

天麻钩藤汤对自发性高血压模型大鼠的疗效及其对血管壁氧化应激的干预作用

范辉 韩毅 马骏

(新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐, 830000)

摘要 目的:观察天麻钩藤汤自发性高血压模型大鼠的治疗作用,并观察其对血管氧化应激的影响。方法:选取SD大鼠100只并随机分为假手术组(10只)、模型组及中药组(共90只),对模型组及中药组大鼠进行高盐饲料喂养以诱导高血压模型,最终将30只造模成功大鼠纳入研究,即模型组、高剂量组及低剂量组,每组10只,中药组大鼠分别接受1.32 kg/mL、及0.33 kg/mL天麻钩藤汤灌胃,1次/d,连续干预10 d,疗程结束后比较4组大鼠血压变化,胸主动脉的病理变化,外周血一氧化氮(NO)、内皮素-1(ET-1)、血管假性血友病因子(vWF)水平变化,并用活性氧(ROS)检测4组胸主动脉细胞氧化应激水平。结果:干预结束后中药组大鼠的血压水平平均低于模型组,其中随着天麻钩藤汤剂量升高大鼠收缩压降低越明显,差异有统计学意义($P < 0.05$);与假手术组比较,模型组及中药组大鼠胸主动脉均出现不同程度的病理受损变化,其中中药组结构、厚度、内膜完整性均较模型组改善,其改善程度高剂量组优于低剂量组。与模型组比较,中药组大鼠外周血ET-1及vWF均有所下降,NO水平有所上调,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中随着天麻钩藤汤剂量增加,大鼠上述指标改善越明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组大鼠比较,中药组大鼠胸主动脉ROS明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中高剂量组下降趋势最明显,与低剂量组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:天麻钩藤汤可有效治疗高血压,可抑制动脉氧化应激水平,改善高血压血管重构。

关键词 高血压;自发性;天麻钩藤汤;氧化应激;血管重构;一氧化氮;内皮素-1;血管假性血友病因子;机制

Effects of Tianma Gouteng Decoction on Spontaneously Hypertensive Rats and Its Intervention on Oxidative Stress of Vascular Wall

Fan Hui, Han Yi, Ma Jun

(Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumchi 830000, China)

Abstract Objective: To observe the therapeutic effects of Tianma Gouteng Decoction on spontaneously hypertensive rats and its effects on the oxidative stress of vascular wall. **Methods:** A total of 100 SD rats were randomly divided into the sham operation group (10 rats), model group and traditional Chinese medicine (TCM) group (90 rats). The rats in the model group and TCM group were fed with high salt diet to induce hypertensive model. Finally, 30 successful SD rats were included in the study, that is, model group, high dose group and low dose group with 10 rats in each group. Rats of TCM group were given Tianma Gouteng Decoction (1.32 Kg/mL) and Tianma Gouteng Decoction (0.33 Kg/mL) once a day for 10 days. The changes of blood pressure, pathological changes of thoracic aorta, levels of nitric oxide (NO), endothelin-1 (ET-1) and von Willebrand factor (vWF) in peripheral blood of rats in each group were compared after treatment. The level of cell oxidative stress in thoracic aorta wall of each group was detected. **Results:** 1) After the intervention, the blood pressure level of rats in the TCM group was lower than that of the model group. The systolic blood pressure of rats in the Tianma Gouteng Decoction group decreased significantly with the increase of the dosage. The difference was statistically significant ($P < 0.05$); 2) HE staining showed that: compared with the sham operation group the thoracic aorta of rats in the model group and the TCM group appeared different impaired physiology. The structure, thickness and intimal integrity of the TCM group were better than those of the model group. The degree of improvement in the high dose group was higher than that of the low dose group. 3) Compared with the model group, ET-1 and vWF in peripheral blood of rats in TCM group decreased, while NO concentration was up-regulated. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). With the increase of Tianma Gouteng Decoction dosage, the previous indexes of rats were improved more significantly. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). 4) Compared with the model group, the ROS of thoracic aorta of rats in the TCM group decreased significantly. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). The trend of ROS in the high-dose group was the most obvious ($P < 0.05$). The difference was statistically significant. **Conclusion:** Tianma Gouteng Decoction can effectively treat hyperten-

基金项目:国家自然科学基金项目(81460549);新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2015200C152)

作者简介:范辉(1980.11—),男,硕士,主治医师,研究方向:心血管疾病的中西医结合治疗,E-mail:1826452924@qq.com

通者作者:马骏(1975.10—),男,硕士研究生,副主任医师,研究方向:中西医结合治疗心血管重症,E-mail:1826452924@qq.com

sion, inhibit arterial oxidative stress as well as improve vascular remodeling of hypertension.

