

化瘀通络中药对糖尿病肾病大鼠肾皮质血管紧张素转化酶 2-血管紧张素(1-7)-Mas 轴的影响

徐晶 马二卫 白璐 马赞 郭倩 贾蕊 张江华 陈志强

摘要 **目的** 观察化瘀通络中药对糖尿病肾病大鼠肾皮质血管紧张素转化酶 2-血管紧张素(1-7)-Mas [ACE2-Ang-(1-7)-Mas] 轴的影响。**方法** 将 89 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为空白对照组(C 组, 22 只)、高糖高脂对照组(H 组, 10 只)和 1% 链尿佐菌素(streptozotocin, STZ)注射组(57 只)。STZ 注射组以高糖高脂饲料联合腹腔注射 STZ 制备糖尿病模型(50 只), 再分为模型组(M 组, 24 只)、厄贝沙坦组(I 组, 13 只)和化瘀通络中药组(Z 组, 13 只)。I 组和 Z 组大鼠分别给予厄贝沙坦和化瘀通络中药混悬液灌胃, 共 16 周, 其余各组给予等体积饮用水。检测各组大鼠 4 个时间点的血糖和 24 h 尿蛋白定量, 分别采用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)、免疫组化法、蛋白印迹(Western blot)方法检测不同时间点各组肾皮质 ACE2、Mas 蛋白的表达变化, 第 16 周末对各组肾皮质 2 种蛋白表达进行定量分析。**结果** 与 C 组比较, H、M 组血糖均升高, 且 M 组高于 H 组($P < 0.01$)。不同时间点 24 h 尿蛋白与 C 组比较, M 组升高, 且 M 组高于 H 组($P < 0.05$)。与 M 组比较, I 组 8 周末和 Z 组 8、16 周末均降低($P < 0.05$), 且第 16 周末 Z 组优于 I 组($P < 0.05$)。与 C、H 两组比较, M 组第 16 周末肾皮质 ACE2 mRNA 的表达降低($P < 0.01$); 与 M 组比较, Z 组表达升高($P < 0.01$)。与 C 组比较, M 组第 16 周末 Mas mRNA 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$); 与 H 组比较, M 组表达降低($P < 0.05$); 与 M 组比较, Z 组表达升高($P < 0.05$), 且高于 I 组($P < 0.05$)。M 组 ACE2、Mas 蛋白表达的定量随时间呈递减趋势。第 16 周末 ACE2、Mas 蛋白的表达定量, 与 C 组比较, M 组两者表达均降低($P < 0.05$); 与 M 组比较, Z 组 ACE2 的表达和 I、Z 两组 Mas 的表达均升高($P < 0.05$)。**结论** 化瘀通络中药可能通过上调 ACE2、Mas mRNA 及其蛋白的表达, 促进 ACE2-Ang-(1-7)-Mas 轴发挥作用, 降低尿蛋白, 对糖尿病肾病大鼠起到肾保护的作用。

关键词 糖尿病肾病; 化瘀通络; 血管紧张素转化酶 2; Mas

Effect of Chinese Herbs for Stasis Removing and Collaterals Dredging upon Angiotensin-Converting Enzyme 2-Angiotensin-(1-7)-Mas Axis in the Renal Cortex of Diabetic Nephropathy Rats XU Jing, MA Er-wei, BAI Lu, MA Yun, GUO Qian, JIA Rui, ZHANG Jiang-hua, and CHEN Zhi-qiang *Institute of Integrative Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang (050017), China*

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Chinese herbs for stasis removing and collaterals dredging (CHSRCD) upon angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-Mas axis in the renal cortex of diabetic nephropathy rats. **Methods** Totally 89 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into the blank control group (C group, $n = 22$), the high-glucose high-fat control group (H group, $n = 10$), and the streptozotocin (STZ)-injecting group ($n = 57$). The diabetes rat model ($n = 50$) was induced by feeding high-glucose high-fat diet in combination with intraperitoneal injection of STZ, which were further divided into the model group (M group, $n = 24$), the irbesartan group (I group, $n = 13$), and the CHSRCD (Z group, $n = 13$). Rats in I and Z groups were intragastrically fed with suspension of irbesartan and CHSRCD, once daily for 16 weeks. Equal volume of drinking water was administrated to rats in the rest groups. Blood glucose and 24 h urine protein quantitation were tested at four time points. And the mRNA expression of ACE2

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81173419)

作者单位:河北医科大学中西医结合研究所(石家庄 050017)

