

## 复肾功方对慢性肾衰竭大鼠 ACE-Ang II -AT1R 及 ACE2-Ang(1-7)-MASR 轴“调控-拮抗”作用的影响

徐珂, 黄学宽\*, 沈清, 张洋, 罗洪玉, 田珈瑜, 邹波, 杨琴, 侯科名  
(重庆医科大学中医药学院, 附属第一医院, 重庆 400016)

**[摘要]** 目的:研究复肾功方对腺嘌呤诱导的慢性肾衰竭(CRF)大鼠血管紧张素转化酶-血管紧张素 II-血管紧张素 II 1 型受体(ACE-Ang II -AT1R)轴与血管紧张素转化酶2-血管紧张素(1-7)-Mas 受体[ACE2-Ang(1-7)-MASR]轴的“调控-拮抗”作用,探讨其延缓 CRF 进展的作用机制。方法:将 65 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组 10 只、造模组 55 只,正常组常规饲养,造模组进行为期 28 d 的 0.25 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 腺嘌呤混悬液灌胃。模型建立后,将存活造模大鼠随机分为模型组,贝那普利组(0.01 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),复肾功方低、中、高剂量(4, 8, 16 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组,正常组和模型组以等体积生理盐水灌胃,持续 28 d。实验结束后,测量各组大鼠尾静脉舒张压(SBP),收缩压(DBP),并收集 24 h 尿液以测定 24 h 尿蛋白(24 h U-pro);测定血清中肌酐(SCr),尿素氮(BUN)含量;苏木素-伊红(HE)染色观察肾组织形态;马松(Masson)染色观察肾间质纤维化程度;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清和肾组织匀浆中 Ang II, Ang(1-7)及血清中胱抑素 C(CysC)的含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肾组织中 ACE, ACE2, AT1R, MASR 蛋白表达水平;免疫组化标记肾组织中 ACE, ACE2 蛋白的表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠血清 SCr, BUN, CysC 明显上升( $P < 0.05$ ),血清与肾组织中的 Ang II 含量明显增加, Ang(1-7)含量明显减少( $P < 0.05$ ),肾组织中 ACE, AT1R 蛋白表达量明显升高( $P < 0.05$ ), ACE2, MASR 蛋白表达量明显降低( $P < 0.05$ );与模型组、贝那普利组比较,经复肾功方干预治疗后,大鼠血清 SCr, BUN, CysC 含量明显下降( $P < 0.05$ ),血清与肾组织中的 Ang II 含量显著减少, Ang(1-7)含量明显增加( $P < 0.05$ ),肾组织中 ACE, AT1R 蛋白表达量显著降低, ACE2, MASR 蛋白表达量明显升高( $P < 0.05$ ),其中复肾功方高剂量效果最佳,复肾功方高、中、低剂量的效果呈剂量相关性。结论:复肾功方可改善腺嘌呤所致 CRF 大鼠肾功能和肾脏的病理学改变,其机制可能与通过抑制 ACE-Ang II -AT1R 轴,同时促进 ACE2-Ang(1-7)-MASR 轴来延缓 CRF 的进展有关。

**[关键词]** 复肾功方;慢性肾衰竭;血管紧张素转化酶(ACE)-血管紧张素 II (Ang II)-Ang II 1 型受体(AT1R)轴;血管紧张素转化酶2(ACE2)-血管紧张素(1-7)[Ang(1-7)]-Mas 受体(MASR)轴;调控-拮抗作用

**[中图分类号]** R2-0;R289;R256.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)05-0062-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20210544

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210115.0854.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-1-15 15:38

### Effect of Fushengong Prescription on Regulation-antagonism Effect of ACE-Ang II -AT1R Axis and ACE2-Ang(1-7)-MASR Axis of Rats with Chronic Renal Failure

XU Ke, HUANG Xue-kuan\*, SHEN Qing, ZHANG Yang, LUO Hong-yu, TIAN Jia-yu, ZOU Bo, YANG Qin, HOU Ke-ming  
(College of Traditional Chinese Medicine, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Fushengong prescription on the regulation-antagonism effect of angiotensin converting enzyme-angiotensin II -angiotensin II 1 receptor (ACE-Ang II -AT1R) axis and

