

研究论文

血管紧张素转移酶2在糖尿病大鼠肾损伤发生发展中的变化

张伟, 马畅, 王艳霞, 王珊珊, 张源淑*

南京农业大学农业部动物生理生化重点开放实验室, 南京 210095

摘要: 本研究通过观察糖尿病大鼠肾损伤发生发展过程中肾脏组织血管紧张素转移酶2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2)的表达差异, 结合循环系统和肾脏组织中血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)水平的变化, 探讨ACE2在高血糖致肾损伤发生发展中的作用。SD大鼠随机分为对照组和糖尿病组, 腹腔内一次性注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导糖尿病肾损伤模型, 大鼠分别在实验的第15天和30天处死。测定大鼠血糖和肾功能相关指标。利用荧光定量PCR和Western blot的方法检测肾脏ACE2的相对表达。通过放射免疫法测定血清和肾脏组织中Ang II含量。结果显示: (1) 注射STZ 48~72 h后大鼠开始出现多尿、多饮症状; (2) 正常对照组大鼠血糖值介于4.9~6.5 mmol/L之间; 糖尿病组造模后15 d时大鼠血糖值在14.0~17.5 mmol/L之间; 造模后30 d时大鼠血糖值均高于24 mmol/L; (3) 糖尿病组造模后15 d时, 大鼠尿糖升高, 与正常对照组相比差异显著($P < 0.05$), 尿蛋白含量略高于正常对照组($P > 0.05$); 而造模后30 d时大鼠的尿糖、尿蛋白含量均显著高于正常对照组($P < 0.01$); (4) 与对照组相比, 糖尿病组造模后15 d时大鼠肾组织中ACE2 mRNA表达升高, 但差异不显著($P > 0.05$), 蛋白水平显著升高($P < 0.05$); 造模后30 d时ACE2 mRNA表达较对照组显著降低($P < 0.05$), 蛋白表达较对照组有下降趋势($P = 0.0718$); (5) 放射免疫测定结果显示, 与对照组相比, 糖尿病组造模后15 d时血清和肾脏组织中Ang II含量稍有升高, 差异不显著($P > 0.05$); 而造模后30 d时血清和肾脏组织中Ang II均显著升高($P < 0.05$)。以上结果提示, ACE2在糖尿病早期肾损伤的发病机制中起到积极的保护作用。随着糖尿病肾损伤程度的逐渐加深, ACE2的表达降低导致Ang II的积聚, 从而加重肾损伤。

关键词: 糖尿病; 肾损伤; 血管紧张素转移酶2; 表达变化; 血管紧张素 II**中图分类号:** R3

Changes of angiotensin converting enzyme 2 in the occurrence and development of diabetic renal injury in rat

ZHANG Wei, MA Chang, WANG Yan-Xia, WANG Shan-Shan, ZHANG Yuan-Shu*

Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Ministry of Agriculture, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China

Abstract: This project was designed to investigate the role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in the diabetic renal injury by observing the expression of ACE2 in the kidney and the level of angiotensin II (AngII) in the circulatory system and kidney tissue of rats with diabetes. SD rats were randomly divided into control group and diabetes group. Diabetic nephropathy model was established by i.p. injection of streptozotocin (STZ). The rats were sacrificed separately on the 15th or 30th day after STZ injection. Biochemical parameters including blood glucose and renal function were examined. The expression of ACE2 in the kidney was detected by real-time PCR and Western blot. The contents of AngII in plasma and kidney were detected by radioimmunoassay. The results are as follows: (1) 48–72 h after STZ injection, the rats showed polyuria, polydipsia and their activity reduced. (2) Blood glucose levels were 4.9–6.5 mmol/L in the control rats, 14.0–17.5 mmol/L in the diabetes group rats on the 15th day, and higher than 24 mmol/L in the diabetes group rats on the 30th day; (3) There was a significant increase of urine glucose level ($P < 0.05$), and a slight but not signifi-

Received 2012-12-10 Accepted 2012-12-31

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30871838) and Graduate Students' Innovative Projects of Jiangsu Higher Education Institutions, China (No. CXZZ12-0296).

