

养肝益水颗粒对高血压早期肾损害大鼠 Ang II/TRPC6/NF- κ B 通路的影响

沈丹琪¹, 戴小华², 杨帆², 王银燕², 邵正斌², 付军², 冉永玲², 袁良² (1. 六安市中医院, 安徽 六安 237000; 2. 安徽中医药大学第一附属医院, 国家中医心血管病临床医学研究中心分中心, 安徽省中医药科学院心血管病研究所, 安徽 合肥 230031)

摘要: **目的** 观察养肝益水颗粒对高盐高脂饮食诱导高血压早期肾损害 SD 大鼠血管紧张素 II (Ang II)/瞬时受体电位阳离子通道 6 (TRPC6)/核转录因子- κ B (NF- κ B) 通路的影响。**方法** 将 50 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、贝那普利组、养肝益水颗粒组、养肝益水颗粒+贝那普利组, 每组 10 只。模型组、贝那普利组、养肝益水颗粒组、养肝益水颗粒+贝那普利组喂养高盐高脂饲料制备实验模型, 周期为 6 周。6 周后, 贝那普利组给药贝那普利悬液 (0.9 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 养肝益水颗粒组给药养肝益水颗粒悬液 (2.7 g 生药·kg⁻¹·d⁻¹), 养肝益水颗粒+贝那普利组分别给药养肝益水颗粒悬液 (2.7 g 生药·kg⁻¹·d⁻¹)、贝那普利混悬液 (0.9 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 空白组、模型组灌胃相同量蒸馏水, 周期为 4 周。每周监测大鼠血压值, 给药前、后收集大鼠尿液测 ACR (白蛋白与尿肌酐的比值)、 β 2-微球蛋白 (β 2-MG), 留取大鼠血标本, 检测血清中血肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN)、Ang II 含量, 留取大鼠双肾标本, 观察大鼠肾脏组织病理变化, 检测肾脏组织中 Ang II、TRPC6、NF- κ B 等蛋白含量。**结果** 与空白组对比, SD 大鼠经高盐高脂饲料喂养 6 周后, 模型组、贝那普利组、养肝益水颗粒组、养肝益水颗粒+贝那普利组收缩压、尿 ACR、 β 2-微球蛋白、血清 Ang II、肾脏组织 Ang II、TRPC6、NF- κ B 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.01$); 给药 4 周后, 与模型组相比, 贝那普利组、养肝益水颗粒组、养肝益水颗粒+贝那普利组收缩压、尿 ACR、 β 2-微球蛋白、血清 Ang II、肾脏组织 Ang II、TRPC6、NF- κ B 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.01$); 与贝那普利组相比, 养肝益水颗粒组各检测指标较贝那普利组高, 养肝益水颗粒+贝那普利组各检测指标较贝那普利组低。肾脏组织病理变化显示, 空白组肾组织结构正常, 模型组肾脏结构可见明显异常, 贝那普利组、养肝益水颗粒组、养肝益水颗粒+贝那普利组干预后肾脏病理均有不同程度的改善。**结论** 养肝益水颗粒可能通过抑制 Ang II/TRPC6/NF- κ B 信号通路发挥肾脏保护作用, 联合贝那普利则疗效更优。

关键词: 养肝益水颗粒; 高血压早期肾损害; Ang II/TRPC6/NF- κ B 通路; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2022)02-0187-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.02.007

Effect of *Yanggan Yishui* Granules on Ang II/TRPC6/NF- κ B Pathway in Rats with Early Renal Damage of Hypertension

SHEN Danqi¹, DAI Xiaohua², YANG Fan², WANG Yinyan², SHAO Zhengbin², FU Jun², RAN Yongling², YUAN Liang² (1. Lu'an Chinese Medicine Hospital, Lu'an 237000 Anhui, China; 2. First Hospital Affiliated to Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Branch of National Clinical Research Center for Chinese Medicine Cardiology, Institution of Cardiovascular Disease, Anhui Academy of Chinese Medicine Sciences, Hefei 230031 Anhui, China)

Abstract: Objective To observe the effect of *Yanggan Yishui* granules on Ang II/TRPC6/NF- κ B pathway in SD rats with early renal damage induced by high-salt and high-fat diet. **Methods** 50 SD rats were randomly divided into blank group, model group, benazepril group (ACEI group), *Yanggan Yishui* granules group (YGYS group),

收稿日期: 2021-08-02

作者简介: 沈丹琪, 女, 硕士, 研究方向: 中医药防治心血管疾病。Email: 1037459842@qq.com。通信作者: 戴小华, 男, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中医药防治心血管疾病。Email: xin_d3980@163.com。

