

潜阳育阴颗粒对自发性高血压大鼠肾脏氧化应激及炎症因子的影响

方祝元^{1*}, 丁康², 沈竹阳³, 蒋卫民¹

(1. 江苏省中医院, 南京 210029; 2. 南京市中医院, 南京 210001;
3. 江苏省中西医结合医院, 南京 210028)

[摘要] **目的:**研究潜阳育阴颗粒对自发性高血压大鼠肾脏氧化应激及炎症因子的影响,并探讨其改善自发性高血压的作用机制。**方法:**自发性高血压大鼠,随机分为模型组、潜阳育阴颗粒组、贝那普利组及潜阳育阴颗粒+贝那普利组,分别给予潜阳育阴颗粒混悬液($5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),贝那普利混悬液($1.67\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),潜阳育阴颗粒混悬液($5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)+贝那普利混悬液($1.67\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)ig,另设正常血压(WKY)大鼠为正常组,连续给等容量药8周后处死大鼠收集肾脏组织。观察大鼠血压、微量白蛋白和肌酐的变化,蛋白质免疫印迹(Western blot)检测肾脏局部NADPH氧化酶-4(NOX4)的水平,核转录因子- κB (NF- κB)p65及肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6(IL-6)蛋白表达量的变化,并观察潜阳育阴颗粒对这些指标释放量的影响。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠血压、微量白蛋白和肌酐明显升高,肾脏组织NOX4,NF- κB ,TNF- α 和IL-6蛋白表达明显升高($P<0.01$);潜阳育阴颗粒能抑制模型组肾脏NOX4的表达,降低NF- κB p65,TNF- α ,IL-6蛋白表达量,降低血压、微量白蛋白和肌酐的含量($P<0.01$),而潜阳育阴颗粒和贝那普利两药协同的效果更加明显($P<0.05$)。**结论:**潜阳育阴颗粒改善自发性高血压大鼠肾损害机制可能与抑制氧化应激进而减少炎症因子释放相关。

[关键词] 潜阳育阴颗粒; 高血压肾损害; 氧化应激; 核转录因子- κB ; 自发性高血压大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)13-0086-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016130086

Effects of Qianyang Yuyin Granules on Oxidative Stress and Inflammation Factors in Kidney of Spontaneously Hypertensive Rats

FANG Zhu-yuan^{1*}, DING Kang², SHEN Zhu-yang³, JIANG Wei-min¹

(1. Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanjing 210029, China;
2. Nanjing Hospital of TCM, Nanjing 210001, China;
3. Jiangsu Integrated Hospital of Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Qianyang Yuyin granules (QYYYG) on oxidative stress and inflammation factors in kidney of spontaneously hypertensive rats (SHRs). **Method:** SHRs were randomly divided into model group, QYYYG group, Benazepril group, and QYYYG + Benazepril group. The rats received QYYYG suspension ($5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Benazepril suspension ($1.67\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), QYYYG suspension ($5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) + Benazepril suspension ($1.67\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) respectively by intragastric administration. WKY rats were used as normal group, and their renal tissues were collected after 8 weeks of same volume administration. The changes of blood pressure, trace albumin, and creatinine in rats were observed; local NADPH oxidase-4 (NOX4) levels, nuclear factor- κB (NF- κB) p65, interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) protein expression levels of kidney were detected by Western blot; the effects of QYYYG on the release of these indicators were observed. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed significant increase in blood pressure, trace albumin, and creatinine in rats, and NOX4, NF- κB p65, IL-6, and TNF- α protein expression

[收稿日期] 20150825(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273713);教育部博士点专项课题项目(20123237110005)

[通讯作者] *方祝元,博士,主任医师,博士生导师,从事心血管疾病的工作,Tel:13915905596 E-mail:51422503@qq.com

levels in kidney of SHR ($P < 0.01$). QYYYG can inhibit the expression of NOX4, reduce the NF- κ B p65, IL-6, and TNF- α protein expression levels in kidney of SHRs, meanwhile it can reduce blood pressure, trace albumin, and creatinine ($P < 0.01$), and the synergy effect was more obvious in case of combination of Qianyang Yuyin granules and Benazepril. **Conclusion:** QYYYG can improve the renal impairment of SHRs, and the mechanism may be associated with inhibiting oxidative stress and reducing the release of inflammation factors.

