

补肾降压方对糖脂代谢异常的自发性 高血压大鼠脂联素通路的影响

段练, 刘咏梅, 李敏, 王阶*

(中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

[摘要] **目的:**观察补肾降压方对糖脂代谢异常的自发性高血压大鼠(spontaneous hypertensive rat, SHR)的影响及其对脂联素通路的影响。**方法:**选用清洁级 5 周龄 SHR 40 只,随机分为正常组和高糖高脂组。8 周造模后将高糖高脂组大鼠分为模型组(空白 SHR 伴糖脂代谢异常),卡托组(卡托普利)和补肾组(补肾降压方)。连续用药 8 周。检测血压,血糖,血脂,胰岛素。心肌组织切片行 HE 染色观察心脏组织病理形态学改变。Elisa 法检测血清中 ADP 的含量。实时定量 PCR 检测心脏组织和肝脏组织 PPAR α 的表达。Western blot 检测心脏 AdipoR1、AdipoR2 的蛋白表达。**结果:**与 SHR 组比较,模型组血压明显升高,卡托组和补肾组有明显降低;与模型组相比,卡托组和补肾组都有明显降低;与卡托组比较,补肾组有升高的趋势。与 SHR 组相比,模型组,卡托组,补肾组胰岛素均有降低;与模型组相比,卡托组和补肾组皆有降低的趋势。与 SHR 组相比,模型组,卡托组,补肾组脂联素均有降低趋势;与模型组相比,卡托组与补肾组有升高趋势。心脏 PPAR- α mRNA 表达中,模型组,卡托组和补肾组较 SHR 组有所升高;与模型组比较,卡托组和补肾组皆有所降低。在 AdipoR1 蛋白表达的比较中,模型组,卡托组,补肾组较 SHR 组均有升高;与模型组相比,卡托组与补肾组有降低趋势。在 AdipoR2 蛋白表达的比较中,模型组,卡托组,补肾组较 SHR 组均有升高,其中模型组和卡托组有显著性差异($P < 0.05$);与模型组和卡托组相比,补肾组有降低趋势。**结论:**补肾降压方对 SHR 伴糖脂代谢异常具有调节作用,对心脏具有一定保护作用,其作用很有可能通过调节脂联素通路实现。

[关键词] 补肾降压方;脂联素;血压;血糖;血脂

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)22-0011-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015220011

Effect of Tonifying Kidney Anti-Hypertension Decoction on Adiponectin Signaling Pathway in Spontaneously Hypertensive Rats with Abnormal Glucose and Lipid Metabolism DUAN Lian, LIU Yong-mei, LI Min, WANG Jie* (*Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China*)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of tonifying kidney anti-hypertension decoction on SHR with abnormal blood lipid and blood glucose and adiponectin pathway. **Method:** Totally 40 5-week-old clean grade SHRs were randomly divided into the normal diet group and high-fat group. After the modeling at the 8th week, the high-fat group rats were divided into three groups: model group (blank SHR with abnormal glucose and lipid metabolism), captopril group and tonifying kidney group (tonifying kidney anti-hypertension decoction). After the treatment of 8 weeks, the rats were killed to test their blood pressure, glucose, blood lipid and insulin. Myocardial tissue sections were stained with HE to observe the pathological changes in heart. The content of ADP in serum was detected by Elisa assay. **Result:** Before the treatment with drugs, blood pressure of SHRs with a high sugar and fat diet had no statistical difference. Blood pressure of groups with a high sugar and fat diet was higher than those with normal diet ($P < 0.05$). After the modeling at the 4th week, compared with the model group, captopril group showed a lower blood pressure significantly ($P < 0.05$). After 8 weeks, compared with the model group, captopril

[收稿日期] 20151008(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473561,81173116)

