

· 配伍 ·

桂枝汤桂枝-白芍不同比例配伍对盐敏感高血压大鼠 心脏交感神经过度激活的影响

韩晓伟¹, 王永成², 马度芳², 李媛¹, 董峰², 赵恒懿², 姜萍¹, 陈文静²,
陈纪烨¹, 迟辰昱¹, 李晓^{1,2*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250014; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014)

[摘要] 目的:探讨桂枝汤桂枝-白芍不同比例配伍对盐敏感高血压大鼠心脏交感神经过度激活的影响及其作用机制。方法:将40只6周龄雄性盐敏感大鼠随机分为5组,空白组、模型组、桂枝汤组(桂枝-白芍1:1组、桂枝-白芍1:2组和桂枝-白芍2:1组)每组8只,空白组给予低盐饲料饲养,其余4组给予8%高盐饲料饲养,饲养4周后灌胃,空白组、模型组大鼠每天给予2 mL·kg⁻¹生理盐水灌胃,桂枝-白芍1:1组、桂枝-白芍1:2组和桂枝-白芍2:1组每天分别按4.0, 5.5, 5.5 g·kg⁻¹给予桂枝汤水煎剂灌胃,连续干预4周。IITC多通道无创血压计检测大鼠治疗前后收缩压变化;超声心动图检测左室前壁舒张末期厚度(LVAWd)和室间隔舒张期厚度(IVSd)以反应心肌肥厚程度;苏木素-伊红(HE)染色和马松(Masson)染色观察大鼠心肌形态学变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组大鼠心肌组织神经生长因子(NGF),生长相关蛋白43(GAP43)和酪氨酸羟化酶(TH)蛋白的表达。结果:桂枝汤干预4周后,与空白组比较,模型组大鼠血压, LVAWd和IVSd显著升高, NGF, TH和GAP43蛋白表达显著增高($P<0.01$); HE和Masson染色结果显示,模型组大鼠心肌细胞水肿,大量炎性细胞浸润,心肌纤维大量增生且排列紊乱,细胞间质可见大量胶原沉积。与模型组比较,桂枝汤各组大鼠收缩压上升缓慢, NGF, TH和GAP43蛋白表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),以桂枝-白芍1:1组效果最佳;超声心动图结果显示,与模型组比较,桂枝-白芍1:1组可降低LVAWd和IVSd($P<0.05$, $P<0.01$);桂枝-白芍1:2组可明显降低IVSd($P<0.05$),但LVAWd与模型组比较,差异无统计学意义;桂枝-白芍2:1组LVAWd和IVSd均无统计学差异;心肌形态学方面,桂枝汤各组较模型组均可减轻细胞水肿和炎性细胞浸润,减少心肌纤维增生和胶原沉积,改善心肌纤维排列紊乱,其中以桂枝汤桂枝-白芍1:1组效果最佳。结论:桂枝汤可抑制心脏交感神经系统过度激活,减轻心肌纤维化、炎症浸润和心肌肥厚,对盐敏感高血压大鼠起到保护作用,其机制可能与调节心脏NGF表达有关,其中桂枝汤桂枝-白芍1:1配伍组在减轻心肌纤维化、炎症浸润和心肌肥厚方面,优于桂枝-白芍1:2和2:1组。

[关键词] 桂枝汤; 高血压; 神经生长因子; 交感神经系统; 心肌损害

[中图分类号] R2-0; R289; R285.5; R541.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)01-0081-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210140

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201110.1335.001.html>

[网络出版日期] 2020-11-10 15:50

Effect of Guizhitang with Different Proportions of Cinnamomi Ramulus and Paeoniae Alba Radix on Overactive Activation of Cardiac Sympathetic Nervous System in Salt-Sensitive Hypertensive Rats

HAN Xiao-wei¹, WANG Yong-cheng², MA Du-fang², LI Yuan¹, DONG Feng², ZHAO Heng-yi²,
JIANG Ping¹, CHEN Wen-jing², CHEN Ji-ye¹, CHI Chen-yu¹, LI Xiao^{1,2*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250014, China;

[收稿日期] 20200630(029)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673970); 国家中医药管理局第四批全国中医(临床、基础)优秀人才研修项目(国中医药人教发[2017]24); 山东张氏风湿病清消流派传承工作室项目

[第一作者] 韩晓伟, 在读硕士, 从事心血管疾病的中西医结合诊疗、心肌微血管损伤与自主神经重构研究, E-mail: hanxw19960129@163.com

[通信作者] * 李晓, 博士, 教授, 主任医师, 从事心血管疾病的中西医结合诊疗、心肌微血管损伤与自主神经重构研究, E-mail: lixiao617@163.com

