

基于主动脉 Ang II/AT1 通路研究蒙花苷对高血压血管重构的影响

苏洁¹, 俞静静¹, 颜美秋¹, 王婷¹, 许韩婷¹, 吴亚军¹, 陈素红^{2*}, 吕圭源^{1*}

1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

2. 浙江工业大学, 浙江 杭州 310014

摘要: **目的** 基于主动脉血管紧张素 II (Ang II) /血管紧张素受体 1 型 (AT1) 通路研究蒙花苷对高血压大鼠血管重构的影响。**方法** 采用自发性高血压大鼠 (SHR) 自然形成高血压血管重构模型, 观察蒙花苷对 SHR 血压、眩晕时间、主动脉组织形态学及胶原纤维分布的影响。采用 Ang II 诱导原代血管平滑肌细胞 (VSMCs) 建立体外血管重构模型, 通过 MTT 和结晶紫实验观察蒙花苷对 VSMCs 异常增殖的影响, 通过细胞划痕及小室实验观察其对 VSMCs 迁移的影响; 检测 Ang II/AT1 信号通路相关分子 Ang II、AT1、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、MMP-9、Src、p-Src、Syk 和 p-Syk 蛋白表达。**结果** 蒙花苷能明显缩短 SHR 眩晕时间及降低 SBP、DBP 及 MBP 水平, 并能改善主动脉中膜增厚、VSMCs 增生肥大且排列紊乱等, 减少主动脉中膜胶原纤维分布; 能显著抑制 Ang II 诱导的 VSMCs 异常增殖和迁移; 能抑制活性氧 (ROS) 的产生, 降低 Ang II、AT1、MMP-2、MMP-9 和 p-Src 的蛋白表达水平。**结论** 蒙花苷可能是通过抑制主动脉中 Ang II/AT1 信号通路的活化, 继而抑制血管平滑肌细胞的异常增殖和迁移, 从而起到抗高血压血管重构的作用。

关键词: 高血压; 血管重构; 蒙花苷; 血管紧张素 II; 血管紧张素受体 1 型; 基质金属蛋白酶-2

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)20-5003-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.023

Effects of buddleoside on hypertensive vascular remodeling through Ang II/AT1 signaling pathway in aorta

SU Jie¹, YU Jing-jing¹, YAN Mei-qiu¹, WANG Ting¹, XU Han-ting¹, WU Ya-jun¹, CHEN Su-hong², LV Gui-yuan¹

1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

Abstract: **Objective** The aim of this paper was to observe the effects of buddleoside on hypertensive vascular remodeling through Ang II/AT1 signaling pathway in aorta. **Methods** We used SHR model to examine the blood pressure, vertigo time, histomorphology, and collagen fiber distribution of the aorta, and evaluate whether buddleoside could ameliorate the hypertensive vascular remodeling *in vivo*. Meanwhile, abnormal proliferation and migration of VSMCs induced by Ang II *in vitro* was used to identify the mechanism. The anti-proliferation effect of buddleoside in VSMCs was observed using MTT assay and crystal violet assay. The anti-migration effect in VSMCs was observed using monolayer-wounding and boyden chamber transwell assay. Furthermore, the protein expression of Ang II, AT1, MMP-2, MMP-9, Src, p-Src, Syk, and p-Syk were examined. **Results** The results showed that buddleoside could significantly decrease SBP, DBP, MBP, and vertigo time, and improve the thickened media aorta, hypertrophy and disordered arrangement of VSMCs, distribution of collagen fibers. Buddleoside could also inhibit the proliferation and migration of VSMCs, inhibit the ROS production, and reduce the protein expression of Ang II, AT1, MMP-2, MMP-9, Src, and p-Src. **Conclusion** These data supported that buddleoside can ameliorate hypertensive vascular remodeling by inhibiting the proliferation and migration of VSMCs. Its mechanism is mediated by the regulation of Ang II/AT1 signaling pathway.

Key words: hypertension; vascular remodeling; buddleoside; Ang II; AT1; MMP-2

收稿日期: 2019-04-28

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LQ18H280003); 国家自然科学基金资助项目 (81873036); 浙江省自然科学基金项目 (LQ17H280004); 浙江省自然科学基金项目 (LQ17H280005); 国家自然科学基金资助项目 (81803819); 浙江省重点研发计划 (2017C03052); 浙江重点实验室 (2012E10002)

作者简介: 苏洁, 助理研究员, 研究方向为中药心血管药理研究。E-mail: sujie198169@126.com

*通信作者 吕圭源, 教授, 研究方向为中药药理与新产品开发。E-mail: zjtcmlgy@163.com

陈素红, 研究员, 研究方向为中药药理与新产品开发。E-mail: chensuhong@zjut.edu.cn

高血压是严重危害人类健康的心血管疾病,目前我国高血压患病率已达 23.2%,其最大的危害在于引发多器官的损伤^[1]。高血压发生发展过程中会伴随着血管结构和功能的改变,这种改变即为高血压血管重构,血管壁中层增厚和胶原纤维增生等是其主要临床表现^[2-3]。现代医学认为高血压血管重构是一个动态病理变化过程,中膜血管平滑肌细胞异常增殖、向内膜下迁移以及细胞外基质改变是其发病机制的中心环节^[4]。而过度激活的肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)与高血压的发生发展密切相关,主动血管紧张素 II(Ang II)是导致高血压血管重构的重要因子,已证实 Ang II 与血管平滑肌细胞(VSMCs)上的血管紧张素受体 1 型(AT1)结合后可激活多条信号通路,促进 VSMCs 增殖、迁移及胞外基质的转化等^[5-6],导致血管重构的产生。

