

牡蛎配伍葛根对自发性高血压(SHR)大鼠降血压作用机制研究

邵江娟¹ 李蒙蒙¹ 付金柏²

(1.南京中医药大学药学院,江苏南京 210023; 2.江苏省中医院,江苏南京 210029)

摘要 目的:探讨牡蛎配伍葛根降血压药理作用及机制。方法:自发性高血压(SHR)大鼠随机分为 SHR 模型组、卡托普利组(阳性药组)、牡蛎单方组、葛根单方组和牡蛎葛根配伍低、高剂量组,另取 Wistar 大鼠 8 只作为空白对照组。各组分别灌胃给予相应药物或生理盐水,连续灌胃 6 周。检测并比较各组大鼠血压、血液流变学指标及左心室肥厚指数,采用双波长荧光光谱法检测原代培养的主动脉血管平滑肌细胞(AVSMC)胞内钙离子含量,ELISA 法检测血浆中内皮素 1(ET-1)、肾素(Renin)、血管紧张素 II(Ang II)、醛固酮(ALD)等指标。结果:给药 4 周,阳性药组和牡蛎葛根配伍高剂量组大鼠血压明显低于 SHR 模型组($P<0.05$);给药 6 周,阳性药组和牡蛎葛根配伍低、高剂量组大鼠血压明显低于 SHR 模型组($P<0.05$)。与空白对照组比较,SHR 模型组大鼠血浆 ALD、Ang II、Renin、ET-1 均明显升高,经各组药物治疗 6 周后上述指标不同程度下降,其中以阳性药组和牡蛎葛根配伍低、高剂量组降低最为明显($P<0.05$)。SHR 模型组大鼠 AVSMC 内 Ca^{2+} 含量显著高于空白对照组,经卡托普利、牡蛎葛根配伍高剂量治疗后 Ca^{2+} 含量显著降低($P<0.05$)。与空白对照组比较,SHR 模型组全血黏度、红细胞压积等血液流变学指标明显升高,经卡托普利、牡蛎葛根配伍高剂量治疗后各指标明显降低($P<0.05$)。SHR 模型组左心室肥厚指数明显高于空白对照组,治疗 6 周后阳性药组和牡蛎葛根配伍低、高剂量组左心室肥厚指数明显降低($P<0.05$)。牡蛎单方组、葛根单方组上述指标与 SHR 模型组比较差异均无统计学意义。结论:牡蛎对葛根降血压具有协同增效作用,其机制与抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)、改善血管内皮功能、阻滞 AVSMC 胞内钙离子引发的多种信号转导途径等作用相关。

关键词 牡蛎 葛根 自发性高血压 血液流变学 左心室肥厚指数 大鼠 实验研究

中图分类号 R544.105 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2017)08-0075-04

牡蛎为牡蛎科动物长牡蛎(*Ostrea gigas* Thunberg)、大连湾牡蛎(*Ostrea talienwhanensis* Crosse)或近江牡蛎(*Ostrea rivularis* Gould)的贝壳,是历版《中国药典》收录的中医临床常用药。牡蛎壳含碳酸钙 90%以上,有机基质由不同大分子组成,主要为蛋白质和多糖,药理研究发现其有镇静、抑制自发活动及安眠作用^[1]。葛根为豆科植物野葛或甘葛藤的干燥根,具有解肌退热、生津、透疹、升阳止泻的功效。葛根的主要化学成分包括异黄酮类、葛根苷类、三萜皂苷类、生物碱及其他化合物等,其主要药理作用包括心血管系统药理作用、降糖降脂作用、抗氧化作用、抗肿瘤作用、免疫作用等^[2]。牡蛎临床常配伍葛根进行降血压治疗(见《施今墨对药》)。为了探究牡蛎-葛根对药抗高血压的药理作用,阐明牡蛎所起的配伍增效机制,本研究以自发性高血压(SHR)大鼠为模型,观察牡蛎、葛根以及两药配伍对血管平滑肌细胞内钙离子(Ca^{2+})含量、肾素-血管紧

