

养阴活血合剂对自发性高血压大鼠的肾保护作用及其相关机制研究

周 婷 屈长宏 蒋红心 廖建春 茆俊卿 刘晓静 黄 萍

(扬州市中医院,江苏扬州 225002)

摘 要 目的:观察中药养阴活血合剂对自发性高血压大鼠(SHR)肾损害的保护作用及其可能机制。方法:将 20 只 12 周龄的雄性 SHR 大鼠随机分为 SHR 组、中药组、安博维组和联合组,每组 5 只,同时设 5 只同龄 Wistar-Kyoto(WKY)大鼠作为正常对照组。中药组和安博维组分别予养阴活血合剂(等效剂量为每日 15g/kg)和安博维(等效剂量为每日 30mg/kg)灌胃,每日 1 次;联合组则给予养阴活血合剂加安博维灌胃,每日 1 次;SHR 组和正常对照组均给予等量的蒸馏水每日 1 次灌胃。共治疗及喂养 8 周,监测尾动脉血压。在实验开始给药前及实验结束后留取小便标本及血标本,检测尿 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)和尿微量白蛋白(mALB)及血尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)。采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测肾组织转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)mRNA 和内皮素 1(ET-1)mRNA 的表达。结果:实验前 SHR 各组血压均显著高于 WKY 组;实验后与实验前相比,中药组、安博维组和联合组大鼠血压均明显下降。实验后 SHR 组大鼠尿 mALB、 β_2 -MG 较实验前明显升高,中药组、安博维组则明显下降,联合组下降更明显。实验后中药组、安博维组及联合组大鼠尿 mALB、 β_2 -MG 均明显低于 SHR 组。与 SHR 组相比,中药组、安博维组、联合组肾组织 TGF- β_1 和 ET-1 mRNA 的表达均显著下降。结论:养阴活血合剂可降低 SHR 大鼠血压,降低尿微量蛋白,其肾保护作用机制可能与其下调肾组织 TGF- β_1 mRNA 和 ET-1mRNA 表达的功能有关。

关键词 养阴活血合剂 自发性高血压 转化生长因子 β_1 内皮素-1 实验研究

中图分类号 R544.105 **文献标识码** A **文章编号** 1672-397X(2014)11-0077-03

近年来,随着高血压的发病率逐渐增高,对于高血压引起的肾损害越来越受到人们的重视。现已发现高血压早期肾脏就已出现了异常改变,因此对于高血压引起的肾损害的早期诊断和早期治疗就显得颇为重要。我们前期研究发现,养阴活血合剂对高血压早期肾损害患者具有显著的疗效,本实验进一步研究养阴活血合剂对自发性高血压大鼠早期肾损害的保护作用及其相关机制。

1 实验材料

1.1 实验动物 自发性高血压大鼠 (SHR)20 只,Wistar-Kyoto (WKY) 大鼠 5 只,SPF 级,雄性,12 周龄,平均体重(280±20)g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 药物 养阴活血合剂由熟地黄 15g、山茱萸 15g、何首乌 15g、枸杞子 15g、丹参 15g、川芎 10g、水蛭 10g、川牛膝 10g、泽兰 10g、天麻 10g、钩藤 10g、丹皮 10g 组成,由扬州市中医院制剂室煎制,煎制成浓度 1.5g/mL 的药液。安博维(厄贝沙坦),150mg/片,杭州赛诺菲安万民生制药有限公司生产。

1.3 试剂与仪器 Trizilo 试剂、逆转录试剂盒(美国 Fermentas 公司);PCR 试剂和 TaqDNA 聚合酶(美国 Fermentas 公司);琼脂糖凝胶(英国 OSOID 公司);DNA Marker(美国 Fermentas 公司);10mg/mL 溴化乙锭(美国 Sigma 公司);美国 ABI17900 实时定量 PCR 仪;DSWY-1 大