**[收稿日期]** 20200819(012)

**[基金项目]** 重庆市卫生和计划生育委员会、重庆市科学技术委员会联合项目(ZY201802149);重庆市技术创新与应用发展专项面上项目(cstc2019jscx-msxmX0119)

**[第一作者]** 徐珂,在读硕士,从事肾病中医基础与临床研究,E-mail:xukegm5@163.com

**[通信作者]** \*黄学宽,教授,博士生导师,从事内分泌代谢疾病及肾病中医理论与临床研究,E-mail:xkhuang2002@cqmu.edu.cn

angiotensin converting enzyme 2-angiotensin (1-7)-Mas receptor [ACE2-Ang(1-7)-MASR] axis of rats with chronic renal failure(CRF), and to explore its mechanism of delaying the development of CRF. **Method:** The 65 male SD rats were randomly divided into normal group ( $n=10$ ) and modeling group ( $n=55$ ). The normal group was routinely reared, while the modeling group were administered by gavage with  $0.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  adenine suspension for 28 days. After the model was successfully established, the survival model rats were randomly divided into model group, benazepril group ( $0.01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and low, medium and high dose of Fushengong prescription groups ( $4, 8, 16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). The normal group and model group were administered the same volume of normal saline by gavage, lasted for 28 days. After the experiment, systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) of caudal artery were measured, and 24-hour urine was collected to determine 24-hour urine protein (24 h U-pro). The content of serum creatinine(SCr) and blood urea nitrogen (BUN) in the serum were measured, the histological morphology was observed by hematoxylin eosin(HE) staining, and the degree of renal interstitial fibrosis was observed by Masson staining. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the contents of Ang II, Ang(1-7) and Cystatin C (CysC) in serum and renal homogenate. The protein level of ACE, ACE2, AT1R and MASR were detected by Western blot. The expression of ACE and ACE2 protein in renal tissues were detected by immunohistochemistry. **Result:** Compared with normal group, the expression levels of SCr, BUN and CysC in model group were significantly increased ( $P<0.05$ ), the content of Ang II in serum and kidney tissues were significantly increased, the content of Ang(1-7) were significantly decreased ( $P<0.05$ ), the expression of ACE and AT1R protein in renal tissues were significantly increased ( $P<0.05$ ), and the expression of ACE2 and MASR protein were significantly decreased ( $P<0.05$ ). Compared with model group and benazepril group, after the intervention with Fushengong prescription, the serum SCr, BUN and CysC decreased ( $P<0.05$ ), the content of Ang II in serum and kidney tissues decreased significantly, Ang(1-7) increased significantly ( $P<0.05$ ), the expression of ACE and AT1R protein in renal tissues decreased significantly ( $P<0.05$ ), ACE2 and MASR protein increased significantly ( $P<0.05$ ). The high-dose Fushengong prescription has the best effect. The high, medium and low-dose effects of Fushengong prescription were dose-dependent. **Conclusion:** Fushengong prescription improved renal function and pathological change of kidney in adenine-induced rats with chronic renal failure. The mechanism may be related to the inhibition of ACE-Ang II-AT1R axis and promotion of ACE2-Ang(1-7)-MASR axis, which leads to the delaying of the progression of chronic renal failure.

**[Key words]** Fushengong prescription; chronic renal failure; angiotensin converting enzyme(ACE)-angiotensin II (Ang II)-angiotensin II 1 receptor (AT1R) axis; angiotensin converting enzyme 2(ACE2)-angiotensin (1-7)[Ang-(1-7)]-Mas receptor (MASR) axis; regulation-antagonism effect

慢性肾衰竭(CRF)是多种因素导致肾功能持续损伤,发展为肾脏各功能减退直至完全丧失的一类临床综合征。由于肥胖、糖尿病和高血压等疾病患病率上升,导致慢性肾脏病(CKD)和终末期肾病的患病率呈现出惊人的态势增长,增加了其总体发病率及死亡率<sup>[1]</sup>。有研究证明,肾素-血管紧张素系统(RAS)中血管紧张素转化酶-血管紧张素 II-血管紧张素 II 1型受体(ACE-Ang II-AT1R)轴通过多种途径(如纤维化途径、炎症途径)促进了CRF的发生和发展<sup>[2]</sup>;最新研究表明,RAS系统中的另一条血管紧张素转化酶2-血管紧张素(1-7)-Mas受体轴[ACE2-Ang(1-7)-MASR]轴对ACE-Ang II-AT1R轴有反向

调节作用<sup>[3]</sup>,进而减缓CRF的发展进程。中医药治疗CRF,其延缓肾纤维化等方面具有巨大潜力<sup>[4]</sup>。复肾功方由著名中医学家、首届国医大师郭子光教授根据《小儿药证直诀》所载六味地黄丸化裁而成,治疗CRF早中期确有疗效,一直为本课题组研究的重点。经基于同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)蛋白质组学研究显示,腺嘌呤造模可显著上调血管紧张素原蛋白表达,而经复肾功方干预后可使之显著下降<sup>[5]</sup>。前期研究发现,复肾功方对CRF大鼠肾脏 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)<sup>[6]</sup>,nephrin蛋白<sup>[7]</sup>具有调控作用,而这两种因子也参与了ACE-Ang II-AT1R轴介导的CRF的发病机制<sup>[8-9]</sup>。

故本实验从 ACE-Ang II -AT1R 轴与 ACE2-Ang(1-7)-MASR 轴的“调控-拮抗”作用来探讨复肾功方治疗 CRF 的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级雄性健康 SD 大鼠 65 只, 体质量 (180±20) g, 合格证号 SCXK(渝)2018-0003, 动物使用许可证号 SYXK(渝)2018-0003, 由重庆医科大学实验动物中心提供。动物实验经重庆医科大学实验动物伦理委员会批准(批准号 CMU2018-016)。

**1.2 试剂** 复肾功方由生黄芪 50 g, 水蛭 10 g, 生地 15 g, 山药 20 g, 山茱萸 15 g, 牡丹皮 15 g, 茯苓 20 g, 车前子 15 g, 黄柏 15 g, 苍术 15 g, 牛膝 15 g, 杜仲 15 g 组成, 所有药材购自重庆桐君阁股份有限公司, 并由重庆医科大学黄学宽教授鉴定为正品。将药材冷水浸泡 30 min, 置于煎药砂锅内, 武火煮沸后文火煎 30 min 共煎 3 次, 合并 3 次药汁, 浓缩至含生药质量浓度 1 g·mL<sup>-1</sup> 的水煎剂, 4 °C 冰箱保存。腺嘌呤(北京索莱宝科技有限公司, 批号 5131055); 盐酸贝纳普利片(北京诺华制药有限公司, 国药准字 H20030514); 大鼠胱抑素 C(CysC), Ang II, Ang(1-7) 酶联免疫吸附测定(ELISA) 试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司, 批号分别为 JIM-01845R1, JIM-01618R1, JIM-02020R1); 兔抗 ACE, AT1R, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(武汉三鹰生物技术有限公司, 批号 24743-I-AP, 25343-I-AP, 10494-I-AP); 兔抗 ACE2(英国 Abcam 公司, 批号 ab108252); 兔抗 MASR(美国 Novus 公司, 批号 NBP1-78444); 山羊抗兔二抗(美国 Earthox 公司, 批号 E030120-01); SDS-PAGE, BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司, 批号分别为 P0012A, P0010S); 超敏化学发光底物(北京四正柏生物科技有限公司, 批号 4AW011-100); 血肌酐(SCr) 试剂盒, 尿素氮(BUN) 试剂盒, 尿蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20191224, 20191225, 20191224); 苏木素染液, 伊红染液, 马松(Masson) 染液(武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号分别为 G1005-1, G1005-2, G1006); 兔免疫球蛋白(Ig) G(博士德生物工程有限公司, 批号 SA1020)。

