

- 23177-23184.
- [7] Christensen RA, Fujikawa K, Madore R, et al. NERF2, a member of the Ets family of transcription factors, is increased in response to hypoxia and angiopoietin-1: a potential mechanism for Tie2 regulation during hypoxia [J]. *J Cell Biochem*, 2002, 85(3):505-515.
- [8] Hanada T, Yoshimira A. Regulation of cytokine signaling and inflammation [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002, 13(4-5): 413-421.
- [9] Rudders S, Gaspar J, Madore R, et al. ESE-1 is a novel transcriptional mediator of inflammation that interacts with NF-kappa B to regulate the inducible nitric-oxide synthase gene [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(5):3302-3309.
- [10] Dube A, Thai S, Gaspar J, et al. Elf-1 is a transcriptional regulator of the Tie2 gene during vascular development [J]. *Circ Res*, 2001, 88(2):237-244.
- [11] Zhang DH, Yang I, Cohn I, et al. Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3 [J]. *Immunity*, 1999, 11(4): 473-482.
- [12] 吉宁飞, 卞涛, 符晓苏, 等. 殷凯生川芎嗪对支气管哮喘大鼠肺组织转录因子 GATA-3 表达的影响 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2006, 29(12):852-853.
- [13] Wozniak RJ, Boyer ME, Grass JA, et al. Context-dependent GATA factor function: combinatorial requirements for transcriptional control in hematopoietic and endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(19):14665-14674.

(编辑 刘清海)

不同剂量苯那普利对自发性高血压大鼠肾小球硬化的影响

石成钢, 尹琼丽, 成彩联, 洪国保, 施 杰

(中山大学附属第三医院肾内科, 广东广州 510630)

摘要:【目的】观察超大剂量血管紧张素转化酶抑制剂干预能否进一步抑制肾小球硬化。【方法】30只8周龄雄性自发性高血压大鼠随机分为模型对照组(M组),大剂量(10 mg·kg⁻¹·d⁻¹)苯那普利治疗组(LT组),超大剂量(50 mg·kg⁻¹·d⁻¹)苯那普利治疗组(HT组),以10只Wistar-Kyoto大鼠(Wistar-Kyoto rats, WKY)为正常对照组(N组)。检测各组大鼠的血压、血清肌酐及24h尿蛋白;RT-PCR和免疫组织化学方法分别检测肾组织转化生长因子-β₁ (transforming growth factor, TGF-β₁)和纤溶酶原激活物抑制因子(Plasminogen Activator Inhibitor, PAI-1)的mRNA和蛋白表达;肾组织石蜡切片评估肾小球胶原沉积程度,采用MASSON染色。【结果】1)TGF-β₁和PAI-1的mRNA和蛋白表达:LT组和HT组的TGF-β₁和PAI-1的mRNA和蛋白表达被抑制($P < 0.01$);两治疗组间无统计学差异($P > 0.05$)。2)肾小球胶原沉积:LT组和HT组的胶原面积/肾小球面积比值均明显减低($0.17 \pm 0.15, 0.18 \pm 0.11$ vs 0.30 ± 0.28 ; $P = 0.001$);两治疗组间无统计学差异(0.17 ± 0.15 vs 0.18 ± 0.11 ; $P = 0.404$)。【结论】大剂量与超大剂量血管紧张素转化酶抑制剂均能降低血压,减少蛋白尿,抑制肾组织TGF-β₁和PAI-1的mRNA和蛋白表达,延缓肾小球硬化;但超大剂量血管紧张素转化酶抑制剂不能进一步的抑制肾小球硬化。

关键词: 血管紧张素转化酶抑制剂; 肾小球硬化; 转化生长因子-β₁; 纤溶酶原激活物抑制因子

中国分类号:R692 文献标识码:A 文章编号:1672-3554(2008)3S-0011-04

血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI)能减少蛋白尿,减轻细胞外基质沉积,从而延缓肾小球硬化(glomerulosclerosis, GS)的进展已被大量研究证实^[1-3]。迄今已有大量关于ACEI对肾保护作用的临床及动物实验研究,就ACEI治疗剂量而言,过去大部分研究结果^[4]显示:大剂量ACEI的肾保护作用优于常规剂量。但在超大剂量ACEI对肾小球硬化的影响方面,研究不多,并存在争议。本实验设计将大剂量与超大剂量苯那普利(benazepril)进行比较观察,探讨超大剂量ACEI能否进一步抑制肾小球硬化。

