

银杏叶提取物、卡托普利和缬沙坦抑制糖尿病肾病大鼠肾纤维化的机制及其比较

刘 晓¹, 汪建云¹, 鲁 茜¹, 董秉政², 印晓星^{1*}

(1. 徐州医学院 药理学系 临床药理学教研室, 江苏 徐州 221004; 2. 徐州医学院徐州临床学院, 江苏 徐州 221002)

摘 要:目的 研究银杏叶提取物 (GBE)、卡托普利和缬沙坦对糖尿病肾病 (DN) 大鼠肾纤维化的防治作用及其机制, 并比较它们对 DN 作用的异同, 从而为联合用药提供理论基础。方法 SD 大鼠一次性 ip 链脲佐菌素 (STZ) 60 mg/kg 诱导 DN 肾病模型。造模成功的 DN 大鼠随机分为 4 组: DN 组、GBE 治疗组 (100 mg/kg)、卡托普利治疗组 (10 mg/kg) 和缬沙坦治疗组 (15 mg/kg)。对照组及 DN 组 ig 给予 1% 羧甲基纤维素治疗。治疗 12 周后收集标本。电镜观察肾小球基底膜 (GBM) 厚度; 放射免疫法测定肾皮质层黏蛋白和 N 型胶原的量; 免疫组化法测定基质金属蛋白酶 2 (MMP2)、结缔组织金属蛋白酶抑制剂 2 (TIMP2) 和结缔组织生长因子 (CTGF) 蛋白表达; RT-PCR 法测定肾皮质转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) mRNA 的表达。结果 GBE、卡托普利和缬沙坦均能显著改善 DN 大鼠 GBM 增厚现象, 降低肾皮质中层黏蛋白和 N 型胶原的量。3 种药物一方面通过抑制直接促进细胞外基质 (ECM) 合成的 TGF- β_1 和 CTGF 的表达而抑制 ECM 的积聚, 另一方面通过其分解平衡系统 MMP2/TIMP2 而使 ECM 表达减少。并且发现 GBE 改善 GBM 的作用较卡托普利和缬沙坦弱, 而抑制肾皮质层黏蛋白和 N 型胶原的作用较强。结论 GBE、卡托普利和缬沙坦均可抑制 ECM 的大量表达, 并且 GBE 抑制 GBM 增厚的作用较其他两药弱, 而抑制肾皮质 ECM 的表达较其他两药强, 这对于临床联合用药具有非常重要的意义。

关键词: 银杏叶提取物; 卡托普利; 缬沙坦; 糖尿病肾病 (DN); 肾纤维化; 联合用药

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)04-0560-06.

Inhibitory mechanism of *Ginkgo biloba* extract, Captopril, and Valsartan on kidney fibrosis of diabetic nephropathy rats and their comparison

LIU Xiao¹, WANG Jian-yun¹, LU Qian¹, DONG Bing-zheng², YIN Xiao-xing¹

(1. Department of Clinical Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China;

2. Clinic Institute of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China)

Abstract: **Objective** To observe the preventive and therapeutic effects and the mechanisms of *Ginkgo biloba* extract (GBE), Captopril, and Valsartan on the early stage of diabetic nephropathy (DN) rats, and to compare the differences among them so as to establish the combination of medication. **Methods** Diabetes mellitus models of SD rats were induced by ip STZ and the developed DN rats were divided randomly into four groups; DN rats with 1% carboxymethyl cellulose (CMC) solution treated (DN group); DN rats with 100 mg/kg of GBE treated (GBE group), DN rats with 10 mg/kg of Captopril treated (CAP group), and DN rats with 15 mg/kg of Valsartan (VAL group). Rats of normal group (NS group) and DN group were treated with 1% CMC solution. After 12-week treatment, samples were collected. The ultrastructural morphology and thickness of glomerular base membrane (GBM) were observed under transmission electron microscope; Collagen IV and laminin in kidney cortex were detected by radioimmunity; MMP2 and TIMP2 proteins and CTGF were measured by immunohistochemistry; the expression of TGF- β_1 mRNA in kidney cortex were determined by a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** GBE, Captopril, and Valsartan could markedly reduce the thickness of GBM, decrease the contents of laminin and collagen IV of DN rats significantly. They could inhibit the expression of TGF- β_1 and CTGF which induced extracellular matrix (ECM) directly; On the other hand, they could ameliorate the disequilibrium of MMP2 and TIMP2. Furthermore, The effects of GBE on reducing the thickness of GBM were weaker than that of Captopril and Valsartan, and on suppressing the ECM of kidney cortex were stronger than that of the two drugs. **Conclusion** GBE, Captopril, and Valsartan could all inhibit the accumulation

