

钩藤碱对自发性高血压大鼠的降压作用及其对血管的调节机制探讨

田丽娜, 高华武, 龙子江*, 唐丽琴

安徽中医药大学, 安徽 合肥 230038

摘要: **目的** 研究钩藤碱连续给药后对自发性高血压大鼠 (SHR) 收缩压 (SBP) 的影响及其对血管的调节机制。**方法** 取雄性 SHR, 随机分为模型组 (等容量蒸馏水), 卡托普利阳性对照组 (6.25 mg/kg), 钩藤碱低、中、高剂量 (1.25、2.50、5.00 mg/kg) 组, 另取 SD 雄性大鼠作为对照组 (等容量蒸馏水), 各给药组连续 ig 给药 21 d, 测定给药前和给药第 7、14、21 天的大鼠尾动脉 SBP, 末次给药后采血, 检测血浆血管紧张素 II (Ang II)、非对称二甲基精氨酸 (ADMA)、血管紧张素 II 1 型受体 (AT1R) 和血清 NO、一氧化氮合酶 (NOS) 水平。**结果** 与模型组比较, 钩藤碱各剂量组可显著降低 SHR 的 SBP 值; 模型组大鼠血浆 Ang II、ADMA、AT1R 水平显著升高, 且血清中 NO 和 NOS 水平显著下降, 而钩藤碱能够逆转上述指标的改变 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 钩藤碱对 SHR 有显著降低 SBP 作用, 能降低血浆 Ang II、ADMA 水平, 升高血清 NO 和 NOS 水平, 有保护血管内皮功能的作用。

关键词: 钩藤碱; 自发性高血压大鼠; 非对称二甲基精氨酸; 一氧化氮合酶; 血管紧张素 II

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)15-2210-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.15.017

Antihypertensive effect and vascular regulation mechanism of rhynchophylline on spontaneously hypertensive rats

TIAN Li-na, GAO Hua-wu, LONG Zi-jiang, TANG Li-qin

Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of rhynchophylline (Rhy) on systolic blood pressure (SBP) with different time after administration in spontaneously hypertensive rats (SHR), and explore the protective effect on vascular endothelial cells of Rhy after long-term administration. **Methods** Male SHR were randomly divided into model, positive control (Captopril 6.25 mg/kg), low-, mid-, and high-dose (1.25, 2.50, 5.00 mg/kg) Rhy groups. Other SD rats were included as the control group. Rats in the model and control groups were given the same volume of distilled water once daily for 21 d. Rat tail artery SBP was measured before administration and day 7, 14, and 21 during the administration. The levels of plasma Ang II, ADMA, AT1R, and serum NO, NOS were detected after the last administration underwent blood sampling. **Results** Compared with the model group, Rhy reduced SBP significantly. Moreover, the plasma Ang II, ADMA, and AT1R levels were up-regulated, and the serum NO and NOS levels were decreased in the model group, which could be reversed by the treatment of Rhy ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Rhy could reduce the SBP of SHR significantly, decrease plasma Ang II, ADMA, and AT1R levels, and promote serum NO and NOS levels, which has the protection of vascular endothelial function.

Key words: rhynchophylline; spontaneously hypertensive rats; asymmetric dimethylarginine; nitric oxide synthase; Ang II

高血压是常见的心血管疾病, 是 21 世纪公认的三大疾病之一, 也是心脑血管病最主要的危险因素, 其有脑卒中、心肌梗死、心力衰竭及慢性肾脏病等主要并发症。高血压通常伴随着血管内皮功能的障碍, 临床研究发现原发性高血压病患者血浆非

对称二甲基精氨酸 (ADMA) 浓度升高^[1-2], ADMA 是一氧化氮合酶 (NOS) 的抑制剂, 降低 NO 合成, 加速血管内皮功能障碍。钩藤有清热平肝、熄风定惊的功效, 钩藤含有多种生物碱类成分^[3], 其中钩藤碱 (rhynchophylline) 是钩藤中量最大的生物碱,

收稿日期: 2013-12-31

基金项目: 安徽省研究生“千人计划”资助项目

作者简介: 田丽娜 (1989—), 女, 硕士生在读, 从事中药对心脑血管疾病防治作用的研究。Tel: 15056028432 E-mail: tln20131203@163.com

*通信作者 龙子江 Tel: (0551)65169216 E-mail: lzjyls@163.com

也是主要的降压成分^[4]。本实验进一步研究钩藤碱的血管内皮功能保护作用,探讨钩藤碱对自发性高血压大鼠(SHR)ADMA、血管紧张素 II(Ang II)、血管紧张素 II 1 型受体(AT1R)、NO 和 NOS 水平的影响,为钩藤碱的开发及临床应用提供基础。