*Corresponding author. Tel: +86-25-84396763; E-mail: zhangyuanshu@njau.edu.cn

cant increase of urine protein level ($P > 0.05$) in the diabetes group on the 15th day; On the 30th day, the levels of urine glucose and urine protein were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$); (4) Compared with the control group, the expression of ACE2 mRNA was slightly increased ($P > 0.05$), and the expression of ACE2 protein was significantly increased ($P < 0.05$) in the rats of diabetic model group on the 15th day; however, on the 30th day, ACE2 mRNA expression in the rats of diabetic model group was significantly lower than the control group ($P < 0.05$), and the expression of ACE2 protein was slightly lower than the control group ($P = 0.0718$). (5) Compared with the control group, the levels of AngII in plasma and kidney of the diabetic rats increased slightly on the 15th day ($P > 0.05$); while the AngII levels in diabetic model group rats were significantly higher ($P < 0.05$) than that in control rats on the 30th day. These results suggest that ACE2 plays a positive role in the protection against the pathogenesis of early renal damage. ACE2 expression is reduced gradually with the deepened degree of diabetic kidney damage, leading to the accumulation of AngII in the kidney, thereby increasing the renal injury.

Key words: diabetes; renal injury; angiotensin converting enzyme 2; expression changes; AngII

血管紧张素转移酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 是在 2000 年被发现的肾素 - 血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 的新成员, 是 RAS 中的负向调节因子^[1,2]。ACE2 可以水解血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 生成 Ang-(1-7), Ang-(1-7) 通过 Mas 受体拮抗 Ang II, 减少 Ang II 在疾病中产生的血管收缩、水盐代谢失调等负面效应。ACE2 在大鼠肾脏中高表达, 其主要位于肾小球上皮细胞, 系膜细胞亦有少量分布。肾脏中 ACE2 的主要作用是水解肾脏中 Ang II 产生 Ang-(1-7)^[3, 4]。Oudit 等^[5]报道, ACE2 基因缺失性雄性大鼠肾脏中 Ang II 水平明显增加, 早期即发现纤维胶原在肾小球系膜中的沉积。Ye 等^[6]报道在糖尿病早期动物模型中 ACE mRNA 和 ACE 蛋白在肾皮质的表达均下降, ACE 活性也显著降低, 而 ACE2 mRNA 的表达无下降, 其蛋白的表达和活性却上升, 推测 ACE2 可能在糖尿病早期起到肾脏保护的作用。Tikellis 等^[4]对 24 周龄的糖尿病肾病大鼠研究显示: ACE2 蛋白在肾小管表达降低 30%, 造成局部 Ang II 的水平升高, 致使肾小管间质纤维化, 而药物治疗 (雷米普利) 组的 ACE2 蛋白表达与无糖尿病肾病大鼠的相似, 表明血管紧张素转化酶抑制剂保护肾功能的作用可能是通过 ACE2 发挥调节作用。

这些研究结果提示 ACE2 在肾脏损伤的发生发展过程中起着关键的作用, 但目前对 ACE2 在肾脏损伤不同病程中的表达水平变化的研究还较少, 其作用的确切机理尚不清楚。因此, 本实验用链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 致大鼠持续高血糖, 造成大鼠肾脏组织不同程度损伤, 采用分子生物学等方法, 从蛋白质水平和基因水平上观察 ACE2 在糖尿病肾脏损伤发生发展过程中的表达变化, 并结合循

环系统和肾脏组织中 Ang II 水平的变化, 探讨 ACE2 在糖尿病肾损伤中的作用及可能的机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 STZ 购自美国 Sigma 公司; 葡萄糖测定试剂盒、尿蛋白测定试剂盒均购自南京建成生物工程公司; TRIzol 试剂盒购于南京天为生物科技有限公司; M-MLV 反转录酶购于 Sigma 公司; $6 \times$ SDS protein loading buffer 及 Tris buffer solution 购于南京生兴生物公司; PCR 引物由上海英俊生物技术有限公司合成; Ang II 放射免疫试剂盒购于北京北方生物技术研究所以; 手持式电动匀浆机 (瑞士 Polytron PT1200CL); Mikro-22R 高速低温离心机 (德国 Andreas Hettich GmbH & CO. KG); 核酸浓度测量仪 (德国 Eppendorf Biophotometer); PCR 仪 (Gene Amp PCR System 9600); Power pac300 电泳仪及半干转移仪 (美国 BIO-RAD); EPSON 扫描仪 (EPSON Perfection V500 Photo)。

1.2 实验动物 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠, 体重 200~220 g, 由东南大学实验动物中心提供 [实验动物使用许可证号码: SYXK(苏)2001-0017 和实验动物生产许可证号码: SCXK(苏)2001-0005]。实验鼠用颗粒饲料 (购于江苏省协同医药生物工程有限公司) 饲养。

