

半夏白术天麻汤对痰湿壅盛型高血压大鼠 心肌 MAPK 信号通路的影响

吴赛¹, 姜月华², 杨传华^{2*}, 孟宪卿^{1,2}, 郝东³, 亓英姿³

(1. 山东中医药大学第一临床医学院, 济南 250355;

2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011; 3. 山东中医药大学基础医学院, 济南 250355)

[摘要] **目的:**通过观察半夏白术天麻汤对痰湿壅盛型高血压大鼠丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路的影响,探讨其逆转心肌肥厚的机制。**方法:**选取 40 只自发性高血压大鼠(SHR)纳入造模组,喂食高脂饲料诱导痰湿壅盛型高血压模型;另取 10 只 SHR 及 WKY 大鼠纳入对照组,喂食普通饲料;两组均持续饲养 20 周。20 周后造模组大鼠分为半夏白术天麻汤低、高剂量组(6.90, 13.8 g·kg⁻¹·d⁻¹),替米沙坦组(6.33 g·kg⁻¹·d⁻¹)和模型组(等量生理盐水),与 SHR 及 WKY 组(等量生理盐水)一起 ig 12 周。检测各组大鼠体重、血压变化;心脏超声观察各组大鼠左室形态和功能;酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测心肌组织血管紧张素 II(Ang II),肿瘤坏死因子-α(TNF-α),白细胞介素-6(IL-6),一氧化氮(NO)的含量;苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠心肌组织形态;免疫组化法观察大鼠心肌组织中血管紧张素 II 1 型受体(AT1)的分布;实时荧光定量-聚合酶链式反应(qPCR)检测大鼠心肌组织中血管紧张素转换酶(ACE),AT1,原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(c-Raf),丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1(ERK1),丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2(ERK2)的 mRNA 表达。蛋白质免疫印迹(Western blot)检测心肌组织中 p-c-Raf, p-ERK1/2 蛋白的表达。**结果:**持续饲养大鼠 20 周后,成功建立了痰湿壅盛型高血压大鼠模型。用药 12 周后,与 SHR 模型组比较,半夏白术天麻汤高、低剂量组和替米沙坦组的体重均显著下降($P < 0.05$)。半夏白术天麻汤高剂量组和替米沙坦组的血压在用药第 4 周时出现显著下降($P < 0.05$),半夏白术天麻汤低剂量组在用药第 8 周时血压显著下降($P < 0.05$)。用药后半夏白术天麻汤高剂量组与替米沙坦组的舒张末期室间隔厚度(IVSd),左室舒张末期后壁厚度(LVPWd),左室质量(LVM),左室质量指数(LVMI)显著降低($P < 0.05$),左室舒张末期内径(LVEDd)显著升高($P < 0.05$),心功能显著改善。半夏白术天麻汤高剂量组及替米沙坦组心肌组织中的 Ang II, TNF-α, IL-6 显著下降($P < 0.05$), NO 显著上升($P < 0.05$);半夏白术天麻汤低剂量组的 NO 显著上升($P < 0.05$)。半夏白术天麻汤高剂量组和替米沙坦组的心肌组织形态改善明显,免疫组化结果显示其 AT1 受体分布减少。半夏白术天麻汤高剂量组和替米沙坦组心肌组织中 ACE, AT1, c-Raf, ERK 1, ERK 2 的 mRNA 表达下降($P < 0.05$), Western blot 半定量分析显示半夏白术天麻汤高、低剂量组和替米沙坦组心肌组织中 p-c-Raf, p-ERK1/2 磷酸化活性降低($P < 0.05$)。**结论:**半夏白术天麻汤能够逆转痰湿壅盛型高血压大鼠心肌肥厚,相关机制与降低 MAPK 信号通路的活性、抑制心脏局部组织肾素血管紧张素系统的激活有关。

[关键词] 痰湿壅盛型高血压; MAPK 信号通路; 心肌

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0159-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080159

Effect of Banxia Baizhu Tianma Tang on Myocardium MAPK Pathway of Spontaneous Hypertensive Rats with Syndrome of Excessive Accumulation of Phlegm-dampness

WU Sai¹, JIANG Yue-hua², YANG Chuan-hua^{2*}, MENG Xian-qing^{1,2}, HAO Dong³, QI Ying-zi³

(1. The First Clinical Medical College, Shandong University of Traditional

Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250355, China;

[收稿日期] 20150703(009)

[基金项目] 泰山学者岗位建设资金项目(#2012-55);山东省科技发展计划项目项目(2014GSF119011);山东省自然科学基金项目(ZR2014HL096)

