

活血潜阳颗粒逆转自发性高血压大鼠左心室肥厚的实验研究

周 端¹, 肖梅芳², 胡 嵘¹

(1. 上海中医药大学龙华医院心血管科, 上海 200032; 2. 上海市黄浦区中心医院中医内科, 上海 200002)

[摘要] **目的:**探讨活血潜阳颗粒逆转高血压左心室肥厚的作用机制。**方法:**以自发性高血压大鼠(spontaneous hypertension rats, SHR)为高血压及高血压左心室肥厚模型,随机分为活血潜阳颗粒高、中、低剂量治疗组,卡托普利治疗组,松龄血脉康治疗组和模型组,并以正常血压 Wistar-Kyoto 大鼠为正常对照组,检测大鼠尾动脉收缩压(systolic blood pressure, SBP)及左心室质量指数(left ventricular mass index, LVMI),放免法测定大鼠左心室组织血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)含量,应用免疫组化法、RT-PCR 法观察左心室组织血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)蛋白与 mRNA 表达。**结果:**(1)与正常对照组比较,模型组 SBP、LVMI 值显著升高;与模型组比较,活血潜阳颗粒高、中剂量可显著降低 SBP、LVMI 值,其作用与松龄血脉康治疗组比较,差异无统计学意义,但作用明显差于卡托普利治疗组;(2)与正常对照组比较,模型组左心室组织 Ang II 含量升高,ACE 蛋白、mRNA 表达明显上调;与模型组相比,活血潜阳颗粒高、中、低剂量可减少心脏局部 Ang II 的含量,下调 SHR 左室心肌 ACE 蛋白及 mRNA 表达,其下调作用与松龄血脉康治疗组比较,差异无统计学意义,但其作用明显不及卡托普利治疗组。**结论:**活血潜阳颗粒可逆转 SHR 左心室肥厚,其作用机制可能与下调左室心肌 ACE 蛋白及 mRNA 的表达,减少心脏局部 Ang II 的含量有关。

[关键词] 高血压;左心室肥厚;血管紧张素 II;血管紧张素转换酶;大鼠

[中图分类号] R322.1+1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2006)06-0606-05

Study of Huoxue Qianyang Granules in revising the left ventricular hypertrophy of spontaneous hypertension rats

Duan ZHOU¹, Mei-Fang XIAO², Rong HU¹

(1. Department of Cardiovascular Diseases, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; 2. Department of Traditional Chinese Internal Medicine, Central Hospital of Huangpu District, Shanghai 200002, China)

ABSTRACT Objective: To study the mechanism of Huoxue Qianyang Granule (HXQYG), a traditional Chinese compound medicine, in revising the left ventricular hypertrophy of hypertension. **Methods:** Spontaneous hypertension rats (SHR) were randomly divided into seven groups: untreated group, Songling Xuemaikang (SLXMK)-treated group, captopril-treated group, high-, medium- and low-dose HXQYG-treated groups, and normal control group. The systolic blood pressure (SBP) and left ventricular mass index (LVMI) were measured. The content of angiotensin II (Ang II) in left ventricular tissue was determined by radioimmunoassay. The expressions of angiotensin converting enzyme (ACE) protein and mRNA in left ventricular tissue were analyzed separately by immunohistochemical method and RT-PCR. **Results:** (1) SBP and LVMI were higher in the untreated group than those in the normal control group, and they were lower in the high- and medium-dose HXQYG-treated groups than those in the untreated group, but higher than those in

[基金项目] 上海市经济委员会高新技术产业开发资助项目(No. 022DJ02)

Correspondence to: Mei-Fang XIAO. E-mail: xiaomf96@yahoo.com.cn

the captopril-treated group, and without significant difference as compared to those in the SLXMK-treated group. (2) The content of Ang II and expressions of ACE protein and mRNA in the left ventricular tissue in the untreated group were higher than those in the normal control group, and they were lower in the HXQYG-treated groups than those in the untreated group, but higher than those in the captopril-treated group, and without significant difference as compared to those in the SLXMK-treated group. **Conclusion:** HXQYG can reverse the left ventricular hypertrophy of SHR, which may be due to decreasing the amount of Ang II and expressions of ACE protein and mRNA in the left ventricular tissue.