1.3 方法

1.3.1 STZ 致大鼠糖尿病肾损伤模型的建立 参照以往的方法并加以改进^[7, 8]。健康成年 SD 大鼠 40 只, 一周适应期后, 随机取 16 只作为正常对照组, 其余 24 只大鼠按 60 mg/kg 体重剂量一次性腹腔内注射 STZ (以 0.1 mmol/L、pH 4.2 柠檬酸缓冲液溶解, 新鲜配制), 正常对照组按 0.1 mL/kg 体重剂量腹腔注射柠檬酸缓冲液。分别于注射 24 h、72 h 后用血

糖仪测定所有实验大鼠的空腹 (禁食 8 h) 血糖水平。以两次空腹血糖值 ≥ 11.1 mmol/L 为糖尿病造模成功。本研究成模率达到 75%, 表明此造模方法可行。取其中 32 只大鼠 (对照组和模型组各 16 只) 进行后续试验。

1.3.2 实验分组与样品采集 给药后大鼠自由采食与饮水, 实验期间于每天同一时间点记录大鼠体重、摄食量和饮水量并观察各组大鼠神态、毛色以及活动状况等变化。于造模后第 15 天, 随机选取 8 只糖尿病大鼠和 8 只正常对照大鼠, 禁食 12 h 后, 断头处死, 静脉采血, 分离血清, -20°C 保存备用; 取左肾, 液氮速冻后转到 -80°C 冰箱保存; 取部分右肾, 10% 中性甲醛固定; 收集的尿液 3 500 r/min 室温离心吸取上清, -20°C 保存备用。其余 16 只 (糖尿病大鼠和正常对照大鼠各 8 只) 大鼠继续观察 15 天后 (共 30 天), 断头处死, 同上取样并处理。统计每 5 天各组大鼠平均增重、平均摄食量、平均饮水量和血糖值进行比较分析。

1.3.3 肾功能指标的测定

1.3.3.1 尿糖测定 葡萄糖氧化酶 - 过氧化物酶法测定尿中葡萄糖浓度 (urine glucose, mmol/L)。具体操作按试剂盒说明书进行。按如下公式计算: 尿糖 = 测定管 OD_{505} / 标准管 OD_{505} $\times$ 标准品浓度 (5.55 mmol/L)。

1.3.3.2 尿蛋白测定 考马斯亮蓝法测定尿中尿蛋白浓度 (urine protein, g/L)。按具体操作试剂盒说明书进行。按如下计算公式: 尿蛋白 = (测定管 OD_{595} - 空白管 OD_{595}) / (标准管 OD_{595} - 空白管 OD_{595}) $\times$ 标准品浓度 (0.563 g/L)。

1.3.4 肾脏中 ACE2 mRNA 表达的 RT-PCR 分析

取约 100 mg 的肾组织, 用电动匀浆机彻底匀浆后, 采用 TRIzol 一步抽提法提取肾脏组织的总 RNA。紫外比色法 (OD_{260} 和 OD_{280}) 测定总 RNA 的浓度和纯度。各样品取 RNA 2 μg , 在 25 μL 体系进行反转录成 cDNA。目的基因和 β -actin 内标引物序列是根据 GenBank 数据库序列, 采用 Primer 5.0 软

件设计, 由上海英骏生物技术有限公司合成, 引物序列及参数见表 1。以 β -actin 作为内参, 对 ACE2 基因进行实时荧光定量分析。实时荧光定量 PCR 采用 SYBR Green 染料, 三步法检测目的基因的相对表达, 反应条件为: 95°C 预变性 10 min; 95°C 变性 20 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共 40 个循环, 利用相对定量 $2^{-\Delta\text{CT}}$ 法进行数据统计。

1.3.5 大鼠肾脏组织中 ACE2 蛋白表达的 Western blot 分析

称取 100 mg 大鼠肾脏组织放入 1 mL 裂解液中, 冰上匀浆, 14 000 r/min 4°C 离心 15 min, 吸取上清液, 弃去沉淀, BCA 法测定蛋白浓度, 置于 -80°C 冰箱保存。用 Bio-Rad 蛋白电泳系统进行不连续 SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳, 5% 浓缩胶, 10% 分离胶。蛋白上样量为 60 μg , 120 V 电泳 90 min, 电泳结束后, 对照预染标准蛋白 Marker 截取目的蛋白所在的凝胶进行转印。半干转移仪中进行转印。转印条件: 1.5 mA/ cm^2 , 90 min。转印结束, 将 PVDF 膜用丽春红染液染色, 5~15 min 出现红色条带, 说明转印成功。封闭和抗体孵育按试剂盒说明书进行。化学发光及显影后, 胶片用扫描仪 (EPSON Perfection V500 Photo) 扫描拍照, 蛋白条带的灰度利用 Quantity One 软件 (美国 Bio-Rad)。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作内参, 目的条带与其相比得到相对量。

