doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.22.012

苯磺酸左旋氨氯地平对肾大部切除自发性高血压模型大鼠肾脏的保护作用*

侯 静[1],蔺 艳[2],刘 勇[1],王玉洁[1]

(1. 西南医科大学附属医院,四川 泸州 646000; 2. 西南医科大学肿瘤研究所,四川 泸州 646000)

摘要:目的 探讨苯磺酸左旋氨氯地平对肾大部(5/6)切除自发性高血压(SH)模型大鼠肾脏的保护作用。**方法** 将 40 只雄性自发性高血压大鼠随机分为手术组(30 只)和假手术组(A 组,等体积蒸馏水,10 只)。A 组剥离肾包膜,暴露肾脏后,关腹。手术组大鼠 14 d 内行 2 次手术切除 5/6 肾脏,术后 2 周按体质量分层随机分为模型组(B 组,等体积蒸馏水,10 只)及低、高剂量组[C_1 组、C_2 组,2.5,5.0 mg/(kg·d)苯磺酸左旋氨氯地平,各 10 只]。各组大鼠灌胃给药,每日 1 次,持续 6 周。监测大鼠尾动脉收缩压;术中检测大鼠稳定状态下颈动脉血压;采用双缩脲法定量检测大鼠 24 h 尿蛋白含量;使用全自动生化分析仪检测白细胞介素 6(IL－6)、超敏 C 反应蛋白(hs－CRP)、肿瘤坏死因子－α(TNF－α)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、血清肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)水平;观察大体肾脏形态,并采用显微镜观察大鼠肾组织病理形态学变化。**结果** 与 A 组干预 0,1,2,4,6 周比较,B 组大鼠尾动脉收缩压明显升高($P<0.05$);与 B 组同时点比较,C_1 组、C_2 组大鼠尾动脉收缩压明显降低($P<0.05$)。与 A 组干预后比较,B 组大鼠颈动脉压及 hs－CRP,IL－6,TNF－α,MDA 水平均明显升高,SOD,SCr,BUN 水平及 24 h 蛋白定量均明显降低($P<0.05$);与 B 组同时点比较,C_1 组、C_2 组大鼠各指标及病理结果均明显改善($P<0.05$)。**结论** 苯磺酸左旋氨氯地平对肾大部切除 SH 模型大鼠的残余肾功能有一定保护作用。

关键词:苯磺酸左旋氨氯地平;肾切除;自发性高血压;肾脏保护;大鼠

中图分类号:R965;R972+.4 **文献标志码:A** **文章编号:1006－4931(2021)22－0047－05**

Protective Effect of Levamlodipine Besylate on Kidney in Spontaneously Hypertensive Rats After Subtotal Nephrectomy

HOU Jing[1], LIN Yan[2], LIU Yong[1], WANG Yujie[1]

(1. Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, China 646000; 2. Institute of Oncology, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, China 646000)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of levamlodipine besylate on the kidney of spontaneous hypertension(SH) rats after 5/6 subtotal nephrectomy. **Methods** A total of 40 male SH rats were randomly divided into the operation group(30 rats) and sham operation group(group A, equal volume of distilled water, 10 rats). The renal capsule of rats in group A was stripped, the kidneys were exposed, and the abdomen was closed. The rats in the operation group were operated twice within 14 d to remove 5/6 kidney, and they were stratified and randomly divided into the model group(group B, equal volume of distilled water, 10 rats) and low－dose and high－dose groups[group C_1, group C_2, 2.5, 5.0 mg/(kg·d) of levamlodipine besylate, 10 rats in each group] according to their body weight at two weeks after the operation. Rats in each group were administered by gavage once a day for six weeks. The systolic blood pressure(SBP) of the rat's caudal artery was monitored. During the operation, the carotid pressure of rats with steady－state was detected. The 24 h urinary protein quantification of rats was quantitatively detected by the biuret method. The levels of interleukin－6(IL－6), high－sensitivity C－reactive protein(hs－CRP) and tumor necrosis factor－α(TNF－α), malondialdehyde(MDA), superoxide dismutase(SOD), serum creatinine(SCr) and blood urea nitrogen(BUN) were detected by the automatic biochemical analyzer. The gross renal morphology was observed, and the renal histomorphological changes were observed by the microscope. **Results** The SBP of rat's caudal artery in group B was significantly higher than that in group A after 0, 1, 2, 4 and 6 weeks of intervention($P<0.05$), while that in groups C_1 and C_2 was significantly lower than that in group B at the same time points($P<0.05$). After the intervention, the levels of carotid pressure, hs－CRP, IL－6, TNF－α and MDA in group B were significantly higher than those in group A, while the levels of SOD, SCr, BUN and 24 h urinary protein quantification in group B were significantly lower than those in group A($P<0.05$). Compared with group B at the same time points, the indexes and pathological results of rats in groups C_1 and C_2 were significantly improved($P<0.05$). **Conclusion** Levamlodipine besylate has a certain protective effect on residual renal function in SH rats after subtotal nephrectomy.

