

# 缬沙坦对高糖环境下大鼠肾小球系膜细胞氧化应激水平的影响

张莹<sup>1</sup>, 黄国良<sup>2</sup> (1.福建医科大学教学医院, 福建省福州儿童医院, 福州 350005; 2.福建医科大学附属协和医院内分泌研究所, 福州 350001)

**摘要:** 目的 观察缬沙坦对高糖环境下大鼠肾小球系膜细胞氧化应激水平的影响。方法 高糖(20 mmol·L<sup>-1</sup>)体外培养大鼠肾小球系膜细胞, 不同浓度缬沙坦(10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>和 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>)干预, 以 RT-PCR 技术检测细胞内还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶亚基 p22<sup>phox</sup> 的 mRNA 表达的变化, 并以 DCFH-DA 和 HE 标记细胞内活性氧(ROS), 流式细胞术检测细胞内 ROS 相对浓度。结果 高糖时间相关性诱导系膜细胞超氧阴离子(·O<sub>2</sub><sup>-</sup>)与过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)明显升高, 并引起 p22<sup>phox</sup> 的 mRNA 表达显著上调, 缬沙坦对高糖引起系膜细胞 p22<sup>phox</sup> 的 mRNA 表达增加有下调作用, 明显降低细胞内·O<sub>2</sub><sup>-</sup>和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度, 并呈浓度依赖性。结论 缬沙坦抑制高糖引起肾小球系膜细胞氧化应激可能和下调 p22<sup>phox</sup> 的 mRNA 表达有关。

**关键词:** 糖尿病肾病; 缬沙坦; NADPH 氧化酶; 氧化应激

中图分类号: R962.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)01-0011-05

## Effect of Valsartan on Rat Glomerular Mesangial Cells Oxidative Stress Induced by High Glucose

ZHANG Ying<sup>1</sup>, HUANG Guoliang<sup>2</sup> (1. Fuzhou Children's Hospital of Fujian, Fuzhou 350005, China; 2. Fujian Institute of Endocrine, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To observe the effect of valsartan on rat glomerular mesangial cells oxidative stress induced by high glucose. **METHODS** Mesangial cell was cultured in high glucose(20 mmol·L<sup>-1</sup>) and intervened by valsartan of different concentration(10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> and 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>). The mRNA of p22<sup>phox</sup>, which was the primary subunit of NADPH oxidase, was detected by semi-quantitative RT-PCR. The relative concentration of reactive oxygen species (ROS) in cells was measured by flow cytometry, using DCFH-DA and HE label, in order to observe the effect of valsartan on glomerular mesangial cells

作者简介: 张莹, 女, 硕士, 主治医师

Tel: 13809556321

E-mail: honionh@163.com

oxidative stress induced by high glucose. **RESULTS** The expression of p22<sup>phox</sup> mRNA as well as  $\cdot\text{O}_2^-$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  was up-regulated by glucose concentration and showed time dependent effect, and it was inhibited by valsartan, the inhibitory effect had dose dependent effect. **CONCLUSION** Valsartan inhibits the up-regulated of oxidative stress induced by high glucose, and it could be concerned with down regulation of the expression of p22<sup>phox</sup> mRNA.

**KEY WORDS:** diabetic nephropathy; valsartan; NADPH oxidase; oxidative stress

缬沙坦对糖尿病肾病的治疗作用已经得到临床证实,但具体机制未明。本研究以大鼠肾小球系膜细胞为研究对象,模拟体内高糖环境,观察缬沙坦对活性氧(ROS)及其产生的主要来源——NADPH 氧化酶亚基 p22<sup>phox</sup> 表达的影响,观察系膜细胞氧化应激水平的变化,从而为缬沙坦对糖尿病肾病的治疗机制提供思路。p22<sup>phox</sup> 是 NADPH 氧化酶重要的跨膜亚基,而 NADPH 氧化酶是细胞内 ROS 产生的主要来源,通过对 p22<sup>phox</sup> mRNA 表达的观察,可以了解缬沙坦对高糖刺激下系膜细胞氧化应激水平的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 大鼠系膜细胞分组