收稿日期: 2007-07-18

基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目 (03KJ13360143)

作者简介: 刘 晓 (1965—), 男, 江苏徐州人, 讲师, 从事糖尿病肾病的研究。

Tel: (0516) 83262319 E-mail: dbzwjy7979@163.com

* 通讯作者 印晓星 Tel: (0516) 83262134 Fax: (0516) 83262136 E-mail: yinxx@xzmec.edu.cn

of ECM. Moreover, GBE has the weaker effects on decreasing the thickness of GBM than Captopril and Valsartan, and has the stronger effects on suppressing the ECM of kidney cortex than the two drugs, which means vitally to postpone kidney fibrosis of DN rats on the combination of medication.

Key words: *Ginkgo biloba* extracts (GBE); Captopril; Valsartan; diabetic nephropathy (DN); kidney fibrosis; combination of medication

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是终末期肾衰的主要原因之一,严重影响患者的生活质量和生存率,其病理特征为细胞外基质 (ECM) 的合成增多,肾小球基底膜 (GBM) 的增厚,最终引起肾纤维化。目前对 DN 的发病机制的研究还未完全明了,但大量的研究表明,转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 在 DN 发病机制中起着至关重要的作用,其下游因子结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 直接促进了 ECM 的大量表达^[1~3],而 ECM 的积聚与基质金属蛋白酶 (metalloproteinase, MMP) 及其抑制剂结缔组织金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP) 的表达失衡也密切相关^[4]。因此探讨它们在 DN 中的变化对于防治 DN 肾纤维化具有至关重要的意义。

银杏叶提取物 (*Ginkgo biloba* extract, GBE) 是从银杏叶中提取的活性部位,具有多种与 DN 防治有关的药理作用^[5,6]。目前已证实血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI) 和血管紧张素 I 受体拮抗剂 (Angiotensin I receptor antagonist, AT2RA) 有确切的肾保护作用^[7,8],但其具体机制尚未明确。本实验观察 GBE、卡托普利和缬沙坦对引起 DN 大鼠肾纤维化的相关因子如 TGF- β_1 、CTGF、MMP2、TIMP2、ECM 等指标的影响,探讨它们保护肾脏的可能机制,并将 GBE 对 DN 的作用与卡托普利和缬沙坦进行比较,从而为防治 DN 肾纤维化的联合用药提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物:健康雄性 SD 大鼠,体重 150~190 g,由徐州医学实验动物中心提供,实验动物合格证号:SYXK 2001-0050,实验前测大鼠血糖均正常。

1.2 药物及试剂:GBE (含黄酮苷类>24%,含萜类>6%,批号 040029) 由徐州邳州富伟技术有限公司赠与;链脲佐菌素 (STZ,批号 P7993b),美国 Sigma 公司;缬沙坦 (批号 050523),杭州默沙东公司;卡托普利 (批号 050050),常州制药有限公司;层黏蛋白试剂盒和 IV 型胶原试剂盒由上海海研医学研究所生物技术中心提供。总 RNA 提取试剂盒