Key Words Hypertension; Spontaneous; Tianma Gouteng Decoction; Oxidative stress; Vascular remodeling; NO; ET-1; VWF; Mechanism

中图分类号: R289.4; R544 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.03.015

高血压是心内科常见的临床疾病,对心、脑、肾等重要脏器均可造成严重的损害。长期高血压机体可产生血管重塑,导致肾小动脉痉挛、硬化,诱发机体全身系统功能受损^[1-2]。血管壁的氧化应激是血管受损的核心原因。高血压的发生发展与氧化应激关系密切,随着自由基的堆积,机体内活性氧类(Reactive Oxygen Species, ROS)水平升高,并广泛参与细胞和组织的损伤过程,进一步恶化病情,故如果干预手段可通过抑制血管氧化应激,恢复血管功能,可能成为治疗自发性高血压的新靶向^[3-5]。自发性高血压属于中医学“眩晕”“风眩”及“头风”等范畴,有气血不足、肝阳上亢、痰浊中阻、肾精亏虚4种证型,肝阳上亢是其主要证型。天麻钩藤汤出自《小儿卫生总微论方》卷五。具有息风止痉,解表祛风,益气平喘,开窍醒神之功效,随着中药汤剂现代应用的不断深入,大量资料证实,天麻钩藤汤可有效治疗高血压,但其作用机制目前尚不明^[6-8]。本研究利用高血压模型大鼠模拟高血压临床病理,以天麻钩藤汤治疗为干预手段,探讨其部分作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选取SD大鼠100只,体质量200~230 g,平均体质量(209±3.8)g,均购自上海斯莱克实验动物有限公司(动物合格证号:SCXK(沪)2007-0005)。

1.1.2 药物 天麻钩藤汤由本院中药研究院提供,中药组成如下:钩藤12 g、天麻9 g、石决明(先煎)30 g、桑叶12 g、生地黄15 g、石菖蒲12 g、茯苓12 g。利用水蒸气回流法蒸煮后在减压过滤后将水分蒸干,真空状态下将药剂干燥至粉末,密封包装后置于4℃冰箱备用。

1.1.3 试剂与仪器 免疫组化染色试剂盒(迈新生物有限公司,批号:3829382)、无创鼠尾血压计(奥尔科特有限公司)、NO Elisa试剂盒(江苏江莱生物技术有限公司,货号:22839)、ET-1 Elisa试剂盒(江苏江莱生物技术有限公司,货号:28374)、vWF Elisa试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号:E-EL-R1079c)、全自动石蜡切片机(徕卡有限公

司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 选取40只大鼠随机分为假手术组、模型组及中药组,各15只,假手术组鼠龄(6±0.5)月,体质量(260±9.8)g;模型组鼠龄(6±0.4)个月,体质量(255±10.5)g;中药组鼠龄(6±0.8)个月,体质量(258±9.5)g;3组大鼠在鼠龄、体质量差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

模型组及中药组大鼠接受高盐饲料喂养,以8%高盐饲料连续喂养8周诱导高血压模型,假手术组大鼠接受普通饲料喂养,从喂养第8周起,每周对大鼠的血压进行测量3次,喂养20周,将每次测量收缩压 ≥ 130 mmHg大鼠视为造模成功^[9]。本研究最终纳入40只大鼠,具体是假手术组,模型组,高剂量组,低剂量组,各10只。

1.2.2 干预方法 造模后干预组大鼠接受天麻钩藤汤灌胃,按《药理实验方法学》的标准动物的等效剂量换算成1.32 kg/g及0.33 kg/g,1次/d,连续干预10 d,假手术组及模型组大鼠接受1 mL生理盐水灌胃,4组均连续灌胃4周。

1.2.3 检测指标与方法 4组血压测定:将大鼠固定于操作台上,静置5 min后安装鼠尾无创血压计,并将固定操作台及鼠尾进行预热,再次将大鼠稳定3 min,启动血压测量软件进行血压测定,每只大鼠均接受5个循环的预测定,数值稳定后进行10个循环的正式测定,每循环30 s,登记大鼠的收缩压及舒张压,计算平均值。