通讯作者:陈志强, Tel: 0311-85990281, E-mail: chenzhiqiang2011@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.06.0714

and Mas at various time points was detected by Real-time PCR, immunohistochemical assay, and Western blot. Quantitative analyses of ACE2 and Mas protein expression were performed at the end of week 16. Results Compared with the C group, blood glucose increased in the H and M groups ($P < 0.01$). It was higher in the H group ($P < 0.01$). 24 h urine protein quantitation at different time points increased in the M group, and it was higher than that in the H group ($P < 0.05$). Compared with the M group, 24 h urine protein quantitation decreased at the end of week 8 in the I group, and at the end of week 8 and 16 in the Z group ($P < 0.05$). It was lower in the Z group than in the I group at the end of week 16 ($P < 0.05$). Compared with the C and H groups, the expression of ACE2 mRNA in the renal cortex was lower in the M group at the end of week 16 ($P < 0.01$). Compared with the M group, it was higher in the Z group ($P < 0.01$). There was no statistical difference in the expressions of Mas mRNA at the end of week 16 between the C group and the M group ($P > 0.05$). It was lower in the M group than in the H group ($P < 0.05$). It was higher in the Z group than in the M group ($P < 0.05$), and higher than in the I group ($P < 0.05$). The expression of ACE2 and Mas protein in the M group decreased as time went by. The expression quantitation of ACE2 and Mas protein at the end of week 16 was lower in the M group than in the C group ($P < 0.05$). Compared with the M group, ACE2 expression of the Z group and Mas of the I and Z groups increased more significantly ($P < 0.05$). Conclusion CHSRCD could play a role in renal protection for diabetic nephropathy rats by up-regulating the mRNA and protein expression of ACE2 and Mas, promoting the ACE2-Ang-(1-7)-Mas axis, and lowering urinary protein.

KEYWORDS diabetic nephropathy; stasis removing and collaterals dredging; angiotensin converting enzyme 2; Mas

肾脏局部肾素-血管紧张素系统(RAS)的功能异常,参与了包括糖尿病肾病在内的肾损伤的进展。基于对糖尿病肾病过程中血管紧张素转化酶-血管紧张素 II-AT1(ACE-Ang II-AT1)通路过度激活的认识,血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)和血管紧张素受体阻断剂(ARB)已成为现代医学临床治疗和延缓糖尿病肾脏损害的一线药物。随着对 RAS 的深入研究^[1-3],发现 RAS 存在的另一条功能轴,即 ACE2-Ang-(1-7)-Mas 轴,其功能可与 ACE-Ang II-AT1 轴相拮抗。维持和重调 RAS 两条代谢通路的平衡成为治疗糖尿病肾脏损伤的新理念。基于糖尿病肾病瘀血阻络证的化瘀通络中药治疗在延缓和阻止糖尿病肾病进展方面的作用,已在临床上获得证实^[4]。本实验意在通过观察化瘀通络中药干预对糖尿病大鼠肾皮质 ACE2 和 Mas 受体的影响,以探索化瘀通络中药延缓和阻止糖尿病肾病进展的作用靶点是否存在于 ACE2-Ang-(1-7)-Mas 轴。

材料与方

1 动物 SD 大鼠 89 只,清洁级,雄性,体重 80~100 g,河北医科大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(冀)2008-1-003。室温 22~24℃,湿度 50%~60%的环境下,12 h 交替照明,大鼠自由进食和饮水。

2 药物 化瘀通络中药颗粒剂:丹参(1.8 g/袋,

相当于饮片 10 g,批号:1107057)、川芎(1.3 g/袋,相当于饮片 6 g,批号:1108827)、地龙(1.0 g/袋,相当于饮片 10 g,批号:1105024)、水蛭(1.5 g/袋,相当于饮片 3 g,批号:1106113)、全蝎(1.0 g/袋,相当于饮片 3 g,批号:1107253),由广东一方制药有限公司惠赠。厄贝沙坦(0.15 g/片,赛诺菲制药有限公司,批号:1A350)。

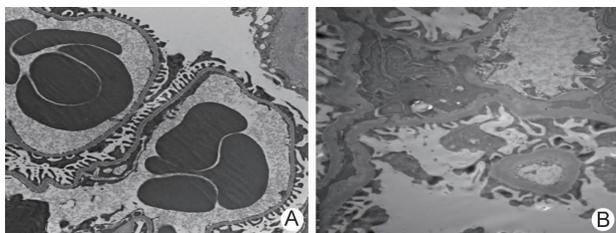
3 试剂及仪器 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, 美国 Enzo 生命科学有限公司,批号:L27453);大鼠尿白蛋白 ELISA 试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司);TRIquick Reagent(北京索莱宝科技有限公司);M-MLV 反转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司);PCR Super Mix(美国 Invitrogen 公司);Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG(美国 Invitrogen 公司);RNA 酶抑制剂(美国 Invitrogen 公司);引物(上海生工生物工程有限公司);兔免疫组化试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司);DAB 显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司);鼠单克隆抗体 β -actin(杭州华安生物技术有限公司,批号:110603);兔单克隆抗体 ACE2(Epitomics 公司,批号:YH090805C);兔多克隆抗体 Mas(Gene Tex 公司,批号:821302279);Triquick 总 RNA 提取试剂(北京索莱宝科技有限公司)。稳豪型血糖仪(美国强生公司);稳豪型血糖试纸(美国强生公司,批号:3354358);Nano Drop 2000C 紫外分光光度计(美

国 Thermo Scientific 公司); C1000™ Thermal Cycler PCR 仪(美国 Bio-RAD 公司); Eco 实时定量 PCR 仪(美国 Illumina 公司); BX63 + DP72 正置研究级显微镜(日本 Olympus 株式会社); Odyssey 红外激光扫描仪(美国 LI-COR 公司)。