基金项目: 安徽省中医药领军人才资助项目(中医药发展秘[2018]23号)。

Yanggan Yishui granules + benazepril group (YGYS + ACEI group), 10 rats per group. The model group, ACEI group, YGYS group, and YGYS+ACEI group were fed with high-salt and high-fat diet to prepare experimental models. The period was 6 weeks. After 6 weeks, the ACEI group was given benazepril suspension ($0.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), the YGYS group was given *Yanggan Yishui* granules suspension ($2.7 \text{ g crude drug} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and the YGYS+ACEI group was given *Yanggan Yishui* granules suspension ($2.7 \text{ g crude drug} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), benazepril suspension ($0.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), respectively. The blank group and the model group were simultaneously given the same amount of distilled water. All groups were administered for 4 weeks. We monitored the blood pressure of rats every week, collected rat urinary to determine ACR (urinary albumin to creatinine ratio) and $\beta 2$ -MG ($\beta 2$ -microglobulin) before and after administration. Blood specimens of rats were kept and subjected to detect the contents of SCR, BUN, Ang II in serum. Kidney specimens of rats were collected for the observation of pathological changes and the detection of Ang II, TRPC6, NF- κ B and other proteins. **Results:** Compared with the blank group, systolic blood pressure, urine ACR, $\beta 2$ -MG, serum Ang II, protein expressions of Ang II, TRPC6 and NF- κ B in kidney tissue were significantly increased ($P < 0.01$) in the model group, ACEI group, YGYS group and ACEI+YGYS group after SD rats were modeled for 6 weeks. Compared with the model group, systolic blood pressure, urine ACR, $\beta 2$ -MG, serum Ang II, protein expressions of Ang II, TRPC6, and NF- κ B in kidney tissue were significantly reduced ($P < 0.01$) in ACEI group, YGYS group and ACEI+YGYS group after 4 weeks of administration. Compared with ACEI group, the detection indexes of YGYS group were higher than those of ACEI group, and the detection indexes of ACEI+YGYS group were lower than those of the ACEI group. Pathological changes of kidney tissue showed that the structure of kidney tissue in the blank group was normal, and the kidney structure in the model group was obviously abnormal. The renal pathology in ACEI group, YGYS group, and YGYS+ACEI group was improved to varying degrees after intervention. **Conclusion** *Yanggan Yishui* granules may exert renal protection by inhibiting Ang II/TRPC6/NF- κ B signaling pathway. Moreover, the combined therapy with benazepril is more effective.

Keywords: *Yanggan Yishui* granules; early renal damage in hypertension; Ang II/TRPC6/NF- κ B pathway; rats

高血压靶器官损害机制颇为复杂, 其中肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS 系统)是参与血压调节及导致靶器官损害的重要机制之一^[1]。RAAS 系统活化, 血液中的血管紧张素 II (Ang II) 升高, 诱导足细胞上瞬时受体电位阳离子通道 6 (TRPC6) 活化^[2], 激活核转录因子- κ B (NF- κ B)^[3], 足细胞因此损伤, 肾脏进一步被损害^[4]。故而认为 TRPC6/NF- κ B 信号通路可能参与了 Ang II 损伤足细胞, 致高血压肾损害过程。

养肝益水颗粒为安徽中医药大学第一附属医院院内制剂, 临床用于肝肾阴虚、瘀阻肾络型高血压肾损害的防治, 该方由枸杞子、盐菟丝子、黄芪、怀牛膝、丹参、芡实等组成, 以补为主, 补泻共施, 共奏抑肝阳、滋肾阴、通脉络、固精微之效^[5-7]。前期研究^[8-10]证明, 养肝益水颗粒可降低自发性高血压大鼠 (SHR) 血压、内皮素-1 (ET-1) 水平, 提高一氧化氮 (NO) 水平, 减少肾脏对尿微量蛋白 (MA)、 $\beta 2$ -微球蛋白 ($\beta 2$ -MG) 的排泄以及降低肾小球胶原蛋白

含量的作用, 可通过降低肾脏局部 Ang II、转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 及结缔组织生长因子 (CTGF) 的表达而发挥肾脏保护作用。

本研究通过高盐高脂饮食诱导 SD 大鼠高血压早期肾损伤模型, 观察养肝益水颗粒对模型大鼠肾脏组织 Ang II、TRPC6 和 NF- κ B 等蛋白表达水平的影响, 进一步探讨养肝益水颗粒防治高血压早期肾损害的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 50 只正常雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体质量 180~200 g, 8 周龄。购自北京维通利华公司, 许可证号: SCXK(皖)2017-0001, 动物质量合格证号: 34000200001377。喂养于安徽中医药大学动物房, 温度: 20~25 °C, 相对湿度: 50%~60%。每日更换 1 次垫料。标准饲料和高盐高脂饲料(每 1 kg 饲料中含有标准饲料 708 g、80 g NaCl、10 g 胆固醇、2 g 牛胆盐、100 g 蛋黄粉、100 g 猪油), 购自江苏

