

腺嘌呤肾虚多尿大鼠肾脏 CYP11B2 mRNA 表达变化的研究

李淑雯^{1*}, 吴清和², 黄萍², 操红缨²

(1. 江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 334000; 2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

[摘要] **目的:**通过研究腺嘌呤对醛固酮合成酶途径的影响,探讨其导致“肾虚多尿”的机制所在。**方法:**利用酶联免疫分析法分别检测正常组、腺嘌呤组动物血中皮质酮(Cort)、醛固酮(ALD)的含量;并采用 RT-PCR 的方法检测各组动物肾脏 CYP11B2 mRNA 的表达。**结果:**与正常组比较,腺嘌呤可明显减少大鼠血中 Cort, ALD 含量,并下调模型大鼠肾脏 CYP11B2 mRNA 的表达。**结论:**腺嘌呤肾虚多尿大鼠血中 Cort, ALD 含量减少,肾脏 CYP11B2 mRNA 的表达下调,影响醛固酮合成酶途径,从而减少 ALD 的合成,导致水液代谢异常引发多尿,本实验研究结果从醛固酮合成酶的角度阐明了腺嘌呤导致“肾虚多尿”的作用机制。

[关键词] 腺嘌呤;肾虚多尿;醛固酮合成酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)02-0064-04

The Experimental Study on the mRNA Expression of CYP11B2 in Rat with Kidney Deficiency and Diuresis Induced by Adenine

LI Shu-wen^{1*}, WU Qing-he², HUANG Ping², CAO Hong-ying²

(1. Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 344000, China;

2. College of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism for kidney deficiency and diuresis by studying the action of adenine to ALD synthase. **Methods:** The contents of Cort, ALD in blood were determined and the mRNA expression

[收稿日期] 2009-09-11

[基金项目] 国家自然科学基金(30873425)

[通讯作者] *李淑雯, Tel: 15879846716; E-mail: lswzyh@qq.com

of CYP11B2 was evaluated with ELISA and RT-PCR in model group and control group. **Results:** Compared with control group, adenine could remarkably decrease the contents of Cort,ALD in rat blood; and downregulate the mRNA expression of CYP11B2. **Conclusion:** Adenine can decrease the contents of Cort,ALD in blood and downregulate the mRNA expression of CYP11B2 in rats. It can decrease the synthesis of ALD by adjusting the ALD synthase. The results may expound the mechanism of kidney deficiency and diuresis induced by adenine from the angle of ALD synthase approach.

[**Key words**] adenine; kidney deficiency and diuresis; ALD synthase

腺嘌呤模型为研究较多的“肾阳虚”模型,其引起“肾阳虚”表现的机制主要为代谢产物机械性阻塞肾小管使肾组织中与糖、脂肪、蛋白质代谢有关的多种酶活性受到抑制,影响肾组织能量代谢因而导致畏寒肢冷、活动减少、反应迟钝、多尿等肾虚的表现^[1]。腺嘌呤模型会出现明显“多尿”的表现,但其在影响水液代谢方面的机制,目前研究较少。醛固酮(ALD)是调节机体水盐代谢的重要激素,作用部位主要在肾小管,可促进肾脏远曲小管及集合管重吸收钠、水和排钾,其合成与分泌正常与否与“多尿”的发生关系密切。醛固酮的合成除受血中皮质酮含量影响外,还有赖于体内醛固酮合成酶的水平。ALD 前身是胆固醇,经过多步生化反应逐步合成具有活性的醛固酮,其合成步骤包括胆固醇形成孕酮、孕酮形成去氧皮质酮、皮质酮在醛固酮合成酶的作用下经过 11 β -羟化、18 位羟化及 18 位氧化 3 步连续的反应最终生成醛固酮^[2]。在其合成的过程中,合成酶起到了关键性的作用。醛固酮合成酶由两个基因控制,一是早些时候发现的 P45011B1 (又名 CYP11B1),该基因控制醛固酮合成早期,并非真正代表醛固酮合成;二是晚些时候确定的 P450 aldo (CYP11B2),为醛固酮合成晚期所必需,因此后者代表醛固酮合成^[3]。本研究通过对醛固酮合成酶途径的实验研究,探讨了腺嘌呤影响醛固酮合成,导致水液代谢异常的机制。

1 材料与方 法

1.1 动物 SD 大鼠,SPF 级,雌雄各半,体重 160 ~ 180 g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号:2007A003。