[第一作者] 吴赛,在读博士,从事心血管疾病的研究, Tel: 13245313409, E-mail: wu-sai@hotmail.com

[通讯作者] *杨传华,博士,教授,主任医师,泰山学者,博士生导师,从事心血管疾病的研究, Tel: 0531-68616602, E-mail: yangchuanhua1962@126.com

2. The Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Ji'nan 250011, China;
3. Basic Medical College, Shandong University of TCM, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] Objective: To observe the effect of Banxia Baizhu Tianma Tang (BBT) on Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway of myocardial hypertrophy of hypertensive rats with the syndrome of excessive accumulation of phlegm-dampness (EAPD), and explore the pathological mechanism of alleviating myocardial hypertrophy. **Method:** Spontaneous hypertensive rats (SHRs) were fed with high-fat diet for 20 weeks to establish hypertensive EAPD rat models (HEAPD). Other 10 SHR and WKY rats were included into control groups. Both groups were fed for 20 weeks. After 20 weeks, the modeled rats were divided into high dosage BBT decoction group ($13.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), low dosage BBT decoction group ($6.90 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), telmisartan group ($6.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and model group (equivalent normal saline). SHR and WKY control groups were intragastrically administrated with equivalent normal saline for 12 weeks. Body weight and blood pressure were measured every week. Left ventricular end diastolic diameter (LVEDd), left ventricular posterior wall diameter (LVPWd), interventricular septal diameter (IVSd), left ventricular ejection fraction (LVEF) were observed by echocardiography every two weeks. Left ventricular mass (LVM) and left ventricular mass index (LVMI) were calculated. Angiotensin II (Ang II), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), nitric oxide (NO) in myocardial homogenate were determined by ELISA. Morphological changes of left ventricular observed by HE staining. The distributions of angiotensin II type 1 receptor (AT1) were detected by immunohistochemical staining assay. Levels of mRNA expression of angiotensin converting enzyme (ACE), AT1, proto-oncogene serine/threonine-protein kinase (c-Raf), extracellular regulated protein kinases 1 (ERK 1), ERK-2 were determined by real-time PCR. The expression of p-c-Raf and p-ERK1/2 were observed by Western blot. **Result:** EAPD rat models were established successfully after high fat diet for 20 weeks. After drug administration for 12 weeks, compared with SHR model group, weight of both high and low dosage BBT groups and telmisartan group was significantly lower ($P < 0.05$), blood pressure of high dosage BBT group and telmisartan group was decreased significantly ($P < 0.05$) in the fourth week, while blood pressure of low dosage BBT group was decreased significantly ($P < 0.05$) in the eighth week. IVSd, LVPWd, LVM, LVMI of high dosage BBT group and telmisartan group were decreased significantly, while LVEDd increased ($P < 0.05$); Ang II, TNF- α , IL-6 in myocardium of high dosage BBT group and telmisartan group were decreased significantly ($P < 0.05$), while NO increased significantly ($P < 0.05$). NO of low dosage BBT group increased significantly ($P < 0.05$). The myocardial morphology of high dosage BBT group and telmisartan group was improved, and the distribution of AT1 was decreased in different degrees after drug treatment. Levels of mRNA expression of ACE, AT1, c-Raf, ERK1 and ERK2 of high dosage BBT group and telmisartan group were decreased significantly ($P < 0.05$). The protein expression of p-c-Raf and p-ERK1/2 of both BBT high and low dosage groups and telmisartan group were decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** BBT decoction can alleviate cardiac hypertrophy in HEAPD. The possible mechanism may be correlated with the down-regulation of MAPK pathway and the inhibition of RASs.

[Key words] spontaneous hypertensive rats with the syndrome of excessive accumulation of phlegm-dampness; MAPK pathway; myocardium

高血压心肌肥厚是心血管事件的独立危险因素之一,是心肌细胞对长期高压负荷的一种代偿性反应,易并发心律失常、心力衰竭等疾病,现有研究证实肥胖、高脂血症、糖尿病等代谢紊乱性疾病是引起心肌肥厚的独立危险因素之一^[1-2],高血压合并代谢紊乱可明显加重左心室结构的损害。

高血压隶属于中医学“头痛”、“眩晕”范畴。近年来,随着人们生活水平的提高,痰湿壅盛型高血压发病率呈逐年上升的趋势。据调查,肝阳上亢和痰湿壅盛型高血压发病率占了整体的 51.2%^[3]。多数痰湿壅盛型高血压患者伴随肥胖、高血脂、高血糖等代谢紊乱因素。因此,痰湿壅盛型高血压患者的

