

肾素拮抗剂 SPH3127 通过 TGF-β/Smads 信号通路对高血压肾损伤保护机制的研究

杨少华,张昕,马雯,石文惠,王瑞琪,王喧,齐婷婷
(内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院心功能科,内蒙古 包头 014010)

【摘要】目的: 探讨肾素拮抗剂 SPH3127 是否通过抑制血管紧张素 II (Ang II) 调控转化生长因子-β1 (TGF-β1) 表达,下调 TGF-β/Smads 信号通路的传导,达到对高血压肾损伤的保护作用。**方法:** 将 75 只雄性 SD 大鼠随机分为五组,分别为假手术组、模型组、SPH3127 组、SB431542 组 (TGF-β1 特异性抑制剂)、缬沙坦组。除假手术组外,其余四组均采用两肾一夹法 (2K1C) 建立高血压模型。药物干预 4 周后,取大鼠腹主动脉血清及肾脏组织,ELISA 法检测大鼠血清 Ang II、肾功能指标 (肌酐、尿素氮)。肾组织分别行 HE 染色、天狼星红染色、TUNEL 与 WT1 共染进行形态学观察,RT-qPCR 法与 Western blot 法分别检测大鼠肾脏组织中 TGF-β1、Smad3 及 Smad7 mRNA 和蛋白的表达水平。**结果:** 造模成功后与假手术组相比,模型组、SPH3127 组、SB431542 组、缬沙坦组四组大鼠尾动脉收缩压 (SBP) 均升高 ($P < 0.05$),但模型组、SPH3127 组、SB431542 组、缬沙坦组组间 SBP 无统计学差异 ($P > 0.05$);药物干预后,与模型组大鼠相比,SPH3127 组、SB431542 组、缬沙坦组 SBP、Ang II 浓度、血肌酐浓度、尿素氮浓度、肾小球萎缩程度、胶原纤维沉积减少且足细胞凋亡水平、TGF-β/Smads mRNA 和蛋白表达水平均降低 ($P < 0.05$),与 SPH3127 组相比,SB431542 组 TGF-β/Smads mRNA 和蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$),SBP、Ang II、尿素氮浓度升高 ($P < 0.05$),胶原纤维沉积增多 ($P < 0.05$),足细胞凋亡水平升高。**结论:** SPH3127 可通过抑制 AngII 水平来抑制 TGF-β/Smads 信号通路以减轻高血压所致的肾脏足细胞凋亡及肾的纤维化。

【关键词】 高血压肾病;血管紧张素 II;转化生长因子-β1;肾素抑制剂
【中图分类号】 R972.4,R969 **【文献标志码】** A

The protective mechanism of renin inhibitor SPH3127 against hypertensive kidney injury through the TGF-β/Smads signaling pathway

YANG Shao-hua,ZHANG Xin,MA Wen,SHI Wen-hui,WANG Rui-qi,WANG Xuan,QI Ting-ting
(Department of Cardiac Function,the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College,Inner Mongolia University of Science and Technology,Baotou 014010,Inner Mongolia,China)

【Abstract】Objective: To explore whether the renin antagonist SPH3127 inhibits angiotensin II (Ang II),Ang II inhibits the expression of transforming growth factor-β1 (TGF-β1) and downregulates the transduction of the TGF-β/Smads signaling pathway,achieving a protective effect against hypertensive kidney injury. **Methods:** 75 male SD rats were randomly divided into sham surgery group,model group,SPH3127 group,SB431542 group (TGF-β 1 specific inhibitor),and valsartan group. Except for the sham surgery group,the other four groups were prepared with two kidneys one clip (2K1C) surgery method to establish a hypertension model. After successful modeling,the abdominal aorta serum and kidney tissue of the rats were continuously intervened for 4 weeks. ELISA was used to detect serum Ang II and renal function indicators (creatinine,urea nitrogen concentration). HE staining,Sirius red staining,TUNEL and WT1 co staining were performed on kidney tissue for morphological observation. RT-qPCR and Western blot were used to detect TGF-β 1,Smad3,and Smad7 mRNA in rat kidney tissue and the relative expression level of proteins,respectively. **Results:** After successful modeling,compared with the sham surgery group,the systolic blood pressure (SBP) of the tail artery in the model group,SPH3127 group,SB431542 group,and valsartan group increased ($P < 0.05$),but there was no statistically significant difference in SBP among these four groups ($P > 0.05$). After drug intervention,compared with the model group rats,the SPH3127 group,SB431542 group,and valsartan group all showed a decrease in SBP,Ang II concentration,serum creatinine concentration,and urea nitrogen con-

基金项目: 内蒙古自治区高等学校“青年科技英才支持项目”(NJYT23075);内蒙古医学科学院公立医院科研联合基金科技项目(2023GLLH0193);包头医学院青年科技人才发展计划临床医学+流行病学多学科联合科研基金(BYJJ-DXK 2022035);包头医学院创新团队基金资助项目(byjj-yfytd-007);内蒙古自治区包头市鹿城英才计划项目(YFYRC-LCYC-2023001);“草原英才”工程专项资金支持项目(CYYC230401);包头医学院科研创新项目(BYKYCX202452)

作者简介: 杨少华(1999-),女,硕士研究生。E-mail:2304013189@qq.com
通讯作者: 张昕,博士,教授。E-mail:zhangxinwdq@sina.com

centration, degree of glomerular atrophy, collagen fiber deposition, podocyte apoptosis, TGF- β /Smads mRNA and protein expression levels ($P < 0.05$). Compared with the SPH3127 group, the SB431542 group showed a decrease in TGF- β /Smads mRNA and protein expression levels ($P < 0.05$), an increase in SBP, Ang II, and urea nitrogen concentrations ($P < 0.05$), an increase in collagen fiber deposition ($P < 0.05$), and an increase in podocyte apoptosis levels. **Conclusion:** SPH3127 can alleviate renal podocyte apoptosis and fibrosis caused by hypertension by inhibiting the TGF- β /Smads signaling pathway by suppressing AngII levels.