1.3.6 血清和肾脏组织中 Ang II 含量测定 放射免疫分析法 (radioimmunoassay, RIA) 测定血清和肾脏组织中 Ang II 含量。具体操作按试剂盒说明书进行。FMJ-182 放射免疫 γ -计数器检测各管沉淀物的放射性计数 (cpm)。

1.4 数据统计与分析 所有数值以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, 采用 SPSS16.0 统计软件进行独立样本 t 检验统计分析。 $P < 0.05$ 时表示差异具有统计学显著性。

2 结果

2.1 一般状态

实验期间正常对照组大鼠精神状况良好, 被毛

表1. ACE2和 β -actin引物参数

Table 1. Parameters of primer pairs for ACE2 and β -actin genes

Gene	GenBank accession number	Primers sequence	Orientation	Product size
ACE2	AY881244	5'-AATCGTAGGCTCTGGGCTTGG-3'	Forward	182 bp
		5'-TTCGATCAACTGGTTTCGGTTGTA-3'	Reverse	
β -actin	AF122902	5'-CCCTGTGCTGCTCACCGA-3'	Forward	198 bp
		5'-ACAGTGTGGGTGACCCCGTC-3'	Reverse	

光滑, 动作自如, 活动量大, 反应灵敏; 糖尿病肾损伤模型组造模后 15 d 时大鼠形体消瘦, 精神状态较好, 动作自如, 尿量增加; 造模后 30 d 时大鼠精神萎靡, 动作迟缓, 被毛干枯, 并变黄脱落, 尿量增加, 常有腹泻。

2.2 大鼠体重、采食量与饮水量变化

实验期间正常对照组大鼠体重随时间的延长, 逐渐增加。糖尿病肾损伤模型组造模后 15 d 时, 大鼠形体偏瘦, 与对照组相比饮水量 ($P < 0.05$)、摄食量增加 ($P < 0.05$)、体增重显著降低 ($P < 0.05$);

造模后 30 d 时大鼠形体消瘦, 与对照组相比饮水量显著增多 ($P < 0.05$), 采食量增加 ($P < 0.05$), 体重明显减轻 ($P < 0.01$); 与造模后 15 d 相比, 造模后 30 d 大鼠实验后期摄食量和饮水量均增加, 但体重未明显增加 (图 1, 2 和 3), 提示随病程延长病情程度加重。

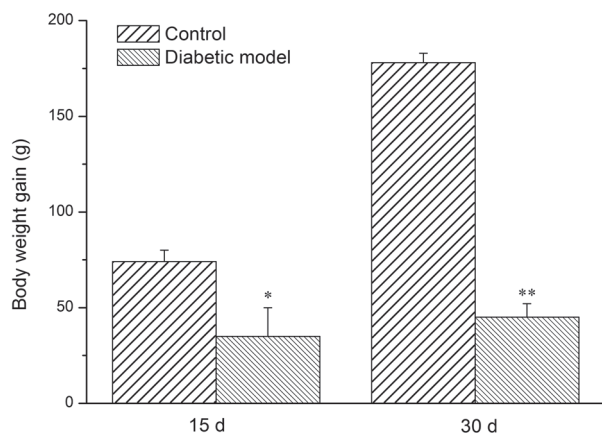


图 1. 对照组和糖尿病模型组大鼠增重

Fig.1. Body weight gain of rats in control and diabetic model groups. Mean $\pm$ SEM, $n = 8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

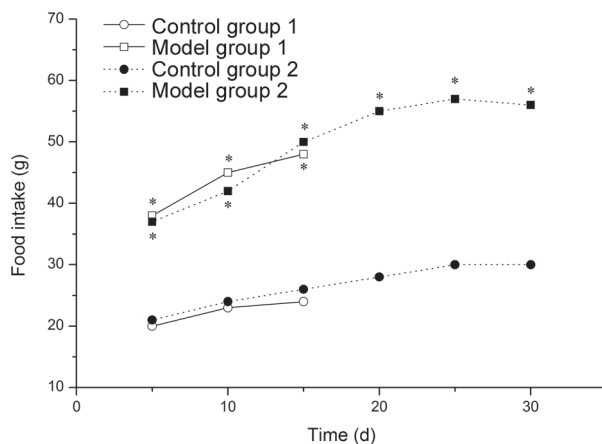


图 2. 不同时间点对照组和糖尿病模型组大鼠摄食量变化

Fig. 2. Change of food intake in control and diabetic model groups rats at different time. Mean $\pm$ SEM, $n = 8$. * $P < 0.05$ compared with corresponding control group. Control group 1 and diabetic model group 1 were observed for 15 d. Control group 2 and diabetic model group 2 were observed for 30 d.