鼠尾动脉血压测量装置(上海欣曼科教设备有限公司);RM6240 生物信号采集系统(成都仪器厂);全自动生化分析仪(西班牙 DIAGNOSTIC);低速离心机(日立 7060 型,日本日立公司);超低温冰箱(SANYOMDF-U71V 型,日本)。

2 实验方法

2.1 分组与给药 25 只大鼠予普通饲料适应性喂养 1 周,将 20 只 SHR 大鼠随机分为 SHR 组、中药组、安博维组和联合组,每组 5 只,另取 5 只同龄 WKY 大鼠作为正常对照组。中药组予以养阴活血合剂灌胃,每日 1 次,根据大鼠与人的体表面积比例,按人每公斤体重的临床日用量折算大鼠的等效剂量,大鼠中药等效剂量为 15g/(kg·d)。安博维组给予安博维灌胃,每日 1 次,安博维的等效剂量为 30mg/(kg·d)。联合组则给予养阴活血合剂加安博维灌胃,每日 1 次。正常对照组和 SHR 组均给予等量蒸馏水每日 1 次灌胃。各组均治疗并喂养 8 周。

2.2 血压测量 测量大鼠尾动脉血压,实验前测 1 次,实验后第 1、2 周各测血压 1 次,以后每隔 2 周测血压并记录,直至实验结束。每记录 1 次测血压 3 次,取均值。

2.3 生化指标检测 在实验开始给药前及实验结束前 1 天清晨留取小便标本,采用放射免疫法检测尿 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)和尿微量白蛋白(mALB)含量。在实验前及实验结束时留取血标本 1mL,用以检测血尿素氮(BUN)和肌酐(Scr)。

基金项目:江苏省中医药局科技项目(LZ11168)

2.4 检测大鼠肾组织转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)mRNA 和内皮素 1 (ET-1)mRNA 的表达 采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 技术进行检测。断头处死大鼠后, 迅速取肾脏, Trizol 试剂提取总 RNA, 然后进行逆转录和 PCR 反应。内参引物 (Gapdh) 上游引物: ACTTTGGCATCGTGAAGGG, 下游引物: ACTTGGCAGTTTCTCCAGG; TGF- β_1 上游引物: AGGGCTACCATGCCAACTTC, 下游引物: CCACGTAGTAGACGATGGGC; ET-1 上游引物: ATCAGAGCAACCAGACA CCG, 下游引物: TGCACTTCTTCTCAGCTCG。PCR 反应体系 25 μ L, 含 2 μ L DNA 模板, 上游引物及下游引物 (10 μ mol/ μ L) 各 1 μ L, 12.5 μ L SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II, 8.5 μ L 灭菌蒸馏水。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30s; 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 40 个循环。每个循环延伸结束检测荧光信号。随后是一个缓慢升温的程序, 同时连续检测 DNA 产物的溶解曲线, 以了解样品扩增的特异性, 保障测定结果的准确可靠。然后用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法进行分析, 相对表达量 = 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}。

2.5 统计学方法 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 正态分布计量数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验, $P<0.05$ 示差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠实验前后尾动脉血压比较 实验前 SHR 大鼠各组血压差异无统计学意义, 但均显著高于正常对照组。实验后与实验前相比, 中药组大鼠血压显著下降 ($P<0.05$), 安博维组和联合组下降更显著 ($P<0.001$), 提示中药养阴活血剂有一定的降压作用。见表 1。

3.2 各组大鼠实验前后肾功能比较 实验前后各组大鼠 BUN、Scr 含量比较均无明显差异 ($P>0.05$)。实验后 SHR 组 mALB、 β_2 -MG 较实验前明显升高 ($P<0.01$), 中药组、安博维组则明显下降 ($P<0.05$), 联合组下降更明显 ($P<0.01$); 实验后中药组、安博维组及联合组尿 mALB、 β_2 -MG 明显低于 SHR 组 ($P<0.01$)。见表 2。

