

• 基础医学 •

文章编号: 1002 - 0217(2017)03 - 0211 - 04

缬沙坦及苯那普利对 5/6 肾切除大鼠血清瘦素水平及肾小球硬化的影响

杨利才, 张道友, 朱新俭, 汪裕伟, 徐海红

(皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 肾内科 安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 观察缬沙坦及苯那普利对 5/6 肾切除大鼠血清瘦素(leptin)水平及其肾小球硬化的影响, 探讨其作用机制。方法: 选用 SD 雄性大鼠 30 只, 其中 24 只通过 5/6 肾切除法制造慢性肾功能衰竭(CRF)模型, 术后 2 周随机分为模型组、缬沙坦组及苯那普利组, 另 6 只为假手术组。术后第 6 周末各组大鼠进行肾功能(Scr、BUN)及血清瘦素的测定; 处死大鼠, 取出肾脏进行病理组织形态学观察, 测定肾小球硬化指数(GSI), 采用免疫组织化学方法检测肾脏转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、IV 型胶原(Col IV)及纤维连接蛋白(FN)表达。结果: 模型组瘦素明显升高, 与 GSI、TGF- β_1 、Col IV 及 FN 呈正相关(r 值分别为 0.871、0.951、0.919、0.913)。与模型组相比, 缬沙坦组及苯那普利组血清瘦素水平明显降低, 肾功能及 GSI 明显改善, 肾脏转化生长因子 TGF- β_1 、Col IV 及 FN 表达减少($P < 0.01$)。结论: 慢性肾衰存在高瘦素血症, 阻断 RAS 可通过降低瘦素水平改善肾小球硬化。

【关键词】慢性肾功能衰竭; 瘦素; 血管紧张素受体阻断剂; 血管紧张素转化酶抑制剂; 转化生长因子 β_1

【中图分类号】R 692.5 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2017.03.003

Effects of valsartan and benazepril on serum leptin levels and glomerulosclerosis in rats with 5/6 nephrectomy

YANG Licai, ZHANG Daoyou, ZHU Xinjian, WANG Yuwei, XU Haihong

Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To observe the changes of serum leptin levels and the relationship with glomerulosclerosis as well as the effects of valsartan and benazepril on the serum leptin levels in model rats of 5/6 nephrectomy for identifying the mechanisms of serum leptin levels and glomerulosclerosis.

Methods: A total of 30 male SD rats were selected, in which 6 were included as sham operation group, and 24 were undergone 5/6 nephrectomy to develop the chronic renal failure(CRF) model and randomized into model group, valsartan group and benazepril group 2 weeks after modeling. By the sixth week after operation, rats in each group were measured for the blood urea nitrogen(BUN), serum creatinine(Scr) and leptin levels. Then the rats were sacrificed to take the kidneys for histological observation on the pathological changes and determination of glomerulosclerosis index(GSI). Immunohistochemistry was used to detect the expression of transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) protein, fibronectin(FN) and collagen IV (Col IV) in the glomeruli. **Results:** Serum leptin level was significantly elevated and positively correlated with GSI, TGF- β_1 , Col IV and FN in rats in the model group. Rats treated with valsartan or benazepril had significantly decreased serum leptin levels, ameliorated renal function and GSI, yet evidently down-regulated expression of TGF- β_1 , FN and Col IV in glomeruli compared to the models($P < 0.01$). **Conclusion:** Hyperleptinemia is commonly concomitant with chronic renal failure, however, glomerulosclerosis may be improved by reducing the leptin levels via blocking renin-angiotensin system(RAS).

