基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001077

糜蛋白酶抑制剂对糖尿病仓鼠肾功能保护作用的实验研究

张孟姝[1]，刘金磊[2]，刘学政[3]，周红丽[4]，张荣明[1]

（锦州医科大学 1. 附属第一医院烧伤整形美容外科；2. 附属第一医院放射线科；3. 基础学院人体解剖学教研室；4. 附属第一医院肾内科，锦州 121000）

【摘 要】**目的**：观察糜蛋白酶抑制剂对糖尿病仓鼠肾脏的保护作用，进而探讨其保护肾脏损伤的机制。**方法**：(1)通过链脲佐菌素(streptozotocin，STZ)腹腔注射法制备仓鼠糖尿病模型。实验分为 5 组，每组 8 只。(2)通过 Western blot 检测各组动物糜蛋白酶抗体、血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin I-converting enzyme，ACE)、过氧化物酶 4(NADPH oxidase-4，NOX-4)、还原型辅酶Ⅱ(NADPH)氧化酶亚单位 p22phox 的表达情况。(3)通过免疫荧光检测各组动物糜蛋白抑制剂对血管紧张素系统(renin-angiotensin system，RAS)的成分，氧化应激的影响。(4)通过 qRT-PCR 及 Western blot 检测糜蛋白抑制剂对人血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ，ANG-Ⅱ)来源的基质蛋白合成影响。**结果**：(1)免疫组化结果显示糖尿病组仓鼠肾小管和血管球糜蛋白酶表达明显。qRT-PCR 结果显示糜蛋白酶 mRNA 水平较对照组普遍增高($P<0.01$)。而胰岛素治疗后降至正常水平。(2)糜蛋白酶抑制剂抑制了糖尿病仓鼠肾内 ANG-Ⅱ升高，同时明显降低了 8-羟化脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine，8-OHdG)分泌水平。(3)NOX-4 和 p22phox 染色表明糖尿病组血管球和肾小管区域氧化产物明显增高，而糜蛋白酶抑制剂抑制氧化产物的升高($P<0.01$)。(4)Western blot 证实了糖尿病组血管球 NOX-4 和 p22phox 蛋白的水平较对照组高，糜蛋白酶抑制剂明显降低了其表达。(5)血管球转化生长因子-β1(transforming growth factor-β，TGF-β1)表达糖尿病组高于对照组，同样糜蛋白酶抑制剂治疗后大大降低了 TGF-β1 水平。**结论**：糜蛋白酶抑制剂能保护糖尿病仓鼠的肾功能，其机制是通过降低肾内 ANG-Ⅱ水平和氧化应激水平来保护糖尿病肾脏损伤。

【关键词】糜蛋白酶抑制剂；肾脏；氧化应激；糖尿病仓鼠

【中图分类号】R587.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-11-02

Experiment study of renal protective function of chymotrypsin inhibitor in diabetes hamsters model

Zhang Mengshu[1], Liu Jinlei[2], Liu Xuezheng[3], Zhou Hongli[4], Zhang Rongming[1]

(1. Department of Burn Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital; 2. Department of Radiology, the First Affiliated Hospital; 3. Teaching and Research Section of Anatomy, Foundation Institute; 4. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital, Jinzhou Medical University)

【Abstract】***Objective***: To observe the protective effect of chymotrypsin inhibitors on diabetic hamster kidney and to explore its protection mechanism. ***Methods***: Hamster diabetes mode was established by intraperitoneal injection of streptozotocin(STZ) and all experiment hamsters were divided into five groups. Immunohistochemistry was used to detect chymotrypsin antibody, angiotensin converting enzyme inhibitors(ACE), NADPH oxidase-4(NOX-4), NADPH oxidase subunit p22phox in each group. Immunofluorescence was used to detect the animal protein inhibitor of angiotensin system Mi(renin-angiotensin system, RAS) component, oxidative stress. Real-time PCR and Western blot were used to detect the effect of protein inhibitor of matrix proteins Mi on synthesis of human angiotensin Ⅱ(ANG-Ⅱ). ***Results***: Immunohistochemistry showed that tubular and glomerular chymotrypsin in diabetic hamsters were significantly increased. Real-time PCR showed that chymotrypsin mRNA levels were generally higher in diabetic hamsters group than in control group($P<0.01$), which returned to normal levels after insulin therapy. Chymotrypsin inhibitors inhibited the increase of angiotensin Ⅱ(ANG-Ⅱ) in kidney of diabetes hamsters, while significantly reduced the level of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine secretion. NOX-4 and p22phox staining indicated

作者介绍：张孟姝，Email：zhangmengshu2015@sina.com，研究方向：糖尿病并发症的研究。

通信作者：张荣明，Email：zhangrm2015@sina.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目(编号：31140072)；辽宁省科技厅科技计划资助项目(编号：2011225015)；辽宁省自然科学基金资助项目(编号：20102140)。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20161215.1105.020.html (2016-12-15)

that oxidation products increased significantly in diabetic glomerular and tubular regional groups, and chymotrypsin inhibitors inhibited the increase of oxidation products ($P<0.01$). Western blot confirmed that the levels of NOX-4 and p22phox protein were higher in glomerular diabetic group than in control group; chymotrypsin inhibitor significantly reduced its expression. Glomerular transforming growth factor-β(TGF-β1) expression was higher in diabetic group than in control groups; chymotrypsin inhibitor therapy significantly reduced the levels of TGF-β1. ***Conclusion***: Chymotrypsin inhibitors protect diabetic hamster kidney function, the mechanism of which is through reducing renal ANG-Ⅱ levels and oxidative stress levels to protect diabetic kidney damage.