张素-醛固酮系统(RAAS)、血管内皮功能等的影响,阐释中医方药的科学内涵。

1 实验材料

1.1 动物 SHR 大鼠(合格证编号:200700 0533455)48 只,SPF 级,雄性,12 周龄,上海斯莱克实验动物有限公司提供;Wistar 大鼠(合格证编号:2007000533463)8 只,清洁级,雄性,12 周龄,上海斯莱克实验动物有限公司提供。

1.2 药物与试剂 牡蛎(产地河北,批号 20070316),柴葛根(产地安徽,批号 111008);大鼠内皮素 1(ET-1)ELISA 检测试剂盒、大鼠肾素(Renin)ELISA 检测试剂盒、大鼠血管紧张素 II(Ang II)ELISA 检测试剂盒、大鼠醛固酮(ALD)ELISA 检测试剂盒均由南京建成生物有限公司提供;卡托普利片,常州制药厂有限公司;RPMI 1640 培养基、小牛血清、胰蛋白酶、牛血清白蛋白、噻唑蓝(MTT)等,均为 GIBCO 公司产品;Triton X-100、EGTA、DMSO、A-SM actin,

基金项目:江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

为 Sigma 公司产品;FURA-2/AM 为 CALBIOCHEM 公司产品。

1.3 仪器 血压测量仪,BP-98A 型,日本 Softron 公司;血液流变学测定仪,LBY-N6B 型,北京普利生有限公司;酶标仪,ELX800 型,Bio Tex Instrument INC;电热恒温振荡水箱,DKZ-2 型,上海精宏实验设备有限公司;双波长荧光分光光度计,F-4500 型,日本 HITACHI 公司。

2 实验方法

2.1 分组与给药 Wistar 大鼠 8 只作为空白对照组。48 只 SHR 大鼠随机分为 SHR 模型组、卡托普利组(阳性药组)、牡蛎单方组、葛根单方组和牡蛎葛根配伍低、高剂量组,每组 8 只。空白对照组、SHR 模型组灌胃生理盐水,卡托普利组灌胃 1mg/mL 卡托普利水溶液 10mg/(kg·d),牡蛎单方组灌胃牡蛎水煎剂(100g 牡蛎水煎浓缩到 166.5mL)6g/(kg·d),葛根组灌胃葛根水煎剂(50g 葛根水煎浓缩到 166.5mL)3g/(kg·d),牡蛎葛根配伍低剂量组灌胃牡蛎葛根水煎剂(50g 牡蛎与 25g 葛根水煎浓缩到 166.5mL)4.5g/(kg·d),牡蛎葛根配伍高剂量组灌胃牡蛎葛根水煎剂(150g 牡蛎与 75g 葛根水煎浓缩到 166.5mL)13.5g/(kg·d)。每周测量 1 次大鼠体重(BW),并且依据体重调整给药剂量。各组大鼠均连续灌胃 6 周。

2.2 指标检测

2.2.1 血压 每周采用动物无创测压仪测量 1 次大鼠的血压,时间均选在下午灌药后进行,比较各组大鼠治疗后血压变化情况。

2.2.2 血液流变学与左心室肥厚指数 各组大鼠灌胃 6 周后,称量体重,更换垫料并且禁食 12h,不禁水,处死大鼠,腹主动脉取血,3000r/min 离心 10min,以肝素为抗凝剂,收集血浆 5mL,测全血黏度(低切、高切)、血浆比黏度、血浆纤维蛋白原含量、红细胞压积、红细胞变形指数、聚集指数共计 7 项血液流变学指标。ELISA 试剂盒检测血浆中 ET-1、Renin、Ang II、ALD 含量。动物开胸取出心脏,沿室间隔肌止端去除右心房及右心室组织,保留左心室及室间隔,称取左心室的重量(LVW),以 LVW/BW 值作为评价左心室肥厚(LVH)程度的定量指标。

2.2.3 主动脉血管平滑肌细胞 (AVSMC)内 Ca^{2+} 含量 无菌操作下迅速取出各组大鼠胸主动脉,加入含 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养液(含 Hepes、 $NaHCO_3$ 、青霉素钠、链霉素),

