

参附强心丸调控肾素原受体介导 MAPK 信号通路抑制心肾细胞凋亡

王蕾*, 王梓, 袁玲, 郝迪, 吕楠, 李旭
(天津市医药科学研究所, 天津 300020)

[摘要] **目的:**基于肾素原受体(PRR)介导的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路,研究参附强心丸对心肾综合征大鼠心肾凋亡的保护作用机制。**方法:**Wistar 大鼠经肾脏急性缺血再灌注损伤合并腹主动脉缩窄术,制备大鼠心肾综合征(CRS)模型。将 CRS 大鼠随机分成 CRS 模型组(*ig* 10 mL·kg⁻¹纯净水),CRS + 参附强心丸组(SFQX 组,*ig* 参附强心丸 13.2 g·kg⁻¹),CRS + 柄区肽(HRP)组(*iv* HRP 10 mg·kg⁻¹),假手术组(*ig* 等体积纯净水)。术后 8 周给药,1 次/d,持续 4 周。实验结束后,测定血清脑钠肽(BNP),尿素氮(BUN)和肌酐(Cr),小动物超声心动仪测定小动物超声监测舒张末室间隔厚度(IVS),舒张末期左心室后壁厚度(LVPW),左心室射血分数(LVEF),实时荧光 PCR 测定左心室和肾脏 PRR mRNA 表达,免疫印迹法(Western blot)测定丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路,包括细胞外信号调控的蛋白激酶(ERK1/2),c-Jun 氨基末端激酶(JNK),P38 蛋白表达,原位末端标记法(TUNEL)测定左心室和肾脏组织细胞凋亡。**结果:**与假手术组比较,CRS 大鼠血清 BNP,BUN,Cr 明显升高($P < 0.05$),IVS,LVPW 显著增加($P < 0.01$),LVEF 显著降低($P < 0.01$),左心室质量指数显著增加($P < 0.01$),左肾脏质量指数显著减小($P < 0.01$),组织 PRR mRNA 高表达($P < 0.01$),ERK1/2,p38,JNK 蛋白表达升高($P < 0.01$),心肌和肾脏细胞凋亡率达 32.5%,63.2%。参附强心丸 13.2 g·kg⁻¹可明显减轻 CRS 大鼠心肌梗厚,抑制 IVS,LVPW 肥厚,增加 EF,血清 BUN,Cr 明显降低,降低受损组织 PRR mRNA 表达和 ERK1/2,p38 蛋白表达,降低心肌和肾脏细胞凋亡率。**结论:**参附强心丸可增强 CRS 大鼠心肾功能,通过降低心肾组织 PRR mRNA 表达,抑制 MAPK 信号通路 ERK1/2,JNK,P38 磷酸化,降低心肾细胞凋亡。

[关键词] 参附强心丸; 丝裂原活化蛋白激酶; c-Jun 氨基末端激酶; 腹主动脉缩窄; 肾脏急性缺血再灌注损伤; 心肾综合征; 肾素原受体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0121-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030121

Shenfu Qiangxin Pill Inhibits Heart and Kidney Cells Apoptosis by Regulating Renin Receptor-Mediated MAPK Signal Pathway

WANG Lei*, WANG Zi, YUAN Ling, HAO Di, LYU Nan, LI Xu
(Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective mechanism of Shenfu Qiangxin pill (SFQX) on heart and kidney cells apoptosis in rats with cardio-renal syndrome (CRS) based on the (pro) rennin receptor (PRR) - mediated mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal pathways. **Method:** Wistar rats underwent reperfusion injury combined with abdominal aortic constriction after renal ischaemia to prepare CRS models. The CRS rats were divided randomly into three groups: CRS model group (10 mL·kg⁻¹ pure water, *ig*); CRS + SFQX group (SFQX group, 13.2 g·kg⁻¹ SFQX, *ig*); CRS + Handle region peptide (HRP) group (10 mg·kg⁻¹ HRP, *iv*). The rats in sham operation group were *ig* given with the same volume of pure water. Treatments were given 8 weeks after surgery, 1 time/day, for 4 weeks. After the experiment, the rats were detected for brain natriuretic peptide

[收稿日期] 20150518(002)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81202801)

