

健脾益气活血汤对自发性高血压大鼠 血管内皮舒缩因子表达的影响

曲怡, 张立德*, 陈志娟, 王珊珊, 谷丽艳, 林庶茹

(辽宁中医药大学基础医学院中医分子生物学实验室, 沈阳 110847)

[摘要] 目的: 观察健脾益气活血汤对自发性高血压大鼠(SHR)收缩压及血管内皮舒缩因子表达的影响。方法: 采用随机对照方法, 将 60 只 24 周龄 SHR 分为 SHR 组(给予蒸馏水)、培哚普利组(培哚普利, $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、培哚普利联合中药组(培哚普利 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ + 中药健脾益气活血汤 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig, 中加西组)、健脾益气活血汤高、中、低剂量组($40, 20, 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig), 每组 10 只, 以同龄同种系正常血压的京都种大鼠(WKY)10 只作为 WKY 组(给予蒸馏水)。BP-98A 型智能无创血压计监测大鼠尾动脉收缩压变化; 治疗 6 周后腹主动脉取血测定血浆一氧化氮(NO)、前列环素(PGI₂)、内皮源性超极化因子(EDHF)、血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ)、内皮素 1(ET-1)浓度。结果: 与 SHR 组收缩压(207.5 ± 16.7) mmHg 相比, 培哚普利组(165.8 ± 10.2) mmHg, 中加西组(160.4 ± 16.5) mmHg 明显降低($P < 0.01$)。SHR 组血浆 NO(5.3 ± 1.6) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, PGI₂(27.2 ± 6.3) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 、EDHF(106.7 ± 3.2) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度低于 WKY 组(33.8 ± 7.5) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, (842.9 ± 218.6), (347.0 ± 44.4) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, ($P < 0.01$); 培哚普利组、中加西组、中药高、中剂量组血浆 NO, PGI₂, EDHF 浓度高于 SHR 组; SHR 组大鼠血浆 ET-1(77.1 ± 13.9) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, Ang Ⅱ(21.0 ± 2.6) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度高于 WKY 组(20.8 ± 1.9) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, (1.1 ± 0.3) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, ($P < 0.05$); 培哚普利组、中加西组、中药高、中、低剂量各组大鼠血浆 ET-1, Ang Ⅱ 浓度明显低于 SHR 组, ($P < 0.01$)。结论: 健脾益气活血汤可调控血管内皮舒缩因子的分泌与释放平衡, 改善血管内皮功能, 降低收缩压, 减轻血压增高引起的血管内皮功能障碍。

[关键词] 健脾益气活血汤; 自发性高血压大鼠; 血管内皮舒张因子; 血管内皮收缩因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0221-04

[doi] 10.11653/syfj2013080221

Influence of Jianpi Yiqi Huoxue Decoction on Vasomotor Factors Expression in Vascular Endothelium of Spontaneously Hypertensive Rats

QU Yi, ZHANG Li-de*, CHEN Zhi-juan, WANG Shan-shan, GU Li-yan, LIN Shu-ru
(Chinese Medical Science Molecular Biology laboratory of the Basic Medical College
of the Traditional Chinese Medicine of Liaoning University, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influence of Jianpi Yiqi Huoxue decoction on systolic pressure and vascular endothelium vasomotor factors of spontaneously hypertensive rats (SHR). **Method:** Sixty 24-week-old SHRs were randomly divided into six groups: SHR group (distilled water), perindopril group (perindopril $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), perindopril plus herb group (perindopril $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ + $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of herb), high, medium and low dose group ($40, 20, 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) of Jianpi Yiqi Huoxue decoction and Wistar kyoto rats (WKY) group. The changes of systolic pressure were measured by BP-98A intelligent sphygmomanometer. After six weeks of treatment, the concentration of nitric oxide (NO), prostacycline (PGI₂), endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF), angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ), and endothelin (ET-1) in plasma of the rats were

[收稿日期] 20120925(006)

[基金项目] 辽宁省科技厅自然科学基金计划项目(20102150)

[第一作者] 曲怡, 博士, 讲师, 从事高血压病因病机及中药防治机制研究, Tel: 024-31207096, E-mail: 64012951@qq.com