[Key words] Hypertensive nephropathy; Angiotensin II; Transforming growth factor- β 1; Renin inhibitor

全球高血压患病率呈逐年递增趋势^[1], 研究^[2]数据示从 1990 年到 2019 年, 30 ~ 79 岁的高血压患者人数增加显著, 1990 年约有 648 万高血压患者, 到 2019 年增长至 1 278 万。高血压是继发性慢性肾脏病的首要病因, 即高血压肾病^[3], 高血压状态时, 肾脏会出现血管的适应性结构变化, 这不仅进一步放大了已经升高的血压值, 还致使氧气穿过平滑肌壁的扩散距离变大, 从而导致了肾小球和肾小管间质结构的缺血缺氧性损伤^[4-5]。随着人口老龄化, 高血压肾病患者在未来几十年将进一步增加^[6], 患者也同样日渐重视相关的血压管理理念, 人们迫切需求新的治疗方案。

肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 阻滞剂的处方仍然是一线选择^[7-9], 其中血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 有调节血压和促进纤维化的重要作用, 考虑其促纤维化作用与转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 过表达密切相关^[6]。TGF- β 1 是高血压肾病的主要驱动因素, 可抑制炎症和诱导自噬来发挥保护作用。但 TGF- β 1 的过表达可以通过激活 TGF- β /Smads 经典信号通路和非经典信号通路来引发肌成纤维细胞的产生、过多的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 成分累积和 ECM 降解抑制, 从而导致肾纤维化的发生^[10]。高血压肾病发展为终末期肾病 (end stage renal disease, ESRD) 过程中必不可少的一环即肾脏的纤维化^[11-12]。SPH3127 是一种新开发的抗高血压药物, 可从 RAS 源头阻断肾素的产生, 从而有效降低 Ang II 水平。课题组已有动物实验及细胞实验^[13-15]可证实 SPH3127 可激活 Nrf2/HO-1 通路、抑制 ERK1/2/Cx43 信号通路, 抑制炎症、减轻氧化应激, 对保护血管内皮及改善血管重构有重要意义。目前 SPH3127 对高血压肾病的作用机制尚不明确, 故本研究旨在探索 SPH3127 能否通过 Ang II 抑制 TGF- β 1 表达, 达到对高血压肾损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取雄性 SPF 级 8 周龄 SD 大鼠 75 只为研究对象, 体质量为 180 ~ 200 g, 购自斯贝福 (北京) 生

物科技有限公司, 动物许可证: SCXK (京) 2019-0010。饲养于包头医学院转化医学中心动物室, 温度 24 ~ 26 $^{\circ}\text{C}$, 湿度为 50% ~ 60%, 分笼 (5 只/笼) 标准饲料饲养, 自由进食水。本实验均符合动物管理条例, 已通过内蒙古科技大学包头医学院动物伦理审查委员会批准 [包医动伦审 (2023) 71 号]。

1.2 实验试剂与仪器

肾素抑制剂 SPH3127 (2016L04321), 购自上海医药集团股份有限公司; 缬沙坦 (H20040217) 购自北京诺华制药有限公司, SB-431542 (HY-10431), 购自 MCE 公司; 血管紧张素 II、肌酐、尿素氮酶联免疫分析试剂盒 (MM-0211R1、MM-20553R2、MM-20555R2), 购自江苏酶免; TGF- β 1 抗体 (21898-1-AP) 购自 proteintech 公司; Smad3 抗体 (EP568Y) 购自 abcam 公司; Smad7 抗体 (A12343) 购自 ABclonal; WT1 (DF6331) 抗体购自 Affinity 公司; TUMEL 试剂盒 (G1507) 购自国药集团化学试剂公司。

1.3 分组、建模及给药

75 只大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为 5 组 (假手术组、模型组、SPH3127 组、SB-431542 组、缬沙坦组), 每组各 15 只。除假手术组外, 其余大鼠均采用两肾一夹法 (2K1C) 的手术方法制备高血压模型, 通过结扎左侧肾动脉建立高血压模型。腹腔内注射 2% 戊巴比妥钠 (1.5 mL/kg) 麻醉大鼠。腹正中中线开口, 将 0.2 mm 的 U 型银夹置于大鼠的左肾动脉中段, 右侧肾脏不做处理, 造成单侧肾动脉的狭窄, 假手术组只游离左侧肾动脉而不放置银夹。每周测定大鼠尾动脉收缩压 (SBP), 测量 4 周, 测得收缩压较之前的基准值上升达 30 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 则认为高血压模型建立成功。造模成功后, SPH3127 组 10 mg/kg SPH3127 灌胃及 10 mL/kg 0.9% 氯化钠溶液腹腔注射; SB-431542 组 10 mL/kg 去离子水灌胃及 10 mg/kg SB-431542 腹腔注射; 缬沙坦组 30 mg/kg 缬沙坦灌胃及 10 mL/kg 0.9% 氯化钠溶液腹腔注射; 假手术组、模型组采用 10 mL/kg 去离子水灌胃及 10 mL/kg 0.9% 氯化钠溶液腹腔注射。1 次/d, 连续干预 4 周。最终 5 组大鼠造模成功数量分别为 14、13、13、12、12 只。

