文章编号:1000-5404(2007)10-0941-04

论著

氯沙坦在AT2-R介导的肾血管性高血压大鼠肾脏保护功能中的作用

吕 慈,何凤慈 (第三军医大学科研部,重庆 400038)

提 要:目的 研究在肾血管性高血压的病理条件下氯沙坦对血管紧张素Ⅱ-2型受体(angiotensin Ⅱ type-2 receptors, AT2-R)介导的大鼠肾脏保护功能中的调节作用,并探讨其相关机制。**方法** 雄性SD大鼠采用Goldblatt方法复制2肾1夹实验性肾血管性高血压模型,分为假手术组和手术组,分别给予低、中、高剂量的氯沙坦处理。用药6周后检测肾脏功能,观察肾脏AT2-R表达,测定血浆和肾脏组织中血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, AngⅡ)的含量变化。**结果** 在肾血管性高血压大鼠的非缺血肾脏AT2-R表达上调($P<0.05$),氯沙坦不仅可升高血浆和肾脏中的AngⅡ含量($P<0.05$, $P<0.05$),还可促进高血压大鼠的尿钠排泄,保护肾脏功能,并且对肾脏AT2-R的表达有上调作用($P<0.05$)。**结论** 氯沙坦通过上调肾脏的AT2-R,介导促尿钠排泄效应,对肾血管性高血压大鼠肾脏起保护作用。

关键词:血管紧张素Ⅱ-2受体;肾血管性高血压;氯沙坦;肾脏功能;SD大鼠;血管紧张素Ⅱ
中图法分类号:R334.1;R544.14;R972.4 **文献标识码**:A

Role of losartan in AT2-R mediated renal protective effects in renovascular hypertension rat

LU Ci, HE Feng-ci (Division of Scientific Research Affairs, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role of losartan in AT2-R mediated renal protective effects in renovascular hypertension rat. Methods Male SD rats were divided into sham group and renovascular hypertension group in which Goldblatt methods were performed. The two groups were intragastically administered with losartan (respectively 0, 10, 20, 30 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$) for 6 weeks. Then renal function was measured, the AT2-R expression in the non-ischemic kidney and the AngⅡ contents in non-ischemic kidney and plasma were determined. Results In renovascular hypertension rats, especially in the contralateral, non-ischemic kidney, the expression of AT2-R protein were up-regulated. Losartan increased the AngⅡ contents in non-ischemic kidney and plasma, mediated the natriuretic/diuretic effect and renal protective effect in renovascular hypertension rat and increased the expression of renal AT2-R. Conclusion In renovascular hypertension rat, losartan mediates renal natriuretic/diuretic effect and protects renal function through up-regulating AT2-R in kidney.

Key words: angiotensin Ⅱ type-2 receptors; renovascular hypertension; losartan; renal function; SD rats; angiotensin Ⅱ

肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)在肾血管性高血压的维持中起着重要作用。AngⅡ主要偶联于两个受体亚型:AT1-R和AT2-R[1]。AT1-R在成人组织中占主导地位,它所介导的效应如血管收缩,促进细胞肥大和尿钠滞留等已被证实。氯沙坦作为一种非肽类的特异性、竞争性AT1-R拮抗剂,可以阻断上述AngⅡ的作用,起到保护肾血管性高血压大鼠肾脏功能的效应。有充分的证据证明AT2-R也可调节肾脏心血管功能。本实验拟在大鼠实验性肾血管性高血压模型的基础上利用氯沙坦阻断AT1-R,观察AT2-R蛋白表达变化情况,及其和肾脏功能变化的关系,了解氯沙坦在AT2-R介导的肾血管性高血压肾脏保护功能中的作用,为氯沙坦在高血压的治疗作用提供理论基础。

作者简介:吕 慈(1980-),女,河南省镇平县人,硕士研究生,医师,主要从事心血管药理学方面的研究。电话:(023)68772252
通讯作者:何凤慈,电话:(023)68752181
收稿日期:2007-02-13;修回日期:2007-03-14

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

健康雄性SD大鼠80只(体质量200~250 g),由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。氯沙坦由Merck公司惠赠;血管紧张素Ⅱ放免试剂盒购自北京北方生物试剂研究所;兔抗大鼠AT2多克隆抗体购自Santa Cruz公司;辣根酶标记的羊抗兔IgG(二抗)、DAB染色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。内径为0.3 mm的U型银夹自制。