在 37℃、5% CO_2 条件下,用组织贴块法进行 AVSMC 原代培养,5d 左右可见细胞从组织块周围呈梭形生长出来,2 周左右待细胞长成单层后进行传代培养。培养的 AVSMC 为梭形或纺锤形,呈典型的“峰和谷”样生长,电镜证实为血管平滑肌细胞。5—10 代培养的 AVSMC,用胰酶消化细胞并制成细胞密度为 1×10^9 的细胞悬液,以 Fura-2/AM 为荧光探针,用双波长荧光光谱法检测 AVSMC 内 Ca^{2+} 含量。发射波长为 510nm,激发波长为 340nm 和 380nm,光栅为 10nm,依次测定静息期荧光值、最大荧光值 R_{max} (按每管 50 μ L 加入 0.1%Triton X-100)和最小荧光强度值 R_{min} (加入 100mmol/L 浓度的 EGTA 100 μ L)。测定荧光强度 R ,Fura-2 与 Ca^{2+} 反应的解离常数 K_d 为 224nmol/L,用下式计算细胞内 Ca^{2+} 含量 $[Ca^{2+}]_i$,单位为 10^{-9} mol/L。

$$[Ca^{2+}]_i = \frac{K_d \times (R - R_{min})}{R_{max} - R}$$

3 实验结果

3.1 各组大鼠血压变化情况比较 见表 1。与空白对照组比较,SHR 模型组大鼠血压明显升高($P < 0.01$);与 SHR 模型组比较,各给药组给药前和给药 2 周时血压无统计学差异;给药 4 周时,与 SHR 模型组比较,卡托普利组和牡蛎葛根配伍高剂量组血压明显降低($P < 0.05$);给药 6 周时,与模型组比较,卡托普利组和牡蛎葛根配伍低、高剂量组血压明显降低($P < 0.05$)。给药各时期,牡蛎、葛根水煎剂对 SHR 大鼠血压无改善效果,牡蛎葛根配伍各剂量降压效果优于单方,且高剂量组效果更明显。

3.2 各组大鼠血浆 Renin、Ang II、ALD、ET-1 含量比较 见表 2。与空白对照组比较,SHR 模型组大鼠血浆 ALD、Ang II、Renin 和 ET-1 含量明显升高($P < 0.01$);与 SHR 模型组比较,卡托普利组和牡蛎葛根配伍高剂量组大鼠上述指标明显降低($P < 0.05$),牡蛎葛根配伍低剂量组 ALD、Ang II 含量明显降低($P < 0.05$)。

表 1 给药前后各组大鼠血压比较($\bar{x} \pm s$) mmHg

组别	动物数(只)	药物剂量	给药前	给药 2 周	给药 4 周	给药 6 周
空白对照组	8		119.75±21.52	128±24.71	125.38±24.35	130.62±30.16
SHR 模型组	8		163.67±16.60**	175.8±13.79**	179±23.06**	179.3±15.28**
卡托普利组	8	10mg/kg	169±16.02	170.8±8.04	162.2±32.32 Δ	154.5±7.92 Δ
牡蛎单方组	8	6g/kg	168.57±17.02	175.6±10.56	174.6±18.32	173.1±13.28
葛根单方组	8	3g/kg	166.5±18.91	175.3±14.60	169.25±20.31	164.6±19.83
牡蛎葛根配伍低剂量组	8	4.5g/kg	163.88±19.87	175.1±17.54	165.88±8.66	160.6±18.99 Δ
牡蛎葛根配伍高剂量组	8	13.5g/kg	161.25±20.87	174.5±26.62	160.2±19.46 Δ	155.5±19.15 Δ

注:**与空白对照组比较, $P < 0.01$; Δ 与 SHR 模型组比较, $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠血浆 Renin、Ang II、ALD、ET-1 含量比较($\bar{x}\pm s$) pg/mL