(批号 182207) 及 RT-PCR 试剂盒 (批号 199676) 均购自美国 Promega 公司。

2 方法

2.1 DN 大鼠模型的建立:大鼠空腹 24 h 后一次性 ip STZ 60 mg/kg (临用前以 pH 4.5 的 0.1 mmol/L 枸橼酸缓冲液配制),对照组 (NS 组, $n=13$) 仅给等量的缓冲液。72 h 后尾静脉采血,采用葡萄糖氧化酶法测定血糖,血糖值 ≥ 13.88 mmol/L 的动物,则为糖尿病模型动物。将造模成功的 SD 大鼠随机分为 4 组:模型组 (DN 组, $n=13$)、GBE 治疗组 (GBE 组, $n=14$)、卡托普利治疗组 (CAP 组, $n=11$) 和缬沙坦治疗组 (VAL 组, $n=13$)。模型建立成功 1 周后,NS 组和 DN 组每日 ig 1% 羧甲基纤维素治疗,GBE 组、CAP 组、VAL 组每日分别 ig 100 mg/kg GBE、10 mg/kg 卡托普利、15 mg/kg 缬沙坦治疗。实验期间各组大鼠均自由饮水、进食,12 周后处死大鼠。左肾肾皮质以甲醛固定,进行免疫组织化学测定。右肾取 1 mm×1 mm 肾皮质以 2.5% 戊二醛固定作 GBM 电镜观察,剩余肾皮质量置于 -80 °C 冰箱保存。

2.2 GBM 厚度的测定:随机抽取每组 3 个样本用 1% 锇酸固定,双蒸水漂洗、醋酸铀快速染色。脱水、浸透、包埋、聚合及切片。电镜 (×6 000 倍) 下观察 GBM。每个样本取 5 个不同视野观察 GBM,用图像分析系统 (Leica Qwin Standard V2.6; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) 分析其平均厚度。

2.3 肾皮质 ECM 的检测^[9]:将低温保存的肾皮质标本吸干水分后制备均浆,加含 0.15 mol/L NaCl、0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.4 的匀浆液 5 mL,于冰水浴研成匀浆,2 000 r/min 离心 10 min,取上清液制成组织匀浆。加提取液 1 mL (提取液为 HAc 0.5 mol/L、胃蛋白酶 1 g/L),4 °C 抽提 18 h,取上清液。以放射免疫法测定 IV 型胶原和层黏蛋白的量,具体操作参照试剂盒说明书。

2.4 免疫组化测定:采用 PV 两步法。大鼠肾脏经甲醛固定后,梯度乙醇脱水、浸蜡、石蜡包埋、切片。石蜡切片作 MMP2、TIMP2、CTGF (购自博士德公司) 免疫组织化学染色。MMP2、TIMP2、CTGF —

抗为兔抗鼠抗体,工作滴度均为 1:50,二抗为羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶(北京中杉生物技术有限公司)。DAB 显色,40 倍显微镜下观察显色。每张切片选取 10 个视野进行灰度分析,以其平均灰度值作为其 MMP2、TIMP2、CTGF 的表达量。

2.5 RT-PCR 测定肾皮质 TGF- β_1 基因表达及其半定量分析:取 50 mg 肾皮质进行总 RNA 提取。采用 Promega 公司的逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)一步法进行 TGF- β_1 及内参照 β -actin 的基因扩增。TGF- β_1 上、下游引物分别为 5'-CCCGCATC-CCAGGACCTCTCT-3' 和 5'-CGGGGGACTGGC-GAGCCTTAG-3', 扩增长度为 512 bp; β -actin 上、下游引物分别为 5'-GCTGCGTGTGGC-CCCTGAG-3' 和 5'-ACGCAGGATGGCATGAG-GGA-3', 扩增长度为 252 bp。反应总体积为 50 μ L。扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C、1 min, 57 $^{\circ}$ C、50 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 共 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。将 TGF- β_1 与 β -actin 的 PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶中进行电泳。置于凝胶图像分析系统进行吸光度分析, 用 TGF- β_1 与 β -actin 吸光度的比值表示目的基因 TGF- β_1 mRNA 的相对表达量。