1.4 大鼠尾动脉收缩压测量

无创血压检测仪预热至 37 $^{\circ}\text{C}$, 使大鼠头部朝向

固定器的末端开口,将鼠尾留在固定器外,并将压脉套放置在大鼠尾部近心端的 1/3 处。通过 BP300A 全自动大小鼠无创血压测量系统测量大鼠收缩压,重复测定 3 次后取平均值。

1.5 大鼠血清样本及肾脏组织的收集和保留方法

药物干预 4 周后取材。腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,10 min (3 000 r/min) 离心后取上清冷冻保存。取血后,迅速剥离大鼠右肾,右肾纵切均分为三份,一份放入 4% 组织细胞固定液中进行稳定保存;一份置于 -80 ℃ 的冰箱里冷冻保存;一份放入 RNA 保存液中 4 ℃ 保存。整个取材过程严格遵循无菌操作原则。

1.6 大鼠 Ang II、肌酐、尿素氮水平的测定

使用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清 Ang II、肌酐 (serum creatinine, Scr)、尿素氮水平 (blood urea nitrogen, BUN)。

1.7 肾脏组织的处理

1.7.1 肾脏病理组织学观察 多聚甲醛溶液浸泡 24 h,乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片,分别行 HE 染色、天狼星红染色、TUNEL 与 WT1 共染,最后封片。

(1) 肾脏组织 HE 染色 HE 染色观察显微镜下肾小球及肾小管间质损伤情况,并用图像分析软件 (Image J Fiji 版本) 行肾小球萎缩程度的半定量分析。

(2) 肾脏组织天狼星红染色 天狼星红染色后用 Image J 分析胶原阳性面积比率,并在偏振光显微镜下观察肾脏组织 I 型胶原纤维与 III 型胶原纤维的分布范围及特点。

(3) 肾脏组织 TUNEL 与 WT1 共染 WT1 持续表达于足细胞核,可用作足细胞的特异性标志,故课题组采用免疫荧光法将 TUNEL、WT1 与 DAPI 共染,观察足细胞凋亡情况。DAPI 染出来的细胞核在紫外光的激发下为蓝色,TUNEL 试剂盒为 488 荧光素标记,阳性凋亡细胞为绿色,WT1 抗体标记为红色。

1.7.2 Western blot 法检测大鼠肾脏中 TGF-β1、Smad3 及 Smad7 蛋白表达水平 取大鼠 -80 ℃ 冷冻保存的肾脏组织,提取总蛋白并进行定量,SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 TGF-β1、Smad3 及 Smad7 蛋白的表达水平。Image J 软件读取条带灰度值。

1.7.3 RT-qPCR 法检测大鼠肾脏中 TGF-β1、Smad3 及 Smad 7 mRNA 表达水平 取大鼠 RNA 固定液保存的肾脏组织,提取组织总 RNA。按试剂盒说明书合成 cDNA 后进行扩增,配制 PCR 反应液,采集荧光信号 40 个循环。TGF-β1 引物:上游 5'-ACTCTCCACCTGCAAGACC-3',下游 5'-CTGGCGA GCCTTAGTTTGGAC-3'; Smad3 引物:上游 5'-GT-

GCTCCATCTCCTACTACGA-3',下游 5'-AGTGAAGC-CATCTACTGTCA-3'; Smad7 引物:上游 5'-GGGC TTTCAGATTCCCAACTT-3',下游 5'-AGGGCTCTTG-GACACAGTAGA-3';内参 GAPDH 引物:上游 5'-AC-CCAGATCATGTTTGAGACCT-3',下游 5'-GAC-CAGAGGGATACAGGGACAAC-3'。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 27.0 统计学软件进行数据分析,Origin2024 版本绘制图表。满足正态分布的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较满足正态分布和方差齐用单因素方差分析,两两比较用 LSD 法;方差不齐用 Tamhane's T2 检验;不满足正态分布用非参数检验,两组比较用 Wilcoxon 秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SPH3127 对大鼠尾动脉收缩压的影响

造模前,所有大鼠 SBP 比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);造模 4 周后,与假手术组相比,模型组、SPH3127 组、SB-431542 组、缬沙坦组 SBP 均升高 ($P < 0.05$),但四组间比较无统计学差异 ($P > 0.05$);给药 4 周后,与模型组相比,SPH3127 组、SB-431542 组、缬沙坦组 SBP 降低 ($P < 0.05$);与 SPH3127 组相比,缬沙坦组 SBP 无统计学差异 ($P > 0.05$),SB-431542 组 SBP 升高 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠尾动脉收缩压(SBP)结果比较($\bar{x} \pm s$, mmHg)			
组别	造模前	造模 4 周后	给药 4 周后
假手术组 (n=14)	112.64 ± 9.50	107.36 ± 7.70	112.07 ± 8.62
模型组 (n=13)	110.00 ± 12.45	165.38 ± 7.33 ^①	166.38 ± 7.23 ^①
SB-431542 组 (n=12)	107.67 ± 11.01	165.17 ± 6.99 ^①	157.08 ± 7.66 ^{①②}
缬沙坦组 (n=12)	107.58 ± 10.18	162.25 ± 7.12 ^①	105.67 ± 4.29 ^{①②③}
SPH3127 组 (n=13)	110.08 ± 13.29	163.92 ± 7.35 ^①	109.38 ± 6.97 ^{②③}
F 值	0.440	165.255	210.374
P 值	0.779	<0.001	<0.001