1 材料与方法

1.1 材料

TRIZON试剂购自Invitrogene公司,逆转录试剂盒购自Fermentas公司,Taq酶购自Takara公司,苯那普利(商品名:洛汀新),购自瑞士诺华制药有限公司。

1.2 动物分组

8周龄自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)30只,质量170~220g,购自北京维通利华动物

收稿日期:2008-01-17

基金项目:广东省自然科学基金(05001702)

作者简介:石成钢(1963-),男,安徽安庆人,医学博士,副主任医师, E-mail:ericshi412@sina.com

实验技术有限公司,8 周龄同源正常的 Wistar-Kyoto 大鼠(Wistar-Kyoto rats, WKY)10 只,质量 170 ~ 220 g, 购自中山大学动物中心,常规自由饮水进食。SHR 随机分成 3 组($n=10$):①SHR 模型对照组(M 组);②10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 苯那普利治疗组(LT 组);③50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 苯那普利治疗组(HT 组);WKY 正常对照组(N 组),在清洁环境下,适应一周(剂量由预实验获得)。检测血压,血清肌酐(serum creatinine, Scr),24 h 尿蛋白(24 hours urinary protein, 24 h UPR)从出现蛋白尿的第 8 周开始,M 组和 N 组灌服饮用水,LT 组和 HT 组分别灌服 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 和 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 苯那普利,喂养 4 周后处死。

1.3 大鼠血压测定

采用 RBP-1B 型大鼠尾动脉血压心率测定仪(中日友好医院)。各组大鼠分别于第 0、4、8 和 12 周在清醒安静状态下测量尾动脉血压,给药后血压在当天给药前测量。

1.4 大鼠生化指标测定

分别于第 0、4、8 和 12 周,用代谢笼收集大鼠 24 h 尿液,在收集瓶中加入适量甲苯,用 OLYMPUS AU640 全自动分析仪测定 24 h UPR。实验结束前于大鼠尾动脉采集血液,实验结束时于下腔静脉采血,3 000 r/min($r=20$ cm)离心 15 min 送检,由 OLYMPUS AU640 全自动分析仪检测 Scr。

1.5 大鼠肾组织 TGF- β_1 和 PAI-1 的 mRNA 的表达

采用 TRIZON 试剂从大鼠肾组织中提取总 RNA,将总 RNA 反转录成相应的 cDNA,行 PCR,产物凝胶电泳后,用图像分析系统拍照并进行半定量分析,TGF- β_1 和 PAI-1 的 mRNA 的吸光度值(A)比值,分别与 GAPDH 的 mRNA 的吸光度值相比较即得到 TGF- β_1 和 PAI-1 的 mRNA 的相对表达量。引物由上海生物技术服务有限公司合成。GAPDH:sense GGC AAG TTC AAT GGC ACA GT, antisense AAG GTG GAG GAA TGG GAG TT,扩增片段长为 725 bp。TGF- β_1 :sense CTG TCC AAA CTA AGG CTC GC,antisense AGA CAG CCA CTC AGG CGT A,扩增片段长为 432 bp。PAI-1:sense ATG GAA CAA GAA TGA GAT CA,antisense TCA AAG GGT GCT GCA ATG AAC,扩增片段长为 472 bp。循环参数为:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,53 °C 退火 50 s,72 °C 延伸 45 s,循环 35 次结束后,于 72 °C 延伸 7 min。

1.6 大鼠肾组织 TGF- β_1 和 PAI-1 的蛋白表达

TGF- β_1 和 PAI-1 多克隆 抗以及即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。实验方法按照试剂盒所提供的的方法和步骤进行。取免疫组化的肾组织切片置于显微镜下,计数 15 个肾小球,光学放大 400 倍,图象摄入德国 KONTRON IBAS 2.5 全自动图像分析系统,运用阳性单位 $PU=100 \times (GA-Ga) / [(1-Aa) \times Gmax]$ 的计算公式,计算阳性单位的数值^[5]。