心肌肥厚在临床治疗和研究中有一定的特殊性。

半夏白术天麻汤出自《医学心悟》，主治痰湿壅盛型高血压，现代药理研究证实其在降低血压、血脂及改善胰岛素抵抗方面均具有确切的疗效。蒋嘉焯等^[4]用半夏白术天麻汤干预自发性高血压大鼠(SHR)，证实了其在逆转心肌肥厚及保护血管内皮方面的作用，但是对于逆转心肌肥厚的机制，研究较少。本研究用半夏白术天麻汤干预痰湿壅盛型高血压大鼠，通过观察其对丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号通路的影响探讨其逆转心肌肥厚的机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 8 周龄雄性 SHR 50 只，体重 160 ~ 180 g；8 周龄雄性 WKY 大鼠 10 只，体重 160 ~ 180 g，北京维通利华实验动物技术有限公司提供，动物合格证号 SCXK(京)2012-0001。高脂高营养饲料配方为普通饲料 60%，猪油 12%，蔗糖 5%，奶粉 5%，花生粉 5%，鸡蛋 10%，麻油 1%，食盐 2%^[5-6]，自购原材料，由北京科澳协力饲料有限公司加工制作。

1.2 药物及试剂 半夏白术天麻汤组成为半夏 9 g，白术 18 g，天麻 6 g，橘红 6 g，茯苓 6 g，甘草 3 g。替米沙坦(美卡素)，每片 80 mg，德国勃林格殷格翰药业有限公司，批号 H20090416，H20090417。酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血管紧张素 II(Ang II，批号 A25364-09)，肿瘤坏死因子- α (TNF- α ，批号 T46070-09)，白细胞介素-6(IL-6，批号 I10772-09)，一氧化氮(NO，批号 N20908-09)试剂盒，均购自上海博蕴生物科技有限公司；兔抗大鼠磷酸化细胞外调节蛋白激酶(p-ERK1/2)多克隆抗体(批号 sc-23759-R，美国 Santa Cruz 公司)；兔抗大鼠磷酸化原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 c-Raf(p-c-Raf)多克隆抗体(批号 bs-5648R)，免疫组化二抗试剂盒(批号 SP-0023)，均购自北京博奥森公司；DAB 显色试剂盒(批号 ZLI-9031，北京中杉公司)，Trizol(批号 E174，美国 Amresco 公司)，逆转录试剂盒(批号 RR047A，大连 TaKaRa 公司)，480 II SYBR Green I Master PCR 试剂盒(批号 10559520，美国罗氏诊断试剂公司)，RIPA 裂解液(批号 P0038B，碧云天生物技术研究所)，BCA 蛋白浓度检测试剂盒(批号 PC0020，北京索莱宝科技有限公司)，羊抗兔多克隆抗体(批号 ZB-2301，北京中杉金桥生物技术有限公司)，增强型化学发光试剂(ECL)化学发光试剂盒(批号 P0018，碧云天生物技术研究所)，引物由上海

生工生物工程有限公司合成。

2 方法

2.1 痰湿壅盛型高血压大鼠心肌肥厚模型的诱导 建立 SHR 及 WKY 大鼠在恒温、恒湿、明暗 12 h/12 h 条件下饲养，适用性喂养 7 d 后，随机挑选 40 只 SHR 喂食高脂饲料，其余 10 只 SHR 及 WKY 大鼠喂食普通饲料，自由饮水摄食，喂养 20 周。每天观察大鼠一般情况；每周记录大鼠体重(BW)、血压；每 2 周，大鼠在 3% 戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹体重)麻醉下，M 超声观察(深圳迈瑞 M5Vet 便携式彩色多普勒超声诊断系统)，取胸骨旁左室长轴和短轴切面，超声记录：左室舒张末期内径(LVEDd)，左室舒张末期后壁厚度(LVPWd)，舒张末期室间隔厚度(IVSd)，左室射血分数(LVEF)，测定连续 5 个心动周期，取平均值，计算左室质量(LVM)，左室质量指数(LVMI)。

$$LVM = 0.8 \times 1.04 \times [(IVSd + LVEDd + LVPWd)^3 - LVEDd^3] + 0.6$$

$$LVMI = LVM/BW$$

2.2 分组及给药 高脂饮食 SHR 随机分为半夏白术天麻汤低剂量组(6.90 g·kg⁻¹·d⁻¹，相当于临床用量 2 倍)、半夏白术天麻汤高剂量组(13.8 g·kg⁻¹·d⁻¹，相当于临床用量 4 倍)、替米沙坦组(6.33 g·kg⁻¹·d⁻¹，相当于临床用量 1 倍)和模型组(等量生理盐水)，每组各 10 只，正常饮食，SHR 组与 WKY 组给以等量生理盐水(2 mL/只)，ig 12 周。

