

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.23.022

肾病患者血管生成素样蛋白-4 与人足细胞损伤的相关性研究

范小丽¹, 侯 倩², 戚芸毓¹, 崔丽萍¹, 赵 军³

(1. 潍坊医学院, 山东潍坊 261053; 2. 山东省潍坊市人民医院病理科 261000;

3. 山东省潍坊市人民医院肾内科 261000)

摘 要:目的 观察不同病理类型肾病患者血清及尿液血管生成素样蛋白-4(Angptl4)的表达与促细胞损伤的相关性,探讨其临床意义。方法 选取肾穿刺活检患者 193 例,根据病理类型分为微小病变肾病组(MCD 组, $n=59$)、膜性肾病组(MN 组, $n=46$)、IgA 肾病组(IgA-N, $n=46$),选取微小病变肾病完全缓解(MCD-CR 组, $n=42$)作为对照组,检测各组血清及尿液 Angptl4 水平,并与 24 小时尿蛋白定量(24U-TP)、血清清蛋白(ALB)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、血肌酐(Scr)进行相关性分析;镜下观察肾组织病理改变。结果 MCD组、MCD-CR 组血清 Angptl4 水平高于 MN 组、IgA-N 组($P<0.05$);MCD 组、MN 组尿液 Angptl4 水平高于 MCD-CR 组及 IgA-N 组($P<0.05$)。血清 Angptl4 水平在 MCD 组中与 24U-TP、TG 呈正相关($P<0.05$),与 ALB 呈负相关($P<0.05$);尿液 Angptl4 水平在 MCD 组、MN 组中与 24U-TP、TG 呈正相关($P<0.05$),与 ALB 呈负相关($P<0.05$),在 IgA-N 组中与 24U-TP 呈正相关($P<0.05$)。IgA-N 组肾小球基底膜空泡变性,系膜细胞和基质轻度增生,足细胞未见明显异常。与 IgA-N 相比,MN 组、MCD 组肾小球存在显著的足细胞增生、肿胀伴空泡变性。结论 尿液 Angptl4 水平的高低反映了蛋白尿的严重程度,可能有助于评估早期的足细胞损伤。

关键词:足细胞损伤; 血管生成素样蛋白-4; 蛋白尿; 高脂血症

中图法分类号:R361

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)23-3556-04

Correlation between angiopoietin-like protein 4 and podocyte injury in patients with nephropathy

FAN Xiaoli¹, HOU Qian², QI Yunyu¹, CUI Liping¹, ZHAO Jun³

(1. Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China; 2. Department of Pathology, Weifang People's Hospital, Weifang, Shandong 261000, China; 3. Department of Nephrology, Weifang People's Hospital, Weifang, Shandong 261000, China)

Abstract: Objective To observe the collection of serum and urine angiopoietin-like protein 4 (Angptl4) in patients with different pathological types of nephropathy and to explore its clinical significance. **Methods** According to different pathological types, 193 patients with biopsy-proven were divided into MCD group ($n=59$), MN group ($n=46$), IgA-N group ($n=46$), MCD remission group ($n=42$). The expression of Angptl4 in serum and urine of each group was measured by ELISA and 24 hours urine protein quantitation (24U-TP), serum albumin (ALB), triacylglycerol (TG), total cholesterol (TC) and serum creatinine (SCr) were conducted correlation analysis. The pathological changes of the kidney tissue under the microscope were observed. **Results** The levels of serum Angptl4 in MCD group and MCD-CR group were significantly higher than those in MN group and IgA-N group ($P<0.05$). The levels of urine Angptl4 in MCD group and MN group were significantly higher than those in MCD-CR group and IgA-N group ($P<0.05$). Serum Angptl4 levels was positively correlated with 24U-TP in MCD group ($P<0.05$), but negatively correlated with ALB ($P<0.05$). Urine Angptl4 levels were positively correlated with 24U-TP, TG in MCD group and MN group ($P<0.05$), but negatively correlated with ALB ($P<0.05$). There was a positive correlation between urine Angptl4 and 24U-TP in IgA-N group ($P<0.05$). IgA-N group had showed that vacuolar degeneration of glomerular basement membrane, mild hyperplasia of mesangial cell and stroma, and podocyte was normal. While in MN group and MCD group, glomerulus showed that podocyte was hyperplastic and swelling obviously, which also combined with vacuolar degeneration. **Conclusion** The level of urine Angptl4 reflects the severity of proteinuria and may be helpful in assessing early podocyte injury.