1.2 模型制作

采用2K1C经典造模方法复制肾血管性高血压大鼠模型[2]:健康雄性SD大鼠经乙醚呼吸道麻醉后,行腹正中切口切开,游离左肾动脉并用内径为0.3 mm银夹钳夹,使左肾动脉部分狭窄,右侧肾动脉不触及。假手术组方法相同,但不安置银夹。术后4周大鼠血压以收缩压(SBP)≥140 mmHg或血压较术前升高30 mmHg者作为肾血管性高血压大鼠模型,并进行动物实验。

1.3 实验分组和处理

成功造模后的64只雄性SD大鼠根据收缩压分为8组,分别为假手术组;低剂量处理的假手术组;中剂量处理的假手术组;高剂量处理的假手术组;手术组;低剂量处理的手术组;中剂量处理的手术组;高剂量处理的手术组。每组8只,分笼饲养。低、中、高剂量(10、20、30 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)的氯沙坦以5 mg/ml的比例溶于生理盐水(NS),每天灌胃;假手术组和手术组均根据体质量以相应的NS灌胃,共进行6周。6周后用1%戊巴比妥钠20 mg/kg腹腔麻醉动物,腹主动脉抽血后,处死动物,立即取出右侧肾脏,用冰浴生理盐水洗净,滤纸吸干;将肾脏标本编号后立即置入-70 ℃液氮冰箱保存备用,检测前制备组织石蜡切块,切片厚度4 μm。

1.4 测定指标和方法

1.4.1 SBP的测定 Powerlad微型动脉测压仪(由本校大坪医院心血管内科研究室提供)测定尾动脉SBP。

1.4.2 肾功能测定 腹腔动脉抽血3 ml,迅速注入放有促凝剂的试管中,4 ℃,1 000 r/min,离心5 min,分离上清于-20 ℃以下保存待测。用自动生化分析仪(由第三军医大学西南医院检验科提供)测定血浆中Na^+、K^+、肌酐、尿素氮的含量。

1.4.3 肾脏组织病理切片检查 取肾脏组织,10%甲醛固定、脱水、包埋、切片、HE染色,在普通光学显微镜下观察肾脏组织变化。

1.4.4 肾脏AT2-R含量测定 取右侧肾皮质作石蜡切片,将石蜡切片常规脱蜡至水,3%过氧化氢孵育5~10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性,蒸馏水冲洗,PBS浸泡5 min并微波抗原修复,依次加入兔抗大鼠AT2多克隆抗体(一抗)、辣根酶标记的羊抗兔IgG(二抗),加显色剂(DAB)显色、复染和封片。用Imagepro-Plus5.0(IPP5.0)高清晰度彩色病理图像免疫组化测量系统,每张切片随机检测5个高倍镜视野下阳性染色细胞的累计光密度值,计算其平均值作为AT2-R的相对含量。

1.4.5 血浆及肾脏AngⅡ含量测定 腹腔动脉抽血3 ml,迅速注入放在冰水浴冷却的抗凝管中,4 ℃,1 000 r/min,离心5 min,分离血浆于-20 ℃以下保存待测。此操作在15 min内完成。取右肾皮质约100 mg,用冰浴生理盐水漂洗后,滤纸吸干,剪成碎块,置入1 mol的冰醋酸中,煮沸15 min,冷却后用匀浆器匀浆,4 ℃,3 000 r/min,离心15 min,取上清液置于-20 ℃以下保存待测。AngⅡ用放射免疫法测定,试剂盒购自北京北方生物试剂研究所,批内变异系数<5%,皮间变异系数<10%,严格按说明书操作。

1.5 统计学分析

所有数据以$\bar{x} \pm s$表示,经SPSS 10.0统计软件进行单因素方差分析后采用Student-Test法进行组间两两比较。

2 结果

2.1 肾脏功能测定结果

手术组大鼠的肾脏功能受到损伤,氯沙坦对假手术组(A组)肾功能的影响不大,氯沙坦对手术组血Na、Scr、BUN的降低水平显著高于假手术组,($P<0.05$,$P<0.01$),且呈剂量依赖性。可见氯沙坦对高血压大鼠肾功能起到了保护作用(表1)。