2. *Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Ji'nan 250014, China*)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanism of Guizhitang with different proportions of Cinnamomi Ramulus and Paeoniae Alba Radix on overactive cardiac sympathetic nerves in salt-sensitive hypertensive rats. **Method:** Randomly divide the forty male 6-week-old salt-sensitive hypertensive rats into five groups: the normal control group, the model group, the Cinnamomi Ramulus and Paeoniae Alba Radix 1:1 group, the Cinnamomi Ramulus and Paeoniae Alba Radix 1:2 group, and the Cinnamomi Ramulus and Paeoniae Alba Radix 2:1 group, each group has 8 animals, the normal control group was fed with low-salt feed, and the remaining four groups were fed with 8% high-salt feed. After 4 weeks of feeding, gastric feeding was started. Give both the normal control group and model group saline and the Cinnamomi Ramulus and Paeoniae Alba Radix 1:1 group, the 1:2 group, and the 2:1 group, were given Guizhitang aqueous solution at 4.0, 5.5 and 5.5 g·kg⁻¹, respectively. Continuous gavage intervention was held for 4 weeks. ITC multi-channel non-invasive sphygmomanometer was used to detect changes of systolic blood pressure before and after treatment in rats. Left ventricular anterior wall end-diastolic thickness (LVAWd) and interventricular septal diastolic thickness (IVSd) were detected by echocardiography. Hematoxylin-eosin(HE) staining and Masson staining were used to observe the myocardial morphological changes of rats in each group, Western blot was used to detect the expression of nerve growth factor (NGF), growth-associated protein 43 (GAP43) and tyrosine hydroxylase (TH) protein. **Result:** After 4 weeks of intervention with Guizhitang, compared with the normal control group, the blood pressure, LVAWd and IVSd of the model group were significantly increased, and the expressions of NGF, TH and GAP43 protein were significantly increased ($P<0.01$). HE and Masson staining results showed that the model group had myocardial cell edema, a large number of inflammatory cell infiltration, myocardial fiber hyperplasia and disordered arrangement, and a large amount of collagen deposition could be seen in the intercellular substance. Compared with model group, the systolic blood pressure of rats in each Guizhitang group increased slowly, and the expression of NGF, TH and GAP43 protein decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), the Cinnamomi Ramulus and Paeoniae Alba Radix 1:1 group has the best effect. The results of echocardiography shows that the 1:1 Guishao group could reduce LVAWd and IVSd levels ($P<0.05$, $P<0.01$), the Cinnamomi Ramulus and Paeoniae Alba Radix 1:2 group could reduce IVSd level ($P<0.05$), there was no statistical difference in LVAWd, there was no statistical difference in LVAWd and IVSd in 2:1 group. In terms of myocardial morphology, each group of Guizhitang can reduce cell edema and inflammatory cell infiltration, reduce myocardial fiber hyperplasia and collagen deposition, and improve the disorder of myocardial fiber arrangement. Among them, the 1:1 group has the best effect. **Conclusion:** Guizhitang can inhibit the overactive activation of cardiac sympathetic nervous system, reduce the extent of myocardial fibrosis, inflammatory infiltration and myocardial hypertrophy, and protect salt-sensitive hypertension rats, whose mechanism may be related to regulating the expression of heart NGF. Among them, the Cinnamomi Ramulus and Paeoniae Alba Radix 1:1 group is better than the 1:2 and 2:1 group in reducing myocardial fibrosis, inflammatory infiltration and myocardial hypertrophy.

[Key words] Guizhitang; hypertension; nerve growth factor; sympathetic nervous system; myocardial damage

心脏交感神经系统过度激活在高血压发病过程中发挥着重要作用,交感神经活性增强可释放儿茶酚胺类递质引起血压升高,同时增强的心脏交感神经电活动及儿茶酚胺类递质可导致高血压心肌梗厚的发生^[1]。实验研究表明,在高血压过程中过

度激活的心脏交感神经系统通过激活 α 和 β 肾上腺素能受体,引发炎症反应而诱导心肌纤维化^[2]。目前,对于交感神经系统的过度激活,尚无特殊治疗药物。 β 受体阻滞剂作为一种抑制交感神经亢进的药物,具有逆转心肌肥厚和抗心肌纤维化作用^[3-4],

但临床观察发现 β 受体阻滞剂在对抗交感神经亢进、降低心率的同时,可增加患者的死亡率^[5]。因此,探寻心脏交感神经系统过度激活的抑制药物对控制高血压引起的心肌重构具有重要意义。