野菊花为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序,具有清热解毒、泻火平肝的功效,能降低血压^[7]。蒙花苷(BUD)是野菊花的药效成分之一^[8-9],本课题组前期研究采用特有的精制工艺从野菊花中分离纯化了 BUD,已证实其能长期稳定地降低自发性高血压大鼠(SHR)血压^[10],还能在体外抑制脂多糖(LPS)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导的血管内皮细胞炎症损伤^[11-12]。因此,BUD 具有明确的降压作用,但其能否在降压的同时对血管重构发挥药效作用有待进一步研究。本研究在前期研究的基础上,以主动血管中 Ang II/AT1 通路为切入点,以 SHR 和 VSMCs 为研究体系,从体内、外水平研究野菊花中的降压活性成分 BUD 对高血压血管重构的药效作用和可能机制。

1 材料

1.1 动物

SHR 30 只,雄性,体质量 180~220 g;Wistar-Kyoto 大鼠 10 只,雄性,体质量 180~220 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号 SCXK(京)2012-0001。SD 大鼠,雄性,体质量 60~80 g,由浙江省实验动物中心提供,动物许可证号 SCXK(浙)2008-0033。

1.2 细胞

无菌条件下摘取 SD 大鼠胸主动脉,采用组织贴块法分离培养原代 VSMCs,传至 2~5 代用于实验。

1.3 药物与试剂

蒙花苷有效部位(TBUD),实验室自制,HPLC 法检测得到其中主要成分 BUD 质量分数>50%;

BUD(质量分数 $\geq$ 98%,批号 E-0167-12121121),上海同田生物技术股份有限公司,用二甲基亚砩完全溶解存于-20℃,临用前用培养液稀释成相应质量浓度供体外细胞实验用;Ang II,德国 Merck 公司,批号 D00123129,用灭菌蒸馏水完全溶解存于-20℃,临用前用培养液稀释成 1 μ mol/L 供体外细胞实验用;缬沙坦胶囊(北京诺华制药有限公司,批号 X1970),用羧甲基纤维素钠混悬液配制质量浓度为 0.8 mg/mL 供体内动物实验用;RPMI 1640 培养液(杭州吉诺生物医药技术有限公司);胎牛血清(FBS,美国 Invitrogen 公司);BCA 蛋白浓度测定和活性氧(ROS)检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司);Masson 染液(美国 sigma 公司);Ang II、AT1、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、MMP-9 和 β -actin 抗体(美国 Santa Cruz 公司);Src、磷酸化 Src(p-Src)、Syk 和磷酸化 Syk(p-Syk)抗体(美国 Cell Signaling 公司);PI/RNase staining Buffer(美国 BD Biosciences 公司);HE 染液(南京建成科技有限公司);HRP/DAB 免疫组化检测试剂盒(美国 Abcam 公司)。

1.4 仪器

BP-2010AUL 小动物无创测压系统(北京软隆生物科技有限公司);Powerwave340 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);MEIKO EC360 包埋机(德国 Meiko 公司);LEICARM2245 切片机(德国 Leica 公司);ZH-SZ 平衡旋转仪(淮北正华生物仪器设备有限公司);IX71 荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);MiniChemi II 化学发光成像仪(北京赛智创业科技有限公司)。

2 方法

2.1 TBUD 制备

按照课题组前期已建立的固-液萃取法^[10]从野菊花中制备得到的干燥粉末,具体为野菊花药材经乙醇粗提浓缩,分别用醋酸乙酯、乙醇及 40%乙醇等萃取,剩余的沉淀即为 TBUD,HPLC 法检测得到其中主要成分 BUD 质量分数>50%。用羧甲基纤维素钠混悬液配制质量浓度为 7.5 mg/mL 溶液供体内动物实验用。

2.2 体外细胞实验

2.2.1 原代 VSMCs 的分离和培养 采用前期建立的组织贴块法分离培养原代 VSMCs^[13],具体方法为 SD 大鼠麻醉消毒,在超净台内解剖迅速取出胸主动脉,移入含 Hanks'溶液的培养皿中清洗,去除血管外脂肪,剖开血管使其内膜朝上,棉签擦拭内

膜去除内皮组织;将胸主动脉剪成约 1 mm^2 大小的组织块,均匀贴壁于培养瓶底部,加入RPMI 1640培养液(含20% FBS、1%丙酮酸钠、100 U/L青霉素和 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 链霉素),置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱内培养。原代VSMCs在组织贴壁3 d慢慢爬出,在倒置显微镜下观察其呈梭形,生长至融合状态并呈现特有峰与谷的特点,7 d左右细胞长成致密单层后即传代,每2~3天传代1次,取2~5代VSMCs用于本实验。通过检测细胞中肌动蛋白(α -actin)的表达,鉴定得到分离培养的原代VSMCs纯度 $\geq 90\%$ 。

2.2.2 BUD对Ang II诱导的VSMCs增殖的影响

(1) MTT实验:取对数生长期的VSMCs,按 1.4×10^4 个/孔接种于96孔板,培养24 h后,分别加入 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ Ang II以及含Ang II的不同浓度BUD(1、2、3、5、10、20、30 $\mu\text{mol/L}$)溶液处理,同时设置对照组。培养24 h后,加入MTT工作液(5 g/L) $20\text{ }\mu\text{L/孔}$,继续培养4 h后,弃去孔内培养液,加入DMSO $150\text{ }\mu\text{L/孔}$,震荡待沉淀物完全溶解后,波长 570 nm 处读取吸光度(A)值,计算存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}}/A_{\text{对照}}$$