KEY WORDS hypertension; left ventricular hypertrophy; angiotensin II; angiotensin converting enzyme; rats

Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao/J Chin Integr Med, 2006, 4(6): 606-610 www.jcimjournal.com

肾素血管紧张素系统 (renin angiotensin system, RAS) 在调节容量超负荷或压力超负荷导致的心肌肥厚中起重要作用^[1]。以往研究表明,活血潜阳颗粒 (Huoxue Qianyang Granule, HXQYG) 可以控制自发性高血压大鼠 (spontaneous hypertension rats, SHR) 随周龄而逐渐升高的血压, 逆转血管重构^[2]。本实验以自发性高血压大鼠为高血压左心室肥厚模型, 研究活血潜阳颗粒逆转左心室肥厚作用及其作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 药物与动物 活血潜阳颗粒清膏 (批号 20040331), 由上海秀龙中药厂生产, 相当于含生药量 10.625 g/g; 松龄血脉康 (Songling Xuemaikang, SLXMK) (批号 040320), 由成都康宏药业集团生产; 卡托普利 (批号 0404031) 由中美上海施贵宝制药有限公司生产。

12 周龄雄性 SPF 级 SHR 78 只, 体质量 330~350 g; 12 周龄雄性 Wistar-Kyoto 大鼠 12 只, 体质量 280~310 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 许可证号 SCXK (沪) 2003-0003, 实验动物质量合格证号 0004045。

1.1.2 试剂及仪器 血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 放免试剂盒, 由北京北方生物技术研究所提供; 血管紧张素转换酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 多克隆抗体, 由 Santa Cruz Biotechnology 公司生产; TRIzol RNA 抽提试剂, 由美国 Invitrogen 公司生产; RT-PCR 一步法试剂盒, 由 Promega 公司生产; PCR 热循环仪, 由德国 Perkin-Elmer 公司生产; Gel-Analyse 凝胶图像处理系统, 由美国 Integrated Silicon Solution 公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 分组及给药 大鼠适应性饲养 1 周, 称取体

质量, 根据体质量随机分组并编号。将 78 只 SHR 随机分为活血潜阳颗粒高 (1.92 g·kg⁻¹·d⁻¹, 相当于成人临床剂量的 24 倍)、中 (0.96 g·kg⁻¹·d⁻¹)、低 (0.48 g·kg⁻¹·d⁻¹) 剂量治疗组, 卡托普利治疗组 (15.625 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 相当于成人临床剂量 150 mg/d), 松龄血脉康治疗组 (1.8 g·kg⁻¹·d⁻¹, 相当于成人临床剂量的 24 倍) 和模型组 (双蒸水 5 ml·kg⁻¹·d⁻¹), 每组 13 只, 连续灌服 9 周; 并以 12 只正常血压 Wistar-Kyoto 大鼠为正常对照组, 饲以标准鼠食和消毒自来水, 自由进食饮水。

1.2.2 血压测量 采用尾套法 RBP-1B 型大鼠血压计。大鼠适应性饲养 1 周后 (13 周龄)、用药前每组各取 9 只 (1~9 号) 测首次尾动脉收缩血压 (systolic blood pressure, SBP); 用药后第 9 周 (21 周龄) 再分别测量 1 次, 若实验过程中有大鼠死亡, 则补充同组其余大鼠。

1.2.3 左心室质量指数 第 10 周 (22 周龄) 腹主动脉采血后立即剪开胸腔, 迅速取出心脏, 用预冷的生理盐水主动脉逆流灌洗, 分离大血管、心房、心室, 滤纸吸干, 称取左心室质量 (含室间隔), 计算左心室质量指数 (left ventricular mass index, LVMI)。LVMI = 左心室质量 (g) / 体质量 (kg)。

1.2.4 心肌组织 Ang II 测定 准确称取 100 mg 心肌组织加入 1 ml 1 mol/L 冰醋酸, 在 100 °C 沸水中水浴 10 min, 玻璃电动匀浆器匀浆, 40 °C 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清, -20 °C 保存。测定时用 PBS 稀释调节 pH 中性, 加样步骤按说明书进行。