[通讯作者] * 张立德, 硕士, 教授, 从事高血压病因病机及中药防治机制研究, Tel: 024-31207078, E-mail: zhldtem@163.com

determined. **Result:** The systolic pressure of the perindopril group and the perindopril plus herb group was prominently decreased, compared with that of the SHR group ($P < 0.01$). The concentration of NO, PGI₂, and EDHF of the SHR group was lower than those of the WKY group, the perindopril group, the perindopril plus herb group, and the two herb dose groups ($P < 0.01$). The concentration of ET-1, Ang II in the SHR was higher than those in the WKY group ($P < 0.05$), and was significantly higher than those in the perindopril group, the perindopril plus herb group, and the three herb dose groups. **Conclusion:** The Jianpi Yiqi Huoxue decoction may improve functions of blood vessels, and reduce systolic pressure by regulating the balance between the secretion and release of vasomotor factors in vascular endothelium so as to modify the vascular endothelial function obstacles caused by hypertension.

[Key words] Jianpi Yiqi Huoxue decoction; spontaneously hypertensive rats; vascular endothelial diastolic factor; vascular endothelial systolic factor

传统中医辨证认为高血压是由于七情所伤,饮食失节,内伤虚损,导致阴阳平衡失调,病损的脏器主要在心、肾、脑。现代中医对高血压病因的认识呈现多元化,我院名中医^[1]结合中医辨证及临床施治效果,鉴于当前人们过食厚腻、多静少动、忧思劳脾这一普遍生活规律,提出从脾论治的理念。尤其临床辨证 2、3 级高血压靶器官功能改变的患者,提出气血失调为其关键病机,脾气虚血瘀为其主要临床症状候群,因此治疗上施以健脾益气活血法。通过临床观察,降压作用明显,疗效稳定,对缓解患者的临床症状及提高自身的免疫力均有很好的调节作用^[1]。本实验拟用 SHR 观察健脾益气活血汤对收缩压及血浆一氧化氮(NO)、前列环素(PGI₂)、内皮源性超极化因子(EDHF)、血管紧张素 II(Ang II)和内皮素 1(ET-1)的影响,考察药物对血管内皮功能的修复情况,进一步探求高血压进程中血管内皮功能障碍的改善机制。

1 材料

1.1 动物 24 周龄 WKY 大鼠,雄性,10 只,体质量 330 ~ 360 g;24 周龄 SHR,雄性,60 只,体质量 340 ~ 380 g。购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物许可证编号 SCXK(沪)2007-0005。清洁条件下喂食标准饲料,自由饮水。

1.2 仪器 TECAN 多功能酶标仪(Infinite M200,奥地利),BP-98A 型智能无创血压计(日本)。

1.3 药物与试剂 培哌普利片(施维雅天津制药有限公司,批号 2001197)。健脾益气活血汤:炒白术 15 g,茯苓 15 g,黄芪 30 g,丹参 15 g,泽泻 30 g,甘草 10 g 组成,水提浓缩至(含生药)1 g·mL⁻¹为低剂量;2 g·mL⁻¹为中剂量;4 g·mL⁻¹为高剂量;将药液分别装入药瓶中,置于 4 °C 冰箱保存备用,购自辽宁省中医院药剂室。一氧化氮(NO,批号 E02N0041)、

前列环素(PGI₂,批号 E02P0026)、内皮源性超极化因子(EDHF,批号 E02E0131)、血管紧张素 II(Ang II,批号 E02A0221)、内皮素(ET-1,批号 E02E0126),ELISA 试剂盒购自上海蓝基生物科技有限公司。

2 方法

2.1 分组与给药 采用随机对照方法将 60 只 24 周龄 SHR 分为 SHR 组(ig 给予蒸馏水)、培哌普利组(培哌普利,0.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、培哌普利联合中药组(培哌普利 0.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹ + 健脾益气活血汤中剂量,中加西组)、健脾益气活血汤高、中、低剂量组(40,20,10 g·kg⁻¹·d⁻¹),每组 10 只,以同龄同种系正常血压的京都种大鼠(WKY)10 只作为 WKY 组(给予蒸馏水)。大鼠 ig 1 次/d,连续给药 6 周。