4 动物分组及干预

4.1 动物分组 89 只雄性 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,检测血糖和尿蛋白,均为阴性者用于实验。按随机数字表示随机分为空白对照组(C 组)22 只、高糖高脂对照组(H 组)10 只和 1% STZ 注射组 57 只。STZ 注射组造模过程中死亡(4 只)及血糖未达标者(3 只)予剔除。将造模成功的 50 只糖尿病大鼠分为模型组(M 组,24 只)和厄贝沙坦组(I 组,13 只)、化痰通络中药组(Z 组,13 只)。

4.2 动物模型制备 大鼠的糖尿病模型采用高糖高脂饲料喂养联合小剂量 STZ 腹腔注射制备^[5-8]。除 C 组大鼠予普通全价颗粒饲料喂养外,其余大鼠均予高糖高脂饲料喂养,4 周后,C、H 和 STZ 注射组大鼠均禁食不禁水 12 h 后,STZ 注射组大鼠予腹腔注射 STZ 40 mg/kg 体重,将其溶于 0.1 mmol/L 的枸橼酸缓冲液(pH 4.3)中,72 h 后尾静脉取血,检测血糖 ≥ 16.7 mmol/L 为糖尿病大鼠造模成功^[9,10],C 组和 H 组给予等体积不含 STZ 的 0.1 mmol/L 枸橼酸缓冲液(pH 4.3)腹腔注射。糖尿病造模成功后第 16 周末,通过透射电镜观察肾小球超微结构,与 C 组比较,M 组表现为肾小球基底膜均质弥漫增厚,足细胞足突广泛融合,表明已出现糖尿病肾损伤(图 1),糖尿病肾病模型复制成功。



注:A 为空白对照组;B 为模型组

图 1 透射电镜观察肾小球超微结构 ($\times 10\ 000$)

4.3 给药方法 糖尿病造模成功后,即给予各组大鼠不同干预。I 组大鼠给予厄贝沙坦混悬液灌胃治疗,Z 组大鼠给予化痰通络中药灌胃治疗。给药剂量分别按照临床成人常用剂量和配方比例以及人与大鼠的体型系数计算^[11],厄贝沙坦量每天为 14.37 mg/kg 体重,相当于成人剂量的 5.8 倍(成人体重以 60 kg 计算);化痰通络中药颗粒剂混合物(颗粒质量比为丹参:

川芎:地龙:水蛭:全蝎 = 27:26:10:30:20)每天 1.08 g/kg 体重(相当于饮片每天 4.7 g/kg 体重),相当于成人剂量的 5.8 倍。每天 1 次,共 16 周。同时,C、H、M 3 组大鼠给予相应体积的饮用水灌胃。

5 标本采集 分别于第 4、8 周末,随机选取 C 组和 M 组大鼠各 6 只,禁食不禁水 12 h 后,水合氯醛 350 mg/kg 体重腹腔注射麻醉,快速取出肾脏,剥去被膜,留取肾皮质约 100 mg 放入冻存管,迅速投入液氮中,短暂冷冻后转入 -80 °C 超低温冰箱保存,待行 Western blot 检测。其余动物于第 16 周末采用相同方法处死,留取肾皮质 2 管(冻存管), -80 °C 保存,待行 PCR、Western blot 检测;并留取部分肾皮质,置于 4% 中性甲醛固定液中,4 °C 保存,待行免疫组织化学技术检测。

6 检测指标与方法

6.1 大鼠一般情况 观察各组大鼠精神状态。

6.2 各组大鼠第 3 天及第 4、8、16 周末随机血糖 分别采用稳豪型血糖仪及血糖试纸测量各组大鼠在各时间点的随机血糖。

6.3 各组大鼠第 3 天及第 4、8、16 周末 24 h 尿蛋白定量 在各时间点,分别将各组大鼠单只饲养于清洁的代谢笼中,收集 24 h 尿液,3 500 r/min,离心 10 min,取上清, -20 °C 保存,ELISA 法检测 24 h 尿蛋白定量。

6.4 各组大鼠第 16 周末肾皮质 ACE2、Mas mRNA 表达采用 Real-time PCR 检测。 取 -80 °C 冻存的第 16 周末处死的各组大鼠肾皮质,采用 TRIquick 提取组织 RNA,用紫外分光光度计检测其浓度及纯度,并调整浓度至 $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。按照 M-MLV 反转录试剂盒说明书操作,将所提取的 RNA 反转录为 cDNA。引物序列:ACE2 引物序列:上游 5'-ATGAAGAGTATGTGGTCCTG-3',下游 5'-TGGTTTCGGTTGTAGTTG-3',扩增长度 124 bp;Mas 引物序列:上游 5'-GTGCTCTCCACCAAGACCTG-3',下游 5'-GGGGACGTCTCCAGGTAAAC-3',扩增长度 163 bp。将模板 cDNA $1\ \mu\text{L}$ 、SYBR Green qPCR SuperMix $5\ \mu\text{L}$ 、上下游引物($5\ \mu\text{mol/L}$)各 $1\ \mu\text{L}$ 、DEPC 水 $2\ \mu\text{L}$ 加入 48 孔板,每个样品做 3 个复孔,震荡混匀后放入实时定量 PCR 仪,采用两步法扩增标准程序:95 °C 预变性 10 min,变性 10 s;60 °C 退火 30 s,共 45 个循环,按照 95 °C 15 s,55 °C 15 s,95 °C 15 s 的条件形成溶解曲线,检测荧光信号。以 β -actin 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析基因的相对表达水平。