课题组前期研究表明,桂枝汤可抑制链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病自主神经病变大鼠心脏交感神经过度激活,调节神经生长因子(NGF),睫状生长因子(CNTF),生长相关蛋白43(GAP43)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量,减轻糖尿病心脏自主神经病变,且对于4-甲基邻苯二酚诱导的心脏交感神经芽生大鼠模型^[6],桂枝汤桂枝-白芍1:1和1:2配伍可以显著抑制交感神经过度芽生^[7]。然而,桂枝汤是否对高血压导致的心肌病变有治疗作用,目前还未有研究。据此,本研究通过观察桂枝汤对盐敏感高血压大鼠心脏交感神经系统的调节作用,探索桂枝汤是否可通过抑制交感神经过度亢进,减轻心肌病理性损伤,缓解高血压心肌肥厚,并推测其作用机制,以期对高血压性心脏病的治疗提供有效的治疗药物。

1 材料

1.1 动物 40只6周龄雄性SPF级Dahl盐敏感大鼠,体质量160~200 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-0006。大鼠饲养于山东中医药大学实验室。本实验操作均遵循实验动物伦理委员会的相关规定,并接受山东中医药大学伦理委员会的监督(伦理批号SDVTCM2018071501)。

1.2 药物与试剂 桂枝汤组成中药均购自山东中医药大学附属医院,经山东中医药大学药学院李峰教授鉴定均符合规范。桂枝汤桂枝-白芍1:1组药物组成为桂枝9 g,白芍9 g,生姜12 g,大枣12 g,炙甘草6 g;桂枝-白芍1:2组为桂枝9 g,白芍18 g,生姜12 g,大枣12 g,炙甘草6 g;桂枝-白芍2:1组为桂枝18 g,白芍9 g,生姜12 g,大枣12 g,炙甘草6 g。取桂枝汤药物组成的原料药用10倍水回流提取2次,煎煮2次,时间分别为1.5,1 h,混合两次提取物,经过过滤减压处理后浓缩成相对浓度密度为1.20~1.25(70~80℃)。后加入颗粒赋形剂,60℃以下干燥,得到桂枝汤颗粒,2 g生药相当于1 g颗粒药。使用时将其配成1 g·mL⁻¹的溶液。苏木素-伊红(HE)染色液(武汉谷歌生物科技有限公司,批号G1005);马松(Masson)染色液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号G1210);兔NGF单克隆抗体,兔GAP43多克隆抗体,兔酪氨酸羟化酶(TH)单克隆抗体(英国

Abcam公司,批号分别为ab52918, ab16053, ab137869);兔 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(武汉三鹰公司,批号20536-1-AP);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号ZB-2301)。

1.3 仪器 5424R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);BL-3000型电子天平(厦门佰伦斯电子科技有限公司);IITC型多通道无创血压计(美国Life Science公司);M5 Vet彩色多普勒超声仪(深圳Mindray公司);Multiskan Go型酶标仪,Mini-Protean Tetra电泳系统(美国Thermo Scientific公司);Trans-Blot Turbo型转膜仪(美国Bio-Rad公司);Fluor Chem Q凝胶成像分析系统(美国Alpha Innotech公司);TP1020型自动脱水机,EG1150H型石蜡包埋机(德国Leica公司);Nikon Eclipse E100型正置光学显微镜(日本尼康公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 适应性饲养大鼠1周后,将40只大鼠随机分成5组,空白组、模型组、桂枝汤桂枝-白芍1:1组、桂枝汤桂枝-白芍1:2组、桂枝汤桂枝-白芍2:1组,每组8只。空白组予以低盐饲料(0.3% NaCl)饲养,余4组大鼠高盐饲料(8% NaCl)饲养以造模。4周后对各组大鼠进行灌胃干预治疗。依据前期给药方法^[7-9],桂枝汤颗粒剂配置成水溶剂后对大鼠进行灌胃治疗,大鼠的用药量根据成人用药剂量和大鼠-成人剂量换算公式,并参考既往研究进行设定。其中桂枝汤桂枝-白芍1:1组,1:2组和2:1组分别按4.0,5.5,5.5 g·kg⁻¹进行灌胃,空白组和模型组灌胃2 mL·kg⁻¹生理盐水,每日1次,连续灌胃4周。

2.2 无创血压计检测大鼠血压 大鼠分组后,于每个时间节点上午8:00至12:00将大鼠固定于无创血压计中,测定大鼠尾动脉收缩压。时间节点选取分组后(造模前),桂枝汤灌胃前(给药前)和桂枝汤灌胃结束后(给药后)。每只大鼠重复测定3次,取平均值并做记录。