2.2 血压测定 大鼠给药期间,BP-98A 型智能无创血压计监测大鼠尾动脉收缩压变化情况。

2.3 标本采集和处理 大鼠禁食、自由饮水 24 h 后 10% 水合氯醛腹腔麻醉(3 mL·kg⁻¹体质量)。开腹,腹主动脉采血,抗凝,低温静置 2 h 后 3 000 r·min⁻¹离心 10 min,收集血浆备用 ELISA 检测。

2.4 血浆内皮舒缩因子检测 采用 ELISA 方法检测血浆内皮舒缩因子。设 1 孔为空白对照孔(加 100 μL 的蒸馏水),将对照品(0,50,10,25,50,100 μmol·L⁻¹)各 100 μL 按照次序分别加入空白微孔中(设立复孔),于空白微孔中依次加入各组样品血浆 100 μL;在对照品孔和样品孔中加入 50 μL 的酶标记液,37 °C 温育反应 60 min 后洗液清洗,每次 30 s,连续 5 次后吸水纸吸干多余水分;各孔加显色剂 A,B 液各 50 μL,25 °C 避光反应 15 min 后再加 50 μL 终止液,终止反应。TECAN 多功能酶标仪测定 450 nm 吸光度(A)。根据对照品的浓度和(A)作标准曲线,根据标准曲线回归方程换算样品浓度。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对尾动脉收缩压的影响 用药前,与 WKY 组比较,其他组大鼠收缩压均较高,用药 6 周后,培哌普利组、中加西组收缩压明显降低,二者之间差异无统计学意义,但与 SHR 组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),健脾益气活血汤高、中、低组收缩压也有一定程度的下降,但与 SHR 组比较,差异无统计学意义,见表 1。

3.2 对血管内皮舒张因子的影响 SHR 组大鼠血浆 NO, PGI₂, EDHF 明显低于 WKY 组 ($P < 0.01$);

培哌普利、中加西、健脾益气活血汤高、中剂量组大鼠血浆 NO, EDHF 浓度明显高于 SHR 组 ($P < 0.05$);培哌普利、中加西、健脾益气活血汤高剂量组大鼠血浆 PGI₂ 明显高于 SHR 组 ($P < 0.05$);中加西组与培哌普利组比较,差异无统计学意义;健脾益气活血汤高、中、低各剂量组与培哌普利组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见表 2。

3.3 对血浆 ET-1, Ang II 的影响 SHR 组大鼠血浆 ET-1, Ang II 明显高于 WKY 组 ($P < 0.05$);培哌普利、中加西、健脾益气活血汤高、中、低剂量各组大鼠血浆 ET-1, Ang II 明显低于 SHR 组 ($P < 0.01$);健脾益气活血汤中、低剂量组血浆 Ang II 与培哌普利组比较有统计学意义 ($P < 0.01$),见表 3。

表 1 健脾益气活血汤对 SHR 用药前后收缩压的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ | 用药前收缩压 | 用药后收缩压 |
|----------------|--|----------------------------|------------------------------|
| WKY | - | 148.1 ± 9.9 | 133.9 ± 12.4 |
| SHR | - | 204.1 ± 14.9 ¹⁾ | 207.5 ± 16.7 ¹⁾ |
| 培哌普利 | 0.4 × 10 ⁻³ | 206.6 ± 11.5 ¹⁾ | 165.8 ± 10.2 ^{1,2)} |
| 健脾益气活血汤 + 培哌普利 | 20 + 0.4 × 10 ⁻³ | 199.9 ± 13.1 ¹⁾ | 160.4 ± 16.5 ^{1,2)} |
| 健脾益气活血汤 | 40 | 203.6 ± 10.1 ¹⁾ | 187.3 ± 6.3 ^{1,3)} |
| | 20 | 207.5 ± 12.5 ¹⁾ | 180.9 ± 8.3 ^{1,3)} |
| | 10 | 211.5 ± 6.3 ¹⁾ | 180.8 ± 10.5 ^{1,3)} |

注:与 WKY 组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 SHR 组比较²⁾ $P < 0.01$;与培哌普利组比较³⁾ $P < 0.05$;1 mmHg = 0.133 kPa(表 2 ~ 3 同)。