6.5 各组大鼠第 16 周末肾皮质 ACE2、Mas 蛋

白表达 采用免疫组化技术检测。第 16 周末处死的各组大鼠肾皮质,经过 4% 中性甲醛固定液固定后,常规石蜡包埋、切片(厚度 4 μm),采用 SP 法,经脱水、枸橼酸缓冲液浸泡、微波修复,依次经过血清封闭、滴加稀释的一抗(ACE2 抗体,稀释度 1:100;Mas 抗体,稀释度 1:1 000)、抗兔生物素化二抗、HRP 标记链亲和素, DAB 显色、复染、封片。采用 BX63 + DP72 正置研究级显微镜进行拍照,针对阳性细胞百分比及阳性细胞染色强弱两个方面采用免疫组化评分(immunohistochemical score, IHS)^[12]: (1) 阳性细胞数百分比(记为 a): 0 分: <1%; 1 分: 1% ~ 10%; 2 分: 11% ~ 50%; 3 分: 51% ~ 80%; 4 分: 81% ~ 100%。(2) 阳性细胞显色强度(记为 b): 0 分: 阴性; 1 分: 弱阳性; 2 分: 阳性; 3 分: 强阳性。(3) a 与 b 乘积为 IHS 评分。

6.6 各组大鼠肾皮质 ACE2、Mas 蛋白表达检测 采用 Western blot 检测。取 -80 ℃ 冻存的各组大鼠肾皮质,加入 RIPA 裂解缓冲液,冰上匀浆、裂解 30 min 后,12 000 r/min 4 ℃ 离心 5 min,收集吸取上清,采用 Bradford 蛋白质定量试剂盒测定蛋白浓度。加入 loading buffer 调整浓度,煮沸 10 min,冷却后上样(100 μg),电泳、转膜后,脱脂奶封闭 2 h。加入稀释的一抗(ACE2,稀释度 1:500;Mas,稀释度 1:4 000),过夜后洗膜,加入稀释的荧光二抗(辣根过氧化物酶标记的抗兔抗体,稀释度 1:7 500),37 ℃ 避光摇床孵育 1 ~ 2 h,洗膜后用红外激光扫描仪进行灰度分析,以目的蛋白/β-actin 的灰度比值表示目的蛋白的相对含量。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据先进行方差齐性检验,若方差齐采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 法;若方差不齐采用秩和检验,组间比较采用 Mann-Whitney 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠一般情况 C、H 两组大鼠精神状态良好,无死亡。糖尿病造模成功后 16 周内,M、I、Z 3 组大鼠分别死亡 3 只、3 只、2 只,并均有 1 只血糖不达标,予以剔除。

2 各组大鼠第 3 天及第 4、8、16 周末随机血糖比较(表 1) 与同时间点 C 组比较,H、M 两组大鼠的血糖均升高($P < 0.01$);与同时间点 H 组比较,M 组均高于 H 组($P < 0.01$);同时间点 M 组与 I、Z 两组的

血糖比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠不同时间点随机血糖水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	随机血糖			
		第 3 天	4 周末	8 周末	16 周末
C	10	5.01 ± 0.47	5.01 ± 0.54	5.00 ± 0.31	5.08 ± 0.41
H	10	6.85 ± 0.65*	6.91 ± 0.53*	6.56 ± 0.65*	6.56 ± 0.76*
M	8	26.99 ± 3.73* [△]	25.10 ± 3.36* [△]	27.29 ± 3.80* [△]	25.40 ± 3.08* [△]
I	9	26.15 ± 4.22	24.40 ± 3.16	26.88 ± 3.95	25.14 ± 4.13
Z	10	26.86 ± 3.69	24.29 ± 3.96	26.79 ± 3.67	25.78 ± 4.47

注:与同时间点 C 组比较,* $P < 0.01$;与同时间点 H 组比较,[△] $P < 0.01$

3 各组大鼠第 3 天及第 4、8、16 周末 24 h 尿蛋白定量比较(表 2) 与同时间点 C 组比较,H 组尿蛋白差异均无统计学意义($P > 0.05$),M 组尿蛋白均升高($P < 0.01$),且高于 H 组($P < 0.01$);与同时间点 M 组比较,第 8 周末 I、Z 两组的尿蛋白均明显降低($P < 0.05$),第 16 周末仅 Z 组的尿蛋白低于同时间点 M 组($P < 0.01$);与同时间点 I 组比较,第 16 周末 Z 组尿蛋白较低($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠不同时间点 24 h 尿蛋白定量水平比较 (mg/24 h, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h 尿蛋白定量			
		第 3 天	4 周末	8 周末	16 周末
C	10	5.48 ± 2.02	5.78 ± 1.40	5.82 ± 1.43	6.56 ± 2.27
H	10	5.14 ± 1.13	5.16 ± 1.53	5.19 ± 1.45	5.40 ± 1.11
M	8	9.18 ± 2.01* [△]	17.06 ± 4.38* [△]	21.78 ± 2.72* [△]	24.56 ± 3.88* [△]
I	9	9.09 ± 1.71	15.14 ± 2.96	15.75 ± 3.09 [▲]	22.55 ± 2.93
Z	10	9.23 ± 1.87	16.75 ± 5.38	18.62 ± 4.63 [▲]	19.08 ± 2.83 [▲] [○]