【Key words】chymotrypsin inhibitor; kidney; oxidative stress; diabetic hamsters

糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）是糖尿病常见的慢性并发症。随糖尿病患病率上升，DN 发生比例也将显著提高。DN 是导致肾衰的主要原因，也是导致心血管疾病危险因素增加的因素之一。目前，DN 已成为全世界医药界面临的重要课题。阻断血管紧张素系统（renin-angiotensin system，RAS）如用血管紧张素-Ⅰ转化酶抑制剂（angiotensin-Ⅰ converting enzyme，ACE-Ⅰ）或者血管紧张素-Ⅱ（angiotensin-Ⅱ，ANG-Ⅱ）拮抗剂具有保护 DN 和心血管并发症的作用，但是其抗心血管并发症的保护作用似乎与它们的抗高血压的效应无关[1-2]。研究发现，人糜蛋白酶能够促进 ANG-II 的生成[3-4]。有报道称糜蛋白酶在糖尿病肾组织中表达上调，并可以激活 RAS[5]。这些发现表明肾内 RAS 可能参与了 DN 的进展。然而，关于糜蛋白酶在肾内如何激活 RAS 还不十分清楚。更重要的是，目前还没有报道显示糜蛋白酶抑制剂在阻止 DN 进展中有作用。因此，本项研究将在实验模型基础上探讨糜蛋白酶抑制剂对糖尿病仓鼠肾脏的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康雄性金黄仓鼠 56 只，体质量 105~135 g，鼠龄 8 周，SPF 级，购自军事医学科学院实验动物中心，实验中死亡动物不计入数据统计范围，由新动物补充。实验动物操作过程遵循实验动物福利要求并获辽宁医学院实验动物伦理委员会批准。

1.1.2 实验试剂 链脲佐菌素（streptozotocin，STZ；美国 Sigma 公司），雷米普利（Ramipril；赛诺菲安万特制药），TEI-F00806（碧云天），ANG-Ⅱ、血管紧张素-Ⅰ（angiotensin-Ⅰ，ANG-Ⅰ）、血管紧张素转化酶抑制剂（angiotensin Ⅰ-converting enzyme，ACE）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）、SOD 试剂盒（南京建成），所有抗体均为北京博奥森公司产品，其他一些常规实验试剂由辽宁医学院附属第一医院中心实验室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 糖尿病模型建立与实验分组 STZ 以 40 mg/kg 体质量腹腔注射方式制备实验动物模型，36 h 后空腹血糖高于 250 mg/dl 认为模型成功。实验分为 6 组，每组 8 只。阴性对照组（NC 组）：未加一抗的健康仓鼠；对照组（Cont 组）：健康仓鼠，腹腔注射柠檬酸纳缓冲液代替 STZ；糖尿病模型组（STZ 组）：注射 STZ 后的糖尿病仓鼠；胰岛素治疗组（ins组）：糖尿病仓鼠注射 U-500 胰岛素 3 U/d；雷米普利治疗组（Ramipril 组）：糖尿病仓鼠口饲雷米普利，每天 2 次，总量为 5 mg/(kg·d)[4]；糜蛋白酶抑制剂组（TEI-F00806 组）：给予糜蛋白酶特异性抑制剂 TEI-F00806，剂量为 10 mg/(kg·d)[5]。[M1]所有动物在治疗的 4 周和 8 周时收集 2 d 的尿液样本，用以分析8-羟化脱氧鸟苷（8-hydroxy-2'-deoxyguanosine，8-OHdG）等生物标记物。在治疗后 8 周处死各组实验动物进行后续检测。

1.2.2 免疫组化检测 取动物肾脏以 4%多聚甲醛固定并包埋于石蜡中。高压锅内柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复（pH=6.0）。0.1%的 Triton X-100 来增强细胞弥散性。室温下用 3% H_2O_2 处理 10 min 来清除内源性过氧化物酶，1%牛血清白蛋白孵育 30 min。5 μm 厚度的石蜡切片常规行二步法免疫组织化学检测。抗体为兔抗鼠糜蛋白酶抗体、ACE、NOX-4、p22phox，一抗稀释比例均为 1:200，4 ℃过夜。第二天切片用 PBS 冲洗，HRP 标记羊抗兔或鼠抗羊 IgG（1:200）室温孵育 1 h，阴性对照组采用 PBS 作为一抗。DAB 镜下观察显色，苏木精复染细胞核。

1.2.3 血管球组织的分离 麻醉仓鼠，用 PBS 经心脏灌流，离取出肾脏，切成 1 mm^3 小片，3 mg Ⅰ型胶原酶和 300 μg *DNase* Ⅰ溶于 3 mL PBS 中，37 ℃孵育消化 30 min。消化后的组织经 100 μm 细胞过滤器过滤。200 g 离心 3 min。通过磁珠分离器收集肾小球。重复 5 次上述收集过程。分离后纯化肾小球超过 95%，光镜下观察并分成 2 份，1 份用于蛋白提取，1 份用于 RNA 提取。