1.2.5 免疫组化法测定心肌组织 ACE 蛋白表达 取左心室游离壁, 常规固定、石蜡包埋、切片, 石蜡切片以二甲苯脱蜡及逐级乙醇脱水, PBS 洗 5 min, 室温下以 0.3% H₂O₂-甲醇液温育切片 10 min, PBS 洗 3 次, 5 min/次; 按链霉亲和素-生物素-过氧化物酶连结法 (strept avidin-biotin complex,

SABC)步骤进行操作,逐级乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。光学显微镜下观察阳性细胞,分析阳性染色在整个视野中所占面积百分比及平均光密度。以平均光密度乘以阳性面积比即积分光密度值表示每张切片的 ACE 蛋白表达的相对含量。阴性对照采用 PBS 代替一抗。

1.2.6 引物设计与合成 参考文献^[1],与 Gene Bank 系列进行同源性比较,确定引物系列。ACE: 上游引物,5'-CCTGATCAACCAGGAGTTTG-CAGAG-3';下游引物,5'-GCCAGCCTTCCCAG-GCAAACAGCAC-3',扩增片断为 317 bp。 β -actin: 上游引物,5'-CCTGTGGCATCCATGAAACT-3';下游引物,5'-GTGCTAGGAGC-CAGGGCAGT-3',扩增片断为 169 bp。

1.2.7 RT-PCR 测定心肌组织 ACE mRNA 表达 应用 TRIzol 试剂抽提大鼠左心室总 RNA。取 0.5 ml 经去 RNA 酶处理的 Eppendorf 管,在冰浴中加入 RT-PCR 试剂盒中反应混合物 25 μ l,ACE 上游引物 1 μ l,下游引物 1 μ l,RNA 模板 1 μ l,加入无 RNA 酶的水至 50 μ l,充分混匀后加 1 μ l 禽类成髓细胞瘤病毒逆转录酶,轻轻混匀后 4 $^{\circ}$ C 1 000 r/min 离心 1 min,加入 20 μ l 甘油,放入 PCR 仪,先 48 $^{\circ}$ C 45 min 逆转录,再 94 $^{\circ}$ C 3 min 灭活逆转录酶,然后依次 94 $^{\circ}$ C 1 min、58 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 2 min,35 个循环后,72 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 结束反应,于 -20 $^{\circ}$ C 保存。 β -actin 为内参基因,PCR 条件与目的基因 ACE 一致。以 2% 琼脂糖凝胶电泳, Gel-Analyse 凝胶图像处理系统进行 DNA 条带光密度定量。每条泳道中的目的基因 ACE 的 cDNA 条带光密度值由相应的 β -actin cDNA 条带光密度值校正以后的比值被定义成为 ACE 在 mRNA 水平的表达。

1.3 统计学方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠的 SBP、LVMI 值 与正常对照组比较,模型组及各治疗组大鼠 SBP、LVMI 值均显著升高;随着周龄的增加,模型组 SBP 持续升高,活血潜阳颗粒高、中、低剂量及松龄血脉康治疗组 SBP 保持相对平稳,卡托普利治疗组 SBP 下降;各用药组与模型组比较,SBP 下降明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明活血潜阳颗粒有抑制 SHR 血压上升的作用;活血潜阳颗粒高、中剂量治疗组的 LVMI 值明显低于模型组,小剂量组则无明显差异。说明活血潜阳颗粒有逆转 SHR 左心室肥厚的作用,且存

在一定的量效关系。活血潜阳颗粒高剂量降压的效果、逆转 SHR 左心室肥厚的作用优于松龄血脉康,但差于卡托普利。见表 1、2。

表 1 各组大鼠 SBP 值

Table 1 Results of SBP of rats in 7 groups

Group	n	$(\bar{x} \pm s, \text{mm Hg})$	
		The first SBP	The last SBP
Normal control	9	133 \pm 2*	133 \pm 2*
Untreated	9	193 \pm 5	214 \pm 4
Captopril-treated	9	194 \pm 7	168 \pm 4* *
SLXMK-treated	9	194 \pm 9	201 \pm 4* Δ
High-dose HXQYG-treated	9	193 \pm 5	193 \pm 6* Δ
Medium-dose HXQYG-treated	9	194 \pm 7	201 \pm 3* Δ
Low-dose HXQYG-treated	9	194 \pm 6	207 \pm 4* Δ

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs untreated group; Δ $P < 0.05$, vs captopril-treated group.