组别	动物数(只)	药物剂量	ALD	Ang II	Renin	ET-1
空白对照组	8		153.92±12.55	152.21±11.63	14.21±0.75	45.07±3.30
SHR 模型组	8		272.42±13.18**	260.97±12.08**	23.24±0.91*	85.68±3.37**
卡托普利组	8	10mg/kg	216.14±15.45 [△]	197.21±14.77 [△]	15.45±0.83 [△]	69.46±6.09 [△]
牡蛎单方组	8	6g/kg	260.13±13.77	250.35±18.98	20.56±0.98	80.57±5.98
葛根单方组	8	3g/kg	242.92±11.12	236.73±17.15	18.3±0.84	77.99±4.01
牡蛎葛根配伍低剂量组	8	4.5g/kg	232.4±14.10 [△]	223.29±8.15 [△]	17.49±1.06	77.23±4.02
牡蛎葛根配伍高剂量组	8	13.5g/kg	210.98±17.57 [△]	197.64±15.81 [△]	16.53±0.9 [△]	62.23±4.79 [△]

注:**与空白对照组比较, $P<0.01$;△与 SHR 模型组比较, $P<0.05$ 。

3.3 各组大鼠 AVSMC 内 Ca^{2+} 含量比较 见表 3。与空白对照组比较,SHR 模型组大鼠 AVSMC 内 Ca^{2+} 含量明显升高($P<0.05$)。与 SHR 模型组比较,各给药组大鼠 AVSMC 内 Ca^{2+} 含量均有不同程度的降低,尤以卡托普利组与牡蛎葛根配伍高剂量组更为明显($P<0.05$)。

表 3 各组大鼠 AVSMC 内 Ca^{2+} 含量比较($\bar{x}\pm s$) nmol/L

组别	样本数(孔)	Ca^{2+} 含量
空白对照组	4	183.29±10.75
SHR 模型组	4	259.15±20.33**
卡托普利组	4	209.67±10.45 [△]
牡蛎单方组	4	235.40±18.67
葛根单方组	4	240.76±29.86
牡蛎葛根配伍低剂量组	4	229.87±15.40
牡蛎葛根配伍高剂量组	4	214.45±10.53 [△]

注:**与空白对照组比较, $P<0.01$;△与 SHR 模型组比较, $P<0.05$ 。

3.4 各组大鼠血液流变学指标比较 见表 4。与空白对照组比较,SHR 模型组大鼠全血黏度、红细胞压积等血液流变学指标均明显升高($P<0.01$)。牡蛎、葛根水煎剂对 SHR 大鼠血液流变学指标基本无影响;卡托普利组、牡蛎葛根配伍高剂量组大鼠血液流变学指标均明显低于 SHR 模型组($P<0.05$)。

3.5 各组大鼠左心室肥厚指数比较 见表 5。与空白对照组比较,SHR 模型组大鼠左心室肥厚程度明显增高($P<0.01$),表明 SHR 模型组大鼠左心室出现了明显重构现象。与 SHR 模型组比较,卡托普利组、牡蛎葛根配伍低、高剂量组大鼠左心室肥厚指数明显降低($P<0.05$)。

4 讨论

高血压是一种以体循环动脉压升高为主要特点,可伴有心脏、肾脏、脑等器官的功能或器质性损

害的临床综合征。目前认为交感神经兴奋、肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)活性增加、血管活性物质释放、氧化应激、细胞因子和蛋白质的异常表达等相互作用可引起血管平滑肌细胞增殖、血管结构和内皮功能的变化从而发生高血压^[3]。高血压的发病与血管内皮功能障碍所引起的血液流变学异常

和微循环障碍密切相关^[4]。高血压患者由于主动脉压力增高,左心室负荷加重,心肌细胞代偿性增生,通常会产生左心室肥厚现象^[5]。目前西药防治高血压疗效确切,但副作用多,禁忌证多,部分药物联合使用受限,而中医药在调节机体整体平衡、控制血压水平稳定等方面具有独特的优势。

中药防治高血压的作用机制包括抑制 RAAS 的激活^[6-7],抑制血管重构和保护血管内皮功能等^[8-9]。Ang II 为 RAAS 系统的主要效应物质,作用于 AT1 受体,使小动脉收缩,外周血管阻力增加,刺激 ALD 和去甲肾上腺素分泌,使水钠潴留,以上作用均可使血压升高^[10]。因此,降低 Ang II 含量对维持正常血压有重要的意义。ET-1 具有强烈的血管收缩作用,在高血压病理状态下,血管内皮功能失调,导致内皮依赖性收缩作用增强,血管平滑肌细胞增殖,血压进一步升高^[11]。因此,调控内皮相关因子可以在一