大鼠肾小球系膜细胞株(HBZY-1,武汉大学中国典型培养物保藏中心);MEM 培养基,根据缬沙坦浓度不同,分组如下,对照组(葡萄糖浓度  $5.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),高糖组(葡萄糖浓度  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),高糖+缬沙坦组(高糖  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,缬沙坦浓度分别为  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

### 1.2 半定量 RT-PCR

按 Trizol 试剂(MBI 公司)说明书提取总 RNA,DEPC 水(上海生物工程公司)溶解,  $-80^\circ\text{C}$  保存。逆转录:以  $\beta$ -actin 为内参照,按逆转录试剂盒(MBI 公司)的说明书步骤进行逆转录,取总 RNA  $1 \mu\text{g}$ ,以多聚寡核苷酸 Oligo(dT)<sub>15</sub> 为引物,在 M-MuLV 逆转录酶的作用下合成 cDNA。反应条件为  $42^\circ\text{C}$   $60 \text{ min}$  逆转录,  $70^\circ\text{C}$   $10 \text{ min}$  灭活 M-MuLV。PCR: p22<sup>phox</sup> 引物:上游  $5'$ -GACGCTTCACGCAGTGGTACT-3',下游  $5'$ -CACGACCTCATCTGTCCTGG-3';扩增条件:  $97^\circ\text{C}$  预热  $5 \text{ min}$ ,  $95^\circ\text{C}$   $5 \text{ min}$ ,  $94^\circ\text{C}$   $60 \text{ s}$ ,  $65^\circ\text{C}$   $60 \text{ s}$ ,  $72^\circ\text{C}$   $90 \text{ s}$ ,循环数 30, p22<sup>phox</sup> 终产物  $485 \text{ bp}$ 。 $\beta$ -actin 引物:上游  $5'$ -ATGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGC-3',下游  $5'$ -AGCATTTGCGGTGCACGATGGAGGG-3'; $\beta$ -actin 终产物  $607 \text{ bp}$ 。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶(含溴化乙啶  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 鉴定。英国 SYNGENE 公司 GENEGENIUS 凝胶成像分析系统分析,以目标条带与  $\beta$ -actin 荧光强度的比值作为半定量值。

### 1.3 流式细胞术

接种于 6 孔板的系膜细胞培养至亚融合状态后,加入各种实验因素作用,消化细胞成为细胞悬液,离心,吸弃上清液,分别加入 DCFH-DA  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  或 HE  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  避光  $37^\circ\text{C}$  孵育  $45 \text{ min}$  后,立即  $4^\circ\text{C}$  中止反应,用 BD 公司的 FACSscan 型 FCM 以激发波长  $488 \text{ nm}$ ,发射波长  $525 \text{ nm}$ (测  $\text{H}_2\text{O}_2$ )和  $610 \text{ nm}$ (测  $\cdot\text{O}_2^-$ )进行检测。由于 HE 容易氧化为 EB,所以在检测  $\cdot\text{O}_2^-$  之前加入  $10 \mu\text{L}$  的  $5.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的台盼兰以消除 HE 中污染 EB 的影响,以不加 DCFH-DA 和 HE 的为对照管,以扣除非特异性荧光背景,以 Cell Quest<sup>TM</sup> 软件分析系膜细胞平均荧光强度和阳性细胞数。

### 1.4 统计分析

实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表述,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用  $Q$  检验,用 SPSS 12.0 版软件进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 缬沙坦对高糖刺激下系膜细胞内 p22<sup>phox</sup> mRNA 表达的影响

采用葡萄糖浓度为  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的培养基作用于大鼠系膜细胞,加入缬沙坦浓度分别为  $0$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  干预,同时设定对照组(葡萄糖浓度为  $5.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。于第 2 天、第 5 天提取总 RNA 进行 RT-PCR,系膜细胞内 NADPH 氧化酶亚基 p22<sup>phox</sup> 的 mRNA 相对表达量以  $F'$  值表示,  $F' = \text{p22}^{\text{phox}}/\beta\text{-actin}$ 。结果发现,高糖作用 2 d 时, p22<sup>phox</sup> 的 mRNA 表达并没有明显的升高,加入缬沙坦后也无明显改变;高糖作用时间延长至 5 d 时, p22<sup>phox</sup> 的 mRNA 升高,而缬沙坦组较高糖组有明显的下降,在缬沙坦浓度  $10^{-7} \sim 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  内,可见随着浓度的增加, p22<sup>phox</sup> mRNA 的表达逐渐下降,具有明显的浓度依赖性。