**1.3 仪器** BP-2000 型大鼠无创血压计(美国 Visitech Systems 公司); iCEN-24R 型高速冷冻离心机(杭州奥盛仪器有限公司); BBX24B 型组织研磨仪, Odyssey FC 型双色红外荧光成像系统, Synergy HTX 型多功能酶标仪(中国香港基因有限公司);

DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂); Eclipse E100 型正置光学显微镜, DS-U3 成像系统(日本尼康公司); Nano Drop2000 型超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); AL204 型电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); FBZ2001-up-p 型标准试剂型纯水仪(山东青岛富勒姆公司)。

## 2 方法

**2.1 动物造模及给药** 65 只 SPF 级雄性健康 SD 大鼠, 饲养环境为 25 °C 恒温, 相对湿度 (40±10)%, 正常饮食适应性饲养 1 周后采用随机数表法随机抽取 10 只大鼠为正常组, 每日上午等量生理盐水灌胃, 另外 55 只大鼠进行腺嘌呤造模, 每日同一时段按 0.25 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 灌胃腺嘌呤混悬液(现配), 持续 28 d。造模结束后随机抽取 5 只模型大鼠和 5 只正常大鼠进行血尿生化指标检测。与正常大鼠比较, 造模大鼠血 SCr, BUN, 24 h 尿蛋白(24 h U-pro) 显著升高, 并随机抽取 2 只造模大鼠, 处死并取出肾脏进行苏木素-伊红(HE) 染色与 Masson 染色观察其组织形态, 发现肾组织纤维化程度较重, 提示造模成功。造模第 4 周因造模药物导致大鼠死亡 3 只, 造模成功的 CRF 大鼠共计 50 只, 按简单随机抽样法分为模型组, 贝那普利组, 复肾功方低、中、高剂量组, 每组 10 只。按人与大鼠体表面积法换算得出 8 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 为复肾功方中剂量组, 按两倍比例增减得出大鼠低、高剂量组给药剂量分别为 4, 16 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 复肾功方低、中、高剂量组分别为人等效剂量的 0.5, 1, 2 倍<sup>[10]</sup>。每日上午分别以相应剂量水煎剂进行灌胃, 正常组及模型组给予等体积生理盐水, 贝那普利组以 0.01 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 贝那普利混悬液灌胃, 持续 28 d。

**2.2 大鼠血压检测** 灌胃 28 d 后, 使用 BP-2000 大鼠无创血压计检测大鼠尾静脉血压。为保证数据稳定准确, 先进行为期 3 d 的适应性检测, 正式检测时每只大鼠检测 20 次, 取后 10 次结果计算平均值。

**2.3 标本采集** 实验结束后进行标本采集, 所有大鼠禁水不禁食 12 h, 以 20% 乌拉坦 5 mL·kg<sup>-1</sup> 麻醉, 心脏采血 3~5 mL, 静置 1~2 h, 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min(离心半径 8 cm), 分离血清, 取上清液, 4 °C 保存以备检测用。颈椎脱臼处死大鼠, 打开腹腔取出肾组织, 对左肾肾组织沿矢状面对半切, 得到蚕豆状横截面的肾组织, 10% 磷酸盐缓冲液(PBS) 冲洗, 置于 4% 多聚甲醛中待石蜡包埋。其余肾组织装入冻存管置于 -80 °C 冰箱待用。

## 2.4 指标检测

**2.4.1 大鼠 SCr, BUN, 24 h U-pro 及 CysC 含量测**

定 给药 28 d 后,用代谢笼收集大鼠 24 h 尿液,记录尿量,尿液 3 500 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上清液,使用 SCr, BUN, 尿蛋白试剂盒分别检测血清中的 SCr, BUN 含量及尿液中尿蛋白含量,并计算出 24 h U-pro。用 ELISA 试剂盒检测血清中 CysC 的含量。

**2.4.2 ELISA 测定大鼠血清及肾组织中 Ang II, Ang(1-7)含量** 将-80 °C 冻存肾组织取出,切割并称取肾组织 1 g,加入生理盐水 9 mL,眼科小剪尽快剪碎组织,匀浆器 15 000 r·min<sup>-1</sup>离心 20 min,后 2 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min,取上清液。运用 ELISA 试剂盒测定大鼠血清及肾组织 Ang II, Ang(1-7)的含量,实验步骤按照说明书进行。

**2.4.3 免疫组化检测大鼠肾脏 ACE, ACE2 的表达**

取适量蚕豆状切面的肾组织,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,梯度乙醇脱蜡至水化,浸泡于枸橼酸缓冲液 20~30 min,冷却至室温,5%BSA 封闭液孵育 30 min,滴加一抗 37 °C 反应 1 h,冲洗,二抗室温下 30 min,冲洗,滴加 SABC 37 °C 孵育 30 min,冲洗,DAB 染色后重染,脱水透明;显微镜观察,棕黄色为阳性染色。

**2.4.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾脏 ACE, AT1R, ACE2, MASR 蛋白表达** 每组剪取肾组织约 30 mg 加入 RIPA 细胞裂解液 1 mL 进行裂解。12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,收集上清液,使用 BCA 法进行总蛋白定量,配置 10%SDS-PAG 凝胶,70 V 转 100 V 电泳,300 mA 转模,5%脱脂奶粉-TBST 缓冲液进行膜的封闭处理,一抗 4 °C 孵育过夜(ACE 1:1 000, AT1R 1:1 000, ACE2 1:1 000, MASR 1:1 000, GAPDH 1:5 000);PBST 洗脱 3 次,加入山羊抗兔二抗(1:1 万),室温孵育 2 h。放入洗涤液中,摇床洗涤每 10 min 换液 1 次,共洗涤 3 次。使用超敏化学发光底物显影,采用 Image J 软件进行