2.3 组织留取及病理学观察 观察结束后，3% 戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹体重)ip 麻醉，测量各组大鼠最终体重、体长、心脏 M 超声检查，下腔静脉取血，分离血清待测。冰上分离心脏，称重，剪取左心室，称重后分为 3 份，1 份以 10% 中性甲醛固定，石蜡包埋，切片厚度 4 μ m，进行苏木素-伊红(HE)染色观察病理学改变；1 份加入 10 倍量 pH 7.4 的 PBS，6 500 r·min⁻¹，40 s 低温匀浆 2 次，匀浆液煮沸 10 min，3 000 r·min⁻¹离心 20 min，吸取上清液，拟进行 ELISA 检测；1 份 -80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

2.4 心肌 Ang II，TNF- α ，IL-6，NO 的检测 ELISA 法检测心肌组织中 Ang II，TNF- α ，IL-6，NO 的含量，根据说明书操作，每组设 3 个复孔。

2.5 免疫组织化学法观察心肌组织 AT1 受体分布 左室石蜡切片，滴加兔抗大鼠 AT1 一抗(1:200 倍稀释)，4 $^{\circ}$ C 过夜，羊抗兔 IgG 二抗，SABC，DAB 显色、苏木素复染，PBS 代替一抗作为阴性对照，以棕

黄色颗粒沉积者判定为阳性。

2.6 实时荧光定量-聚合酶链式反应 (qPCR) 检测相关基因的表达 剪取冻存的心肌组织 100 mg, Trizol 法提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA。血管紧张素转换酶 (ACE), 血管紧张素 II 1 型受体 (AT1), 原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (c-Raf), 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (ERK1), 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2 (ERK2) 基因引物序列见表 1。依据说明书建立 20 μ L PCR 反应体系, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 扩增 45 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 65 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 97 $^{\circ}$ C 酶瞬间灭活; 40 $^{\circ}$ C 冷却 10 s。数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 直接计算出模型组与给药组间对应基因的表达差异^[7-8]。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

名称	引物序列	扩增产物 /bp
ACE	上游 5'-TAACTCGAGTGCCGAGGTG-3'	340
	下游 5'-CCAGCAGGTGCCAGTCTT-3'	
AT1	上游 5'-CAGCCGTCATCTACCGAAAC-3'	134
	下游 5'-GAACACGAAGCCGAGAATGT-3'	
c-Raf	上游 5'-GGTCAATGTGCGGAATGGG-3'	160
	下游 5'-CAATCAGAGAGCGCGGTC-3'	
ERK1	上游 5'-CGAAATCTGACTCCAAAGC-3'	162
	下游 5'-TCCATGTCAAGGTGAATG-3'	
ERK2	上游 5'-GCGGTTAGTCTCTCTTCT-3'	127
	下游 5'-GCTCGACGCTTCGCGTTAC-3'	
β -actin	上游 5'-CGTTGACATCCGTAAGA-3'	150
	下游 5'-AGCCACCAATCCACACAG-3'	

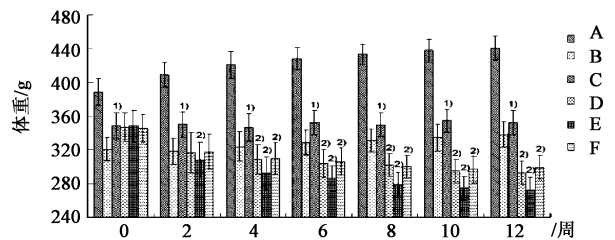
2.7 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测 p-c-Raf 及 p-ERK1/2 的表达 加入预冷的含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液低温裂解 5 min, 12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 提取总蛋白。BCA 法检测蛋白浓度。12% SDS-PAGE 电泳, 上样量 50 μ g; 电转印后以含 5% 脱脂奶的 PBS-T 室温封闭 1 h。加入兔抗大鼠 p-c-Raf 一抗 (1: 300 稀释) 或兔抗大鼠 p-ERK1/2 一抗 (1: 500 稀释), 以 β -actin 为内参, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日 $1 \times \text{PBS-T}$ 洗涤 5 min \times 5 次, 加入山羊抗兔 IgG 二抗 (1: 20 000) 室温孵育 1 h, $1 \times \text{PBS-T}$ 洗涤 5 min \times 5 次。ECL 显色, Fluor Chem Q 曝光、条带半定量分析。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计学软件进

