

天麻钩藤饮对自发性高血压肝阳上亢证大鼠 Ang , ALD 及肝脏蛋白质表达的影响

段小军, 曾星^{2*}, 张娴², 欧润妹²

(1. 海南省中医院, 海口 570203; 2. 广东省中医院中心实验室, 广州 510120)

[摘要] 目的: 探讨高血压肝阳上亢证证候相关蛋白及天麻钩藤饮降血压和改善肝阳上亢证症状的机制。方法: 采用自发性高血压大鼠(SHR) ig 附子汤复制高血压肝阳上亢证模型, 并用天麻钩藤饮治疗, 观察造模前及治疗前后大鼠易激惹程度、饮水量、血压的变化, 检测治疗后血浆血管紧张素 (Ang) 及醛固酮(ALD) 水平; 同时通过双向电泳技术分析大鼠肝脏蛋白质组变化。结果: SHR 大鼠经 ig 附子汤 6 周后, 出现易激惹程度增高、饮水量增加等高血压肝阳上亢证候的表现。经天麻钩藤饮高剂量及低剂量组治疗后, 易激惹程度好转, 饮水量减少, 血压下降; 天麻钩藤饮高剂量组血浆 Ang 水平显著降低。SHR 对照组、肝阳上亢组和天麻钩藤饮高剂量组的蛋白斑点总体分布相似。肝阳上亢组和 SHR 对照组比较, 仅在 SHR 对照组或肝阳上亢组表达的蛋白质分别有 13 个和 27 个; 有 28 个点在表达量上有明显变化(5 倍以上)。天麻钩藤饮高剂量组和肝阳上亢组比较, 仅在天麻钩藤饮高剂量组表达的蛋白质有 44 个, 没有仅在肝阳上亢组表达的蛋白质; 有 29 个点在表达量上有明显变化(5 倍以上)。结论: 天麻钩藤饮能减轻高血压肝阳上亢证大鼠的症状和降低血压。肝脏差异表达的蛋白质可能存在高血压肝阳上亢证证候相关蛋白, 天麻钩藤饮降压和改善症状可能与降低 Ang 及上述蛋白质的改变有关。

[关键词] 高血压; 肝阳上亢; 自发性高血压大鼠; 天麻钩藤饮; 蛋白质组; 双向电泳

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0160-04

原发性高血压病是临床常见疾病, 据我国先后 4 次全国居民流行病学调查的资料显示, 从 20 世纪 50 年代至 21 世纪初, 我国成年人高血压的患病率已从 5.11% 上升至 18.8%。中国现有高血压患者约 1.6 亿, 成人中每 5 人就有 1 人有高血压^[1]。而高血压导致的慢性肾脏病目前已成为发达国家引起终末期肾病的第 2 位或第 3 位的原因^[2]。肝阳上亢证是原发性高血压中最常见的证型之一。本试验采用病证结合的方式复制动物模型, 观察平肝潜阳经典方天麻钩藤饮对大鼠血管紧张素 (Ang) 及醛固酮(ALD) 的影响, 并应用双向电泳分析造模前后及治疗后的肝脏蛋白质表达, 从蛋白质组角度初步探讨高血压肝阳上亢证候相关蛋白及天麻钩藤饮治疗后蛋白质的差异表达。

1 材料

1.1 药物 附子汤: 取制附子 20 g 先浸泡 0.5 h, 然后煎煮 2 次, 总计 90 min, 合并 2 次药液浓缩为含生药 0.1 g·mL⁻¹。天麻钩藤饮: 各药先浸泡 30 min, 石决明(18 g) 先煎 0.5 h; 再下川牛膝 12 g 天麻、栀子、黄芩、杜仲、益母草、桑寄生、夜交藤、茯苓各 9 g, 煎煮 0.5 h 后下钩藤 12 g, 再煎 10 min, 共煎煮 2 次, 合并后将药液浓缩至药液含生药 2.4 g·mL⁻¹。利血平注射液: 1 mg·mL⁻¹, 为广东邦民制药厂有限公司生产。