胶片条带分析,计算目的蛋白灰度值与 GAPDH 灰度值的比值即为目的蛋白相对表达量。

**2.5 统计学处理** 采用 SPSS 20.0 软件进行分析,实验数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,在检验数据正态分布及方差齐性的条件下,多组间数据比较采用方差分析,各组组间差异比较用最小显著性差异法(LSD)-*t* 检验。 $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 CRF 大鼠尾静脉血压的影响** 与正常组比较,模型组大鼠尾静脉收缩压(SBP),舒张压(DBP)均明显升高( $P<0.05$ );与模型组比较,各给药组 SBP 明显降低( $P<0.05$ ),贝那普利组及复肾功高、中剂量组 DBP 明显降低( $P<0.05$ )。复肾功方高剂量组与贝那普利组比较,差异无统计学意义。见表 1。

表 1 复肾功方对 CRF 大鼠尾静脉 SBP, DBP 的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )  
Table 1 Effect of Fushengong prescription on SBP and DBP of caudal artery of CRF rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ ) mmHg

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	SBP	DBP
正常		131.47±11.47	53.48±8.08
模型		198.43±11.97 <sup>1)</sup>	97.61±16.04 <sup>1)</sup>
贝那普利	0.01	150.52±11.70 <sup>2)</sup>	70.23±10.71 <sup>2)</sup>
复肾功方	4	182.92±12.73 <sup>3)</sup>	82.23±14.50
	8	170.51±8.73 <sup>2,3)</sup>	75.23±10.86 <sup>2)</sup>
	16	162.62±9.19 <sup>2,4,5)</sup>	72.46±7.99 <sup>2)</sup>

注:1 mmHg=0.133 kPa;与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ;与贝那普利组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ;与复肾功方低剂量组比较<sup>4)</sup> $P<0.05$ ;与复肾功方中剂量组比较<sup>5)</sup> $P<0.05$ (表 2~5 同)。

**3.2 对 CRF 大鼠 SCr, BUN, 24 h U-pro 及 CysC 水平的影响** 与正常组比较,模型组大鼠 SCr, BUN, 24 h U-pro 及 CysC 水平明显升高( $P<0.05$ );与模型组比较,所有给药组大鼠 SCr, BUN, 24 h U-pro 及 CysC 水平明显降低( $P<0.05$ );复肾功方高剂量组与贝那普利组比较,差异无统计学意义。见表 2。

表 2 复肾功方对 CRF 大鼠 SCr, BUN, 24 h U-pro 及 CysC 含量的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of Fushengong prescription on content of SCr, BUN, 24 h U-pro, CysC of CRF rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	SCr/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h U-pro/mg	CysC/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
正常		58.38±6.46	5.22±0.46	6.14±1.20	134.77±34.73
模型		371.42±41.88 <sup>1)</sup>	25.41±3.73 <sup>1)</sup>	14.53±2.67 <sup>1)</sup>	537.66±81.38 <sup>1)</sup>
贝那普利	0.01	121.45±25.08 <sup>2)</sup>	15.53±1.35 <sup>2)</sup>	8.54±1.45 <sup>2)</sup>	230.06±32.84 <sup>2)</sup>
复肾功方	4	197.00±16.24 <sup>2,3)</sup>	17.10±2.20 <sup>2)</sup>	12.17±1.19 <sup>2,3)</sup>	324.88±28.19 <sup>2,3)</sup>
	8	185.64±43.93 <sup>2,3)</sup>	16.06±3.18 <sup>2)</sup>	9.57±1.10 <sup>2,4)</sup>	321.18±48.52 <sup>2,3)</sup>
	16	120.54±44.36 <sup>2,4,5)</sup>	11.08±3.02 <sup>2,4,5)</sup>	8.29±1.33 <sup>2,4)</sup>	273.26±40.72 <sup>2)</sup>

**3.3 对 CRF 大鼠血清及肾组织中 Ang II, Ang(1-7) 水平的影响** 与正常组比较,模型组大鼠血清、肾

组织匀浆中 Ang II 水平明显增加,Ang(1-7)水平明显减少( $P<0.05$ );与模型组比较,贝那普利组及复肾

功方中、高剂量组大鼠血清中 Ang II 水平明显减少,各给药组大鼠肾脏中 Ang II 明显减少 ( $P<0.05$ );与模型组比较,各给药组大鼠血清中 Ang(1-7)水平减

少不明显,Ang(1-7)的水平明显增加 ( $P<0.05$ ),复肾功高剂量组与贝那普利组比较,差异无统计学意义。见表3。

表3 复肾功方对 CRF 大鼠血清,肾组织中 Ang II, Ang(1-7)含量的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

