

## 缬沙坦对实验性糖尿病大鼠肾脏的保护作用

郭聪芳, 张 晔

(天津市第一中心医院急救医学研究所, 天津 300192)

【关键词】 糖尿病; 缬沙坦; 肾脏; 保护作用

中图分类号: R242 文献标识码: B 文章编号: 1008-9691(2008)03-0185-02

糖尿病(DM)可引起视网膜、肾脏、神经等多种器官并发症,其中糖尿病肾病(DN)是其最严重的并发症之一,也是导致DM患者死亡的主要原因。DN肾小球硬化是DN产生的主要机制,主要是由微血管的损伤引起,目前认为结缔组织生长因子(CTGF)是DN肾小球硬化形成过程中的重要生长因子<sup>[1]</sup>。阻断CTGF表达或抑制其活性,可能是一种更特异、更有效的防治DN肾小球硬化症的手段。近年来的研究提示,同型半胱氨酸血症是血管性疾病的一个独立危险因素<sup>[2]</sup>,研究结果表明,高同型半胱氨酸血症与尿蛋白排泄率及DN有关,认为同型半胱氨酸血症是独立于高血压、DM、蛋白摄入和肾功能之外的影响尿蛋白排泄的因素之一<sup>[3-4]</sup>。本实验中通过观察缬沙坦对链脲佐菌素(STZ)诱导DM大鼠肾组织血管紧张素Ⅰ(AngⅠ)含量及CTGF表达的影响,探讨其肾脏保护作用机制。

### 1 材料与与方法

**1.1 大鼠DM模型的建立、分组及给药方法:**选择8周龄健康雄性Wistar大鼠36只,体重200~220g(由天津市放射医学研究所实验动物中心提供)。按随机数字表法将大鼠分为正常组(10只)和DM模型组(26只)。DM模型制备:从左下腹腔单次注射65mg/kg STZ溶液,禁食48h后经尾尖取血测空腹血糖,血糖 $\geq 16.7$ mmol/L为DM模型成功,共24只成模,7d后将成模大鼠随机均分为模型组和缬沙坦治疗组。缬沙坦治疗组用缬沙坦按55mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃,正常组和模型组大鼠用等量蒸馏水灌胃,每日上午1次。整个过程不使用胰岛素,自由进食,共喂养12周。

作者简介:郭聪芳(1983-),女(汉族),山西省人,硕士研究生,Email:congfang830126@sina.com。

表1 12周后各组大鼠BUN、SCr、UAER、Hcy的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数	BUN(mmol/L)	SCr( $\mu$ mol/L)	UAER(mg)	Hcy( $\mu$ mol/L)
正常组	10	5.51 $\pm$ 0.43	12.88 $\pm$ 3.58	9.83 $\pm$ 1.22	13.38 $\pm$ 1.37
模型组	10	14.85 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	68.68 $\pm$ 5.02 <sup>a</sup>	72.06 $\pm$ 2.09 <sup>a</sup>	23.93 $\pm$ 3.10 <sup>a</sup>
治疗组	10	9.79 $\pm$ 0.40 <sup>ab</sup>	40.78 $\pm$ 6.82 <sup>ab</sup>	45.15 $\pm$ 1.43 <sup>ab</sup>	19.76 $\pm$ 2.99 <sup>ab</sup>

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$

表2 12周后各组大鼠肾组织AngⅠ含量及肾小球、肾小管CTGF表达的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数	AngⅠ (ng/g)	肾小球CTGF(A值)	肾小管CTGF(A值)
正常组	10	2.66 $\pm$ 0.22	0.10 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01
模型组	10	8.55 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.19 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
治疗组	10	5.78 $\pm$ 0.24 <sup>ab</sup>	0.13 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.14 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$

**1.2 标本收集与处理:**于实验结束前1周,收集24h尿液,记录总量,离心后-80℃保存备用。12周时,空腹下水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,心脏取血,离心,-80℃保存备用;然后活杀分离双肾,左肾用于称重,右肾部分用多聚甲醛水溶液固定用于病理和免疫组化检测,部分用液氮快速冰冻保存,备测AngⅠ。

**1.3 生化指标检测方法:**用全自动生化分析仪测定血糖、尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)、24h尿白蛋白(UAER)。

**1.4 肾组织AngⅠ含量测定:**取左肾皮质100mg制成匀浆,离心取上清液。用放射免疫试剂盒检测肾组织AngⅠ含量,操作按说明书要求进行。

**1.5 免疫组化方法检测肾组织CTGF的表达:**将石蜡包埋的肾组织制成4 $\mu$ m厚切片,按照免疫组化二步法检测肾组织CTGF的表达。以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。每个标本在400倍光镜下随机选取8个视野,用图像采集和分析管理系统进行半定量分析,染色阳性部位的深浅以平均吸光度(A)值表示。