[**Key words**] Qianyang Yuyin granules; hypertensive renal damage; oxidative stress; nuclear factor- κ B; spontaneously hypertensive rats

高血压能造成肾脏等多个靶器官的损害,近年来的研究表明肾脏内氧自由基损伤和过氧化作用在引起高血压肾损害病理过程中起到独立作用,同时高血压患者肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)激活,是导致血管损伤的主要原因,血管紧张素II(AngII)是RAAS系统的主要产物,可以诱导核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路激活导致导致血管收缩、细胞增殖及炎症细胞因子,如白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的释放等,这些都成为高血压非血流动力学发病机制重要部分^[1-4]。

以非血流动力学发病机制做为治疗方向的研究较少,郭兆安^[5]研究表明连黄降浊颗粒能明显改善内皮素(ET)和一氧化氮(NO)的水平,抑制血管紧张素II(ATII)及ET的合成。牟林茂等^[6]平肾通络降浊颗粒能降低血浆ET,升高NO浓度,抑制RAS系统活性,改善性激素平衡的作用。陈景彦等^[7]研究结果显示泽泻汤加味方可改善高盐致高血压大鼠肾脏的结构和功能,其机制与上与肾脏RAS活性和AngII水平有关。而治疗高血压肾损害的重要药物血管紧张素受体阻滞剂(ARB)或血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)^[8-10]在治疗机制方面被证明也可体现在抑制AngII产生的炎症作用,可降低循环中如IL-6, TNF- α , 单核细胞趋化因子蛋白-1(MCP-1)和C-反应蛋白(CRP)等一些炎症介质水平。因此,对氧化应激及炎症因子等非血流动力学因素和高血压肾损害的相关性研究可作为重要研究方向,可为临床治疗打好基础。

潜阳育阴颗粒(QYYYG)用于治疗高血压肾损害已有30多年之久,前期已进行随机对照研究,发现QYYYG对患者的血压、尿微量白蛋白、尿白蛋白、肌酐及内生肌酐清除率均有一定的改善作用^[11],可做为重要的补充治疗方案,而前期也进行了大量的体外研究,发现QYYYG具有多靶点的治疗作用^[12-14],其中包括药物通过调控Fas/FasL蛋白的活性能够明显抑制内皮细胞的凋亡从而为治疗高血压肾损害提供分子机制的可能性之一,另一方面

发现药物可以上调NO水平,特别是内皮型一氧化氮合酶(eNOS)表达明显升高从而改善血压保护肾功能,这样为分子机制提供了可能性之二,同时实验发现QYYYG可抑制还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶的活性证明了药物也有可能改善氧化应激反应而起效,为后续具体研究NADPH氧化酶4(NOX4)在药物治疗中的地位打下了基础;体内实验中QYYYG可以通过干预AngII起到治疗的作用,也对其中TNF- α 进行了初步研究^[15],但没有进一步通过实验研究去发现QYYYG是通过何种途径减少下游炎症因子的生成而达到改善肾损害的目的,本实验则力求证明QYYYG有可能通过改善自发性高血压大鼠肾脏组织氧化应激特别是NOX4的表达达到干预NF- κ B信号通路减少炎症因子生成的目的。

1 材料

1.1 动物 正常血压(WKY)大鼠8只,14周龄,雄性;自发性高血压大鼠40只,14周龄,雄性。所有大鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2012-0001。

1.2 药物及试剂 QYYYG[药物各成份由江苏省中医院制剂部及GCP中心鉴定并制成配方颗粒,主要鉴定专家为南京中医药大学药学院居文政教授,批号1307004,内含鬼针草810g,制何首乌180g,山茱萸108g,玄参180g,川牛膝270g,泽泻180g以上6味,加水煎煮2次,滤过,合并2次滤液,减压浓缩至适量,离心,上清液浓缩至相对密度约1.20(60℃)的浸膏,流化床制粒,60℃干燥,制成颗粒1000g,即得],贝那普利片(北京诺华制药有限公司,批号X1971);全蛋白抽提试剂盒,SDS-PAGE凝胶电泳试剂盒,蛋白质免疫印迹(Western blot)检测试剂盒,增强型化学发光试剂(ECL)检测试剂盒,Braford蛋白含量检测试剂盒,预染蛋白分子量,丽春红染色液,凝胶阻滞分析(EMSA)检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号分别为KGP250, KGP113, KGP1201, KGP1123, KGA801, KGP441,