[第一作者] 段练,博士,从事中西医结合心血管研究,Tel:010-88001817, E-mail:popale2003@163.com

[通讯作者] *王阶,主任医师,从事中西医结合心血管研究,Tel:010-88001817, E-mail:wangjiedoctor2015@163.com

group and tonifying kidney group showed statistically significant difference in the blood pressure ($P < 0.01$). Compared with SHR group, model group, captopril group, tonifying kidney group showed decreased adiponectin, and model group had significant difference ($P < 0.05$). In PPAR- mRNA of heart, the model group, captopril group and tonifying kidney group were higher than SHR group. Compared with the model group, captopril group and tonifying kidney group were lower. The expressions of AdipoR1 protein in model group, captopril group and tonifying kidney group were higher than that in SHR group. Compared with the model group, captopril group and tonifying kidney group were lower. AdipoR2 protein expression in model group, captopril group and tonifying kidney group were higher than that in SHR group. Compared with the model group and the captopril group, tonifying kidney group had a decreasing tendency. **Conclusion:** Tonifying kidney anti-hypertension decoction can regulate the abnormal blood lipid and blood glucose of SHRs and protect their hearts. Its mechanism may be correlated with the regulation of adiponectin pathway.

[**Key words**] Tonifying kidney anti-hypertension decoction; adiponectin; blood pressure; lipid; blood glucose

临床上高血压往往与糖脂代谢异常紧密联系。高血压,高血糖,高血脂 3 种疾病互相影响,互相促进,增加发生心脑血管疾病的患病风险和病死率。在治疗上,高血压合并糖脂代谢异常往往需要多种药物配合治疗。各类降糖药物中格列酮类 PPAR γ 激动剂,在降糖药物中属胰岛素增敏剂,但对于肝脏具有一定的不良影响,并增加心衰的风险。他汀类为目前最有效最常用的降脂调脂药物,但长期服用可带来肝损害及肌肉溶解作用,限制了该类药物的大剂量,长期应用,大大降低了患者的依从性。

补肾降压方是基于补肾降压的治则治法而形成的治疗高血压病的临床经验方,该方由地黄、天麻、杜仲、三七等药物组成,具有补肾平肝,活血化瘀之功,主治高血压病引起的头痛,眩晕,耳鸣等肾虚证。前期临床研究表明,本方治疗高血压病疗效确切,能较好改善高血压病肾虚证患者的血压及临床症状^[1],但对于糖脂代谢异常的效果仍需验证。在前期的预实验中,课题组已经进行了量效关系的比较,确定了较为合适的剂量和浓度,所以此次实验在前期实验的基础上,进一步观察补肾降压方是否有调节血压,血糖,血脂的作用,并从脂联素的变化来探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物 选用清洁级 5 周龄雄性自发性高血压大鼠 (SHR) 40 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK (京) 2012-0001。

1.2 药物 补肾降压方 (颗粒剂),为中国中医科学院广安门医院药剂科制剂,每剂相当于生药:生地 25 g,山萸肉 10 g,杜仲 10 g,天麻 20 g 等,临用时配置成混悬液。4 ℃ 冰箱保存。链脲佐菌素 (STZ) 粉

剂 (Sigma 公司,批号 18883-66-4)。高糖高脂饲料:猪油 15% + 胆固醇 6% + 胆盐 3 号 2% + 丙基硫氧嘧啶 0.2% + 蔗糖 15% + 基础饲料 71.8%,由北京科澳协力饲料有限公司提供,合格证号 SCXK (京) 2005-0007。

2 方法

2.1 造模 除 SHR 组外,其余大鼠高糖高脂饲料饲养 8 周。将 STZ 按说明溶于柠檬酸缓冲液中, pH4.5,现用现配。8 周后给予自发性高血压合并高糖高脂模型大鼠 *ip* 小剂量 STZ (30 mg·kg⁻¹)。注射 STZ 12 h 后,尾静脉采血糖 > 11.1 mmol·L⁻¹,即为造模成功,成模率为 100%。

2.2 分组及给药 各组动物适应性喂养 1 周后,予实验室喂养 8 周,14 周龄开始给药,连续给药 8 周。SHR 空白组 (SHR 组) 每日予 0.9% 生理盐水 1 mL/100 g *ig* 给药,普通饲料和自由饮水。其余各组予高糖高脂饲料和自由饮水,SHR 高糖高脂组 (模型组) 每日 *ig* 0.9% 生理盐水 (1 mL/100 g); 卡托普利 + SHR 高糖高脂组 (卡托组),补肾组 (补肾降压方) 每日 *ig* 相应药物 (1 mL/100 g)。

2.3 体重,血糖,血压,血脂测定 给药前测量血压 1 次,后每 2 周测血压 1 次 (尾压法)。每周测体重 1 次。每 2 周尾静脉采血测量血糖 1 次。各组大鼠处死 (采血后),立即剖取脏器,按常规放入 10% 福尔马林溶液中固定,脱水,石蜡包埋,切片,HE 染色。其中血液进行生化分析,测定血脂。