1.7 病理指标检测

将多聚甲醛固定的标本,常规石蜡包埋切片,进行 Masson 染色后,观察肾小球硬化的改变情况。肾小球胶原沉积评分^[6]:在光镜($\times 200$)视野下,每张切片随机选择肾组织内 15 个肾小球,利用图像分析系统,首先检测肾小球

总面积,再检测相应肾小球内胶原的总 IOD(光密度)值,计算胶原纤维 IOD/肾小球总面积,代表胶原纤维的含量。

1.8 统计学分析

所有数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,用统计分析软件包 SPSS 11.5 进行处理, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血压

M 组血压较 N 组明显升高($P < 0.01$);LT 组和 HT 组血压明显低于 M 组($P < 0.05$),高于 N 组,但无统计学差异($P > 0.05$);两治疗组间血压无明显差异(表 1)。

表 1 血压比较 ($n=10, \bar{x} \pm s, \text{mmHg}$)

组别	0 周	4 周	8 周	12 周
N 组	120 \pm 6 ²⁾³⁾	122 \pm 8 ²⁾³⁾	123 \pm 10 ²⁾³⁾	124 \pm 9 ²⁾³⁾
M 组	164 \pm 9	177 \pm 10	185 \pm 13	190 \pm 10
LT 组	164 \pm 9	175 \pm 15	132 \pm 5 ¹⁾	134 \pm 6 ¹⁾
HT 组	159 \pm 10	165 \pm 10	125 \pm 10 ¹⁾	124 \pm 8 ¹⁾

1)与 M 组比较: $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$; 3)与 LT 组比较, $P < 0.05$

2.2 尿蛋白和血清肌酐

与模型组相比,两治疗组 24 h UPR 明显降低($P < 0.05$),但高于正常对照组,两治疗组间 24 h UPR 无差异($P > 0.05$);各组 Scr 无明显区别($P > 0.05$,表 2)。

表 2 肌酐和 24 h 蛋白尿比较 ($n=10, \bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}, \text{mg}/24 \text{ h}$)

组别	0 周	4 周	8 周	12 周
N 组 Scr	38 \pm 6	38 \pm 4	38 \pm 6	37 \pm 3
24 h UPR	12.6 \pm 3.0 ¹⁾³⁾	14 \pm 4.1 ³⁾	18.1 \pm 10.6 ²⁾³⁾	19.4 \pm 8.8 ²⁾³⁾
M 组 Scr	40.1 \pm 4.1	36.7 \pm 1.7	38.7 \pm 3.6	35.6 \pm 1.7
24 h UPR	20.9 \pm 5.2	19.4 \pm 3.7	40.7 \pm 5.1	42.3 \pm 2.5
LT 组 Scr	39 \pm 4	37 \pm 3	39 \pm 4	36 \pm 3
24 h UPR	25 \pm 7	23 \pm 3	30 \pm 10 ¹⁾	29 \pm 6 ¹⁾
HT 组 Scr	38 \pm 4	40 \pm 8	37 \pm 3	37 \pm 5
24 h UPR	23 \pm 7	21 \pm 9	31 \pm 6 ¹⁾	30 \pm 4 ¹⁾

1)与 M 组比较: $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$; 3)与 LT 组比较, $P < 0.05$; Scr:肌酐;24 h UPR:24 h 蛋白尿

2.3 TGF- β_1 mRNA 和蛋白表达

RT-PCR 实验发现模型对照组较正常对照组 TGF- β_1 mRNA 和蛋白表达明显上调,两者之间的表达有显著差异($P < 0.01$);LT 组和 HT 组的 TGF- β_1 mRNA 和蛋白的表达被抑制,其表达量与模型对照组相比有统计学差异($P < 0.01$);两治疗组间无差异($P > 0.05$,图 1,3,表 3)。

2.4 PAI-1 mRNA 和蛋白表达

RT-PCR 实验发现模型对照组较正常对照组 PAI-1 mRNA 和蛋白表达明显上调,两者之间的表达有显著差异($P < 0.01$);LT 组和 HT 组的 PAI-1 mRNA 和蛋白的表达