### 2.2 缬沙坦对高糖刺激下系膜细胞内 ROS 的影响

**2.2.1 缬沙坦对高糖刺激下系膜细胞内  $\cdot\text{O}_2^-$  产生的影响** HE 荧光探针标记细胞内  $\cdot\text{O}_2^-$ ,流式细胞仪检测平均细胞荧光强度,实际荧光强度 = 测定

荧光强度-对照管自发荧光强度。结果发现，高糖作用 2 d 时， $\cdot\text{O}_2^-$  荧光强度高糖组为对照组荧光强度

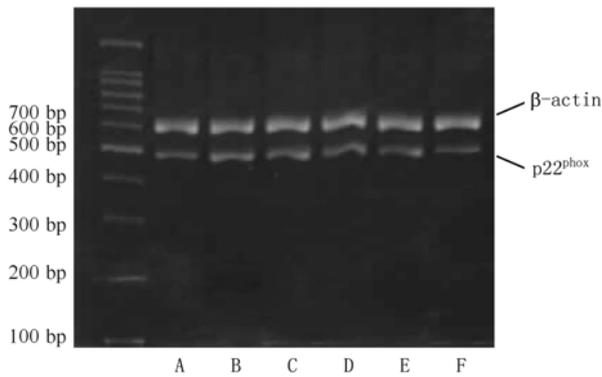
**表 1** 缬沙坦对高糖刺激下系膜细胞内 p22<sup>phox</sup> mRNA 表达影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

**Tab 1** The effect of valsartan on the expression of p22<sup>phox</sup> mRNA induced by high glucose in rat glomerular mesangial cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

组别	作用 2 d F 值	作用 5 d F 值
对照组	0.379±0.014	0.372±0.011
高糖组	0.395±0.015	0.677±0.025 <sup>1)</sup>
高糖+缬沙坦 10 <sup>-7</sup> mol·L <sup>-1</sup> 组	0.394±0.016	0.598±0.013 <sup>2)</sup>
高糖+缬沙坦 10 <sup>-6</sup> mol·L <sup>-1</sup> 组	0.383±0.006	0.499±0.014 <sup>2)</sup>
高糖+缬沙坦 10 <sup>-5</sup> mol·L <sup>-1</sup> 组	0.373±0.008	0.392±0.030 <sup>2)</sup>
高糖+缬沙坦 10 <sup>-4</sup> mol·L <sup>-1</sup> 组	0.367±0.027	0.373±0.012 <sup>2)</sup>

注：与对照组相比，<sup>1)</sup> $P<0.05$ ；与高糖组比，<sup>2)</sup> $P<0.05$

Note: Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with high glucose group, <sup>2)</sup> $P<0.05$



**图 1** 缬沙坦对高糖刺激 5 d 系膜细胞内 p22<sup>phox</sup> mRNA 表达影响

A-对照组；B-高糖组；C-高糖+缬沙坦 10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup> 组；D-高糖+缬沙坦 10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup> 组；E-高糖+缬沙坦 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup> 组；F-高糖+缬沙坦 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> 组

**Fig 1** The effect of valsartan on the expression of p22<sup>phox</sup> mRNA induced by high glucose in rat glomerular mesangial cells after 5 days

A-control group; B-high glucose group; C-high glucose+valsartan 10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup> group; D-high glucose+valsartan 10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup> group; E-high glucose+valsartan 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup> group; F-high glucose+valsartan 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> group

度 3.9 倍，而作用 5 d 后升高更加显著，高糖组为对照组 5.5 倍，并且，两个作用时间点中均可以看见，在高糖加缬沙坦干预组中，随着缬沙坦浓度在 10<sup>-7</sup>~10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> 内的增加， $\cdot\text{O}_2^-$  表达逐渐下降，甚至低于对照组水平。