KGP105, KGS101); 血肌酐试剂盒和血尿素试剂盒 (中生北控生物科技股份有限公司, 批号分别为 120391, 120521), 尿微量白蛋白试剂盒 (宁波赛克生物技术有限公司, 批号 20130927), NF- κ B p65 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号 4764); IL-6, TNF- α 和 NOX4 (英国 Abcam 公司, 批号为 ab83339, ab7742, ab109225)。

1.3 仪器 BP2006A 型智能无创血压计 (北京软隆生物技术有限公司), 309L 型 -70 $^{\circ}$ C 低温冰箱 (日本 Sanyo 公司), AU2700 型全自动生化仪 (日本奥林巴斯公司), 164-5051-PowerPacTM 基础电泳仪电源 (美国 Bio-Rad 公司), UV-2540 型分光光度计 (日本岛津公司), HY-4 型脱色摇床 (江苏金坛市正基仪器厂), BL310/BL21S 型分析天平 (德国 Sartorius 公司), BOXChemiXR5 型凝胶成像分析系统 (英国 Syngene 公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 WKY 大鼠为正常组, 自发性高血压大鼠随机分为 4 组, 分别为模型组, QYYYG 组, 贝那普利组, QYYYG + 贝那普利组 (联合组)。以上每组大鼠 8 只, 组内编号。QYYYG 组给予 5 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ QYYYG 混悬液 *ig* (人剂量的 10 倍^[16]); 贝那普利组给予 1.67 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 贝那普利混悬液 *ig*; 联合组给予 5 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ QYYYG 混悬液 + 1.67 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 贝那普利混悬液 *ig*; 正常组及模型组予等量蒸馏水 *ig*。所有实验大鼠 *ig* 8 周, 每日 1 次, 根据体重改变药物量。

2.2 大鼠标本采集 停药 1 d 后处死大鼠, 取肾脏组织, 夹取厚度 ≤ 0.5 cm 的肾脏组织按组别投入已预先配好的 10% 福尔马林中固定, 送至江苏省中医院病理科冰冻切片制作, 制作好的切片置于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用及检测。

2.3 测量血压 采用无创性套尾法测定清醒大鼠血压, 早上 9:00 ~ 12:00, 每次测量时记录 3 次, 间隔 1 ~ 2 min, 取其平均值, 测定前将大鼠置于 25 $^{\circ}$ C 室温下 30 min, 使尾部血管充分扩张, 便于准确测

量, 每次 *ig* 后 2 h 开始测量, 以排除 *ig* 刺激对血压的干扰。

2.4 尿液指标测定 用大鼠代谢笼按组分别装大鼠, 接取各组大鼠 24 h 的尿液, 统一送至江苏省中医院检验科, 采用全自动生化仪和放免法检测大鼠尿微量白蛋白。

2.5 血液指标测定 停药 1 d 后麻醉大鼠, 无菌条件下打开腹腔, 经腹主动脉取血于抗凝管中, 以 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液置于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。取置于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱保存的血清上清液, 采用全自动生化分析仪测定肌酐。

2.6 Western blot 检测 每 100 mg 固体组织置于培养皿中, 手术剪剪碎成 3 mm \times 3 mm 左右的小块, 加入冷裂解液 0.5 ~ 1 mL, 玻璃匀浆器上下手动匀浆, 4 $^{\circ}$ C, 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清转移测蛋白浓度; β -肌动蛋白 (β -actin) 作为内参, 取待测蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳, 转移至 NC 膜上, 将 NC 膜放入平皿中, 加入含 5% 脱脂奶粉的封闭液, 洗膜 3 次。放入含一抗的平皿中, 4 $^{\circ}$ C 摇床振荡孵育过夜。吸弃一抗, 用 5% 脱脂奶粉封闭液稀释二抗, 室温摇床振荡反应 1 ~ 2 h。洗膜后显影、定像。使用软件对结果进行灰度分析。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据采用单因素方差分析, 两两组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对模型组大鼠血压的影响 给药前, 与正常组比较, 模型组, QYYYG 组、贝那普利组及联合组的收缩压 (SBP) 及舒张压 (DBP) 组间均有明显差异, 说明造模成功, 同时模型组各组之间无明显差异, 可进行后续的实验。给药 8 周后, 与正常组比较, 模型组 SBP, DBP 明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, QYYYG 组、贝那普利组及联合组 SBP, DBP 均下降 ($P < 0.01$); 联合组和其他两单药治疗组比较, 降低 SBP, DBP 的幅度更大 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 QYYYG 对给药前和给药后大鼠血压的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effects of QYYYG on delivery before and delivery after blood pressure in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