1.2 试剂 Ang , ALD 放免试剂盒, 由北京东雅生物技术有限公司提供, 批号 20050631; 十二烷基硫酸钠 (SDS)、尿素、硫尿、碘乙酰胺、二硫苏糖醇 (DTT) 购自 BBI 公司; 牛血清白蛋白 (BSA)、TEMED 购自上海生物工程技术有限公司; 固相 pH 梯度干胶条 (IPG)、Tris、过硫酸胺 (APS)、CHAPS、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺为 Bio-Rad 公司产品; 硝酸银、甲醛、氢氧化钠、柠檬酸、无水乙醇、乙酸均为国产分析纯。

1.3 仪器 中日友好临床医学研究所 RBP-1B 型大鼠血压计; TC-15 套式恒温器为浙江海宁新华医疗器械厂产品; 低温高速离心机; 紫外-可见分光光度计为 BECKAMAN COULTER 公司产品; 等电聚焦

[收稿日期] 2010-02-24

[基金项目] 广东省教育厅项目(Q02079); 广州中医药大学项目(GH00133)

[第一作者] 段小军, 博士, Tel: 13544517279, E-mail: dxj139@163.com

[通讯作者] * 曾星, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合基础研究, Tel: 020-39318678

仪和垂直电泳仪为 Bio-Rad 公司生产; DELL Dimension4600 微机, 扫描仪; SN-695B 型放免测量仪为上海日环仪器一厂生产。

2 方法

2.1 动物分组与给药 SPF 级自发性高血压大鼠 (SHR), 雄性, 3 月龄, 体重 190 ~235 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物随机分为 5 组: SHR 对照组: 普通饲养, ig 蒸馏水; 肝阳上亢组 ($n=10$): 采用连续 ig 附子汤方法造模^[3], $2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 共 6 周, 第 7 周开始蒸馏水 ig 2 周; 利血平组: 造模后第 7 周开始连续 im 利血平 $0.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 2 周; 天麻钩藤饮高、低剂量组: 造模后第 7 周开始连续 ig 天麻钩藤饮 24, 12 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 2 周。ig 量均为 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

2.2 观测指标与方法

2.2.1 一般状态观察 包括大鼠毛色、行动、饮食、易激惹程度的变化。易激惹程度分为 3 级: I 级捉持大鼠颈部时无明显反应; II 级捉持大鼠颈部时尖叫、惊跳; III 级捉持大鼠颈部时咬人或同笼大鼠频繁打斗。

2.2.2 饮水量的测定 每笼放大鼠 1 只, 记录每日饮水量(包括给药用水量)。

2.2.3 血压的测定 采用大鼠清醒状态下尾动脉加压法, 每周 1 次。

2.2.4 血浆 Ang II, ALD 检测, 采用放射免疫方法。

2.2.5 肝脏蛋白质组的双向电泳分析

2.2.5.1 蛋白质样品的准备 取大鼠肝脏组织, 用冷 PBS 冲洗干净, 迅速置于 -70°C 中保存。取湿重约 200 mg 的组织置于研磨器中, 加入蛋白质裂解液 1 mL, 在冰浴中充分研磨后, 静置 1 min, 取上清置于 1.5 mL 离心管中, 加入 $20\ \mu\text{g}$ DNase 和 $50\ \mu\text{g}$ Rnase, 振荡混匀, 4 $^\circ\text{C}$ 作用 30 min 后振荡混匀, 4 $^\circ\text{C}$ 下 $13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 1 h, 上清液即为蛋白样品溶液, 测定蛋白质含量(考马斯亮蓝染色法)后置 -70°C 保存待用。