(2) 结晶紫实验:VSMCs按 8×10^4 个/孔接种于24孔板,培养24 h后分为对照组、Ang II($1\text{ }\mu\text{mol/L}$)组、Ang II+BUD($1\text{ }\mu\text{mol/L}+5$ 、10、20 $\mu\text{mol/L}$)组。分别加入相应药物处理,24 h后弃去培养液,每孔加入 $250\text{ }\mu\text{L}$ 结晶紫染色液,室温静置30 min,弃去染色液,水洗2次自然干燥后,每孔加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 20%醋酸溶液,震荡溶解结晶, 540 nm 波长下读取各孔 A 值,计算存活率。

2.2.3 BUD对Ang II诱导的VSMCs迁移的影响

(1) 细胞划痕实验:VSMCs按 8×10^4 个/孔接种于24孔板,培养24 h后分为对照组、Ang II($1\text{ }\mu\text{mol/L}$)组、Ang II+BUD($1\text{ }\mu\text{mol/L}+5$ 、10、20 $\mu\text{mol/L}$)组。弃去培养液,用 $200\text{ }\mu\text{L}$ 的枪头在每个孔中沿培养板底部呈“一”字形划痕,采用倒置显微镜在200倍下拍照记录药物干预前划痕区的相对距离,然后分别加入相应药物处理,24 h后拍照记录药物干预后划痕区的相对距离,计算细胞迁移距离。

$$\text{迁移距离} = \text{干预前划痕区的相对距离} - \text{干预后划痕区的相对距离}$$

(2) 细胞小室实验:采用Transwell小室上的微孔滤膜把小室分隔上、下2层。下层加入 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ Ang II以及含Ang II的不同浓度BUD(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)药液 $500\text{ }\mu\text{L/孔}$ 。上层加入 $250\text{ }\mu\text{L}$ 的VSMCs

悬液(2.4×10^5 个/ mL),再加入终浓度与下层相同的相应药液 $50\text{ }\mu\text{L/孔}$ 。继续培养24 h后,取出小室经PBS蘸洗后,用4%多聚甲醛固定,擦净滤膜内表面细胞。采用 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ PI染色,撕下微孔滤膜于载玻片上,荧光显微镜(激发光为 535 nm)拍照,经Image-Pro plus 5.1计算迁移到下层的细胞数目。

2.2.4 BUD对Ang II诱导的VSMCs ROS产生的影响 将VSMCs按 1×10^5 个/皿的细胞数接种于 $35\text{ mm}\times 10\text{ mm}$ 培养皿中,培养24 h后弃去培养液,加入不同浓度BUD(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)溶液处理。继续培养24 h后,采用 $40\text{ }\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA染色,于培养箱中孵育20 min后,加入 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ Ang II处理5 min。最后于荧光显微镜下(激发光为 488 nm)拍照,经Image-Pro plus 5.1进行荧光定量分析。

2.2.5 BUD对Ang II诱导的VSMCs中Src、p-Src、Syk和p-Syk蛋白表达的影响 将VSMCs培养在 $60\text{ mm}\times 15\text{ mm}$ 培养皿中,细胞长至80%后分为对照组、Ang II($1\text{ }\mu\text{mol/L}$)组、Ang II+BUD($1\text{ }\mu\text{mol/L}+5$ 、10、20 $\mu\text{mol/L}$)组。弃去培养液,分别加入相应药物处理,24 h后胰酶消化,离心收集细胞用蛋白裂解液裂解,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心15 min,加入 $5\times$ 上样缓冲液, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热30 min变性。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后,转至PVDF膜上,室温下封闭后加入1:1 000稀释的一抗, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用PBST/TBST清洗后加入1:2 000稀释的二抗,孵育30 min,再清洗后加入辣根过氧化物酶(HRP),最后采用化学发光成像仪曝光成像。

2.3 体内动物实验

2.3.1 分组与给药 雄性SHR随机分为模型组、缬沙坦(8 mg/kg)组、TBUD(75 mg/kg ,前期已明确具有降压作用的较低剂量^[10])组,每组10只。另取10只Wistar-Kyoto大鼠作为对照组。对照组及模型组大鼠按体质量ig给予蒸馏水,其余各组大鼠分别ig给予相应药物 10 mL/kg ,每日1次,连续给药6周。

2.3.2 TBUD对SHR血压的影响 给药5周后,采用BP-2010AUL小动物无创测压系统平行测量各组大鼠血压,先将大鼠置于测量环境中适应约15 min,然后再将其放入鼠袋,尾巴套入传感器中,当就绪信号出现及稳定后,仪器自动加压并开始测量,记录收缩压(SBP)、舒张压(DBP)和平均动脉压(MBP)。

2.3.3 TBUD对SHR眩晕时间的影响 给药5周后,将各组大鼠置于平衡旋转仪上以 500 r/min 旋转

30 s 后取下, 然后将大鼠放在高台上, 看大鼠是否能保持平衡不掉下, 记录大鼠恢复正常状态所需时间。

2.3.4 TBUD 对 SHR 主动脉组织形态学的影响
末次给药后麻醉各组大鼠, 解剖快速取出胸主动脉约 2 cm, 经过固定、脱水、包埋、切片后, 制成 4 μm 石蜡切片, 采用 HE 染色, 显微镜下观察胸主动脉组织形态学改变。

2.3.5 TBUD 对 SHR 主动脉胶原纤维分布的影响
各组大鼠胸主动脉制成 4 μm 石蜡切片, 采用 Masson 染色, 显微镜下观察胸主动脉胶原纤维分布情况。

2.3.6 TBUD 对 SHR 主动脉中 Ang II、AT1、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响
各组大鼠胸主动脉制成 4 μm 石蜡切片, 通过抗原修复、灭活内源性过氧化氢酶、封闭、滴加一抗 (1:500), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 孵育二抗、DAB 显色、苏木素染色、脱水及封片后,