mmHg

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	给药前		给药后	
		SBP	DBP	SBP	DBP
正常	-	122.13 \pm 6.05	83.88 \pm 6.91	127.00 \pm 8.22	143.45 \pm 8.41
模型	-	189.10 \pm 9.24 ¹⁾	140.80 \pm 9.46 ¹⁾	193.95 \pm 4.95 ¹⁾	134.35 \pm 9.31 ¹⁾
QYYYG	5	189.45 \pm 8.08 ¹⁾	139.80 \pm 3.03 ¹⁾	184.50 \pm 8.39 ²⁾	127.40 \pm 17.26 ^{2,4)}
贝那普利	1.67 $\times 10^{-3}$	190.50 \pm 8.78 ¹⁾	139.30 \pm 4.92 ¹⁾	174.65 \pm 10.65 ^{2,4)}	110.35 \pm 10.82 ^{2,3,4)}
联合	5 + 1.67 $\times 10^{-3}$	190.80 \pm 9.70 ¹⁾	139.50 \pm 7.06 ¹⁾	163.80 \pm 9.13 ^{2,3,5)}	84.50 \pm 7.82 ^{2,3,5)}

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$; 与 QYYYG 组比较³⁾ $P < 0.01$; 与联合组比较⁴⁾ $P < 0.05$; 与贝那普利组比较⁵⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

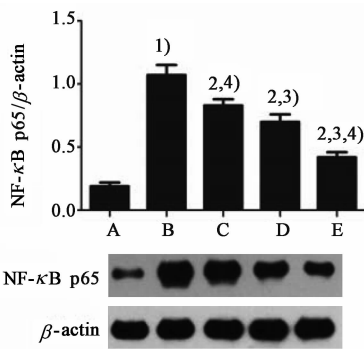
3.2 对大鼠尿微量白蛋白、血肌酐的影响 与正常组比较,模型组尿微量白蛋白、血液肌酐明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,QYYYG 组、贝那普利组、联合组尿微量白蛋白均降低 ($P < 0.01$);联合组比其余两单药治疗组对尿微量白蛋白的影响更大 ($P < 0.05$),而各治疗组对肌酐的影响均没有显著差异。见表 2。

表 2 QYYYG 对大鼠尿液微量白蛋白与血肌酐的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of QYYYG on urine trace albumin and serum creatinine in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	微量白蛋白 /g·L ⁻¹	肌酐 /mmol·L ⁻¹
正常	-	8.34 ± 1.81	20.33 ± 7.57
模型	-	24.15 ± 3.59 ¹⁾	59.14 ± 8.63 ¹⁾
QYYYG	5	17.84 ± 6.99 ^{2,4)}	54.51 ± 3.83
贝那普利	1.67 × 10 ⁻³	17.73 ± 5.21 ^{2,4)}	51.63 ± 2.84 ³⁾
联合	5 + 1.67 × 10 ⁻³	10.99 ± 2.37 ^{2,3,5)}	45.80 ± 14.71 ³⁾

3.3 对大鼠肾脏局部 NF-κB p65 蛋白含量的影响 与正常组比较,模型组 NF-κB p65 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$);与模型组比较,QYYYG 组、贝那普利组及联合组对大鼠肾组织 NF-κB p65 蛋白表达均明显下降 ($P < 0.05$);联合组抑制肾组织 NF-κB p65 蛋白表达程度优于 QYYYG 组与贝那普利组 ($P < 0.05$)。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. QYYYG 组;D. 贝那普利组;E. 联合组;与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与 QYYYG 组比较³⁾ $P < 0.05$;与贝那普利组比较⁴⁾ $P < 0.05$ (图 2,3 同)。