Key words: levamlodipine besylate; nephrectomy; spontaneous hypertension; renal protection; rat

*基金项目:四川省医学会科研课题[2016SHD005]。

第一作者:侯静,女,硕士,副教授,研究方向为慢性肾脏病及急性肾损伤的防治,(电子信箱)lzhj300024@163.com。

自发性高血压(SH)是以体循环动脉压升高为特征的综合征[1],若不及时干预,会影响心、脑、肾等重要脏器的功能,甚至引发器官功能衰竭,需尽早治疗,以减少终末事件的发生,保护靶器官,促使血压长期达标[2]。目前常用药物为钙离子拮抗剂,苯磺酸左旋氨氯地平属长效二氢吡啶类钙离子拮抗剂,钙拮抗活性是消旋体的 2 倍、右旋体的 1 000 倍,能通过改变细胞膜电位,减少钙离子内流,扩张外周小动脉,舒张血管平滑肌,降低外周血管阻力,促使血压下降[3]。有学者发现,钙拮抗剂在降低血压的同时,还可减轻对肾小球的损害,在一定程度上降低缺血带来的危险和减少局部自由基形成,缓解软组织钙化[4],但有待进一步证实。本研究中对比了常规剂量、大剂量用药对肾大部(5/6)切除 SH 模型大鼠肾脏功能的影响,为后期临床保护残余肾功能提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试药与动物

仪器:FinePointe NAM 型无创实验动物测试仪(美国 Buxco 公司);7170A 型全自动生化分析仪(日本 Hitachi 公司);Olympus CX33 型显微镜(南京贝登医疗股份有限公司);TG18KR 型离心机(上海舜制仪器制造公司);DN20 – 600 型三通管 – 电极 – 生命信息处理系统(河北鼎航管道制造有限公司)。

试药:苯磺酸左旋氨氯地平片(施慧达药业集团,批号为 180131,规格为每片 2.5 mg)、10% 水合氯醛(上海山浦化工有限公司,批号 121004);肿瘤坏死因子 – α(TNF – α)试剂盒(解放军总医院放免研究所,批号 20080820),白细胞介素 6(IL – 6)试剂盒(批号为 170894)、超敏 C 反应蛋白(hs – CRP)试剂盒(批号为 171094),均购自北京晶美公司;丙二醛(MDA)试剂盒(中山生物工程公司,批号为 2000427),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(英科新创科技有限公司,批号为 2010015113),血清肌酐(SCr)试剂盒(上海华科生物工程股份有限公司,批号为 20100112),血尿素氮(BUN)试剂盒(珠海珠厦药集团股份有限公司,批号为 20100205)。PAS,苏木素 – 伊红(HE)染色试剂盒。

动物:选取 2018 年 2 月至 2019 年 5 月福州医科大学实验动物中心生产的雄性 SH 大鼠 40 只,均为 16 周龄,平均体质量(204.56 ± 15.45)g。实验动物使用许可证号 SYXK(闽)2016 – 0006;适应性喂养 7 d,饲养笼相对湿度(65.2 ± 8.1)%、温度(22.5 ± 2.13)℃,保持良好通风和 12 h 黑暗/光照周期交替。每周更换 1 次高压消毒垫料,自由饮水(饮用水需高温高压消毒)、摄食。严格按国家科学技术委员会《实验动物管理条例》进行实验。