[通讯作者] * 王蕾,副研究员,从事心脑血管药理学研究,Tel:022-27236137,E-mail:zws9905@sina.com

(BNP), urea nitrogen (BUN), and creatinine (Cr) levels; ultrasound cardiograph for small animals was used to detect end diastolic interventricular septum thickness (IVS), left ventricular end diastolic posterior wall thickness (LVPW) and left ventricular ejection fraction (LVEF); real time fluorescent PCR was used to measure PRR mRNA expressions of left ventricle and kidney; Western blot assay was used to determine MAPK signal pathways, including extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), C-Jun amino terminal kinase (JNK), and P38 protein expressions; Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labeling (TUNEL) was used to detect cells apoptosis of left ventricular and renal tissues. **Result:** Compared to the sham operation group, serum BNP, BUN and Cr levels were significantly increased ($P < 0.05$); IVS, LVPW levels were significantly increased ($P < 0.01$); LVEF levels were significantly decreased ($P < 0.01$); mass index of left ventricle was significantly increased ($P < 0.01$); mass index of left kidney was significantly decreased in CRS rats ($P < 0.01$). Expression of PRR mRNA was increased ($P < 0.01$); protein expressions of ERK1/2, p38 and JNK were increased ($P < 0.01$). Myocardial and renal cell apoptosis rate was 32.5% and 63.2% respectively. SFQX 13.2 g·kg⁻¹ could significantly reduce cardiac hypertrophy in CRS rats, inhibit IVS and LVPW, increase EF, significantly decrease BUN and Cr, decrease PRR mRNA expression and ERK1/2, P38 protein expression of injured tissues, and decrease the myocardial and renal cell apoptosis rate. **Conclusion:** SFQX could improve the heart and kidney function of CRS rats, and reduce myocardial and renal cell apoptosis through reducing PRR mRNA expression of myocardial and renal cells and inhibiting ERK1/2, JNK and P38 phosphorylation in MAPK signal pathways.

[Key words] Shenfu Qiangxin pill; mitogen-activated protein kinase; C-Jun amino terminal kinase; infrarenal aortic-clamping; renal ischaemia; cardio-renal syndrome; (pro) rennin receptor

血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)和血管紧张素受体拮抗剂(ARB)在严重心肾综合征的使用限制^[1-3]使得肾脏纤维化的治疗受阻。寻找血管紧张素 II(Ang II) 环节之外的治疗靶点成为新的策略。肾素原受体(PRR)是存在于血管紧张素醛固酮系统上游受体的新成员,具有非 AngII 依赖功能,肾素和肾素原与 PRR 结合后,激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路,从而导致肾纤维化^[4-5]。MAPK 信号转导途径通过参与小鼠肥厚心肌,调控心肌细胞凋亡实现保护作用^[6]。心肌肥厚大鼠心脏中 AKT/GSK β , MAPKs 和核因子- κ B(NF- κ B)磷酸化水平均显著升高^[7]。但关于 PRR 介导的非 Ang II 功能的 MAPK 信号通路在心肾综合征的调控机制尚未见报道。本项目针对 PRR 的非 Ang II 功能,对参附强心丸通过调控 MAPK 信号通路,从而抑制心肾凋亡的作用机制予以研究。为非血管紧张素 II 途径作为治疗心肾综合征的新策略治疗心肾损伤提供药理学数据参考。

1 材料

1.1 动物及饲料 Wistar 大鼠,雄性,体重 290 ~ 300 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2009-003。普通全价颗粒饲料 II 号由北京科澳协力饲料有限公司生产,动物饮用纯净水。

1.2 药物与试剂 参附强心丸为中成药,系天津市中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂品种,处方由人参,附子(制),桑白皮,猪苓,葶苈子,大黄 6 味组成,粉碎成细粉,过筛,混匀。每 100 g 粉末加炼蜜 130 ~ 150 g,制成大蜜丸。含量测定,本品每丸含大黄以大黄素(C₁₅H₁₀O₃)和大黄酚(C₁₅H₁₀O₄)的总量计,不得少于 0.55 mg。受试样品为达仁堂制药厂提供相同处方和工艺的棕色粉末(即制成大蜜丸之前的生药粉),规格为生药量 1 g·g⁻¹,批号 zj001。柄区肽(HRP,上海强耀生物,相对分子质量 1 184.56)^[8]。Tunel 试剂盒(德国 Roche 公司,批号 11684817910),2 × NI-RT Master Mix(批号 306503),Real Master Mix(美国 SYBR GreenI 公司,批号 308101),I-DNA Marker I(批号 A01103),细胞外信号调转的蛋白激酶(ERK1/2)抗体(美国 CST 公司,批号 4695s003),C-Jun 氨基末端激酶(JNK)抗体(美国 CST 公司,批号 9258s0003),p38 抗体(美国 CST 公司,批号 4511s0006)。尿素氮(BUN,北京中生北控生物科技股份有限公司,批号 140681),肌酐(Cr,日本积水公司,批号 818RAM),脑钠肽(南京建成科技有限公司,批号 DGE20812)。