HE染色观察胸主动脉病理变化:从4组中随机选取3只大鼠,取出胸主动脉,将所获组织置于10%多聚甲醛固定24 h,随后取出组织进行脱水,步骤如下:二甲苯(I)15 min-二甲苯(II)15 min-无水乙醇12 min-无水乙醇5 min-80%乙醇8 min-蒸馏水5 min,随后将组织进行石蜡包埋,切片后中性树胶封固,苏木精液染色5 min,清水冲洗3 min,显微镜下观察并进行图像采集。

血管壁应激水平测定:从4组中随机选取3只大鼠,取出胸主动脉,将所获组织置于10%多聚甲醛固定24 h,随后取出组织进行脱水,通过二甲苯(I)15 min-二甲苯(II)15 min-无水乙醇12 min-无

水乙醇 5 min-80% 乙醇 8 min-蒸馏水 5 min, 随后将组织石蜡包埋、切片, 再经二甲苯、乙醇脱蜡、脱二甲苯, 随后用事先配制好的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 3 次, 15 s/次, 经微波修复后加入二氢乙啶溶液, 室温下避光孵育 30 min, 在荧光显微镜下观察, 用绿光激发后 ROS 阳性细胞表现为红色, 摄取图片。

1.3 统计学方法 利用 Excel 表格对本研究数据进行登记, 使用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 对数据进行正态分布检测, 符合正态分布用 *t* 检验, 不符合正态分布用秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组血压变化比较 干预结束后中药组大鼠的血压水平均低于模型组, 其中随着天麻钩藤汤剂量升高大鼠收缩压降低越明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 HE 染色结果 与假手术组大鼠比较, 模型组及中药组大鼠胸主动脉均出现不同程度的病理受损征象, 模型组大鼠主动脉弓血管壁结构受损严重, 血管壁通透性明显增高, 有大量的炎性细胞浸润, 以中性粒细胞为主, 血管平滑肌细胞排列紊乱, 纤维结构断层, 增生、肥大, 血管壁明显增厚。中药组大鼠胸

主动脉结构、厚度、内膜完整性均明显改善, 血管壁通透性降低, 中性粒细胞浸润减轻, 血管平滑肌增生及肥大现象较模型组改善, 其改善程度高剂量组大于低剂量组。见图 1。

2.3 4 组 ET-1、vWF 及 NO 比较 与模型组比较, 中药组大鼠外周血 ET-1 及 vWF 均有所下降, NO 水平有所上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中随着天麻钩藤汤剂量升高大鼠上述指标改善越明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 4 组血管壁氧化应激比较 利用荧光探针对各组大鼠胸主动脉 ROS 表达进行检测, 假手术组大鼠胸主动脉只有少量阳性细胞表达, 模型组可见大量细胞核染红的阳性细胞, 低剂量组及高剂量组阳性细胞较模型组减少, 其中高剂量组减少的趋势更明显。见图 2。

表 1 4 组大鼠血压水平比较 ($\bar{x} \pm s$, mmHg)

组别	收缩压	舒张压
假手术组 ($n = 10$)	103.18 ± 17.21	69.24 ± 4.28
模型组 ($n = 10$)	240.24 ± 14.81*	102.42 ± 11.73*
高剂量组 ($n = 10$)	145.23 ± 8.48* ^{△▲}	83.29 ± 9.29* ^{△▲}
低剂量组 ($n = 10$)	201.24 ± 9.27* [△]	91.28 ± 10.27* [△]