2.2.5.2 双向电泳分离 等电聚焦电泳 (IEF): 17 cm IPG 胶条, pH 5 ~8, 上样量 $300\ \mu\text{g}$ 。250 V, 30 min; 1 000 V, 1 h; 10 000 V, 5 h; 10 000 V, 60 000 vhs。平衡: 先后用 DTT、碘乙酰胺平衡液进行平衡, 每次 15 min。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE): 10% 凝胶, 体积 $20\ \text{mm}\times 20\ \text{mm}\times 1.5\ \text{mm}$, 电泳条件: $5\ \text{mA}/\text{gel}$, 30 min; $30\ \text{mA}/\text{gel}$, 至溴酚蓝迁

移到玻璃板末端。

2.2.5.3 染色 5% 乙酸 5% 乙醇固定过夜; 去离子水洗涤 2 次, 每次 20 min; 5% 戊二醛增敏 1 h; 去离子水洗涤 4 次, 每次 15 min; 银氨染液染色 30 min; 去离子水洗涤 3 次, 每次 3 ~5 min; 柠檬酸甲醛溶液显色至斑点与背景均清晰, 迅速倒去显色液; 5% 乙酸终止显色。

2.2.5.4 凝胶图像分析 在 300 dpi, Transmissive 条件下扫描凝胶, TIF 格式保存图像。采用 PDQuest7.4 软件对图像进行背景削减、去除条纹、斑点检测, Gaussian 拟合, 量的归一化后进行匹配比较; 以标准蛋白斑点作为内对照, 分析蛋白斑点的相对分子质量和等电点。

2.3 统计分析 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用方差分析, 两两比较采用 LSD 法, 统计软件为 SPSS 11.0。等级资料采用秩和检验, 处理软件为 PEMS 3.0。 $P<0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般状态的变化 造模大鼠逐渐出现被毛蓬松, 无泽, 食量减少, 易激惹程度增高 ($P<0.05$), 多由造模前的 I 级转变为 II, III 级(表 1)。肝阳上亢组未经治疗, 多表现为 II, III 级; 天麻钩藤饮高剂量及低剂量治疗 2 周后, 大鼠被毛逐渐变得紧凑、有光泽, 食量增加, 易激惹程度好转, 与肝阳上亢组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$) 易激惹程度多表现为 I 级; 利血平组经治疗后, 易激惹程度亦好转 ($P<0.05$), 仍毛松, 无光泽, 食少, 并出现眯眼、拱背现象。

表 1 各组大鼠易激惹程度变化比较

组别	剂量 $/\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	n	造模前			造模 6 周后			治疗后		
			0	1	2	0 ¹⁾	1	2	0 ¹⁾	1	2
SHR 对照	-	9	8	1	0	7	2	0 ¹⁾	8	1	0
肝阳上亢	-	10	9	1	0	0	3	7	0	2	8
利血平	1×10^{-4}	11	8	3	0	0	4	7	9	2	0 ¹⁾
天麻钩藤饮	24	10	8	2	0	0	3	7	8	2	0 ¹⁾
	12	10	9	1	0	0	2	8	8	1	1 ¹⁾

注: 与肝阳上亢组比较¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ (表 2 ~4 同)。

3.2 各组大鼠 24 h 饮水量变化 各造模组别大鼠在附子汤灌胃 6 周后, 饮水量均较前明显增加, 与 SHR 对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.01$) (表 2)。利血平组、天麻钩藤饮高、低剂量组大鼠经治疗后, 饮水量较肝阳上亢组明显减少 ($P<0.01$)。

表 2 各组大鼠 24 h 饮水量变化比较 (̄±s) mL

组别	n	造模前	造模 6 周后	治疗后
SHR 对照	9	25.89 ±6.60	25.78 ±3.27 ²⁾	24.00 ±2.92 ²⁾
肝阳上亢	10	27.60 ±4.50	47.40 ±6.00	40.50 ±5.80
利血平	11	24.18 ±4.56	45.73 ±4.47	19.82 ±3.80 ²⁾
天麻钩藤饮(高)	10	25.40 ±4.16	46.20 ±4.08	25.30 ±4.05 ²⁾
(低)	10	25.60 ±4.86	41.50 ±3.38	25.20 ±7.72 ²⁾