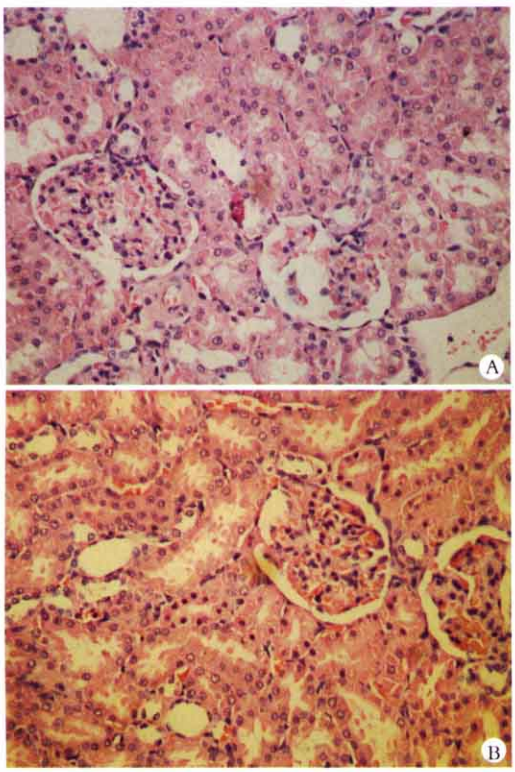
表1 氯沙坦对肾血管性高血压大鼠的肾功能以及血浆、肾脏组织AngⅡ的影响($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	Na(mmol/L)	K(mmol/L)	Scr(μmol/L)	BUN(mmol/L)	血AngⅡ(pg/ml)	肾脏AngⅡ(ng/g)
假手术组	144.83±0.39	3.52±0.25	30.25±4.51	4.86±0.65	107.85± 22.65	2.19±0.19
手术组	151.53±1.66[a]	3.63±0.33	56.87±1.61[a]	9.19±1.37[a]	121.82± 26.73	3.22±0.28[a]
低剂量处理的假手术组	144.18±1.81	3.7±0.35	27.20±1.97	4.24±0.88	251.79± 58.84[a]	2.84±0.35[a]
低剂量处理的手术组	142.53±2.13[c]	4.09±0.47	46.88±3.10[c]	6.94±0.78[c]	374.46± 71.38[d]	4.16±0.38[c]
中剂量处理的假手术组	143.53±1.13	3.77±0.18	26.33±1.19	4.15±0.74	967.34±148.02[b]	3.04±0.46[a]
中剂量处理的手术组	141.5±2.61[c]	4.11±0.27	41.65±3.40[c]	6.38±0.99[c]	1146.13±241.87[d]	4.65±0.56[c]
高剂量处理的假手术组	141.73±1.13[a]	3.9±0.22	25.23±2.26	4.14±0.57	1004.31±252.80[b]	3.21±0.34[a]
高剂量处理的手术组	139.1±1.64[c]	4.17±0.21[c]	35.67±3.49[c]	5.73±0.76[c]	1338.11±192.33[d]	5.25±0.47[d]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与假手术组比较; c: $P<0.05$, d: $P<0.01$, 与手术组比较

2.2　肾脏组织病理观察

与假手术组相比，手术组肾脏底肾小球系膜细胞增殖、基质增生、毛细血管基底膜增厚，部分肾小球出现纤维化和肾小球球囊融合。氯沙坦处理后，随着用药量的增加，手术组的肾小球系膜细胞增殖、基质增生、毛细血管基底膜增厚、肾小球纤维化和球囊融合程度减轻，在高剂量处理的手术组未见明显的肾小球纤维化，肾脏组织基本恢复正常（图 1）。



A：手术组；B：高剂量处理的手术组

图 1　肾血管性高血压大鼠肾小球病理观察　（HE ×400）

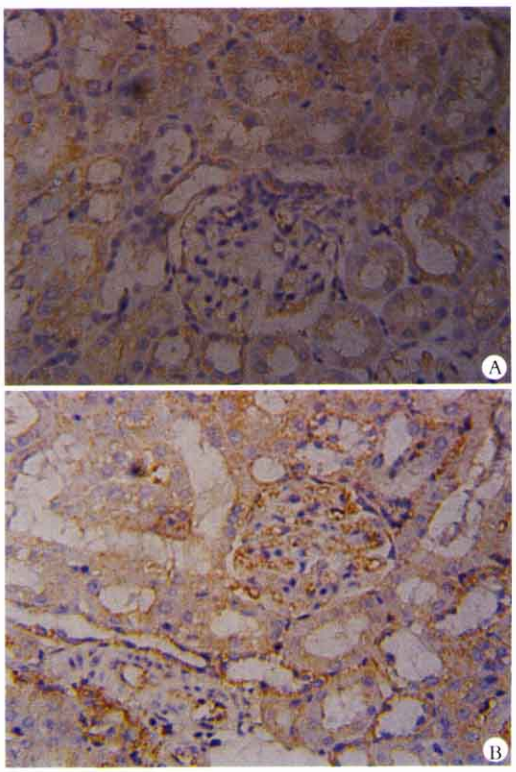
2.3　AT2-R 蛋白表达测定结果

免疫组化染色显示 AT2-R 在细胞膜和细胞质中均有表达，呈棕黄色（图 2）。AT2-R 蛋白表达量（相对值）在肾血管性高血压大鼠健侧肾（122 837.89 ± 220.65）明显高于假手术组（202 047.56 ± 151.76）（$P < 0.05$），并且氯沙坦可增加肾脏 AT2-R 的表达（表 2）。