显微镜下观察胸主动脉 Ang II、AT1、MMP-2 和 MMP-9 的表达情况。

2.4 统计学处理

组间比较采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果与分析

3.1 BUD 对 Ang II 诱导的 VSMCs 增殖的影响

MTT 实验 (图 1-A) 结果显示, 1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 能明显促进 VSMCs 的增殖 ($P < 0.01$), 加入 10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ BUD 作用 24 h 后能显著抑制 VSMCs 的增殖 ($P < 0.01$)。

结晶紫实验 (图 1-B) 结果显示, 1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 能诱导 VSMCs 增殖 ($P < 0.01$), 加入 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ BUD 能明显抑制 VSMCs 增殖 ($P < 0.05$ 、0.01)。说明 BUD 能显著抑制 Ang II 诱导的 VSMCs 异常增殖。

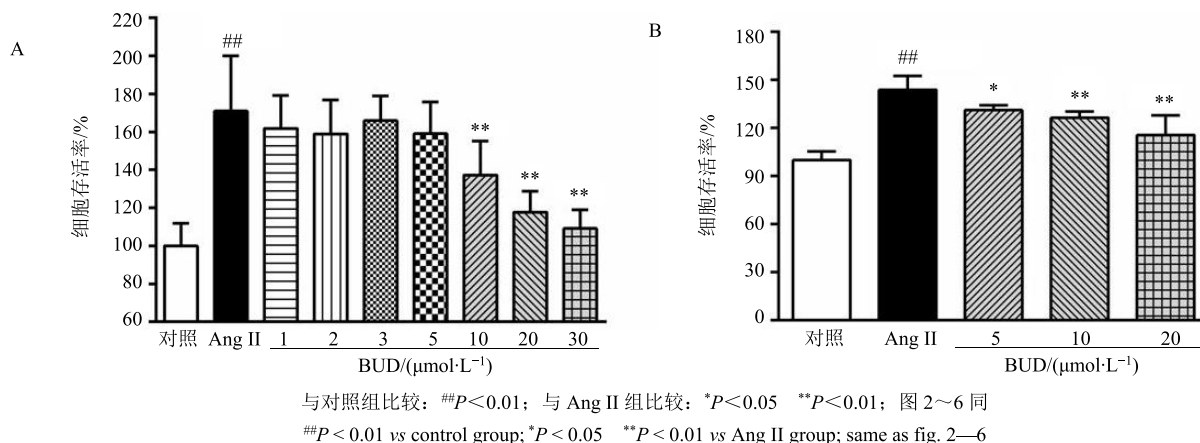


图 1 MTT 实验 (A) 和结晶紫实验 (B) 中 BUD 对 Ang II 诱导的 VSMCs 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effects of BUD on proliferation of VSMCs induced by Ang II in MTT assay (A) and crystal violet viability assay (B) ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.2 BUD 对 Ang II 诱导的 VSMCs 迁移的影响

细胞划痕实验 (图 2) 结果显示, 1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 能显著促进 VSMCs 迁移 ($P < 0.01$), 而加入 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ BUD 处理后, 细胞迁移距离显著缩短 ($P < 0.01$)。

细胞小室实验 (图 3) 结果显示, 1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 能显著诱导 VSMCs 迁移 ($P < 0.01$), 而加入 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ BUD 处理后, 细胞迁移数目显著减少 ($P < 0.01$)。表明 BUD 能显著抑制 Ang II 诱导的 VSMCs 迁移。

3.3 BUD 对 Ang II 诱导的 VSMCs ROS 产生的影响

结果显示 (图 4), 1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 能显著增加 VSMCs ROS 的产生 ($P < 0.01$), 而经 5、10、20

$\mu\text{mol/L}$ BUD 处理后, ROS 的产生明显减少 ($P < 0.01$)。说明 BUD 能抑制 Ang II 诱导的 VSMCs ROS 的产生。

3.4 BUD 对 Ang II 诱导的 VSMCs 中 Src、p-Src、Syk 和 p-Syk 蛋白表达的影响

结果显示 (图 5), 1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 刺激 VSMCs 后能引起 p-Src 和 p-Syk 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$), 经 10、20 $\mu\text{mol/L}$ BUD 处理后 p-Src 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 且呈浓度依赖性。20 $\mu\text{mol/L}$ BUD 能显著降低 Src 蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。

3.5 TBUD 对 SHR 血压和眩晕时间的影响

与对照组比较, 模型组大鼠眩晕时间延长, SBP、DBP 及 MBP 水平均显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组

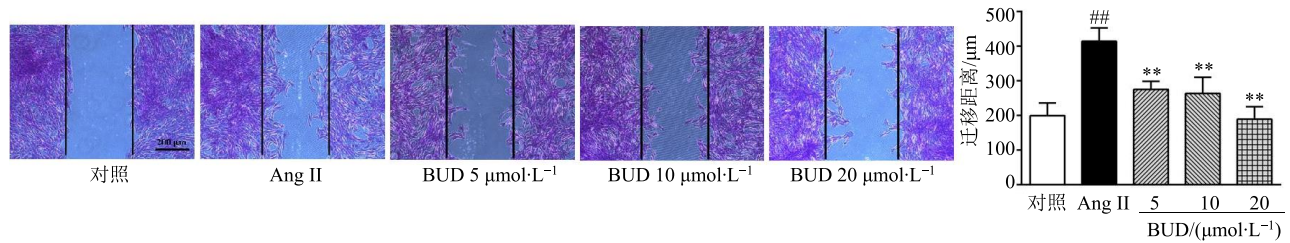


图 2 BUD 对 Ang II 诱导的 VSMCs 迁移距离的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 2 Effects of BUD on Ang II-induced migration distance of VSMCs ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

