

- Med Mater(中药材), 2010, 34(3): 404-408.
- [4] LEI G, WANG M G, CHEN K M, et al. Effect of osthon on apoptosis and bone resorption of osteoclasts cultured *in vitro* [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2012, 47(2): 174-179.
- [5] MING L G, Ge B F, CHEN K M, et al. Effect of osthon on the proliferation and differentiate of osteoblasts *in vitro* [J]. China J Orthop Trauma(中国骨伤), 2010, 23(9): 688-691.
- [6] SATIR P, PEDERSEN L B, CHRISTENSEN S T. The primary cilium at a glance [J]. Cell Sci, 2010, 123(4): 499-503.
- [7] IZAWA I, GOTO H, KASAHARA K, et al. Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle [J]. Cilia, 2015, 4(1): 1-13.
- [8] FUJII K. Primary cilia and hedgehog signaling [J]. No to Hattatsu, 2015, 47(4): 259-265.
- [9] PRAETORIUS H A. The primary cilium as sensor of fluid flow: new building blocks to the model. A review in the theme: cell signaling: proteins, pathways and mechanisms [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2015, 308(3): 198-208.
- [10] MING L G, Ge B F, CHEN K M, et al. Effects of osthon on bone marrow stromal stem cell differentiation and proliferation *in vitro* [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2010, 26(8): 1098-1103.
- [11] CIVITELLI R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage [J]. Arch Biochem Biophys, 2008, 473(2): 188-192.
- [12] YUAN X, SERRA R A, YANG S. Function and regulation of primary cilia and intraflagellar transport proteins in the skeleton [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2015, 31: 78-99.
- [13] CHEN K M, GE B F, MA H P, et al. Icariin, a flavonoid from the herb *Epimedium* enhances the osteogenic differentiation of rat primary bone marrow stromal cells [J]. Pharmazie, 2005, 60(12): 939-942.
- [14] CHEN K M, GE B F, MA H P, et al. The serum of rats administered flavonoid extract from *Epimedium sagittatum* but not the extract itself enhances the development of rat calvarial osteoblast-like cells *in vitro* [J]. Pharmazie, 2004, 59(1): 61-64.

收稿日期: 2016-01-28

葛根素对高血压大鼠内皮功能障碍的影响

李晓洁^{a,b}, 林宇涵^a, 刘彦彬^a, 黄蕾^a, 周明生^{a*} (锦州医科大学, a.生理教研室; b.附属第一医院, 辽宁 锦州 121000)

摘要: 目的 研究葛根素对血管紧张素(angiotensin, Ang) II 诱导的高血压大鼠的影响, 并探讨其改善内皮功能的机制。

方法 SD 大鼠随机分为对照组、Ang II 组和葛根素组。Ang II 组连续 5 d 泵入 Ang II (0.7 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 葛根素组在泵入 Ang II 前 10 d 采用葛根素注射液腹腔注射(100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)进行干预。采用尾动脉法测量收缩压, 用血管张力测量灌流系统测量内皮依赖性舒张功能(endothelium-dependent relaxation, EDR)。Western blot 测量血管内相关蛋白的表达。

结果 葛根素能明显降低 Ang II 诱导的大鼠高血压水平($P < 0.05$), 减轻 Ang II 引起的动脉内膜增厚和心肌细胞的肥大。和对照组相比, Ang II 组能削弱动脉血管的 EDR, 同时降低 p-eNOS(Ser 1177)的表达, 增强 gp91 phox(85%), p22 phox(113%)的表达, 而葛根素能改善 EDR, 并逆转 Ang II 引起的蛋白量的变化。

结论 在 Ang II 诱导的高血压大鼠中, 葛根素能降低血压, 保护内皮功能及靶器官免受损伤。葛根素具有心血管保护作用, 机制可能和自身抗氧化及上调 p-eNOS 的作用有关。

关键词: 血管紧张素 II; 葛根素; 内皮功能; 高血压; 氧化应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2016)07-0841-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.07.002