【Key words】chronic renal failure; leptin; angiotensin receptor blockers; angiotensin-converting enzyme inhibitor; transforming growth factor- β_1

瘦素(leptin)是一种由脂肪组织分泌的蛋白类激素^[1]。慢性肾功能衰竭(chronic renal failure, CRF)患者普遍存在高瘦素血症^[2-3]。研究显

示^[4-6]瘦素不但介导心肌细胞的肥大,还能刺激肾小球内皮细胞的增殖及促进系膜细胞肥大,并与肝脏纤维化程度显著相关。由此提示,瘦素可能作为

收稿日期: 2016-09-10

作者简介: 杨利才(1973-)男,副主任医师, (电话)13135535819, (电子信箱)yjsyanglicai@sina.cn。

一种硬化因子参与器官或组织的硬化。进一步研究发现,血管紧张素 II (Ang II) 能刺激脂肪细胞的瘦素分泌,且和瘦素具有协同效应^[7-8]。为阐明瘦素、Ang II 与肾小球硬化关系及机制。本研究建立慢性肾功能衰竭(CRF)大鼠模型,分析瘦素与肾小球硬化的关系,观察缬沙坦及苯那普利对慢性肾衰大鼠血清瘦素水平及肾小球硬化的改善作用,阐明其可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及材料 SD 大鼠购自南京青龙山实验动物中心。6 周龄,平均体质量 190 g。试验药物缬沙坦及苯那普利均购自本院药房,免疫组化试剂盒、IV 型胶原(collagen IV,Col IV)、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)及转化生长因子 β₁(transforming growth factor β₁, TGF-β₁)单克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。瘦素放射免疫试剂盒购自北京北免东雅生物技术研究所。

1.2 5/6 肾切除模型的建立 参照文献方法^[9],SD 大鼠喂养一周后开始模型建立,通过腹腔内注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉。行左侧背部切口进腹,将左肾牵拉至体外,分离肾上腺,切除左肾上下极,残余肾脏回纳。一周后行右肾全切。假手术组只行麻醉进腹,不切除肾组织。

1.3 分组及给药 模型建立 1 周后随机分成 4 组,即假手术组、模型组、缬沙坦组及苯那普利组。采用

灌胃法给药 缬沙坦组给药剂量 16 mg/(kg·d),苯那普利组给药剂量 4 mg/(kg·d),假手术组及模型组只以蒸馏水灌胃。

1.4 血清尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、总蛋白(TP)、白蛋白(Alb)及瘦素水平检测 分别在本院检验科及核医学科完成,BUN、Scr、TP、Alb 由全自动生化分析仪检测,瘦素通过放免法检测。

1.5 肾脏病理及免疫组化 肾脏组织经固定、包埋后切片,行 HE 染色。肾组织 Col IV、FN 和 TGF-β₁的检测具体步骤参照试剂盒说明书。肾小球硬化指数(GSI)的计算参考 Raij 等^[10]半定量方法。肾小球 Col IV、FN 和 TGF-β₁ 蛋白表达的测定也采用半定量法,评分如下:0 分为无染色或微弱染色;1 分为局部弱染,染色面积 < 25%;2 分为局部染色趋强,染色面积 25% ~ 50%;3 分为染色面积 51% ~ 75%;4 分为染色面积 > 75%。

1.6 统计学方法 数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据处理采用方差分析及相关分析。

2 结果

2.1 血清 BUN、Scr、TP、Alb 及瘦素检测结果 如表 1 所示,模型组血清 BUN、Scr 及瘦素明显升高($P < 0.01$)。经缬沙坦及苯那普利治疗后,两治疗组上述指标明显降低($P < 0.01$)。各组大鼠血清 Alb 无明显差异($P > 0.05$)。

表 1 4 组大鼠血清 BUN、Scr、TP、Alb 及瘦素检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	BUN/(mmol/L)	Scr/(μmol/L)	TP/(g/L)	Alb/(g/L)	leptin/(ng/mL)
Sham	6	7.72 ± 1.36	77.00 ± 18.95	78.12 ± 2.46	28.30 ± 1.69	10.84 ± 2.67
Model	8	16.44 ± 2.50	144.60 ± 19.26	69.00 ± 2.78	26.70 ± 1.40	14.88 ± 1.46
Valsartan	8	13.00 ± 1.66	125.67 ± 12.02	65.64 ± 3.01	26.31 ± 2.95	12.06 ± 1.24
Benazepril	8	13.48 ± 3.37	120.80 ± 12.81	67.44 ± 2.88	24.16 ± 3.97	12.42 ± 1.53
F		15.06	21.42	25.303	2.689	5.975
P		0.000	0.000	0.000	0.067	0.003