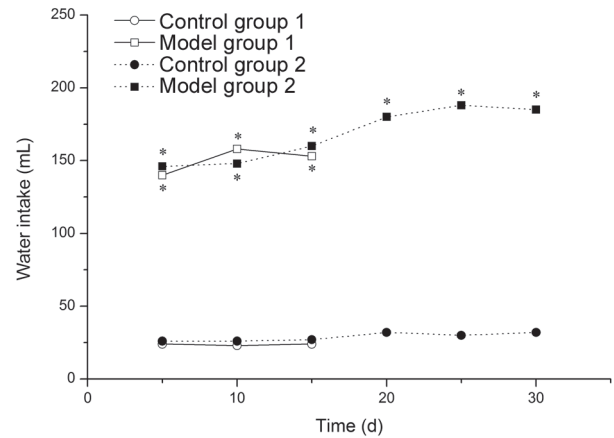


图 3. 不同时间点对照组和糖尿病模型组大鼠饮水量变化

Fig. 3. Change of water intake in control and diabetic model groups rats at different times. Mean $\pm$ SEM, $n = 8$. * $P < 0.05$ compared with corresponding control group. Control group 1 and diabetic model group 1 were observed for 15 d. Control group 2 and diabetic model group 2 were observed for 30 d.

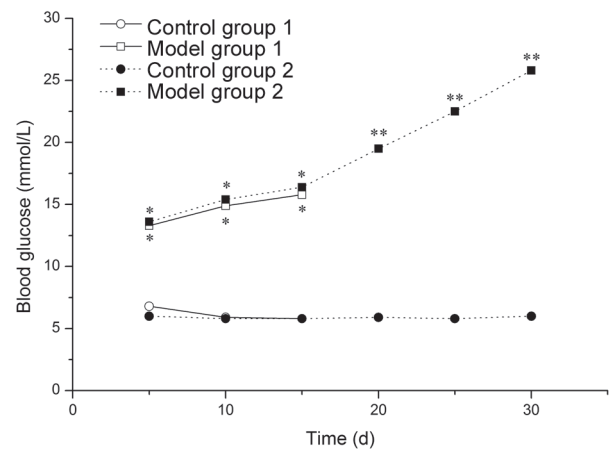


图 4. 不同时间点对照组和糖尿病模型组大鼠空腹血糖测定值

Fig. 4. Change of fasting blood glucose in control and diabetic model groups rats at different time. Mean $\pm$ SEM, $n = 8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with corresponding control group. Control group 1 and diabetic model group 1 were observed for 15 d. Control group 2 and diabetic model group 2 were observed for 30 d.

2.3 大鼠空腹血糖浓度测定结果

正常对照组大鼠空腹血糖介于 4.9~6.5 mmol/L 之间 (平均值 5.89 ± 0.25), 均在正常血糖范围; 而糖尿病肾损伤模型组造模后 15 d 时, 大鼠空腹血糖均介于 14.0~17.5 mmol/L 之间 (平均值 15.78 ± 0.38), 30 d 时大鼠空腹血糖为 24.6~27.6 mmol/L (平均值 25.99 ± 0.60), 严重超出正常血糖值范围, 并且显著高于 15 d 时的血糖值 ($P < 0.05$) (图 4)。

2.4 尿糖和尿蛋白含量的变化

由图 5A 可以看出, 对照组大鼠尿液中均无尿糖存在, 尿糖含量为 0。糖尿病肾损伤模型组造模后 15 d 和 30 d 时, 大鼠的尿液中均有尿糖存在,

与对照组相比, 模型组 15 d 时大鼠尿糖显著升高 ($P < 0.05$); 30 d 时大鼠尿糖含量极显著升高 ($P < 0.01$); 30 d 时尿糖含量是 15 d 时的 2.2 倍。

由图 5B 可以看出, 糖尿病肾损伤模型组造模后 15 d 时, 尿蛋白含量略高于对照组 ($P > 0.05$), 造模后 30 d 时大鼠的尿蛋白含量显著高于对照组 ($P < 0.01$); 30 d 时尿蛋白含量是 15 d 时的 10.6 倍。

2.5 糖尿病大鼠肾损伤发生发展中ACE2 mRNA表达的变化

如图 6 所示, 与对照组相比, 糖尿病肾损伤模型组造模后 15 d 时, 大鼠肾组织中 ACE2 mRNA 表达升高, 但差异不显著; 造模后 30 d 时大鼠肾组