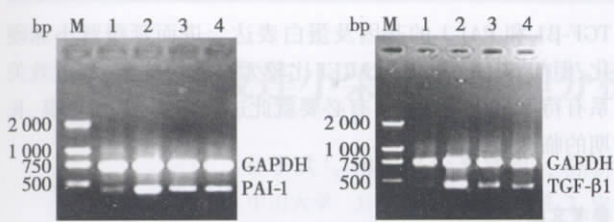


图 1 RT-PCR 检测 TGF-β₁ mRNA 表达

图 2 RT-PCR 检测 PAI-1 mRNA 表达

M: Marker; 1: 正常对照组; 2: 模型对照组; 3: 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 苯那普利治疗组; 4: 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 苯那普利治疗组

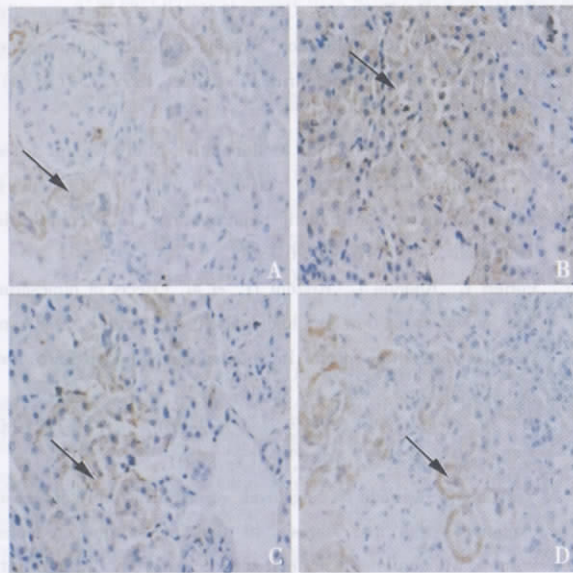


图 3 免疫组化检测 TGF-β₁ 蛋白表达

A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 苯那普利治疗组; D: 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 苯那普利治疗组

表 3 肾组织 TGF-β₁ mRNA 和蛋白的表达 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	TGF-β ₁ /GAPDH	阳性单位 (PU)
N 组	0.46 ± 0.26 ²⁾	9.5 ± 3.2 ²⁾
M 组	1.15 ± 0.13	20.4 ± 2.5
LT 组	0.55 ± 0.08 ²⁾	11.1 ± 1.3 ²⁾
HT 组	0.45 ± 0.24 ²⁾	11.0 ± 2.3 ²⁾

1) 与 M 组比较; P < 0.05, 2) P < 0.01; 3) 与 LT 组比较; P < 0.05

被抑制, 其表达量与模型对照组相比有统计学差异 (P < 0.01); 两治疗组间无差异 (P > 0.05, 图 2, 4, 表 4)。

表 4 肾组织 PAI-1 mRNA 和蛋白的表达 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	PAI-1/GAPDH	阳性单位 (PU)
N 组	0.34 ± 0.04 ²⁾	8.3 ± 1.2 ²⁾
M 组	1.11 ± 0.95	21.5 ± 2.5
LT 组	0.47 ± 0.21 ²⁾	9.3 ± 3.6 ²⁾
HT 组	0.48 ± 0.28 ²⁾	10.3 ± 1.3 ²⁾