1 材料

1.1 药品与试剂

钩藤碱,经 HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$,安徽中医药大学中西医结合临床学院药理教研室提供;卡托普利片(批号 12072811),常州制药厂有限公司;ADMA、NO、NOS、Ang II 和 AT1R ELISA 试剂盒(批号分别为 CK-E90891C、CK-E94328C、CK-E94890C、CK-E68436C、CK-E90439C),上海源叶生物技术有限公司;生理盐水,安徽丰原药业股份有限公司;水合氯醛(批号 20100304),国药集团化学试剂有限公司。

1.2 动物

雄性 SHR,12 周龄,体质量(270 ± 20)g,SPF 级,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2007-001。雄性 SD 大鼠,12 周龄,体质量(270 ± 20)g,SPF 级,购于安徽省实验动物中心,许可证号 SCXK(皖)2011-002。

1.3 仪器

BP—6 无创动物血压测量系统,成都泰盟科技有限公司;FA1004 电子分析天平,上海精密科学仪器有限公司;RT—6000 酶标仪,雷杜科学仪器有限公司;TDZ5—WS 多管架自动平衡离心机,上海手术器械厂;MK3 全自动酶标分析仪,上海弘联公司;电热恒温干燥箱,上海三星电热仪器厂;GL—88B 漩涡混合器,其林贝尔仪器制造公司;Medlab U/4C501 生物信号采集处理系统,南京美易科技有限公司;DNP—9052B—III 电热恒温箱,上海三发学科仪器有限公司。

2 方法

2.1 分组与给药

取 12 周龄雄性 SHR,适应性饲养 7 d 后,采用无创血压测试仪,用尾套法测量收缩压(SBP),筛选出 SBP ≥ 18.7 kPa 大鼠 40 只,随机分为 5 组(每组 8 只):模型组,卡托普利阳性对照组(6.25 mg/kg),钩藤碱低、中、高剂量(1.25、2.50、5.00 mg/kg)组;另取 8 只 SBP ≤ 16 kPa 的 SD 雄性大鼠作为对照组。除对照组和模型组大鼠 ig 等容量蒸馏水(1 mL/100 g)外,其他各组大鼠分别按照

上述剂量每天 ig 给药,每天 1 次,连续给药 21 d。

2.2 检测指标

2.2.1 一般行为学观察 观察大鼠的精神、排便、毛色、活动度等情况。

2.2.2 动脉血压 采用尾套法,用 Bp—6 型动物无创血压测试仪分别测定给药前尾动脉 SBP 和给药第 7、14、21 天药后 30 min 尾动脉 SBP,每只大鼠连续测量血压 3 次,取平均值。

2.2.3 血浆 Ang II、ADMA、AT1R 和血清 NO、NOS 水平的测定 末次血压测定完成,各组大鼠禁食不禁水 12 h,用 3.5%水合氯醛 ip 麻醉后,腹主动脉取血 8 mL,分装于肝素抗凝管和真空采血管,3 000 r/min 离心 10 min 分离血浆和血清,采用 ELISA 法检测血浆 Ang II、ADMA、AT1R 和血清 NO、NOS 水平。测定方法严格按照说明书进行操作。

2.3 数据处理及分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,采用 One-way-AVOVA 进行分析,方差齐采用 LSD 检验,方差不齐采用 Dunnett *t* 检验,用 GraphPad Prism 6 软件作图。

3 结果

3.1 对 SHR 一般行为的影响

对照组大鼠被毛紧凑,毛色有光泽,对周围变化反应灵敏且比较温顺。模型组大鼠出现毛发无光泽,被毛蓬松成簇,消瘦,捉持颈部时抵抗剧烈,时常尖叫、暴跳。各给药组大鼠精神状态有所好转,毛发鲜有光泽,情绪相对稳定,行为较温顺平和,给药时抵抗不剧烈,接近于对照组大鼠的表现,提示给药组大鼠状态有所改善。

3.2 对 SHR 尾动脉 SBP 的影响

对照组给药前 SBP 明显低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.01$);随着给药时间的延长,模型组大鼠保持较高的 SBP 水平;与模型组比较,各给药组给药后大鼠 SBP 明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 、0.01)。各给药组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表 1。

3.3 对 SHR 血浆 ADMA、Ang II、AT1R 水平的影响

与模型组比较,对照组大鼠血浆中 ADMA、Ang II 水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,低剂量钩藤碱能显著降低血浆中 ADMA、Ang II、AT1R 水平($P < 0.01$),中、高剂量钩藤碱能显著降低血浆中 Ang II 水平($P < 0.01$);与卡托普利组相比,钩藤碱各剂量组降低血