表 2　氯沙坦对肾血管性高血压大鼠免疫组化法所测肾脏 AT2R 蛋白表达的影响（$n = 6$，$\bar{x} \pm s$）

组别	AT2-R 蛋白表达相对量
假手术组	122 837.89 ± 220.65
手术组	202 047.56 ± 151.76[a]
低剂量处理的假手术组	309 698.35 ± 628.16[a]
低剂量处理的手术组	449 337.10 ± 964.86[b]
中剂量处理的假手术组	338 222.20 ± 891.07[a]
中剂量处理的手术组	453 575.20 ± 984.86[b]
高剂量处理的假手术组	349 337.10 ± 1 001.70[a]
高剂量处理的手术组	488 203.95 ± 1 432.56[b]

a：$P < 0.05$，与假手术组比较；b：$P < 0.05$，与手术组比较



A：假手术组；B：高剂量处理的手术组

图 2　肾脏 AT2-R 的表达　（DAB ×400）

2.4　血浆及肾脏 AngⅡ含量测定结果

氯沙坦（10、20、30 mg · kg^{-1} · d^{-1}）可升高假手术组、手术组血浆和肾脏组织中的 AngⅡ水平（$P < 0.05$，$P < 0.01$），两组均以血浆升高水平最为明显（表 1）。

3　讨论

肾血管性高血压是一侧或两侧肾动脉主干或分支狭窄、阻塞所造成的高血压。在本实验中采取的是经典的 2 肾 1 夹法肾血管高血压模型，即夹闭左侧肾动脉而不触及右侧。在模型建立后，左侧肾脏因肾脏供血不足而出现萎缩，功能丧失，右侧即健侧肾脏出现一系列的代偿和失代偿反应。这是一种肾素依赖性高血压，血浆和肾脏组织中的 RAS 在肾血管性高血压的形成与维持中起着重要作用。在 RAS 系统中关键的物质是具有强有力缩血管作用的 AngⅡ。AngⅡ引起肾脏血管肥厚，肾血管阻力增加，肾脏舒张能力及肾排钠能力降低，导致肾功能改变。本实验病理切片检查结果表明在肾血管性高血压的情况下，右侧肾脏肾小球系膜细胞增殖、基质增生、毛细血管基底膜增厚，肾小球出现纤维化和部分肾小球球囊融合。

氯沙坦是一种非肽类的特异性、竞争性 AT1-R 拮

抗剂，对 AT1-R 具有高度选择性，较 AT2-R 高 30 000 倍，从而在受体水平阻断了 AngⅡ通过 AT1-R 介导的生物学效应[3]。本实验证明氯沙坦能升高血浆及肾脏组织中的 AngⅡ水平，其机制是在 AT1-R 阻断后 AngⅡ通过 AT1-R 介导的作用消失，醛固酮生成减少，经负反馈机制激活肾素，使 AngⅡ升高。因循环中的 AngⅡ70% 来自 ACE 途径，因此血浆 AngⅡ升高最明显[4,5]。因为 AT1-R 拮抗剂与 AngⅡ竞争 AT1-R，应用氯沙坦后肾脏组织中的 AngⅡ的水平也有所升高，但却没有血浆中升高明显，原因可能是肾脏局部由 ACE 途径产生的 AngⅡ仅占 20%，这种反馈调节机制有限，且 AT1-R 阻断前的肾脏局部 RAS 就已处于高功能状态，因此 AngⅡ水平不可能再有较大幅度的提高。