1.2 建模、分组与给药

将 40 只大鼠随机分为手术组(30 只)和假手术组(A 组,等体积蒸馏水,10 只)。A 组剥离肾包膜,暴露肾脏,关腹。手术组大鼠予 10% 水合氯醛麻醉后行背左侧切口,充分暴露左肾,将肾周围脂肪囊分离,结扎、离断上下极肾组织(如出血明显,用明胶海绵压迫片刻),最后复位肾脏后缝合切口,使结扎的肾脏因缺血而梗死;14 d 后,采取同样麻醉方式,切开右侧背部,结扎肾蒂,切除右肾,2 次手术需保证切除 5/6 肾脏。术后 2 周将手术组大鼠按体质量分层随机分为模型组(B 组,等体积蒸馏水,10 只),低剂量组[C_1 组,2.5 mg/(kg · d)苯磺酸左旋氨氯地平,10 只],高剂量组[C_2 组,5.0 mg/(kg · d)苯磺酸左旋氨氯地平,10 只]。各组大鼠均于每日上午 9:00 灌胃给药 1 次,持续 6 周。

1.3 观察指标

尾动脉收缩压:分别在干预前(0 周)及干预后 1,2,4,6 周上午 8:00 – 10:30 监测。将大鼠固定于仪器配套的鼠笼内,提前预热 15 min,待大鼠安静后,将其尾巴根部放于套袖中,按压,以每次 20 ~ 30 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa)的速率自动加压至脉搏波消失,维持 5 s 松气,收缩压为第 1 次波型,连续监测 5 次,每次间隔 3 min,取平均值。

颈动脉压:术前禁饮 8 h。测定前腹腔注射 10% 水合氯醛(0.35%/100 g),大鼠麻醉后固定于解剖台上,保持平卧位,剪去颈部正中范围毛发,逐层钝性分离组织直至颈总动脉,用手术缝线结扎远端血管,夹住近端血管,挑起血管,在血管上剪一斜口,肝素冲管,再连接三通管 – 电极 – 生命信息处理系统,缝线固定,松开动脉夹,待血压稳定后记录颈动脉压。

24 h 尿蛋白定量:干预前后分别收集代谢笼中大鼠 24 h 尿量,采用双缩脲法检测尿蛋白定量。

血生化指标和残余肾功能:测定颈动脉压后,打开腹腔,行腹主动脉采血,将收集的血清静置 30 min 后 3000 r/min 离心 15 min,收集上清液,置 – 80℃冰箱保存。检测 IL – 6,hs – CRP,TNF – α,MDA,SOD,SCr,BUN 水平。

肾组织形态学变化:迅速摘取各组大鼠肾脏,剥离筋膜,肉眼观察大体肾脏形态。并处理好肾脏组织后,纵向切开,取 1/2 组织放入甲醛内固定,用于病理切片 PAS 染色及 HE 染色。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件分析。计量资料以 $\overline{X} \pm s$ 表示,行 t 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 尾动脉收缩压

与 A 组干预后比较,B 组大鼠同时段的尾动脉收缩压明显升高($P < 0.05$);与 B 组同时段比较,C_1 组和 C_2 组大鼠尾动脉收缩压明显降低($P < 0.05$)。详见表 1。

2.2 颈动脉压

与 A 组干预后比较,B 组大鼠颈动脉压明显升高

表 1 各组大鼠尾动脉收缩压比较（$\bar{X} \pm s$，mmHg，$n=10$）

Tab. 1 Comparison of SBP of rat's caudal artery in each group（$\bar{X} \pm s$，mmHg，$n=10$）

组别	剂量(mg/kg)	给药前	给药后 1 周	给药后 2 周	给药后 4 周	给药后 6 周
A 组		151.22±7.16	151.23±6.65	150.45±6.35	150.36±5.42	150.62±5.68
B 组		162.58±8.46	157.63±7.49*	157.23±6.65*	157.46±7.65*	157.63±8.46*
C_1 组	2.5	162.29±8.31	130.65±5.46#	127.65±6.65#	124.46±5.36#	120.13±5.14#
C_2 组	5.0	162.37±8.32	126.39±6.35#	121.41±6.32#	120.49±6.32#	117.45±5.26#

注：与 A 组比较，* $P<0.05$；与 B 组比较，# $P<0.05$。下表同。

Note: Compared with those in group A, * $P<0.05$; Compared with those in group B, # $P<0.05$; as well as the following tables.