图 1 QYYYG 对大鼠肾脏 NF-κB p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig.1 Effects of QYYYG on expression of NF-κB p65 protein in rats kidney ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.4 对模型组大鼠肾脏局部 TNF-α, IL-6 蛋白含量的影响 与正常组比较,模型组 TNF-α, IL-6 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$);与模型组比较,QYYYG 组、贝那普利组及联合组对大鼠肾组织 TNF-α, IL-6 蛋白

表达均明显下降 ($P < 0.05$);联合组抑制肾组织 TNF-α, IL-6 蛋白表达程度优于 QYYYG 组与贝那普利组 ($P < 0.05$)。见图 2。

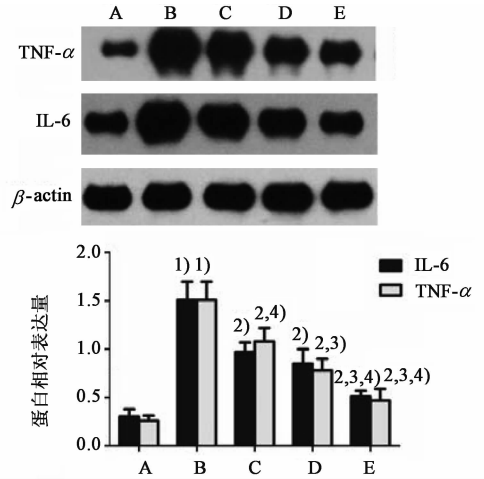


图 2 QYYYG 对大鼠肾脏 TNF-α, IL-6 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig.2 Effects of QYYYG on expression of TNF-α, IL-6 protein in rats kidney ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.5 对大鼠肾脏局部 NOX4 蛋白含量的影响 与 WKY 比较,模型组 NOX4 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$);与模型组比较,QYYYG 组、贝那普利组及联合组对大鼠肾组织 NOX4 蛋白表达均明显下降 ($P < 0.05$);联合组抑制肾组织 NOX4 蛋白表达程度优于 QYYYG 组与贝那普利组 ($P < 0.05$)。见图 3。

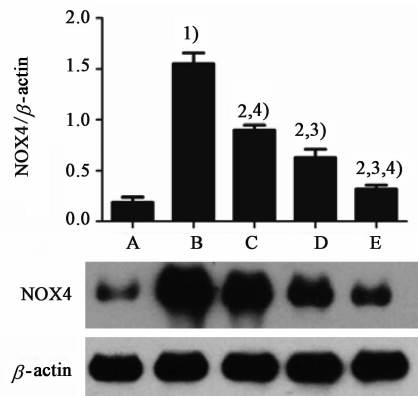


图 3 QYYYG 对大鼠肾脏 NOX4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig.3 Effects of QYYYG on expression of NOX4 protein in rats kidney ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

4 讨论

随着高血压病程不断发展,心脑血管靶器官的损害是常见现象,肾脏是最早出现生理和病理改变的器官。对于高血压发病的过程来说,肾脏的病理性变化即是因又是果。在高血压发展阶段,有可能并

没有发现任何肾脏结构性改变,但其实肾脏局部已经发生些许变化,改善肾脏损害的首要治疗方法是合理的降低血压,维持血压在正常的水平波动,而蛋白排泄率和肌酐水平是公认的肾损害指标,笔者也可以通过肾损害指标的检测直接观察肾损害发展的程度。前期研究中笔者做了肾脏局部苏木素-伊红(HE)染色,结果表明模型组肾脏病变表现为部分肾小球内纤维组织明显增多,肾小球纤维化等,与正常大鼠比较,模型组肾脏病变积分显著升高;马松三色(Masson)染色肾脏组织纤维化指数结果也提示模型组肾脏纤维化指数显著升高,提示该实验条件下模型组大鼠的肾脏病变为早期纤维化,这也说明了模型组可做为笔者的实验大鼠。本次研究笔者则检测模型组尿微量白蛋白及肌酐的变化情况来观察药物的作用,发现尿微量白蛋白在模型组肾脏中可明显表达,QYYYG可降低此项指标,而QYYYG与贝那普利联用可显著降低尿微量白蛋白的水平,其作用效果比单药使用效果更明显。而实验中肌酐仍在正常范围,这也说明了当肾发生严重病变时,血液中肌酐含量才会升高,但实验中比较正常组的结果,其仍有明显升高;而在QYYYG和贝那普利进行干预后也发现两药联合干预可使肌酐明显降低^[17-19],上述研究中证明了QYYYG对模型组的血压有一定的调控作用,而贝那普利联合QYYYG对血压调控作用比单用QYYYG或单用贝那普利的优势更明显,同时药物可降低肾脏的尿微量白蛋白及肌酐,达到改善肾损害的目的。在此基础上笔者将进一步发现QYYYG是否通过抑制氧化应激及炎症因子达到改善血压及高血压肾损害各类指标的目的。