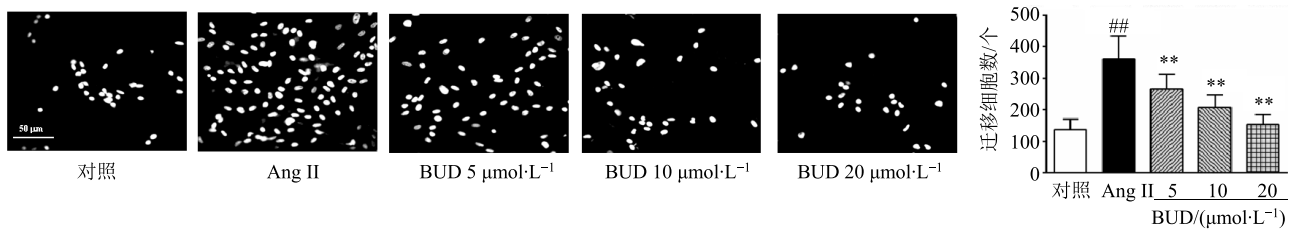


图 3 BUD 对 Ang II 诱导的 VSMCs 迁移数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 3 Effects of BUD on Ang II-induced number of cell migration of VSMCs ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

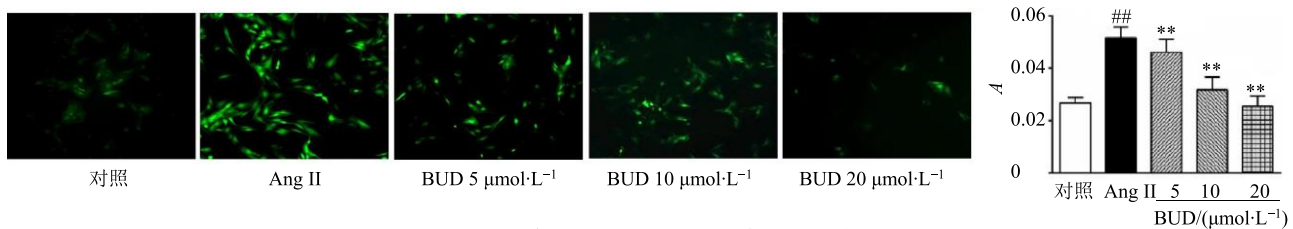


图 4 BUD 对 Ang II 诱导的 VSMCs ROS 产生的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 4 Effects of BUD on Ang II-induced oxidative stress in VSMCs ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

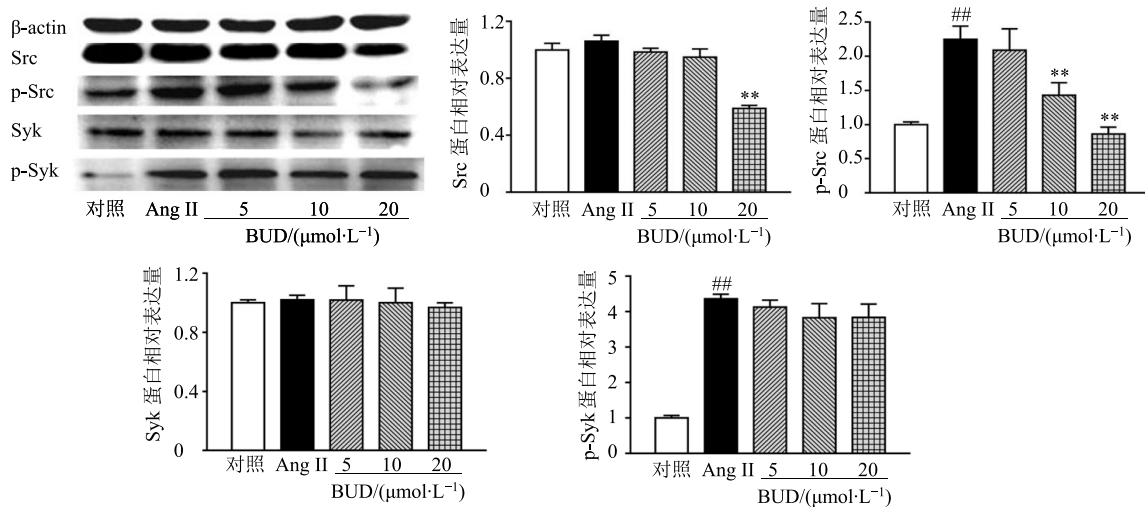


图 5 BUD 对 VSMCs 中 Src、p-Src、Syk 和 p-Syk 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of BUD on protein expression of Src, p-Src, Syk, and p-Syk in VSMCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

比较, 给药 5 周后, TBUD 组大鼠眩晕时间缩短, SBP、DBP 及 MBP 水平均显著降低 ($P < 0.01$, 图 6)。

3.6 TBUD 对 SHR 主动脉组织形态学的影响

与对照组比较, 模型组大鼠主动脉中膜明显增

厚, 血管平滑肌细胞增生肥大且排列紊乱, 血管内皮细胞排列不齐且部分脱落。与模型组比较, TBUD 组大鼠主动脉中膜增厚、血管平滑肌细胞增生且排列紊乱等减轻 (图 7)。