1.2.4 qRT-PCR 检测 Trizol 提取组织总 RNA，逆转录合成 cDNA，紫外分光光度计测 mRNA 浓度。分离的血管球组织 RNA 用 RNeasy Mini 试剂盒纯化，根据操作指导进行反转录。用转录试剂盒合成 cDNA。实时定量 PCR 仪对 mRNA 表达量进行检测。每 1 个目的 cDNA 的 PCR 反应都使用各自的引物在特定的条件下进行，β-Actin 作为内参。实验重复 3

次取平均值。

1.2.5 Western blot 检测 超声粉碎血管球匀浆，5 min×12 000 r/min 离心。BCA 测量蛋白浓度。配制 5%浓缩胶与 8%分离胶，60 V×30 min，150 V×1 h 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳结束后取下分离胶洗涤 3 次放入转膜仪，以 100 mA×30 min 进行转膜，转膜后孵育一抗（1:1 500），4 ℃摇摆过夜，洗膜后继续孵育二抗及显影液，室温避光孵育 30 min，洗脱液洗涤 3次终止显色反应，凝胶成像系统分析 PVDF 膜上目的条带与内参照的吸光度（absorbance，A）值。重复实验 3 次，计算相对 A 值。

1.2.6 血清 RAS 成分和肾 ANG-Ⅱ水平的测量 血清 RAS 成分采用相应试剂盒按照说明书步骤测量[6]。肾脏 ANG-Ⅱ采用联合固态提取和放射免疫检测法进行。肾脏标本在反相洗脱柱进行提取。

1.2.7 二氢乙啶原位检测过氧化物 仓鼠麻醉后由右侧颈静脉进针注射 1 mL（1 mg/mL）二氢乙啶。2 h 后动物经心脏 4%多聚甲醛灌流固定处死，分离肾脏并冷冻包埋，制备 10 μm 厚冰冻切片，行 Hoechst 33258 染色。选取 200 倍血管球视野计数荧光的平均值作为二氢乙啶（dihydroethidium，DHE）荧光水平，比较组间荧光强度的差别。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 for Windows 软件包对所得结果进行统计学分析，计量资料用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 糖尿病仓鼠肾脏糜蛋白酶表达水平分析

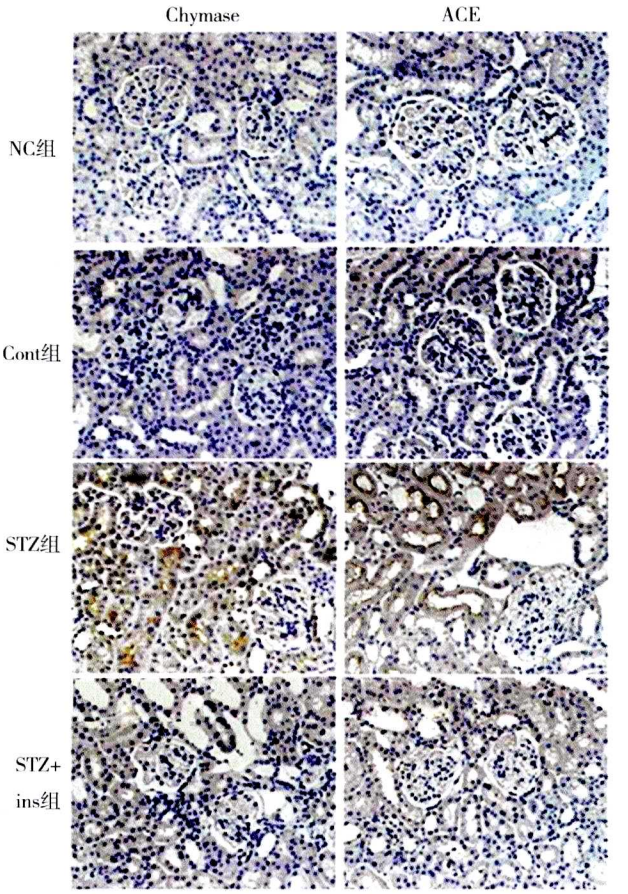
通过胰岛素治疗糖尿病仓鼠血糖水平减少到接近正常水平。未治疗组仓鼠血糖处于较高水平，且体质量减轻（表 1）。免疫组化结果显示糖尿病组仓鼠肾小管和血管球糜蛋白酶表达明显。胰岛素治疗组糜蛋白酶趋于正常水平（图 1A）。实时荧光定量 PCR 结果分析显示糜蛋白酶 mRNA 水平较对照组普遍增高。而胰岛素治疗后降至正常水平（图 1B）。糖尿病仓鼠肾脏组织 ACE 表达增加，但是仅局限在近端小管的刷状缘（图 1A）。