Key words: podocyte injury; angiopoietin-like protein-4; proteinuria; hypertriglyceridemia

足细胞是避免机体蛋白质丢失的最后一道屏障。和硬化进展的重要观察及预测指标^[1]。因此,识别特足细胞的减少和丢失成为反映肾小球损伤严重程度异性生物标志物评估早期的足细胞损伤非常重要。

有研究发现,血管生成素样蛋白-4(Angptl4)作为一种非免疫性循环因子介导足细胞病变中的蛋白尿,并可加重高三酰甘油血症^[2]。本研究通过对比不同病理类型肾脏病患者血清及尿液 Angptl4 水平,并与临床化验指标进行相关性分析,探讨 Angptl4 与足细胞损伤的关系,促进足细胞病变患者的早期诊断与治疗。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 9 月至 2017 年 9 月潍坊市人民医院收治的 193 例经肾穿刺活检病理确诊为微小病变肾病(MCD)、膜性肾病(MN)、IgA 肾病(IgA-N)的患者作为研究对象。其中 MCD 组男 36 例、女 23 例,平均年龄(54.31±22.16)岁;MN 组男 25 例、女 21 例,平均年龄(46.03±15.95)岁;IgA-N 组男 26 例、女 20 例,平均年龄(44.80±12.63)岁;微小病变肾病完全缓解(MCD-CR)组男 25 例、女 17 例,平均年龄(42.25±15.96)岁。各组间性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。排除标准:代谢综合征、紫癜性肾炎、狼疮性肾炎、糖尿病、高血压病、肝病、甲状腺疾病、血液病及肿瘤等继发因素;Alport 综合征、薄基底膜肾病、Fabry 病等遗传性肾病;近期感染史、重金属接触史;慢性肾病患者含透析、肾移植者;采集血液、尿液标本 24 h 内未应用非甾体类消炎药、糖皮质激素、细胞毒药物或免疫抑制剂。研究对象均同意,并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 血清及尿液 Angptl4 水平检测 留取患者治疗前(入院时)及患者门诊随诊时清晨空腹静脉血 3 mL 及 24 h 尿液 5 mL,离心后采用双抗体夹心酶联免疫吸附(ELISA)法分别检测 Angptl4 水平,人 An-

gptl4 试剂盒购自上海茁彩生物科技有限公司。操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.2.2 生化指标检测 采用罗氏示差脉冲极谱法全自动生化仪检测 24 h 尿蛋白定量(24U-TP)、血清清蛋白(ALB)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、血肌酐(Scr)等指标。

1.2.3 肾组织标本采集及病理 每位患者均在局部麻醉下行 B 超引导下经皮肾穿刺,并分别留取 2~3 条长约 10~15 mm 肾组织。(1)光镜部分:新鲜肾活检标本作成 5 μm 冰冻切片,荧光标记后于荧光显微镜下观察,肾组织经甲醛固定,石蜡包埋后制成厚度 2 μm 切片,六胺银染色(PASM)、Masson 染色后光镜下观察。(2)电镜部分:约 1 mm³ 大小肾皮质经固定、包埋、切片后透射电镜下观察。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件分析。正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK- q 检验;非正态分布的计量资料以中位数和四分位数间距 [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示,组间比较采用秩和检验。采用 Pearson 或 Spearman 进行相关性分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组患者相关临床指标水平比较 IgA-N 组、MCD-CR 组的 24U-TP、ALB、TG、TC 与 MCD 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。IgA-N 组、MCD-CR 组的 24U-TP、ALB、TG、TC 与 MN 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。MCD-CR 组的 24U-TP、ALB、TG、TC 与 IgA-N 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组患者相关临床指标水平比较

组别	<i>n</i>	24U-TP[g/24 h, $M(P_{25}, P_{75})$]	ALB(g/L, $\bar{x} \pm s$)	TG(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	TC(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	Scr(μmol/L, $\bar{x} \pm s$)
MCD 组	59	4.06(2.08,12.24)	23.51±5.53	4.66±1.07	10.25±2.89	83.15±12.22
MN 组	46	4.60(2.64,8.18)	25.22±5.61	4.17±1.49	9.46±3.64	84.97±17.43
IgA-N 组	46	1.93(0.90,4.38)* [#]	36.28±7.35* [#]	2.31±1.07* [#]	6.64±2.23* [#]	81.55±12.28
MCD-CR 组	42	0.18(0.14,0.20)* [#] ^{&}	43.90±4.72* [#] ^{&}	2.11±0.95* [#] ^{&}	4.74±1.24* [#] ^{&}	74.42±13.42