**2.2.2 高糖对系膜细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产生的影响** DCFH-DA 荧光探针标记细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，流式细胞仪检测

平均细胞荧光强度，实际荧光强度=测定荧光强度-对照管自发荧光强度。结果发现，高糖作用 2 d 时，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 荧光强度高糖组为对照组荧光强度 3.9 倍，而作用 5 d 后升高更加显著，高糖组为对照组 5.1 倍，并且，两个作用时间点中均可以看见，在高糖加缬沙坦干预组中，随着缬沙坦浓度在 10<sup>-7</sup>~10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> 内的增加，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 表达逐渐下降，甚至低于对照组水平。

**表 2** 缬沙坦对高糖刺激下系膜细胞内  $\cdot\text{O}_2^-$  表达影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

**Tab 2** The effect of valsartan on the expression of  $\cdot\text{O}_2^-$  induced by high glucose ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

组别	作用 2 d $\cdot\text{O}_2^-$ 值	作用 5 d $\cdot\text{O}_2^-$ 值
对照组	51.50±16.22	61.32±15.22
高糖组	201.87±21.47 <sup>1)</sup>	340.45±53.02 <sup>1)</sup>
高糖+缬沙坦 10 <sup>-7</sup> mol·L <sup>-1</sup> 组	150.37±20.99 <sup>2)</sup>	211.73±40.55 <sup>2)</sup>
高糖+缬沙坦 10 <sup>-6</sup> mol·L <sup>-1</sup> 组	90.41±12.68 <sup>2)</sup>	107.02±28.45 <sup>2)</sup>
高糖+缬沙坦 10 <sup>-5</sup> mol·L <sup>-1</sup> 组	49.86±12.07 <sup>2)</sup>	58.48±20.40 <sup>2)</sup>
高糖+缬沙坦 10 <sup>-4</sup> mol·L <sup>-1</sup> 组	40.68±15.86 <sup>2)</sup>	42.18±12.61 <sup>2)</sup>

注：与对照组相比，<sup>1)</sup> $P<0.05$ ；与高糖组比，<sup>2)</sup> $P<0.05$

Note: Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with high glucose group, <sup>2)</sup> $P<0.05$

**表 3** 缬沙坦对高糖刺激下系膜细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 表达影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

**Tab 3** The effect of valsartan on the expression of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced by high glucose ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

组别	作用 2 d H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 值	作用 5 d H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 值
对照组	26.87±8.75	41.87±10.24
高糖组	104.82±15.88 <sup>1)</sup>	212.56±19.15 <sup>1)</sup>
高糖+缬沙坦 10 <sup>-7</sup> mol·L <sup>-1</sup> 组	70.27±8.58 <sup>2)</sup>	143.22±14.31 <sup>2)</sup>
高糖+缬沙坦 10 <sup>-6</sup> mol·L <sup>-1</sup> 组	41.65±8.99 <sup>2)</sup>	88.12±19.07 <sup>2)</sup>
高糖+缬沙坦 10 <sup>-5</sup> mol·L <sup>-1</sup> 组	30.09±13.51 <sup>2)</sup>	41.50±6.95 <sup>2)</sup>
高糖+缬沙坦 10 <sup>-4</sup> mol·L <sup>-1</sup> 组	22.97±13.17 <sup>2)</sup>	35.01±5.86 <sup>2)</sup>

注：与对照组相比，<sup>1)</sup> $P<0.05$ ；与高糖组比，<sup>2)</sup> $P<0.05$

Note: Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with high glucose group, <sup>2)</sup> $P<0.05$

### 3 讨论

糖尿病肾病是以细胞外基质在肾脏的过度积聚，导致肾小球系膜增生和肾小管间质纤维化为特征。氧化应激在糖尿病肾病的发病过程中为一原发且独立的参与因素，ROS 是氧化应激的基本环节，其能破坏组织蛋白、脂肪、核酸反应同时产生过氧化脂质，如各种醛、酮等，从而放大氧化损伤。肾脏能够产生 ROS，并且对氧化应激损害敏感，在肾皮质和外髓质均检测到了超氧阴离子的产生<sup>[1]</sup>，在高糖诱导的肾脏损害中，ROS 起

