

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.05.017

泽泻汤加味方对高盐高血压肾损害大鼠 AT1R、AT2R mRNA 表达的影响

陈景彦¹, 陈炳宏², 范洪亮³, 张树峰^{3*}

(1. 海阳市中医医院, 山东省海阳市文山街 9 号, 063000; 2. 河北省南宫市长城医院; 3. 承德医学院)

摘要 目的 探讨泽泻汤加味方预防高血压大鼠肾损害的可能作用机制。方法 Wistar 大鼠高盐饮食 22 周建立高血压模型后随机分为模型组、缬沙坦组及中药高、中剂量组, 每组 10 只, 另设正常组 10 只。从第 23 周起, 缬沙坦组予缬沙坦胶囊溶液 14.4 mg/(kg·d) 灌胃, 中药高、中剂量组分别予泽泻汤加味方混悬液 16.2、10.8 g/(kg·d) 灌胃, 模型组给予等量蒸馏水灌胃, 正常组正常饲养。8 周后观察各组大鼠肾皮质血管紧张素 II 1 型受体 (AT1R)、血管紧张素 II 2 型受体 (AT2R) mRNA 的表达水平。结果 与正常组比较, 模型组大鼠肾皮质 AT1R、AT2R mRNA 水平明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 缬沙坦组及中药高、中剂量组 AT1R、AT2R mRNA 表达明显下调 ($P < 0.01$), 且缬沙坦组 AT1R、AT2R mRNA 水平均低于中药高、中剂量组 ($P < 0.01$), 中药高剂量组 AT1R mRNA 水平低于中药中剂量组, 但 AT2R mRNA 水平高于中药中剂量组 ($P < 0.01$)。结论 泽泻汤加味方预防高血压肾损害可能与下调 AT1R、AT2R mRNA 有关。

关键词 肾损害; 高血压; 泽泻汤加味方; 血管紧张素 II 1 型受体; 血管紧张素 II 2 型受体

血管紧张素 II 1 型受体 (AT1R) 与血管紧张素 II 2 型受体 (AT2R) 是肾素-血管紧张素系统 (RAS) 家族的成员, RAS 分为循环 RAS 和组织 RAS。循环 RAS 主要参加短期应激反应及水盐代谢的调节, 而血管阻力的控制和局部组织功能则受组织 RAS 的影响^[1]。长期的高血压伴随着肾脏局部 RAS 的持续激活导致的持续进展的肾小球前动脉肌层肥厚、管壁增厚、管腔狭窄、肾血管阻力增加及肾血流量减少导致的肾脏缺血是肾小管功能受损和肾小球功能减退的主要原因, 最后导致肾功能衰竭^[2]。前期研究显示, 泽泻汤加味方可改善高盐高血压大鼠肾脏的结构和功能, 从而起到预防肾损害的作用, 其机制与上调肾脏肾素活性和血管紧张素 II (AngII) 水平有关^[3-4]。为了进一步研究 RAS 家族与高盐高血压肾损害大鼠的关系, 我们观察了泽泻汤加味方对高盐高血压肾损害大鼠 AT1R、AT2R mRNA 表达水平的影响, 报告如下。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 180 只, 3 周龄, 体重

50~60 g, 由天津市山川红实验动物科技有限公司提供, 实验动物合格证号: SCXK (津) 2009-001。

1.2 药物

泽泻汤加味方: 泽泻 21 g, 白术 9 g, 泽兰 15 g, 石菖蒲 15 g (承德医药集团有限责任公司, 批号 0712002); 缬沙坦胶囊 (北京诺华制药有限公司生产, 批号 X0796)。

1.3 主要仪器及试剂

BP-6 型动物套尾无创血压仪 (成都泰盟科技有限公司); SIM-F124 型制冰机 (日本 SANYO 公司); CSR-1-30 型超纯制水机 (北京爱思泰克公司); ESJ200-4 电子天平 (沈阳龙腾电子有限公司); HI98127 酸度计 (意大利 HANNA 公司); Peltier Thermal Cycler-100 (美国 MJ Research 公司); SORYALL Biofuge fresco 冷冻离心机 (德国 Kendro Labrotary 公司)。

TakaRa RNA PCR Kit (AMV) ver. 3.0 试剂盒 (批号 ALW66031113111) 大连宝生物工程有限公司; PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成, β -actin: 上游引物: 5'-CATCCTGCGTCTG-GACCT-3', 下游引物: 5'-TCAGGAGGAGCAAT-GATCTTG-3', 扩增片段长度: 480bp; AT1R: 上

基金项目: 河北省科技支撑计划项目 (09276101D-20)

* 通讯作者: 965115974@QQ.com

游引物: 5'-CTCTGACTAAATGGCTTACGACC-3', 下游引物: 5'-TGACTACAGGGACAACAAAGGT-3', 扩增片段长度: 383bp; AT2R: 上游引物: 5'-CCACCAGCAGAAACATCACC-3', 下游引物: 5'-GGACAGACAAGCCATACACC-3', 扩增片段长度: 497bp。