行数据分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般状态及体重 SHR 高脂组呈现典型的痰湿证表现, 大鼠体重增加, 精神萎靡不振, 毛色萎黄黯淡, 纳呆嗜睡, 活动度下降, 饮食减少, 便溏, 肛周不洁, 舌黯红, 苔白厚腻, 证实痰湿壅盛型高血压大鼠模型成功建立。半夏白术天麻汤和替米沙坦 *ig* 后, 大鼠状态均有不同程度的改善, 以半夏白术天麻汤组高剂量组大鼠状态最佳。喂养高脂饲料 20 周后, 高脂饲料组 SHR 大鼠体重升高, 达到了 (345.23 ± 19.87) g, 普通饲料组 SHR 体重为 (321.15 ± 13.46) g, 两组比较差异无统计学意义; WKY 组体重为 (388.69 ± 15.37) g, 与高脂饲料组 SHR 比较, 差异有统计学意义。用药干预 12 周后, 与 SHR 模型组比较, 半夏白术天麻汤高、低剂量组及替米沙坦组体重下降显著 ($P < 0.05$)。见图 1。



A. WKY 组; B. SHR 组; C. SHR 模型组; D. 替米沙坦组; E. 半夏白术天麻汤 $13.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; F. 半夏白术天麻汤 $6.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 (图 2 ~ 6 同); 与 WKY 组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 SHR 模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (图 2, 5, 6, 表 2 ~ 4 同)

图 1 半夏白术天麻汤对大鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effects of Banxia Baizhu Tianma Tang on body weight of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.2 对大鼠血压变化的影响 用药 12 周后, 半夏白术天麻汤高剂量组及替米沙坦组血压下降显著 ($P < 0.05$), 在用药的第 2 ~ 6 周血压下降最为明显, 之后下降缓慢, 逐渐趋于平稳; 半夏白术天麻汤低剂量组在用药第 8 周后血压下降 ($P < 0.05$), 但下降程度低于半夏白术天麻汤高剂量组。见图 2。

3.3 左心室结构及功能变化 喂食高脂饲料 20 周后, SHR 组呈现典型心肌肥厚的表现, IVSd, LVPWd, LVM, LVMI 显著升高 ($P < 0.05$), LVEDd 显著降低 ($P < 0.05$)。用药 12 周后, 与 SHR 模型组比较, 半夏白术天麻汤高剂量组与替米沙坦组的 IVSd, LVPWd, LVM, LVMI 显著降低 ($P < 0.05$), LVEDd 显著升高 ($P < 0.05$), 半夏白术天麻汤低剂

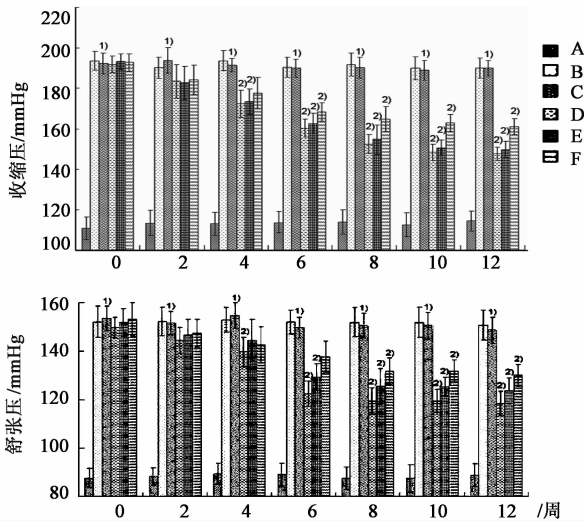


图 2 半夏白术天麻汤对大鼠血压变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Fig. 2 Effects of Banxia Baizhu Tianma Tang on blood pressure of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

量组的 IVSd, LVPWd, LVM, LVMI 略有下降, LVEDd 略有升高。见表 2, 3。

3.4 对心肌组织中 Ang II, NO, TNF- α , IL-6 水平的影响 用药 12 周后, 半夏白术天麻汤高剂量组及替米沙坦组心肌 Ang II, TNF- α , IL-6 显著下降 ($P < 0.05$), NO 显著上升 ($P < 0.05$); 半夏白术天麻汤低剂量组 Ang II, TNF- α , IL-6 略有下降, NO 显著上升 ($P < 0.05$)。见表 4。

3.5 对大鼠心肌细胞形态学的影响 WKY 组心肌

细胞排列有序, 心肌间隙较小, 动脉血管周围无慢性炎细胞浸润。SHR 模型组心肌细胞体积增大, 心肌间隙增宽, 并见小的灶性坏死, 部分心肌轻度变性并断裂; 心肌细胞动脉血管周围少量慢性炎细胞浸润, 管壁空泡、脂肪变性, 心肌细胞间质散在少量纤维结缔组织。与 SHR 模型组比较半夏白术天麻汤高剂量组与替米沙坦组的心肌细胞直径及细胞间隙减小, 心肌细胞周围炎性浸润减少; 半夏白术天麻汤低剂量组心肌形态改善不明显。见图 3。

