeks, renal pathological staining, serological and urinalysis were performed. Western blot was used to detect the expression of autophagy pathway protein in kidney tissues. Data were analyzed by means of homogeneity of variance. **Results** Compared with the normal control group, obesity group mice glomerular hypertrophy, mesangial matrix increased significantly, and accompanied by focal stage sclerosis. Compared with obesity group, liraglutide group mice kidney lesions significantly reduced. Compared with the normal control group, body weight, wet weight of right kidney and urine microalbumin and blood lipids in obesity group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with obesity group, the above indicators of liraglutide group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the normal control group, the obesity group SIRT-1, P-AMPK and LC3B were significantly decreased, P62 cumulative increased. Compared with obesity group, liraglutide group SIRT-1, P-AMPK and LC3B were significantly increased, P62 cumulative decreased. **Conclusion** Liraglutide can reduce urine microalbumin and improve the degree of glomerular hypertrophy, focal stage sclerosis and mesangial matrix in high fat-induced obesity-related nephropathy mice, and the mechanism underlying may contribute to induction of autophagy in ORG mice.

**Key words** obesity-related glomerulopathy; liraglutide; autophagy