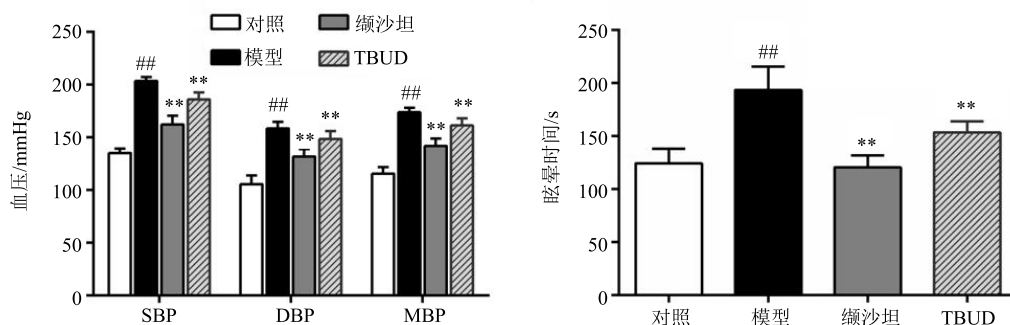
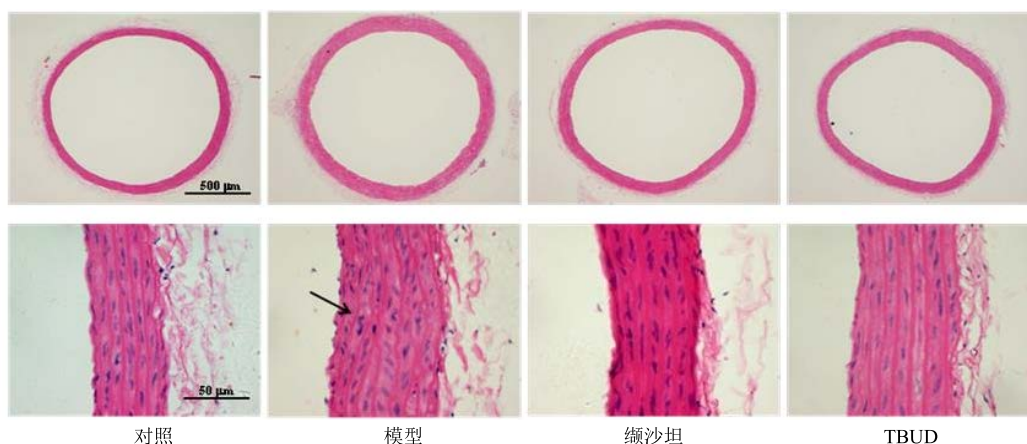
图 6 TBUD 对 SHR 血压和眩晕时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Fig. 6 Effect of TBUD on blood pressure and vertigo time of SHR ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

图 7 TBUD 对 SHR 主动脉组织形态学的影响

Fig. 7 Effect of TBUD on aorta histomorphology of SHR

3.7 TBUD 对 SHR 主动脉胶原纤维分布的影响

主动脉 Masson 染色后, 光镜下观察肌细胞呈红色, 胶原纤维呈蓝色或蓝紫色。与对照组比较, 模型组大鼠主动脉中膜胶原纤维分布增多 (蓝染); 与模型组比较, TBUD 组大鼠主动脉中膜胶原纤维分布减少 (图 8)。

3.8 TBUD 对 SHR 主动脉中 Ang II、AT1、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组大鼠主动脉 Ang II、AT1、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平明显升高; 与模型组比较, TBUD 组大鼠主动脉 Ang II、AT1、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平明显降低 (图 9)。

4 讨论

高血压是危害人类健康的最常见心血管病之一, 2018 年《中国高血压防治指南修订版》显示, 目前我国高血压患病率已升高至 23.2%, 而高血压最主要的危害在于它会引发多器官的损伤^[1]。临床中发现高血压发生发展过程中伴随着血管结构和功能的改变, 这种改变即为高血压血管重构, 而血管壁中层增厚、内径缩小和胶原纤维增生等是其主要临床表现^[2-3]。高血压血管重构既是高血压状态下机体的适应性行为, 又是持续恶化的结构基础, 同时也是高血压并发症的共同病理学基础。因此, 高血压病的治疗不应仅局限在降低血压, 还应该强调对