表 2 各组大鼠颈动脉压比较（$\bar{X} \pm s$，mmHg，$n=10$）

Tab. 2 Comparison of rat's carotid pressure in each group（$\bar{X} \pm s$，mmHg，$n=10$）

组别	剂量(mg/kg)	给药前	给药后 6 周
A 组		142.96±5.32	142.23±6.65
B 组		153.36±10.23	155.13±11.65*
C_1 组	2.5	153.39±10.41	110.13±10.14#
C_2 组	5.0	153.87±10.56	99.45±5.26#

（$P<0.05$）；与 B 组干预后比较，C_1 组和 C_2 组大鼠颈动脉压明显降低（$P<0.05$）。详见表 2。

2.3 血生化指标

与 A 组干预后比较，B 组大鼠血清 hs－CRP，IL－6，TNF－α，MDA 水平均明显升高，SOD 水平明显降低（$P<0.05$）；与 B 组干预后比较，C_1 组、C_2 组大鼠血清 hs－CRP，IL－6，TNF－α，MDA 水平均明显降低，SOD 明显升高（$P<0.05$）。详见表 3。

2.4 残余肾功能

与 A 组干预后比较，B 组大鼠 SCr，BUN，24 h 蛋白定量均明显升高（$P<0.05$）；与 B 组干预后比较，C_1 组、C_2 组大鼠 SCr，BUN，24 h 蛋白定量均明显降低（$P<0.05$）。详见表 4。

2.5 肾组织形态学观察

由图 1 可见，HE 染色下，A 组、C_1 组、C_2 组的残肾病理切片镜下可见肾小球节段性硬化，且增生程度不一，属基质增生。PAS 染色下，A 组残肾病理切片镜下可见肾小球内微小血栓形成，全球硬化，周围炎性细胞浸润，偶见球囊粘连；C_1 组可见肾小管－间质呈慢性病理改变，肾小管上皮细胞空泡变性及蛋白管型，肾间质纤维化及炎性细胞浸润，多灶状的肾小管萎缩；C_2 组可见肾小球硬化呈局灶节段性，囊腔变大或消失。

表 4 各组大鼠残余肾功能比较（$n=10$）

Tab. 4 Comparison of residual renal function of rats in each group（$\bar{X} \pm s$，$n=10$）

组别	剂量	SCr(μmol/L)		BUN(mg/dl)		24 h 蛋白定量(mg)	
	(mg/kg)	给药前	给药后 6 周	给药前	给药后 6 周	给药前	给药后 6 周
A 组		120.95±10.52	120.01±8.15	25.53±5.45	25.46±6.54	25.58±7.24	25.58±7.24
B 组		133.13±7.29	155.51±7.49*	32.35±6.55	37.55±3.35*	35.49±5.19	38.14±5.56*
C_1 组	2.5	133.52±7.86	121.25±7.86#	32.69±6.53	26.69±6.53#	35.63±5.19	26.63±4.19#
C_2 组	5.0	133.73±7.66	121.68±9.74#	32.27±6.41	25.45±7.19#	35.32±5.22	26.26±8.44#

3 讨论

SH 危害性较大，若血压长期不达标，可造成靶器官损害，甚至致残、致死[5]。SH 已成为终末期肾功能衰竭的主要病因之一，且我国高血压患者常合并肾功能损害，血压控制不佳将加剧肾功能损害，需合理用药以减少靶器官损害[6-7]。本研究中肾大部切除 SH 模型大鼠为实验对象，建模过程与人类慢性肾脏疾病的进展过程类似，操作相对简单、经济[8]。