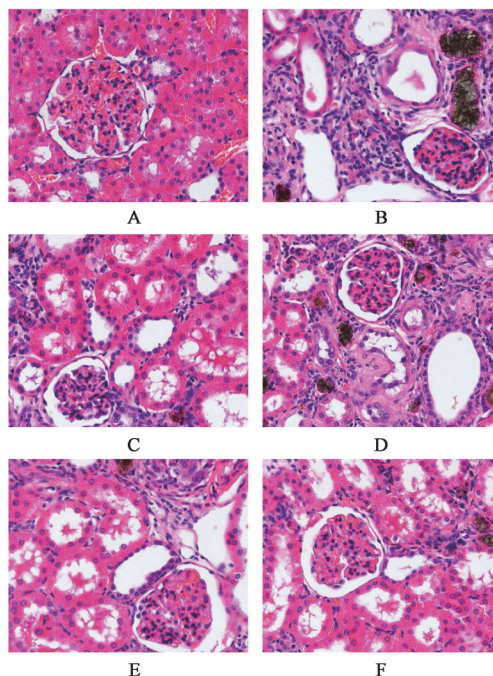
Table 3 Effect of Fushengong prescription on content of Ang II, Ang(1-7) of CRF rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	血清 Ang II/ng·L <sup>-1</sup>	血清 Ang(1-7)/ng·L <sup>-1</sup>	肾组织 Ang II/ng·g <sup>-1</sup>	肾组织 Ang(1-7)/ng·g <sup>-1</sup>
正常		130.14±31.95	250.91±41.19	1.10±0.31	1.21±0.10
模型		307.79±23.42 <sup>1)</sup>	167.51±38.46 <sup>1)</sup>	3.15±0.39 <sup>1)</sup>	0.38±0.10 <sup>1)</sup>
贝那普利	0.01	228.90±12.52 <sup>2)</sup>	228.73±58.71 <sup>2)</sup>	1.35±0.34 <sup>2)</sup>	0.61±0.12 <sup>2)</sup>
复肾功方	4	281.53±23.64 <sup>3)</sup>	185.44±39.77	2.44±0.12 <sup>2,3)</sup>	0.88±0.05 <sup>2,3)</sup>
	8	253.06±22.72 <sup>2)</sup>	200.40±47.11 <sup>2)</sup>	2.19±0.36 <sup>2,3)</sup>	0.85±0.08 <sup>2,3)</sup>
	16	230.47±56.47 <sup>2,4)</sup>	230.98±50.60 <sup>2)</sup>	1.63±0.27 <sup>2,4,5)</sup>	0.71±0.07 <sup>2,4,5)</sup>

3.4 对 CRF 大鼠肾组织形态学的影响 HE 染色结果显示,正常组大鼠肾小球、肾小管紧密排列,形态结构正常,肾间质比例正常,炎症细胞浸润几不可见;模型组大鼠肾小管无规律扩张、萎缩,肾间质可见大量炎症细胞浸润,上皮细胞变性、坏死,异状间质纤维增生,肾小管及肾间质存在大量腺嘌呤结晶;药物干预后,各给药组大鼠炎症细胞浸润减少,肾小管好转趋于正常,腺嘌呤结晶减少,以复肾功方高剂量组和贝那普利组改善更为明显,见图1。Masson 染色结果显示,正常组大鼠仅有微量胶原沉积;模型组大鼠有大量胶原沉积于肾间质;各给药组大鼠胶原沉积量较模型组显著减少,其中以复肾功方高剂量组和贝那普利组改善更为明显。见图2。

3.5 对 CRF 大鼠肾组织 ACE, ACE2 表达的影响 免疫组化结果显示,正常组大鼠肾小球和肾小管上皮细胞呈现 ACE 的弱阳性表达,ACE2 较大面积的强阳性表达,模型组大鼠肾小管上皮细胞呈现 ACE 强阳性表达,ACE2 微弱阳性表达;与模型组比较,各给药组大鼠肾小管上皮细胞 ACE 阳性表达减弱,ACE2 阳性表达增强。见图3,4。

3.6 对 CRF 大鼠肾组织 ACE, ACE2, AT1R, MASR 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾组织 ACE, AT1R 蛋白表达明显升高 ( $P<0.05$ );与模型组比较,各给药组大鼠肾组织 ACE, AT1R 蛋白表达均明显降低 ( $P<0.05$ )。与正常组比较,模型组大鼠肾组织 ACE2, MASR 蛋白表达明显降低 ( $P<0.05$ );与模型组比较,各给药组大鼠肾组织 ACE2, MASR 蛋白表达均明显升高 ( $P<0.05$ ),贝那普利组和复肾功方高剂量组改善更为显著,且两组之间比较,差异无统计学意义。见图5,表4。



A. 正常组; B. 模型组; C. 贝那普利组; D. 复肾功方低剂量组; E. 复肾功方中剂量组; F. 复肾功方高剂量组(图2~5同)

图1 复肾功方对 CRF 大鼠肾组织形态学的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Fushengong prescription on morphology of renal tissues in CRF rats (HE, ×400)

#### 4 讨论

CRF 是各种慢性肾脏病逐渐进展的结果,延缓病情发展,保护肾功能是治疗的重点和目的。临床研究表明中医药在 CRF 的治疗中广泛应用,疗效得到广大患者肯定。CRF 属中医“腰痛”“水肿”“虚劳”“癃闭”“溺毒”等范畴<sup>[11]</sup>,而目前中医对 CRF 的辨证分型尚无统一标准,用药治法也各具特色<sup>[12]</sup>。复肾功方由生黄芪、水蛭、生地黄、山药、山茱萸、牡丹皮、茯苓、车前子、黄柏、苍术、牛膝、杜仲等组成,其中生地黄、山药、山茱萸滋补肝肾之精,加牛膝、

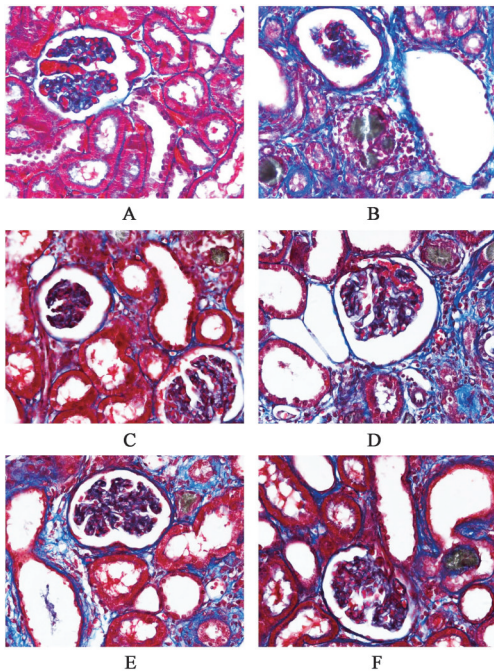


图2 复肾功方对CRF大鼠肾组织形态学的影响(Masson,×400)  
Fig. 2 Effect of Fushengong prescription on morphology of renal tissues in CRF rats (Masson,×400)