Influence of Puerarin on Endothelial Dysfunction in Hypertensive Rats

LI Xiaojie^{a,b}, LIN Yuhan^a, LIU Yanbin^a, HUANG Lei^a, ZHOU Mingsheng^{a*} (Liaoning Medical University, a. Department of Physiology; b. The First Affiliated Hospital, Jinzhou 121000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of puerarin on endothelial function in angiotensin (Ang) II-induced hypertensive rats as well as the underlying mechanism of improving endothelial function. **METHODS** SD rats were randomly divided into control, Ang II and puerarin groups. The rats of Ang II groups were infused with Ang II (0.7 mg·kg⁻¹·d⁻¹ implanted by mini-pump) for 5 d while the rats of puerarin group were treated with puerarin (100 mg·kg⁻¹·d⁻¹) for 10 d followed by Ang II and puerarin for 5 d. The systolic blood pressure (SBP) was measured by tail-cuff method. Endothelium-dependent

基金项目: 国家自然科学基金项目(81470532)

作者简介: 李晓洁, 女, 硕士生 Tel: 18841608985 E-mail: qianxun326@126.com *通信作者: 周明生, 男, 博士, 教授 Tel: 18104068992 E-mail: zhousm1963@163.com

中国现代应用药学 2016 年 7 月第 33 卷第 7 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2016 July, Vol.33 No.7

• 841 •

relaxation (EDR) to acetylcholine was determined using organ chamber bath. Expression of the protein in the aortic tissue was determined by Western blot analysis. **RESULTS** Puerarin significantly reduced SBP ($P<0.05$), aortic and LV hypertrophy in Ang II-infused rats. Puerarin also reduced aortic medial thickness and myocardial cell surface area in Ang II-infused rats. Compared with the rats in control group, Ang II infused rats exhibited an impaired EDR with reduction in the protein expression of phosphor-eNOS at ser 1177 and increase the expression of gp91phox (85%), p22phox (113%). Puerarin improved EDR and reversed the changes of Ang II-induced protein expression of above molecules. **CONCLUSION** Puerarin reduced blood pressure, improved endothelial function and end organ damage in Ang II-induced hypertensive rats, the anti-oxidant and upregulation of phosphor-eNOS of puerarin may in part contribute to its cardiovascular protective effects.

KEY WORDS: angiotensin II; puerarin; endothelial function; hypertension; oxidative stress

高血压是心血管疾病发生与发展的主要危险因素, 长期的高血压会导致心、脑、肾、血管等靶器官严重损害, 严重影响疾病的预后。因此, 稳定血压、预防和改善高血压所导致的靶器官的损害, 是治疗高血压的重中之重。高血压损害的靶器官主要是血管内皮。研究发现, 在高血压发生的初期即出现不同程度的内皮功能不全的表现, 发生的机制主要与 NO 的生物利用率降低和氧化产物尤其是超氧阴离子的增加有关^[1]。另外, 研究发现, 血管紧张素(angiotensin, Ang) II 通过刺激血管膜表面的 NADH/NADPH 氧化酶产生活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS), 使得 NO 生物活性降低, 直接造成内皮功能损害、血管炎症及血管重塑^[2], 是形成高血压的重要原因^[3]。因此, 改善内皮功能将给高血压患者带来福音。

葛根素是从中药葛根中提取出来的一种异黄酮类化合物, 具有降低血压、改善心血管循环、抗粥样硬化、抑制炎症等药理作用^[4], 目前已广泛应用于心血管及脑血管疾病的临床治疗, 包括心肌梗死、脑卒中、心绞痛和高血压等^[5]。本研究研究了葛根素对 Ang II 诱导的高血压大鼠的内皮功能及靶器官的影响, 进一步阐明葛根素保护内皮功能及靶器官的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 动物

6 周龄 SD 大鼠 16 只, 体重 260~280 g, 清洁级, ♂, 购买于辽宁医学院实验动物中心。合格证号: SYXK(辽)2015-0030。

1.2 仪器与试剂

Ang II(美国 Sigma, 批号: RN4474-91-3, 规格: 10 mg); 葛根素注射液(济南利民制药有限公司, 批号: H20043489, 规格: 2 mL : 0.1 g); 1007D Model 植入式胶囊渗透压泵(美国 Alzet); p-eNOS(ser-1177, 美国 Cell Signaling, 批号: #9571,