① $P < 0.05$,与假手术组比较;② $P < 0.05$,与模型组比较;③ $P < 0.05$,与 SB-431542 组比较。

2.2 SPH3127 对大鼠血清 Ang II、肌酐及尿素氮水平的影响

与模型组相比,假手术组、SPH3127 组、SB-431542 组及缬沙坦组血清 Ang II、Scr、BUN 浓度均降低 ($P < 0.05$);与 SPH3127 组相比,缬沙坦组 Scr 浓度升高 ($P < 0.05$)、Ang II 浓度、BUN 浓度无统计学差异 ($P > 0.05$),SB-431542 组 Ang II 浓度、BUN 浓度升高 ($P < 0.05$),Scr 浓度无统计学差异 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 SPH3127 对高血压大鼠肾脏 HE 染色的影响

HE 染色观察显微镜下模型组与假手术组、

SPH3127 组、SB-431542 组及缬沙坦组相比,出现肾小球的萎缩、肾小球细胞核的溶解破碎、肾小球细胞数量减少,肾脏间质可见融合,黑色箭头示胶原沉积。

与模型组相比,假手术组、SPH3127 组及 SB-431542 组单位视野内肾小球数量及肾小球内细胞数量增多,肾小球面积增大($P < 0.05$),缬沙坦组单位视野内肾小球数量及肾小球内细胞数量增多($P < 0.05$),肾小球面积未见明显差异($P > 0.05$);与 SPH3127 组相比,缬沙坦组单位视野内肾小球数量减少、肾小球面积减小($P < 0.05$)、肾小球内细胞数量无统计学差异($P > 0.05$),SB-431542 组单位视野内肾小球数量、肾小球内细胞数量及肾小球面积

无统计学差异($P > 0.05$)。见图 1 及表 3。

表 2 各组大鼠血清血管紧张素 II (Ang II)、肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN) 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	AngII (pg/mL)	Scr (μmol/L)	BUN (mmol/L)
假手术组 (n=14)	17.13 ± 11.15	27.98 ± 11.91	47.24 ± 4.72
模型组 (n=13)	93.87 ± 9.83 ^①	92.97 ± 8.14 ^①	94.04 ± 3.90 ^①
SB-431542 组 (n=12)	52.29 ± 4.68 ^{①②}	37.21 ± 16.05 ^②	60.85 ± 6.16 ^{①②}
缬沙坦组 (n=12)	37.11 ± 16.20 ^{①②③}	39.39 ± 13.06 ^{①②}	54.28 ± 6.92 ^{①②③}
SPH3127 组 (n=13)	25.87 ± 9.73 ^{②③}	30.03 ± 17.12 ^{②④}	52.50 ± 4.62 ^{①②③}
F 值	75.663	51.551	161.289
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

① $P < 0.05$,与假手术组比较;② $P < 0.05$,与模型组比较;③ $P < 0.05$,与 SB-431542 组比较。④ $P < 0.05$,与缬沙坦组比较。

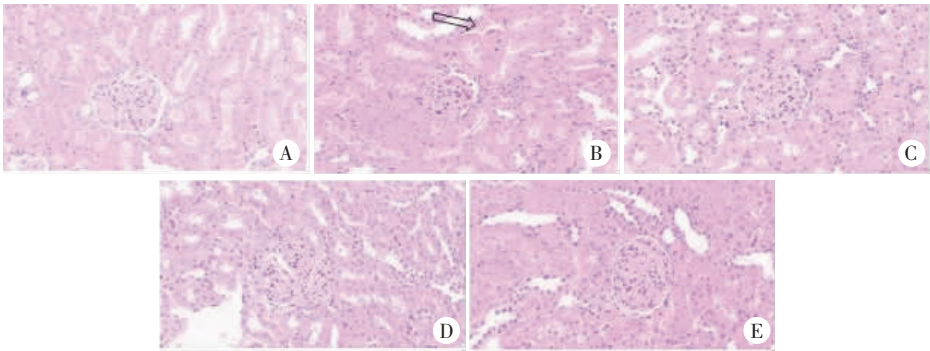


图 1 HE 染色法观察各组大鼠肾脏组织病理形态变化(×400)

A. 假手术组;B. 模型组;C. SPH3127 组;D. SB-431542 组;E. 缬沙坦组。

表 3 各组大鼠肾脏组织的半定量分析结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	单位视野内 肾小球数量	肾小球内 细胞数量	肾小球面积(μm ²)
假手术组 (n=6)	11.00 ± 1.67	58.50 ± 7.12	223.37 ± 3.43
模型组 (n=6)	6.17 ± 0.75 ^①	36.83 ± 6.18 ^①	216.32 ± 1.55 ^①
SB-431542 组 (n=6)	10.50 ± 2.26 ^②	50.00 ± 7.01 ^{①②}	221.47 ± 2.39 ^②
缬沙坦组 (n=6)	10.33 ± 0.81 ^②	48.17 ± 4.88 ^{①②}	214.86 ± 1.95 ^{①③}
SPH3127 组 (n=6)	13.17 ± 0.75 ^{②④}	49.50 ± 3.39 ^{①②}	222.37 ± 1.95 ^{②④}
F 值	56.954	10.360	16.738
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