着非常重要的作用,首先,ROS 引起细胞外基质重构,细胞外基质沉积与肾功能的下降密切相关,而细胞外基质的沉积多少在于其合成和降解的平衡。ROS 促进肾内细胞外基质如 FN、IV 型胶原合成;下调纤溶酶原激活剂和基质金属蛋白酶;上调 PAI 以及 TIMP<sup>[2-3]</sup>。其次,ROS 激活信号转导级联(PKC, MAPK, JSK/STAT)、上调 TGF- $\beta_1$ 。再次,ROS 激活转录因子, NF- $\kappa$ B 和活化蛋白-1 是由 ROS 激活的普遍存在的转录因子<sup>[4-5]</sup>。此外,ROS 还影响血液动力学,上调炎症因子表达,加剧糖尿病肾病的发生和发展。

ROS 产生的直接来源,在非吞噬细胞中,主要来自 NADPH 氧化酶<sup>[6-8]</sup>, NADPH 氧化酶由膜单位和胞浆内单位组成。膜单位包括两个跨膜亚基 p22<sup>phox</sup> 和 gp91<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> 家族作为这个细胞色素的催化亚基,与 3 个辅基相连——一个黄素腺嘌呤二核苷酸和两个亚铁血红素分子,胞浆内单位则至少由 p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> 和 p40<sup>phox</sup> 等亚基组成。当细胞受到刺激时,胞浆组分迁移到胞膜并与膜组分结合,酶活化,还原底物 NADPH 在细胞膜的胞质面与 gp91<sup>phox</sup> 结合并释放 2 个电子,最终在膜的另一侧被 2 个相连的氧分子接受并产生两个  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\cdot\text{O}_2^-$  在超氧化物歧化酶的作用下转化为  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。 $\cdot\text{O}_2^-$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  均为 ROS 家族的重要成员。

肾素-血管紧张素系统(RAS)在糖尿病肾病发生发展时起重要作用,越来越多的证据显示不同的组织,尤其是肾脏存在局部血管紧张素产生系统。并且不依赖于循环 RAS 而起作用<sup>[9]</sup>。在肾脏,局部 RAS 包括其组分定位于近端小管细胞,微穿刺实验和微透析技术都证实了近端小管液和肾间质液含有 Ang II<sup>[10]</sup>。糖尿病肾病的发病机制中,Ang II 发挥着血流动力学和非血流动力学的双重作用。缬沙坦作为 ARB 类药物,是一种有效的非肽类 Ang II 受体阻滞剂,直接作用于 AT1R,具有高度特异性,从而在受体水平全面阻断 Ang II 的效应。在 ROS 的产生过程中,除了高糖、高脂、进展性糖基化终产物等能促进 ROS 的产生,近年来研究已表明 Ang II 在 ROS 的产生中也起了重要的作用。在系膜细胞和小管上皮细胞,Ang II 可诱导 ROS 产生<sup>[11]</sup>。所以,干预 Ang II 效应的药物 AT1 受体拮抗剂可以作为抗氧化剂起作用,阻止血管和肾脏变化。本次实验以系膜细胞为研究对象,更进一步地证实了缬沙坦对氧化应激水平的

影响。

笔者之前的研究已发现,高糖刺激系膜细胞后, NADPH 氧化酶的表达并不呈现时间和剂量的依赖关系,在作用的初期,无论是在正常葡萄糖糖组还是在不同高糖浓度组, p22<sup>phox</sup> 的 mRNA 表达均无明显的改变,只有达到一定的作用时间后, p22<sup>phox</sup> 才随着高糖作用时间的延长而上升。与此类似的,本次试验中,缬沙坦对高糖刺激后 NADPH 氧化酶亚基 p22<sup>phox</sup> 的 mRNA 的干预作用也出现在高糖刺激 5 d 后,而在高糖刺激 2 d 时,既没有高糖组 mRNA 的升高,也没有出现缬沙坦干预组的降低。出现这种现象的具体原因需要进一步研究和探讨,考虑可能与非吞噬细胞内 NADPH 氧化酶的组成和定位有关。在非吞噬细胞, NADPH 氧化酶亚基有可能都位于胞浆中,尤其是胞核附近,处于“预装配”状态,正常情况下,只有少量的预装配的 NADPH 氧化酶处于激活的状态,早期细胞受到刺激时,预装配的 NADPH 氧化酶稳定性改变,越来越多的 NADPH 酶从“稳定态”转变为“激活态”,当刺激持续时间足够长后,所有的 NADPH 氧化酶已经激活,这时应对细胞外刺激的反应就是 NADPH 氧化酶合成增多,表达升高。同样,缬沙坦对其的干预作用也方显现出来。