规格: 100 μ L); p22phox(美国 Santa, 批号: sc-21870, 规格: 100 μ L)、gp91phox(美国 Santa, 批号: sc-5827, 规格: 100 μ L); 720M 型多通道血管灌流系统(德国 DMT 公司); BP-98A 大小鼠无创血压测量系统(北京软隆生物技术有限公司); BX51 显微镜(奥林巴斯); 电泳及转印系统(BioRad)。

1.3 方法

SD 大鼠常规饲养 2 周以适应环境, 实验前用尾动脉法测收缩压(systolic blood pressure, SBP), 筛选出符合条件的大鼠(体质量 260~280 g, SBP 100~120 mmHg)。腹腔注射 5%水合氯醛($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉, 在其肩胛部切口, 植入胶囊泵, 随机分为 3 组, 即对照组($n=6$): 仅在其肩胛部切口、缝合; Ang II 组($n=5$): 持续 5 d 泵入 Ang II $0.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 葛根素组($n=5$): 腹腔注射葛根素注射液($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)15 d, 第 11 天开始泵入 Ang II $0.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。干预结束后测量 SBP, 处死大鼠, 迅速分离出血管及左心室。获得左心室重量(left ventricular, LV), 计算左心室相对重量(LV/BW)及血管相对重量($\text{mg} \cdot \text{cm}^{-1}$)。

1.4 血管环张力试验

通过检测不同浓度($10^{-9} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)对去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)预收缩血管的内皮依赖性舒张功能(endothelium-dependent relaxation, EDR)的反应, 以 NE 引起的血管收缩幅度为分母, 用不同浓度的 Ach 的血管收缩幅度与之相比的百分比表示血管舒张能力。

1.5 组织学分析

取胸主动脉(0.5 cm)及左心室的一部分, 用 4% 福尔马林固定 24 h 及以上, 30%蔗糖脱水至组织沉底, PBS 洗脱 2~3 遍, 于 -20°C 冰冻切片机中用 OCT 包埋后切片($4 \mu\text{m}$), 然后经 HE 染色, 在显微

镜下观察,并用 IPP 6.0 软件测量血管壁厚度(每组选取至少 5 个视野的血管壁厚度)及心肌细胞大小(每组测定 100 个心肌细胞大小)。

1.6 Western blot

采用 Western blot 分析动脉组织中 p-eNOs (ser-1177)、NADPH 氧化酶的 2 个亚基 p22phox、gp91phox 表达。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,

多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 葛根素对 SBP、动脉重量、LV/BW 的影响

与 Ang II 组相比,葛根素能轻度降低血压 ($P < 0.05$),减轻 Ang II 诱导的血管肥厚,甚至使其接近正常,能显著降低 Ang II 导致的左心室增厚,结果见图 1。HE 染色进一步证实葛根素能明显改善 Ang II 引起的心肌肥厚及血管肥厚,结果见图 2。

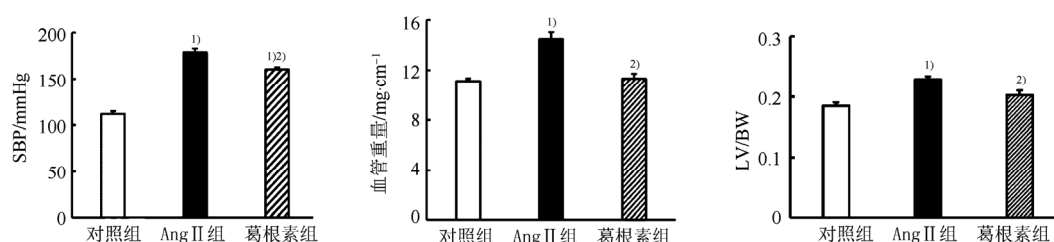


图 1 葛根素对泵入 Ang II 的大鼠的影响

与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 Ang II 组比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 1 Effects of puerarin on Ang II-infused rats

Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with Ang II group, ²⁾ $P < 0.05$.