① $P < 0.05$,与假手术组比较;② $P < 0.05$,与模型组比较;③ $P < 0.05$,与 SB-431542 组比较。④ $P < 0.05$,与缬沙坦组比较。

2.4 SPH3127 对高血压大鼠肾脏组织天狼星红染色的影响

与模型组相比,假手术组、SPH3127 组、缬沙坦组及 SB-431542 组胶原阳性面积比率降低($P < 0.05$);与 SPH3127 组相比,缬沙坦组胶原阳性面积比率无统计学差异($P > 0.05$),SB-431542 组胶原阳性面积比率升高($P < 0.05$)。天狼星红染色后在偏振光显微镜下观察得到:模型组较假手术组相比胶原沉积增多;药物干预的 SPH3127 组、SB-431542 组、缬沙坦组较模型组相比,胶原沉积情况均有不同程度的改善。见图 2、图 3 及表 4。

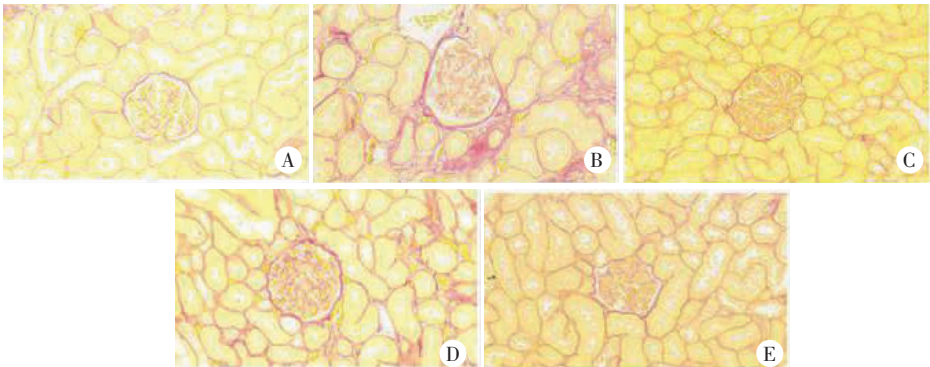
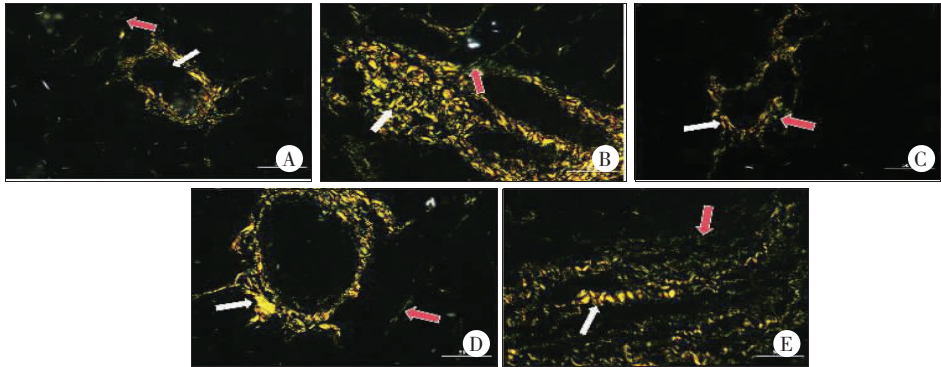


图 2 天狼星红染色法观察各组大鼠肾脏组织病理形态变化(×400)

A. 假手术组;B. 模型组;C. SPH3127 组;D. SB-431542 组;E. 缬沙坦组。



白色箭头指向 I 型胶原纤维;红色箭头指向 III 型胶原纤维。
图 3 偏振光显微镜下观察各组大鼠肾脏组织病理形态变化(×400)
A. 假手术组;B. 模型组;C. SPH3127 组;D. SB-431542 组;E. 缬沙坦组。

表 4 各组大鼠肾脏天狼星红染色胶原阳性面积比率($\bar{x} \pm s, \%$)	
组别	阳性面积比率
假手术组($n=6$)	2.91 ± 0.08
模型组($n=6$)	21.24 ± 5.59 ^①
SB-431542 组($n=6$)	13.59 ± 2.36 ^{①②}
缬沙坦组($n=6$)	6.66 ± 2.18 ^{②③}
SPH3127 组($n=6$)	3.99 ± 1.79 ^{②③}
F 值	38.662
P 值	<0.001

① $P<0.05$,与假手术组比较;② $P<0.05$,与模型组比较;③ $P<0.05$,与 SB-431542 组比较。

2.5 SPH3127 对足细胞凋亡的影响

假手术组、SPH3127 组、SB-431542 组、缬沙坦组虽均有一定的足细胞凋亡,但与模型组相比均有不同程度的改善;与 SPH3127 组相比,SB-431542 组足细胞凋亡增多。见图 4。