1.3 仪器 Visual Sonic Vevo® 2100 型小动物超声成像系统(加拿大 VisualSonics 公司),SN-697 型全自动双探头放射免疫 γ 计数器(上海原子核研究

所日环仪器一厂), Bio-rad IQ5 型实时定量 PCR 仪, PVDF 膜(美国 Millipore 公司), 5418R 型低温离心机(德国 Eppendorf 公司), 电 DYY-12 型泳仪(北京六一仪器厂), Fisher Model 266 MP 型自动石蜡包埋机(日本 Fisher 公司), RM2135 型切片机(西德 Leica 公司), BA400 型显微镜, Moticom2306 型摄像装置(麦克奥迪实业集团有限公司)。

2 方法

2.1 造模 采用肾脏急性缺血再灌注损伤合并腹主动脉缩窄术, 制备 CRS 病理模型^[9-14]。大鼠经 ip 戊巴比妥钠 45 mg·kg⁻¹ 麻醉后, 分离左、右侧肾蒂, 阻断结扎 30 min 后, 恢复血流, 造成急性缺血再灌注损伤。然后在左肾动脉上方游离腹主动脉, 使腹主动脉残留直径为 0.7 mm 的残腔, 造成腹主动脉狭窄。

2.2 分组与给药 CRS 大鼠随机分为 CRS 模型组 (ig 纯净水 10 mL·kg⁻¹), 参附强心丸 (13.2 g·kg⁻¹, 按生药量计, 相当于临床用量 12 倍) 组, iv HRP 10 mg·kg⁻¹ 组。假手术组经开腹, 分离, 穿线等操作, 但不结扎和缩窄 ig 10 mL·kg⁻¹ 纯净水。所有组别均从手术后 8 周开始给药, 1 次/d, 持续 4 周。

2.3 心脏超声心动图检查 采用超声心动图描述 CRS 大鼠心功能。大鼠麻醉后, 固定于小动物解剖台上, Visual Sonics Vevo 2100 system 系统测量舒张末室间隔厚度 (IVS), 舒张末期左心室后壁厚度 (LVPW), 左心室射血分数 (LVEF), 各个值分别取 3 个心动周期的平均值。

2.4 血清 BUN, Cr, BNP 测定 大鼠经腹主动脉采血, 2 500 r·min⁻¹ 离心 15 min, 分离血清。酶联免疫法测定 BNP 含量, 苦味酸法测定 Cr, 酶偶联速率法测定 BUN。

2.5 心室、肾脏质量指数测定 将大鼠心脏及双侧肾脏取出, 分离心室, 称量左心室湿重、全心湿重、左肾湿重, 计算心室质量指数、左侧肾脏指数。计算公式如下。

$$\text{左心室指数} = \text{左心室湿重} / \text{体重} \times 100\%$$

$$\text{肾脏指数} = \text{肾脏湿重} / \text{体重} \times 100\%$$

2.6 左心室和肾脏组织 PRR mRNA 表达 大鼠左心室肌和肾脏组织经 RNA 提取^[15], mRNA 逆转录合成 cDNA, PCR 扩增 PRR 的过程。用 GAPDH 作为内参。大鼠 PRR 上游引物 5'-TGACCTGCTATTTCTTTCTG-3', 下游引物 5'-TCTTCTCCATAACGCTTCC-3', 产物长度 150 bp。大

鼠 GAPDH 上游引物 5'-TTCAACGGCAGTCAAG-3', 下游引物 5'-CCACGACATACTCAGCAC-3', 产物长度 124 bp。用相对表达量表示 PRR mRNA 表达情况, 目的基因量 = 2^{-ΔΔC_t} (2^{-ΔΔC_t} 表示的是实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数)。

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 管家基因}})_{\text{实验组}} - (C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 管家基因}})_{\text{对照组}}$$