省协同医药公司, 苏饲证(2019)01008。

1.2 实验药物及试剂 养肝益水颗粒(皖药制字 Z20070005), 安徽中医药大学第一附属医院院内制剂; 盐酸贝那普利片, 北京诺华制药有限公司, 国药准字: H20000292, 批号: X0503, 规格: 每片 5 mg。肌酐(Scr)、尿素氮(BUN), 南京建成生物工程研究所, 批号分别为: 20210113、20210112; 大鼠尿微量白蛋白(ALB)、大鼠 β 2-微球蛋白、大鼠血管紧张素 II (Ang- II) 试剂盒, 泉州市睿信生物科技有限公司, 批号均为 2021-01; β -Actin、山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG、PBS 缓冲液粉末、过氧化物酶封闭液、通用型二抗试剂盒、DAB 显色试剂盒, 北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号分别为: 19AW0505、142637、139931、19071101、18070201、18G48D07、108038A08; TRPC6, 美谷生物科技(浙江)有限公司, 批号: 0031760201; Ang II、NF- κ B 抗体, 美国 Affinity 公司, 批号分别为: 28i1953、84y0079; 预染蛋白 Marker、ECL 超敏发光试剂盒, 美国 Thermo 公司, 批号分别为: 00784045、S1257444; 苏木素染色液、伊红染色液(醇溶性), 珠海贝索生物技术有限公司, 批号分别为: C190903、719041。

1.3 实验仪器 11000592 型六通道自动无创血压测试分析系统, 美国 IITC 公司; RT-6100 型酶标分析仪, 美国雷杜公司; EPS300 型电泳仪、VE-180 型电泳槽、VE-186 型转膜仪, 上海天能科技有限公司; LX 300 型常温微量离心机, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; JW-3021HR 型高速冷冻离心机, 安徽嘉文仪器装备有限公司; TS-1000 型水平摇床, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; DHG-9070 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海三发科学仪器有限公司; FA2004N 型电子天平, 上海菁海仪器有限公司; JS-M6P 型自动曝光仪, 上海培清科技有限公司; KD-TS3A 型生物组织自动脱水机, 金华市科迪仪器设备有限公司; Tissue-TEKRTECTM 型生物组织包埋机, 日本 SAKURA 公司; Shandon Finesse325 型徕卡切片机, 美国 Therom 公司; HI1210 生物组织摊烤片机, 瑞士 Leica 公司; Nikon eclipse 50i 型显微镜, 日本 Nikon 公司。

1.4 实验分组及模型复制 将 50 只 SD 大鼠随机分为 5 组, 即空白组、模型组、贝那普利组(ACEI 组)、养肝益水颗粒组(YGYS 组)、养肝益水颗粒+贝那普利组(YGYS+ACEI 组), 每组 10 只。实验中, 空白组、模型组大鼠灌胃治疗时各死亡 1 只; 模型组因互相撕咬打架致死 1 只; 因夜间代谢笼所在实验室

温度低, 养肝益水颗粒组、贝那普利组分别死亡 2 只、1 只; 养肝益水颗粒+贝那普利组大鼠未出现死亡。

除空白组外, 另 4 组予高盐高脂饲料饲养 6 周, 每周均监测 5 组大鼠血压。模型^[11-12]复制 6 周后, 给药前、后收集尿液, 测定尿 ACR(白蛋白与尿肌酐的比值)、 β 2-微球蛋白浓度。与空白组比, 模型组、贝那普利组、养肝益水颗粒组、养肝益水颗粒+贝那普利组大鼠血压值及尿 ACR、 β 2-微球蛋白浓度均明显升高, 即视为高血压早期肾损害 SD 大鼠模型建立成功。

1.5 实验给药 ①贝那普利组: 盐酸贝那普利混悬液(浓度: $0.18 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), $0.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃; ②养肝益水颗粒组: 养肝益水颗粒混悬液(浓度: $0.54 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 2.7 g 生药 $\cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃; ③养肝益水颗粒+贝那普利组: 养肝益水颗粒混悬液(浓度: $0.54 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 2.7 g 生药 $\cdot \text{kg}^{-1}$, 早上灌胃; 贝那普利混悬液(浓度: $0.18 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), $0.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 晚上灌胃。④空白组及模型组: 等量蒸馏水, 灌胃。每日 1 次, 连续灌胃 4 周。

1.6 观察及检测指标

1.6.1 大鼠尾动脉血压 于实验开始后, 每周测大鼠尾动脉收缩压(SBP)。测压前将仪器预热至 $36 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 维持恒定温度, 将大鼠装入透明圆筒中, 套管穿过大鼠尾部, 离尾端越近测量越准。打开软件及测压仪, 当波形规律时读取血压值。尽量减少打开仪器滑盖次数, 保持环境安静。连续 3 次测大鼠收缩压, 取平均值作为结果。

1.6.2 大鼠尿中 ACR、 β 2-微球蛋白含量 于给药前 1 d 和实验结束前 1 d 代谢笼留取各组大鼠尿液。使用代谢笼前先清洗, 防止尿液被不明因素污染。每个代谢笼仅放 1 只老鼠, 禁食不禁水。用 100 mL 的平底离心管, 收集大鼠夜间 12 h 尿液。混匀后在 $-4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 实验结束后统一检测。

1.6.3 大鼠血清肌酐、尿素氮含量 于实验结束前测量血压后, 腹膜内注射 10% 水合氯醛将大鼠麻醉, 固定在鼠板上。打开大鼠腹腔, 腹主动脉采血。抗凝管收集血标本, $-4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 实验结束统一检测, 以 $1\ 000 \times \text{g}$ 离心 20min, 取上清。