2.3 心脏彩超检测大鼠心功能 大鼠经麻醉处理(3%盐酸戊巴比妥钠腹腔注射,40 mg·kg⁻¹)后,使用脱毛膏对大鼠前胸部进行脱毛处理。大鼠取仰卧位固定于固定器上,使用超声仪进行超声检测,并分别记录室间隔舒张期厚度(IVSd)和左室前壁舒张末期厚度(LVAWd)。

2.4 标本留取 连续灌胃4周,最后1次给药12 h后,大鼠禁食并称体质量,戊巴比妥钠麻醉大鼠,开

胸,于冰上剪取心脏,称质量后即刻用生理盐水进行灌流,分离左心室,分装于甲醛固定液和-80℃冰箱储存,用于HE, Masson染色和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测。

2.5 HE染色和Masson染色观察大鼠心肌病理形态学改变 取大鼠心肌组织,石蜡包埋后切取厚度约6 μm的切片,烤片后置于二甲苯和乙醇中脱蜡至水,分别放于苏木素染液10 min,盐酸乙醇3 s,进行染色和分化处理后,流水冲洗,再分别置于乙醇、伊红中各30 s,再依次置于低浓度到高浓度的乙醇以及二甲苯中进行脱水和透明,最后中性树胶封片。于光学显微镜下观察,并保存图片。

取心肌组织石蜡切片脱蜡至水,分别用自来水、蒸馏水冲洗,铁苏木素染液染核5 min,充分水洗后,分别置于Masson丽春红酸性复红液,2%乙酸水溶液和1%磷钼酸水溶液中,时间分别为5 min,数秒及5 min,随后直接苯胺蓝染5 min,冰醋酸水溶液浸泡数秒后,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。置于光学显微镜下观察。

2.6 Western blot检测NGF, TH和GAP43蛋白表达 于离心管中放入心肌组织,剪碎离心处理后置于研钵中,放入RIPA和PMSF后充分研磨组织至匀浆,将匀浆孵育离心后于-80℃储存;BCA法测定蛋白浓度;将蛋白,PBS和5×Loading buffer配成蛋

白体系100 μL,离心后置于100℃水浴锅内沸水变性10 min,4℃储存;配胶后进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳;切取目的蛋白的分子量的胶后进行转膜;将膜放入5%脱脂牛奶中封闭1 h;配置一抗NGF(1:1 000),TH(1:5 000),GAP43(1:1 000),β-actin(1:5 000),将膜置于一抗中4℃孵育过夜;次日TBST洗膜,二抗(1:1万)孵育后显影。采用AlphaView SA软件对目的蛋白进行定量分析并根据其与内参灰度值的比值,计算目的蛋白的相对表达量。

2.7 统计学分析 使用SPSS 23.0软件对实验数据进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用纽曼-科伊尔斯检验(SNK)或Dunnet T检验,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠收缩压的影响 造模前,各组大鼠收缩压比较,差异无统计学意义;给药前,与空白组比较,模型组大鼠收缩压显著上升($P<0.01$);药物治疗4周后,与模型组比较,桂枝汤各组大鼠血压均明显降低($P<0.05, P<0.01$),桂枝汤3个配伍组中以桂枝汤桂枝-白芍1:1组血压最低($P<0.05$)。桂枝汤桂枝-白芍1:2和2:1组大鼠收缩压比较,差异无统计学意义。见表1。

表1 桂枝汤桂枝-白芍不同比例配伍对盐敏感大鼠收缩压的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Effect of Guizhitang with different proportions of Cinnamomi Ramulus and Paeoniae Alba Radix on systolic blood pressure in salt-sensitive rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	造模前	给药前	给药后
空白		120.80±4.09	128.80±3.42	131.80±3.31
模型		125.00±4.18	180.80±5.07 ²⁾	222.40±4.45 ²⁾
桂枝-白芍1:1	4.0	128.20±5.54	184.80±5.17	205.40±2.73 ⁴⁾
桂枝-白芍1:2	5.5	128.80±5.31	185.40±4.83	214.60±2.15 ^{3,5)}
桂枝-白芍2:1	5.5	129.40±4.51	186.20±7.26	213.40±4.08 ^{3,5)}

注:1 mmHg=0.133 kPa;与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与桂枝汤桂枝-白芍1:1组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$;与桂枝汤桂枝-白芍1:2组比较⁷⁾ $P<0.05$,⁸⁾ $P<0.01$ (表2,3同)。