2.7 JNK, ERK1/2, P38 蛋白表达测定^[16-18] 采用免疫印迹 (Western blot) 法测定左心室和肾脏 JNK, ERK1/2, P38 蛋白表达。左心室和肾脏组织经裂解, 提取总蛋白, 测定蛋白浓度, 经洗膜, 曝光, 洗片, 用 image J 软件分析灰度值。蛋白表达量计算方法: 对总 JNK, ERK1/2, P38 和相应的 GAPDH 条带灰度进行分析, 以 GAPDH 为内参, 各数据均以相应的 GAPDH 为蛋白表达量 1, 以蛋白表达总量/GAPDH 表达量计算各组蛋白相对表达量。

2.8 心肾细胞凋亡测定 切片经脱蜡, 梯度乙醇水化, 复染, 晾干, 封固。计算各组细胞凋亡率, 凋亡率计算方法为同一个视野下, 凋亡细胞占整体细胞数量的比, IPP 6.0 计数计算。

2.9 统计方法 采用 SPSS 17.0 统计学软件, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组计量资料比较采用单因素方差分析。P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 CRS 大鼠心脏超声心动图的影响 与假手术组比较, CRS 大鼠 IVS, LVPW 增加 (P < 0.01), EF 降低 (P < 0.01)。13.2 g·kg⁻¹ 参附强心丸可明显减轻心肌肥厚, 抑制 IVS, LVPW 肥厚 (P < 0.01), 增加 EF (P < 0.01)。见表 1。

表 1 参附强心丸 (SFQX) 对 CRS 大鼠 IVS, LVPW, EF 改善作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Shenfu Qiangxin pill on improvement of IVS, LVPW and EF in CRS rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IVS /mm	LVPW /mm	EF /%
假手术	-	1.27 ± 0.13	1.55 ± 0.13	72.27 ± 3.77
模型	-	2.03 ± 0.12 ¹⁾	2.23 ± 0.32 ²⁾	40.66 ± 4.25 ²⁾
SFQX	13.2	1.66 ± 0.12 ⁴⁾	1.98 ± 0.36	55.31 ± 7.49 ⁴⁾
HRP	10 × 10 ⁻³	1.26 ± 0.08 ⁴⁾	1.55 ± 0.12 ⁴⁾	63.17 ± 4.27 ³⁾

注: 与假手术组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与模型组比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01 (表 2 ~ 7 同)。

3.2 对 CRS 大鼠血清 BUN, Cr, BNP 的影响 CRS 大鼠血清 BUN, Cr, BNP 较假手术组明显升高 (P < 0.05, P < 0.01)。参附强心丸对血清 Bun, Cr 明显

降低作用 ($P < 0.05$), 但血清 BNP 水平较 CRS 模型组无显著差异。见表 2。

表 2 参附强心丸对 CRS 大鼠血清 BUN, Cr, BNP 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of Shenfu Qiangxin pill on serum BUN, Cr and BNP in CRS rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	BUN /mmol·L ⁻¹	Cr /μmol·L ⁻¹	BNP /ng·L ⁻¹
假手术	-	6.16 ± 0.82	29.28 ± 4.86	460 ± 70
模型	-	9.02 ± 1.99 ²⁾	41.25 ± 8.33 ²⁾	588 ± 113 ¹⁾
SFQX	13.2	6.97 ± 1.24 ³⁾	31.50 ± 4.00 ³⁾	482 ± 104
HRP	10 × 10 ⁻³	6.97 ± 1.50 ³⁾	31.86 ± 7.95 ³⁾	509 ± 98

3.3 对 CRS 大鼠心室、肾脏质量指数的影响 CRS 大鼠左心室质量指数明显大于假手术组 ($P < 0.01$), 左肾脏明显减小 ($P < 0.01$)。参附强心丸对肾脏缺血的改善作用明显, 与模型组比较肾脏质量指数明显增加 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 参附强心丸对 CRS 大鼠左心室, 左肾脏质量指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effect of Shenfu Qiangxin pill on massindex of left ventricular and left kidney in CRS rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	左心室指数	肾脏指数
假手术	-	0.232 ± 0.018	0.383 ± 0.098
模型	-	0.303 ± 0.034 ²⁾	0.096 ± 0.054 ²⁾
SFQX	13.2	0.302 ± 0.024	0.237 ± 0.136 ⁴⁾
HRP	10 × 10 ⁻³	0.290 ± 0.060 ³⁾	0.173 ± 0.130