2.4 Elisa 检测血清胰岛素,脂联素 (ADP) 取血清,由中国中医科学院广安门医院检验科按照胰岛素,脂联素试剂盒说明书严格操作。

2.5 PPAR α mRNA 检测 实时定量 PCR 检测心脏

组织和肝脏组织 PPAR α 的表达。

2.6 AdipoR1, AdipoR2 蛋白检测 Western blot 检测心脏 AdipoR1, AdipoR2 的蛋白表达。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 18.0 进行统计分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间差异比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 补肾降压方对各组 SHR 大鼠血压的影响 给药第 4 周, 大鼠血压出现了一定变化。给药后, 模型组较 SHR 组有明显升高 ($P < 0.05$); 卡托组较模型组有显著下降 ($P < 0.05$)。补肾组较给药前变化不大, 较卡托组为高。给药 8 周后, 大鼠血压有明显变化。与 SHR 组比较, 模型组血压明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 卡托组和补肾组有明显降低, 其中卡托组有统计学差异 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 卡托组和补肾组都有明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与卡托组比较, 补肾组有升高的趋势。见表 1。

由血压变化曲线可以看出, SHR 组血压稳步上升, 模型组血压同样稳定上升, 较 SHR 组血压为高, 卡托组血压前 4 周血压降低较快, 而补肾组血压保持较为稳定。

表 1 补肾降压方对模型大鼠血压的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of tonifying kidney anti-hypertension decoction on blood pressure of model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$) mmHg

组别	给药前血压	第 4 周血压	第 8 周血压
SHR	200.65 \pm 12.44	212.74 \pm 9.78	218.95 \pm 10.12
模型	210.73 \pm 11.73	223.56 \pm 12.66 ¹⁾	230.05 \pm 12.13 ¹⁾
卡托	212.24 \pm 12.03	198.37 \pm 13.45 ^{1,3)}	204.86 \pm 11.98 ^{1,3)}
补肾	210.89 \pm 13.11	211.55 \pm 11.34 ^{1,3)}	212.33 \pm 10.87 ^{1,3)}

注: 与 SHR 组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与卡托组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 5 同)。

3.2 补肾降压方对各组 SHR 大鼠体重、血糖、胰岛素、血脂的影响 血糖比较中, 与 SHR 组相比, 模型组, 卡托组, 补肾组均升高, 有显著性差异 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 卡托组和补肾组有显著性降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与卡托组比较, 补肾组有一定升高趋势, 但无显著性差异。胰岛素比较中, 与 SHR 组相比, 模型组, 卡托组, 补肾组均有降低, 模型组与补肾组有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组相比, 卡托组和补肾组皆有升高, 其中卡托组有显著性差异 ($P < 0.05$), 而补肾组无显著性差异。见表 2。

表 2 补肾降压方对模型大鼠体重、血糖、胰岛素的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of tonifying kidney anti-hypertension decoction on weight, blood glucose, insulin of model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	体重/g	血糖/mmol·L ⁻¹	胰岛素/mmol·L ⁻¹
SHR	319.00 \pm 31.30	4.38 \pm 0.56	140.95 \pm 26.83
模型	153.40 \pm 7.96 ²⁾	12 \pm 3.0 ²⁾	90.72 \pm 13.16 ²⁾
卡托	146.40 \pm 9.35 ²⁾	8.7 \pm 3.7 ^{1,4)}	111.86 \pm 17.039 ^{1,3)}
补肾	155.20 \pm 12.97 ²⁾	10 \pm 3.4 ^{1,3)}	97.02 \pm 15.74 ^{1,5)}

与 SHR 组比较, 模型组, 卡托组, 补肾组 TC, HDL, LDL 均有明显升高, 有显著性差异 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 卡托组和补肾组 TC, HDL, LDL 均无显著性差异。与卡托组比较, 补肾组 TC 有降低的趋势, 但无显著性差异。而补肾组 TG 较 SHR 组为高, 有显著性差异 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 补肾降压方对模型大鼠血脂的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of tonifying kidney anti-hypertension decoction on blood lipid of model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$) mmol·L⁻¹