2.6 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用方差分析。

3 结果

3.1 大鼠 GBM 厚度及肾皮质 ECM 测定结果:电镜下观察 GBM, 可见 DN 组 GBM 呈不同程度的增厚, 同一小球内 GBM 厚度差异明显。脏层上皮细胞部分足突融合、增宽。而 GBE 组、CAP 组、VAL 组均有相应的改善(图 1)。用图像分析系统统计 GBM 的平均厚度, 并将测定的肾皮质 IV 型胶原和层黏蛋白结果进行统计, 发现 DN 组大鼠的 GBM 厚度及 IV 型胶原和层黏蛋白比对照组显著增多 ($P < 0.01$), GBE 组、CAP 组及 VAL 组的 GBM 的厚度、IV 型胶原和层黏蛋白水平比 DN 组显著降低 ($P < 0.01, 0.05$), 提示 3 种药物均可显著改善 DN 大鼠 GBM 增厚及肾皮质 ECM 大量堆积的病理改变(表 1)。进一步研究发现 GBE 改善 GBM 增厚的能力较卡托普利弱 ($P < 0.05$); 而对于层黏蛋白和 IV 型胶原积聚的改善作用较卡托普利和缬沙坦强 ($P < 0.05$)。而卡托普利、缬沙坦对 GBE 厚度、IV 型胶原和层黏蛋白的作用无显著性差异。



图 1 各组 GBM 的超微电镜照相

Fig. 1 Transmission electron micrographs of GBM in every group

表 1 GBE、卡托普利、缬沙坦对 DN 大鼠肾皮质 GBM 厚度及 IV 型胶原和层黏蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of GBE, Captopril, and Valsartan on thickness of GBM and levels of collagen IV and laminin in kidney cortex of DN rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	GBM 厚度/nm	IV 型胶原/(μ g $\cdot$ g $^{-1}$)	层黏蛋白/(μ g $\cdot$ g $^{-1}$)
NS	13	125.8 $\pm$ 12.8	0.31 $\pm$ 0.03	0.35 $\pm$ 0.05
DN	13	267.5 $\pm$ 30.0 ^{**}	0.55 $\pm$ 0.09 ^{**}	0.75 $\pm$ 0.16 ^{**}
GBE	14	171.4 $\pm$ 16.7 ^{##}	0.43 $\pm$ 0.05 ^{##}	0.48 $\pm$ 0.06 ^{##}
CAP	11	155.6 $\pm$ 15.9 ^{##Δ}	0.48 $\pm$ 0.05 ^{##Δ}	0.53 $\pm$ 0.04 ^{##Δ}
VAL	13	157.3 $\pm$ 17.1 ^{##}	0.46 $\pm$ 0.04 ^{##Δ}	0.53 $\pm$ 0.05 ^{##Δ}

与 NS 组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与 DN 组比较: ^{##} $P < 0.05$

^{##} $P < 0.01$; 与 GBE 组比较: ^{Δ} $P < 0.05$

^{**} $P < 0.01$ vs NS group; ^{##} $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs DN group; ^{Δ} $P < 0.05$ vs GBE group

3.2 大鼠肾皮质 MMP2、TIMP2、CTGF 的表达: 经免疫组化染色后, MMP2、TIMP2、CTGF 在肾小

球中染色呈棕褐色(图 2~4)。灰度分析发现, DN 组 CTGF 和 TIMP2 的表达较对照组显著增高, 而 MMP2 较对照组明显降低 ($P < 0.01$)。同时发现 GBE 抑制 CTGF 的作用较卡托普利和缬沙坦弱 ($P < 0.05, 0.01$)。GBE 对 MMP2 表达的增强作用较卡托普利强, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 较缬沙坦也强, 但无显著性意义。而 CAP 组和 VAL 组的 3 个指标差异无显著性(表 2)。