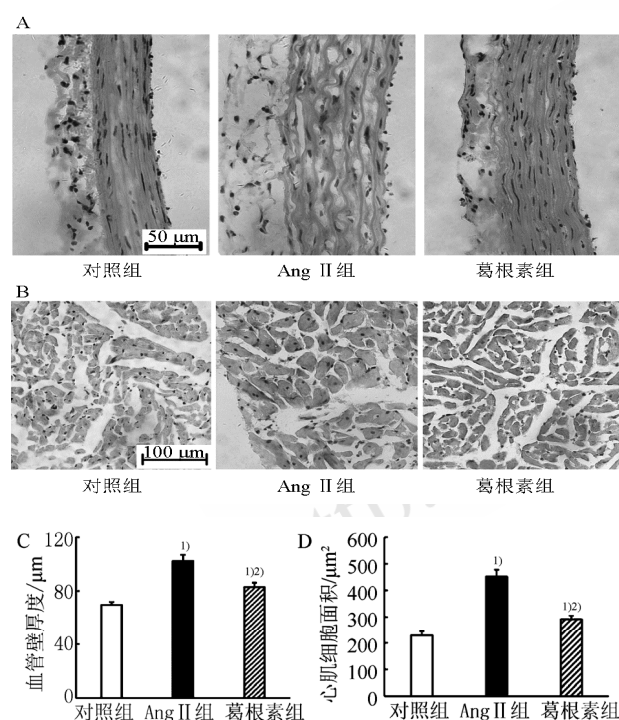


图 2 葛根素对 LV 和动脉 HE 组织学观察(HE 染色)

A—动脉壁; B—心脏; C—动脉血管壁厚度定量分析结果; D—心肌细胞面积定量分析结果; 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 Ang II 组比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 2 Histological examination of LV and aortic hypertrophy treated with puerarin(HE staining)

A—aortic wall; B—heart; C—the quantitative analysis of aortic wall thickness; D—the quantitative analysis of myocardial cell area; compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with Ang II group, ²⁾ $P < 0.05$.

2.2 葛根素对 Ang II 诱导的 NADPH 氧化酶的活化的影响

与对照组相比,Ang II 能显著增加 NADPH 氧化酶的 2 个亚基 gp91phox(85%, $P < 0.05$)和 p22phox(113%, $P < 0.05$)的蛋白表达量。与 Ang II 组相比,葛根素组能抑制 gp91phox 和 p22phox 的蛋白表达量。结果见图 3。

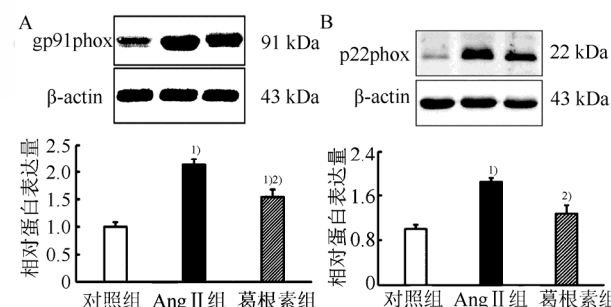


图 3 葛根素对泵入 Ang II 的大鼠的 NADPH 氧化亚基表达的影响

A—p22phox; B—gp91phox; 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 Ang II 组比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Effects of puerarin on the protein expression of NADPH oxidase subunits in the aorta in Ang II-infused rats

A—p22phox; B—gp91phox; compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with Ang II group, ²⁾ $P < 0.05$.

2.3 葛根素对 p-eNOs 表达的影响

与对照组相比,Ang II 使 p-eNOs(Ser 1177)表达明显减少,葛根素组则能阻止 p-eNOs(Ser 1177)

的下降。和对照组相比, Ang II 组 EDR 明显受损, 葛根素明显改善血管环 EDR。结果见图 4。

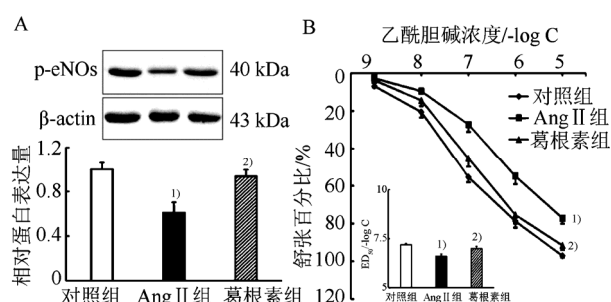


图 4 葛根素对内皮功能的影响

A—大鼠 p-eNOS(ser 1177)表达; B—大鼠 EDR; ED₅₀ 是血管达到最大舒张能力一半时所需要的 Ach 的浓度; 与对照组比较, ¹⁾P<0.05; 与 Ang II 组比较, ²⁾P<0.05。

Fig. 4 Effects of puerarin on endothelial function

A—the expression of phosphor-eNOS at ser 1177 in rats; B—EDR in rats; ED₅₀ was the concentration of acetylcholine required for a half-maximal response; compared with control group, ¹⁾P<0.05; compared with Ang II group, ²⁾P<0.05.