注:与 MCD 组比较,* $P<0.05$;与 MN 组比较,[#] $P<0.05$;与 IgA-N 组比较,[&] $P<0.05$

表 2 各组患者血清、尿液 Angptl4 水平比较(ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	血清 Angptl4	尿液 Angptl4
MCD 组	59	50.10±17.60	70.47±27.26
MN 组	46	40.60±12.51*	62.24±22.48
IgA-N 组	46	30.13±8.19* [#]	32.08±13.58* [#]
MCD-CR 组	42	55.16±11.81 [#] ^{&}	8.38±1.18* [#] ^{&}

注:与 MCD 组比较,* $P<0.05$;与 MN 组比较,[#] $P<0.05$;与 IgA-N 组比较,[&] $P<0.05$

2.2 各组患者血清、尿液 Angptl4 水平比较 血清 Angptl4 水平比较,MCD 组、MCD-CR 组高于 MN 组、IgA-N 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。尿液

Angptl4 水平比较,MCD-CR 组低于 MCD 组、MN 组及 IgA-N 组,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 2。

2.3 各组血清 Angptl4 水平与其他临床指标相关分析 MCD 组血清 Angptl4 水平与 24U-TP、TG 呈正相关($P<0.05$),与 ALB 呈负相关($P<0.05$)。见表 3。

2.4 各组尿液 Angptl4 水平与其他临床指标相关分析 MCD 组、MN 组尿液 Angptl4 水平与 24U-TP、TG 呈正相关($P<0.05$),与 ALB 呈负相关($P<0.05$);IgA-N 组尿液 Angptl4 与 24U-TP 呈正相关($P<0.05$)。见表 4。

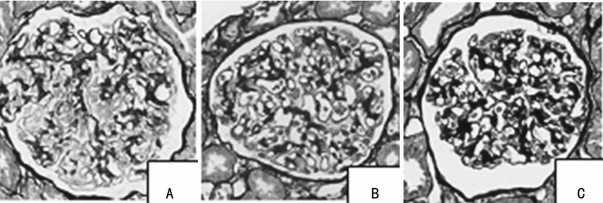
表 3 各组患者血清 Angptl4 与相关临床指标相关性分析

项目	MCD 组		MN 组		IgA-N 组		MCD-CR 组	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
24U-TP	0.898	<0.000 1	0.021	0.905	0.195	0.410	0.269	0.398
ALB	-0.915	<0.000 1	-0.304	0.585	-0.287	0.220	0.380	0.224
TG	0.622	0.023	-0.084	0.635	0.213	0.368	-0.011	0.974
TC	0.185	0.546	-0.130	0.642	-0.230	0.329	0.172	0.593
Scr	0.026	0.932	0.287	0.100	0.255	0.278	-0.109	0.737

表 4 各组患者尿液 Angptl4 与相关临床指标相关性分析

项目	MCD 组		MN 组		IgA-N 组		MCD-CR 组	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
24U-TP	0.809	<0.000 1	0.731	0.005	0.985	0.001	0.425	0.168
ALB	-0.769	0.002	-0.361	0.006	-0.860	0.110	-0.231	0.470
TG	0.909	<0.000 1	0.705	0.007	0.144	0.544	0.136	0.673
TC	0.239	0.431	0.202	0.867	0.404	0.077	0.358	0.254
Scr	0.202	0.508	-0.068	0.704	0.308	0.187	0.137	0.672

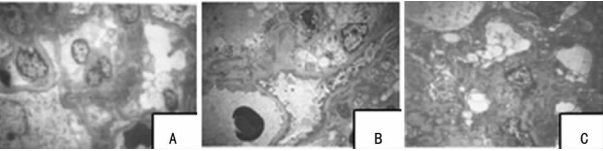
2.5 PASM 染色结果 IgA-N 组肾小球基底膜空泡变性,系膜细胞和基质轻度增生,足细胞未见明显异常。与 IgA-N 相比,MN 组、MCD 组肾小球存在显著的足细胞增生、肿胀伴空泡变性。见图 1。



注:A 为 IgA-N 组;B 为 MN 组;C 为 MCD 组

图 1 各组肾组织 PASM 染色(×400)

2.6 肾小球足细胞超微结构的改变结果 IgA-N 组系膜细胞和基质增生,足突节段性融合;MN 组基底膜不规则增厚,上皮可见电子致密物沉积,足突融合;MCD 组肾小球上皮细胞足突弥漫融合、脱落。见图 2。