**1.6 血浆同型半胱氨酸(Hcy)浓度测定:**应用高效液相色谱荧光分析法。

**1.7 统计学处理:**应用SPSS 11.5统计软件进行数据分析。数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 大鼠一般状态:**成模大鼠均出现多饮、多食、多尿、消瘦、毛发枯黄无光泽等DM表现,部分出现肢体感染、溃疡和白内障等合并症。模型组上述症状明显,死亡2只,考虑死因为血糖过高引起酮症酸中毒或感染;缬沙坦治疗组因灌胃死亡5只。

**2.2 实验12周后各组大鼠BUN、SCr、UAER及Hcy比较(表1):**模型组大鼠BUN、SCr、UAER和Hcy均明显升高,缬沙坦治疗组上述指标均明显下降,但仍高于正常组水平( $P$ 均 $< 0.01$ )。

**2.3 肾组织AngⅠ含量及CTGF表达(表2):**模型组AngⅠ含量明显高于正常组,缬沙坦治疗组AngⅠ含量明显低于模型组( $P$ 均 $< 0.01$ )。CTGF阳性染色主要位于肾小球上皮细胞、系膜细胞及系膜区、肾小管基膜及管周毛细血管处。正常组大鼠肾小球、肾小管CTGF仅有微弱表达;模型组CTGF表达明显高于正常组;缬沙坦治疗组CTGF表达

明显低于模型组 ( $P$  均  $< 0.01$ )。

2.4 相关性分析 (图 1): CTGF 在肾小球的表达与 24 h UAER 呈显著正相关 ( $Y = 0.002 4X + 0.041 5, r = 0.930 1, P = 0.000$ )。

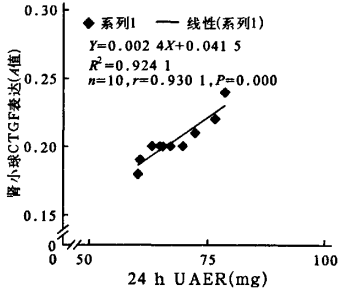


图 1 DM 大鼠肾小球 CTGF 表达与 24 h UAER 的关系

### 3 讨论

DN 是 DM 的常见慢性并发症,也是 DM 患者死亡的主要原因之一,并已成为发达国家终末期肾功能衰竭(肾衰)的首位原因。DN 的发病机制尚未完全明了,许多研究认为 DN 的形成与遗传、高血糖、血流动力学改变以及细胞因子等因素有关。近年来人们认识到 DM 时存在肾脏局部肾素-血管紧张素系统(RAS)的异常,可能与 DN 的发生发展关系密切<sup>[5]</sup>。早期研究多注重全身的 RAS,认为 DN 处于一个“低肾素”状态,然而,事实上 Ang II 和血浆中的肾素水平是不一致的,血浆中的肾素活性并不能准确反映肾脏中 RAS 的活性,大量证据表明,局部组织中 RAS 的调节是独立于血浆 RAS 之外的。DM 时肾脏局部 Ang II 的表达增高,直接参与肾脏的进行性损害,它除了通过影响全身及肾脏局部血流动力学、升高肾小球内压力外,还作为一种生长因子及促纤维化因子,一方面可直接导致细胞肥大及细胞外基质(ECM)的积聚,另一方面还能通过促进转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ )等多种细胞生长因子的生成,使 ECM 降解减少、生成增多<sup>[6]</sup>,间接引起肾间质 ECM 积聚,也是加重 DN 的重要因素,导致肾脏肥大和肾脏纤维化。

DN 早期病理改变主要是肾脏肥大和 ECM 的进行性积聚。CTGF 是调节细胞增生、分化和 ECM 形成的重要效应分子,由 TGF- $\beta 1$  诱导产生的一种新的致纤维化蛋白,可刺激成纤维细胞增