3.3 各组大鼠血压变化 大鼠在造模前后与 SHR 组比较,其血压无明显变化(表 3)。利血平组、天麻钩藤饮高剂量及低剂量组大鼠经治疗后血压均比肝阳上亢组下降($P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠血压变化比较 (̄±s) mmHg

组别	n	造模前	造模 6 周后	治疗后
SHR 对照	9	186.56 ±7.25	202.44 ±4.45	203.89 ±4.68
肝阳上亢	10	186.50 ±7.93	207.90 ±5.24	205.30 ±5.25
利血平	11	185.64 ±6.10	206.00 ±7.42	177.55 ±7.57 ²⁾
天麻钩藤饮(高)	10	186.70 ±6.80	204.80 ±8.05	189.70 ±6.55 ²⁾
(低)	10	184.30 ±7.32	205.90 ±6.28	191.90 ±5.26 ²⁾

3.4 对大鼠血浆 Ang, ALD 的影响 与肝阳上亢组比,天麻钩藤饮高剂量组大鼠经治疗后,Ang 含

量降低($P < 0.05$)。各组大鼠经治疗后,ALD 含量差异无统计学意义(表 4)。

表 4 各组大鼠 Ang, ALD 含量比较 (̄±s)

组别	n	Ang /pg·L ⁻¹	ALD/nmol·L ⁻¹
SHR 对照	9	768.07 ±460.50	1.68 ±0.39
肝阳上亢	10	731.71 ±318.01	2.04 ±1.08
利血平	11	549.25 ±253.44	2.49 ±1.64
天麻钩藤饮(高)	10	392.32 ±220.46 ¹⁾	1.76 ±0.65
(低)	10	593.06 ±315.75	1.83 ±0.66

3.5 肝脏蛋白质组双向电泳分析 SHR 对照组、肝阳上亢组和天麻钩藤饮高剂量组共检测到蛋白质点数分别为(716 ±58), (875 ±19), (899 ±25) 个。肝阳上亢组和 SHR 对照组比较,仅在 SHR 对照组或肝阳上亢组表达的蛋白质分别有 13 个和 27 个;28 个点在表达量上有明显变化(5 倍以上),其中 15 个点明显下调,13 个点明显上调。天麻钩藤饮高剂量组和肝阳上亢组比较,仅在天麻钩藤饮高剂量组表达的蛋白质有 44 个,没有仅在肝阳上亢组表达的蛋白质;29 个点在表达量上有明显变化(5 倍以上),其中 14 个点明显下调,15 个点明显上调(图 1,2)。