3.2 对大鼠心脏超声的影响 与空白组比较,模型组LVAWd和IVSd均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,桂枝汤桂枝-白芍1:1组LVAWd,IVSd均明显降低($P<0.05, P<0.01$),桂枝汤桂枝-白芍1:2组IVSd明显降低($P<0.05$),LVAWd无统计学差异,桂枝汤桂枝-白芍2:1组均无统计学差异;与桂枝汤桂枝-白芍1:1组比较,桂枝汤桂枝-白芍1:2和2:1组IVSd显著升高($P<0.01$);桂枝汤桂枝-白芍1:2组和2:1组LVAWd和IVSd比较,差异无统计学意义。

见表2。

3.3 对大鼠心肌形态学的影响 HE染色结果显示,空白组大鼠心肌组织结构完好,可见整齐排列的心肌纤维,有少量炎性细胞浸润。模型组大鼠心肌组织细胞间隙增宽,细胞间呈现水肿表现,可见大量炎性细胞浸润。桂枝汤桂枝-白芍1:1组大鼠心肌组织炎性细胞浸润较少,心肌纤维排列比较整齐,无明显细胞间水肿,较模型组大鼠心肌形态学明显改善。桂枝汤桂枝-白芍1:2组大鼠心肌纤维

表2 桂枝汤桂枝-白芍不同比例配伍对盐敏感大鼠心脏超声的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

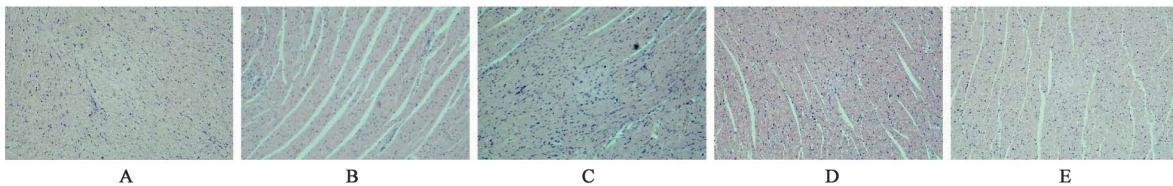
Table 2 Effect of Guizhitang with different proportions of Cinnamomi Ramulus and Paeoniae Alba Radix on echocardiography in salt-sensitive rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	LVAWd	IVSd
空白		2.01±0.07	1.92±0.04
模型		2.45±0.04 ²⁾	2.35±0.04 ²⁾
桂枝-白芍 1:1	4.0	2.33±0.06 ³⁾	2.08±0.06 ⁴⁾
桂枝-白芍 1:2	5.5	2.37±0.03	2.22±0.06 ^{3,6)}
桂枝-白芍 2:1	5.5	2.40±0.02	2.29±0.04 ⁶⁾

排列尚可,存在部分炎性细胞浸润,心肌细胞间质可见水肿,较模型组大鼠心肌形态学有一定的改

善。桂枝汤桂枝-白芍 2:1 组心肌纤维排列不规整,存在细胞间隙增宽和水肿,较模型组大鼠心肌形态学改变不显著。见图 1。

Masson 染色结果示空白组大鼠心肌细胞结构规整,细胞间质偶见胶原纤维。模型组大鼠心肌组织可见大量蓝色心肌纤维增生,细胞间质可见大量胶原沉积。桂枝汤桂枝-白芍 1:1 组大鼠心肌细胞间质胶原沉积和心肌纤维均减少,较模型组大鼠心肌形态学明显改善。桂枝汤桂枝-白芍 1:2 组大鼠心肌纤维增生较多,存在胶原沉积,较模型组大鼠心肌形态学有一定改善。桂枝汤桂枝-白芍 2:1 组大鼠心肌纤维排列紊乱,心肌纤维及胶原沉积较模型组大鼠心肌形态学改善不显著。见图 2。



A. 空白组; B. 模型组; C. 桂枝汤桂枝-白芍 1:1 组; D. 桂枝汤桂枝-白芍 1:2 组; E. 桂枝汤桂枝-白芍 2:1 组 (图 2, 3 同)

图 1 桂枝汤桂枝-白芍不同比例配伍对盐敏感大鼠心肌组织形态学的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Guizhitang with different proportions of Cinnamomi Ramulus and Paeoniae Alba Radix on morphology of myocardium in salt-sensitive rats (HE, ×200)