注:与同时间点 C 组比较,* $P < 0.01$;与同时间点 H 组比较,[△] $P < 0.01$;与同时间点 M 组比较,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$;与同时间点 I 组比较,[○] $P < 0.05$

4 各组大鼠第 16 周末肾皮质 ACE2、Mas mRNA 表达比较(表 3) ACE2 mRNA 的表达水平显示:与 C 组比较,H 组 ACE2 mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$),M 组表达降低($P < 0.01$);与 H 组比较,M 组低于 H 组($P < 0.01$);与 M 组比较,Z 组升高($P < 0.01$),I 组与 M 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);I 组与 Z 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。Mas mRNA 的表达水平显示:与 C 组比较,H 组表达升高($P < 0.05$),M 组差异无统计学意义($P > 0.05$);与 H 组比较,M 组表达显著降低($P < 0.05$);与 M 组比较,Z 组表达升高($P < 0.05$),而与 I 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);Z 组 Mas mRNA 表达高于 I 组($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠第 16 周末肾皮质 ACE2、Mas mRNA 相对表达水平比较 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	ACE2 mRNA	Mas mRNA
C	10	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
H	10	1.09 ± 0.15	1.93 ± 0.23*
M	8	0.39 ± 0.05** $\Delta\Delta$	0.74 ± 0.37 Δ
I	9	0.79 ± 0.43	0.59 ± 0.24
Z	10	0.69 ± 0.07 $\Delta\Delta$	4.94 ± 0.99 $\Delta\Delta^{\circ}$

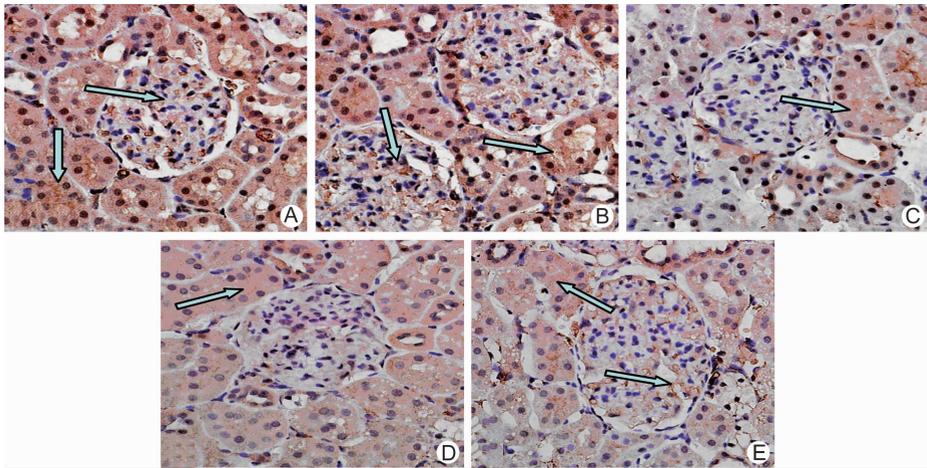
注:与 C 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 H 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 M 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 I 组比较, $\Delta P < 0.05$

5 各组大鼠第 16 周末肾皮质 ACE2、Mas 蛋白表达的免疫组化结果

5.1 观察免疫组化染色结果(图 2、3) ACE2

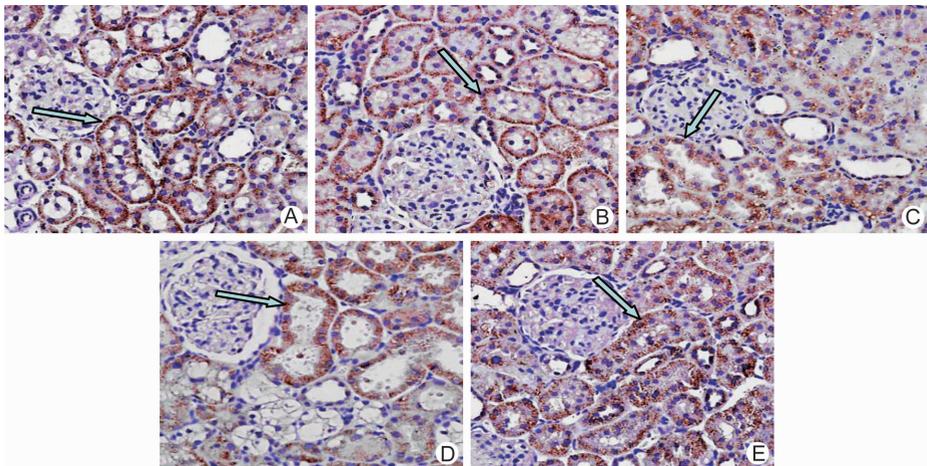
蛋白主要表达在各组大鼠的肾小球和肾小管上皮细胞中,通过肉眼观察其表达量:与 C 组比较,H 组表达差异不明显,M 组表达明显降低,且低于 H 组;与 M 组比较,I、Z 两组的表达差异不明显;且 I、Z 两组的表达接近。MAS 主要表达在各组大鼠的肾近端小管,通过肉眼观察其表达量:与 C 组比较,H 组表达略低,M 组表达明显降低,且低于 H 组;与 M 组比较,I、Z 两组表达略高,且 I、Z 两组的表达接近。