1.2 药物与试剂 腺嘌呤,上海昊化化工有限公司;大鼠皮质酮酶联免疫试剂盒(ELISA),由美国 TPI 公司提供;离子浓度测定试剂:Olympus 公司;大鼠醛固酮酶联免疫试剂盒(ELISA),由美国 ADL 公司提供。Trizol reagent,美国 Invitrogen 公司提供;

cDNA 试剂盒,立陶宛 Fermentas 公司提供。

1.3 仪器 PCR 扩增仪(DNA Thermal Cycler),Biometra 公司产品;WO-9413B 型凝胶成像分析系统,北京六一仪器厂;DYCP-31 系列水平电泳仪,上海申能博彩生物科技有限公司产品;酶标仪:RT-2100C 自动酶标仪,美国 RAYTO 公司产品;培养箱:Binder 培养箱,USA 产品;CLINITEK 50 尿液分析仪,美国 BAYER 公司产品。

1.4 动物分组与给药 根据改良 Aston 方法^[4]对实验大鼠进行尿量筛选,将合格 SD 大鼠,随机分为正常组、腺嘌呤组,雌雄各半,腺嘌呤组按腺嘌呤 150 mg · kg⁻¹剂量灌服大鼠 4 周,每周测量体重一次,调整给药剂量。给药 4 周后,用代谢笼收集 24 h 尿液检测尿量及尿中离子浓度,眼眶静脉丛采血分别检测 Cort、ALD,颈椎脱臼处死,将肾脏在冰块上仔细分离皮质,置于液氮中用于 RT-PCR 检测。

1.5 ELISA 法检测血中 Cort、ALD 含量 取血样用 ELISA 法检测,按照试剂盒说明书步骤进行。

1.6 RT-PCR 法检测肾脏 CYP11B2 mRNA 的表达 用 Trizol 试剂盒提取肾皮质总 RNA,取 1 μ L 进行 RT-PCR 分析。PCR 引物由上海生物工程公司合成,CYP11B2 引物序列为上游 5'-ACCATGGATGTC-CAGCAA-3',下游 5'-GAGAGCTGCCGAGTCTGA-3',依引物设计,PCR 扩增目的片段长度为 297 bp;同时扩增 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceral-dehydrophosphate dehydrogenase,GAPDH)为内参照,其序列为上游 5'-GGCAAGTTCAATGGCACAGT-3',5'-AAGGTG-GAGGAATGGGAGTT-3',依引物设计,PCR 扩增目的片段长度为 725 bp;实验过程按试剂盒说明书进行,PCR 反应参数为 94 $^{\circ}$ C 45 s,56 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min。反应结束后,取 PCR 产物 5 μ L 于 0.25 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,密度扫描分析 PCR 产物带,用 Gel-pro 4.0 凝胶分析软件分析结果。各组 CYP11B2 mRNA 的表达

水平以相对表达量即 CYP11B2 mRNA 与 GAPDH 的比值来表示。

1.7 统计方法 实验数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异的显著性检验运用 SPSS 13.0 软件提供的非参数检验和单因素方差分析方法。

2 结果

2.1 一般情况观察结果 与正常组比较, 模型组大鼠用药腺嘌呤灌胃 1 周后, 出现畏寒肢冷、倦缩拱背、多尿、活动减少、反应迟钝、喜扎堆、体毛枯疏、多尿等明显肾阳虚多尿外在表现。

2.2 24 h 尿量变化 表 1 结果显示, 与正常组比较, 腺嘌呤组大鼠 24 h 尿量显著增加 ($P < 0.01$)。

表 1 腺嘌呤对大鼠 24 h 尿量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	尿量 ($mL \cdot 100 g^{-1}$)
正常组	-	8.12 ± 2.25
腺嘌呤组	0.15	14.36 ± 4.37 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

2.3 尿中离子浓度变化 表 2 结果显示, 与正常组比较, 腺嘌呤组大鼠尿中 Na^+ , Cl^- 显著增加, K^+ 显著减少 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。

表 2 腺嘌呤对大鼠尿中离子浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	Na^+ ($mmol \cdot L^{-1}$)	K^+ ($mmol \cdot L^{-1}$)	Cl^- ($mmol \cdot L^{-1}$)
正常组	-	17.2 ± 4.6	81.7 ± 9.9	23.3 ± 9.9
腺嘌呤组	0.15	27.5 ± 16.6 ¹⁾	51.4 ± 12.1 ²⁾	42.9 ± 11.2 ²⁾