由本实验结果可知，与假手术组相比，氯沙坦降低手术组血浆 Na^+、Scr 和 BUN 的水平更为明显，对高血压大鼠的肾脏功能起到了保护作用。氯沙坦处理后手术组的肾小球系膜细胞增殖、基质增生、毛细血管基底膜增厚、肾小球纤维化和球囊融合程度减轻，在高剂量处理的手术组肾脏组织基本恢复正常。氯沙坦对肾功能的保护作用除了与其在受体水平阻断 AngⅡ通过 AT1-R 介导的生物学效应外，在部分程度上与其暴露、激活 AT2-R 的功能有关。有充分的证据证明 AT2-R 也可调节肾脏心血管功能，包括血管舒张和利钠作用。并且，AT2-R 有抗增殖抗生长和促凋亡效应[6-8]。AT2-R 可能在功能上对抗 AT1-R 介导的 AngⅡ作用。在本实验中，与假手术组相比手术组肾脏组织中 AT2-R 的表达明显增加，并且氯沙坦对肾脏 AT2-R 的表达也有上调作用，这一结果与以前的报道相一致[9]，这说明在 AT1-R 和 AT2-R 之间存在有交互作用。氯沙坦阻断 AT1-R 后高水平的 AngⅡ作用于上调的 AT2-R，激活激肽-激肽释放酶系统，通过增加肾脏及血管中的 NO/cGMP 的水平起到舒张血管、利钠利尿，保护肾脏功能的效应。这与在自发性高血压大鼠表达上调的 AT2-R 可产生利钠利尿以及肾脏保护效应的结果相一致[10]。

本实验的结果揭示了在肾血管性高血压大鼠氯沙坦通过上调 AT2-R 对肾脏起保护功能。表达上调的 AT2-R 可以介导 AT1-R 拮抗剂所诱导的促尿钠排泄和肾脏保护功能。参与 AT2-R 介导的舒张血管/促尿钠排泄的肾脏自分泌级联反应包括 BK、NO/cGMP。这个通路作为 Ang 由 AT1-R 介导的血管收缩/抗尿钠排泄效应的拮抗机制非常重要，在肾血管性高血压中起保护作用，并且 AT2-R 也可调节肾脏的前列腺素类物质的分泌。这为肾血管性高血压的药物治疗以及氯沙坦的临床应用前景提供了理论依据。近来的研究表明 AT1-R 拮抗剂优于AngⅡ转换酶抑制剂。这种优势是由于 AT1-R 拮抗剂可选择性阻断 AT1-R 从而暴露 AT2-R 的功能，而转换酶抑制剂减少 AngⅡ的生成，导致 AT1-R 和 AT2-R 功能的降低。本研究也支持这一观点，这就是应用 AT1-R 拮抗剂可保持 AT2-R 的完整性，从而调节尿钠排泄和保护肾脏的有益效应。但是有关 AT2-R 效应以及 AT1-R 和 AT2-R 交互作用的确切机制目前尚不清楚，有待于进一步研究。

参考文献：

[1] 韦玉生，李仁德. 褪黑素对肾血管型高血压大鼠的血压及主动脉舒缩功能的影响[J]. 中国药理学通报，2002，18(1)：46-50.

[2] 赵光胜. 高血压发病机理与防治[M]. 上海：上海科学技术文献出版社，1991：123.

[3] 叶华茂，陈孝文，江黎明. 血管紧张素受体拮抗剂和血管紧张素转换酶抑制剂与肾脏病关系[J]. 国外医学：泌尿系统分册，2000，20(6)：259-261.

[4] Dzau V J，Re R. Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine. A paradigm shift? [J]. Circulation，1994，89(1)：493-498.

[5] Nunez E，Hosoya K，Susic D，*et al*. Enalapril and losartan reduced cardiac mass and improved coronary hemodynamics in SHR[J]. Hypertension，1997，29(1 Pt 2)：519-524.

[6] Carey R M，Wang Z Q，Siragy H M. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function[J]. Hypertension，2000，35(1 Pt 2)：155-163.

[7] Millatt L J，Abdel-Rahman E M，Siragy H M. Angiotensin II and nitric oxide：a question of balance[J]. Regul Pept，1999，81(1-3)：1-10.

[8] Horiuchi M，Akishita M，Dzau V J. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system[J]. Hypertension，1999，33(2)：613-621.

[9] De-Paolis P，Porcellini A，Gigante B，*et al*. Modulation of the AT2 subtype receptor gene activation and expression by the AT1 receptor in endothelial cells[J]. J Hypertens，1999，17(12 Pt 2)：1873-1877.

[10] Munoz-Garcia R，Maeso R，Rodrigo E，*et al*. Acute renal excretory actions of losartan in spontaneously hypertensive rats：role of AT2 receptors，prostaglandins，kinins and nitric oxide[J]. J Hypertens，1995，13(12 Pt 2)：1779-1784.

（编辑 薛国文）