3.3 各组大鼠肾皮质 TGF- β_1 的基因表达: 从大鼠肾皮质提取的总 RNA 进行 TGF- β_1 mRNA 的 RT-PCR 扩增, 将其产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶中电泳, 可得分离清晰的条带(图 5-A)。用 TGF- β_1 与 β -actin 的吸光度比值表示 TGF- β_1 mRNA 的相对表达量, 见图 5-B。结果发现 DN 组 TGF- β_1 mRNA 较对照组明显升高 ($P < 0.01$), 而经过 GBE、卡托普利、



图 2 各组肾皮质 MMP2 的免疫组化染色

Fig. 2 Immunohistochemistry micrographs of MMP2 in kidney cortex in every group



图 3 各组肾皮质 TIMP2 的免疫组化染色

Fig. 3 Immunohistochemistry micrographs of TIMP2 in kidney cortex in every group



图 4 各组肾皮质 CTGF 的免疫组化染色

Fig. 4 Immunohistochemistry micrographs of CTGF in kidney cortex in every group

表 2 GBE、卡托普利、缬沙坦对 DN 大鼠肾皮质 MMP2、TIMP2 及 CTGF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of GBE, Captopril, and Valsartan on expressions of MMP2, TIMP2, and CTGF in kidney cortex of DN rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	MMP2	TIMP2	CTGF
NS	13	27.9±4.8	20.0±4.1	14.9±3.4
DN	13	15.5±5.5**	38.0±5.3**	34.2±6.7**
GBE	14	24.7±4.4**	29.9±3.6*	27.1±5.4*
CAP	11	18.7±4.3**△	26.2±4.5**	21.4±4.3**△
VAL	13	21.8±3.6*	27.9±3.9**	21.0±3.8**△△

与 NS 组比较: ** $P < 0.01$; 与 DN 组比较: * $P < 0.05$

** $P < 0.01$; 与 GBE 组比较: △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$

* $P < 0.01$ vs NS group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs DN group; △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ vs GBE group

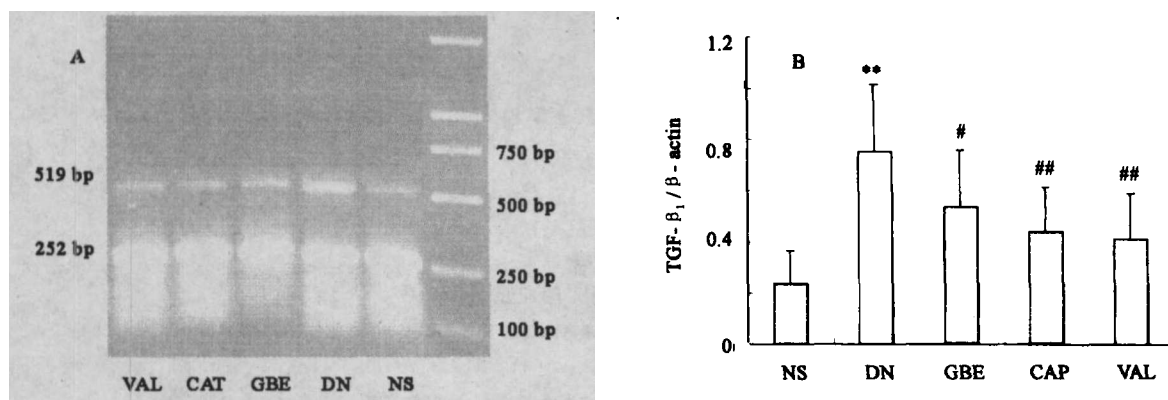
缬沙坦治疗后,其表达较 DN 组显著降低 ($P < 0.01, 0.05$)。

4 讨论

糖尿病肾病 (DN) 是常见的慢性并发症,是致残率和致死率较高的一个临床难题。目前认为其发病是由高血糖为始动因素所引起的血流动力学、代谢异常及细胞因子表达异常等多方面因素综合作用