2.2 模型组大鼠血清瘦素水平与 BUN、Scr、TP、Alb、GSI、肾小球 TGF-β₁、Col IV、FN 蛋白表达之间的关系 模型组肾小球可见肥大、局灶节段硬化,甚至全球硬化等不同表现,肾小球系膜区及基底膜区可见 Col IV、FN 及 TGF-β₁ 蛋白强表达,免疫组化表现为局部棕褐色的物质沉积。如表 2 所示,模型组血清瘦素水平与 GSI、TGF-β₁、Col IV 及 FN 呈显著正相关, r 值分别为 0.871、0.951、0.919、0.913, P 值分别为 0.024、0.004、0.010、0.011,但与肾功能(Scr、BUN)及营养指标(TP、Alb)无明显相关性(r

值分别为 0.593、0.432、-0.548、-0.783, P 值分别为 0.214、0.392、0.260、0.066)。

2.3 各组大鼠 GSI、肾小球 TGF-β₁、Col IV、FN 蛋白表达结果 和模型组相比,缬沙坦组及苯那普利组 GSI 均明显降低($P < 0.01$),肾小球 Col IV、FN 及 TGF-β₁ 蛋白表达积分低于模型组($P < 0.01$),见表 2。

3 讨论

肾小球硬化是各种肾脏疾病的终末阶段,是导

致慢性肾衰竭的最根本的原因。研究肾小球硬化的发生、进展及干预机制有助于延缓及防止慢性肾衰的发生。5/6 肾切除模型是慢性肾衰竭的经典动物模型,具有与临床相似的病理表现,本实验中,大鼠 5/6 肾切除 6 周后,血清 BUN、Scr 升高的同时,肾脏病理表现为肾小球局灶阶段性硬化,甚至全球硬化,肾小球硬化指数升高。

瘦素是一种由脂肪组织分泌的蛋白类激素,由肥胖基因调控。慢性肾衰时存在高瘦素血症,本实

验中也发现模型组大鼠血清瘦素明显升高,这和既往的临床研究相似^[2,11]。引起瘦素升高的原因可能因为瘦素生成增多或排泄减少,或者两者同时存在。既往的研究显示^[12],当切除动物双肾后,体内瘦素排泄急剧下降,提示肾脏是瘦素的主要排泄器官。本研究发现模型组大鼠血清瘦素水平与血清肌酐及尿素氮水平并不相关,提示慢性肾衰时血清瘦素水平升高可能是多因素的结果,具体因素有待进一步研究。

表 2 GSI 及 TGF-β₁、Col VI 型胶原、FN 在肾小球表达结果($\bar{x} \pm s$)

Group	Glomeruli			
	GSI	TGF-β ₁	Col IV	FN
Sham	3.20 ± 2.59	0	1.03 ± 0.30	1.13 ± 0.32
Model	64.00 ± 12.49	3.47 ± 0.86	3.53 ± 0.52	3.20 ± 0.67
Valsartan	35.00 ± 18.66	2.26 ± 0.57	2.37 ± 0.32	2.47 ± 0.52
Benazepril	40.00 ± 13.05	2.48 ± 0.34	2.53 ± 0.41	2.50 ± 0.51
F	20.367	39.103	38.340	15.300
P	0.000	0.000	0.000	0.000

近年来瘦素作为一种促生长及硬化作用的因子受到众多学者的注意,越来越多的证据表明瘦素参与了众多器官或组织的增生、肥大及硬化。在对血管及心肌的研究中发现^[13-14]瘦素能诱导血管平滑肌及心肌细胞的肥大。在对慢性丙型肝炎的研究中也发现^[6]瘦素同样能诱导肝细胞纤维化。在对肾脏固有细胞的研究中^[4,15]瘦素能诱导内皮细胞及系膜细胞的增殖,具体机制可能和 TGF-β₁ 及 TGF-α、IV 胶原 mRNA 表达升高有关。本研究发现,血清高瘦素水平与肾小球硬化显著相关。高瘦素血症可能通过刺激局部 TGF-β₁ 表达,引起细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成增加,促进肾小球硬化。本研究中 5/6 肾切除大鼠 6 周后,Col IV、FN 升高的同时,血清瘦素水平及肾脏局部 TGF-β₁ 表达也显著升高,且血清瘦素水平与 TGF-β₁、Col IV 及 FN 呈显著正相关,证实这种假设。