1.6.4 大鼠血清 Ang II 含量 血清制备及检测操作同“1.6.3”项。

1.6.5 Western Blot 法检测大鼠肾脏 Ang II、TRPC6、NF- κ B 蛋白表达水平 腹主动脉取血后取大鼠双肾。取右肾, 称取 100 mg 组织, 加入 1 mL 细胞裂

解液；于 4 ℃、12 000×g 离心 10 min，取上清；按 1:4 的比例将收集的蛋白样品加入蛋白上样缓冲液，充分变性蛋白；冷却后加入到配置好的 SDS-PAGE 凝胶样孔内，每孔加 30 μg 即可；转膜 2 h；蛋白膜经洗涤后，封闭 2 h；一抗、二抗孵育后检测蛋白；收集图像并分析。

1.6.6 HE 染色观察大鼠肾脏组织形态学 取左侧肾脏石蜡切片，过二甲苯、乙醇；切片经自来水慢冲洗透明；苏木素染液后，自来水多次冲洗；盐酸酒精溶液分化数秒，多次水洗；稀碳酸锂水溶液蓝化，多次水洗；切片先 80%乙醇脱水后，伊红染色液（醇溶性）染色；95%乙醇调色；100%乙醇脱水，二甲苯透明；封片；拍片取图并分析。

1.6.7 电镜下观察大鼠肾脏组织形态学 取大鼠右肾组织（体积一般不超过 1 mm³），投入电镜固定液 4 ℃固定，PBS 漂洗；放入锇酸中固定，PBS 漂洗；梯度脱水；渗透后放入烤箱中包埋；超薄切片机切片；

铀铅双染色；电镜下观察，采集图像分析。

1.7 统计学处理方法 采用 SPSS 24.0 统计软件。数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠血压变化 见表 1。与空白组比较，模型组、贝那普利组、养肝益水颗粒组、养肝益水颗粒+贝那普利组 SD 大鼠经高盐高脂饲料喂养 6 周后，收缩压均明显升高($P < 0.01$)。给药 4 周后，与空白组比较，模型组收缩压明显升高($P < 0.01$)；与模型组比较，贝那普利组、养肝益水颗粒组、养肝益水颗粒+贝那普利组收缩压均明显降低($P < 0.01$)；与贝那普利组比较，养肝益水颗粒组收缩压较贝那普利组高($P < 0.05$)，养肝益水颗粒+贝那普利组收缩压较贝那普利组低($P < 0.05$)，差异均有统计学意义。

表 1 各组大鼠血压的变化($\bar{x} \pm s$, mmHg)

Table 1 Changes of blood pressure in rats($\bar{x} \pm s$, mmHg)

组别	鼠数/只	模型复制前	给药前(模型复制 6 周后)	给药 4 周后
空白组	9	106.80 ± 2.09	108.85 ± 2.83	107.72 ± 1.09
模型组	8	106.52 ± 0.86	166.83 ± 2.50 ^{▲▲}	171.42 ± 2.49 ^{▲▲}
贝那普利组	9	107.41 ± 4.18	169.97 ± 3.85 ^{▲▲}	154.34 ± 5.93 ^{**}
养肝益水颗粒组	8	109.70 ± 0.97	169.42 ± 2.54 ^{▲▲}	159.08 ± 3.61 ^{**△}
养肝益水颗粒+贝那普利组	10	108.37 ± 3.42	168.70 ± 3.71 ^{▲▲}	148.21 ± 2.78 ^{**△}

注：与空白组比较，^{▲▲} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ ；与贝那普利组比较，[△] $P < 0.05$

2.2 大鼠尿 ACR、β2-微球蛋白含量变化 见表 2。模型复制 6 周后，与空白组比较，模型组、贝那普利组、养肝益水颗粒组、养肝益水颗粒+贝那普利组 SD 大鼠尿 ACR、β2-微球蛋白含量明显升高($P < 0.01$)，结合“2.1”项下显示收缩压均明显升高($P < 0.01$)，说明模型复制成功。给药 4 周后，与空白组比较，模型组大鼠尿 ACR、β2-微球蛋白含量均明显

升高($P < 0.01$)；与模型组比较，贝那普利组、养肝益水颗粒组、养肝益水颗粒+贝那普利组 SD 大鼠尿 ACR、β2-微球蛋白含量均明显降低($P < 0.01$)；与贝那普利组比较，养肝益水颗粒组 SD 大鼠尿 ACR 和 β2-微球蛋白含量较贝那普利组高($P < 0.05$)，养肝益水颗粒+贝那普利组 SD 大鼠尿 ACR 和 β2-微球蛋白含量较贝那普利组低($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠尿 ACR、β2-微球蛋白(β2-MG)含量的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Changes of urine ACR and β2-MG in rats($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数/只	ACR/(mg·mL ⁻¹)		β2-微球蛋白/(ng·mL ⁻¹)	
		给药前(模型复制 6 周后)	给药 4 周后	给药前(模型复制 6 周后)	给药 4 周后
空白组	9	14.93 ± 6.53	14.59 ± 2.87	22.38 ± 0.17	22.18 ± 0.51
模型组	8	35.37 ± 7.37 ^{▲▲}	43.65 ± 2.27 ^{▲▲}	31.37 ± 1.91 ^{▲▲}	34.30 ± 4.35 ^{▲▲}
贝那普利组	9	34.50 ± 8.18 ^{▲▲}	20.58 ± 6.29 ^{**}	32.95 ± 2.66 ^{▲▲}	27.30 ± 1.62 ^{**}
养肝益水颗粒组	8	34.38 ± 5.16 ^{▲▲}	22.35 ± 8.64 ^{**△}	32.41 ± 1.86 ^{▲▲}	30.41 ± 1.62 ^{**△}
养肝益水颗粒+贝那普利组	10	35.24 ± 6.66 ^{▲▲}	17.99 ± 4.70 ^{**△}	32.42 ± 0.50 ^{▲▲}	25.34 ± 0.45 ^{**△}