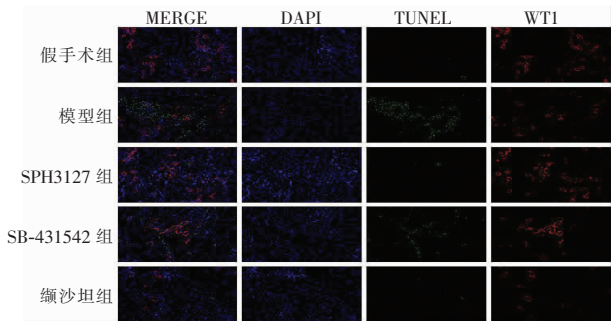


图 4 TUNEL 与 WT1 共染检测足细胞凋亡情况(×400)

2.6 SPH3127 对大鼠肾脏 TGF-β1/Smads 通路蛋白的影响

与模型组相比,假手术组、SPH3127 组、SB-431542 组、缬沙坦组 TGF-β1 和 Smad3 蛋白表达均降低($P<0.05$),Smad7 蛋白表达升高($P<0.05$);与 SPH3127 组相比,SB-431542 组 TGF-β1 和 Smad3 蛋白表达均降低($P<0.05$),Smad7 蛋白表达升高($P<0.05$);缬沙坦组 TGF-β1 和 Smad3 蛋白表达均升高($P<0.05$),Smad7 蛋白表达降低($P<$

0.05)。见表 5。

表 5 各组大鼠肾脏中 TGF-β1、Smad3 及 Smad7 相对表达量($\bar{x} \pm s$)			
组别	TGF-β1	Smad3	Smad7
假手术组($n=3$)	0.15 ± 0.05	0.13 ± 0.04	0.94 ± 0.06
模型组($n=3$)	0.94 ± 0.06 ^①	0.96 ± 0.05 ^①	0.20 ± 0.02 ^①
SB-431542 组($n=3$)	0.32 ± 0.08 ^{①②}	0.36 ± 0.03 ^{①②}	0.75 ± 0.08 ^{①②}
缬沙坦组($n=3$)	0.70 ± 0.06 ^{①②③}	0.66 ± 0.06 ^{①②③}	0.38 ± 0.06 ^{①②③}
SPH3127 组($n=3$)	0.46 ± 0.03 ^{①②③④}	0.51 ± 0.05 ^{①②③④}	0.59 ± 0.03 ^{①②③④}
F 值	87.964	152.586	86.270
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

① $P<0.05$,与假手术组比较;② $P<0.05$,与模型组比较;③ $P<0.05$,与 SB-431542 组比较。④ $P<0.05$,与缬沙坦组比较。

2.7 SPH3127 对大鼠肾脏中 TGF-β1、Smad3 及 Smad7 mRNA 的表达影响

与模型组相比,假手术组、SPH3127 组、SB-431542 组、缬沙坦组 TGF-β1 mRNA 和 Smad3 mRNA 表达均降低($P<0.05$)、Smad7 mRNA 表达均升高($P<0.05$);与 SPH3127 组相比,SB-431542 组 TGF-β1 mRNA 表达降低($P<0.05$)、Smad7 mRNA 表达升高($P<0.05$)、Smad3 mRNA 表达无统计学差异($P>0.05$),缬沙坦组 TGF-β1 mRNA 表达升高($P<0.05$)、Smad3 mRNA 和 Smad7 mRNA 表达无统计学差异($P>0.05$)。见表 6。

表 6 各组大鼠肾脏中 TGF-β1、Smad3 及 Smad7 mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$)			
组别	TGF-β1	Smad3	Smad7
假手术组($n=3$)	1.01 ± 0.04	1.06 ± 0.11	1.09 ± 0.08
模型组($n=3$)	2.19 ± 0.10 ^①	2.31 ± 0.20 ^①	0.44 ± 0.05 ^①
SB-431542 组($n=3$)	1.34 ± 0.09 ^{①②}	1.38 ± 0.15 ^{①②}	0.88 ± 0.07 ^{①②}
缬沙坦组($n=3$)	1.87 ± 0.12 ^{①②③}	1.61 ± 0.11 ^{①②}	0.59 ± 0.05 ^{①②③}
SPH3127 组($n=3$)	1.53 ± 0.07 ^{①②③④}	1.44 ± 0.13 ^{①②}	0.70 ± 0.06 ^{①②③}
F 值	79.652	32.600	44.837
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

① $P<0.05$,与假手术组比较;② $P<0.05$,与模型组比较;③ $P<0.05$,与 SB-431542 组比较。④ $P<0.05$,与缬沙坦组比较。