5.2 各组大鼠第 16 周末肾皮质 ACE2、Mas 蛋白 IHS 评分比较(图 4) 与 C 组比较,H 组 ACE2 和 Mas 表达评分差异均无统计学意义($P > 0.05$),M 组 2 种蛋白的表达评分均降低($P < 0.05$),且均低于 H 组($P < 0.05$);与 M 组比较,I、Z 两组 ACE2 表达评分



注:A 为空白对照组;B 为高糖高脂对照组;C 为模型组;D 为厄贝沙坦组;E 为化痰通络中药组;箭头所示为 ACE2 阳性表达

图 2 各组大鼠肾皮质 ACE2 表达 (免疫组化染色, $\times 400$)



注:A 为空白对照组;B 为高糖高脂对照组;C 为模型组;D 为厄贝沙坦组;E 为化痰通络中药组;箭头所示为 Mas 阳性表达

图 3 各组大鼠肾皮质 Mas 表达 (免疫组化染色, $\times 200$)

中国中西医结合杂志

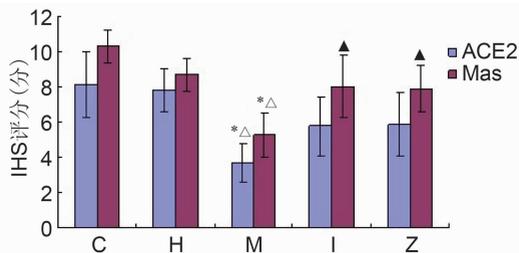
中国中西医结合杂志

中国中西医结合杂志

中国中西医结合杂志

中国中西医结合杂志

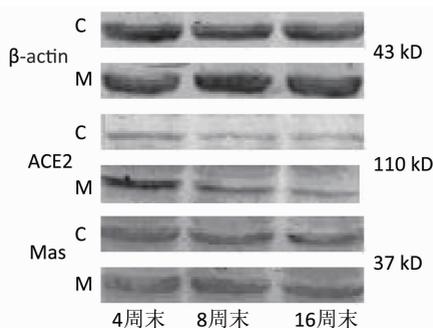
无明显差异 ($P > 0.05$), 而两组的 MAS 表达评分均升高 ($P < 0.05$); I、Z 两组间 2 种蛋白表达评分比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: C 为空白对照组; H 为高糖高脂对照组; M 为模型组; I 为厄贝沙坦组; Z 为化瘀通络中药组; 与 C 组比较, * $P < 0.05$; 与 H 组比较, [^] $P < 0.05$; 与 M 组比较, [^] $P < 0.05$

图 4 各组大鼠第 16 周末肾皮质 ACE2、Mas 蛋白 IHS 评分比较

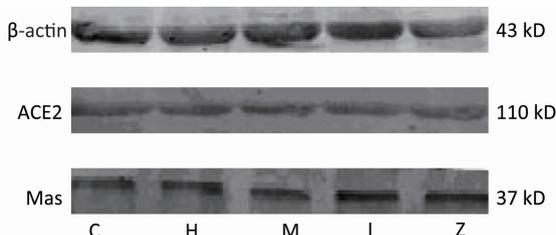
6 C 组与 M 组大鼠不同时间点肾皮质 ACE2、Mas 蛋白表达定量比较(表 4, 图 5) C 组大鼠不同时间点, 肾皮质 ACE2、Mas 蛋白的表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 M 组两种蛋白的表达水平随时间呈递减趋势。其中, 与第 4 周末 M 组 ACE2 的表达比较, 第 8 周末 M 组 ACE2 的表达无明显差异 ($P > 0.05$), 而第 16 周末 M 组 ACE2 的表达水平低于第 4 周末 ($P < 0.05$); 与第 4 周末与第 8 周末 M 组 Mas 表达比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而第 16 周末 M 组的表达水平低于第 4 周末和第 8 周末 Mas 表达水平 ($P < 0.01, P < 0.05$)。



注: C 为空白对照组; M 为模型组

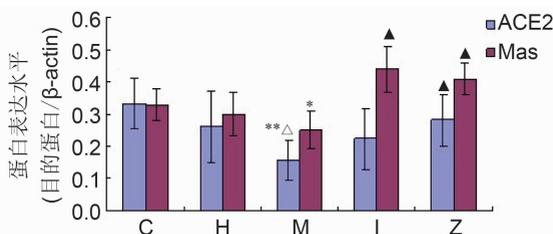
图 5 C、M 组大鼠不同时间点肾皮质 ACE2、Mas 蛋白表达的电泳图

7 各组大鼠第 16 周末肾皮质 ACE2、Mas 蛋白表达定量比较(图 6、7) ACE2 蛋白表达水平显示: 与 C 组比较, H 组表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), M 组表达降低 ($P < 0.01$), 且低于 H 组 ($P < 0.01$); 与 M 组比较, I 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), Z 组表达高于 M 组 ($P < 0.05$)。Mas 蛋白表达水平显示: 与 C 组比较, H 组表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), M 组表达降低 ($P < 0.05$); 与 H 组比较, M 组表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 M 组比较, I、Z 两组表达均升高 ($P < 0.01$); 且 I、Z 两组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: C 为空白对照组; H 为高糖高脂对照组; M 为模型组; I 为厄贝沙坦组; Z 为化瘀通络中药组