表 4 各组大鼠血液流变学指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	药物剂量	全血黏度(高切, mPa·s)	全血黏度(低切, mPa·s)	红细胞压积(%)	纤维蛋白原含量(g·L ⁻¹)	血浆黏度(mPa·s)
空白对照组	8		3.11±0.90	7.65±1.23	0.35±0.09	2.51±0.20	1.95±0.29
SHR 模型组	8		5.35±0.43**	11.89±0.98**	0.48±0.05**	3.58±0.22**	2.56±0.24**
卡托普利组	8	10mg/kg	3.78±0.84 [△]	8.16±1.05 [△]	0.41±0.04 [△]	2.83±0.38 [△]	1.80±0.11 [△]
牡蛎单方组	8	6g/kg	5.31±0.43	11.81±0.35	0.49±0.05	3.59±0.25	2.54±0.20
葛根单方组	8	3g/kg	5.05±0.34	11.07±0.53	0.45±0.06	3.52±0.52	2.40±0.11
牡蛎葛根配伍低剂量组	8	4.5g/kg	4.78±0.95	9.35±1.89	0.43±0.03	3.35±0.27	2.21±0.17
牡蛎葛根配伍高剂量组	8	13.5g/kg	4.09±0.24 [△]	8.65±1.67 [△]	0.41±0.03 [△]	2.93±0.30 [△]	1.85±0.14 [△]

注:**与空白对照组比较, $P<0.01$;△与 SHR 模型组比较, $P<0.05$ 。

表 5 各组大鼠左心室肥厚指数比较($\bar{x}\pm s$) mg/g

组别	药物剂量	左心室肥厚指数(LVHI)
空白对照组		1.91±0.26
SHR 模型组		3.15±0.18**
卡托普利组	10mg/kg	2.60±0.55 [△]
牡蛎单方组	6g/kg	3.06±0.54
葛根单方组	3g/kg	2.83±0.59
牡蛎葛根配伍低剂量组	4.5g/kg	2.71±0.44 [△]
牡蛎葛根配伍高剂量组	13.5g/kg	2.65±0.85 [△]

注:**与空白对照组比较, $P<0.01$;△与 SHR 模型组比较, $P<0.05$ 。

定程度上改善高血压症状^[12]。本研究发现,与葛根水煎剂比较,牡蛎配伍葛根能更加抑制 SHR 大鼠的 RAAS 系统,降低血浆 Renin、Ang II、ALD、ET-1 含量,更能改善 SHR 大鼠的血液流变学和左心室肥厚程度。另外,血管平滑肌细胞紧张度增高是高血压病最重要的病理生理学改变,Ca²⁺作为细胞内第二信使物质及细胞兴奋-收缩耦联剂,对血压调节起关键作用^[13]。与葛根水煎剂比较,牡蛎配伍葛根降低 SHR 大鼠 AVSMC 胞内的 Ca²⁺浓度作用更加明显,尤以高剂量效果更好。以上研究结果表明,牡蛎对葛根降血压具有协同增效作用,其机制与抑制 RAAS、改善血管内皮功能、阻滞 AVSMC 胞内 Ca²⁺引发的多种信号转导途径等作用相关。

目前中医药防治高血压的实验一般是对降压疗效的简单观察,缺乏对包括改善并发症和靶器官损伤等的作用机制研究,未来需进一步从分子、基因水平开展实验和临床研究,基于经典方药开发更好的现代化抗高血压中药。