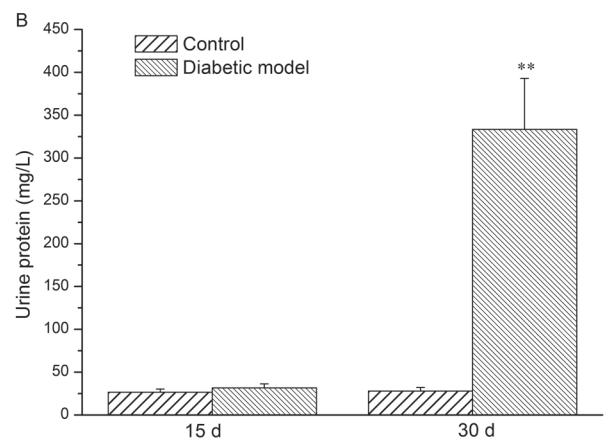
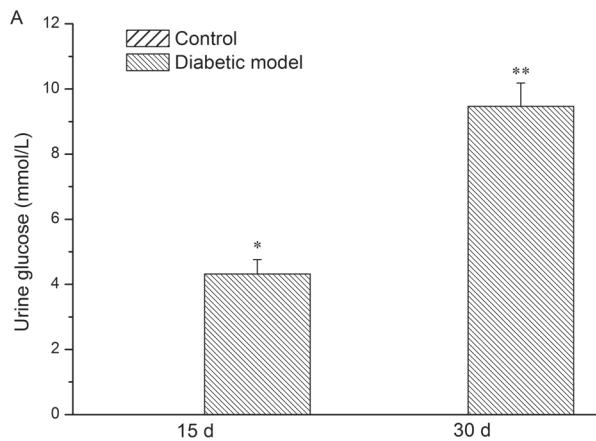


图 5. 对照组和糖尿病模型组大鼠尿糖和尿蛋白含量

Fig. 5. Urine glucose (A) and urine protein (B) levels in control and diabetic model groups rats. Mean $\pm$ SEM, $n = 8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

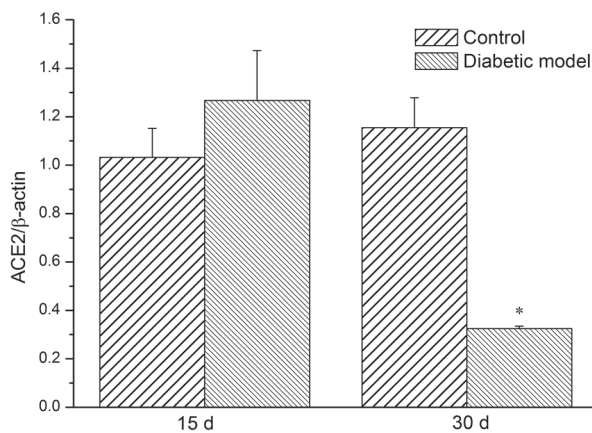


图 6. 对照组和糖尿病模型组大鼠肾脏中ACE2 mRNA水平变化

Fig. 6. Change of ACE2 mRNA expression level in kidneys of control and diabetic model groups rats. Mean $\pm$ SEM, $n = 8$. * $P < 0.05$ compared with control group.

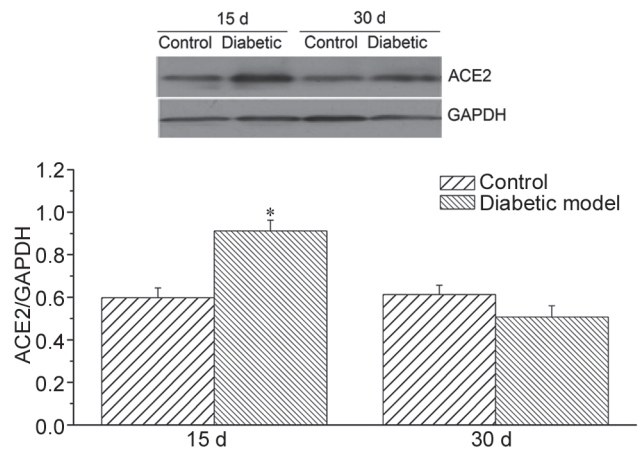


图 7. 对照组和糖尿病模型组大鼠肾脏中ACE2蛋白水平变化

Fig. 7. Change of ACE2 protein expression level in kidneys of rats in control and diabetic model groups. Mean $\pm$ SEM, $n = 8$. * $P < 0.05$ compared with control group.