注：与空白组比较，^{▲▲} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ ；与贝那普利组比较，[△] $P < 0.05$

2.3 大鼠血清肌酐、尿素氮的变化 见表 3。与空白组比较, 模型组、贝那普利组、养肝益水颗粒组、养肝益水颗粒+贝那普利组 SD 大鼠血清肌酐、尿素氮含量的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠血清肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Changes of serum Scr and BUN in rats($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数/只	肌酐/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	尿素氮/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
空白组	9	251.12 \pm 43.55	2.46 \pm 0.40
模型组	8	282.64 \pm 53.01	2.78 \pm 0.72
贝那普利组	9	290.75 \pm 87.14	2.80 \pm 0.28
养肝益水颗粒组	8	247.75 \pm 56.62	2.42 \pm 0.27
养肝益水颗粒+贝那普利组	10	261.80 \pm 62.90	2.57 \pm 0.30

2.4 大鼠血清 Ang II 的变化 见表 4。与空白组比较, 模型组血清 Ang II 升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 贝那普利组、养肝益水颗粒组、养肝益水颗粒+贝那普利组血清 Ang II 均降低($P < 0.05$)。与贝那普利组比较, 养肝益水颗粒组血清 Ang II 较贝那普利组高, 养肝益水颗粒+贝那普利组血清 Ang II 较贝那普利组低, 但差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 4 各组大鼠血清血管紧张素 II (Ang II) 的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Changes of serum Ang II in rats($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数/只	Ang II/($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
空白组	9	41.24 \pm 11.58
模型组	8	101.53 \pm 31.93 [▲]
贝那普利组	9	80.51 \pm 8.01 [*]
养肝益水颗粒组	8	85.60 \pm 8.83 [*]
养肝益水颗粒+贝那普利组	10	71.80 \pm 12.58 [*]

注: 与空白组比较, [▲] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$

2.5 大鼠肾组织 Ang II、TRPC6、NF- κ B 等蛋白表达变化 见图 1、表 5。与空白组比较, 模型组肾组织中 Ang II、TRPC6、NF- κ B 蛋白水平升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 养肝益水颗粒组、贝那普利组、养肝益水颗粒+贝那普利组肾组织中 Ang II、TRPC6、NF- κ B 蛋白水平均降低($P < 0.01$)。与贝那

普利组比较, 养肝益水颗粒组肾组织中 Ang II、TRPC6、NF- κ B 蛋白水平较贝那普利组高, 但差异无统计学意义($P > 0.05$); 养肝益水颗粒+贝那普利组肾组织中 Ang II、TRPC6、NF- κ B 蛋白水平较贝那普利组低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

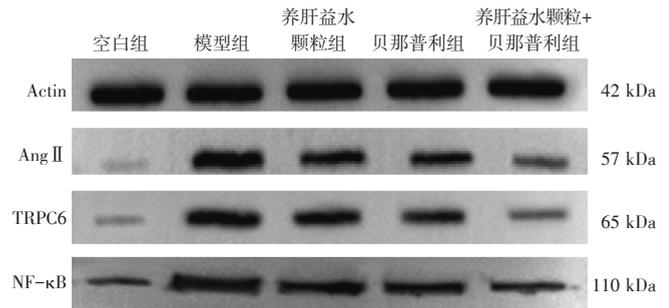


图 1 各组大鼠肾组织血管紧张素 II (Ang II)、TRPC6、NF- κ B 蛋白表达条带

Figure 1 Expression of Ang II, TRPC6 and NF- κ B protein in rat kidney tissue

2.6 肾脏组织 HE 染色 见图 2。空白组大鼠肾组织结构正常, 肾小球肾小管无异常。模型组大鼠肾组织结构明显异常, 视野中可见部分肾小球发生萎缩; 附近肾小球代偿性肥大, 系膜细胞数量明显增多, 肾小球囊腔异常, 基底膜增厚; 部分肾小管上皮细胞水肿, 胞浆疏松。养肝益水颗粒组大鼠肾组织结构中度异常, 视野中可见肾小球系膜细胞数量明显增多; 肾小管上皮细胞水肿, 胞浆疏松。贝那普利组大鼠肾组织结构轻度异常, 视野中可见分叶程度较轻的部分肾小球, 系膜细胞数量增多; 肾小管未见异常。养肝益水颗粒+贝那普利组组织结构轻度异常, 视野中肾小球未见损伤, 系膜细胞无增生; 仅有少量肾小管上皮细胞发生水肿、程度较轻。