2.4 对血中皮质酮 (Cort)、醛固酮 (ALD) 的影响 表 3 结果显示, 与正常组比较, 腺嘌呤组大鼠血中 Cort, ALD 明显下降 ($P < 0.01$)。

表 3 腺嘌呤对大鼠血中 Cort, ALD 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	Cort ($pg \cdot mL^{-1}$)	ALD ($ng \cdot mL^{-1}$)
正常组	-	13.34 ± 3.44	0.255 ± 0.123
模型组	0.15	8.67 ± 2.37 ²⁾	0.119 ± 0.026 ²⁾

2.5 肾脏 CYP11B2 mRNA 检测结果 结果见图 1, 表 4。

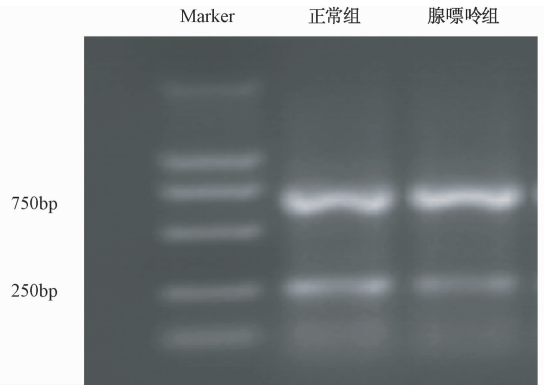


图 1 腺嘌呤对大鼠肾脏 CYP11B2 mRNA 表达量的影响

表 4 腺嘌呤对大鼠肾脏 CYP11B2 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	CYP11B2 mRNA (比值)
正常组	-	1.735 0 ± 0.123 2
腺嘌呤组	0.15	1.089 6 ± 0.271 1 ²⁾

结果显示, CYP11B2 mRNA 的相对拷贝数与内参做对比, 得到 CYP11B2 mRNA 表达的相对比值, 结果表明腺嘌呤组大鼠肾脏 CYP11B2 mRNA 表达比正常组明显降低 ($P < 0.01$)。

3 讨论

文献研究报导表明, 腺嘌呤模型既具有肾阳虚证的主要特征, 又出现明显的尿量增多变化, 其为核酸的主要组成成分之一, 当机体摄入大剂量腺嘌呤时, 异常高浓度的腺嘌呤在黄嘌呤氧化酶的作用下则转变成极难溶解于水的 2,8-二羟基腺嘌呤, 这种代谢产物沉积于肾小管, 机械性阻塞肾小管而引起肾功能衰竭, 使肾组织中与糖、脂肪、蛋白质代谢有关的多种酶活性受抑制, 影响了肾组织的能量代谢因而引起“肾阳虚”的诸多证候^[5~6]。本研究在采用腺嘌呤灌服大鼠的实验过程中发现, 用药一周后大鼠出现体重减轻, 活动减少, 畏寒肢冷, 倦缩拱背, 反应迟钝等明显的“肾阳虚”外观行为表现, 此外, 24 h 尿量实验也表明大鼠尿量明显增多, 说明此模型在引起肾阳虚症状的同时还出现了水液代谢的异常; 在对动物进行尿离子浓度检测的实验中也发现, 腺嘌呤组大鼠尿中 Na^+ , Cl^- 浓度增加, K^+ 浓度减少, 进一步表明其导致“肾虚多尿”的出现可能与影响肾小管对 Na^+ , K^+ , Cl^- 的重吸收和分泌有关。