3.4 对 CRS 大鼠左心室、肾脏组织 PRR mRNA 表达的影响 CRS 大鼠左心室及左肾组织 PRR mRNA 高表达 ($P < 0.01$), HRP 对 PRR mRNA 表达的抑制作用明显 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 参附强心丸组 PRR mRNA 表达较 CRS 模型组明显降低 ($P < 0.01$)。见表 4。

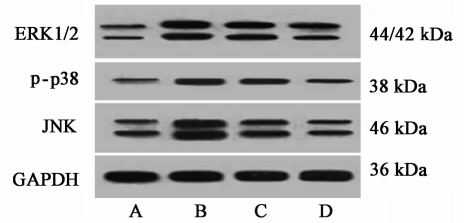
表 4 参附强心丸对 CRS 大鼠左心室, 肾脏 PRR mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 4 Effect of Shenfu Qiangxin capsule on PRR mRNA expression in left ventricle and kidney of CRS rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	左心室	左肾
假手术	-	0.76 ± 0.09	0.97 ± 0.10
模型	-	1.23 ± 0.09 ²⁾	1.91 ± 0.16 ²⁾
SFQX	13.2	0.90 ± 0.12 ⁴⁾	0.95 ± 0.10 ⁴⁾
HRP	10 × 10 ⁻³	0.94 ± 0.14 ³⁾	1.21 ± 0.35 ⁴⁾

3.5 参附强心丸对 MAPK 信号通路蛋白调控作用

与假手术组比较, CRS 大鼠左心室和左肾组织 ERK1/2, p38, JNK 蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$), HRP 对 MAPK 信号通路抑制作用明显, 较 CRS 模型组明显降低 ($P < 0.01$), 左肾脏 ERK1/2, p38 蛋白表达较模型组明显降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见图 1~2, 表 5~6。



A. 假手术组; B. 模型组; C. SFQX 组; D. HRP 组 (图 2 同)

图 1 参附强心丸对 CRS 大鼠左心室 MAPK 信号通路蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of Shenfu Qiangxin pill on MAPK signal pathway protein expression in left ventricle of CRS rats

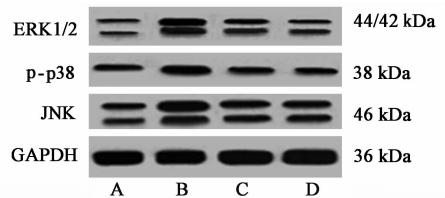


图 2 参附强心丸对 CRS 大鼠左肾 MAPK 信号通路蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of Shenfu Qiangxin pill on MAPK signal pathway protein expression in left kidney of CRS rats

表 5 参附强心丸对 CRS 大鼠左心室 MAPK 信号通路蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 5 Effect of Shenfu Qiangxin pill on MAPK signal pathway protein expression in left ventricle of CRS rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	ERK1/2 /GAPDH	P38 /GAPDH	JNK /GAPDH
假手术	-	0.47 ± 0.06	0.38 ± 0.04	0.41 ± 0.11
模型	-	0.74 ± 0.05 ²⁾	0.69 ± 0.05 ²⁾	0.76 ± 0.02 ²⁾
SFQX	13.2	0.70 ± 0.04	0.63 ± 0.04	0.66 ± 0.03 ⁴⁾
HRP	10 × 10 ⁻³	0.60 ± 0.05 ⁴⁾	0.52 ± 0.04 ⁴⁾	0.59 ± 0.04 ⁴⁾

3.6 参附强心丸对心肾细胞凋亡抑制作用 CRS 大鼠左心室、左肾凋亡明显, 凋亡率达 32.5%, 63.2%, 较假手术组明显升高 ($P < 0.01$), 凋亡细胞形态学呈现细胞变圆, 染色质凝聚、分块, 胞质皱缩。参附强心丸可明显抑制 CRS 大鼠心肌和肾脏细胞凋亡率, 与 CRS 模型组比较有显著差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 7。

表 6 参附强心丸对 CRS 大鼠左肾 MAPK 信号通路蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 6 Effect of Shenfu Qiangxinpin on MAPK signal pathway protein expression in left kidney of CRS rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	ERK1/2 /GAPDH	P38 /GAPDH	JNK /GAPDH
假手术	-	0.49 ± 0.13	0.57 ± 0.04	0.37 ± 0.20
模型	-	0.81 ± 0.06 ²⁾	0.70 ± 0.03 ²⁾	0.77 ± 0.05 ²⁾
SFQX	13.2	0.67 ± 0.06 ³⁾	0.63 ± 0.03 ³⁾	0.69 ± 0.07
HRP	10 × 10 ⁻³	0.62 ± 0.08 ⁴⁾	0.62 ± 0.05 ³⁾	0.66 ± 0.09