的结果。其病理改变是以大量的 ECM 堆积、GBM 异常增厚、肾脏肥大特征的肾纤维化,最终导致肾功能衰竭。因此,寻求延缓 DN 肾纤维化进程的药物已成为目前全世界研究的热点。

正常的肾小球 ECM 从形态上分为 GBM 与系膜基质。IV 型胶原、层黏蛋白是 ECM 的主要成分。目前, $TGF-\beta_1$ 是公认的可引起多种疾病纤维化的细胞因子,是引起 ECM 大量表达的主要因子^[10]。糖尿病状态下, $TGF-\beta_1$ 表达大量增高。在细胞水平上也发现高糖可促使肾小球系膜细胞 $TGF-\beta_1$ 表达增高^[11]。因此有学者提出阻断 $TGF-\beta_1$ 可能不失为延缓纤维化的一个良策。但是研究发现,短期阻断 $TGF-\beta_1$ 的活性能抑制 ECM 的增加和减轻肾脏纤维化,而 $TGF-\beta_1$ 是一种多功能的细胞因子,除了致纤维化作用外,尚有抗增殖、抗炎等重要功能,长期抑制 $TGF-\beta_1$ 的活性将对机体产生不利影响^[10,12],为此人们不得不继续寻找其更加特异的作用途径,而 CTGF 被认为是 $TGF-\beta_1$ 的下游效应分子,可通过 Smads 信号直接参与纤维化过程^[13]。 $TGF-\beta_1$ 不仅导致了 CTGF 的表达增高,进而直接促使 ECM 的



A-TGF- β_1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳, β -actin 作为内参照; B-TGF- β_1 mRNA 的吸光度分析;

与 NS 组比较: ** $P < 0.01$; 与 DN 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

A-Agarose electrophoresis of RT-PCR products amplified from total RNA extracts of kidney cortex, β -actin was used as internal standard in each sample; B-RT-PCR data for relative quantity of TGF- β_1 mRNA performed by densitometric analysis;

** $P < 0.01$ vs NS group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs DN group

图 5 GBE、卡托普利、缬沙坦对 DN 大鼠肾皮质 TGF- β_1 mRNA 表达的影响

Fig. 5 Effects of GBE, Captopril, and Valsartan on relative TGF- β_1 mRNA expression of kidney cortex in DN rats

大量表达,更重要的是它引起了 ECM 合成/分解系统的失衡,即 TIMP 的表达增多和 MMP 的减少^[14]。这其中研究最多的是 MMP2/TIMP2。本实验中发现 DN 组肾皮质 TGF- β_1 比对照组表达明显增高,同时伴随着 CTGF 和 IV 型胶原、层黏蛋白的增高及 GBM 的增厚。而 ECM 的平衡系统中 TIMP2 表达增高, MMP2 表达降低。表明 DN 大鼠 ECM 的表达增高与其直接促进因子 TGF- β_1 和其下游因子 CTGF 的增高密切相关,同时与其分解酶 MMP2 的表达减少及抑制分解的酶 TIMP2 的表达增强也密不可分,也就是说 DN 情况下存在 MMP/TIMP 的表达失衡。这与同行学者的研究结果一致^[15,16]。

高血糖情况下,肾脏局部肾素-血管紧张素系统(RAS)活性增高,血管紧张素 I (Ang I) 合成增加, Ang I 既可直接导致肾脏血流动力学异常,还可作为重要的细胞因子作用于肾脏刺激 TGF- β_1 、ROS 和 ECM 的表达^[17]。目前,血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)和血管紧张素 II 受体拮抗剂(ARB)是公认的对糖尿病肾病具有保护作用的临床一线药物^[7,8]。

GBE 具有多种与 DN 防治有关的药理作用,如改善血流动力学状态、抑制血小板聚集、抗氧化、舒张血管平滑肌等^[5,6]。本实验以卡托普利和缬沙坦及天然药物 GBE 为目标药物,发现它们可显著地降低 TGF- β_1 和 CTGF 水平,即对 ECM 合成的直接促进因子有抑制作用;同时也发现它们可显著降低 TIMP2,增加 MMP2 的表达,从而最终减少 IV 型胶