醛固酮是人体最为重要的盐皮质激素, 作用于远曲小管, 调节着人体的离子转运, 通过保钠排钾调

节水盐代谢。ALD 的前身为胆固醇,经过多步生化反应催化逐步合成具有盐活性的醛固酮。在体内,胆固醇经过碳链裂解酶、 3β -羟甾类脱氢酶、 21 -羟化酶以及醛固酮合成酶催化,由孕烯醇酮、黄体酮生成皮质酮,在 CYP11B2 的催化下最后生成醛固酮^[7]。其合成过程受到皮质酮含量及合成酶活性的影响,孕烯醇酮转化生成 ALD 的过程中,首先有赖于皮质酮的生成,皮质酮为盐皮质激素,具有类似醛固酮的作用,主要作用部位在肾脏,具有较强调节水盐代谢的作用,可促进肾远曲小管及集合管对 Na^+ 的重吸收和 K^+ 的排泄。此激素依靠具有 11β -羟化酶、 18 位羟化酶、 18 位氧化酶活性的 CYP11B2 催化经过三步连续反应才能最终生成 ALD^[8]。因此,皮质酮含量的升高及 CYP11B2 基因表达的上调均可使 ALD 合成增多。醛固酮在体内合成涉及两个重要基因: CYP11B1、CYP11B2,分别调控其早期与终末阶段,其中 CYP11B2 基因被认为是醛固酮合成的真正标志基因^[9]。醛固酮合成酶是催化醛固酮生物合成过程中的一个关键酶,醛固酮合成数量的增加,一方面源于 CYP11B2 活性的增强;另一方面也可能源于启动 CYP11B2 基因表达的因素增加,其表达量以及活性的差异直接影响体内醛固酮水平^[10-11]。在水液代谢调节方面,醛固酮通过影响钠通道的钠吸收及 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶的功能等方面,通过基因及非基因组作用的综合调节发挥保钠排钾作用。其含量升高,可促进钠重吸收,同时伴有水的重吸收增加,尿量也相应减少,因此,体内醛固酮水平的异常可直接影响机体水液代谢功能。本实验研究发现,腺嘌呤组大鼠血中 Cort, ALD 明显减少, Cort 为盐皮质激素,除本身具有类似 ALD 的功能外,还可通过 CYP11B2 的催化合成 ALD,为 ALD 合成的重要前体物质,当皮质酮含量下降时,相应地会引起 ALD 的合成减少。CYP11B2 编码蛋白为醛固酮合成酶,其为催化 ALD 合成的标志性酶, CYP11B2 mRNA 表达的变化,可以体现出 ALD 的合成情况。在实验研究过程中,腺嘌呤组大鼠出现肾脏 CYP11B2 基因表达的明显下调,表明使用腺嘌呤后, CYP11B2 编码合成酶发挥酶活性经过连续反应催化皮质酮合成 ALD 的功能可能会受到影响,因而也可导致 ALD 的合成

减少;而 ALD 是调节水液代谢的重要盐皮质激素,具有保钠保水作用,其合成功能受到影响时会导致血中的含量下降,从而引起多尿病症的发生。由此可见,腺嘌呤引起的“多尿”与醛固酮合成酶途径有关,其机制可能在于下调肾脏 CYP11B2 基因的表达,导致 ALD 合成障碍,因而水液代谢出现异常。

[参考文献]

- [1] 邵命海,肖 静,王毅兴,等.从“肾主生殖”角度评价腺嘌呤与氢化可的松诱导的肾阳虚模型[J].上海中医药杂志,2008,(2):57.
- [2] 张秀珍.内分泌代谢疾病与肾脏[M].上海:复旦大学出版社,2004:25.
- [3] 李淑梅,吴平生,钟世顺,等.ACEI 及 AT II RA 长期治疗对高血压鼠肾醛固酮合成影响[J].实用老年医学,2004,18(2):75.
- [4] 王 蕾,姚东云,马红梅,等.中药利尿药理实验动物筛选方法探讨[J].中国比较医学杂志,2006,11(11):694.
- [5] 陈光亮,徐叔云.高尿酸血症动物模型研究进展[J].中国药理学通报,2004,20(4):369.
- [6] 王海燕.肾脏病学[M].北京:人民卫生出版社,1996:967.
- [7] 骆杰伟,陈 慧,林慧中.醛固酮合成酶、血管紧张素转换酶基因多态性及环境因素与高血压病中风先兆证的关系[J].中华中医药杂志,2008,23(3):218.
- [8] 吴永全,王学东,方 宏.血管紧张素 II 受体 1、醛固酮合成酶与房颤心房结构重构的关系[J].中华医学杂志,2007,87(32):2281.
- [9] Hu JG, Igarashi A, Kamata M, Nakagawa H. Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer Amyloid-Peptide (A); rerards A aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001,276(51): 47863.
- [10] Schmidt EMW, Georgens AC, Martin N, et al. Interaction of rapid nongenomic cardiovascular aldosterone effects with the adrenergic system [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86: 761.
- [11] Xiao F, Puddefont JR, Vinson GP. Aldosterone mediates angiotensin II stimulated rat vasculature smooth muscle cell proliferation[J]. J Endocrinol, 2000, 165: 533.