表 2 各组大鼠 LVMI 值

Table 2 Results of LVMI of rats in 7 groups

Group	n	$(\bar{x} \pm s, \text{mg/kg})$
		LVMI
Normal control	12	2.14 \pm 0.22* *
Untreated	12	2.73 \pm 0.11
Captopril-treated	13	2.45 \pm 0.11* *
SLXMK-treated	13	2.62 \pm 0.15* $\Delta\Delta$
High-dose HXQYG-treated	10	2.58 \pm 0.05* $\Delta\Delta$
Medium-dose HXQY-treated	11	2.58 \pm 0.11* $\Delta\Delta$
Low-dose HXQY-treated	10	2.65 \pm 0.08 $\Delta\Delta$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs untreated group; Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$, vs captopril-treated group.

2.2 各组大鼠左心室组织 Ang II 含量 与正常对照组比较,模型组左心室组织 Ang II 含量显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,活血潜阳颗粒高剂量治疗组与卡托普利治疗组左心室 Ang II 的含量明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),其他各组亦有降低 SHR 左室心肌 Ang II 含量的作用,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

2.3 各组大鼠左心室组织 ACE 蛋白表达 免疫组化染色可见 ACE 在心肌间质细胞、血管内皮细胞胞核以及心肌细胞胞膜和胞浆中表达(棕色或深棕色)。与正常对照组比较,模型组左心室心肌 ACE 蛋白表达明显上调 ($P < 0.01$)。与模型组比较,卡托普利治疗组,活血潜阳颗粒高、中剂量治疗组,松龄血脉康治疗组均有下调左心室心肌 ACE 蛋白表达的作用 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),活血潜阳颗粒高、中剂量治疗组,松龄血脉康治疗组下调左心室心肌 ACE 蛋白表达的作用差于卡托普利治疗组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表 3、图 1。

2.4 各组大鼠左室心肌 ACE mRNA 表达与正常对照组比较,模型组左室心肌 ACE mRNA 表达上调 ($P < 0.05$),卡托普利治疗组,活血潜阳

颗粒高、中剂量治疗组,松龄血脉康治疗组左室心肌 ACE mRNA 下降 ($P < 0.05$),各治疗组之间比较,差异无统计学意义。见表 3、图 2。

表 3 各组大鼠左室 Ang II 含量、ACE 蛋白及 mRNA 表达

Table 3 Content of Ang II and expressions of ACE protein and mRNA in left ventricle of rats in 7 groups

Group	Content of Ang II ($n = 11$, pg/100 mg)	ACE protein integral optical density ($n = 7$)	ACE mRNA/ β -actin ($n = 7$)
Normal control	1343 ± 62 *	13.61 ± 2.28 * $\Delta\Delta$	0.39 ± 0.18 *
Untreated	1408 ± 41	26.88 ± 2.99	0.86 ± 0.30
Captopril-treated	1316 ± 45 * *	15.41 ± 4.10 * *	0.57 ± 0.13 *
SLXMK-treated	1349 ± 97	20.67 ± 5.16 * $\Delta\Delta$	0.59 ± 0.22 *
High-dose HXQY-treated	1341 ± 47 *	18.17 ± 1.46 * Δ	0.59 ± 0.17 *
Medium-dose HXQY-treated	1379 ± 39 Δ	19.94 ± 3.32 * Δ	0.57 ± 0.27 *
Low-dose HXQY-treated	1376 ± 59	23.28 ± 2.39 $\Delta\Delta$	0.73 ± 0.37

($\bar{x} \pm s$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs untreated group; Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$, vs captopril-treated group.