表 1 实验动物治疗前后的血糖和体质量情况（$\bar{x}\pm s$，n=8）

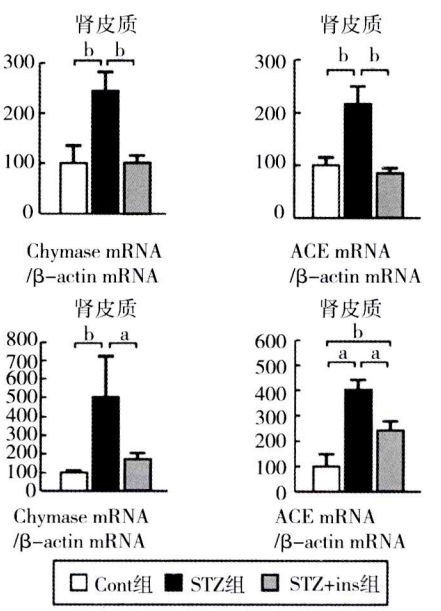
Tab.1 Blood sugar and body weight of experimental animals before and after the treatment（$\bar{x}\pm s$，n=8）

检测指标	Cont组	STZ组	ins组
治疗前体质量（g）	122.3±8.7	125.7±13.7	134.8±9.6
治疗前血糖（mg/dL）	95.0±8.8	258.0±11.3[a]	274.2±12.8[a]
治疗后体质量（g）	145.4±10.5[b]	102.0±6.2[b]	158.8±15.4[b]
治疗后血糖（mg/dL）	94.7±8.3	312.8±22.7[c]	98.9±10.9[c]

注：a，与 Cont 组比较，P<0.01；b：与 Cont 组和 STZ 组、ins 组比较，P<0.01；c：与治疗前比较，P<0.01



A. 肾脏中糜蛋白酶和 ACE 免疫组织化学表达情况（200×）



a：P<0.05，b：P<0.001

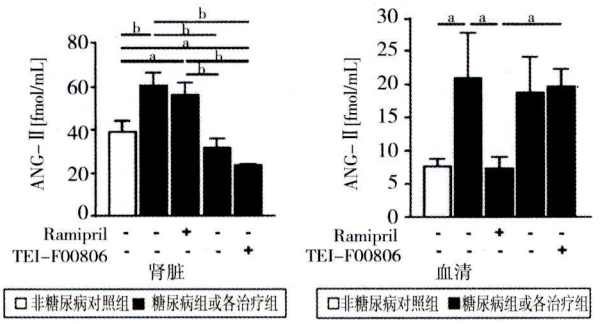
B. 糜蛋白酶和 ACE mRNA qRT-PCR 表达

图 1 糖尿病仓鼠糜蛋白酶及血管紧张素转化酶表达定量与定性分析（n=8）

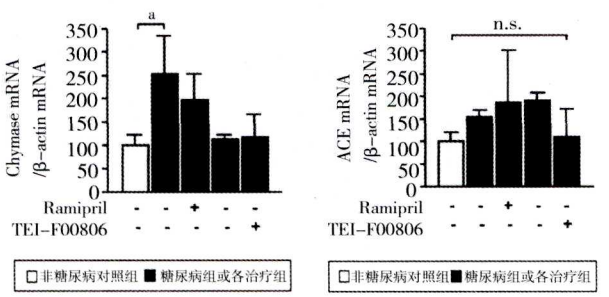
Fig.1 Quantitative and qualitative analysis of diabetes hamsters chymotrypsin and angiotensin-converting enzyme expression（n=8）

2.2　糜蛋白抑制剂对 RAS 成分、氧化应激的影响

给予糜蛋白酶抑制剂没有影响血清 ANG-Ⅱ水平，但是完全抑制了糖尿病仓鼠肾内 ANG-Ⅱ生成过剩（图 2A）。然而，给予雷米普利治疗后完全抑制了血清 ANG-Ⅱ水平，但对肾内 ANG-Ⅱ没有影响（图 2B）。只有糖尿病组动物糜蛋白酶的 mRNA 水平升高，应用糜蛋白酶抑制剂后明显降低。ACE 的 mRNA 水平未见改变（图 2C、D；表 2）。



A. 8 周后肾内 ANG-Ⅱ成分　　B. 8 周后血清内 ANG-Ⅱ成分



C. 动物血管球处糜蛋白酶 mRNA 表达量　　D. 动物血管球处 ACE mRNA 表达量

a：$P<0.05$；b：$P<0.01$；Ramipril：雷米普利治疗组；TEI-F00806：糜蛋白酶抑制剂组

图 2　糜蛋白酶抑制剂和雷米普利对血清和肾内 ANG-Ⅱ生成的影响（n=8）

Fig.2　Influence chymotrypsin inhibitor ramiprilon generation of serum and intrarenal ANG-Ⅱ（n=8）

糖尿病仓鼠尿液中 8-OHdG 分泌水平较对照组明显升高（$P<0.05$）。糜蛋白酶抑制剂治疗后降低了 8-OHdG 分泌水平，但雷米普利对 8-OHdG 没有影响（图 3A）。结果提示糜蛋白酶抑制剂可以有效地减少 8-OHdG 的分泌水平，由于 8-OHdG 是敏感的 DNA 损害标志物之一，因此在防止由氧化应激所产生的羟自由基诱导而导致慢性损害这一点上，尤其是对糖尿病仓鼠氧化应激的保护方面，本研究认为糜蛋白酶抑制剂起到了关键的作用。