表 2 健脾益气活血汤对 SHR 血管内皮舒张因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ | NO/μmol·L ⁻¹ | PGI ₂ /ng·L ⁻¹ | EDHF/ng·L ⁻¹ |
|----------------|--|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| WKY | - | 33.8 ± 7.5 ^{2,3)} | 842.9 ± 218.6 ^{2,3)} | 347.0 ± 44.4 ^{2,3)} |
| SHR | - | 5.3 ± 1.6 ^{1,3)} | 27.2 ± 6.3 ^{1,3)} | 106.7 ± 3.2 ^{1,3)} |
| 培哌普利 | 0.4 × 10 ⁻³ | 21.4 ± 5.1 ²⁾ | 413.0 ± 30.0 ²⁾ | 226.4 ± 13.9 ²⁾ |
| 健脾益气活血汤 + 培哌普利 | 20 + 0.4 × 10 ⁻³ | 25.0 ± 3.1 ²⁾ | 418.0 ± 51.6 ²⁾ | 236.2 ± 16.7 ²⁾ |
| 健脾益气活血汤 | 40 | 13.5 ± 3.2 ^{2,3)} | 115.7 ± 34.9 ^{2,3)} | 185.8 ± 20.7 ^{2,3)} |
| | 20 | 11.0 ± 4.0 ^{2,3)} | 52.3 ± 6.8 ³⁾ | 134.0 ± 9.5 ^{2,3)} |
| | 10 | 7.1 ± 2.6 ³⁾ | 52.0 ± 15.9 ³⁾ | 108.3 ± 6.6 ³⁾ |

表 3 健脾益气活血汤对 SHR 血浆 ET-1, Ang II 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ | ET-1/ng·L ⁻¹ | Ang II /μg·L ⁻¹ |
|----------------|--|-----------------------------|----------------------------|
| WKY | - | 20.8 ± 1.9 ²⁾ | 1.1 ± 0.3 ²⁾ |
| SHR | - | 77.1 ± 13.9 ^{1,3)} | 21.0 ± 2.6 ^{1,3)} |
| 培哌普利 | 0.4 × 10 ⁻³ | 23.6 ± 1.4 ²⁾ | 3.5 ± 0.3 ²⁾ |
| 健脾益气活血汤 + 培哌普利 | 20 + 0.4 × 10 ⁻³ | 22.0 ± 1.2 ²⁾ | 2.6 ± 0.6 ²⁾ |
| 健脾益气活血汤 | 40 | 27.7 ± 3.4 ²⁾ | 6.8 ± 1.9 ²⁾ |
| | 20 | 22.5 ± 1.3 ²⁾ | 16.2 ± 2.0 ^{2,3)} |
| | 10 | 24.0 ± 1.7 ²⁾ | 16.1 ± 2.1 ^{2,3)} |

4 讨论

中医认为高血压的病位在脉^[2]。观察健脾益气活血汤对脉的作用,最直接的体现就是对于血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VEC)的影响,VEC 是覆盖于血管内侧的单层纵向细胞,通过自身调节及对血管微环境的调节维护血管功能^[3-4]。VEC 分泌的多种血管舒缩因子在高血压的发生发展过程中扮演着重要的角色^[5-6]。血压升高损害血管内皮及其功能,导致血管舒缩因子异常释放^[7],促进了血压的升高。

SHR 是目前国际公认的最接近于人类原发性高血压的动物模型。研究表明 SHR 存在血管内皮功能障碍^[8],具体表现在血管舒缩因子的释放异常,已有报道中医药对调节血管内皮舒缩因子的释放平衡具有很好的作用^[9-10]。基于此,本实验观察补脾益气活血汤对 SHR 血管舒缩因子的影响作用,探讨补脾益气活血汤改善血管内皮功能的机制。方中黄芪为君药,以其补气健脾,利尿消肿之作用为统帅,茯苓、炒白术为臣药,具有益气健脾、利水渗湿之功效,佐以丹参、泽泻,配其利水渗湿,活血祛瘀的作用,以生甘草为使药,达到补脾益气,调和诸药之效。