2.7 肾脏组织超微结构 见图 3。空白组肾小球相对正常, 基底膜厚薄均一, 基质均匀, 三层结构完整, 足细胞结构尚佳, 足突未见明显融合, 结构尚可, 粗细均一, 结构清晰。模型组肾脏组织损伤相对严重, 肾小囊腔消失, 足细胞中度水肿, 基底膜

表 5 各组大鼠肾组织血管紧张素 II (Ang II)、TRPC6、NF- κ B 蛋白表达水平的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Protein expressions of Ang II, TRPC6 and NF- κ B in rat kidney tissue($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数/只	Ang II	TRPC6	NF- κ B
空白组	9	0.12 \pm 0.04	0.40 \pm 0.02	0.15 \pm 0.05
模型组	8	0.96 \pm 0.07 ^{▲▲}	1.63 \pm 0.07 ^{▲▲}	0.99 \pm 0.06 ^{▲▲}
贝那普利组	9	0.54 \pm 0.07 ^{**}	0.97 \pm 0.06 ^{**}	0.58 \pm 0.08 ^{**}
养肝益水颗粒组	8	0.60 \pm 0.03 ^{**}	1.03 \pm 0.06 ^{**}	0.63 \pm 0.05 ^{**}
养肝益水颗粒+贝那普利组	10	0.28 \pm 0.04 ^{**△}	0.61 \pm 0.01 ^{**△}	0.31 \pm 0.06 ^{**△}

注: 与空白组比较, ^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与贝那普利组比较, [△] $P < 0.05$

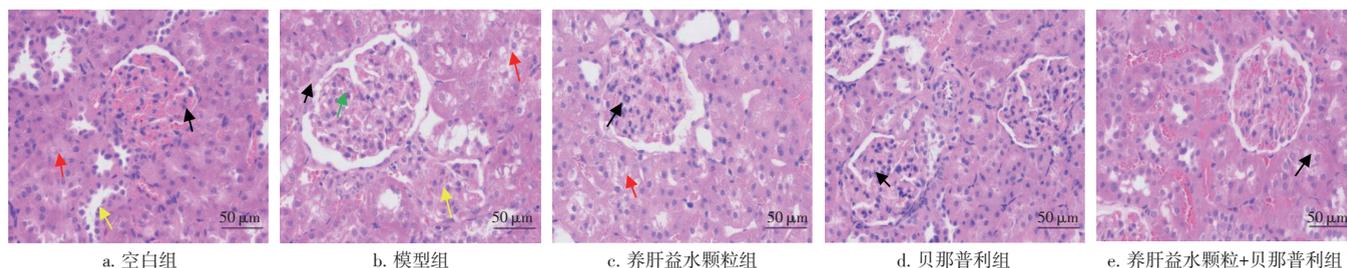


图 2 各组肾脏组织形态变化(HE 染色, ×400)

Figure 2 Morphological changes of rat kidney(HE staining, ×400)

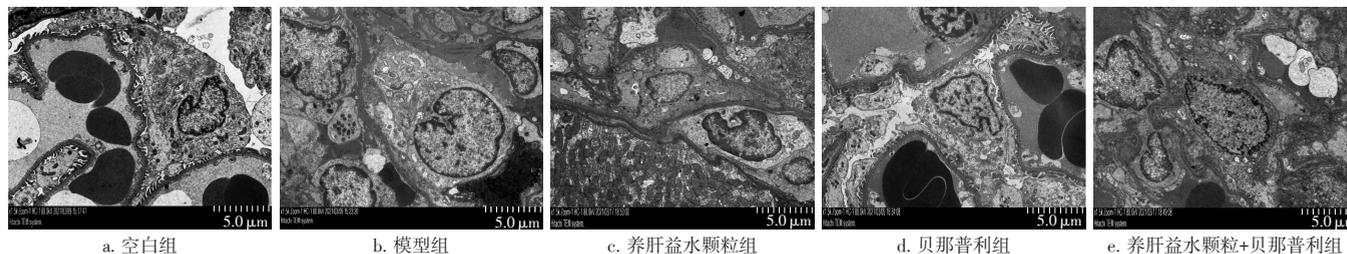


图 3 各组电镜下肾脏组织形态变化(×1 500)

Figure 3 Electron microscope images of morphological changes of rat kidney(×1 500)

厚薄不均一，局部结构模糊、变宽，足突大多融合，极个别足突结构存在，间隙消失。养肝益水颗粒组肾脏组织结构损伤相对次之，基底膜局部模糊，厚薄不一，足细胞中度水肿，细胞器减少，足突局部融合。贝那普利组肾脏组织结构损伤较模型组轻，细胞膜内局部低电子密度水肿区，基底膜厚薄不均一，局部略显模糊，三层结构存在，足细胞中度水肿，细胞器肿胀，空泡变，足突结构模糊，大部分挤压，部分融合。养肝益水颗粒+贝那普利组中肾小球损伤较轻，基底膜结构完整、连续，厚薄均一，三层结构明显，足细胞轻度水肿，足突个别融合，大多足突结构尚可，粗细均一，结构清晰。