原、层黏蛋白的表达,抑制 GBM 的增厚。也就是说,3 种药物一方面通过抑制直接促进 ECM 合成的 TGF- β_1 和 CTGF 的表达而抑制 ECM 的积聚,另一方面通过其分解平衡系统 MMP2/TIMP2 而使 ECM 表达减少。还发现,在本实验中,GBE 对 IV 型胶原、层黏蛋白的抑制作用比卡托普利强,而对 GBM 增厚的抑制作用较卡托普利弱($P < 0.05$ 、0.01),与缬沙坦相比,GBE 组 GBM 增厚、IV 型胶原、层黏蛋白的堆积也相对较弱。这提示在临床应用中,可将 GBE 和卡托普利或缬沙坦(尤其是卡托普利)联合使用,对于延缓 DN 肾纤维化将有十分重要的意义。探索其机制,发现 GBE 对 ECM 的分解酶 MMP2 表达的增强作用较卡托普利和缬沙坦较强,而对促进 ECM 合成的 CTGF 的抑制作用较两药低,理论上 GBE 对 GBM 和肾皮质 ECM 的抑制作用应该一致,但实验结果却并非如此,这说明在肾 ECM 的调节系统中还有其他因素,这将有待进一步探索。

参考文献:

- [1] Sharma K, McGowan T A. TGF-beta in diabetic kidney disease: role of novel signaling pathways [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000, 11: 115-123.
- [2] Sakharova O V, Taal M W, Brenner B M. Pathogenesis of diabetic nephropathy: focus on transforming growth factor-beta and connective tissue growth factor [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2001, 10: 727-738.
- [3] Lam S, van der Geest R N, Verhagen N A, et al. Connective tissue growth factor and igf-I are produced by human renal fibroblasts and cooperate in the induction of collagen production by high glucose [J]. *Diabetes*, 2003, 52: 2975-2983.
- [4] Woessner J F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling [J]. *FASEB J*, 1991, 5:

- 2145-2154.
- [5] Akisu M, Kultursay N, Coker I, *et al.* Flunarizine and *Ginkgo biloba* extract reduce PAF concentration in the brain [J]. *Biol Neonate*, 1998, 74: 439-444.
- [6] Haines D D, Bak L, Ferdinandy P, *et al.* Cardioprotective effects of the calcineurin inhibitor FK506 and the PAF receptor antagonist and free radical scavenger, EGB761, in isolated ischemic/reperfused rat hearts [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000, 35: 37-44.
- [7] Okada H, Watanabe Y, Kikuta T, *et al.* Bradykinin decreases plasminogen activator inhibitor-1 expression and facilitates matrix degradation in the renal tubulointerstitium under angiotensin-converting enzyme blockade [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15: 2404-2413.
- [8] 何新霞, 韩卫红, 薛燕, 等. 血管紧张素转换酶抑制剂和血管紧张素受体拮抗剂对糖尿病肾病患者肾功能的保护作用 [J]. 中国慢性病预防与控制, 2007, 15(1): 34-35.
- [9] 余路, 邱鸿鑫, 陈文缘, 等. 糖尿病大鼠糖基化终产物与主动脉细胞外基质成分的关系 [J]. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7(4): 311-314.
- [10] 汪建云, 印晓星. 糖尿病肾病中转化生长因子- β_1 信号转导与肾纤维化 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(4): 371-376.
- [11] Wang J Y, Yin X X, Wu Y M, *et al.* *Ginkgo biloba* extract suppresses hypertrophy and extracellular matrix accumulation in rat mesangial cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(9): 1222-1230.
- [12] 李能娟, 李红. TGF- β /Smad 信号通路及其在肾纤维化中的作用 [J]. 国际泌尿系统杂志, 2007, 21(1): 88-91.
- [13] Wahab N A, Weston B S, Mason R M. Modulation of the TGF-beta/Smad signaling pathway in mesangial cells by CTGF/CCN2 [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 307(2): 305-314.
- [14] Ruperez M, Ruiz-Ortega M, Esteban V, *et al.* Angiotensin I increases connective tissue growth factor in the kidney [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163: 1937-1947.
- [15] 朱昭明, 杨素琴, 吴以岭. 通络 1 号对高糖状态下大鼠肾系膜细胞金属蛋白酶 2 及其抑制物 2 mRNA 影响的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(2): 121-123.
- [16] 史玉玲, 程晓芸, 吴国亭, 等. 氯沙坦对糖尿病大鼠肾组织 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 表达的影响 [J]. 东南大学学报, 2006, 25(1): 28-31.
- [17] Yu L, Border W A, Anderson I, *et al.* Combining TGF-beta inhibition and angiotensin I blockade results in enhanced antifibrotic effect [J]. *Kidney Int*, 2004, 66: 1774-1784.