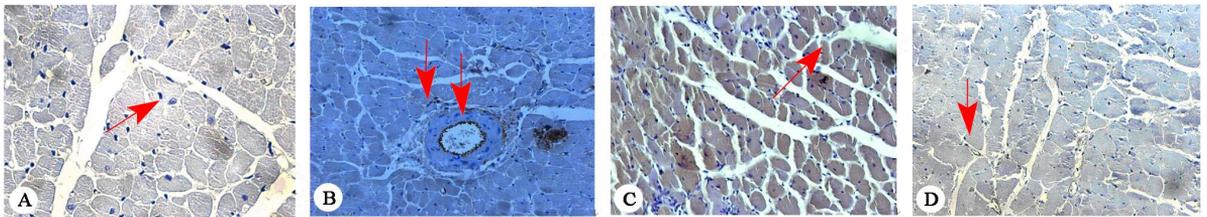


图 1 大鼠左室组织 ACE 蛋白表达 (SABC 免疫组化法, $\times 200$)

Figure 1 Expression of ACE protein in left ventricle of rats (SABC, $\times 200$)

ACE mostly expressed in vascular endothelia cells and myocardial matrix cells, few in plasma and membrane of myocardial cells. The nigger-brown granules are indication of ACE (Red arrowhead). A: Normal control group, few expression of ACE; B: Untreated group, high expression of ACE; C: captopril-treated group, low expression of ACE; D: High-dose HXQY-treated group.

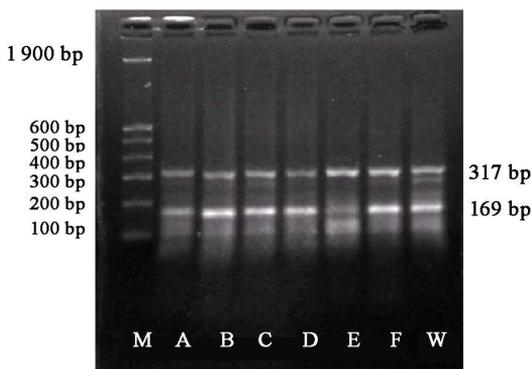


图 2 ACE cDNA 电泳图

Figure 2 Electrophoretogram of ACE cDNA

M: Marker; A: High-dose HXQY-treated group; B: Medium-dose HXQY-treated group; C: Low-dose HXQY-treated group; D: Captopril-treated group; E: SLXMK-treated group; F: Untreated group; W: Normal control group. ACE: 317 bp; β -actin: 169 bp.

3 讨论

高血压左室肥厚的发病机制主要是高血压时左室负荷增加,心肌细胞受到机械刺激,肾素-血管紧张素-醛固酮系统过度激活,其效应激素 Ang II、醛固酮与细胞表面受体结合,通过细胞内蛋白激酶 A 及蛋白激酶 C 信号传导系统激活一系列激酶,使蛋白质合成增加,细胞体积增大,间质胶原合成增多^[3, 4],使室壁增厚,左室质量增加。

另外,交感神经活动的增强是高血压的始动因素。交感神经兴奋,释放儿茶酚胺增加,使心排出量增加,阻力血管收缩,血管(包括心脑血管等)肥厚,管腔变小,总外周阻力升高,其结果使血压上升。而升高的血压反过来又促使交感神经释放去甲肾上腺素,去甲肾上腺素通过兴奋 α 和 β 受体使心肌细胞信使核糖核酸表达增加,环磷酸腺苷和糖原合成增多,心肌细胞肥大^[5, 6]。

大多数 Ang II 在两步连续的反应中产生。肾素催化血管紧张素原转化为十肽的血管紧张素 I,

血管紧张素 I 在 ACE 的水解下形成八肽的 Ang II。大量研究表明,ACE 抑制剂通过抑制 ACE 的活性减少 Ang II 的生成,降低血压而逆转左心室肥厚,同时通过减少缓激肽的降解而逆转左心室肥厚。因此,ACE 抑制剂逆转左心室肥厚可不依赖其降血压的作用^[7~9]。