3.6 对大鼠心肌中 AT1 蛋白的影响 与 WKY 组比较, SHR 的 AT1 受体分布明显增多。用药后, 与 SHR 模型组比较, 半夏白术天麻汤高剂量组及替米沙坦组心肌 AT1 受体分布明显减少, 半夏白术天麻汤低剂量组 AT1 分布无明显变化。见图 4。

3.7 对大鼠心肌组织中 ACE, AT1, c-Raf, ERK1, ERK2 mRNA 表达的影响 喂食高脂饲料 20 周后, 模型组大鼠心肌中 ACE, AT1, c-Raf, ERK1, ERK2 mRNA 表达显著上调 ($P < 0.05$), 半夏白术天麻汤高剂量组与替米沙坦组 ACE, AT1, c-Raf, ERK1, ERK2 的 mRNA 表达显著下降 ($P < 0.05$), 半夏白术天麻汤低剂量组 ACE, AT1, ERK1, ERK2 的 mRNA 表达显著下降 ($P < 0.05$)。见图 5。

3.8 心肌组织中 p-c-Raf 及 ERK1/2 蛋白的表达 与 WKY 组比较, 模型组大鼠心肌细胞中 p-c-Raf 及 ERK1/2 的表达和磷酸化水平显著增加 ($P <$

表 2 半夏白术天麻汤对大鼠左心室结构及功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of Banxia Baizhu Tianma Tang on left ventricular structure and function of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IVSd/mm	LVPWd/mm	LVEDd/mm	LVEF/%
WKY	-	2.36 ± 0.07	2.45 ± 0.06	5.43 ± 0.13	91.58 ± 4.65
SHR	-	2.93 ± 0.04	3.11 ± 0.03	4.71 ± 0.18	84.24 ± 3.41
SHR 模型	-	2.92 ± 0.03 ¹⁾	3.01 ± 0.05 ¹⁾	4.73 ± 0.11 ¹⁾	83.17 ± 2.23 ¹⁾
替米沙坦	6.33	2.64 ± 0.05 ²⁾	2.62 ± 0.04 ²⁾	5.14 ± 0.16 ²⁾	89.32 ± 3.08 ²⁾
半夏白术天麻汤	13.8	2.70 ± 0.04 ²⁾	2.67 ± 0.07 ²⁾	5.08 ± 0.13 ²⁾	88.58 ± 2.22 ²⁾
	6.9	2.90 ± 0.05	2.93 ± 0.05	4.90 ± 0.18	85.71 ± 3.76

表 3 半夏白术天麻汤对大鼠左心室质量指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of Banxia Baizhu Tianma Tang on left ventricular mass index of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	全心质量/g	LVM/g	LVMI/g·kg ⁻¹
WKY	-	1.04 ± 0.03	0.74 ± 0.05	2.38 ± 0.21
SHR	-	1.34 ± 0.05	0.92 ± 0.03	3.01 ± 0.14
SHR 模型	-	1.33 ± 0.04 ¹⁾	0.90 ± 0.04 ¹⁾	2.96 ± 0.12 ¹⁾
替米沙坦	6.33	1.03 ± 0.05 ²⁾	0.72 ± 0.04 ²⁾	2.68 ± 0.15 ²⁾
半夏白术天麻汤	13.8	1.09 ± 0.06 ²⁾	0.76 ± 0.03 ²⁾	2.79 ± 0.13 ²⁾
	6.9	1.21 ± 0.05	0.85 ± 0.05	2.84 ± 0.17

表 4 半夏白术天麻汤对心肌组织中 Ang II, NO, TNF- α , IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of Banxia Baizhu Tianma Tang on Ang II, NO, TNF- α , IL-6 of myocardium of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ang II/ng·L ⁻¹	NO/mmol·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹
WKY	-	365.3 ± 13.6	1.35 ± 0.08	380.5 ± 21.7	789.8 ± 48.7
SHR	-	540.6 ± 14.7	0.75 ± 0.09	568.3 ± 22.4	1493.5 ± 53.8
SHR 模型	-	547.5 ± 15.1 ¹⁾	0.74 ± 0.08 ¹⁾	574.6 ± 20.1 ¹⁾	1506.3 ± 54.6 ¹⁾
替米沙坦	6.33	447.7 ± 21.2 ²⁾	1.08 ± 0.12 ²⁾	481.0 ± 24.8 ²⁾	1091.1 ± 51.3 ²⁾
半夏白术天麻汤	13.8	452.4 ± 18.4 ²⁾	1.16 ± 0.11 ²⁾	439.9 ± 26.3 ²⁾	967.4 ± 55.6 ²⁾
	6.9	496.8 ± 20.8	0.91 ± 0.08 ²⁾	503.4 ± 24.6	1244.6 ± 58.2