3.3 各组大鼠实验后肾组织 TGF- β_1 和 ET-1 mRNA 表达比较 与 SHR 组相比, 中药组、安博维组、联合组大鼠肾组织 TGF- β_1 和 ET-1 mRNA 的表达均显著下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 3。

4 讨论

高血压病肾脏损害的病理表现主要为肾小动脉硬化, 入球小动脉、小叶间动脉玻璃样变性和间质纤维化, 其中肾间质纤维化是高血压病肾脏损害的重要病理基础。转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 在肾间质纤维化过程中起到重要的作用。TGF- β_1 可促进 ECM 蛋白的生成和沉积, 降低蛋白酶的生成而减少基质降解^[4], 可促进肾小球系膜细胞和肾小管上皮细胞肥大; 使肾小管上皮细胞发生表型转化, 成为肌成纤维细胞; 促进细胞凋亡, 导致肾小管萎缩、肾功能损害^[5]。王甜等^[6]研究发现, SHR 大鼠肾脏组织 TGF- β 的表达随周龄和血压的增加而升高, 与 β_2 -MG 的变化趋势一致, 可以作为早期肾损害的诊断指标。

ET-1 是参与了高血压肾损害的另外一种重要的因子, 是血管强力收缩剂, 可显著减少肾脏血流量 (RBF) 和肾小球滤过率 (GFR)。ET-1 还可促使肾脏血管平滑肌细胞的增生, 肾小球系膜细胞生长, 促进肾小球硬化的形成与发展, 加重高血压时肾功能损害的程度。有研究发现, 16 个月龄的自发性高血压大鼠存在明显的肾损害, 血浆和肾组织中的 ET 含量也明显升高, 提示 ET 可能参与了 SHR 的肾损害^[4]。

高血压早期肾损害阶段, 肾脏没有明显的结构和功能改变, 缺少相关的临床症状和体征, 尿素氮和肌酐在早期不能反映肾小球的滤过功能, 用常规的检测方法难以较早判断肾脏损害情况。而尿 mALB 在肾小球轻度受损时即明显升高, 标志着肾小球滤过膜电荷选择性屏障损伤, 是肾小球早期损害的敏感指标。 β_2 -MG 是体内所有有核细胞的固有成分, 几乎全部由肾小球滤过, 99% 被肾小管重吸收, 是判断肾小管、肾间质损害的敏感指标。尿 mALB 和 β_2 -MG 联合检测可以早期发现肾脏损害。本实验证实, SHR 大鼠在 13 周时即有尿 mALB、和 β_2 -MG 的显著升高, 且随着周龄的增加而升高 ($P<0.01$)。

中医认为高血压早期肾损害病位主要在肝肾两脏, 以肝肾阴虚、肝阳上亢为主要病理基础, 瘀血为主要病理因素。《内经·素问》云: “肾者主水, 受五脏六腑之精而藏之”, “肾者, 主蛰, 封藏之本, 精之处也”。肾虚, 封藏失司, 不能固涩精微, 致精微外泄; 肝肾阴虚, 脉道失濡, 血行不畅, 肾络瘀阻, 且“久病必瘀”, 瘀阻肾络, 清浊不分, 精微壅而外溢, 皆可出现尿 mALB、 β_2 -MG 升高等高血压早期肾损害的表现。据此

表 1 各组大鼠实验前后尾动脉血压比较 ($\bar{x}\pm s$) mmHg

组别	动物数 (只)	0 周	8 周
正常对照组	5	108.6 \pm 8.050	110.6 \pm 7.335
SHR 组	5	177.2 \pm 11.17	171.2 \pm 2.588
中药组	5	177.0 \pm 8.436	154.4 \pm 6.044 ^{△△}
安博维组	5	177.5 \pm 9.678	118.0 \pm 11.76 ^{△△△△▲▲▲}
联合组	5	174.8 \pm 8.402	106.0 \pm 6.356 ^{△△△△▲▲▲}

注: 与本组 0 周时比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta\Delta P<0.001$; 与同时期 SHR 组比较, $\blacktriangle P<0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P<0.001$ 。