表1 各组给药前后 SHR 尾动脉 SBP 的比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 1 Comparison on tail artery SBP value before and after administration in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	给药前 SBP / kPa	给药后 SBP / kPa		
			7 d	14 d	21 d
对照	—	14.13 ± 1.31**	13.79 ± 0.85**	12.91 ± 1.00**	12.73 ± 1.06**
模型	—	19.92 ± 0.73	21.02 ± 1.74	20.25 ± 0.97	21.12 ± 0.84
卡托普利	6.25	19.30 ± 0.68	17.91 ± 1.56**	18.17 ± 1.29**	18.59 ± 0.89**
钩藤碱	1.25	20.28 ± 0.57	17.85 ± 1.14**	18.95 ± 0.66*	18.28 ± 0.96**
	2.50	20.17 ± 1.03	17.72 ± 1.37**	18.47 ± 0.95**	18.97 ± 0.82**
	5.00	20.89 ± 1.16	19.57 ± 1.82*	18.96 ± 0.91*	18.55 ± 1.30**

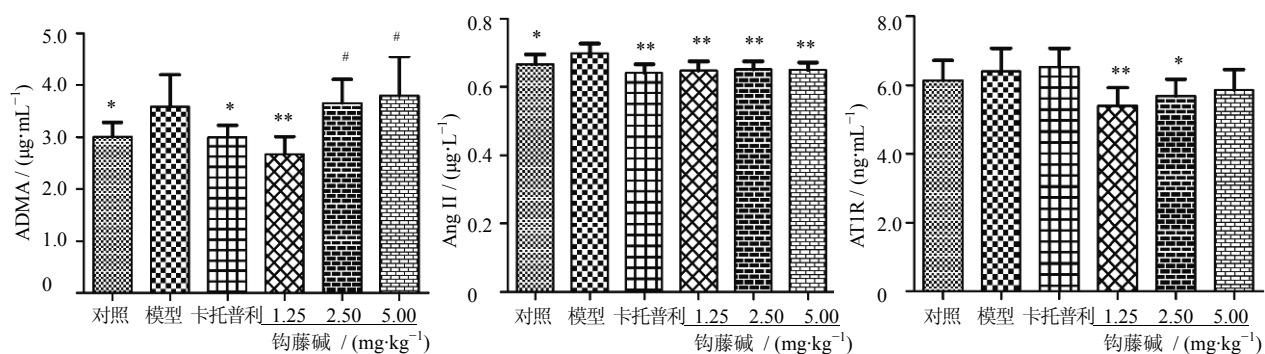
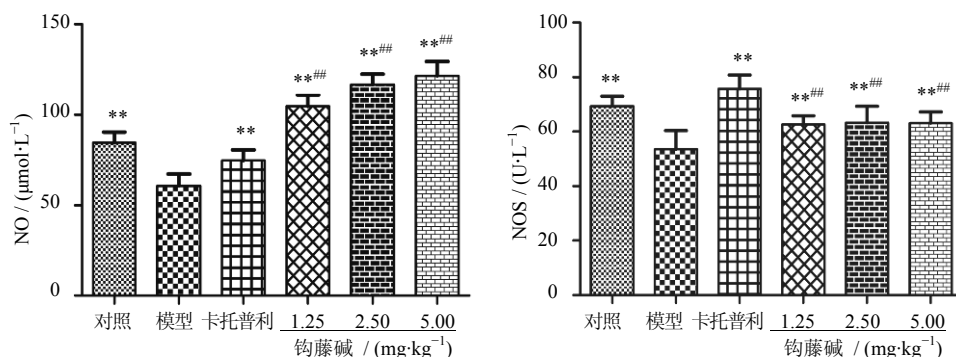
与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

浆中 Ang II、AT1R 水平的作用无显著差异 ($P > 0.05$); 而高、中剂量钩藤碱对血浆中 ADMA 并未显现明显的降低作用, 与卡托普利组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见图 1。

3.4 对 SHR 血清 NO 和 NOS 水平的影响

与模型组比较, 对照组大鼠血清 NO 和 NOS 水

平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 各给药组血清 NO 和 NOS 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与卡托普利组比较, 钩藤碱各剂量组血清 NO 水平显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 钩藤碱各剂量组血清 NOS 水平升高不明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果见图 2。

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与卡托普利组比较: # $P < 0.05$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; # $P < 0.05$ vs Captopril group图1 钩藤碱对 SHR 血浆 ADMA、Ang II 和 AT1R 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Fig. 1 Effect of rhynchophylline on levels of ADMA, Ang II, and AT1R in plasma of SHR ($\bar{x} \pm s, n=8$)与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与卡托普利组比较: ## $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; ## $P < 0.01$ vs Captopril group图2 钩藤碱对 SHR 血清 NO 和 NOS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Fig. 2 Effect of rhynchophylline on levels of NO and NOS in serum of SHR ($\bar{x} \pm s, n=8$)