表 7 参附强心丸对 CRS 大鼠左心室、左肾组织细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 7 Effect of Shenfu Qiangxin pill onapoptosis of left ventricle and left kidney tissues in CRS rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	左心室肌	左肾脏
假手术	-	9.2 ± 6.1	12.7 ± 9.7
模型	-	32.5 ± 4.5 ²⁾	63.2 ± 4.9 ²⁾
SFQX	13.2	12.3 ± 11.8 ⁴⁾	15.8 ± 1.8 ⁴⁾
HRP	10 × 10 ⁻³	32.9 ± 5.9 ¹⁾	12.9 ± 6.3 ⁴⁾

4 讨论

参附强心丸是天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂研制的国家中药保护品种,具有益气助阳,强心利水功效,临床用于慢性心力衰竭,属心肾阳衰者。本课题组前期实验结果已证实,参附强心丸可上调慢性心衰大鼠心肌 Bcl-2^[19]。然而,如何阐明参附强心丸对肾脏和心脏的共同保护作用,体现中医“水火既济”的基础理论和益气助阳、强心利水中医治则,则需要制备“心损及肾、肾损及心”或“心肾共损”的病理模型。

以往已有文献报道采用合并手术方法造成心肾损伤程度大于单一手术的模型制备手段,多为大鼠急性心肌缺血(MI)合并肾组织切除术^[10,20-21],但是对心肾损伤程度的评价不一致。此次本研究采用肾脏急性缺血再灌注损伤(RIRI)合并腹主动脉缩窄的手术方法制备大鼠“心肾共损”模型,模拟临床心肾综合征的病理特点。RIRI是导致肾脏急性损伤(AKI)转归为慢性肾损伤(CKD)的启动因素,肾脏缺血/再灌 24 h 内,肾脏血流量下降 50% ~ 75%,同时伴随血清肌酐急剧升高,术后 1 ~ 2 周恢复至正常水平,2 ~ 4 周内肾小管结构分化重建^[10],而蛋白尿和肾间质纤维化改变是由 AKI 向 CKD 转变的内在修复过程^[22],管周毛细血管稀疏是纤维化之前的恢复阶段,但可加重缺氧,从而向 CKD 发展。此次实

验采用 RIRI + 腹主动脉缩窄术,以期造成肾脏和心脏共损的状态。

MAPK 信号通路是生物体内重要的信号转导系统之一,MAPK 亚族主要包括 ERK1/2, JNK, p38 和 ERK5, MAPK 活化后通过磷酸化核转录因子、细胞骨架蛋白及酶类等参与细胞增殖,分化,转化及凋亡的调节。肾素和(或)原肾素与 PRR 结合后可诱导其自身活化,并促使血管紧张素原向 AngI, II 转化,即 AngII 依赖性信号途径。随着研究的深入,发现 PRR 还能激活细胞内非 AngII 依赖性信号途径。PRR 的非 AngII 依赖功能体现在介导 MAPK 信号转导通路^[5],激活 MAPK 信号通路,参与心肌肥厚,肾小球硬化,肾脏纤维化,视网膜病变等,其介导的功能结构损害与终末器官损害之间存在因果关系。

HRP 为 PRR 多肽阻断剂,能阻断肾素原与 PRR 相结合。本实验中模型大鼠心室和肾脏组织 PRR 表达上调,引发 MAPK 途径包括 ERK1/2, p38, JNK 磷酸化和活化,HRP 阻断 PRR 的表达,继而影响 MAPK 信号通路活化,因此,本文将 HRP 作为阳性对照组,以作为 PRR 上调的抑制剂。

本次实验数据表明,CRS 大鼠左心室和左肾组织 PRR mRNA 表达异常升高,激活了 MAPK 信号通路 ERK1/2, p38, JUN 蛋白表达相应升高,心肾组织细胞凋亡率明显升高,PRR 阻滞剂 HRP 有效抑制 PRR,从而抑制 MAPK 信号通路的激活,并有效降低心肾组织细胞凋亡率。参附强心丸对 CRS 大鼠的治疗作用确定,对肾功能,缺血肾脏的改善作用明显,对心肾组织细胞凋亡抑制作用明显。

综上所述,本研究旨在通过证实 PRR 的非 AngII 功能,运用肾脏急性缺血再灌注损伤复合腹主动脉缩窄术制备 CRS 模型,阐明参附强心丸增加心室肌和肾脏组织 PRR,介导激活了 MAPK 信号通路 ERK1/2, p38, JUN 蛋白表达的调控,抑制心肾组织细胞凋亡,从而对心肾起到保护作用。

[参考文献]

[1] 吉强. 血管紧张素转化酶抑制剂治疗心血管病对肾脏的影响[J]. 新医学, 2008, 39(11): 748-749.