表 2 各组大鼠实验前后尿微量白蛋白、 β_2 微球蛋白、尿素氮及肌酐比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (只)	BUN (mmol/L)		Scr (μ mol/L)		mALB (mg/L)		β_2 -MG (μ g/L)	
		实验前	实验后	实验前	实验后	实验前	实验后	实验前	实验后
正常对照组	5	6.2 \pm 1.5	6.5 \pm 2.8	52.6 \pm 8.1	58.5 \pm 9.4	12.4 \pm 3.2	15.1 \pm 2.6	5.9 \pm 2.4	6.3 \pm 3.1
SHR 组	5	6.8 \pm 3.0	8.5 \pm 2.4	53.5 \pm 5.4	67.2 \pm 2.1	38.7 \pm 5.2	68.2 \pm 7.1 ^{**}	54.8 \pm 7.3	86.4 \pm 5.9 ^{**}
中药组	5	6.4 \pm 1.7	7.6 \pm 3.1	55.8 \pm 3.6	59.0 \pm 7.5	36.9 \pm 4.6	28.5 \pm 5.7 ^{***}	56.1 \pm 6.2	43.2 \pm 9.3 ^{***}
安博维组	5	7.2 \pm 1.1	7.0 \pm 2.5	60.3 \pm 5.7	62.5 \pm 5.3	40.1 \pm 3.5	27.3 \pm 8.0 ^{***}	52.7 \pm 5.8	39.5 \pm 8.7 ^{***}
联合组	5	6.7 \pm 2.6	7.4 \pm 1.6	58.9 \pm 7.2	63.8 \pm 6.1	39.5 \pm 4.3	15.4 \pm 5.6 ^{***}	56.8 \pm 8.1	29.3 \pm 6.4 ^{***}

注: 与本组实验前比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与同时期 SHR 组比较, ### $P<0.01$ 。

表 3 各组 TGF- β_1 和 ET-1 mRNA 表达的变化 (2^{- $\Delta\Delta$ C_t})

组别	动物数 (只)	TGF- β_1	ET-1
正常对照组	5	1.00	1.00
SHR 组	5	26.59 \pm 23.11	21.08 \pm 5.906
中药组	5	3.249 \pm 2.416 ^{###}	2.224 \pm 0.7006 ^{###}
安博维组	5	6.688 \pm 3.40 [*]	6.897 \pm 3.349 ^{###}
联合组	5	2.620 \pm 3.173 [#]	1.581 \pm 1.223 ^{###}

注: 与 SHR 组比较, # $P<0.05$, ### $P<0.01$ 。

推拿手法防治失神经骨骼肌萎缩的实验研究

马书杰¹ 严隽陶¹ 黄品贤²

(1.上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院、上海市中医药研究院推拿研究所,上海 200437;
2.上海中医药大学统计教研室,上海 201203)

摘要 目的:探讨推拿手法对延缓失神经骨骼肌萎缩的作用及途径。方法:六月龄新西兰家兔 84 只,切断右下肢神经后随机分为失神经手法治疗组(手法组)42 只、失神经模型对照组(模型组)42 只。手法组给予按揉法治疗,模型组不予手法干预。分别在造模后第 1、2、3 周和第 1、2、4、6 个月时间点每组各取 6 只家兔检测腓肠肌肌湿重、收缩力及卫星细胞计数。结果:造模后 2 周起手法组家兔腓肠肌收缩力明显高于模型组;造模后 2 月起手法组家兔腓肠肌肌湿重明显高于模型组;腓肠肌失神经后 4 周内,手法组肌卫星细胞增殖趋势高于模型组,而 4 周以后,手法则不再起作用。结论:推拿手法在一定程度上可延缓失神经后骨骼肌萎缩,手法促进骨骼肌卫星细胞增殖与分化是手法减缓肌萎缩的可能途径之一。