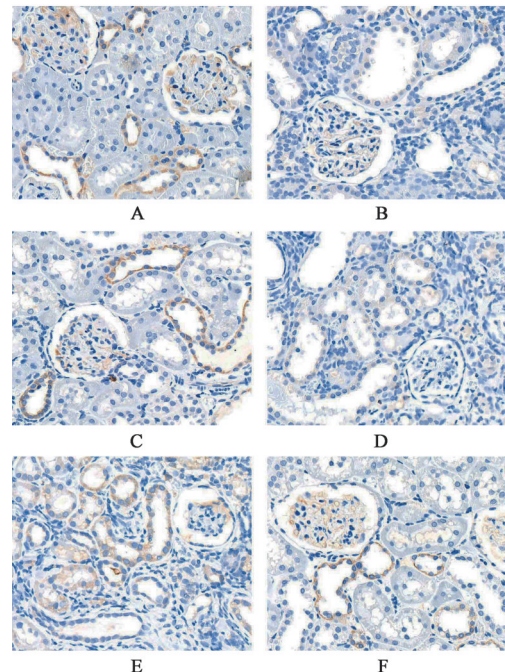


图4 复肾功方对CRF大鼠肾组织ACE2蛋白表达的影响(免疫组化,×400)  
Fig. 4 Effect of Fushengong prescription on ACE2 protein of renal tissues in CRF rats (IHC,×400)

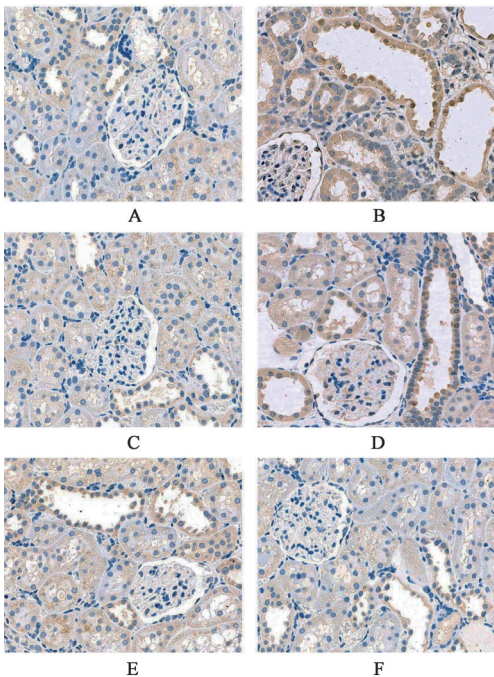


图3 复肾功方对CRF大鼠肾组织ACE蛋白表达的影响(免疫组化,×400)  
Fig. 3 Effect of Fushengong prescription on ACE protein of renal tissues in CRF rats (IHC,×400)

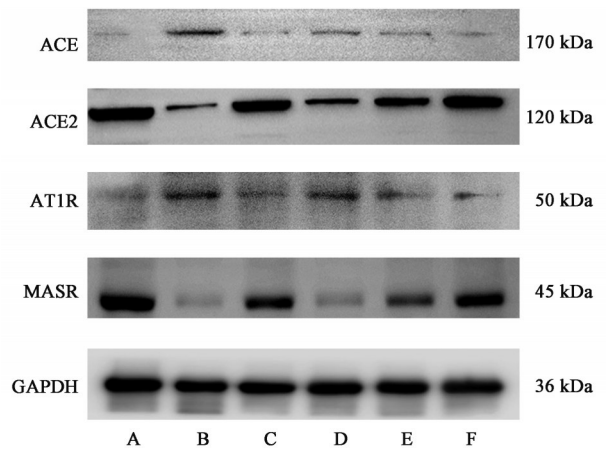


图5 各组大鼠肾组织中ACE,ACE2,AT1R,MASR蛋白表达电泳  
Fig. 5 Electrophoresis of protein expression of ACE, ACE2, AT1R, MASR in renal tissues of each group rats

杜仲可增强补肾之效,而水蛭、车前子、黄柏、牡丹皮等具有下行通瘀兼祛湿热之功,黄芪、茯苓、苍术补气健脾除湿,升清降浊,同时兼防补益之品过于滋腻之弊。现代药理研究证实,本方所含之多数药

味均具有抗肾间质纤维化、改善肾功能等作用,如黄芪、水蛭等能诱导大鼠肾小球系膜细胞凋亡<sup>[13]</sup>,茯苓所含茯苓多糖可通过调控p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)/过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )信号通路来保护db/db小鼠的肾脏<sup>[14]</sup>,增强2型糖尿病小鼠肾脏抗氧化能力<sup>[15]</sup>,车前子所含木脂素和黄酮类化合物通过抑制芳香烃受体(AhR)信号通路则可延缓肾纤维化<sup>[16]</sup>等。而黄芪所含芒柄花黄素能抑制ACE的表达,并促进ACE2表达,从而对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)具有保护作用