中医学从整体考虑,认为高血压与左心室肥厚处于同一机体环境中,辨证具有同一性。血瘀和阳亢是高血压发病的病理基础,也是左心室肥厚的病理因素^[10]。活血潜阳颗粒以丹参活血利血、宁心调肝为君;沙苑子补益肝肾,白蒺藜疏肝解郁,祛风明目,散结祛瘀,二药相配,一平肝阳以治上,一补肾阴以治下,二药为臣;泽泻利水渗湿,性平不伤阴,佐上药以利尿降压辅养肝肾;青箱子为使,清肝明目,祛风热,清肝火。诸药相配,共奏活血化瘀、平肝潜阳、利尿降压之功。前期临床研究显示该方有缓慢有效的降压作用,可显著改善患者的临床症状,提高生活质量;动物研究表明,活血潜阳颗粒可以控制 SHR 随周龄而逐渐升高的血压,逆转 SHR 左心室肥厚,改善血液流变性,改善血小板与血管内皮细胞功能,降低其血浆去甲肾上腺素水平^[11~14]。

本实验中模型组心脏局部的 Ang II 含量较空白对照组增加,左室心肌 ACE 蛋白及 mRNA 表达较空白对照组大鼠明显上调。活血潜阳颗粒可减少心脏局部 Ang II 的含量,下调左室心肌 ACE 蛋白及 mRNA 表达,以高剂量效果较好,提示不同剂量的活血潜阳颗粒作用的效果可能不同,存在一定的量效关系。

综上所述,下调左室心肌 ACE 蛋白及 mRNA 的表达,减少心脏局部 Ang II 的含量可能为活血潜阳颗粒逆转高血压左心室肥厚的机制之一。

[参考文献]

1 Krizanova O, Kiss A, Zacikova L, *et al.* Nitric oxide synthase mRNA levels correlate with gene expression of angiotensin II type-1 but not type-2 receptors, renin or angiotensin converting enzyme in selected brain areas. *Physiol Res*, 2001, 50(5): 473-480.
 2 周 端,苑素云,顾仁樾,等.活血潜阳胶囊改善高血

压病血管重建的临床与实验研究. *中国医药学报*, 2001, 16(4): 310-312.
 3 Harrap SB, Dominiczak AF, Fraser R, *et al.* Plasma angiotensin II, predisposition to hypertension, and left ventricular size in healthy young adults. *Circulation*, 1996, 93(6): 1148-1154.
 4 Tokuda K, Kai H, Kuwahara F, *et al.* Pressure-independent effects of angiotensin II on hypertensive myocardial fibrosis. *Hypertension*, 2004, 43(2): 499-503.
 5 余振球,马长生,赵连友,等.实用高血压学.第二版.北京:科学出版社,2000. 66-69.
 6 Schlaich MP, Kaye DM, Lambert E, *et al.* Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy. *Circulation*, 2003, 108(5): 560-565.
 7 Klingbeil AU, Schneider M, Martus P, *et al.* A meta-analysis of the effects of treatment on left ventricular mass in essential hypertension. *Am J Med*, 2003, 115(1): 41-46.
 8 Tanaka Y, Nagai M, Date T, *et al.* Effects of bradykinin on cardiovascular remodeling in renovascular Hypertensive Rats. *Hypertens Res*, 2004, 27(11): 865-875.
 9 Sayegh F, Topouchian J, Hlawaty M, *et al.* Regression of left ventricular hypertrophy with moexipril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, in hypertensive patients. *Am J Ther*, 2005, 12(1): 3-8.
 10 符德玉,罗海明,黄蔚,等.活血潜阳方治疗血瘀、阳亢证高血压病患者左心室肥厚的临床研究. *上海中医药杂志*, 2003, 37(12): 6-9.
 11 肖梅芳.周端应用活血潜阳法治疗高血压病经验. *上海中医药杂志*, 2004, 38(4): 12-13.
 12 周 端,符德玉,顾仁樾.活血潜阳胶囊治疗高血压病的临床与实验研究. *上海中医药杂志*, 2000, 34(4): 22-25.
 13 符德玉,周 端,顾仁樾,等.活血潜阳胶囊治疗高血压病(血瘀、阳亢证)临床研究. *中成药*, 1999, 21(9): 464-466.
 14 周 端,符德玉,顾仁樾.活血潜镇胶囊对自发性高血压大鼠心肌组织 AT II、ET 和血浆 NO 含量的影响. *上海中医药大学上海市中医药研究院学报*, 1998, 12(2): 70-72.

[收稿日期] 2006-03-30