DHE 在糖尿病仓鼠肾脏中大量表达，而经糜蛋白酶抑制剂治疗后表达下降（图 3B）。DHE 表达的位置明显与 ACE 和糜蛋白酶的分布有联系（图 3B）。DHE 在糖尿病组血管球处的荧光强度高于对照组，而经糜蛋白酶抑制剂治疗后升高趋势明显被抑制（$P<0.05$）。雷米普利降低 DHE 荧光水平没有糜蛋白酶抑制剂明显（图 3C）。NOX-4 和 p22phox 染色表明：糖尿病组血管球和肾小管处氧化产物增高，同样可被糜蛋白酶抑制剂所抑制（图 4A）。Western blot（图 4B）也证实了组化 NOX-4 和 p22phox 蛋白表达的结果（图 4C、D）。雷米普利组对 NAD(P)H 氧化酶未见有明显统计学差异（图 4C、D）。

2.3　糜蛋白抑制剂对 ANG-Ⅱ来源的基质蛋白合成影响

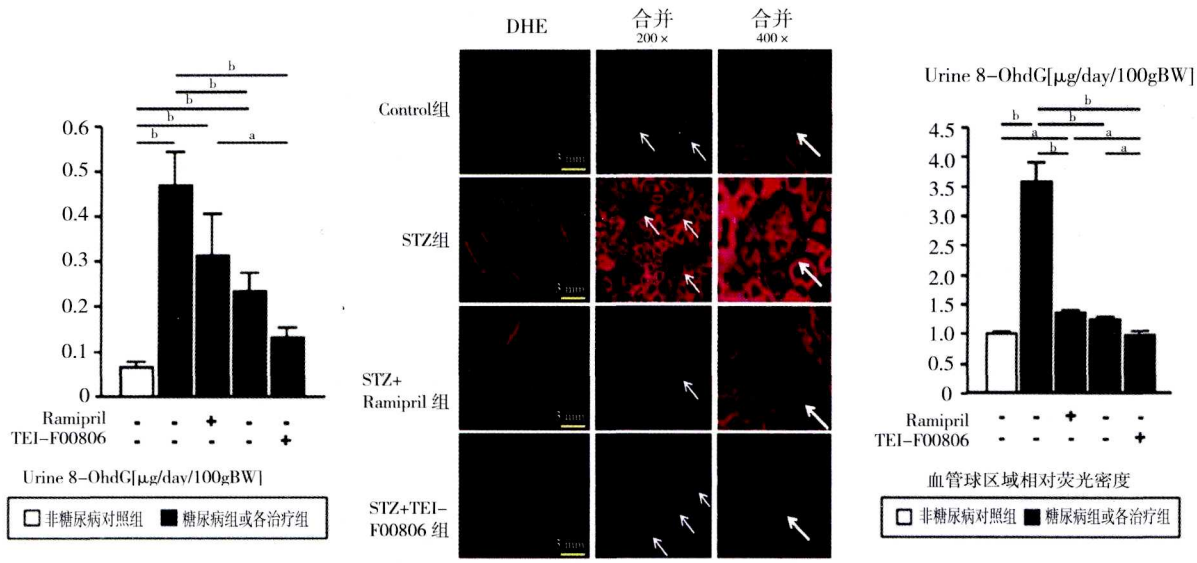
qRT-PCR 几个显示糖尿病组动物转化生长因子-β1（transforming growth factor-β，TGF-β1）表达较对照组高（$P<0.05$），只有糜蛋白酶抑制剂明显降低了 TGF-β1 的水平（$P<0.05$，图 5A）。免疫印迹分析证实了糖尿病组血管球 TGF-β1 表达高于对照组（$P<0.05$），同样糜蛋白酶抑制剂降低了TGF-β1 水平（$P<0.05$）。雷米普利组未见降低（图 5B、C）。免疫组化染色揭示糖尿病组动物纤连蛋白表达升高，同样可被糜蛋白酶抑制剂降低，而雷米普利没有降低作用（图 5D）。

表 2　治疗前后动物血糖及 RAS 成分情况（$\bar{x}\pm s$，n=8）

Tab.2　Animal blood sugar and RAS components before and after treatment（$\bar{x}\pm s$，n=8）

检测指标	Cont组	STZ组	Ramipril组	INS组	TEI-F00806组
治疗前体质量(g)	133.2 ± 5.3	116.6 ± 4.7[b]	123.6 ± 5.7	121.3 ± 4.5	119.3 ± 4.5
治疗前血糖(mg/dL)	95.6 ± 6.8	287.2 ± 18.6[b]	266.3 ± 23.9[b]	276.8 ± 10.5[b]	276.8 ± 10.5[b]
治疗后体质量(g)	178.5 ± 2.3[a]	165.3 ± 1.3[a]	130.7 ± 25.6[c]	156.0 ± 13.3	152.0 ± 16.0
治疗后血糖(mg/dl)	109.8 ± 7.2	315.1 ± 19.8[b]	347.7 ± 22.3[b]	96.1 ± 11.2[b]	316.1 ± 21.6[b]
治疗后血清肾素(μmol/h)	0.9 ± 0.2	1.8 ± 0.2[b]	1.9 ± 0.4[b]	1.1 ± 0.3	1.4 ± 0.3
治疗后血清 ANG-1(ng/mL)	3.1 ± 0.1	4.7 ± 0.2[bd]	3.2 ± 0.5	3.7 ± 0.5	4.7 ± 0.5[bd]
治疗后血清 ACE(nmol/min)	163.8 ± 16.9	271.9 ± 35.7[bd]	121.2 ± 8.5	179.1 ± 16.7	309.5 ± 16.7[bd]