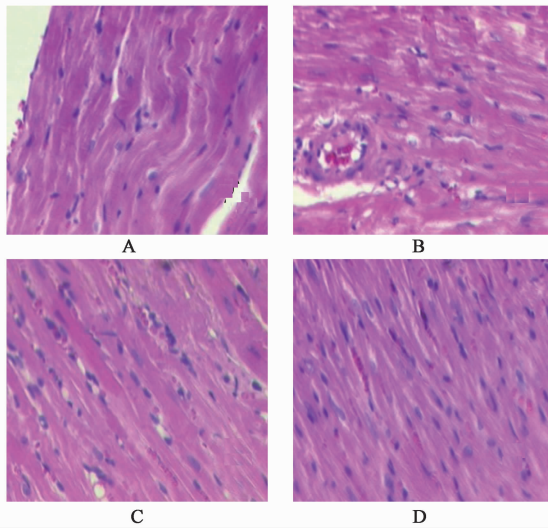
组别	TC	TG	HDL	LDL
SHR	1.29 \pm 0.14	0.36 \pm 0.04	0.89 \pm 0.09	0.36 \pm 0.04
模型	10.04 \pm 4.17 ²⁾	0.38 \pm 0.09	2.98 \pm 0.51 ²⁾	6.44 \pm 3.62 ²⁾
卡托	11.55 \pm 4.88 ²⁾	0.47 \pm 0.23	2.98 \pm 0.38 ²⁾	7.31 \pm 3.53 ²⁾
补肾	9.74 \pm 2.52 ²⁾	0.65 \pm 0.39 ^{2,4)}	2.95 \pm 0.52 ²⁾	5.91 \pm 1.65 ²⁾

3.3 补肾降压方对合并高糖高脂 SHR 大鼠心肌组织病理形态学改变的影响 心肌组织 HE 染色光镜下观察可见, SHR 大鼠心肌纤维增厚, 屈曲, 边界已显模糊; 模型组大鼠心肌纤维肿胀, 断裂, 排列紊乱, 边界不清, 胞核不均, 细胞间连接疏松, 可见局部炎症细胞浸润, 且有局灶性坏死, 并有粥样斑块; 卡托组大鼠上述情况明显减轻, 接近正常; 补肾 + 高糖脂 SHR 大鼠心肌组织得到改善。见图 1。

心肌组织 HE 染色光镜下观察可见, 心肌细胞横截面面积统计结果显示, SHR 大鼠心肌细胞显著增大; 模型组大鼠心肌细胞较小, 卡托组大鼠心肌细胞较为正常; 补肾组大鼠心肌细胞也有所恢复。见图 2。

3.4 补肾降压方对各组 SHR 大鼠脂联素的影响 与 SHR 组相比, 模型组, 卡托组, 补肾组脂联素均有降低, 其中模型组有显著性差异 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 卡托组与补肾组脂联素有升高趋势。补肾组基本相当与卡托组。见表 4。

3.5 补肾降压方对各组 SHR 大鼠心脏、肝脏组织 PPAR α mRNA 表达量的影响 肝脏 PPAR- α mRNA



A. SHR 组, B. 模型组, C. 卡托组, D. 补肾组 (图 2 同)

图 1 心肌组织纵切面病理形态学改变 (HE, ×400)

Fig. 1 Pathological changes of longitudinal section in myocardial tissues (HE, ×400)

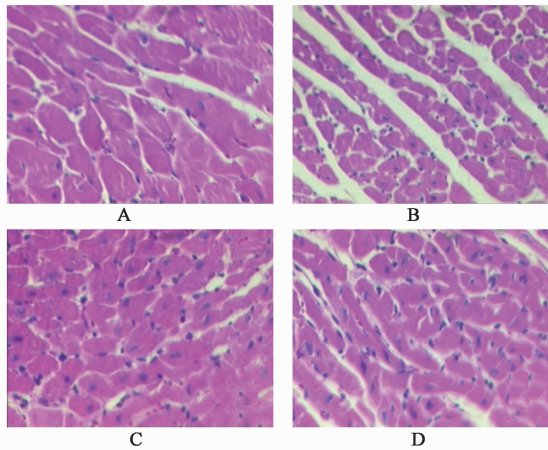


图 2 心肌组织横切面病理形态学改变 (HE, ×400)