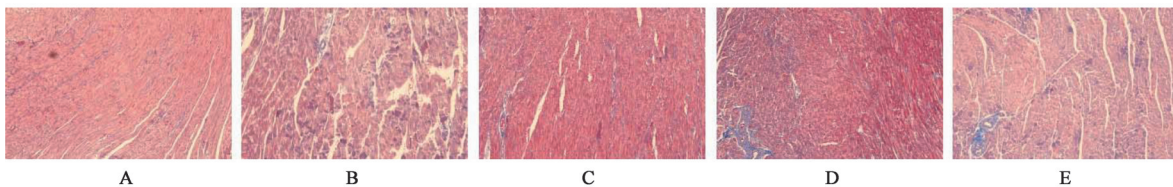


图 2 桂枝汤桂枝-白芍不同比例配伍对盐敏感大鼠心肌组织形态学的影响 (Masson, ×200)

Fig. 2 Effect of Guizhitang on morphology of myocardium in salt-sensitive rats (Masson, ×200)

3.4 对大鼠心肌组织中 NGF, GAP43 和 TH 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠 NGF, TH 和 GAP43 蛋白表达均显著增高 ($P<0.01$);与模型组比较,桂枝汤各组 NGF, TH 和 GAP43 蛋白表达均显著降低 ($P<0.01$);与桂枝汤 1:2 和 2:1 组比较,桂枝汤 1:1 组 NGF, TH 和 GAP43 蛋白表达均明显降低 ($P<$

0.05, $P<0.01$);与桂枝汤 2:1 组比较,桂枝汤 1:2 组 NGF, GAP43 蛋白表达明显降低 ($P<0.05, P<0.01$)。见表 3, 图 3。

4 讨论

在高血压的发病过程中,交感神经系统过度激活,引起血压升高^[10-11]。过度激活的交感神经系统

表 3 桂枝汤桂枝-白芍不同比例配伍对盐敏感大鼠心肌组织 NGF, TH, GAP43 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of Guizhitang with different proportions of Cinnamomi Ramulus and Paeoniae Alba Radix on NGF, TH and GAP43 protein expression in salt-sensitive rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NGF/ β -actin	TH/ β -actin	GAP43/ β -actin
空白		0.52±0.03	0.44±0.02	0.44±0.03
模型		0.93±0.05 ²⁾	0.90±0.04 ²⁾	0.96±0.03 ²⁾
桂枝-白芍 1:1	4.0	0.74±0.02 ⁴⁾	0.53±0.02 ⁴⁾	0.64±0.02 ⁴⁾
桂枝-白芍 1:2	5.5	0.80±0.01 ^{4,5)}	0.74±0.06 ^{4,6)}	0.69±0.03 ^{4,5)}
桂枝-白芍 2:1	5.5	0.85±0.01 ^{4,6,7)}	0.77±0.03 ^{4,6)}	0.80±0.03 ^{4,6,8)}

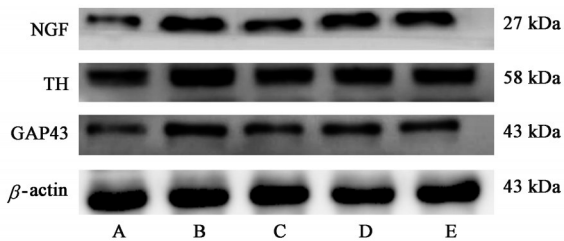


图3 各组盐敏感大鼠心肌组织中NGF,TH,GAP43蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of NGF,TH and GAP43 protein expression in salt-sensitive rats of each group

可引起严重的心肌损伤,继而引起冠心病、心衰等疾病的发生^[12-13]。抑制交感神经可使包括高血压在内的多种心脏病受益。实验研究表明,在自发性高血压大鼠和主动脉缩窄术大鼠中去除肾交感神经均可延缓大鼠的心肌重构^[14-15]。临床研究表明,压力反射激活疗法可通过激活副交感神经影响颈动脉中的压力感受器而抑制交感神经,可有效减轻射血分数保留心衰患者的症状,提高其生活质量,降低住院率,且压力反射激活疗法对抵抗性高血压具有一定作用^[16-17]。因此,通过抑制交感神经系统的过度激活在防治高血压导致的心肌损伤中具有重要意义。

本研究结果显示,盐敏感高血压大鼠经过高盐饲养,模型组大鼠收缩压升高,左室前壁舒张末期厚度和室间隔舒张期厚度增加,出现心肌纤维增生和胶原沉积,心肌细胞发生炎症反应。桂枝汤干预后,桂枝汤各组大鼠血压上升缓慢,LVAWd和IVSd均不同程度降低,炎症细胞浸润、心肌纤维增生和胶原沉积均不同程度减少,表明桂枝汤可延缓盐敏感高血压大鼠血压升高,减轻心肌损伤,其中以桂枝汤桂枝-白芍1:1组效果最佳。