本研究结果显示经药物干预的大鼠收缩压与 SHR 组相比,都有一定程度的下降,以中加西、培哚普利组的降压效果最为明显,健脾益气活血汤各剂量组的降压作用没有中西药联合应用效果佳。NO 通过与鸟苷酸环化酶中铁原子的作用,激活鸟苷酸环化酶,产生胞内效应,引起血管平滑肌松弛,血管扩张^[11]。ET-1 作为血管内皮细胞衍生的收缩因子,能促进 NO 的合成与释放^[12]。血管内皮产生的 PGI₂ 是保证血管通畅的重要因素,具有扩张血管和抑制血小板聚集作用^[13]。EDHF 作为衡量内皮功能的重要指标,扩张血管直径^[14]。Ang II 是已知最强的缩血管活性物质之一。可作用于血管平滑肌 Ang II 受体直接引起血管收缩,血压升高^[15-16]。我们研究结果显示中加西组、培哚普利组对于 NO、PGI₂、EDHF 的影响作用优于健脾益气活血汤各剂量组,以中加西组的调节作用最为明显,各治疗组对于 ET-1 的调节没有明显差异,对于 Ang II 的调节中加西组、培哚普利组与健脾益气活血汤中高剂量组的作用相似。提示方药通过调节血管内皮舒缩因子的释放平衡,维持血管张力的恒定和调节血压的稳定。

健脾益气活血汤的降压效果不甚理想,但在调节血管舒缩因子的释放,尤其是与培哚普利联合应

用,通过调节血管内皮舒缩因子的释放平衡发挥对血管内皮功能的保护作用,改善高血压进程中血管内皮功能障碍。但调节内皮舒缩因子释放的具体途径仍值得进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 张艳,柳士博,庞敏. 高血压病的中医辨证治疗[J]. 中国实用乡村医生杂志,2007,10(14):31.
- [2] 曲荣波,王庆国. 三草降压汤治疗高血压病的组方机理探析[J]. 中国中医基础医学杂志,2008,14(3):228.
- [3] Hynynen M, Raouf A. The vascular endothelin system in hypertension-recent patents and discoveries [J]. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov,2006,1(1):95.
- [4] Coultas L, Chaw Engsak Sophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development [J]. Nature,2005,438(70):937.
- [5] 冯桂芳,李胜涛,刘行,等. 中医药对血管内皮保护作用的研究进展[J]. 环球中医药,2011,4(2):153.
- [6] 任印新,丁碧云. 中医药调节高血压血管内皮功能研究进展[J]. 中医药临床杂志,2011,23(1):88.
- [7] 吴旭彤,朱萱萱,李七一,等. 中药对血管内皮细胞损伤的保护作用的研究进展[J]. 中华中医药学刊,2011,29(12):2648.
- [8] Deanfield J E, Halcox J P, Rabelink T J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance [J]. Circulation,2007,115(10):1285.
- [9] 岳桂华,卓少元. 益气活血解毒方对幼龄自发性高血压大鼠内皮功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(8):154.
- [10] 王现珍,蒋嘉焯,罗珊珊,等. 地黄饮子改善自发性高血压大鼠进程中血管内皮功能的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(14):110.
- [11] 韩勇. 阿托伐他汀改善高血压合并高血脂患者的血管内皮功能[J]. 中华高血压杂志,2008,16(4):368.
- [12] 龙本栋,黄红梅,王丕荣. 卡托普利对原发性高血压血管内皮细胞生长因子、一氧化氮、内皮素-1 的影响[J]. 中华高血压杂志,2009,17(8):748.
- [13] 周齐艳,余国龙,卿丽琼. 阿托伐他汀强化治疗对急性冠脉综合征患者 TXA₂、PGI₂ 的早期影响[J]. 中国现代医学杂志,2010,20(13):2058.
- [14] 陈锐,张抒扬. 血管紧张素转换酶抑制剂保护血管内皮功能的机制[J]. 中华高血压杂志,2010,18(1):31.
- [15] 吕良忠,方晴霞,吕圭源,等. 济脉通与硝苯地平合用对 SHR 血压的影响及其抗高血压机制的初步研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(7):896.
- [16] 郝颖,周京敏,王克强,等. 通心络对血管紧张素 II 致大鼠内皮损伤的保护作用[J]. 中华中医药杂志,2009,24(7):855.

[责任编辑 聂淑琴]