图 6 各组大鼠第 16 周末肾皮质 ACE2 及 Mas 蛋白表达电泳图



注: C 为空白对照组; H 为高糖高脂对照组; M 为模型组; I 为厄贝沙坦组; Z 为化瘀通络中药组; 与 C 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 H 组比较, [^] $P < 0.01$; 与 M 组比较, [^] $P < 0.05$

图 7 各组大鼠第 16 周末肾皮质 ACE2 及 Mas 蛋白表达比较

讨论

ACE2 是 ACE 的同系物, 高表达于心脏、肾脏和睾丸组织^[13]。作为一种专一的单羧基肽酶, 其仅能水

表 4 C、M 组大鼠不同时间点肾皮质 ACE2 及 Mas 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ACE2			Mas		
		4 周末	8 周末	16 周末	4 周末	8 周末	16 周末
C	6	0.80 ± 0.27	0.60 ± 0.17	0.58 ± 0.16	0.55 ± 0.38	0.46 ± 0.33	0.43 ± 0.25
M	6	0.70 ± 0.25	0.45 ± 0.09	0.29 ± 0.06*	0.48 ± 0.10	0.47 ± 0.07	0.24 ± 0.12** [^]

注: 与本组 4 周末比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与本组 8 周末比较, [^] $P < 0.05$

解一个氨基酸残基,使 AngI 转变成 Ang-(1-9),同时可在近端小管水解 AngII 生成大量 Ang-(1-7)^[14]。ACE2 对 AngII 的水解活性是 AngI 的 400 倍。Ang-(1-7) 通过与 Mas 受体结合,抑制了 AngII 活化 MAPK 通路的作用,参与足细胞功能、系膜细胞增殖和细胞外基质合成、小管上皮细胞转分化的调节^[15]。在 RAS 中,ACE2-Ang-(1-7)-Mas 轴和 ACE-AngII-AT1 轴之间存在平衡状态。前者通过 AngII 产生缩血管、促增殖、促进炎症反应的作用,而后者则主要通过 Ang-(1-7) 拮抗前者,发挥扩展血管、抑制细胞增殖、利尿和促尿钠排泄的功能^[16]。ACE2/ACE 之间的相对平衡决定着 AngII 的生成量^[17-19]。两条代谢通路的异常是引发糖尿病肾损伤的重要原因之一,其机制可能包括:(1) ACE-AngII-AT1 通路过度激活加速了 AngII 的生成;(2) ACE2-Ang-(1-7)-Mas 轴相对不足减少了 AngII 的降解和 Ang-(1-7) 的生成,而过多的 AngII 反馈性抑制了 ACE2 的表达而引起组织损伤。国外有研究显示,ARB 类药物可削减糖尿病大鼠肾组织 ACE2 和 Ang-(1-7) 的 Mas 受体的下调改变,并通过调节其表达减轻 STZ 诱导糖尿病大鼠的肾纤维化^[20, 21]。国内也有关于厄贝沙坦治疗糖尿病肾病的临床研究^[22-24],显示其能有效降低尿总蛋白和微量蛋白定量,延缓糖尿病肾病的肾功能损害。

本课题组从中医学理论角度研究糖尿病肾病的病机及证候,并结合前期临床和实验研究的基础^[25-28],认为瘀血阻络是贯穿糖尿病肾病始终的关键病机,糖尿病气阴两虚,气虚无力运血则血行迟缓,日久可致血瘀;阴虚火旺,煎熬津液,则津亏血少,血液黏稠不畅,日久而致血瘀;瘀血迁延不愈,由经及络,而致瘀血阻于肾络,造成糖尿病肾损害的发生。因而,化瘀通络中药成为辨证论治的必然用药。本实验用方以丹参、川芎活血化瘀,配合性善走窜之虫类药地龙、全蝎、水蛭,以加强通络逐瘀之功。

本实验结果显示,M 组大鼠的血糖水平、24 h 尿蛋白定量均显著高于同时间点 C 组及 H 组。其中,不同干预条件下的糖尿病大鼠血糖变化趋势基本一致,同时时间点的血糖水平比较,差异无统计学意义,表明化瘀通络中药及对照药物的干预对大鼠血糖无显著影响。而 24 h 尿蛋白定量结果显示,厄贝沙坦干预 8 周以及化瘀通络中药干预 16 周,尿蛋白定量均显著低于同时间点模型组,表明两种药物均有降低尿蛋白的作用,而化瘀通络中药的长期疗效更优于阳性对照药物。糖尿病大鼠肾皮质 ACE2 和 Mas 受体的 mRNA 以及蛋白表达均较正常组显著下调,而化瘀通络中药干预对两者均具