1) 与 M 组比较; P < 0.05, 2) P < 0.01; 3) 与 LT 组比较; P < 0.05

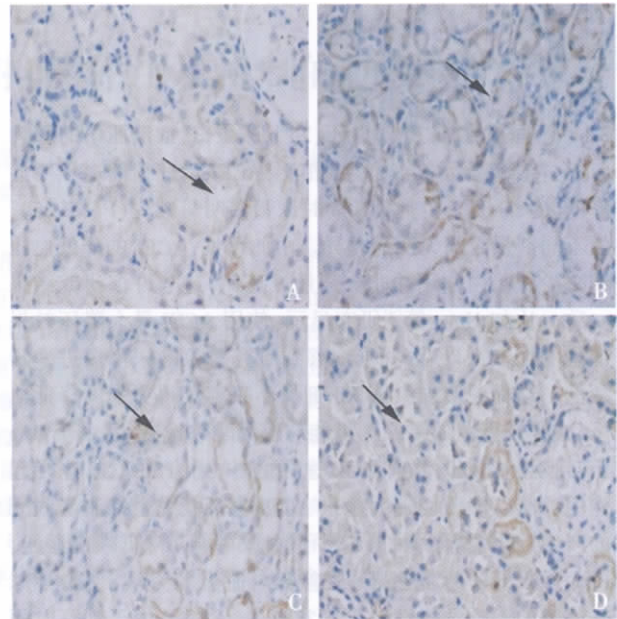


图 4 免疫组化检测 PAI-1 蛋白表达

A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 苯那普利治疗组; D: 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 苯那普利治疗组

2.5 肾小球硬化

模型对照组较正常对照组肾小球内的胶原沉积明显增加 (0.30 ± 0.28 vs 0.15 ± 0.24, P < 0.05); LT 组 (0.17 ± 0.15) 和 HT 组 (0.18 ± 0.11) 肾小球内的胶原沉积减少, 与模型对照组有统计学差异 (P < 0.05, 图 5); 两治疗组间无统计学差异 (P > 0.05)。

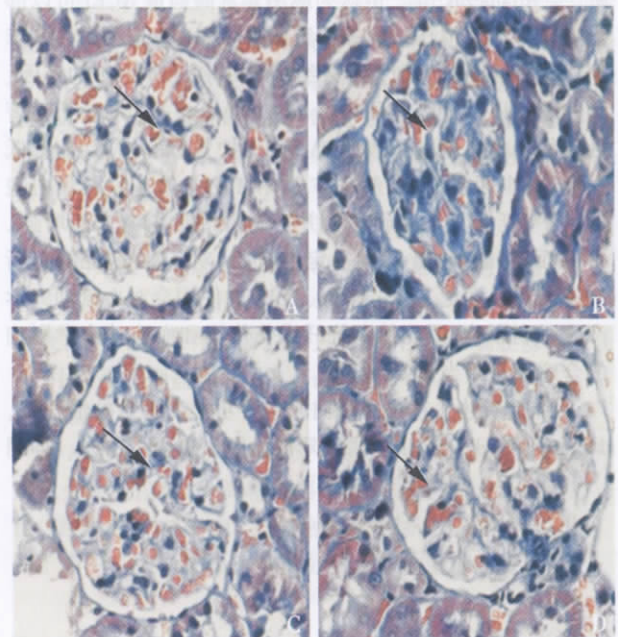


图 5 肾小球胶原沉积

A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 苯那普利治疗组; D: 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 苯那普利治疗组

3 讨 论

3.1 不同剂量 ACEI 对血压、24 h 尿蛋白、血清肌酐的影响

本研究显示:与模型组相比,ACEI 治疗组的血压明显降低($P < 0.05$)、实验第 8 周时尿蛋白明显减少($P < 0.05$),但不同剂量组间无明显差异。由此可见,ACEI 的降低血压和减少尿蛋白作用并非与剂量成正比,这与许多研究结果一致。比如 Haas 等^[7]研究显示:使用 ACEI 最大降压效果剂量的加倍剂量后,并未观察到研究对象的尿蛋白进一步减低。这说明加大 ACEI 剂量不一定获得更强的降低血压、减少尿蛋白效果。这可能与醛固酮逃逸有关,由于 Ang 转换为 Ang₂,除有 ACE 途径之外,还有非 ACE 途径起作用,所以即使用超大剂量 ACEI 也不能完全抑制醛固酮的产生。同时提示 ACEI 减少蛋白尿可能与降低系统血压,进而降低肾小球滤过压,改善肾内血流动力学,使肾小球基底膜的渗透选择性趋于正常有关。另外,由于观察时间仅 12 周,我们没有观察到各治疗组间 Scr 的差异。本研究显示 ACEI 可以降低血压,减少蛋白尿,但超大剂量并不提供更强的降压及减少尿蛋白的作用。