3 讨论

目前临床上第一个口服有效的肾素抑制剂阿利克仑,经研究^[16]发现,其有降压及高血压靶器官损害的保护作用,但其生物利用度较低,不良反应较多,包括胃肠道反应、头痛、腰痛等症状。为提升肾素抑制剂的降压及靶器官保护作用,且完善如阿利吉伦类药物的不足之处,开发了新型肾素抑制剂 SPH3127,其药物试验已到临床试验阶段。SPH3127 通过直接抑制肾素活性,抑制 RAS 级联系统的激活,阻断下游血管紧张素的生成。其中发挥重要作用的 Ang II 对 TGF-β1 影响较大,具体作用机制如下:(1) Ang II 直接调控特异性转录序列激活 TGF-β1 基因转录;(2) Ang II 可激活血管紧张素 II 1 型受体,从而促进了 TGF-β1 的促纤维化通路;(3) AngII 诱导 NADPH 氧化应激反应,上调 TGF-β1 的表达^[17-18]。TGF-β1 具有调节纤维结缔组织增生、胶原合成和沉积的作用,是与心肌纤维化、肝纤维化及肺纤维化关系最紧密的细胞因子之一^[19-21]。TGF-β1 可通过 Smad 经典依赖途径使肌成纤维细胞激活,促使胶原等 ECM 生成增加、降解减少,从而导致肾脏的纤维化^[22]。其中 Smad3 是 TGF-β 经典信号通路中重要的致纤维化信号蛋白^[23],而 Smad7 则具有肾脏保护的作用。研究^[24]证实,Smad3 基因敲除后对动物肾纤维化有一定的改善作用。本研究发现,SPH3127 可降低 2K1C 高血压模型大鼠 TGF-β1/Smads mRNA 和蛋白的相对表达。SB-431542 是 TGF-β1 的特异性抑制剂,可阻断 Smad 的磷酸化,下调 TGF-β1,减少与纤维化有关的基因表达,其与 SPH3127 组相比,TGF-β/Smad3 通路蛋白及 mRNA 相对表达升高,但 SBP、Ang II、尿素氮浓度升高,胶原纤维沉积增多,足细胞凋亡水平升高。

肾脏纤维化的特征是成纤维细胞和 ECM,如胶原蛋白和纤连蛋白的过度累积,同时有足细胞凋亡、肾小球萎缩、肾间质纤维化等现象发生^[25]。本研究发现,SPH3127 可抑制 2K1C 高血压模型大鼠肾小球萎缩及胶原的沉积,其对高血压肾损伤的保护作用优于 SB-431542 的药物干预。考虑肾纤维化是由多种信号通路及相应细胞因子作用的结果,除了 TGF-β 依赖性机制外,Ang II 可直接通过血管紧张素 II 1 型受体(angiotensin II type 1 receptor,AT1)受体介导的 ERK/p38 MAP 通路刺激 ECM 的产生,Ang II 也可诱导纤维化的其他机制,包括促进缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1)产生,达到激活活性氧、促进肌成纤维细胞的活化和转分化的作用,出现肾脏组织缺氧依赖性纤维化^[26-27]。而

SPH3127 可从源头抑制 Ang II 的产生,故得出 SPH3127 对高血压肾病的保护作用优于 TGF-β1 的特异性抑制剂 SB-431542 的结果。

足细胞构成了肾小球屏障,足细胞间足突交错,其复杂的相互作用维持了肾小球滤过结构和功能的完整性^[28-29],成熟足细胞的丢失会导致不可逆的损伤^[30-31]。本研究证实,SPH3127 可抑制 2K1C 高血压模型大鼠肾脏肾小球的萎缩、胶原的沉积及足细胞的凋亡,SPH3127 也可改善高血压肾损伤引起的肾功能指标恶化。

既往研究^[32-33]发现,长期使用血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin-converting enzyme inhibitors, ACEI)及血管紧张素 II 受体拮抗剂(angiotensin II receptor blockers, ARB)类药物会导致的血管紧张素 I(angiotensin I, AngI)堆积和旁途径激活引起的 AngII 生成增多。本研究证实,与假手术组相比,SPH3127 组 Ang II 浓度及肾功能相关指标未见明显差异,而缬沙坦组 Ang II 浓度及肾功能相关指标升高,且出现更严重的肾小球萎缩、足细胞的凋亡及胶原的沉积,同样 TGF-β 经典通路相关蛋白表达也相对降低。

综上,本研究说明,SPH3127 可通过抑制 AngII 水平来抑制 TGF-β/Smads 信号通路以减轻高血压后的肾脏足细胞凋亡及肾的纤维化,且 SPH3127 对高血压肾损伤的保护作用优于缬沙坦与 TGF-β1 特异性抑制剂 SB-431542。

参考文献

[1] Mills KT, Bundy JD, Kelly TN, *et al.* Global disparities of hypertension prevalence and control: a systematic analysis of population-based studies from 90 countries [J]. *Circulation*, 2016, 134 (6): 441 - 450.

[2] Zhou B, Carrillo-Larco RM, Danaei G, *et al.* Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants [J]. *The Lancet*, 2021, 398 (10304): 957 - 980.

[3] Seccia TM, Caroccia B, Calò LA. Hypertensive nephropathy. Moving from classic to emerging pathogenetic mechanisms [J]. *Journal of Hypertension*, 2017, 35 (2): 205 - 212.

[4] Folkow B, Göthberg G, Lundin S, *et al.* Structural “resetting” of the renal vascular bed in spontaneously hypertensive rats (SHR) [J]. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1977, 100 (2): 270 - 272.

[5] Mennuni S, Rubattu S, Pierelli G, *et al.* Hypertension and kidneys: unraveling complex molecular mechanisms underlying hypertensive renal damage [J]. *Journal of Human Hypertension*, 2014, 28 (2): 74 - 79.

[6] Wang L, Wang J, Zhang Y, *et al.* Current perspectives and trends of the research on hypertensive nephropathy: a bibliometric analysis from 2000 to 2023 [J]. *Renal Failure*, 2024, 46 (1): 2310122.