关键词 骨骼肌萎缩 失神经 肌卫星细胞 推拿手法

中图分类号 R685.05 **文献标识码** A **文章编号** 1672-397X(2014)11-0079-03

骨骼肌损伤是临床常见的一大类疾患,在临床实际中,骨骼肌急性损伤往往同时伴有神经损伤,由于治疗手段应用不当或是治疗不及时彻底,常常导致肌肉萎缩和再损伤。研究骨骼肌急性损伤的修复方式以及促进修复的手段,已成为国际运动、医学界的研究热点,包括手法治疗的物理治疗是目前治疗骨骼肌损伤的有效手段。我们对手法在防治骨骼肌失神经萎缩中的作用及其机制进行了研究,现报告如下。

1 实验材料

1.1 实验动物 新西兰家兔,6 月龄,雄性,体重(2.21±0.15)kg,由上海海军研究院动物房提供。单笼,自由饮水,20℃恒温环境饲养。

1.2 主要试剂及仪器 3%戊巴比妥钠(上海西唐生物科技有限公司提供,批号:20110112);苏木精、伊红染色剂;YF-3 手法测试仪(由上海中医药大学和复旦大学共同研发);

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30973806);上海市中医药事业发展三年行动计划(海派中医流派传承工程)丁氏推拿项目(ZYSNXD-CC-HPGC-JD-011);严隽陶全国名老中医药专家传承工作室项目

理论,中医治疗立法以养阴活血为主,方中熟地黄、山茱萸、何首乌、枸杞子补肝肾,益精血,固涩精微;丹参、水蛭、川芎、丹皮、川牛膝活血化瘀通络,川牛膝引药下行,丹皮兼清肝热;天麻、钩藤平息肝阳;泽兰活血利水。全方共奏养阴活血、固摄精微之功效。前期研究发现,养阴活血合剂可显著降低高血压合并早期肾损害患者的尿 mALB、 β_2 -MG 和 24h 尿蛋白^[5-6]。本研究通过养阴活血合剂治疗自发性高血压大鼠的实验发现,养阴活血合剂能降低 SHR 大鼠的血压,显著降低尿 mALB 和尿 β_2 -MG,具有保护高血压肾脏损害的作用,安博维与养阴活血合剂合用则有协同作用。进一步研究发现,养阴活血合剂和安博维都可显著抑制 SHR 大鼠肾脏组织 TGF- β_1 和 ET-1 mRNA 的表达,两者合用则作用更明显,显示养阴活血合剂可通过抑制肾组织 TGF- β_1 和 ET-1 mRNA 的表达,进而抑制高血压引起的肾间质纤维化、肾小球硬化,从而起到肾保护的作用。

5 参考文献

[1] Schnaper H, Hayashida T, Hubchak SC, et al. TGF- β signaling transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol Renal*

Physiol, 2003, 283(2):243

[2] Li JH, Huang XR, Zhu HJ, et al. Role of TGF- β signaling in extracellular matrix production under high glucose conditions. *Kidney Int*, 2003, 63(6):2010

[3] 王甜,李静,时晔,等.转化生长因子 β 与结缔组织生长因子在自发性高血压大鼠肾脏的增龄性变化. *陕西医学杂志*, 2012, 41(8):952

[4] 王小丹,郑秋甫,谷庆阳,等.碱性成纤维细胞生长因子和内皮素在自发性高血压大鼠肾损害中的作用. *解放军医学杂志*, 2000, 25(4):270

[5] 周婷.中西药合用治疗高血压病早期肾损害疗效研究. *辽宁中医杂志*, 2008, 35(2):256

[6] 周婷,屈长宏.养阴活血方联合安博维治疗高血压病早期肾损害患者 30 例. *中医杂志*, 2009, 50(11):1009

第一作者:周婷(1963-),女,本科学历,主任中医师,主要从事肾脏疾病的中西医结合诊治研究。Yzzt11757@163.com

收稿日期:2014-05-26

编辑:吴宁