3.2 对大鼠肾组织 TGF- β_1 和 PAI-1 的基因、蛋白表达以及肾小球硬化的影响

本实验观察到,与模型组比较,LT 组和 HT 组大鼠肾脏的 TGF- β_1 和 PAI-1 mRNA 以及蛋白表达明显下调($P < 0.01$),肾小球内胶原沉积减少($P < 0.05$);但两治疗组间无明显差异。尽管循证医学已证实,ACEI 及 ARB 能降低糖尿病肾病及非糖尿病肾病患者的尿蛋白,延缓肾功能恶化^[8]。甚至有观点建议使用 5 倍推荐剂量以上 ARB 来保护肾脏^[9]。Adamczak 等^[10]也认为应用非常高剂量 ACEI 可以部分逆转肾小球损伤。但本研究结果显示 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 苯那普利能够明显抑制大鼠肾组织 TGF- β_1 和 PAI-1 的基因、蛋白表达以及肾小球硬化,与 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量无显著性差异。本实验结果表明,ACEI 保护肾脏的作用(如降低血压、减少尿蛋白,抑制 TGF- β_1 和 PAI-1 的基因及蛋白表达水平,延缓肾小球硬化),并不随着剂量的增大而增强。一方面,可能 ACEI 达到一定剂量后,对 ACE 途径的阻断作用已经最大化。另一方面,ACEI 的使用会对血流动力学产生不利影响,因此兼顾抗纤维化作用和血流动力学影响的合适剂量相当重要。

综上所述,在出现蛋白尿但肾功能尚正常的情况下,10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ACEI 能明显降低血压、减少蛋白尿、抑制

TGF- β_1 和 PAI-1 的基因及蛋白表达、进而延缓肾小球硬化,但与 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ACEI 比较无显著性差异,其量效关系有待于进一步研究。有必要就此进行多中心、大规模、长期的临床随机研究。

参考文献:

- [1] Remuzzi A, Gagliardini E, Sangalli F, et al. ACE inhibition reduces glomerulosclerosis and regenerates glomerular tissue in a model of progressive renal disease[J]. *Kidney Int*, 2006, 69(7): 1124-1130.
- [2] Ruggenenti P, Perna A, Gherardi G, et al. Renoprotective properties of ACE-inhibition in non-diabetic nephropathies with non-nephrotic proteinuria[J]. *Lancet*, 1999, 354(9176): 359-364.
- [3] Cinotti GA, Zucchelli PC, Collaborative Study Group. Effect of Lisinopril on the progression of renal insufficiency in mild proteinuric non-diabetic nephropathies[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2001, 16(5): 961-966.
- [4] Porteri E, Rodella L, Rizzoni D, et al. Effects of olmesartan and enalapril at low or high doses on cardiac, renal and vascular interstitial matrix in spontaneously hypertensive rats[J]. *Blood Press*, 2005, 14(3): 184-192.
- [5] 申 洪. 免疫组织化学染色定量方法研究[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 1995, 4(1): 89-91.
- [6] Moriyama T, Kawada N, Nagatoyak, et al. Fluvastatin suppresses oxidative stress and fibrosis in the interstitium of mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction [J]. *Kidney Int*, 2001, 59(6): 2095-2103.
- [7] Haas M, Leko-Mohr Z, Erler C, et al. Antiproteinuric versus antihypertensive effects of high-dose ACE inhibitor therapy [J]. *Am J Kidney Dis*, 2002, 40(3): 458-463.
- [8] 李 超, 姜探奇, 汤 颖, 等. 高剂量缬沙坦单独或联合贝拉普利对慢性肾病的疗效[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006, 27(3): 354-357.
- [9] Weinberg AJ, Zappe DH, Ashton M, et al. Safety and tolerability of high-dose angiotensin receptor blocker therapy in patients with chronic kidney disease: a pilot study[J]. *Am J Nephrol*, 2004, 24(3): 340-345.
- [10] Adamczak M, Gross ML, Amann K, et al. Reversal of glomerular lesions involves coordinated restructuring of glomerular microvasculature[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(12): 3063-3072.

(编辑 孙慧兰)