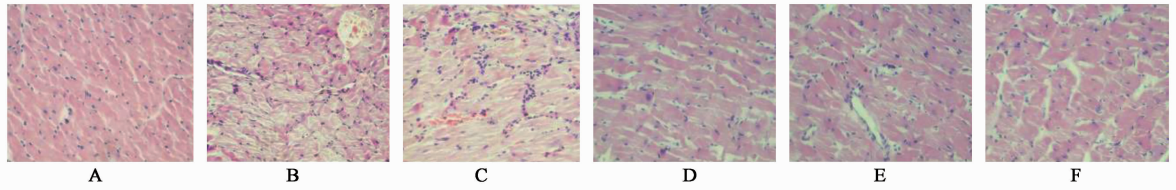


图 3 半夏白术天麻汤对大鼠心肌细胞形态学的影响 (HE, ×200)

Fig. 3 Effects of Banxia Baizhu Tianma Tang on myocardial morphology of rats (HE, ×200)

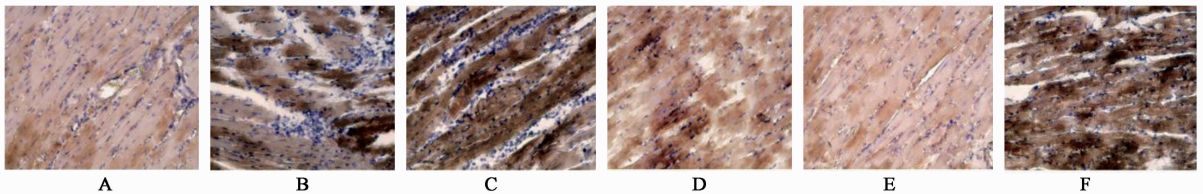


图 4 半夏白术天麻汤对大鼠心肌中 AT1 蛋白的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 4 Effects of Banxia Baizhu Tianma Tang on protein of AT1 of rats (IHC, ×200)

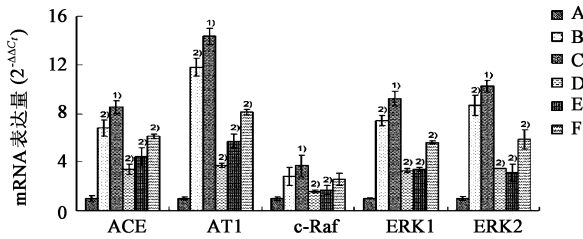


图 5 半夏白术天麻汤对大鼠心肌中相关 mRNA 的表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of Banxia Baizhu Tianma Tang on myocardium mRNA expression of rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

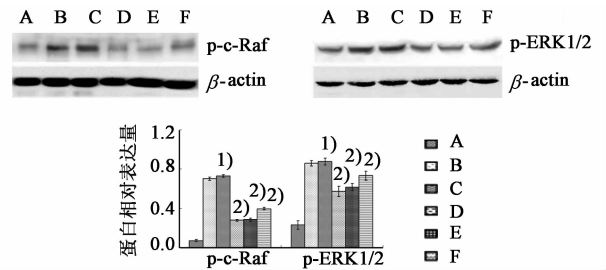


图 6 半夏白术天麻汤对大鼠心肌中 p-c-Raf 及 p-ERK1/2 的蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 6 Effects of Banxia Baizhu Tianma Tang on myocardium protein expression of p-c-Raf and p-ERK1/2 of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

0.05), 半夏白术天麻汤高、低剂量组与替米沙坦组 p-c-Raf 及 ERK1/2 显著下降 ($P < 0.05$)。见图 6。

4 讨论

应力负荷引起的机械牵张刺激和心肌局部肾素血管紧张素系统 (RASs) 的激活是导致高血压心肌肥厚的直接诱因^[9]。长期高脂饮食易导致机体脂质堆积和代谢紊乱、心脏心肌局部细胞因子大量释放和心肌细胞能量代谢方式的转变, 因此, 痰湿壅盛

高血压具有其疾病发生发展的特殊性。本研究通过长期高脂饮食诱导建立痰湿壅盛 SHR 模型, 模型大鼠呈现典型的证候表现, 包括体重增加、饮食减少、嗜睡、活动度下降、反应慢、便溏等, 心脏超声呈现典型向心性心肌肥厚特点, 病理结果清晰的显示模型组心肌细胞代偿性肥大。

半夏白术天麻汤是治疗痰湿壅盛型高血压的经典方^[10]。本方中半夏燥湿化痰, 天麻平肝熄风, 两

者共为君药。白术为臣,健脾燥湿,佐以茯苓健脾渗湿,橘红理气化痰,共奏化痰熄风、健脾燥湿之功效。本研究中,半夏白术天麻汤组大鼠体重及血压均有所下降,尤其是高剂量组药效更佳,且其室间隔及左室后壁厚度减小,左室舒张末期内径上升,心肌细胞横径减小,炎细胞浸润改善明显,LVMI 显著下降,提示应力负荷降低。压力负荷的减小是半夏白术天麻汤逆转心肌肥厚的重要原因。