3 讨论

高血压早期肾脏损害主要发生在肾小球和小管部位^[13]。足细胞是肾小球正常滤过代谢物质无法缺少的成分，在其中发挥屏障作用；同时其又与肾小球硬化有着不可分割的关系^[14]。足细胞损伤或丢失程度与尿白蛋白排泄率呈正相关，最终引发慢性肾脏病(CKD)，甚至终末期肾病(ERSD)^[15]。持续高血压状态下，肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS 系统)系统过度激活，血管紧张素 II (Ang II) 作为其主要活性分子，可诱导足细胞损伤和细胞凋亡，损伤肾小球滤过功能，并促进其硬化，增加蛋白尿的大量形成^[16]。Ang II 在 AT1R 介导下，上调 TRPC6 表达和血管内皮细胞内 Ca²⁺ 浓度，从而打破细胞骨架蛋白稳

定；同时 TRPC6 协同 TGF-β1，损伤足细胞，影响 desmin、nephrin 表达^[17]；Ang II 活化核转录因子-κB (NF-κB)，提高 ICAM-1 表达水平，促进单核细胞浸润，增加蛋白尿，加重肾脏损伤^[18]。血浆及肾组织中 Ang II 含量升高，收缩小动脉，减少血流，损伤肾小球。Ang II 也可收缩系膜细胞，增加蛋白排出。Ang II 亦可诱发强烈的氧化应激反应，阻断足细胞间细胞连接，足细胞由于结构变化从基膜上脱落^[19]。本研究观察到养肝益水颗粒、贝那普利及两者联合均能降低血清 Ang II 含量，从而减轻其对肾脏的损害。

TRPC6 是一种可渗透 Ca²⁺ 的非选择性阳离子通道的亚族，Ca²⁺ 过度进入到细胞可诱导足损伤或甚至导致其发生细胞凋亡或死亡^[20]。目前已发现 TRPC6 是重要的足细胞膜蛋白之一，其与 Nephrin、Podocin 等共同组成足细胞裂隙膜复合体，维系正常肾小球滤过功能^[21]，其中 Nephrin 和 Podocin 水平明显下调常即表明足细胞受损^[22]。另外足细胞 TRPC6 通道的持续过度活化会导致 Ca²⁺ 离子过载，许多钙依赖性因子和途径(包括钙调神经磷酸酶)可能是足细胞中 TRPC6 激活损伤肾小球的潜在靶标^[23]。TRPC6 可以促进 p44/42 激酶的磷酸化，引起核转录因子 κB 易位而使其激活^[24]，诱导足细胞损伤。NF-κB 是对 DNA、小分子甚至细胞都能发生作用的蛋白质复合物，参与许多生物过程，包括增强炎症反应，在人体功能中占有很重要的地位^[25]。NF-κB 活化，促发 IL-β, IL-6、TNF-α、MCP-1、Cxcr4、Emr-1 和

MIP-1 α 等因子表达明显增加, 导致足细胞严重损伤^[26]。同时足细胞功能受到 NF- κ B 与凋亡基因 (c-myc) 的共同调控, 造成其凋亡或死亡^[27]。

因此, 高血压状态下肾脏 Ang II/TRPC6/NF- κ B 信号通路激活诱导足细胞损伤可能是高血压肾损伤的重要机制之一, 调控这一重要信号通路是防治肾脏损伤、改善肾功能的重要途径之一。

本研究结果表明, 养肝益水颗粒明显降低了高盐高脂饮食诱导的高血压早期肾损害模型大鼠的尿微量蛋白, 改善其肾脏病理, 减少肾脏 Ang II、TRPC6、NF- κ B 蛋白表达。提示该方可能通过抑制 Ang II/TRPC6/NF- κ B 信号通路、保护足细胞, 发挥肾脏保护作用, 联合贝那普利则疗效更优。

参考文献:

- [1] 赵信科, 刘斌, 蒋虎刚, 等. 地龙降压胶囊对自发性高血压大鼠 RAAS 系统调控机制的研究[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(2): 169-172.
- [2] YU S M, NISSAISORAKARN P, HUSAIN L, et al. Proteinuric kidney diseases: a podocyte's slit diaphragm and cytoskeleton approach [J]. *Frontiers in medicine*, 2018, 5: 221.
- [3] ILATOVSKAYA DV, PALYGAIN O, CHUBINSKIY-NADEZHIDIN V, et al. Angiotensin II has acute effects on TRPC6 channels in podocytes of freshly isolated glomeruli[J]. *Kidney International*, 2014, 86(3): 506-514.
- [4] 任凌燕, 朱鸣, 朱华艳, 等. 雷公藤甲素通过调控 Toll-样受体 (TLR)/核因子 κ B(NF- κ B) 信号通路对糖尿病肾病模型小鼠足细胞的作用研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2020, 30(3): 191-195
- [5] 杨帆, 戴小华, 朱涛, 等. 养肝益水颗粒对自发性高血压大鼠肾小球足细胞 TGF- β 1、p27 蛋白及其基因表达的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2017, 36(2): 56-60.
- [6] 郑林, 戴小华, 杨帆. 养肝益水颗粒防治高血压病早期肾损害理论探讨[J]. 中国中医急症, 2007, 16(4): 439-440.
- [7] 杨帆, 戴小华, 王建彬. 原发性高血压早期肾损害中医证候学观察[J]. 安徽中医学院学报, 2007, 26(2): 8-11.
- [8] 王波, 戴小华, 杨帆, 等. 养肝益水颗粒对自发性高血压大鼠肾脏 Smad2、Smad3、Smad7 表达的影响[J]. 安徽中医学院学报, 2011, 5(5): 59-62.
- [9] 戴小华, 郑林, 杨帆. 养肝益水颗粒对自发性高血压大鼠血压及尿 MA、 β 2-MG 的影响[J]. 中国中医急症, 2009, 18(1): 85-86.
- [10] 戴小华, 王波, 杨帆, 等. 养肝益水颗粒对自发性高血压大鼠肾脏 I、III、IV 型胶原蛋白和 FN 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(8): 1003-1007.
- [11] 史娜, 王竹青, 王海珍, 等. 高盐饮食诱导和两肾一夹法复制高血压大鼠模型的比较[J]. 皖南医学院学报, 2016, 35(5): 418-422.
- [12] SZULIŃSKA M, STEPIEŃ M, KREGIELSKA-NAROZNA M, et al. Effects of green tea supplementation on inflammation markers, antioxidant status and blood pressure in NaCl-induced hypertensive rat model[J]. *Food Nutr Res*, 2017, 61(1): 1295525.
- [13] 王月琴, 王道成, 徐盛颖, 等. 滋肾平肝方对二肾一夹高血压大鼠肾损害的保护作用及机制研究[J]. 中医药导报, 2020, 26(15): 49-51, 55.
- [14] 付军, 杨帆, 戴小华. 足细胞参与高血压病肾小球硬化作用机制研究[J]. 安徽中医临床杂志, 2014, 26(1): 80-82.
- [15] 兰天鹰, 姚东升, 王骆冰, 等. 基于真实世界研究益肾止衰颗粒对 CKD 3~4 期患者蛋白尿及尿足细胞的作用[J]. 中医药学报, 2021, 49(4): 66-69.
- [16] 汤天凤, 唐荣, 蒋春明, 等. 血管紧张素 II 诱导肾小管上皮细胞 Toll 样受体 4 和炎症因子表达[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2016, 25(4): 304-308.
- [17] 黄海庭, 林栩, 尤燕舞, 等. TRPC6 在 TGF- β 1 诱导的体外培养肾小球足细胞损伤中的表达及其高表达对 nephrin、desmin 表达的影响[J]. 免疫学杂志, 2016, 32(7): 570-576.
- [18] 韩跃刚, 黄彦生. 雷米普利对自发性高血压大鼠肾脏核因子- κ B 表达的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(4): 426-427.
- [19] 陈朝红, 洪亦眉, 秦卫松, 等. 雷公藤甲素对血管紧张素 II 诱导足细胞损伤的保护作用及其机制研究[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2010, 19(6): 508-515.
- [20] HOU X, XIAO H, ZHANG Y. Transient receptor potential channel 6 knock-down prevents apoptosis of renal tubular epithelial cells upon oxidative stress via autophagy activation[J]. *Cell Death Disease*, 2018, 9(10): 1015.
- [21] REISER J, POLU KRISHNA R, MÖLLER CLEMENS C, et al. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function[J]. *Nature Genetics*, 2005, 37(7): 739-44.
- [22] 刘雪皎, 赵京, 王国勤, 等. Wnt5a/TRPC6 在姜黄素拮抗肥胖相关肾小球病足细胞损伤中的机制探讨[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 20(12): 1044-1047.
- [23] WANG Y, JARAD G, TRIPATHI P, et al. Activation of NFAT signaling in podocytes podocytes causes glomerulosclerosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(10): 1657-1666.
- [24] 孟影. 丹参调控 Nox2/ROS/JNK2/NF- κ B 信号通路降低 TRPC6/Ca²⁺ 内流防治高糖环境下心肌缺血再灌注损伤的机制研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.
- [25] ZHANG H, WANG W, REN L, et al. The mTORC2/Akt/NF κ B Pathway-Mediated Activation of TRPC6 Participates in Adriamycin-Induced Podocyte Apoptosis[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2016, 40(5): 1079-1093.
- [26] XU M X, MING W, YANG WW. Gold-*quercetin* nanoparticles prevent metabolic endotoxemia-induced kidney injury by regulating TLR4/NF- κ B signaling and Nrf2 pathway in high fat diet fed mice [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2017, 12: 327-345.
- [27] 潘柳叶, 杨发奋, 庞君, 等. 糖尿病肾病足细胞损伤机制及中药对其保护作用的研究进展[J]. 右江医学, 2019, 47(11): 871-875.

(编辑: 修春)