注：a，与治疗前比较，$P<0.01$；b：与 Cont 组比较，$P<0.01$；c：与 Cont 组比较，$P<0.05$；d：与 Ramipril 组比较，$P<0.01$

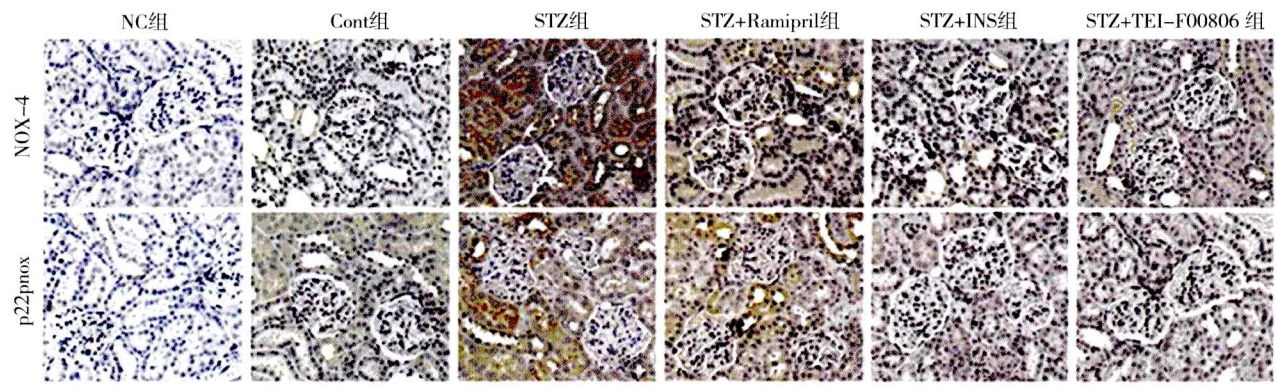


A. 24 h 尿 8-OhdG 分泌水平　B. DHE 的原位检测（红色为 DHE 荧光；蓝色为 Hoechst 33258 复染细胞核；箭头所示为血管球）　C. 血管球 DHE 荧光相对密度分析

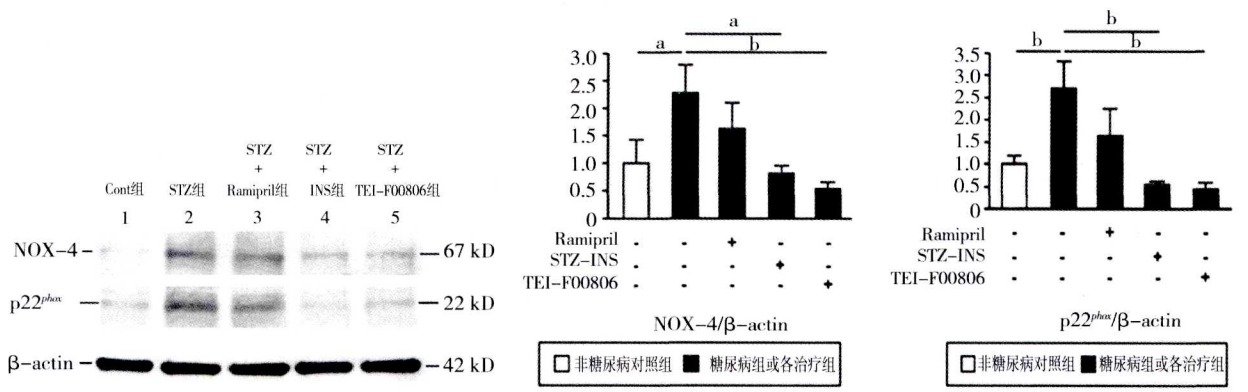
a：$P<0.05$；b：$P<0.01$

图 3　糜蛋白抑制剂和雷米普利对糖尿病仓鼠氧化应激的影响（n=8）

Fig.3　Effect of Mi protein inhibitor and ramipril on oxidative stress in diabetic hamsters（n=8）