表2. 对照组和模型组大鼠血清和肾脏组织中Ang II含量比较

Table 2. Content of AngII in plasma and kidney tissues of control and diabetic model rats

	Plasma AngII (ng/mL)	Kidney AngII (ng/g protein)
Control group (15 d)	0.64 ± 0.04	6.53 ± 0.82
Diabetic model group (15 d)	0.77 ± 0.08	7.92 ± 1.48
Control group (30 d)	0.62 ± 0.03	6.76 ± 0.91
Diabetic model group (30 d)	1.47 ± 0.35*	13.21 ± 1.86*

Mean ± SEM, $n = 8$. * $P < 0.05$ compared with control group (30 d).

组织中ACE2 mRNA表达较对照组显著降低($P < 0.05$)。

2.6 大鼠肾脏组织中ACE2蛋白表达变化

如图7所示, Western blot结果显示, 与对照组相比, 糖尿病肾损伤模型组造模后15 d时, 大鼠肾脏组织中ACE2蛋白显著升高($P < 0.05$), 而造模后30 d时大鼠肾脏组织中ACE2蛋白表达较对照组表达略下降, 但差异不显著($P = 0.0718$)。

2.7 血清和肾脏组织中Ang II含量变化

如表2所示, 与对照组相比, 糖尿病肾损伤模型组造模后15 d时, 血清和肾脏组织中Ang II含量均有升高趋势, 但无统计学差异; 造模后30 d时血清和肾脏组织中Ang II均显著高于对照组($P < 0.05$)。

3 讨论

本实验中以60 mg/kg剂量STZ腹腔注射成功诱导糖尿病大鼠模型。实验中选取尿糖、尿蛋白等生化指标进行检测, 对模型大鼠的肾功能进行综合评定。比较检测结果显示, 正常对照组大鼠血糖平稳, 波动在4.9~6.5 mmol/L, STZ注射15 d后, 糖尿病模型大鼠的血糖值都处于14.0~17.5 mmol/L之间, 而且出现肾小球高滤过现象, 表现为蛋白尿分泌率上升, 而在STZ注射后30 d后, 糖尿病模型大鼠血糖值均高于24 mmol/L, 尿中尿蛋白含量均显著升高。由此可见, 糖尿病高血糖致肾脏损伤的程度是随着时间的延长而加重, 所出现的病理学改变是逐渐发生和进展的。

上世纪80年代, Brenner等^[9]首次证实肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)在糖尿病肾病中发挥重要作用, 他们的研究显示STZ致糖尿病肾损伤大鼠的一个重要特征是肾小球内压力持续性增大, 而在糖尿病早期就已经出现这种血流动力学的改变, 可能是出球小动脉阻力相对增大所致。由于Ang II对肾小球微循环的血流动力学作用的特点也表现为出球小动脉过度收缩, 肾小球毛

细血管内压力增大等, 因此, 糖尿病大鼠出现类似的肾小球血流动力学改变可能是RAS激活所致。

Zatz等^[10]检测血管紧张素转化酶抑制剂对STZ诱导糖尿病大鼠肾小球血流动力学、蛋白尿、肾脏病理改变等方面的影响, 结果显示依那普利治疗组大鼠的肾小球内压力降至正常范围, 蛋白尿液接近对照组大鼠水平, 肾小球硬化也明显减缓。所以, 高浓度血糖可激活RAS, 通过Ang II作用于AT1受体导致肾小球内压增大、出现蛋白尿甚至肾脏硬化、纤维化。此外, Ang II还可增加许多促纤维化和促炎症介质的表达和释放(如肿瘤生长因子), 并进一步加速肾脏病变进展, 提示Ang II的调节对维持肾功能正常生理功能非常重要。现在已经得到证实Ang II具有促炎症及促纤维化作用, 并且这些作用可被ACE2抑制^[11, 12]。本研究结果表明, 与对照组相比, 在糖尿病肾损伤病情较轻(即造模后15 d)时循环和肾脏组织Ang II水平升高不显著, 而糖尿病肾损伤病情严重(即造模后30 d)时Ang II水平显著升高, 提示Ang II水平的显著升高是导致糖尿病肾损伤病情发展的主要原因。

ACE2是新近发现的ACE的同系物, ACE2的主要生物学效应是水解Ang II产生Ang-(1-7)。目前众多研究显示ACE2是预防和治疗糖尿病致肾损伤的重要靶点, 但研究结果不尽相同。Burrell等^[13]研究表明, ACE2表达主要与局部炎症反应、受损组织修复及组织重构等过程有关, 但其具体机制仍不明确。有研究显示, 在肾病患者和糖尿病小鼠肾脏组织中, ACE2表达下降^[14, 15]; 亦有报道, ACE2基因突变导致小鼠肾小球硬化^[16]; 而Oudit等^[5]研究结果显示, ACE2表达缺失小鼠可出现肾间质胶原蛋白、纤维连接蛋白及 α 平滑肌动蛋白的沉积。幼年高血糖小鼠的肾脏ACE2的表达水平上调, 并伴有ACE表达的下调^[4]。但是, Tikellis等^[4]发现高血糖致肾损伤模型中ACE2的表达显著降低。本研究结果显示, 与对照组相比, 糖尿病肾损伤模型