研究发现^[16-17]脂肪组织局部肾素血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)激活与循环中瘦素水平密切相关,生理剂量的血管紧张素 II (Ang II)即能显著增加 3T3-L1 脂肪细胞及人脂肪细胞的瘦素分泌,Ang II 和瘦素也具有协同效应,提示 RAS 与瘦素关系密切。Santos 等^[18]研究证实血管紧张素转化酶抑制剂依那普利能显著减少年轻大鼠血瘦素水平。新近的研究也表明^[7],在大脑内也存在瘦素-RAS 的相互作用,瘦素能激活脑内 RAS,卡托普利能减轻瘦素对肾脏交感神经的影响,这也为控制

慢性肾衰高瘦素血症提供了可能。本研究结果发现,缬沙坦及苯那普利组肾功能及肾小球硬化改善的同时,血清瘦素水平显著降低,肾脏局部 TGF-β₁ 表达及 ECM 合成减少,提示阻断 RAS 可能通过降低瘦素水平改善肾小球硬化。

本研究进一步证实了瘦素参与肾小球硬化可能机制,同时提示高瘦素血症可能为 RAS 激活后的一个下游事件,降低瘦素水平可以改善肾小球硬化,这也为延缓肾小球硬化的提供了一种新的治疗途径。

【参考文献】

[1] ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [J]. Nature, 1994, 372:425-432.

[2] 宋洁, 李辉, 张晓东, 等. 不同血液净化方式对慢性肾衰患者血清瘦素、神经肽 Y 水平的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(11):65-70.

[3] RODRIGUEZ-CARMONA A, PEREZ FONTAN M, CORDIDO F, et al. Hyperleptinemia is not correlated with markers of protein malnutrition in chronic renal failure. A cross-sectional study in pre-dialysis, peritoneal dialysis and hemodialysis patients [J]. Nephron, 2000, 86:274-280.

[4] WOLF G, HAMANN A, HAN DC, et al. Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis [J]. Kidney Int, 1999, 56:860-872.

[5] MOEY M, RAJAPUROHITAM V, ZEIDAN A, et al. Ginseng (Panax quinquefolius) attenuates leptin-induced cardiac hypertrophy through inhibition of p115Rho guanine nucleotide exchange factor-

RhoA/Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase-dependent mitogen-activated protein kinase pathway activation [J]. *J Pharmacol Exp Ther* 2011, 339(3):746-756.

[6] CRESPO JAVIER MD, RIVERO *et al.* Plasma Leptin and TNF- α Levels in Chronic Hepatitis C Patients and Their Relationship to Hepatic Fibrosis [J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2002, 47:1604-1610.

[7] HILZENDEGER AM, MORGAN DA, BROOKS L *et al.* A brain leptin-renin angiotensin system interaction in the regulation of sympathetic nerve activity [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012, 303(2):197-206.

[8] KIM S, WHELAN J, CLAYCOMBE K *et al.* Angiotensin II increases leptin secretion by 3T3-L1 and human adipocytes via a prostaglandin-independent mechanism [J]. *J Nutr* 2002, 132(6):1135-1140.

[9] 杨利才, 张道友, 朱新俭 等. 缬沙坦及苯那普利对慢性肾功能衰竭大鼠左室肥厚的影响 [J]. *中国病理生理杂志* 2007, 23(7):1426-1428.

[10] RAIJ L, AZAR S, KEANE W. Mesangial immune injury, hypertension and progressive glomerular damage in Dahl rats [J]. *Kidney Int* 1984, 26:137-143.

[11] BUYAN N, BIDECI A, OZKAYA O *et al.* Leptin and resistin levels and their relationships with glucose metabolism in children with chronic renal insufficiency and undergoing dialysis [J]. *Nephrology (Carlton)* 2006, 11(3):192-196.

[12] CUMIN F, BAUM HP, LEVENS N. Mechanism of leptin removal from the circulation by the kidney [J]. *J Endocrinol*, 1997, 155:577-585.