A. NOX-4 和 $p22^{phox}$ 免疫组化表达（200×）

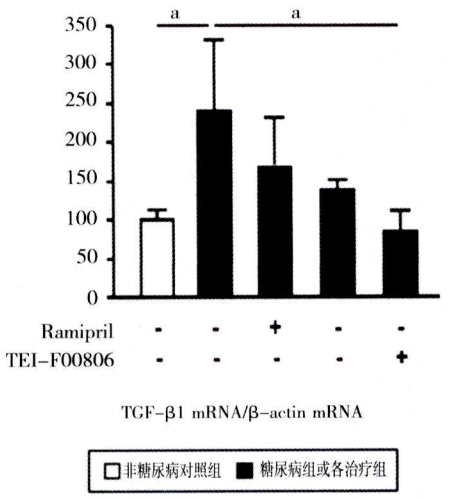


B. Western blot 分析血管球 NOX-4 和 $p22^{phox}$ 蛋白分析　C. NOX-4 蛋白表达相对密度定量分析　D. $p22^{phox}$ 蛋白表达相对密度定量分析

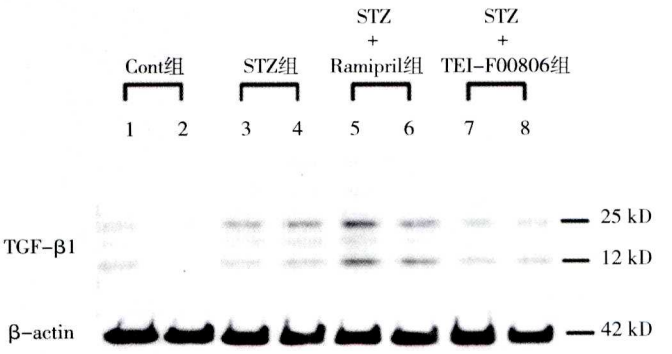
a：$P<0.05$；b：$P<0.01$

图 4　糜蛋白抑制剂和雷米普利对糖尿病仓鼠 NAD（P）H 氧化酶的影响（n=8）

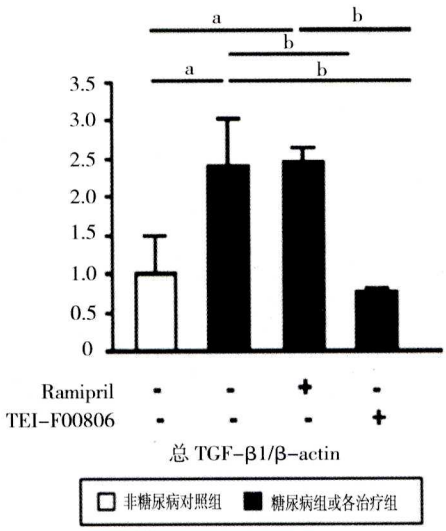
Fig.4　Effect of Mi protein inhibitor and ramipril on NAD（P）H oxidase in diabetic hamsters（n=8）



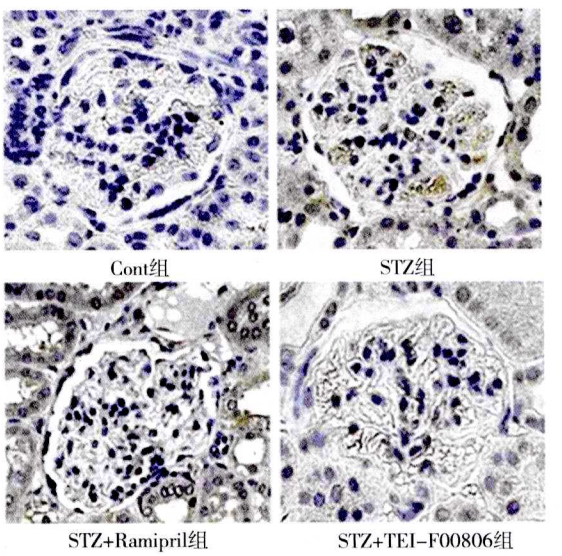
A. PCR 检测血管球 TGF-β1 mRNA



B. Western blot 分析血管球 TGF-β1 蛋白表达



C. Western blot 分析血管球 TGF-β1 蛋白表达柱状图



D. 纤连蛋白免疫组织化学染色（400×）

a：$P<0.05$；b：$P<0.01$

图 5　糜蛋白抑制剂和雷米普利对 ANG-Ⅱ信号通路基质蛋白合成的影响（n=8）

Fig.5　Effect of Mi protein inhibitor and ramipril on ANG-Ⅱ signaling pathway in diabetic hamsters（n=8）

3　讨　论

人和仓鼠糜蛋白酶(α-糜蛋白酶)对 ANG-Ⅰ转化为 ANG-Ⅱ具有促进作用[7]。而大鼠和小鼠体内的是 β-糜蛋白酶，其作用是分解 ANG-Ⅱ[8]。因此本实验采用仓鼠更适合评估糜蛋白酶和组织 RAS 的病理生理作用。本实验研究表明，专一性糜蛋白酶抑制剂能够完全阻止糖尿病仓鼠蛋白尿和肾小球系膜扩张。表明糜蛋白酶抑制剂可以保护和阻止 DN 的发生与发展。研究显示 ANG-Ⅱ受体阻断剂和 ACE 抑制剂对于 DN 发生具有一定的保护作用。因此，一般认为肾内 RAS 参与 DN 的发展。ACE 抑制剂只能在部分上抑制肾内 RAS 生成。由于肾内ANG-Ⅱ浓度远高于血清中的浓度[9]，因此肾内ANG-Ⅱ可能不会被 ARB 完全抑制。本研究结果显示 ACE 抑制剂完全抑制了血清 ANG-Ⅱ浓度，但是没有减轻肾内 ANG-Ⅱ浓度。相反，糜蛋白酶抑制剂完全抑制了肾内 ANG-Ⅱ产物的升高，该作用并没有影响血清 ANG-Ⅱ水平[3]。