本研究显示缬沙坦对高糖刺激后 NADPH 氧化酶亚基 p22<sup>phox</sup> 的 mRNA 表达的上升有明显的抑制作用,并且具有浓度依赖性。同时,在本次实验中,笔者对 ROS 最重要成员  $\cdot\text{O}_2^-$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  进行了检测,发现缬沙坦对高糖刺激后引起的升高具有明显的抑制作用。因此,缬沙坦能够通过对其 NADPH 氧化酶表达的调控实现其对高糖刺激后氧化应激水平的干预,从整个实验来看,缬沙坦明显抑制了高糖引起的 NADPH 氧化酶的合成,抑制了 ROS 的产生,逆转了高糖所致细胞外基质的变化,而考虑到 NADPH 氧化酶及其产生的 ROS 对细胞外基质的影响,可以得出结论:缬沙坦至少是在一定程度上通过对 NADPH 氧化酶的影响,引起对细胞内 ROS 的调节,从而导致细胞外基质的变化,这可能为缬沙坦在糖尿病肾病治疗机制提供一个新思路。

## REFERENCES

- [1] ZOU A P, LI N, COWLEY A W. Production and actions of superoxide in the renal medulla [J]. Hypertension, 2001, 37(2): 547-553.

- [2] PAUTZ A, FRANZEN R, DORSCH S, et al. Cross-talk between nitric oxide and superoxide determines ceramide formation and apoptosis in glomerular cells [J]. *Kidney Int*, 2002, 61(3): 790-796.
- [3] SUN J, XU Y, DAI Z, et al. Intermittent high glucose stimulate MCP-1, IL-18, and PAI-1, but inhibit adiponectin expression and secretion in adipocytes dependent of ROS [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2009, 55(3): 173-180.
- [4] SHEU M L, HO F M, CHAO K F, et al. Activation of phosphoinositide 3-kinase in response to high glucose leads to regulation of reactive oxygen species-related nuclear factor-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression in mesangial cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2004, 66(1):187-196.
- [5] XU S, HE Y, VOKURKOVA M, et al. Endothelial cells negatively modulate reactive oxygen species generation in vascular smooth muscle cells: role of thioredoxin [J]. *Hypertension*, 2009, 54(2): 427-433.
- [6] BAYRAKTUTAN U, DRAPER N, LANG D, et al. Expression of a functional neutrophil-type NADPH oxidase in cultured rat coronary microvascular endothelial cells [J]. *Cardiovasc Res*, 1998, 38(1): 256-262.
- [7] WARNHOLTZ A, NICKENIG G, SCHULZ E, et al. Increased NADH-oxidase mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis *Circulation* [J]. 1999, 99(15): 2027-2033.
- [8] TAKEYA R, UENO N, SUMIMOTO H. Regulation of superoxide-producing NADPH oxidases in nonphagocytic cells [J]. *Methods Enzymol*, 2006, 406(1): 456-468.
- [9] WOLF G, BUTZMANN U, WENZEL U O. The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology [J]. *Nephron Physiol*, 2003, 93(1): 3-13.
- [10] NISHIYAMA A, SETH D M, NAVAR L G. Renal interstitial fluid concentrations of angiotensins I and II in anesthetized rats [J]. *Hypertension*, 2002, 39(1): 129-134.
- [11] ZHOU M S, HERNANDEZ SCHULMAN I, PAGANO P J, et al. Reduced NAD(P)H oxidase in low renin hypertension: link among angiotensin II, atherogenesis, and blood pressure [J]. *Hypertension*, 2006, 47(1): 81-86.

收稿日期: 2010-10-08