NGF具有诱导神经生长,保护和修复受损神经等作用^[18-19],是介导心脏交感神经支配的关键趋化因子^[20]。在NGF基因和受体缺失的小鼠中的研究表明,NGF可通过防止细胞凋亡而促进交感神经发育^[19,21]。在心肌组织中,NGF的表达与交感神经支配密度水平相对应^[22]。GAP43是一种脊椎动物特异性蛋白,参与轴突生长和突触形成,常被用作神经再生的标志物^[23-24]。研究表明,在受损心肌组织中,NGF可通过上调GAP43的表达,引起交感神经支配密度增加^[25]。交感神经通过释放儿茶酚类神经递质发挥生理作用,TH是交感神经递质合成的限速酶,反应交感神经的支配活性。

本研究结果显示,模型组高血压大鼠心肌组织中NGF,GAP43和TH蛋白的表达增加,说明在盐敏感高血压大鼠中,心脏交感神经支配密度增加且支

配活性增强。桂枝汤各组均可降低NGF,GAP43和TH的表达,不同比例各组存在差异,以桂枝汤桂枝-白芍1:1组效果最佳。桂枝汤桂枝-白芍1:2组较桂枝-白芍2:1组可更好地降低NGF和GAP43蛋白的表达,但其TH蛋白的表达水平相当。

高血压心肌损伤根据其临床表现应属于祖国医学中心悸、胸痹等心系疾病的范畴。《难经》中指出了心系疾病的治疗应从营卫着手。营卫二气,循行周身,渗灌气血,濡养心脏。《黄帝内经·素问·六微旨大论》谓:“亢则害,承乃制,制则生化”。营卫二者动态平衡失调,或营气衰少而卫气内伐,或营气稽留而卫气从之,均可引起心脉失养,心气不足,瘀血、水饮等病理产物蓄积体内,发为心悸、胸痹等。因此,在心系疾病的治疗过程中应注重调和营卫^[26]。桂枝汤具有调和营卫的功效,方中桂枝辛、甘、微温,《本草纲目》言:“桂枝进达营卫,故能解肌而风邪去。”桂枝行于肺卫,与炙甘草相合化阳入心助心阳。白芍苦、酸、凉,成无己在《注解伤寒论》中指出:“芍药之酸收,敛津液而益荣。”与炙甘草酸甘相合,化生脾土,生营敛阴滋养心阴。佐以生姜、大枣,佐助桂枝使得邪从卫泄,且助白芍敛阴和营,整方配伍共奏调和营卫,平调心之阴阳的功效。临证应用桂枝汤时,患者常有心之阴阳虚损偏盛之不同,桂枝白芍常采用不同比例配伍以求辨证施治,如倍用桂枝,即为桂枝加桂汤,整方偏阳,偏于走表,则辛散透邪,温通卫阳之力增强,《伤寒论》言之可治疗因失治误治,汗出过多,心阳虚损,气发奔豚之症。倍用白芍,取小建中汤酸甘化阴,调建中州之意,整方偏阴,偏于入里,则增其收敛益营,滋补心阴之效。实验研究表明,桂枝汤桂枝白芍不同比例配伍水煎剂中药物的有效成分的煎出率和生物利用度存在差异^[27-28]。因此,本研究设置平调阴阳的桂枝汤桂枝-白芍1:1组、偏于滋养心阴的1:2组和偏于温通心阳的2:1组,探索不同比例的配伍对高血压过程中交感神经系统过度激活及其引起的心肌病理变化的作用。本研究结果表明,三组对盐敏感高血压大鼠的交感神经抑制作用及减轻心肌损伤程度以1:1组效果最佳,1:2组较2:1组可更好降低NGF,减轻心脏交感神经支配密度。

综上所述,在盐敏感高血压大鼠中,桂枝汤不同比例配伍可抑制交感神经系统过度激活,减轻高血压导致的心肌纤维化、心肌细胞炎症和心肌肥厚的程度,具有心血管保护作用,其机制可能与桂枝汤调节NGF的表达有关,以桂枝汤原方比例1:1配

伍效果最佳,且1:2配伍组效果优于2:1配伍组。

[参考文献]