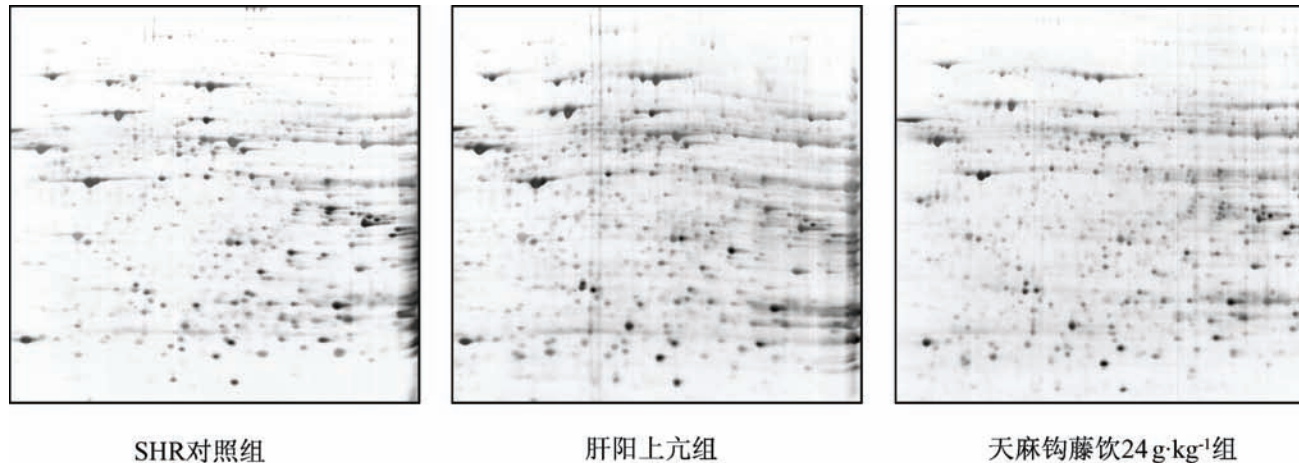


图 1 大鼠肝脏蛋白质双向凝胶电泳整体图谱 (PI5-8, 上样量 300 μg, 银染)

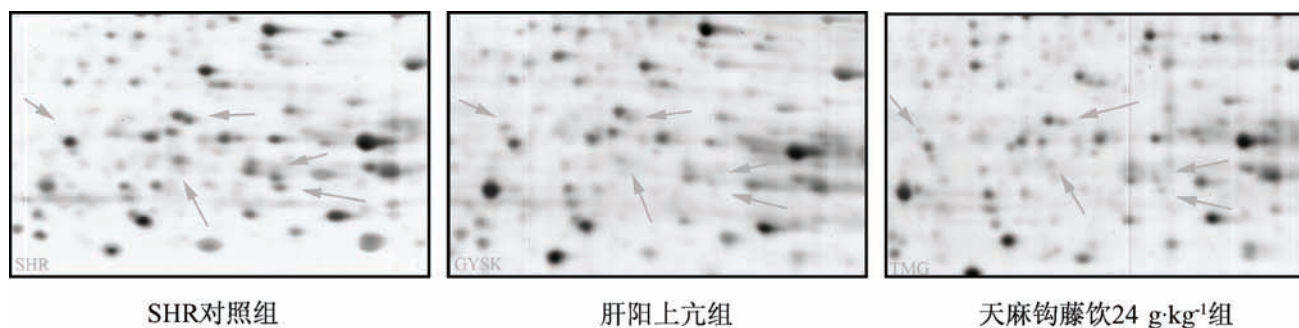


图 2 大鼠肝脏部分差异蛋白质双向凝胶电泳局部图谱 (上样量 300 μg, 银染)

4 讨论

天麻钩藤饮出自于近代胡光慈《中医内科杂病证治新义》^[4],具有平肝潜阳、补益肝肾的功效,是治疗肝阳上亢型高血压病的名方。本试验选用可形成稳定高血压的自发性高血压大鼠(SHR),ig 附子汤,取附子之燥热,灼伤肝肾之阴,从病因、病机、病

位方面综合模拟临床发病情况复制肝阳上亢模型。在附子汤 ig 6 周后,造模组大鼠易激惹程度发生了很大变化,多表现为 , 级,饮水量均较前明显增加,具有与肝阳上亢患者相似的口渴、烦躁易怒等临床特征,已形成较稳定的高血压肝阳上亢证模型。

(下转第 165 页)

复方经血停治疗青春期子宫出血的药理学研究

彭百承, 李萍^{2?}, 甄丹丹³

(1. 南宁市中医院, 南宁 530012; 2. 广西中医学院, 南宁 530001;
3. 广西中医学院第一附属医院, 南宁 530012)

[摘要] 目的: 观察复方经血停的药理作用, 探讨其治疗青春期子宫出血的作用机制。方法: 观察复方经血停对正常小鼠子宫、卵巢质量及血清雌二醇水平的影响, 对去卵巢小鼠子宫质量的影响, 对小鼠出血时间和凝血时间的影响, 对大鼠离体子宫收缩功能的影响。结果: 经血停能增加小鼠子宫和卵巢质量, 能显著提高血清雌二醇水平; 可增加去卵巢小鼠子宫质量; 缩短小鼠出血时间和凝血时间; 能显著增强大鼠离体子宫的收缩频率、幅度和活动力。结论: 经血停可促进雌激素分泌, 有雌性激素样作用, 有止血、兴奋子宫平滑肌等作用。