Fig. 2 Pathological changes of transverse section in myocardial tissues (HE, ×400)

表 4 补肾降压方对模型大鼠 ADP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of tonifying kidney anti-hypertension decoction on ADP of model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	ADP
SHR	4.59 ± 0.30
模型	3.72 ± 0.45 ¹⁾
卡托	4.38 ± 0.37 ^{1,3)}
补肾	4.37 ± 0.32 ^{1,3)}

表达中,与 SHR 组相比,模型组有升高趋势;卡托组与补肾组皆有所降低。与模型组相比,卡托组和补肾组皆有降低,其中补肾组有显著性差异 ($P < 0.01$)。与卡托组相比,补肾组有降低趋势。

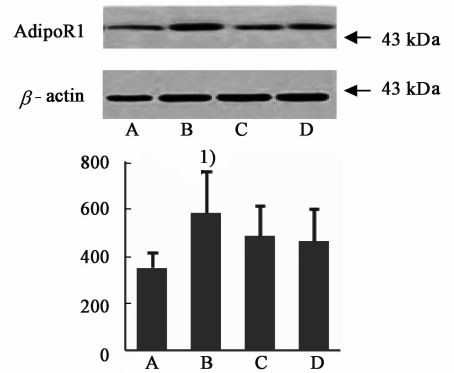
心脏 PPAR- α mRNA 表达中,与 SHR 组比较,模型组,卡托组和补肾组都有所升高,皆有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,卡托组和补肾组皆有所降低,其中卡托组有显著性差异 ($P < 0.05$)。与卡托组相比,补肾组有升高趋势。见表 5。

表 5 补肾降压方对模型大鼠肝脏和心脏 PPAR- α mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of tonifying kidney anti-hypertension decoction on PPAR- α mRNA in liver and heart of model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	肝脏 PPAR- α	心脏 PPAR- α
SHR	10.362 ± 6.045	4.188 ± 1.831
模型	13.177 ± 7.653	15.602 ± 6.573 ¹⁾
卡托	8.149 ± 5.184	10.196 ± 4.940 ^{2,3)}
补肾	5.411 ± 1.977	12.075 ± 3.964 ^{2,3)}

3.6 补肾降压方对各组 SHR 大鼠心脏 AdipoR1, AdipoR2 蛋白表达的影响 与 SHR 组相比,模型组,卡托组,补肾组 AdipoR1 蛋白均有升高,其中模型组有显著性差异 ($P < 0.01$),卡托组与补肾组无显著性差异。与模型组相比,卡托组与补肾组 AdipoR1 蛋白有降低趋势,但无显著性差异。补肾组 AdipoR1 蛋白基本持平与卡托组。见图 3。



A. SHR 组; B. 模型组; C. 卡托组; D. 补肾组。与 SHR 组比较¹⁾ $P < 0.01$ (图 4 同)

图 3 补肾降压方对模型大鼠心脏组织 AdipoR1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effect of tonifying kidney anti-hypertension decoction on AdipoR1 protein in heart of model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

与 SHR 组相比,模型组,卡托组,补肾组 AdipoR2 蛋白表达均有升高,其中模型组和卡托组有显著性差异 ($P < 0.05$)。与模型组和卡托组相比,补肾组 AdipoR2 蛋白表达有降低趋势。见图 4。

4 讨论

补肾降压方对降压和调节糖脂代谢异常的作用

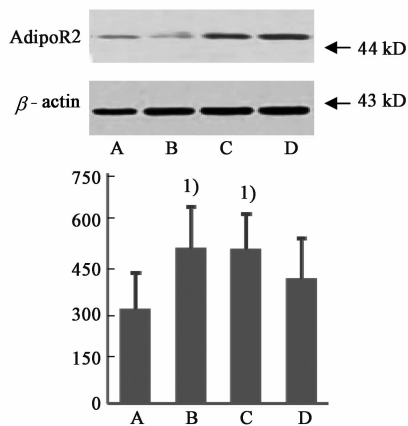


图 4 补肾降压方对模型大鼠心脏组织 AdipoR2 蛋白表达的影响变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Effect of tonifying kidney anti-hypertension decoction on AdipoR2 protein in heart of model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