注:A 为 IgA-N 组;B 为 MN 组;C 为 MCD 组

图 2 各组足细胞超微结构改变(投射电镜,×5 000)

3 讨 论

Angptl4 主要在人体肝脏、脂肪组织中表达,肾脏、骨骼肌、心肌、胎盘中也有少量表达。该种标志物参与了血管生成、糖脂代谢、肿瘤转移等病理生理过程^[3-4]。机体存在两种形式的 Angptl4,正常唾液酸化(中性等电点)的 Angptl4 来源于肝脏、脂肪组织和正

常肾小球,低唾液酸化(高等电点)的 Angptl4 由肾小球受损足细胞过度分泌。有研究发现肾小球足细胞分泌的低唾液酸化形式的 Angptl4 可与肾小球基底膜硫酸类肝素蛋白聚糖相互作用引起电荷屏障改变,导致足突融合,推测此为蛋白尿产生的主要原因^[5]。

本研究发现,患者血清 Angptl4 水平比较,MCD 组和 MN 组高于 IgA-N 组($P<0.05$),MCD 组血清 Angptl4 与 24U-TP、TG 水平呈正相关,与 ALB 呈负相关,这与以往研究结果显示的随足细胞损伤程度加重,循环中 Angptl4 增多并加重高 TG 血症一致^[6-9]。足细胞损伤患者蛋白尿达肾病范围时,尿液丢失清蛋白增多,循环中游离脂肪酸与清蛋白比例升高,使骨骼肌、心脏和脂肪组织中游离脂肪酸摄取增加,循环中 Angptl4 水平反应性升高,一方面通过系统反馈环路调节 Angptl4 与肾小球内皮细胞 v5 整联蛋白结合来减少蛋白尿,另一方面在局部反馈环路中,Angptl4 通过抑制脂蛋白脂酶的活性减少 TG 水解为脂肪酸,导致高 TG 血症^[7]。MCD-CR 组患者血清 Angptl4 水平高于 MCD 组,但差异无统计学意义($P>0.05$),可能的原因之一为血清 Angptl4 不能透过肾小球滤过膜,MCD 患者多为激素敏感性,可在短时间内迅速缓解,缓解后的 MCD 患者已经升高的血清 Angptl4 水平的恢复存在延迟;其次,MCD 患者在足细胞损伤早期,仅受损足细胞分泌的 Angptl4 上调,而肾外组织中尚未上调;同时,足细胞分泌的 Angptl4 是否会进入循环还待进一步证实;最后可能的原因是循环中的一部分 Angptl4 随大量蛋白尿的产生从尿液中丢失。

本研究中,患者尿液 Angptl4 水平比较,MCD

组、MN 组明显高于 IgA-N 组、MCD-CR 组,经治疗后 MCD-CR 组的 Angptl4 水平明显降低,并低于其他 3 组,这与研究发现的 MCD、MN 患者及模型大鼠中 Angptl4 的肾小球表达和尿液排泄明显增加一致^[10-11]。与 IgA-N 组相比,MN 组、MCD 组存在显著的足细胞足突增宽、融合甚至脱落,MCD 组、MN 组尿液 Angptl4 水平与 24U-TP、TG 呈正相关,与 ALB 水平呈负相关,虽然 IgA-N 组尿液 Angptl4 水平与 24U-TP 呈正相关,但其水平低于 MCD 组及 MN 组,说明尿液 Angptl4 水平随着尿蛋白的增加而增加,考虑与肾小球受损足细胞过度分泌 Angptl4 导致基底膜电荷屏障受损的程度有关,这与 CLÉMENT 等^[12]研究亦相符,他们发现足细胞特异性过表达 Angptl4 的转基因大鼠再现了 MCD 的主要特征(大量蛋白尿、广泛足突融合及肾小球基底膜电荷屏障受损),而脂肪组织特异性过表达 Angptl4 的转基因大鼠仅存在高循环水平的 Angptl4 导致的高 TG 血症,却不会产生蛋白尿。同时尚不能排除大量蛋白尿患者从尿液中丢失有活性的脂蛋白脂酶,进一步加重高 TG 血症。补充 N-乙酰-D-氨基甘露糖胺(ManNAc)唾液酸化 Angptl4 可以显著降低 MCD 模型大鼠的蛋白尿程度,这可能成为一种新的非免疫方式治疗足细胞病变^[12-14]。LI 等^[10]研究发现在 MCD 模型大鼠中肾小球受损足细胞中 Angptl4 表达的上调比足细胞损伤标志物 desmin 更早达峰。以上研究结果均提示,尿液 Angptl4 水平的变化可能有助于预测早期足细胞损伤的程度。