[关键词] 经血停; 青春期子宫出血; 药效学

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0163-03

青春期功能失调性子宫出血, 是指青春期女性由于神经内分泌调节功能不完善引起生殖内分泌紊乱导致的异常子宫出血, 生殖器官无明显器质性病变, 是青少年女性的常见病。中医药对青春期功能性子宫出血的治疗大都从肾着手, 通过补肾可以调节卵巢内分泌, 从而使卵泡正常发育并排卵, 从根本上治愈功血。复方经血停是南宁市中医院制剂, 由当归、川芎、三七、蒲黄、牛膝、元胡 10 多味中药组成, 具有活血化瘀、补肝肾阴、收敛止血的作用, 临床用于青春期子宫出血, 月经过多, 疗效显著。前期研究工作已证实复方经血停具有明显的镇痛、抗炎作用。本试验进一步观察其对子宫、卵巢质量, 雌性激素水平, 子宫收缩功能, 出、凝血时间的影响。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠, 清洁级, 18 ~22 g。由广西中医学院实验动物中心提供, 许可证 SYXK(桂)2003-0001。Wistar 大鼠, 雌性, 成年未孕, 清洁级, 体重 200 ~250 g, 由广西医科大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK(桂)2003-0003。

1.2 药物与试剂 经血停, 由南宁市中医院提供, 将中药打成粉末, 用纱布包, 水煎煮 3 次, 合并 3 次

滤液, 浓缩至含生药 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 置 -4℃ 冰箱贮存备用; 乌鸡白凤丸, 北京同仁堂有限责任公司, 批号 091006; 雌二醇 (E_2) 酶联免疫检测试剂盒, ADL 公司; 己烯雌酚注射液, 上海第九制药厂, 批号 080709; 缩宫素注射液, 上海第一生化药业有限公司, 批号 080615; 云南白药, 云南白药股份有限公司, 批号 080111。

1.3 仪器 HH-S 型数显恒温水浴箱, 江苏省金坛市医疗仪器厂; AEL-200 型电子天平, 日本岛津公司; SM-3 自动化酶免分析仪, 北京天石医疗用品制作所; ZH-Z 离体器官测量系统, 淮北正华生物仪器设备有限公司; BL-410 型多通道生理信号采集与处理系统, 成都泰盟科技有限公司。

2 方法

2.1 经血停对正常小鼠子宫、卵巢质量及血清雌二醇水平的影响^[1] 取雌性小鼠 50 只, 随机分为空白对照组 ($NS, 20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 阳性对照组 (乌鸡白凤丸, $3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 复方经血停高、中、低剂量组 (生药 10, 20, 40 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。连续 ig 相应药物 14 d, 1 次/d, 给药容量为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。末次给药后 24 h, 动物称重, 摘眼球取血, 应用酶联免疫法测定血清雌二醇水平。处死后取出子宫和卵巢, 迅速称重, 计算脏器系数。

2.2 经血停对去卵巢小鼠子宫质量的影响^[1] 取雌性小鼠 50 只, 在乙醚浅麻醉下摘除两侧卵巢, 伤口愈合后, 分组、给药剂量和途径和时间同 **2.1**, 末次给药后 24 h 将动物称重后, 处死, 剖腹取子宫, 称重,

[收稿日期] 2010-06-18

[第一作者] 彭百承, 副主任中药师, 主要从事医院制剂及临床药学, Tel: 13807878505; E-mail: 13807878506@139.com

[通讯作者] [?] 李萍, 硕士, 副教授, 主要从事中药药理研究, Tel: 13005923060, E-mail: lizli92@163.com