1.4 动物模型制备

参考文献 [5] 并根据前期研究 [3-4] 结果, 选取尿蛋白和尿红细胞均为阴性大鼠作为观察对象, 预留 10 只作为正常组, 给予普通饲料正常喂养。其余 170 只通过连续 22 周 8% 高盐饲料 [由天津市山川红实验动物科技有限公司提供, 批号 GY (津) 2009-010] 饲养, 并从喂养第 8 周开始每周用鼠尾动脉测压仪测量血压 1 次。在喂养第 18 周到 22 周时测清醒状态下大鼠的血压, 收缩压 (SBP) > 130 mmHg 的大鼠为血压达标。从血压已达标的大鼠中采用随机数字表抽出 10 只取肾组织行病理切片观察, 未发现病理改变。剩余大鼠 3 天测 1 次血压, 连测 3 次, 每次每只大鼠测 3 遍, 血压均 > 130 mmHg 者为造模成功。

1.5 分组及给药方法

造模成功的 40 只大鼠按随机数字表法分为模型组、缬沙坦组及中药高、中剂量组, 每组 10 只, 另有正常组 10 只。按照成人剂量的 15 倍为高剂量组, 10 倍为中剂量组 [6], 缬沙坦组给予缬沙坦胶囊溶液 14.4 mg/(kg·d) 灌胃 (成人剂量的 10 倍); 中药高、中剂量组分别给予泽泻汤加味方混悬液 16.2、10.8 g/(kg·d) 灌胃; 模型组给予等量蒸馏水灌胃, 共灌胃 8 周。正常组大鼠普通饲料喂养, 其余各组大鼠继续 8% 高盐饲料喂养。

1.6 指标检测

8 周末各组大鼠用 10% 水合氯醛腹腔麻醉, 并取每只大鼠双肾称重, 剪取肾皮质 600 mg 放入液氮后转至 -80℃ 冰箱保存。用 Trizol 提取 RNA; 按通用型 RT-PCR 试剂盒说明书反转录 RNA。扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳跑胶, 恒压 120V, 30min, UVP 成像分析系统 (GelDoc-it TS 型, 北京誉郎诺科技有限公司) 拍照观察结果。采用 Quantity One 软件 (4.52 版, Sigma 公司) 对图像进行灰度分析, 每组实验至少重复 5 次。分别以 AT1R 和 AT2R 目的基因条带与 β -actin 基因条带的灰度比值作为 AT1R 和 AT2R 的相对表达水平。

1.7 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析。计量

资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 *LSD* 比较。

2 结果

表 1 示, 与正常组比较, 模型组及中药高、中剂量组大鼠肾皮质 AT1R mRNA、AT2R mRNA 表达显著上调 ($P < 0.01$), 缬沙坦组显著下调 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 缬沙坦组及中药高、中剂量组的 AT1R mRNA、AT2R mRNA 表达明显下调 ($P < 0.01$); 与缬沙坦组比较, 中药高、中剂量组的 AT1R mRNA、AT2R mRNA 表达明显上调 ($P < 0.01$); 与中药高剂量组比较, 中药中剂量组的 AT1R mRNA 表达明显上调, 而 AT2R mRNA 则明显下调 ($P < 0.01$)。各组大鼠肾脏 AT1R、AT2R mRNA 表达电泳图见图 1。

表 1 各组大鼠肾脏 AT1R、AT2R mRNA 的表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	AT1R mRNA	AT2R mRNA
正常组	10	0.6915 $\pm$ 0.01221	0.6662 $\pm$ 0.04440
模型组	10	2.5283 $\pm$ 0.04812*	2.3600 $\pm$ 0.13432*
缬沙坦组	10	0.5490 $\pm$ 0.02049* Δ	0.3262 $\pm$ 0.01737* Δ
中药高剂量组	10	1.0777 $\pm$ 0.01699* Δ Δ	1.2832 $\pm$ 0.06809* Δ Δ
中药中剂量组	10	1.3115 $\pm$ 0.03370* Δ Δ #	0.9952 $\pm$ 0.06393* Δ Δ #

注: AT1R, 血管紧张素 II 1 型受体; AT2R, 血管紧张素 II 2 型受体; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与缬沙坦组比较, $\Delta P < 0.01$; 与中药高剂量组比较, # $P < 0.01$