[13] SHIN HJ, OH J, KANG SM *et al.* Leptin induces hypertrophy via p38 mitogen-activated protein kinase in rat vascular smooth muscle cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 329:18-24.

[14] RAJAPUROHITAM V, GAN XT, KIRSCHENBAUM LA. The obesity-associated peptide leptin induces hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes [J]. *Circ Res* 2003, 93:277-279.

[15] HAN DC, JISONO M, CHEN S *et al.* Leptin stimulates type I collagen production in db/db mesangial cells: glucose uptake and TGF-beta type II receptor expression [J]. *Kidney Int* 2001, 59:1315-1323.

[16] KIM S, SOLTANI-BEJNOOD M, QUIGNARD-BOULANGE A *et al.* The adipose Renin-Angiotensin system modulates systemic markers of insulin sensitivity and activates the intrarenal Renin-Angiotensin system [J]. *J Biomed Biotechnol* 2006, 5:27012.

[17] KIM S, WHELAN J, CLAYCOMBE K *et al.* Angiotensin II increases leptin secretion by 3T3-L1 and human adipocytes via a prostaglandin-independent mechanism [J]. *J Nutr* 2002, 132(6):1135-1140.

[18] SANTOS EL, DE PICOLI SOUZA K, GUIMARÃES PB. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on body weight and composition in young rats [J]. *Immunopharmacol*, 2008, 8(2):247-253.

(上接第 207 页)

【参考文献】

[1] 田旭升, 胡妮娜, 宋琳 等. 酸枣仁汤对抑郁症模型大鼠海马 TNF- α 、IL-1 β 及 c-fos 表达的影响实验研究 [J]. *中医药学报*, 2013, 41(2):44-46.

[2] 李庆娇, 安书成. 海马 NMDA 受体和 NOS 在慢性应激性抑郁发生中的作用及相互关系 [J]. *动物学研究* 2009, 30(6):653-661.

[3] 华冰, 程瑞凤, 景晶 等. 甘草总黄酮抗大鼠应激抑郁作用及对突触可塑性关键蛋白 SYP/PSD-95 的调节作用 [J]. *中国新药杂志* 2014, 23(10):1180-1186.

[4] LI X, GUO F, ZHANG Q *et al.* Electroacupuncture decrease cognitive impairment and promotes neurogenesis in the APP/PS1 transgenic mice [J]. *BMC Complement Altern Med* 2014, 14:37-47.

[5] 刘述霞, 王秀花, 刘秀丽 等. 电针治疗抑郁症 118 例 [J]. *中医研究* 2010, 23(9):76-77.

[6] 李昱颖, 莫雨平, 邓晓丰 等. 电针预处理对慢性应激抑郁模型大鼠海马内 5-HT 及 5-HT 转运体表达的影响 [J]. *针灸临床杂志* 2014, 30(7):57-60.

[7] 莫雨平, 宋洪涛, 姚海江 等. 不同电针对慢性应激抑郁模型大鼠不同脑区神经肽 Y mRNA 表达的影响 [J]. *中国中医药科技* 2014, 21(6):604-607.

[8] 高莉, 关宿东, 祝延. 浸水急性冷应激对大鼠脑皮质神经元一氧化氮释放量的影响 [J]. *蚌埠医学院学报* 2006, 31(1):7-8.

[9] 李凯, 张平, 周杰. 益气活血补肾方对大鼠脑缺血损伤后 c-Fos、c-Jun 表达影响的实验研究 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2015, 10(1):27-29.

[10] SNG JG, TANIURA H, YONEDA Y. A tale of early response genes [J]. *Biol Pharm Bull* 2004, 27(5):606-612.

[11] 徐玲玲, 刘儒鹏, 高昕妍 等. 针灸治疗抑郁症的神经生物化学机制研究进展 [J]. *针刺研究* 2011, 36(9):384-385.

[12] LEUNG MCP, YIP KK, HO YS *et al.* Mechanisms underlying the effect of acupuncture on cognitive improvement: a systematic review of animal studies [J]. *Journal of neuroimmune Pharmacology*, 2014, 9(4):492-507.