可能与其关键病机相关。补肾降压方以补肾为主要治法的经验方,而肾虚是高血压伴糖脂代谢异常的病机关键。高血压糖脂代谢异常是常年累月发展的结果,临床上老年人占多数,更有甚者合并有多脏器疾病,是疾病发展的严重阶段。高血压患者大多病程较长,部分未服西药降压治疗的患者具有典型的病机演变规律,即“肾阴虚—肝火旺盛—肝阳上充—肝肾阴虚—肾阴阳两虚—肾阳虚”。而高血糖与古代“消渴”密切相关,其病机涉及肺,胃,肾,下消在肾,降阴枯耗,摄纳不固。而高血压糖脂代谢异常患者病情较长,缠绵不愈,多已及肾。因此,临床上对于各种慢性疾病日久不复者,从肾入手,采取滋阴补肾,或温肾散寒之法,常有良效。此即所谓“直取其本”。

近年发现,脂联素通路是高血压伴糖脂代谢异常的重要信号通路,参与其发生发展的多个进程。脂联素缺乏大鼠表现出损伤的内皮依赖舒张和 NO 生成^[2]。糖尿病患者的低脂联素状态也与较低的舒张反应相关联^[3]。脂联素通过 PI3K 通路调节 eNOS 的活性和 NO 的产生^[4]。脂联素也能够调节 eNOS 的亚细胞定位,酶活性^[5]。血管紧张素 II 受体拮抗剂可能直接增加脂联素的产生^[6-7]。AdipoR1 调节 AMPK 的激活,抑制糖异生和脂质合成相关基因的表达^[8]。AdipoR2 诱导 PPAR α , 因此增加了糖吸收和脂肪酸氧化,也减少了炎症和氧化压力^[9]。通过 AdipoR1, APPL 得以激活。脂联素刺激 APPL1 和小 GTPase Rab5, 增强了诱导的葡萄糖转运 GLUT4 的膜易位。

补肾降压方是基于补肾降压的治则治法而形成的治疗高血压病的临床经验方。前期的动物和临床

实验表明,补肾降压方具有降低血压,调节血糖和肾功能的作用。本研究选择脂联素信号通路中相关指标。模型组脂联素有所下降,说明在高糖高脂的影响下,脂联素水平降低。经过卡托普利和补肾降压方的干预后,与模型组比较,有升高趋势,说明卡托普利和补肾降压方有升高脂联素的作用。显示补肾降压方能降低血压,改善胰岛素分泌,调节血脂的作用,其可能通过脂联素通路发挥作用,这为补肾降压方的药理作用靶点提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 杨晓忱,熊兴江,王阶. 补肾降压法治疗原发性高血压 108 例临床观察[J]. 世界中西医结合杂志,2014,9(10):1083-1086.
- [2] Ouedraogo R, Gong Y, Berzins B, et al. Adiponectin deficiency increases leukocyte-endothelium interactions via upregulation of endothelial cell adhesion molecules *in vivo*[J]. J Clin Invest,2007,117(6):1718-26.
- [3] Tan K C, Xu A, Chow W S, et al. Hypoadiponectinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation[J]. J Clin Endocrinol Metab,2004,89(2):765-769.
- [4] Cheng K K, Lam K S, Wang Y, et al. Adiponectin-induced endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide production are mediated by APPL1 in endothelial cells[J]. Diabetes,2007,56(5):1387-1394.
- [5] Xi W, Satoh H, Kase H, et al. Stimulated HSP90 binding to eNOS and activation of the PI3-Akt pathway contribute to globular adiponectin-induced NO production: vasorelaxation in response to globular adiponectin[J]. Biochem Biophys Res Commun,2005,332(1):200-205.
- [6] Benson S C, Pershadsingh H A, Ho C I, et al. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPAR γ -modulating activity[J]. Hypertension,2004,43(5):993-1002.
- [7] Schupp M, Janke J, Clasen R, et al. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity [J]. Circulation, 2004, 109(17):2054-2057.
- [8] Miller R A, Chu Q, Le Lay, et al. Adiponectin suppresses gluconeogenic gene expression in mouse hepatocytes independent of LKB1-AMPK signaling[J]. J Clin Invest, 2011,121(6):2518-2528.
- [9] Bjursell M, Ahnmark A, Bohlooly-Y M, et al. Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism[J]. Diabetes,2007,56(3):583-593.

[责任编辑 张丰丰]