葛根素对低氧高二氧化碳性肺动脉高压大鼠右心室 Apelin/APJ 系统的影响

黄萍, 龚永生, 范小芳, 张琴辉, 毛孙忠*, 胡良冈

(温州医学院 肺心病研究室, 浙江 温州 325035)

摘要:目的 探讨葛根素防治慢性低氧高二氧化碳性肺动脉高压大鼠右心室肥大的效应是否与新的小分子活性肽 Apelin 及其受体 (APJ) 有关。方法 清洁级 SD 雄性大鼠 30 只, 随机分为对照组、低氧高二氧化碳模型组和葛根素组。放免法测定血浆与右心室组织匀浆的 Apelin-36 水平, RT-PCR 检测右心室组织 Apelin 与 APJ mRNA 表达。结果 右心室与左心室加室间隔的质量比 [RV/(LV+S)]: 模型组明显高于对照组 ($P < 0.01$), 而葛根素组明显低于模型组 ($P < 0.01$); 平均肺动脉压 (mPAP): 模型组明显高于对照组 ($P < 0.01$), 而葛根素组明显低于模型组 ($P < 0.05$); 平均颈动脉压 (mCAP) 各组间比较无显著统计学意义 ($P > 0.05$)。血浆 Apelin-36 水平: 模型组明显高于对照组 ($P < 0.01$), 葛根素组又高于模型组 ($P < 0.05$)。右心室肌匀浆 Apelin-36 水平: 模型组明显高于对照组 ($P < 0.05$), 葛根素组又明显比模型组高 ($P < 0.01$)。右心室肌 Apelin mRNA 水平: 模型组明显低于对照组 ($P < 0.05$), 而葛根素组显著高于模型组 ($P < 0.01$)。右心室肌 APJ mRNA: 模型组低于对照组 ($P < 0.05$), 而葛根素组高于模型组 ($P < 0.05$)。结论 葛根素防治低氧高二氧化碳性肺动脉高压大鼠右心室肥大的机制可能部分与调节 Apelin/APJ 系统有关。

关键词: 葛根素; Apelin/APJ; 右心室肥大; 肺动脉高压

中图分类号: R286, R563, R541.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)04-0565-05

Effect of puerarin on Apelin/APJ system in right ventricle of pulmonary hypertensive rats induced by hypoxia-hypercapnia

HUANG Ping, GONG Yong-sheng, FAN Xiao-fang, ZHANG Qin-hui, MAO Sun-zhong, HU Liang-gang

(Institute of Cor Pulmonale, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

收稿日期: 2007-08-27

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (206464)

作者简介: 黄萍 (1980—), 女, 浙江温州人, 硕士在读, 研究方向为肺动脉高压的机制与防治。

Tel: (0577) 86699521

* 通讯作者 毛孙忠 Tel: (0577) 86699521 E-mail: fxbwzmc@126.com