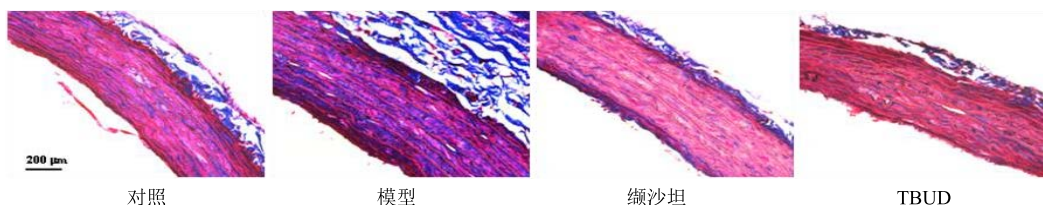


图 8 TBUD 对 SHR 主动脉胶原纤维分布的影响

Fig. 8 Effect of TBUD on aorta collagenous fiber of SHR

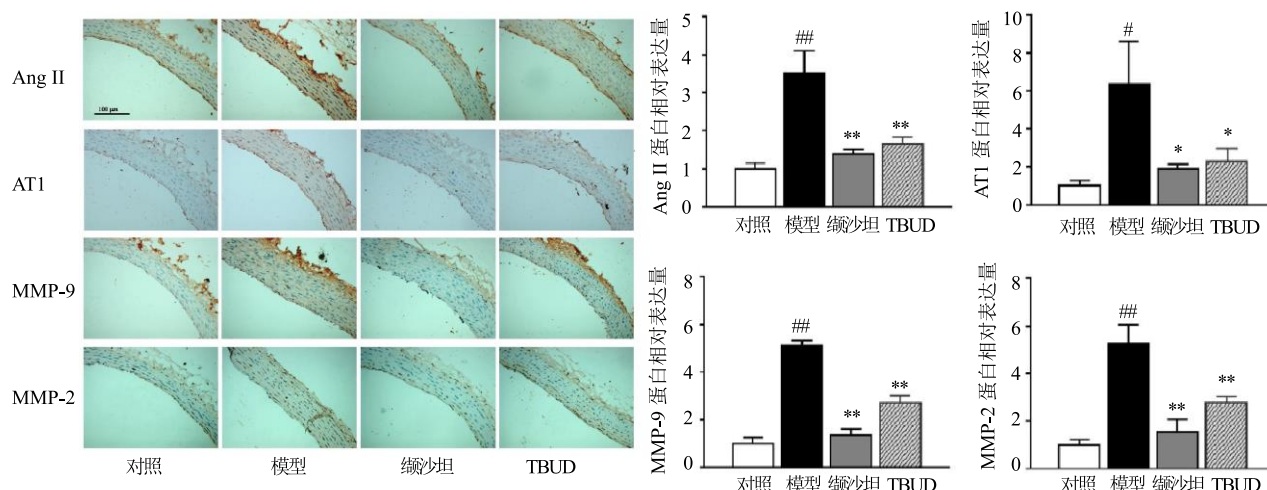


图 9 TBUD 对 SHR 主动脉中 Ang II、AT1、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 9 Effect of TBUD on protein expression of Ang II, AT1, MMP-2, and MMP-9 in aorta of SHR ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

血管重构等并发症的改善。

现代医学认为高血压血管重构是一个动态病理变化过程,至少包括细胞增殖、迁移、凋亡以及细胞外基质的形成、降解以及重排等。其中中膜血管平滑肌细胞异常增殖、向内膜下迁移以及细胞外基质改变是其发病机制的中心环节^[4]。过度激活的 RAAS 与高血压的发生发展密切相关,Ang II 为 RAAS 中最强的活性物质,高血压患者和动物模型体内 Ang II 水平往往较高^[14],是导致高血压血管重构的重要因子,已证实 Ang II 能与其特异性受体 AT1 结合从而参与细胞的生长、迁移、分化、凋亡以及胞外基质的转化和调节等^[5]。

一方面,Ang II 与 VSMCs 上的 AT1 受体结合后会促使酪氨酸激酶 Src、Syk 等磷酸化,激活丝裂原活化蛋白激酶 MAPK 家族(ERK1/2、p38 及 JNK),促进 VSMCs 的异常增殖及合成分泌大量胶原蛋白^[5,15-16]。另外,Ang II 与 AT₁ 受体结合后也可以激活 NADPH 氧化酶,促使 ROS 的产生^[17-18],通过氧化还原敏感的信号传递功能,从而促进 MMPs 的表达^[5,19]。而 MMPs 是重要的细胞外基质降解酶,MMP-9、MMP-2 等可以通过降解细胞外基质,最终使 VSMCs 突破物理屏障而从内膜下迁移至中膜^[20],在血管重构中发挥重要作用。因此,Ang II 与 VSMCs 上的 AT1 受体结合后可激活多条信号通路,发挥一系列的生物学效应,促进 VSMCs 增殖、迁移及胞外基质的转化等^[6],进一步导致血管重构的产生。

野菊花为菊科植物野菊的干燥头状花序,具有清热解毒、泻火平肝的功效,是临床常用的治疗高血压中药,具有降压作用^[7],而降压作用的发挥离

不开其有效的化学成分。现代研究表明,黄酮类化合物是野菊花中含量最多、最主要的活性成分^[8-9],而 BUD 是野菊花中最主要的黄酮苷,也是《中国药典》规定野菊花药材质量控制标准的指标性成分。近年来研究发现 BUD 具有很强的药理活性,能够抗炎、抗菌等^[21]。本课题组前期研究采用特有的精制工艺(授权国家发明专利)成功从野菊花中分离纯化 TBUD(质量分数>50%),已证实 75、150 mg/kg 剂量下能够长期稳定地降低 SHR 血压^[10]。此外,还发现 BUD 在体外能抑制 LPS 和 TNF- α 诱导的血管内皮细胞炎症损伤^[11-12]。因此,TBUD 具有明确的降压作用,但其能否在降压的同时对血管重构发挥药效作用有待进一步研究。

因此,本研究在前期研究的基础上,采用 SHR 自然形成高血压血管重构模型,ig 给予 TBUD 75 mg/kg(前期已明确具有降压作用的较低剂量),观察 TBUD 对 SHR 主动脉组织形态学及胶原纤维分布的影响,考察其抗高血压血管重构的药效作用,进一步检测 SHR 主动脉中 Ang II/AT1 信号通路相关分子的蛋白表达,探索其可能的分子机制。同时采用 Ang II 诱导原代 VSMCs 建立体外血管重构模型,在体外细胞水平上观察 BUD 对 VSMCs 异常增殖和迁移的作用,研究其抗高血压血管重构的可能作用机制。