机械牵张刺激与心肌组织局部 RAS 系统的激活是导致心肌肥厚的重要机制。AT1 是一种 G 蛋白耦联受体,Ang II 与 AT1 结合后激活磷脂酶 C (PLC),催化二脂酰甘油(DAG)的生成,DAG 激活 PKC,经过 PKC/Raf1/MEK 进一步激活 MAPK/ERK 信号通路^[11]。同时,机械牵张刺激通过整合素激活 MAPKs 信号通路,MAPKs 信号通路的激活参与心肌肥厚病理发展的过程、导致心肌细胞的肥大^[12-13]。本研究中模型组心肌 Ang II, TNF- α , IL-6 上升,NO 下降,AT1 受体表达增加,提示局部 RAS 系统的激活及炎症反应状态,ACE, AT1, c-Raf, ERK1 和 ERK2 的 mRNA 表达上升,c-Raf 和 ERK1/2 蛋白磷酸化活化增加,提示 MAPK/ERK 信号通路的激活。替米沙坦为 ARB 类药物,显著降压外可以抑制心肌重塑,改善左室舒张功能^[14]。本研究中,半夏白术天麻汤高剂量组心肌 Ang II, TNF- α , IL-6 下降,NO 上升,AT1 受体分布降低,ACE, AT1, c-Raf, ERK1 和 ERK2 的 mRNA 表达下降,推测半夏白术天麻汤可能既可直接抑制 MAPK/ERK 信号通路的激活,也通过抑制 Ang II 的生物学效应间接抑制 MAPK/ERK 信号通路,减少心肌细胞的重塑与间质细胞的增殖。

综上所述,半夏白术天麻汤能够抑制心肌细胞重塑,逆转心肌肥厚,降压的同时具有明显的靶器官保护作用。其作用机制可能是一方面降低压力负荷,减少机械牵张刺激,一方面通过抑制 MAPK/ERK 的活化减轻心肌 RASs 系统的生物学效应。但其药理作用是否还涉及其他作用靶点和通路还需进一步研究。深入研究半夏白术天麻汤的作用机制,对于开展靶向药物治疗及指导临床用药具有深远的意义。

[参考文献]

- [1] Fogli-Cawley J J, Dwyer J T, Saltzman E, et al. The 2005 Dietary Guidelines for Americans and risk of the metabolic syndrome[J]. *Am J Clin Nutr*, 2007, 86(4): 1193-1201.
- [2] 祝之明,周芳明,张刚,等. 代谢综合征心血管重塑的特征[J]. *中华心血管病杂志*, 2004, 32(9):819-820.
- [3] 余云旭. 高血压辨证分型调查研究[D]. 北京:北京中医药大学,2008.
- [4] 蒋嘉焯,王现珍,罗珊珊. 半夏白术天麻汤对自发性高血压大鼠左心室肥厚的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(10):1061-1066.
- [5] 孙志,张中成,刘志诚. 营养性肥胖动物模型的实验研究[J]. *中国药理学通报*, 2002, 18(4):466-467.
- [6] 程志清,黄科. 高血压合并肥胖大鼠动物模型的建立[J]. *浙江中医药大学学报*, 2007, 31(3):291-292.
- [7] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades[J]. *Nature*, 2001, 410(6824):37-40.
- [8] Yamamoto K, Hamada H, Shinkai H, et al. The KDEL receptor modulates the endoplasmic reticulum stress response through mitogen-activated protein kinase signaling cascades[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(36): 34525-34532.
- [9] 刘东. 心肌细胞对机械刺激的细胞与分子反应[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, 7(1):87-90.
- [10] 孙付军,黄伟克,李晓晶,等. 半夏白术天麻汤化痰方治疗高脂血症的实验研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(7):158-160.
- [11] Perales J C, Grossmann G A. Biochemical and functional characterization of DNA complexes capable of targeting genes to hepatocytes via the asialoglycoprotein receptor[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(11):7398-7407.
- [12] Aikawa R, Nagai T, Kudoh S, et al. Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation[J]. *Hypertension*, 2002, 39(2):233-238.
- [13] Aoki H, Richmond M, Lzumo S, et al. Specific role of the extracellular signal regulated kinase pathway in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy *in vitro*[J]. *Biochem J*, 2000, 347(1):275-284.
- [14] 屈春生,陈莉萍,李道麟. 替米沙坦对大鼠心肌肥厚组织中 Raf/MEK/ERK 信号通路的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(11):1344-1347.

[责任编辑 周冰冰]