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$; 与低剂量组比较, [▲] $P < 0.05$

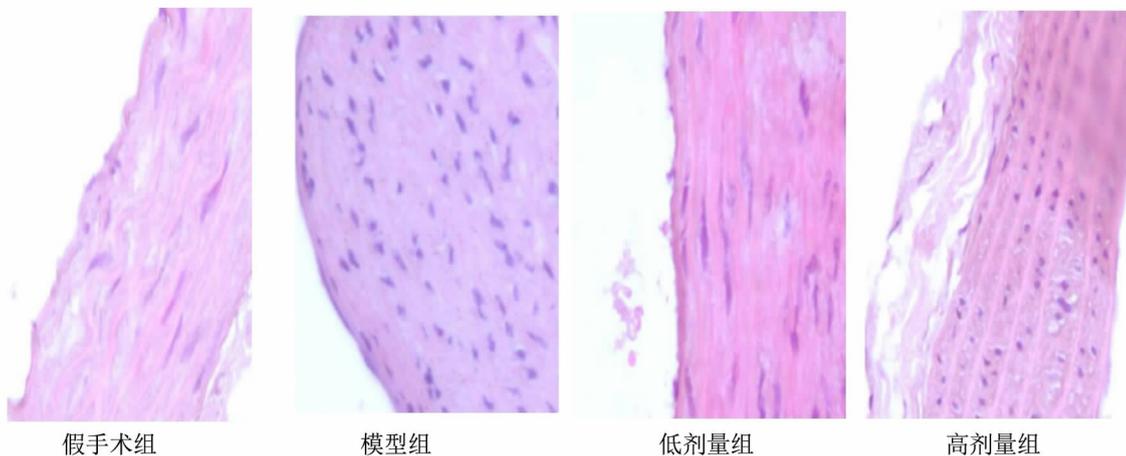


图 1 4 组大鼠主动脉形态变化结果 (HE 染色, ×400)

表 2 4 组大鼠 ET-1、vWF 及 NO 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ET-1 (pg/mL)	vWF (pg/mL)	NO (μmol/L)
假手术组 ($n = 10$)	103.18 ± 17.21	51.24 ± 3.82	32.38 ± 9.28
模型组 ($n = 10$)	1350.24 ± 46.84*	923.32 ± 22.43*	11.28 ± 4.29*
高剂量组 ($n = 10$)	384.23 ± 18.42* ^{△▲}	123.23 ± 8.42* ^{△▲}	29.38 ± 8.66* ^{△▲}
低剂量组 ($n = 10$)	6871.24 ± 29.23* [△]	325.28 ± 12.23* [△]	20.38 ± 5.63* [△]

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$; 与低剂量组比较, [▲] $P < 0.05$

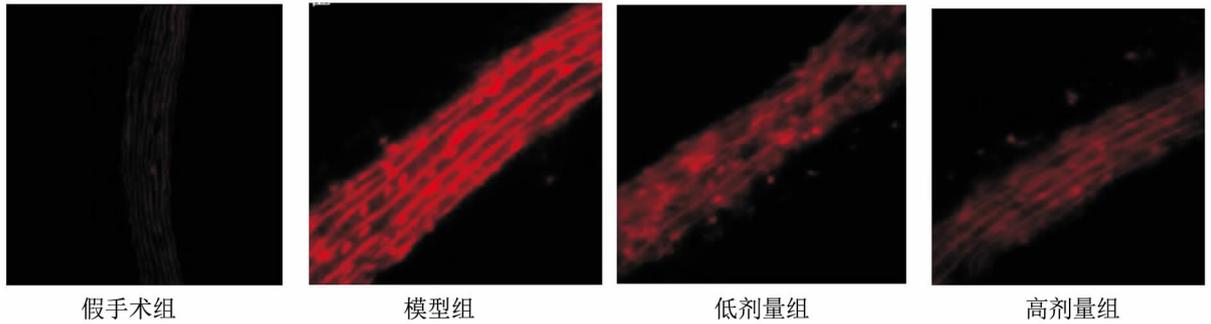


图2 4组大鼠血管壁氧化应激(免疫荧光染色, $\times 1\ 000$)

3 讨论

机体长期处于高血压状态可引起血管壁结构破坏/功能紊乱,是心血管事件核心危险因素。血管结构及功能受损后极易引起血管炎性反应,同时伴随着高凝状态、氧化/抗氧化系统平衡障碍,由此进一步引发心血管事件发生率。近年来,中医药在调节血压方面的作用日益受重视,且相关研究亦日益升温。首先中药可协助西药发挥调节血压的作用,减少西药用量,从而减轻西药引起的不良反应。此外中药可对临床高血压患者进行“调理”,遏制其高血压进展,促使血压维持于正常范围内,延缓甚至避免西药的过早介入。天麻钩藤汤源自《中医内科杂病证治新义》,有平肝熄风、清热活血、补益肝肾之功效,主治肝阳上亢、肝风内扰之证。肝阳偏亢,风阳上扰,故患者出现头痛、眩晕之证候,肝阳有余,化热扰心,肝阳上亢型高血压多本虚标实,以标实为主,治疗应以平肝熄风为主,佐以清热安神、补益肝肾之品。方中天麻、钩藤有平肝熄风之功,共为君药。石决明咸寒质重,既可平肝潜阳,又可清热明目,与天麻、钩藤合用,加强平肝熄风之力,牛膝引血下行,并能活血利水,共为臣药。杜仲、寄生补益肝肾以治本;栀子、黄芩清肝降火,以折其亢阳;益母草合川牛膝活血利水,有利于平降肝阳;夜交藤、茯神宁心安神,共为佐药。诸药合用,共奏平肝熄风、清热活血、补益肝肾之功^[10-12]。在本研究发现加用天麻钩藤汤干预后可明显降低高血压模型大鼠的血压,且具有一定的剂量依赖性。