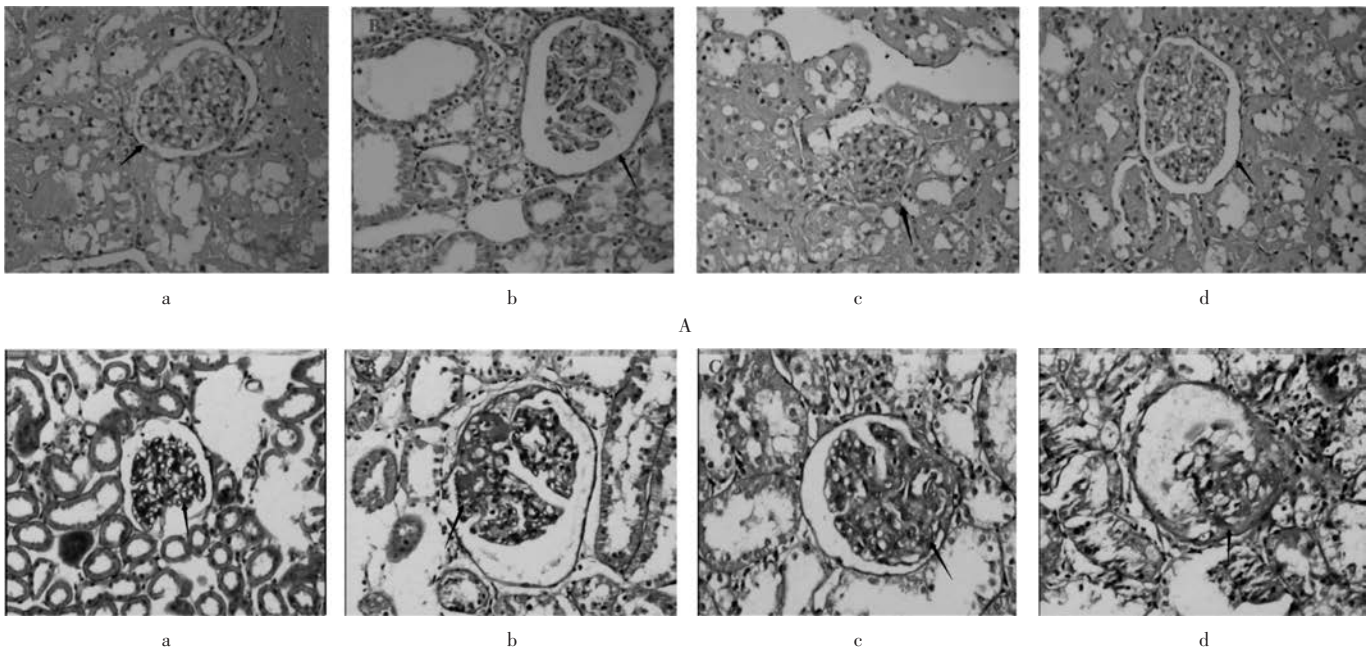
肾间质纤维化与肾脏细胞凋亡增多相关，而钙离子拮抗剂能抑制肾脏细胞凋亡[9]。苯磺酸左旋氨氯地平作用于肾出球小动脉和入球小动脉，能改善残余肾单位高代谢状态时，但不会改变肾小球膜通透性，还可阻止钙离子进入肾细胞内引起肾功能损害，有效降低去甲肾上腺素和血管紧张素Ⅱ对肾内的损害，有保护肾功能的作用[10-11]。本研究结果显示，C_1 组、C_2 组大鼠的 SCr，BUN，24 h 蛋白定量高于 A 组、B 组，且 C_2 组明显高于 C_1 组，说明用药干预后模型大鼠肾功能明显改善。主要因为苯磺酸左旋氨氯地平在降压期间并不会减少肾脏血流量，即便在达到降压目标值时，也不会影响血流动力学，可减轻对肾功能的影响[12-13]；其大剂量使用可更好地消除氧自由基，在一定程度上减少肾实质缺血危险，阻止局部自由基形成，缓解软组织钙化，有效保护肾脏功能[14-15]。

高血压肾损伤表现为系膜基质增生、肾小球硬化，血管活性物质平衡失调，炎性因子水平增加，血压升高[16]。本研究结果显示，C_1 组、C_2 组大鼠尾动脉收缩压、颈动脉压，以及 hs－CRP，IL－6，TNF－α，MDA 的降低幅度均明显大于 A 组和 B 组，说明苯磺酸左旋氨氯地平在抑制血管平滑肌细胞迁移、稳定血压、改善炎性因子水平

表 3 各组大鼠血生化指标比较（$\bar{X} \pm s$，$n=10$）

Tab. 3 Comparison of blood biochemical indexes of rats in each group（$\bar{X} \pm s$，$n=10$）

组别	hs－CRP(ng/mL)		IL－6(pg/mL)		TNF－α(pg/mL)		MDA(nmol/mL)		SOD(U/mL)	
	给药前	给药后 6 周	给药前	给药后 6 周	给药前	给药后 6 周	给药前	给药后 6 周	给药前	给药后 6 周
A 组	189.95±19.89	190.59±20.31	19.88±6.87	21.86±6.65	17.88±4.25	18.68±6.79	6.35±1.25	7.16±2.35	181.32±18.88	183.26±19.65
B 组	212.77±20.41	211.64±18.55*	31.33±2.45	32.65±4.15*	34.65±1.48	35.71±3.37*	10.73±1.49	11.46±2.16*	204.80±20.41	162.82±10.19*
C_1 组	212.78±20.32	191.65±18.46#	31.25±2.33	21.15±5.26#	34.12±1.23	18.45±3.62#	10.15±1.22	7.45±1.33#	204.36±20.32	184.56±15.46#
C_2 组	212.51±20.19	190.25±17.19#	31.44±2.57	21.23±4.29#	34.36±1.51	18.25±5.31#	10.79±1.31	7.61±1.29#	204.45±20.75	184.13±13.62#