DN 状态下，ANG-Ⅱ活性的升高以及血流动力学的改变均可诱导肾脏组织 TGF-β1 及其受体合成

增加。而 TGF-β1 又可通过多种机制促使肾脏肥大，参与糖尿病肾小球硬化的发生。有活检和免疫荧光技术证实，DN 患者或实验性糖尿病动物的肾小管间质、肾小球内可以检测到 TGF-β1 mRNA 的高水平表达，并且其升高可发生于 DN 的早期。进一步研究表明，减少体内 TGF-β1 的合成或阻断、拮抗其生物学作用可有效遏制甚至逆转 DN 的进展。因此推测糜蛋白酶依赖的 ANG-Ⅱ产物 TGF-β1 可能在糖尿病肾脏中提高氧化应激发挥重要作用，并因此促进了 DN 的发展。本实验中，通过应用糜蛋白酶抑制剂，明显降低了 TGF-β1 的表达水平，这为临床上治疗 DN 提供了又一个新的思路和方法。

近来一些肾素抑制药物已经应用在临床，单纯或联合 ARB 应用可以比单纯应用 ARB 更有效地阻断 RAS。然而，肾素抑制药物对于局部 ANG-Ⅱ产物的作用仍然不清楚。本研究证实了糜蛋白酶抑制剂并没有系统增加肾素活性。总之，目前的发现表明糜蛋白酶抑制剂更加有效地抑制了糖尿病肾内 RAS 成分，并且有望成为治疗 DN 的一种有效措施。虽然 ANG-Ⅱ可以通过多种途径促进 DN 的发生，但是已经证实的是，ANG-Ⅱ在血管内皮细胞通过激活或表达 NAD(P)H 氧化酶诱发 ROS 产物。在肾脏 NOX-4 为 NAD(P)H 氧化酶的主要成分[10]。有研究表明，NOX-4 表达的增加可能会在糖尿病肾脏组织中 ROS 产物的增加过程中发挥重要作用。Gorin 等[11]报道称 NOX-4 的下调缓解了氧化性应激，肾肥大，并且增加了肾脏表达纤维连接蛋白。本研究表明，特异性糜蛋白酶抑制剂减轻了 DN 组织中氧化应激水平并且使 NOX-4 的表达接近正常。目前的结果表明糜蛋白酶抑制剂的保护效应至少部分是由使增加 ANG-Ⅱ表达水平以及接下来的降低由 NOX-4 衍生的 ROS 产物实现的。

高血糖可以刺激 ROS 产物生成通过蛋白激酶 C 依赖的 NAD(P)H 氧化酶激活途径。这种高血糖效应可能是氧化应激和炎症的始动因素，但是接下来的糜蛋白酶表达和局部 ANG-Ⅱ产物的增加可以更进一步加速 ROS 产物生成和炎症发生，最终形成氧化应激与炎症的一个恶性循环。关于这一假设应进一步去验证和研究。

综上所述，本研究表明了特异性的糜蛋白酶抑制剂可以对抗糖尿病仓鼠肾内 ANG-Ⅱ浓度的升高，改善 TGF-β1 的过表达并进一步对抗氧化应激和肾功能不全。既然人类有 α-糜蛋白酶与仓鼠相同，目前的发现可以运用到人 DN 的治疗中。而糜蛋白酶特异性抑制剂的效应应该在对人的实验中进一步确认。

参 考 文 献

[1] Burnier M, Zanchi A. Blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system: a key therapeutic strategy to reduce renal and cardiovascular events in patients with diabetes[J]. J Hypertens, 2006, 24(1): 11-25.

[2] Mahmoud F, Alozairi E. Inflammatory cytokines and the risk of cardiovascular complications in type 2 diabetes[J]. Disease Markers, 2013, 35(4): 235-241.

[3] Lavrentyev EN, Estes AM, Malik KU. Mechanism of high glucose induced angiotensin II production in rat vascular smooth muscle cells [J]. Circ Res, 2007, 101(5): 455-464.

[4] Doggrell SA, Wanstall JC. Vascular chymase: pathophysiological role and therapeutic potential of inhibition[J]. Cardiovasc Res, 2004, 61 (4): 653-662.

[5] Huang XR, ChenWY, Truong LD, et al. Chymase is upregulated in diabetic nephropathy: implications for an alternative pathway of angiotensin Ⅱ-mediated diabetic renal and vascular diseas[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(7): 1738-1747.

[6] Cristovam PC, Arnoni CP, de Andrade MC, et al. ACE-dependent and chymase- dependent angiotensin Ⅱ generation in normal and glucose-stimulated human mesangial cells[J]. Exp Biol Med, 2008, 233(8): 1035-1043.

[7] Lee EJ, Chen HY, Lee MY, et al. Cinnamophilin reduces oxidative damage and protects against transient focal cerebral ischemia in mice [J]. Free Radic Biol Med, 2005, 39(4): 495-510.

[8] Yoo TH, Li JJ, Kim JJ, et al. Activation of the renin-angiotensin system within podocytes in diabetes[J]. Kidney Int, 2007, 71(10): 1019-1027.

[9] Gumprecht J, Zychma M, Grzeszczak W, et al. Angiotensin I-converting enzyme and chymase gene polymorphisms-relationship to left ventricular mass in type 2 diabetes patients[J]. Med Sci Monit, 2002, 8 (8): CR603-CR606.

[10] Miyazaki M, Takai S, Jin D, et al. Pathological roles of angiotensin Ⅱ produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models[J]. Pharmacol Ther, 2006, 112(3): 668-676.

[11] Gorin Y, Block K, Hernandez J, et al. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and bronectin expression in the diabetic kidney [J]. J Biol Chem, 2005, 280(47): 39616-39626.

（责任编辑：唐秋姗）