殖和分泌胶原,对多种间质细胞的分化、增生及 ECM 的合成和降解具有很强的调控作用,其异常表达在多种类型纤维化疾病进程中起关键作用。在高糖环境、糖基化终末产物、Ang II、机械性张力、低氧等因素刺激时,CTGF 呈现高表达<sup>[7-8]</sup>。Ang II 通过 TGF- $\beta$  介导或直接刺激作用上调 CTGF 表达,后者促进成纤维细胞增生、细胞黏附和 ECM 合成增加。Rupérez 等<sup>[9]</sup>发现,给正常大鼠注射 Ang II 后 3 d 肾脏 CTGF 的表达上升,7 d 时肾小球、肾小管和肾动脉出现 CTGF 的过度表达,其与肾小管损伤程度及纤维结合蛋白沉积密切相关,进一步支持 CTGF 可能是 Ang II 致纤维化作用的重要介导因子,Ang II 可以直接诱导 CTGF 的上调,并独立于其升压作用;体外实验中,Ang II 能诱导 CTGF 的表达,CTGF 能够减少 Ang II 诱导的纤维结合蛋白合成,提示 CTGF 可能参与了 Ang II 的致纤维化作用。CTGF 特异性抗体亦可阻断 Ang II 在体外诱导的肾小管细胞肥大<sup>[8]</sup>。

近年来的研究提示同型半胱氨酸血症是血管性疾病的一个独立危险因素,有关 Hcy 的致病机制还尚不清楚,但普遍认为 Hcy 是一种血管损伤性氨基酸,其与糖基化终产物有协同作用,可直接造成血管内皮损伤和血管功能异常<sup>[10]</sup>。本研究发现,缬沙坦干预 DM 大鼠后,可明显减少大鼠 24 h UAER 排泄量,降低 SCr 水平,减轻 DM 大鼠肾组织的病理损伤,同时下调 DM 大鼠肾组织 CTGF 的表达、从而延缓肾小球硬化的进程,表明缬沙坦对 DM 大鼠肾脏可能具有良好的抗纤维化作用;同时具有下调 DM 大鼠肾组织 Ang II 含量的作用。总之,本研究表明缬沙坦对 DM 大鼠所表现出的肾脏保护效应,可能与其降低血浆 Hcy 含量,减少肾组织中 Ang II 的含量,较强抑制 CTGF 过度表达有关。

#### 参考文献

[1] Sakharova O V, Taal M W, Brenner B M. Pathogenesis of diabetic nephropathy: focus on transforming growth factor $\beta$  and connective tissue growth factor [J]. Cur Opin Nephrol Hypertens, 2001, 10(6): 727-738.  
 [2] Hanson N Q, Aras O, Yang F, et al. C677T and A1298C polymorphisms of the methyltetrahydro of late reductase gene; incidence and effect of combined

genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease [J]. Clin Chem, 2001, 47(4): 661-666.  
 [3] Hoogeveen E K, Kostense P J, Jager A et al. Serum homocysteine level and protein in intake are related to risk of microalbuminuria [J]. Kidney Int, 1998, 54(1): 203-209.  
 [4] Chico A, Pérez A, Córdoba A, et al. Plasma homocysteine is related to albumin excretion rate in patients with diabetes mellitus; a new link between diabetic nephropathy and cardiovascular disease [J]? Diabetologia, 1998, 41(6): 684-693.  
 [5] Leehey D J, Singh A K, Alavi N, et al. Role of angiotensin II in diabetic nephropathy [J]. Kidney Int Suppl, 2000, 77: S93-98.  
 [6] 郑承红, 柯淑红, 马威, 等. 降糖通脉方干预肾组织细胞外基质表达的研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(5): 303-304.  
 [7] Zhou G, Li C, Cai L. Advanced glycation end-products induce connective tissue growth factor-mediated renal fibrosis predominantly through transforming growth factor-beta independent pathway [J]. Am J Pathol, 2004, 165(6): 2033-2043.  
 [8] Liu B C, Sun J, Chen Q, et al. Role of connective tissue growth factor in mediating hypertrophy of human proximal tubular cells induced by angiotensin II [J]. Am J Nephrol, 2003, 23(6): 429-437.  
 [9] Rupérez M, Ruiz-Ortega M, Esteban V, et al. Angiotensin II increases connective tissue growth factor in the kidney [J]. Am J Pathol, 2003, 163(5): 1937-1947.  
 [10] 甘伟杰, 刘俊田, 林蓉. 槲皮素对高同型半胱氨酸血症兔血管内皮细胞的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2004, 20(6): 647-651.

(收稿日期: 2008-03-07

修回日期: 2008-05-10)

(本文编辑: 李银平)

#### • 广告目次 •

- ①天津生化制药有限公司: 注射用氢化可的松琥珀酸钠 ..... (封二)
- ②天津红日药业: 血必净注射液 ..... (封底)