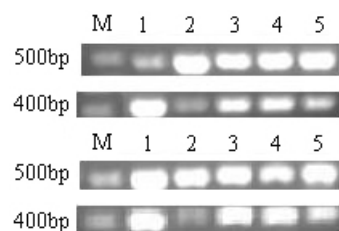


图 1 各组大鼠肾脏 AT1R、AT2R mRNA 表达电泳图

注: M, Mark; 1, 模型组; 2, 缬沙坦组; 3, 中药高剂量组; 4, 中药中剂量组; 5, 正常组

3 讨论

Ang II 的生物作用, 如刺激交感神经末梢释放儿茶酚胺、收缩血管、刺激醛固酮的分泌、促进心肌及血管平滑肌细胞增殖和肥厚等, 是通过与 AT1R 的结合而实现的 [7]。Ang II 的受体亚型共有 4 种, 目前研究较多的是 AT1R 和 AT2R。AT1R 和 AT2R 都属于 G 蛋白偶联受体, 都有 7 个跨膜区 [8]。AT1R 有介导血管收缩、升高血压、促进钠重吸收、刺激细胞增殖、促进纤维化的作用。Ang II 可

与 AT2R 结合, 激活缓激肽 $\beta 2$ 受体参与一氧化氮的合成、舒张血管、降低血压^[9]。研究证明, 在糖尿病大鼠肾脏组织及脑组织中存在 AT1R 高表达及 AT2R 低表达^[9-10]。在 Ang II 诱导的人血管平滑肌动脉粥样硬化中 AT1R mRNA 表达增强, 而 AT2R mRNA 表达与之相反^[11]。也有研究发现, AT2R 在动脉粥样硬化的小鼠骨髓细胞中及 Ang II 诱导的大鼠动脉内皮细胞中为高表达^[12-13]。

在本研究中, 由于高盐致高血压大鼠的肾组织中 AT1R、AT2R mRNA 的表达均上调, 认为高盐高血压造成大鼠肾损害与 AT1R mRNA 的表达上调有关, 而 AT2R mRNA 的表达在此实验中也上调了, 这在一定程度上暴露了机体在某种病理条件的诱导下激活了肾脏 AT2R 的活性, 说明机体在遭到高盐高血压造成肾损害的侵袭时, 也在积极地进行自我防御和保护。此外, 有研究发现, 病理状态时血管损伤后新内膜形成过程中 AT2R 表达增加^[14]。有研究也认为, AT2R 在组织受损尤其是血管受损后表达明显增加^[14]。本研究中, 与正常组比较, 缬沙坦组大鼠肾皮质中的 AT1R、AT2R mRNA 明显下调 ($P < 0.01$), 分析其原因可能与服用缬沙坦的剂量及其他有待研究的因素有关。但是与模型组比较, 缬沙坦组和泽泻汤加味方高、中剂量组 AT2R mRNA 的表达明显下调, 分析其原因可能是药物促使了 Ang II 与 AT2R 的结合, 从而导致 AT2R mRNA 的下调, 由此起到预防肾损害的目的, 可能也与高盐高血压造成肾损害相关的内在机制有关, 相关问题还需进一步研究。本研究结果显示, 与模型组比较, 泽泻汤加味方高、中剂量组和缬沙坦组有相似疗效, 均下调了 AT1R、AT2R mRNA 在肾皮质中的表达水平。

综上所述, 高盐高血压肾损害大鼠肾皮质中 AT1R、AT2R mRNA 的表达水平均上调, 泽泻汤加味方下调了高盐高血压肾损害大鼠肾皮质中的 AT1R、AT2R mRNA 的表达水平, AT1R、AT2R mRNA 的表达水平未出现相反的变化趋势。因此, 有关 AT1R、AT2R 在高血压肾损害病理变化过程中的动态演变及在蛋白方面的表达有待进一步研究。

参考文献

- [1] 刘治全. 盐与高血压 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997: 141.
- [2] 尤丹瑜. 高血压肾损害 [J]. 中华高血压杂志, 2007, 15(4): 275-277.
- [3] 陈景彦, 范洪亮, 张树峰. 泽泻汤加味方对高盐致高血压大鼠肾损害的预防作用 [J]. 中医杂志, 2012, 53(3): 234-237.
- [4] 陈景彦, 陈炳宏, 张树峰, 等. 泽泻汤加味方对高盐高血压大鼠降压疗效及保护肾功能的作用 [J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(24): 5467-5469.
- [5] 曾昭华, ROBERT M. K. LEE, 罗碧辉, 等. 一种新的高盐致高血压动物模型及其血管重构改变 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(1): 24-27.
- [6] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理学实验方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 204.
- [7] 黎磊石, 刘志红. 中国肾脏病学: 上册 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2008: 797-813.
- [8] 陈冬冬, 黄子扬. AT1R、AT2R 与原发性高血压相关性研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2009, 8(9): 129-131.
- [9] 李屹, 曹和欣, 张新志, 等. 糖肾宁对糖尿病肾病大鼠肾组织 AT1R 及细胞因子表达的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(6): 83-85.
- [10] 刘晓敏, 胡向阳, 余锋, 等. AT1R、AT2R、RAGE 在糖尿病大鼠脑组织中的表达及意义 [J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(10): 1170-1173.
- [11] 魏均伯, 马健, 陆志刚, 等. 血管紧张素 II 对血管平滑肌细胞血管紧张素 II 受体 1、2 mRNA 表达的影响 [J]. 临床心血管杂志, 2015, 31(2): 216-217.
- [12] 唐兵, 速晓华, 陈劲松, 等. AT2R 基因转染对树突状细胞成熟和免疫功能的影响 [J]. 西南国防医药, 2015, 25(1): 1-4.
- [13] 周春刚, 张志斌, 陆曙. 连豆清脉方对 Ang II 诱导内皮细胞凋亡模型 AT1R、AT2R、caspase8 和 caspase9 mRNA 表达的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(2): 37-39.
- [14] CAREY RM, WANG ZQ, SIRAGY HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function [J]. Hypertension, 2000, 35(1 Pt 2): 155-163.