组造模后 15 d 时, 大鼠肾脏 ACE2 mRNA 水平略上升, 蛋白水平显著上升; 而肾造模后 30 d 时大鼠肾脏 ACE2 mRNA 水平及蛋白水平均下降。据此我们推测, ACE2 在糖尿病致肾损伤早期阶段具有保护作用, 但之后 ACE2 表达下调, 使 Ang II 水平增高, 导致肾损伤的发展。ACE2 参与了其中的抗损伤过程。其抗损伤详细机理有待进一步研究。

参考文献

- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000; 87(5): E1–E9.
- Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme - Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000; 275(43): 33238–33243.
- Ye M, Wysocki J, William J, Soler MJ, Cokic I, Battle D. Glomerular localization and expression of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-converting enzyme: Implications for albuminuria in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(11): 3067–3075.
- Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Burrell LM, Risvanis J, Cooper ME. Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. *Hypertension* 2003; 41(3): 392–397.
- Oudit GY, Herzenberg AM, Kassiri Z, Wong D, Reich H, Khokha R, Crackower MA, Backx PH, Penninger JM, Scholey JW. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin II-dependent glomerulosclerosis. *Am J Pathol* 2006; 168(6): 1808–1820.
- Ye MH, Wysocki J, Naaz P, Salabat MR, LaPointe MS, Battle D. Increased ACE 2 and decreased ACE protein in renal tubules from diabetic mice - A renoprotective combination? *Hypertension* 2004; 43(5): 1120–1125.
- Wang YY (王圆圆), Liu RX, Guo B, Xiao Y, Shi MJ, Pi MJ, Wen QY, Zhang GZ. Down-regulation of PTEN expression in kidney and its role in development of diabetic nephropathy in rats. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2011; 4: 325–332 (Chinese, English abstract).
- Shen YF (沈亚非), Xu YC. Study on experimental diabetes animal model in rats induced by streptozotocin. *J Pract Diag Ther* (实用诊断与治疗杂志) 2005; 19(2): 79–80 (Chinese, English abstract).
- Hostetter TH, Troy JL, Brenner BM. Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int* 1981; 19(3): 410–415.
- Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest* 1986; 77(6): 1925–1930.
- Jin HY, Song B, Oudit GY, Davidge ST, Yu HM, Jiang YY, Gao PJ, Zhu DL, Ning G, Kassiri Z, Penninger JM, Zhong JC. ACE2 deficiency enhances angiotensin II-mediated aortic profilin-1 expression, inflammation and peroxynitrite production. *PloS One* 2012; 7(6): e38502.
- Zhong J, Guo D, Chen CB, Wang W, Schuster M, Loibner H, Penninger JM, Scholey JW, Kassiri Z, Oudit GY. Prevention of angiotensin II-mediated renal oxidative stress, inflammation, and fibrosis by angiotensin-converting enzyme 2. *Hypertension* 2011; 57(2): 314–322.
- Burrell LM, Risvanis J, Kubota E, Dean RG, MacDonald PS, Lu S, Tikellis C, Grant SL, Lew RA, Smith AI. Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur Heart J* 2005; 26(4): 369–375.
- Soler MJ, Wysocki J, Ye M, Lloveras J, Kanwar Y, Battle D. ACE2 inhibition worsens glomerular injury in association with increased ACE expression in streptozotocin-induced diabetic mice. *Kidney Int* 2007; 72(5): 614–623.
- Mizui S, Hemmi H, Arita M, Ohashi Y, Tanaka Y, Miyagi M, Sakai K, Ishikawa Y, Shibuya K, Hase H, Aikawa A. Expression of ACE and ACE2 in individuals with diabetic kidney disease and healthy controls. *Am J Kidney Dis* 2008; 51(4): 613–623.
- Shiota A, Yamamoto K, Ohishi M, Tatara Y, Ohnishi M, Maekawa Y, Iwamoto Y, Takeda M, Rakugi H. Loss of ACE2 accelerates time-dependent glomerular and tubulointerstitial damage in streptozotocin-induced diabetic mice. *Hypertens Res* 2010; 33(4): 298–307.