- [7] Whelton PK, Carey RM. The 2017 clinical practice guideline for high blood pressure[J]. JAMA, 2017, 318(21): 2073–2074.
- [8] Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension; The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension [J]. Journal of Hypertension, 2018, 36(10): 1953–2041.
- [9] Unger T, Borghi C, Charchar F, et al. 2020 international society of hypertension global hypertension practice guidelines[J]. Hypertension (Dallas, Tex), 2020, 75(6): 1334–1357.
- [10] Li J, Sun YBY, Chen W, et al. Smad4 promotes diabetic nephropathy by modulating glycolysis and OXPHOS [J]. EMBO Reports, 2020, 21(2): e48781.
- [11] Ravid JD, Kamel MH, Chitalia VC. Uraemic solutes as therapeutic targets in CKD-associated cardiovascular disease [J]. Nature Reviews Nephrology, 2021, 17(6): 402–416.
- [12] Meyers CM, Geanacopoulos M, Holzman LB, et al. Glomerular disease workshop [J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2005, 16(12): 3472–3476.
- [13] 李瑜, 朱雅泉, 张昕. SPH3127 通过 ERK1/2/Cx43 信号通路改善高血压大鼠血管重构 [J]. 医学研究杂志, 2024, 53(12): 140–144, 156.
- [14] 李圆, 张昕, 马雯, 等. 基于 Nr2/HO-1 通路研究肾素抑制剂 SPH3127 对两肾一夹高血压大鼠血压的影响及可能的机制 [J]. 中国循环杂志, 2023, 38(8): 867–872.
- [15] 马雯, 白力, 邹琳, 等. SPH3127 调节炎症和 FXR1 对高血压血管内皮损伤的保护机制 [J]. 实用医学杂志, 2023, 39(4): 430–435.
- [16] Alshahrani S. Aliskiren-A promising antioxidant agent beyond hypertension reduction [J]. Chemico-Biological Interactions, 2020, 326: 109145.
- [17] Zhang HF, Gao X, Wang X, et al. The mechanisms of renin - angiotensin system in hepatocellular carcinoma; From the perspective of liver fibrosis, HCC cell proliferation, metastasis and angiogenesis, and corresponding protection measures [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 141: 111868.
- [18] Macconi D, Remuzzi G, Benigni A. Key fibrogenic mediators: old players. Renin-angiotensin system [J]. Kidney International Supplements, 2014, 4(1): 58–64.
- [19] Lu Y, Liu Z, Zhang Y, et al. METTL3-mediated m6A RNA methylation induces the differentiation of lung resident mesenchymal stem cells into myofibroblasts via the miR-21/PTEN pathway [J]. Respiratory Research, 2023, 24(1): 300.
- [20] Li R, Frangogiannis NG. Integrins in cardiac fibrosis [J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2022, 172: 1–13.
- [21] Siapoush S, Rezaei R, Alavifard H, et al. Therapeutic implications of targeting autophagy and TGF- β crosstalk for the treatment of liver fibrosis [J]. Life Sciences, 2023, 329: 121894.
- [22] Lan HY. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation [J]. International Journal of Biological Sciences, 2011, 7(7): 1056–1067.
- [23] Wu W, Wang X, Yu X, et al. Smad3 signatures in renal inflammation and fibrosis [J]. International Journal of Biological Sciences, 2022, 18(7): 2795–2806.
- [24] 麻志恒, 钟利平, 余柯娜, 等. Smad3 基因敲除对慢性肾纤维化 [C]. 上海: 2016 年中国中西医结合学会肾脏疾病专业委员会学术年会, 2016.
- [25] Arif E, Rathore YS, Kumari B, et al. Slit diaphragm protein Nephl and its signaling: a novel therapeutic target for protection of podocytes against glomerular injury [J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(14): 9502–9518.
- [26] Han Y, Wu X, Shi X, et al. akap1-stabilized timp-4 attenuates ang-II-induced oxidative stress and inflammation in vascular smooth muscle cells by inactivating the nf- κ b signaling [J]. Shock (Augusta, Ga), 2025, 63(5): 750–759.
- [27] Zhang D, Li G, Liu X, et al. KCa3.1 upregulation mediated by Ang II-induced JNK/AP-1 activation contributes to atrial fibrosis [J]. Cellular Signalling, 2025, 131: 111731.
- [28] Kriz W, Lemley KV. Mechanical challenges to the glomerular filtration barrier: adaptations and pathway to sclerosis [J]. Pediatric Nephrology (Berlin, Germany), 2017, 32(3): 405–417.
- [29] Cellesi F, Li M, Rastaldi MP. Podocyte injury and repair mechanisms [J]. Current Opinion in Nephrology and Hypertension, 2015, 24(3): 239–244.
- [30] Yu D, Petermann A, Kunter U, et al. Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria [J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2005, 16(6): 1733–1741.
- [31] Rincon-Choles H, Vasylyeva TL, Pergola PE, et al. ZO-1 expression and phosphorylation in diabetic nephropathy [J]. Diabetes, 2006, 55(4): 894–900.
- [32] Passos-Silva DG, Verano-Braga T, Santos RAS. Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions [J]. Clinical Science, 2013, 124(7): 443–456.
- [33] Zheng J, Hao H. Targeting renal damage: The ACE2/Ang-(1-7)/mas axis in chronic kidney disease [J]. Cellular Signalling, 2024, 124: 111413.

(收稿日期: 2025–02–04

修回日期: 2025–03–25)