Impact of *Modified Zexie Decoction* (泽泻汤加味方) on mRNA Expression of AT1R and AT2R in Rats with High-salt Induced Hypertension and Renal Damage

CHEN Jingyan¹, CHEN Binghong², FAN Hongliang³, ZHANG Shufeng³

(1. Haiyang Hospital of Chinese Medicine, Haiyang, Shandong 063000; 2. Nangong Great Wall Hospital of Hebei Province; 3. Chengde Medical College)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Modified Zexie Decoction* (泽泻汤加味方) in preventing high-salt induced hypertension and renal damage in rats' model. **Methods** After hypertension models were established by given high-salt diet for 22 weeks, Wistar rats were randomized into the model group, the valsartan group, and high and middle dose herb groups ($n = 10$ in each group). Besides, a normal group was set ($n = 10$). From the 23rd week, the valsartan group was given 14.4 mg/($\text{kg} \cdot \text{d}$) of valsartan capsule solution by gavage. High and middle dose herb groups were given 16.2 g/($\text{kg} \cdot \text{d}$) or 10.8 g/($\text{kg} \cdot \text{d}$) of *Modified Zexie Decoction* suspension by gavage respectively. The model group was given equivalent distilled water by gavage. The normal group was fed normally. After 8 weeks, the mRNA expressions of angiotensin II type 1 receptor (AT1R) and angiotensin II type 2 receptor (AT2R) were examined. **Results** Compared with the normal group, the mRNA expressions of renal cortex AT1R and AT2R increased significantly in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the mRNA expressions of AT1R and AT2R were down-regulated significantly in the valsartan group, and the high and middle dose herb groups ($P < 0.01$). The mRNA expressions of AT1R and AT2R in the valsartan group were lower than that in high and middle dose herb groups ($P < 0.01$). The mRNA expression of AT1R was lower, while the mRNA expression of AT2R was higher in the high dose herb group than that in the middle dose herb group ($P < 0.01$). **Conclusion** The effect that *Modified Zexie Decoction* preventing renal damage might relate to down-regulating mRNA expression of AT1R and AT2R.

Keywords renal damage; hypertension; *Modified Zexie Decoction*; angiotensin II type 1 receptor; angiotensin II type 2 receptor

(收稿日期: 2015 - 06 - 10; 修回日期: 2015 - 10 - 15)

编辑: 焦 爽

欢迎订阅 2016 年 《国际中医中药杂志》

《国际中医中药杂志》为中华医学会、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中华医学会系列杂志,系国内外公开发行的专业学术期刊。本刊自 2008 年起成为“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”。

《国际中医中药杂志》以反映国内外中医药研究最新进展,促进国内外中医药学术交流为己任,以中医药科研、临床、生产、管理工作为主要对象,介绍中医药学相关领域的新进展、新技术和新方法。本刊现主要栏目有“专题论坛”“国外传统医学”“论著”“短篇论著”“综述”,此外不定期设有“国外药政法规”栏目。报道内容涉及中医药动态、临床与实验研究、流行病学调查、质量标准研究、制剂与工艺、思路与方法、医学教育、专家经验、临证心得、综述等。

本刊为月刊,大 16 开,96 页。国内外公开发行,每期定价 12 元,全年 144 元。ISSN: 1673 - 4246; CN: 11 - 5398/R。国内邮发代号: 2 - 611 (中国邮政集团公司北京市报刊发行局); 国外发行代号: BM6563 (中国国际图书贸易集团有限公司)。全国各地邮局均可订阅。可从本刊编辑部直接订阅。

地址: 北京市东直门内南小街 16 号中国中医科学院中医药信息研究所,国际中医中药杂志编辑部; 邮编: 100700; 电话: 010 - 64089579; 网址: <http://gjzy.cintcm.com.cn>; 邮箱: guowaiyixue@aliyun.com; 微信号: gjzyzy。