本研究利用 HE 染色法观察血管内膜的形态及整体结构,接受高血压造模的大鼠血管内皮均出现不同程度的损伤,这说明高血压确对血管内皮有破坏效应,而天麻钩藤汤可明显逆转其病理程度,对血管内皮有一定的保护效应。NO 与 ET-1 均属于血管活性因子,二者具有相互拮抗效应,高血压发生时 NO 与 ET-1 的稳态受破坏,主要表现为 NO 合成释

放减少而 ET-1 水平上调,这与本研究结果一致,我们发现模型组大鼠外周血 NO 水平降低,而 ET-1 有明显上调趋势。有提示 NO 与 ET-1 的平衡可作为高血压相关内皮依赖性舒张功能障碍的检测指标,其在血管内皮损伤方面具有直接的观测意义^[13-16]。在本研究发现,经过天麻钩藤汤干预后大鼠外周血 NO 水平上升,ET-1 水平下降,这说明天麻钩藤汤可能抑制了 NO 合成途径,通过恢复 NO 与 ET-1 稳态而保护高血压机体的血管内皮。血液循环内皮细胞计数亦是判定血管内皮情况的重要指标,vWF 由内皮细胞合成、释放、储存,广泛参与机体的凝血调节。正常机体内 vWF 含量极少,当血管内皮受损后大量的 vWF 释放入血,促使血小板黏聚力增加,血浆中的凝血酶原被激活,诱发血栓形成风险,进一步破坏内皮^[17-18]。本研究发现,经过天麻钩藤汤干预后大鼠外周血 vWF 水平下降,这说明天麻钩藤汤可以通过下调 vWF 表达而修复受损内皮。

本研究通过荧光探针发现接受高血压模型制备的大鼠主动脉氧化应激水平增加,高血压发生时机体组织或细胞内氧自由基增加,机体对其清除能力减弱,ROS 在机体内蓄积,随着 ROS 水平上调其对血管的氧化损伤日趋严重^[19-22]。机体多种 ROS 参与血管损伤过程,病理状况下大量的 ROS 可影响血管内皮结构及功能,导致血管顺应性降低,最终诱发或恶化高血压。与此同时,机体长期处于氧化应激状态则极易诱发动脉粥样硬化的发生发展,直接导致血管重构,故检测血管壁的氧化应激水平可直接观察血管功能。

综上所述,天麻钩藤汤可有效治疗高血压,可抑制动脉氧化应激水平,改善高血压血管重构,但中药具有多作用靶点的效应,故此仅有部分机制,下阶段将研究天麻钩藤汤的作用机制。