高血压肾损害的发病机制首先包括血流动力学因素,与肾血管的高压力密切相关^[20],而非血流动力学因素做为另一发病机制为近年来研究重点,包括氧化应激,炎症反应^[21]和RASS系统,三者密切相关,其中RASS系统中重要物质Ang II有明显的促炎症作用,最新的研究为一个大型荟萃分析支持心血管疾病的炎症假说,说明有可能低级别的慢性炎症是导致全身血管疾病的重要原因^[22],在某种程度上也说明了氧化应激及炎症因子释放是高血压肾损害发病机制重要内容^[23],上述实验笔者研究了NF- κ B炎症通路及其下游的TNF- α ,IL-6因子的释放,TNF- α 是参与机体免疫反应和炎症反应的重要调节因子,它处于众多炎症因子的核心地位,而IL-6浓度可敏感的反映出组织损伤的程度,被认为与全

身炎症反应的严重程度和致死率密切相关。笔者的实验发现和WKY大鼠比较,模型组肾脏中的NF- κ B p65,TNF- α ,IL-6蛋白含量明显增多,说明高血压RASS系统紊乱可能使NF- κ B炎症通路过度激活,进而下游TNF- α ,IL-6 2个主要炎症因子的释放明显增多,说明炎症通路激活后进一步促成炎症因子的生成过多从而可能形成肾损害。

研究明确证实在肾脏的各部位都有NADPH氧化酶的分布,至少有3种不同的NOX酶存在于肾脏中,包括NOX1,NOX2和NOX4^[24-28],其中NOX4表达最多^[3,29-31],NOX4机体氧化还原反应的重要酶类,是活性氧(ROS)的主要来源,在肾损伤至纤维化的病理过程中具有重要作用,笔者研究发现模型组肾组织中NOX4明显过度生成,说明高血压形成的氧化应激反应有可能是炎症通路激活的一个诱发因素,在后期的实验研究中将得到证实。

在使用药物干预的研究中,笔者发现QYYYG组和贝那普利组均能抑制NF- κ B p65,NOX4的表达,并减少TNF- α ,IL-6的释放,而贝那普利组除了对IL-6抑制效果相当外其余均明显优于QYYYG组,于是笔者同时使用2种药物同时干预,发现抑制效果优于2个单药组,说明两者联用有可能有协同作用。在QYYYG组和贝那普利组检测NOX4蛋白表达的实验中和炎症通路相关因子的实验有着同样的结果,结合前期的研究成果推测QYYYG对模型组肾脏的保护作用可能与降低了NOX4表达进而ROS的生成减少从而抑制了炎症通路的激活有关:NOX4及ROS活性降低,抑制了NF- κ B DNA结合活性,从而抑制了细胞中这2条的炎症通路的释放与激活;减少了肾细胞损伤后引起的一系列黏附分子及炎症因子的表达与释放,如TNF- α ,IL-6,达到保护肾脏组织及血管内皮的作用。

综上所述,笔者通过对模型组肾脏NOX4,炎症因子表达量的研究证明了QYYYG有可能是通过抑制氧化应激及NF- κ B信号通路,减少炎症因子释放达到改善肾损害的目的,但这还需要进一步研究是否其他炎症信号通路也参与了其中,所以笔者下一步将对其他多个炎症信号通路进行研究,以发现QYYYG的多靶点作用。

[参考文献]

- [1] Chamarthi B, Williams G H, Ricchiuti V, et al. Inflammation and hypertension: the interplay of interleukin-6, dietary sodium, and the renin-angiotensin