参考文献

- [1] 杨丽,刘友平,韦正,等.贝壳类药材牡蛎石决明珍珠母的研究进展[J].时珍国医国药,2013,24(12):2990.
- [2] 张晓娟,周海纯.葛根化学成分,现代药理及临床应用研究进展[J].中医药信息,2017,34(1):124.
- [3] 钟伟,王永刚,于远望,等.中医药防治高血压的作用机制研究进展[J].时珍国医国药,2013,24(5):1224.
- [4] 陈善,周晚秋,叶梁,等.辛伐他汀对轻中度高血压合并高血脂症患者血清炎症介质、血小板活化功能和血液流变学的影响[J].中华高血压杂志,2015,23(5):477.
- [5] 聂亚红,张蓉,张磊,等.NT-proBNP 和 HCY 对原发性高血压患者合并左心室肥厚的预测价值[J].国际检验医学杂志,2017,38(9):1160.
- [6] AHN Y M,CHO K W,KANG D G,et al.Oryeongsan (Wulingsan),a traditional Chinese herbal medicine, induces natriuresis and diuresis along with an inhibition of the renin-angiotensin-aldosterone system in rats[J].J Ethnopharmacol,2012,141(3):780.
- [7] HUANG C Y,KUO W W,KUO C H,et al.Protective effect of Danggui (Radix Angelicae Sinensis) on angiotensin II-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells[J].BMC Complement Altern Med,2014,14:358.
- [8] LI Y,YANG W,ZHU Q,et al.Protective effects on vascular endothelial cell in N'-nitro-L-arginine (L-NNA)-induced hypertensive rats from the combination of effective components of Uncaria rhynchophylla and Semen Raphani[J].Biosci Trends,2015,9(4):237.
- [9] ZHENG C Y,SONG L L,WEN J K,et al.Tongxinluo (TXL),a Traditional Chinese Medicinal Compound,Improves Endothelial Function After Chronic Hypoxia Both In Vivo and In Vitro[J].J Cardiovasc Pharmacol,2015,65(6):579.
- [10] 李运伦,朱梅,程德斌,等.藤蓼降压片抗高血压的实验效应[J].中成药,2013,35(12):2581.
- [11] 黄丹娥,黄琳,曾巧煌,等.复方芪麻胶囊对自发性高血压大鼠血压及血清 NO、ET、Ang II 的影响[J].广东药学院学报,2015,31(6):791.
- [12] VANHOUTTE P M.Endothelial dysfunction:the first step toward coronary arteriosclerosis[J].Circ J,2009,73(4):595.
- [13] 李卫丽,陈孝银,吴先林.天麻钩藤饮对 SHR 血管平滑肌细胞 CaL-α1C 及 PMCA1mRNA 表达的影响[J].中成药,2009,31(8):1175.

第一作者:邵江娟(1976—),女,博士,副教授,研究方向为中药资源化学及作用机制。

通讯作者:付金柏,本科学历,副主任中药师。1918598016@qq.com

收稿日期:2017-03-28

编辑:吴宁

(上接第 74 页)

- [3] 周萌.银屑病血瘀证的思考[J].中国医学文摘(皮肤科学),2006,23(5):337.
- [4] 姚佳,曹晓燕,王喆之.6 种秦艽镇痛和抗炎活性的比较[J].现代生物医学进展,2010,10(24):4642.
- [5] 姚梅芬,张思巨,李琳,等.苦参中黄酮类成分及其药理作用研究现状[J].中国中医药信息杂志,2013,20(3):110.
- [6] 韩福海,黎淑华,李良弟.复方青黛丸联合复方氨肽素治疗银屑病的临床研究[J].中国医学创新,2014,11(29):99.
- [7] 赵香花,黄予.银屑病的动物模型研究进展[J].药学服务与研究,2009,9(3):213.
- [8] 解春桃.银屑病患者与相关细胞因子水平变化的研究[J].放射免疫学杂志,2007,20(5):415.
- [9] 杨京慧.银屑病病因及发病机理研究概述[J].中外医疗,2008,27(20):25.
- [10] 周晓琳,张学文.减少甲氨蝶呤副作用的措施及效果分析[J].医学理论与实践,2013,26(17):2351.

第一作者:闫景东(1977—),男,博士研究生,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向为中医药防治疑难性皮肤病。

通讯作者:安月鹏,医学硕士,主治医师。522176709@qq.com

收稿日期:2017-04-20

编辑:吴宁