参考文献

[1] 陈宇峰,战莹,武晓丹,等. 基于 iTRAQ 和质谱技术的合生元对自

- 发性高血压大鼠降压机制蛋白质组学分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(10): 39-45.
- [2] 王佩佩, 赵慧辉, 弓铭, 等. 五味降压散对自发性高血压大鼠降压、利尿作用实验探究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(10): 29-31.
- [3] 王莉, 朱玲勤, 薛姝婧, 等. 慢性心理应激对自发性高血压大鼠主动脉血管一氧化氮合酶表达水平的影响[J]. 临床医学工程, 2018, 25(5): 578-579.
- [4] 施伟丽. 葛根素对自发性高血压大鼠血压的干预作用及机制研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2017.
- [5] 李虹, 王蕾, 肖传实, 等. 不同周龄自发性高血压大鼠血管内皮功能及氧化应激的变化研究[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(1): 179-182.
- [6] 郭修芹. 天麻钩藤汤加减治疗肝阳上亢型高血压的临床分析[J]. 中西医结合心血管病杂志(连续型电子期刊), 2018, 6(16): 150-151.
- [7] 孔志明. 天麻钩藤汤加减治疗肝阳上亢型高血压的临床应用效果研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(44): 139.
- [8] 张素梅. 肝阳上亢型高血压给予天麻钩藤汤加减治疗的效果分析[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(37): 141 + 146.
- [9] 陈景彦, 陈炳宏, 张树峰, 等. 泽泻汤加味方对高盐高血压大鼠24h液体出入量及尿电解质的影响[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(10): 2374-2375.
- [10] 蔡辉. 天麻钩藤饮治疗肝阳上亢型原发性高血压病48例[J]. 中国处方药, 2018, 16(6): 93-94.
- [11] 付晓乐. 天麻钩藤饮联合硝苯地平治疗高血压(肝阳上亢)随机平行对照研究[J]. 实用中医内科杂志, 2018, 32(5): 40-42.
- [12] 王阶, 熊兴江, 刘巍. 补肾法治疗高血压病[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(9): 1277.
- [13] 刘宏民, 范洪亮. 四物汤加味方联合苯磺酸氨氯地平治疗原发性高血压对血压、心率及ET-1、NO水平的影响[J]. 实用中医药杂志, 2018, 34(8): 958-959.
- [14] 刘思洋, 吴建龙, 乔建勇, 等. 高血压脑出血患者血清TNF- α 、VEGF、ET-1水平的变化及意义[J]. 承德医学院学报, 2018, 35(4): 296-298.
- [15] 张宇霞, 杨雨民, 周芸慧, 等. 半夏白术天麻汤对痰湿壅盛型高血压大鼠血清ET-1及NO含量的影响[J]. 内蒙古中医药, 2018, 37(6): 99-101.
- [16] 赵倩, 高岚. 银杏达莫注射液联合盐酸拉贝洛尔对妊娠期高血压疾病孕妇血清FIB、ET-1、NO水平变化及母婴结局的影响[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(8): 1701-1703.
- [17] 沈妍, 李欣. 持续正压通气治疗对OSAHS合并高血压患者PDGF-BB与vWF水平的影响及其临床意义[J]. 临床肺科杂志, 2018, 23(10): 1845-1849, 1853.
- [18] 徐俊, 胡承志, 丁斌, 等. 高血压颈动脉粥样硬化患者血清25(OH)D及vWF水平变化及其关系[J]. 安徽医学, 2018, 39(7): 813-815.
- [19] Jahandideh F, Majumder K, Chakrabarti S, et al. Beneficial effects of simulated gastro-intestinal digests of fried egg and its fractions on blood pressure, plasma lipids and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e115006.
- [20] Schulz E, Gori T, Münzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension[J]. Hypertens Res, 2011, 34(6): 665-673.
- [21] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301(6): H2181-H2190.
- [22] Bahrehmand F, Vaisi-Raygani A, Kiani A, et al. Matrix metalloproteinase 9 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: correlation with systemic inflammatory markers and oxidative stress[J]. Lupus, 2015, 24(6): 597-605.

(2018-10-29 收稿 责任编辑: 杨觉雄)

全面推进中医药全球化, 为构建人类健康命运共同体而努力奋斗 ——世界中联2019年分支机构会长级会议召开

2月23日, 世界中医药学会联合会2019年分支机构会长级会议在京召开。会议主题是: 深入学习领会习近平总书记关于发展中医药的指示精神, 分析当前国际中医药发展形势, 回顾总结2018年工作, 部署2019年工作任务, 全面推进中医药全球化, 为构建人类健康命运共同体做出更大贡献。

世界中医药学会联合会主席马建中出席会议并讲话, 他分析了中医药发展面临的机遇形势, 充分肯定了世界中医药学会联合会2018年的工作成绩, 并对2019年工作重点提出了明确要求。国家中医药管理局国际合作司司长王笑频出

席会议开幕式并指出, 世界中联要进一步发挥国际组织的优势, 助力服务“一带一路”发展, 通过增进世界各国和地区中医药团体之间的交流与合作, 促进中医药国际传播与发展。世界中医药学会联合会副主席兼秘书长桑滨生代表秘书处向大会做了主题为“全面推进中医药全球化, 为构建人类健康命运共同体而努力奋斗”的工作报告, 提出了2019年的重点工作, 要求分支机构坚持学术引领, 办好系列学术会议, 勇于开拓创新, 带动各项工作迈上新台阶; 强化规范管理, 打造一支适应国际发展的工作团队。