a. A组 b. B组 c. C_1组 d. C_2组
A. HE染色 B. PAS染色

图1 大鼠肾脏组织病理图(×400)

a. group A b. group B c. group C_1 d. group C_2
A. HE staining B. PAS staining

Fig. 1 Histopathology of rat's kidney(×400)

中有一定作用。推测可能是该药中左旋体成分能在蛋白及转录水平中降低炎性反应,有效保护靶器官[17]。C_1组、C_2组血压、血生化指标比较无显著差异,表明苯磺酸左旋氨氯地平降压效果不受剂量影响。

综上所述,苯磺酸左旋氨氯地平可保护5/6肾切除SH模型大鼠的残余肾功能。但由于本研究样本量少,无法反映总体趋势,故需后期扩大样本进一步研究。

参考文献

[1] 郭书英,吴传亮,刘 卫,等. 缬沙坦氨氯地平联合治疗原发性高血压的临床有效性和安全性[J]. 解放军药学学报,2018,34(5):73-74.
[2] 黄炯华,宋代富,区德锦,等. 心肌自噬在肾去神经联合氨氯地平治疗高血压大鼠心肌肥厚中的作用[J]. 安徽医科大学学报,2018,53(10):1509-1512.
[3] 叶桃春,周小雄,吴 辉,等. 苯磺酸左旋氨氯地平对单纯收缩期高血压患者血压及变异率的影响[J]. 广东医学,2017,38(11):112-114.
[4] FENG P, SU JH, CHI RX, et al. Effect of amlodipine besylate combined with acupoint application of traditional Chinese medicine nursing on the treatment of renal failure and hypertension by the PI3K/AKT pathway[J]. International journal of Molecular Medicine,2019,43(4):1900-1910.
[5] 范利娟,姚鸿萍. 左旋氨氯地平治疗轻中度高血压患者的临床效果及药理分析[J]. 贵州医药,2020,44(6):910-912.
[6] 梁艳粉,马亚东. 左旋氨氯地平治疗轻中度高血压患者的临床效果[J]. 实用临床医药杂志,2019,23(14):107-110.
[7] 权中文. 苯磺酸左旋氨氯地平片治疗原发性高血压的效果研究[J]. 山西医药杂志,2020,49(21):71-72.
[8] 张 云,罗富健,王 莉,等. 马来酸左旋氨氯地平对高血压患者血压昼夜节律和清晨血压的影响[J]. 中国新药杂志,2016,25(10):1149-1152.
[9] POTUCEK P, RADIK M, DOKA G, et al. mRNA levels of circadian clock components Bmal1 and Per2 alter independently from dosing time-dependent efficacy of combination treatment with valsartan and amlodipine in spontaneously hypertensive rats[J]. Clinical and Experimental Hypertension,2017,39(8):754-763.
[10] 夏 南,张焕鑫,赵继先,等. 高盐饮食对自发性高血压大鼠肾脏的影响及左旋氨氯地平的作用[J]. 中国循证心血管医学杂志,2019,11(5):611-613.
[11] 沈丽莎,李锦伟,黄 珊,等. 左旋氨氯地平联合氯沙坦治疗2型糖尿病肾病合并高血压的疗效及对血压和肾功能的影响[J]. 现代生物医学进展,2016,16(14):2695-2698.
[12] 骆元正,贾秀丽,李瑞文,等. 苯磺酸左旋氨氯地平治疗原发性轻中度高血压的疗效和安全性再评价(随机、开放、阳性药平行对照)多中心临床研究[J]. 中华高血压杂志,2018,26(11):1067-1069.
[13] 杨雪莲,李列平. 川芎嗪注射液,α-酮酸联合左旋氨氯地平治疗慢性肾功能衰竭的临床观察[J]. 中国药房,2016,27(24):3371-3373.
[14] YU DR, JI LP, HE YH, et al. Study on effect of Baisha Green tea extract on blood pressure in treating spontaneous hypertension