表4 复肾功方对各组大鼠肾组织ACE,ACE2,AT1R,MASR蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of Fushengong prescription on ACE,ACE2,AT1R,MASR protein of renal tissues in CRF rats ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ACE/GAPDH	ACE2/GAPDH	AT1R/GAPDH	MASR/GAPDH
正常		0.55±0.023	0.73±0.066	0.43±0.029	0.82±0.088
模型		0.83±0.078 <sup>1)</sup>	0.20±0.019 <sup>1)</sup>	1.19±0.019 <sup>1)</sup>	0.32±0.169 <sup>1)</sup>
贝那普利	0.01	0.62±0.197 <sup>2)</sup>	0.71±0.071 <sup>2)</sup>	0.49±0.071 <sup>2)</sup>	0.51±0.148 <sup>2)</sup>
复肾功方	4	0.72±0.029 <sup>2,3)</sup>	0.36±0.054 <sup>2,3)</sup>	0.80±0.054 <sup>2,3)</sup>	0.38±0.135 <sup>2,3)</sup>
	8	0.70±0.073 <sup>2,3)</sup>	0.52±0.056 <sup>2,3,4)</sup>	0.69±0.056 <sup>2,3,4)</sup>	0.49±0.139 <sup>2,4)</sup>
	16	0.65±0.072 <sup>2,4,5)</sup>	0.64±0.115 <sup>2,4,5)</sup>	0.49±0.115 <sup>2,4,5)</sup>	0.54±0.127 <sup>2,4,5)</sup>

用<sup>[17]</sup>;水蛭所含水蛭素可通过调节细胞外调节激酶1/2(ERK1/2)途径抑制Ang II诱导的心肌成纤维细胞纤维化<sup>[18]</sup>;黄柏所含小檗碱能抑制Ang II诱导的血管平滑肌细胞(VSMC)的增殖<sup>[19]</sup>等。总之,全方位针对慢性肾衰竭多为肾虚夹湿浊瘀滞之基本病机,具有补肾活血降浊之功,适用于CRF早、中期治疗。

本实验显示CRF造模大鼠血压显著升高,而给药干预后其血压明显降低,提示药物干预改善了腺嘌呤诱导的CRF对RAS系统产生的影响。ACE-Ang II-AT1R轴被认为通过激活血管收缩、炎症、纤维化、细胞生长和迁移等机制主导了RAS系统的激活,从而对肾脏疾病产生影响<sup>[20]</sup>。而血管紧张素原被肾素裂解生成血管紧张素I(Ang I),并被ACE转化为Ang II,Ang II最终产生两种受体,即AT1R和II型受体(AT2R),AT1R可调控内源性转化生长因子-β(TGF-β),促进TGF-β介导的细胞外基质(ECM)的积累<sup>[21]</sup>,同时还能上调许多促炎基因如肿瘤坏死因子-α(TNF-α)<sup>[22]</sup>,细胞间黏附分子-1(ICAM-1),白细胞介素-6(IL-6)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)等,通过激活多个细胞信号系统,包括核转录因子-κB(NF-κB),促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联,Rho蛋白和氧化还原途径,最终导致CRF的发生和发展。而ACE2可切割十肽Ang I产生无活性的肽Ang1-9,并通过ACE或其他肽酶转化为Ang(1-7),同时ACE2对Ang II的亲合力大于对Ang I的亲合力,可直接水解Ang II生成Ang(1-7)<sup>[23]</sup>。ACE2-Ang(1-7)-MASR轴可拮抗ACE-Ang II-AT1R轴,抑制TGF-β<sup>[24]</sup>,并增加抗炎性细胞因子IL-10的表达,降低促炎性细胞因子TNF-α,IL-1β的表达<sup>[25]</sup>,抑制氧化型低密度脂蛋白受体1(LOX-1)的表达<sup>[26]</sup>,具有利尿、抗氧化、舒张血管、抗增殖等作用,从而有利于修复肾脏的受损功能<sup>[27]</sup>。以往对RAS系统结合肾脏疾病的研究多集中于糖尿病肾病,且往往局限于RAS系统中单一轴或仅对RAS系

统中部分因子如ACE/ACE2的平衡调控机制进行探讨,而本实验在腺嘌呤诱导的CRF基础上,对RAS系统中的ACE-Ang II-AT1R轴与ACE2-Ang(1-7)-MASR轴之间的“调控-拮抗”效应及进行研究,则具有十分重要的意义。

本实验通过检测肾脏损伤指标(SCr, BUN, 24 h U-pro及CysC等)发现复肾功方能显著减轻肾功能衰退、纤维化的改变,从而改善造模肾脏的结构和功能特征。本实验ELISA, Western blot, 免疫组化结果显示,造模后大鼠肾脏中ACE, Ang II, AT1R蛋白含量及血清中Ang II蛋白含量明显上升,肾组织中ACE2, Ang(1-7), MASR蛋白含量及血清中Ang(1-7)蛋白含量明显下降,表明造模促进了ACE-Ang II-AT1R轴并抑制了ACE2-Ang(1-7)-MASR轴,而药物干预后两轴中关键蛋白均显示与造模相反趋势的改变,证明复肾功方有效改善了造模引起的ACE-Ang II-AT1R轴与ACE2-Ang(1-7)-MASR轴的异常变化。本实验采用贝那普利作为阳性药,该药为血管紧张素转化酶抑制剂,可直接抑制Ang II的生成,阻断ACE-Ang II-AT1R轴,研究表明,贝那普利对多种肾病所致肾损伤具有修复作用,目前已成为早中期CRF常用药物<sup>[28]</sup>。通过对比表明,复肾功方高剂量组治疗效果与贝那普利治疗效果接近,而复肾功方中、低剂量相对于高剂量效果稍逊,效果呈浓度相关性。

综上所述,复肾功方改善肾功能,减缓CRF的进展可能是通过对ACE-Ang II-AT1R轴与ACE2-Ang(1-7)-MASR轴产生“调控-拮抗”作用实现的,但由于中药的多靶点以及RAS系统复杂的上下游信号通路联系,其作用机制还有待今后进一步研究。

[参考文献]

- [1] RANI N P, YENTL H, FREDRIEKE D, et al. Chronic kidney disease and kidney health care status: the healthy life in Suriname (HeliSur) study[J]. Intern