有显著的上调作用,充分表明化瘀通络中药通过 ACE2-Ang-(1-7)-Mas 轴的活化对高糖高脂饲料联合 STZ 注射造成的糖尿病大鼠肾脏具有显著的保护作用,且优于 ARB 类对照药物的干预作用。

参 考 文 献

- [1] Ferrario CM. Does angiotensin-(1-7) contribute to cardiac adaptation and preservation of endothelial function in heart failure [J]. *Circulation*, 2002, 105(13): 1523-1525.
- [2] Santos RA, Simões Silva AC, Maric C, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(14): 8258-8263.
- [3] Roks AJ, Van Geel PP, Pinto YM, et al. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human rennin-angiotensin system [J]. *Hypertension*, 1999, 34(2): 296-301.
- [4] 郭登洲,王月华,张芬芳,等.活血化瘀消癥通络中药治疗糖尿病肾病 76 例临床研究 [J]. *中国全科医学*, 2007, 10(20): 1692-1693.
- [5] Luo J, Quan J, Tsai J, et al. Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus [J]. *Metabolism*, 1998, 47(6): 663-668.
- [6] Lin KY, Ito A, Asagami T, et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: Role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase [J]. *Circulation*, 2002, 106(8): 987-992.
- [7] Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat [J]. *Metabolism*, 2000, 49(11): 1390-1394.
- [8] Danda RS, Habiba NM, Rincon-choles H, et al. Kidney involvement in a nongenetic rat model of type 2 diabetes [J]. *Kidney Int*, 2005, 68(6): 2562-2571.
- [9] Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening [J]. *Pharmacol Res*, 2005, 52(4): 313-320.
- [10] Fang DH, Guan HY, Liu J, et al. Early intensive insulin therapy attenuates the p38 pathway in the renal cortex and indices of nephropathy in diabetic rats [J]. *Endocr J*, 2012, 59(1): 81-90.
- [11] 陈奇主编.中药药理研究方法学 [M]. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2011:1261-1263.

- [12] Geleilete TJ, Costa RS, Dantas M, et al. Alpha-smooth muscle actin and proliferating cell nuclear antigen expression in focal segmental glomerulosclerosis: functional and structural parameters of renal disease progression [J]. Braz J Med Biol Res, 2001, 34(8): 985-991.
- [13] Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9 [J]. Circ Res, 2000, 87(5): E1-E9.
- [14] Li N, Zimpelmann J, Cheng K, et al. The role of angiotensin converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1-7 by rat proximal tubules [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2005, 288(2): F353-F362.
- [15] Su Z, Zimpelmann J, Burns KD. Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II stimulated phosphorylation of MAP kinases in proximal tubular cells [J]. Kidney Int, 2006, 69(12): 2212-2218.
- [16] Ferreira AJ, Santos RA, Bradford CN, et al. Therapeutic implications of the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases [J]. Hypertension, 2010, 55(2): 207-213.
- [17] Santos RA, Ferreira AJ, Simões Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-Mas axis [J]. Exp Physiol, 2008, 93(5): 519-527.
- [18] Ingelfinger JR. ACE2: a new target for prevention of diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(11): 2957-2959.
- [19] Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase [J]. J Biol Chem, 2000, 275(43): 33238-33243.
- [20] Lakshmanan AP, Watanabe K, Thandavarayan RA, et al. Telmisartan attenuates oxidative stress and renal fibrosis in streptozotocin induced diabetic mice with the alteration of angiotensin-(1-7) Mas receptor expression associated with its PPAR- γ agonist action [J]. Free Radic Res, 2011, 45(5): 575-584.
- [21] Lakshmanan AP, Thandavarayan RA, Watanabe K, et al. Modulation of AT1R/MAPK cascade by an olmesartan treatment attenuates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 348(1): 104-111.
- [22] 何明海, 杨文翔, 张晋波. 厄贝沙坦对糖尿病肾病患者尿蛋白的影响 [J]. 华西医学, 2004, 19(2): 236.
- [23] 朱彩花. 厄贝沙坦治疗糖尿病肾病早期效果观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 17(11): 1652-1653.
- [24] 张日赤, 薛峰. 厄贝沙坦治疗糖尿病肾病的临床研究 [J]. 中国当代医药, 2013, 20(8): 98-99.
- [25] 陈志强, 赵雯红, 张江华, 等. 益气养阴消癥通络中药对早期糖尿病大鼠肾脏的保护作用及其相关机制 [J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(11): 746-750.
- [26] 王凤丽, 陈志强, 王月华, 等. 益气养阴消癥通络方治疗早期糖尿病肾病临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(1): 35-38.
- [27] 李黎莉, 陈志强, 王月华, 等. 益气养阴化痰通络中药及其拆方对糖尿病大鼠模型 nephrin 蛋白的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(7): 960-964.
- [28] Li LL, Chen ZQ, Wang YH, et al. Relationship between urinary nephrin and urinary albumin changes in diabetic rats and effects of Yiqi Yangyin Huayu Tongluo Recipe [J]. J Tradit Chin Med, 2012, 32(2): 278-282.

(收稿:2013-10-31 修回:2014-02-28)

欢 迎 投 稿 欢 迎 订 阅