[2] Takahashi H, Ichihara A, Kaneshiro Y, et al. Regression of nephropathy developed in diabetes by (pro) rennin receptor blockade[J]. Am Soc Nephrol, 2007, 18(7): 2054-2061.

[3] Abdellatif A A. The role of rennin inhibition in treating the hupertensive patient with diabetes; a summary of preclinical and clinical evidence [J]. Expert Rev

- Cardiovasc Ther, 2012, 10(2):251-263.
- [4] GNguyen, Delarue F, Burcklé C, et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin [J]. J Clin Invest, 2002, 109(11):1417-1427.
- [5] Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, et al. Renin increases mesangial cell TGF-beta 1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms [J]. Kidney Int, 2006, 69(1):105-113.
- [6] 李晓梅, 杨毅宁, 马依彤, 等. 细胞外信号调节激酶 1/2 在压力负荷诱导小鼠肥厚心肌和心衰中的表达变化及作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(2):209-215.
- [7] 徐瑞霞, 郑哲, 林富强, 等. 大鼠肥厚心脏卸负荷后心室逆重塑相关的信号通路改变 [J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(4):625-630.
- [8] Rademaker M T, Yandle T G, Ellmers L J, et al. Hemodynamic, hormonal, and renal effects of (Pro)renin receptor blockade in experimental heart failure [J]. Circ Heart Fail, 2012, 5(5):645-652.
- [9] Szymanski M K, de Boer R A, Navis G J, et al. Animal models of cardiorenal syndrome: a review [J]. Heart Fail Rev, 2012, 17(3):411-420.
- [10] Basile D P. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function [J]. Kidney Int, 2007, 72:151-156.
- [11] Dikow R, Kihm L P, Zeier M, et al. Increased infarct size in uremic rats: reduced ischemia tolerance? [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(6):1530-1536.
- [12] 王蕾, 郝迪, 李旭, 等. 心肾综合征动物模型研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(11):1496-1498.
- [13] Li Y W, Zhang Y, Zhang L, et al. Protective effect of tea polyphenols on renal ischemia/reperfusion injury via suppressing the activation of TLR4/NF- κ B p65 signal pathway [J]. Gene, 2014, 542(1):46-51.
- [14] Venkatachalam M A, Griffin K A, Lan R, et al. Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 298(5):F1078-F1094.
- [15] 贺明, 黄娅林, 张琳, 等. 肾素(原)受体在大鼠肾小球系膜细胞和肾脏的表达 [J]. 生理学报, 2007, 59(6):796-804.
- [16] 张佩青, 刘娜, 王丽彦, 等. 肾衰泻浊丸对慢性肾衰竭大鼠 BMP-7/Smads/TGF- β_1 信号转导通路的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(8):692-695.
- [17] 周君. 下丘脑 MAPK 通路介导人身皂苷对 ARF 大鼠的肾保护作用 [D]. 大连:大连医科大学, 2010.
- [18] 刘洁. Megsin 及 p38MAPK 信号通路在糖尿病肾病发病机制中的作用 [D]. 石家庄:河北医科大学, 2010.
- [19] 王蕾, 蒋永萍, 康利, 等. 参附强心对腹主动脉缩窄大鼠心肌细胞 Bcl-2 表达及抗心衰作用机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4):254-258.
- [20] Szymanski M K, de Boer R A, Navis G J, et al. Animal models of cardiorenal syndrome: a review [J]. Heart Fail Rev, 2012, 17(3):411-420.
- [21] Dikow R, Kihm L P, Zeier M, et al. Increased infarct size in uremic rats: reduced ischemia tolerance? [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(6):1530-1536.
- [22] Basile D P. Rarefaction of peritubular capillaries following ischemic acute renal failure: a potential factor predisposing progressive nephropathy [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2004, 13(1):1-7.

[责任编辑 聂淑琴]