- Emerg Med, 2019, 14(2):249-258.
- [ 2 ] 吉晶,何立群. 抗纤灵方对5/6肾切除大鼠肾纤维化及ACE-Ang II -AT1R轴的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1): 57-62.
- [ 3 ] IWAI M, HORIUCHI M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II -AT1 receptor axis vs ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis[J]. Hypertens Res, 2009, 32(7):533-536.
- [ 4 ] 谢帆,刘叶,凌鑫隆,等. 中医药治疗慢性肾病临床研究进展[J]. 新中医, 2019, 51(11):23-26.
- [ 5 ] YANG Y, WEI J, HUANG X, et al. iTRAQ-based proteomics of chronic renal failure rats after Fushengong prescription treatment reveals haptoglobin and alpha-1-antitrypsin as potential biomarkers [J]. eCAM, 2017, doi:10. 1155/2017/1480514.
- [ 6 ] 王玲,黄学宽,万磊,等. 复肾功方对慢性肾功能衰竭大鼠肾脏 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白表达的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21(1):33-37.
- [ 7 ] 王玲,黄学宽,万磊,等. 复肾功方对慢性肾功能衰竭大鼠肾脏nephin mRNA表达的影响[J]. 四川大学学报:医学版, 2016, 47(3):342-346.
- [ 8 ] PITCHAI B, RAMANATHAN S, NANJAIAN M, et al. A potential role of the renin-angiotensin-aldosterone system in epithelial-to-mesenchymal transition-induced renal abnormalities: mechanisms and therapeutic implications[J]. Pharmacol Res, 2019, 146: 104314.
- [ 9 ] LANGHAM R, KELLY D, COX A, et al. Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition [J]. Diabetologia, 2002, 45(11):1572-1576.
- [ 10 ] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9):1069-1072.
- [ 11 ] 赵彤,高继宁,柳思源. 高继宁教授经方治疗慢性肾衰经验总结[J]. 中国中医药现代远程教育, 2018, 16(2):74-75.
- [ 12 ] 王洋,高继宁,张敏继. 中医药治疗慢性肾衰竭研究进展[J]. 中国民间疗法, 2020, 28(1):93-95.
- [ 13 ] 姜梦真,任惠娟,徐蕾,等. 黄芪、水蛭有效成分对大鼠肾小球系膜细胞凋亡的影响[J]. 中成药, 2017, 39(5):902-906.
- [ 14 ] 李佳丹,周迪夷. 茯苓多糖对db/db小鼠肾脏保护作用及其对p38 MAPK/PPAR- $\gamma$ 信号通路的影响[J]. 中国中医药科技, 2019, 26(3):346-350.
- [ 15 ] 冯亚龙. 车前子拮抗芳烃受体介导的肾纤维化物质基础及作用机制研究[D]. 西安:西北大学, 2019.
- [ 16 ] 黄聪亮,郑佳俐,李凤林,等. 茯苓多糖对2型糖尿病小鼠肾组织抗氧化能力及Bax、Bcl-2蛋白表达影响[J]. 食品与生物技术学报, 2016, 35(1):82-88.
- [ 17 ] LI N, LI X, YU J. A12673 Formononetin of Radix astragali affects the expression of ACE/ACE2 in vascular endothelial cells [J]. J Hypertens, 2018, 36(42):60187.
- [ 18 ] YU C, WANG W, JIN X. Hirudin protects Ang II -induced myocardial fibroblasts fibrosis by inhibiting the extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) pathway [J]. Med Sci Monit, 2018, 24(24):6264-6272.
- [ 19 ] LEE S, LIM H J, PARK H Y, et al. Berberine inhibits rat vascular smooth muscle cell proliferation and migration *in vitro* and improves neointima formation after balloon injury *in vivo*. Berberine improves neointima formation in a rat model [J]. Atherosclerosis, 2006, 186(1):29-37.
- [ 20 ] SONOO M, YASYSHI O. ACE and ACE2 in kidney disease[J]. World J Nephrol, 2015, 4(1):74-82.
- [ 21 ] JI J, TAO P, HE L. Kangxianling decoction prevents renal fibrosis in rats with 5/6 nephrectomy and inhibits Ang II -induced ECM production in glomerular mesangial cells [J]. J Pharmacol Sci, 2019, 139(4):367-372.
- [ 22 ] MARTA R, MONICA R, OSCAR L, et al. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney[J]. Kidney Int Suppl, 2002, 62(82):12-22.
- [ 23 ] MARTA K, ELZBIETA K, JANUSZ S, et al. Modulating role of Ang1-7 in control of blood pressure and renal function in Ang II -infused hypertensive rats [J]. Am J Hypertens, 2018, 31(4):504-511.
- [ 24 ] CRISTINA S, MARTINS T. ACE inhibition, ACE2 and angiotensin-(1-7) axis in kidney and cardiac inflammation and fibrosis [J]. Pharmacol Res, 2016, 107:154-162.
- [ 25 ] MEHDI N, AZAM M. Renal vascular response to angiotensin 1-7 in rats: the role of Mas receptor [J]. Res Pharm Sci, 2018, 13(2):177-180.
- [ 26 ] WANG L, HU X, ZHANG W, et al. Angiotensin (1-7) ameliorates angiotensin II -induced inflammation by inhibiting LOX-1 expression [J]. Inflamm Res, 2013, 62(2):219-228.
- [ 27 ] KIM C, KIM I, BAE E, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates kidney injury due to obstructive nephropathy in rats [J]. PLoS One, 2015, 10(11):0142664.
- [ 28 ] ALDIGIER J, MEUR Y, BRUNEL P. Protection of renal function with ACE inhibitors: experience with benazepril [J]. Clin Drug Investig, 1998, 16(6):463-472.

[责任编辑 孙丛丛]