综上所述,足细胞损伤患者尿液 Angptl4 水平显著升高,与 24U-TP、TG 水平呈正相关,与 ALB 水平呈负相关。MCD 患者的血清 Angptl4 水平随 24U-TP 的增多而升高,并能加重高 TG 血症。因此,尿液 Angptl4 水平反映了足细胞病变患者蛋白尿的严重程度,并可能成为预测足细胞早期损伤的新型生物标志物。

参考文献

- [1] 赵悦,吴红赤,封宝红,等.足细胞病与相关循环因子的表达[J].现代生物医学进展,2015,15(11):2157-2160.
- [2] CLEMENT L C, AVILA-CASADO C, MACÉ C, et al. Podocyte-secreted angiotensin-like-4 mediates proteinuria

in glucocorticoid-sensitive nephrotic syndrome[J]. Nat Med,2011,17(1):117-122.

- [3] GE H, YANG G, YU X, et al. Oligomerization state-dependent hyperlipidemic effect of angiotensin-like protein 4[J]. J Lipid Res,2004,45(11):2071-2079.
- [4] PADUA D, ZHANG X H, WANG Q, et al. TGF-beta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiotensin-like 4[J]. Cell,2008,133(1):66-77.
- [5] 柳珊珊,陈江华.足细胞功能紊乱与微小病理性肾病[J].浙江大学学报(医学版),2016,45(2):214-218.
- [6] CLEMENT L C, MACÉ C, AVILA-CASADO C, et al. Circulating angiotensin-like 4 links proteinuria with hypertriglyceridemia in nephrotic syndrome[J]. Nat Med,2014,20(1):37-46.
- [7] CLEMENT L C, MACÉ C, DEL NOGAL AVILA M, et al. The proteinuria-hypertriglyceridemia connection as a basis for novel therapeutics for nephrotic syndrome[J]. Transl Res,2015,165(4):499-504.
- [8] VAZIRI N D, MORADI H. Dual role of circulating angiotensin-like 4 (ANGPTL4) in promoting hypertriglyceridemia and lowering proteinuria in nephrotic syndrome[J]. Am J Kidney Dis,2014,64(4):495-498.
- [9] MACÉ C, CLÉMENT L C. Role of angptl4 in nephrotic syndrome:a two-faced protein[J]. Med Sci (Paris),2014,30(6/7):605-607.
- [10] LI J S, CHEN X, PENG L, et al. Angiotensin-Like-4, a potential target of tacrolimus, predicts earlier podocyte injury in minimal change disease[J]. PLoS One,2015,10(9):e0137049.
- [11] PENG L, MA J, CUI R, et al. The calcineurin inhibitor tacrolimus reduces proteinuria in membranous nephropathy accompanied by a decrease in angiotensin-like-4[J]. PLoS One,2014,9(8):e106164.
- [12] CLÉMENT L, MACÉ C. ManNAc, a new therapeutic agent to reduce Angptl4-induced proteinuria in MCD[J]. Med Sci (Paris),2016,32(6/7):606-611.
- [13] CHUGH S S, MACÉ C, CLEMENT L C, et al. Angiotensin-like 4 based therapeutics for proteinuria and kidney disease[J]. Front Pharmacol,2014,5:23.
- [14] MACÉ C, CHUGH S S. Nephrotic syndrome: components, connections, and angiotensin-like 4-related therapeutics[J]. J Am Soc Nephrol,2014,25(11):2393-2398.

(收稿日期:2018-04-24 修回日期:2018-07-08)

(上接第 3555 页)

- 国临床医学影像杂志,2014,25(4):260-262.
- [13] 张玮.剖宫产瘢痕妊娠超声图像特征的再认识[J].中国医师进修杂志,2013,36(30):51-53.
- [14] 罗欢,张惠芳,霍咪,等.剖宫产切口瘢痕妊娠的超声诊断及误诊分析[J].临床军医杂志,2015,43(2):206-207.
- [15] 王晓薇,王海宽,宫丽华.经阴道超声对剖宫产瘢痕处妊

娠的诊断价值[J].哈尔滨医科大学学报,2012,46(1):83-85.

- [16] 林莉,赵旭东.不同途径彩色多普勒超声诊断剖宫产瘢痕妊娠 44 例比较分析[J].实用妇产科杂志,2014,30(9):690-692.

(收稿日期:2018-06-11 修回日期:2018-08-30)