- system in humans[J]. *Am J Hypertens*, 2011, 24(10): 1143-1148.
- [2] Coleman C G, Wang G, Faraco G, et al. Membrane trafficking of NADPH oxidase p47 (phox) in paraventricular hypothalamic neurons parallels local free radical production in angiotensin II slow-pressor hypertension [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(10): 4308-4316.
- [3] Bedard K, Krause K H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology [J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(1): 245-313.
- [4] Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases[J]. *Pharmacol Rev*, 2011, 52(1): 11-34.
- [5] 郭兆安. 祛湿降浊法干预高血压性肾损害(肾功能衰竭期)的研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2003.
- [6] 牟林茂, 于雷, 张娟. 平肾通络降颗粒治疗原发性高血压早期肾损害临床研究[J]. *山东中医药大学学报*, 2008, 32(4): 319-323.
- [7] 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): 234-235.
- [8] Kranzhöfer R, Schmidt J, Pfeiffer C A, et al. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19(7): 1623-1639.
- [9] Skurk T, van Harmelen V, Hauner H. Angiotensin stimulates the release of interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human adipocytes by activation of NF-kappaB [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*, 2004, 24(7): 1199-1203.
- [10] Savoia C, Schiffrin E L. Inflammation in hypertension [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2006, 15(2): 152-158.
- [11] 黄洋. 潜阳育阴颗粒对高血压肾损害保护作用的研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.
- [12] 陈艺, 方祝元, 严士海, 等. 潜阳育阴颗粒含药血清对 Ang II 诱导人脐静脉内皮细胞凋亡及 fas/fasL 蛋白表达的影响[J]. *中成药*, 2013, 35(7): 1381-1385.
- [13] 严冬, 方祝元, 严士海, 等. 潜阳育阴颗粒含药血清对 Ang II 诱导人脐静脉内皮细胞损伤 NADPH 氧化酶、AKT、TNF- α 、IL-6 的影响[J]. *中成药*, 2014, 36(9): 1809-1813.
- [14] 王欣彤, 方祝元, 严士海, 等. 潜阳育阴颗粒含药血清对 Ang II 诱导 HUVEC 损伤 NO 的影响[J]. *中成药*, 2014, 36(12): 2467-2470.
- [15] 陈艺, 方祝元, 严士海, 等. 潜阳育阴颗粒对自发性高血压大鼠 Ang II 及 TNF- α 的影响[J]. *现代中药研究与实践*, 2013, 27(3): 33-36.
- [16] 魏伟. 药理学实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 123.
- [17] 陈艺. 潜阳育阴颗粒对 Ang II 诱导的血管内皮细胞炎症反应及凋亡的影响及其保护机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
- [18] 沈竹阳. 潜阳育阴颗粒联合贝那普利对模型组大鼠 ROS 表达、NF- κ B 活性及 ICAM-1 的影响[D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [19] 叶沃若. 潜阳育阴颗粒对模型组大鼠血压及活性氧物种 ROS 的影响[D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
- [20] Palmer B F Impaired renal autoregulation; implications for the genesis of hypertension and hypertension-induced renal injury [J]. *Am J Med Sci*, 2001, 321(6): 388-400.
- [21] Wang L, Yao L. Hypertensive renal damage[J]. *Chin J Nephrol*, 2005, 21(10): 569-571.
- [22] Kaptoge S, Seshasai S R, Gao P, et al. Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease; new prospective study and updated meta-analysis [J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(9): 578-589.
- [23] 黎磊石, 刘志红. 中国肾脏病学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2008.
- [24] Chabrashvili T, Tojo A, Onozato M L, et al. Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney [J]. *Hypertension*, 2002, 39(2): 269-274.
- [25] Cheng G, Cao Z, Xu X, et al. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5 [J]. *Gene*, 2001, 269(1/2): 131-140.
- [26] Geiszt M, Kopp J B, Várnai P, et al. Identification of Renox, an NAD(P)H oxidase in kidney [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(14): 8010-8014.
- [27] Miyata K, Rahman M, Shokoji T, et al. Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(10): 2906-2912.
- [28] Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, et al. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(2): 1417-1423.
- [29] Gill P S, Wilcox C S. NADPH oxidases in the kidney [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(9/10): 1597-1607.
- [30] Lambeth J D. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43(3): 332-347.
- [31] Geiszt M. NADPH oxidases; new kids on the block [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 71(2): 289-299.