研究结果显示,TBUD 能明显降低 SHR 眩晕时间、SBP、DBP 及 MBP 水平,并能改善主动脉中膜增厚、VSMCs 增生肥大且排列紊乱等,减少主动脉中膜胶原纤维分布。说明 TBUD 具有抗高血压血管重构的药效。细胞实验结果表明,BUD 能明显抑制 Ang II 诱导的 VSMCs 异常增殖,且能降低

VSMCs 中 p-Src 的蛋白表达水平。说明 BUD 可能通过抑制 Src 的磷酸化, 继而减少 MAPK 家族 (ERK1/2、p38 及 JNK) 的激活, 从而抑制 Ang II 介导的 VSMCs 异常增殖。BUD 能显著抑制 Ang II 诱导的 VSMCs 迁移, 且能抑制 Ang II 诱导 VSMCs ROS 的产生, 降低主动脉中 Ang II、AT1、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达。说明 BUD 可能通过抑制 ROS 产生继而减少 MMP-2 和 MMP-9 的表达, 从而抑制 Ang II 介导的血管平滑肌细胞迁移。TBUD 还能抑制主动脉中 Ang II 和 AT1 的蛋白表达, 从而抑制主动脉中 Ang II/AT1 信号通路的活化。

综上所述, BUD 可能通过抑制主动脉中 Ang II/AT1 信号通路的活化, 继而抑制血管平滑肌细胞的异常增殖和迁移, 从而起到抗高血压血管重构的作用。

参考文献

- [1] 《中国高血压防治指南》修订委员会. 中国高血压防治指南 2018 年修订版 [J]. 心脑血管病防治, 2019, 19(1): 1-45.
- [2] Schiffrin E L. Vascular remodeling in hypertension: Mechanisms and treatment [J]. *Hypertension*, 2012, 59(2): 367-374.
- [3] Schiffrin E L. The vascular phenotypes in hypertension: Relation with the natural history of hypertension [J]. *J Am Soc Hyper*, 2007, 1(1): 56-67.
- [4] 李朝红. 高血压血管重构研究进展——多因素协同作用机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(3): 235.
- [5] Belenkov Y N, Privalova E V, Kaplunova V Y, *et al.* Remodeling of vascular bed in patients with arterial hypertension: Possibilities of diagnostics and correction [J]. *Kardiologiia*, 2012, 52(6): 67-72.
- [6] 周 华, 张翠芳, 陈瑞瑞, 等. 血管紧张素转换酶和血管紧张素 II 1 型受体双基因沉默对自发性高血压大鼠血压及主动脉重构的影响 [J]. 中华高血压杂志, 2019, 27(2): 149-155.
- [7] 刘 伟, 张 倩, 何宏媛, 等. 益母草、野菊花单方与复方水煎液对高血压模型大鼠降压作用的比较 [J]. 山东中医药大学学报, 2015, 39(6): 555-556.
- [8] 袁慧杰, 赖志辉, 管艳艳, 等. 野菊花主要活性成分的药理作用研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(3): 651-653.
- [9] 刘磊磊, 肖卓炳. 野菊花的化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5254-5258.
- [10] Qiaoshan Y, Suhong C, Minxia S, *et al.* Preparative purification of linarin extracts from dendranthema indicum flowers and evaluation of its antihypertensive effect [J]. *Evid-Based Compl Alter Med*, 2014, doi: 10.1155/2014/394276.
- [11] 许韩婷, 苏 洁, 吴亚军, 等. 蒙花苷对脂多糖诱导的血管内皮细胞炎症损伤的影响 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(1): 29-32.
- [12] 吴亚军, 苏 洁, 黄浦俊, 等. 蒙花苷对 TNF- α 诱导的血管内皮细胞炎症损伤及 TLR4/I κ B α /NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(5): 637-643.
- [13] Sun J, Xu H T, Yu J J, *et al.* Luteolin ameliorates hypertensive vascular remodeling through inhibiting the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells [J]. *Evid-Based Compl Alter Med*, 2015, doi: 10.1155/2015/364876.
- [14] 任利群, 冯改涛, 李万红. 高血压患者血浆 PRA Ang II ALD 浓度变化及意义 [J]. 内蒙古医学杂志, 2000, 32(1): 10-11.
- [15] Wang Y, Yan T, Wang Q, *et al.* Pkc-dependent extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in the inhibition of Ib on angiotensin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375(1): 151-155.
- [16] Ishida M, Ishida T, Thomas S M, *et al.* Activation of extracellular signal-regulated kinases (erk1/2) by angiotensin II is dependent on c-src in vascular smooth muscle cells [J]. *Circul Res*, 1998, 82(1): 7-12.
- [17] Wilcox C S. Reactive oxygen species: Roles in blood pressure and kidney function [J]. *Curr Hyper Repor*, 2002, 4(2): 160-166.
- [18] Van Heerebeek L, Meischl C, Stooker W, *et al.* NADPH oxidase (s): New source (s) of reactive oxygen species in the vascular system? [J]. *J Clin Pathol*, 2002, 55(8): 561-568.
- [19] Lin Z, Wang Z, Li G, *et al.* Fibulin-3 may improve vascular health through inhibition of MMP-2/9 and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(5): 3805-3812.
- [20] Kalayarasan S, Sriram N, Soumyakrishnan S, *et al.* Diallylsulfide attenuates excessive collagen production and apoptosis in a rat model of bleomycin induced pulmonary fibrosis through the involvement of protease activated receptor-2 [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 271(2): 184-195.
- [21] Han S, Sung K H, Yim D, *et al.* The effect of linarin on LPS-induced cytokine production and nitric oxide inhibition in murine macrophages cell line RAW264.7 [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25(2): 170-177.