- [1] SCHLAICH M P, KAYE D M, LAMBERT E, et al. Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy [J]. *Circulation*, 2003, 108(5):560-565.
- [2] LEVICK S P, MURRAY D B, JANICKI J S, et al. Sympathetic nervous system modulation of inflammation and remodeling in the hypertensive heart [J]. *Hypertension*, 2010, 55(2):270-276.
- [3] ZHANG N, WEI W Y, LI L L, et al. Therapeutic potential of polyphenols in cardiac fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:122.
- [4] SOLIMAN E Z, PRINEAS R J. Antihypertensive therapies and left ventricular hypertrophy [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2017, 19(10):79.
- [5] WIYSONGE C S, BRADLEY H A, VOLMINK J, et al. Beta-blockers for hypertension [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007, 24(1):CD002003.
- [6] 马度芳,姜月华,杨金龙,等. 桂枝汤对糖尿病模型大鼠自主神经损伤的治疗作用[J]. *山东中医药大学学报*, 2015, 39(6):549-551, 572.
- [7] 李晓,姜萍,林海青,等. 桂枝汤对4-甲基邻苯二酚诱导心脏交感神经芽生的抑制作用[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(9):1320-1325.
- [8] 李晓,杨金龙,马度芳,等. 桂枝汤桂芍不同比例配伍对糖尿病模型大鼠心脏自主神经病变的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(6):741-745.
- [9] WANG Y C, MA D F, JIANG P, et al. Guizhitang inhibits cholinergic transdifferentiation by regulating imbalance of NGF and LIF in salt-sensitive hypertensive heart failure rats [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26(3):188-196.
- [10] GUYENET P G. The sympathetic control of blood pressure [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(5):335-346.
- [11] WESTFALL D P, TODOROV L D, MIHAYLOVA-TODOROVA S T. ATP as a cotransmitter in sympathetic nerves and its inactivation by releasable enzymes [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 303(2):439-444.
- [12] SLIVNICK J, LAMPERT B C. Hypertension and heart failure [J]. *Heart Fail Clin*, 2019, 15(4):531-541.
- [13] ESCOBAR E. Hypertension and coronary heart disease [J]. *J Hum Hypertens*, 2002, doi: 10.1038/sj.jhh.1001345.
- [14] LI Z Z, JIANG H, CHEN D, et al. Renal sympathetic denervation improves cardiac dysfunction in rats with chronic pressure overload [J]. *Physiol Res*, 2015, 64(5):653-662.
- [15] TROMP T R, MAHESH D, JOLES J A, et al. Direct recording of cardiac and renal sympathetic nerve activity shows differential control in renovascular hypertension [J]. *Hypertension*, 2018, 71(6):1108-1116.
- [16] CHUNBIN W, FU S, JING H. Efficacy and safety of baroreflex activation therapy for treatment of resistant hypertension: a systematic review and Meta-analysis [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2018, 40(6):501-508.
- [17] MANN J A, ABRAHAM W T. Cardiac contractility modulation and baroreflex activation therapy in heart failure patients [J]. *Curr Heart Fail Rep*, 2019, 16(1):38-46.
- [18] ROCCO M L, SOLIGO M, MANNI L, et al. Nerve growth factor: early studies and recent clinical trials [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2018, 16(10):1455-1465.
- [19] SNIDER W D. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us [J]. *Cell*, 1994, 77(5):627-638.
- [20] KIMURA K, IEDA M, FUKUDA K. Development, maturation, and transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves [J]. *Circ Res*, 2012, 20, 110(2):325-36.
- [21] CROWLEY C, SPENCER S D, NISHIMURA M C, et al. Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons [J]. *Cell*, 1994, 76(6):1-9.
- [22] BARTKOWSKA K, TURLEJSKI K, DJAVADIAN R L. Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system [J]. *Acta Neurobiol Exp*, 2010, 70:454-467.
- [23] KONG H, QI G, LI Z, et al. Cardiac autonomic nerve fiber regeneration in chronic heart failure do Akt gene-transduced mesenchymal stem cells promote repair? [J]. *Neural Regen Res*, 2010, 5(1):28-34.
- [24] KAWASAKI A, OKADA M, TAMADA A, et al. Growth cone phosphoproteomics reveals that GAP-43 phosphorylated by JNK is a marker of axon growth and regeneration [J]. *iScience*, 2018, 29(4):190-203.
- [25] KIMURA K, IEDA M, KANAZAWA H, et al. Cardiac sympathetic rejuvenation: a link between nerve function and cardiac hypertrophy [J]. *Circ Res*, 2007, 100(12):1755-1764.
- [26] 李晓. 从营卫和调论述当今心血管疾病难点的防治 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(3):824-828.
- [27] 陈永财,钱江辉,王彬辉,等. “桂枝与白芍”药对不同比例配伍的HPLC指纹图谱探讨 [J]. *中国医药导报*, 2017, 14(13):29-33, 64.
- [28] 陈永财,钱江辉,王彬辉,等. 桂枝-白芍药对不同比例配伍对芍药苷在大鼠体内药动学的影响 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2017, 22(11):1237-1243.

[责任编辑 孙丛丛]