4 讨论

SHR 与人类高血压疾病发生的病理生理机制相似,是目前应用较为广泛的高血压模型。随着高血压对人类生命健康的危害性不断加剧,目前有关中药在降压方面的研究也不断的增多,如无患子皂苷^[5]、罗布麻叶总黄酮^[6]等均具有显著的降压作用。钩藤的现代药理学研究表明,其对心脑血管系统具有较明显的作用,包括降压、逆转心肌重构、抗心律失常等。

血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)可释放多种舒张、收缩血管因子,共同调节血管张力、维持血压的稳定,NO 就是其中一个重要的舒张血管因子,高血压状态下,血管痉挛收缩引起 VEC 缺血缺氧,导致血管内皮结构和功能损伤,进一步影响 NO 的合成和分泌。

研究证明 ADMA 是 NOS 的强烈抑制剂^[7],被认为是 VEC 损害的一种重要的危险因素,在高血压的发病机制中起着重要作用。有研究显示虎杖苷在 ADMA 存在时,能非竞争性拮抗正常家兔主动脉血管条对苯肾上腺素的收缩反应^[8]。ADMA 是一种主要的内源性 NOS 抑制物,它能竞争性抑制 NOS 活性,Veresh 等^[9]研究表明 ADMA 可能是通过激活血管肾素-血管紧张素系统(RAS)还原型辅酶 II(NADPH)氧化通路,诱导氧化应激,加快 NO 灭活,降低了 NO 的生物利用度,从而导致了 NO 介导的血管扩张作用降低,进而引发血管内皮功能障碍^[10]。ADMA 是一个调节内源性 NO 生成的系统,血浆中 ADMA 通过抑制 NO 的合成降低血管的顺应性、增加血管阻力,加快血压疾病的进程并增加发生心血管事件的风险,因此该系统的稳定对维持血管内皮功能起关键作用。

高血压属中医“眩晕”、“头痛”、“肝风”等范畴。钩藤归心、肝经,具有清热平肝、熄风止痉的功效,有明显的降压、镇静、加速血流、降低血管阻力等作用。本研究发现,钩藤碱可以有效降低 SHR 的血压,降低血浆 ADMA、Ang II、AT1R 水平,升高血清 NO 和 NOS 水平,具有保护血管内皮功能的作用。其作用机制可能是促进 ADMA 在体内的水解代谢,一方面阻断其激活 RAS,从而减

少 Ang II 生成,抑制 AT1R 活性,降低了其对血管壁的损伤作用;另一方面降低其竞争性抑制 NOS 与 L-精氨酸的结合位点,从而促进 VEC 释放舒血管物质 NO,因此达到扩张血管、降低血压的作用。本研究后续部分将进行分子生物学、细胞信号转导、蛋白质组学的深入研究,为钩藤碱的临床应用提供更有效的实验支持和科学依据。

参考文献

- [1] 边云飞. 氧化应激与心血管疾病 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2012.
- [2] Vasilev V, Matrozoza J, Elenkova A, *et al.* Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1) as circulating markers for endothelial dysfunction in patients with pheochromocytoma [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2013, 121: 551-555.
- [3] 辛文波, 桂新, 王峥涛. 钩藤生物碱类成分研究 [J]. *中草药*, 2009, 40(2): 204-207.
- [4] 宋纯清, 樊懿, 黄伟晖, 等. 钩藤中不同成分降压作用的差异 [J]. *中草药*, 2000, 31(10): 762-764.
- [5] 陈明, 陈志武, 龙子江, 等. 无患子皂苷对自发性高血压大鼠降压及内皮损伤保护作用的实验研究 [J]. *中成药*, 2012, 34(10): 1999-2004.
- [6] 李芝, 王超云, 张树平, 等. 罗布麻叶总黄酮对高脂高盐大鼠高血压的影响及其分子机制 [J]. *中草药*, 2012, 43(3): 540-545.
- [7] Martin S, Priit K, Jaak K, *et al.* Association between asymmetric dimethylarginine and indices of vascular function in patients with essential hypertension [J]. *Blood Press*, 2011, 20: 111-116.
- [8] 秦俭, 陈运贞, 周岐新. 虎杖苷对 ADMA 作用的正常兔主动脉血管条内皮功能的影响 [J]. *中草药*, 2004, 35(5): 535-538.
- [9] Veresh Z, Debreczeni B, Hamar J, *et al.* Asymmetric dimethylarginine reduces nitric oxide donor-mediated dilation of arterioles by activating the vascular renin-angiotensin system and reactive oxygen species [J]. *J Vasc Res*, 2012, 49: 363-372.
- [10] Ando R, Ueda S, Yamagishi S, *et al.* Involvement of advanced glycation end product-induced asymmetric dimethylarginine generation in endothelial dysfunction [J]. *Diabet Vasc Dis Res*, 2013, 10(5): 436-441.