3 讨论

高血压是增加心血管疾病发病率和死亡率主要的流行性危险因素^[6]。高血压主要是通过激活肾素血管紧张素系统促使 Ang II 分泌增加, 作用于 Ang II 1 型受体(AT₁R)产生强效的缩血管效应, 此外, Ang II 还通过激活 NADPH 氧化酶, 产生大量的氧自由基, 使内皮 NO 生成减少, 生物利用率大大降低, 直接造成内皮损伤, 表现为内皮的依赖性舒张功能减弱, 收缩功能增强, 出现血管结构的重塑^[7]。本实验结果显示, 泵入 Ang II 的确能使大鼠动脉中 NADPH 氧化酶的 2 个亚基 gp91phox 和 p22phox 的表达显著增高, p-eNOS 的表达降低, 打破氧自由基生成与清除的内在平衡系统, 产生氧化应激效应, 进而损伤血管内皮, 使其形成高血压的病理状态。葛根素能逆转 Ang II 引起的 p-eNOS 下降, 促使血管内 NO 的生成, 同时还能抑制氧化应激反应^[8]。减少 ROS 的生成, 修复 eNOS/NO, 抑制氧化应激, 可能是葛根素改善内皮功能的主要机制。另外, 长期的高血压会使靶器官(心、脑、肾、血管等)严重受损, 而葛根素在有效降低血压的同时, 还能减轻血管、心室肥厚^[9], 机制可能与其保护内皮功能, 改善舒张功能有关。本实验结果表明, 葛根素可以降低血压, 对靶器官起到保护作用, 对延缓高血压病程发展及预后具有重要意义。

葛根素治疗的大鼠血压虽有明显的下降, 但血压仍在高血压范围内, 然而却明显的改善了内皮功能, 修复了 p-eNOS/NO 的平衡, 减轻氧化应激状态。因此, 葛根素的降压作用或许是其改善血管功能和结构、修复血管收缩和舒张因子的平衡的结果。

在传统中药临床实践中, 葛根素对于治疗心血管疾病有极大的益处。研究发现, 葛根素不仅对高血压有降压功效, 而且还能缓解高血压靶器官损伤, 对心血管系统有多方面的保护作用, 包括抗氧化, 保护 eNOS/内皮功能、抗炎等作用^[4,10]。这些益处减慢了疾病中血管结构重塑及功能异常的进程, 从而保护靶器官免受其害。本实验为葛根素作为一种新型策略治疗高血压及其相关心血管疾病提供了科学依据。

REFERENCES

- [1] PERTICONE F, CERACOLO R, PUJIA A, et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients [J]. *Circulation*, 2001, 104(2): 191-196.
- [2] DIKALOV S I, NAZAREWICZ R R, BIKINEYEVA A, et al. Nox2-induced production of mitochondrial superoxide in angiotensin II-mediated endothelial oxidative stress and hypertension [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(2): 281-294.
- [3] ZHAO Y, FLAVAHAN S, LEUNG S W, et al. Elevated pressure causes endothelial dysfunction in mouse carotid arteries by increasing local angiotensin signaling [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(4): H358-363.
- [4] 崔书霞, 田炜, 郝志梅. 葛根素对心脏疾病的保护作用[J]. *广东医学*, 2013, 34(7): 1139-1140.
- [5] WEI S Y, CHEN Y, XU X Y. Progress on the pharmacological research of puerarin: A review [J]. *Chin J Nat Med(中国天然药物)*, 2014, 12(6): 407-414.
- [6] MORAN A E, ODDEN M C, THANATAVEERAT A, et al. Cost-effectiveness of hypertension therapy according to 2014 guidelines [J]. *New Engl J Med*, 2015, 372(5): 447-455.
- [7] ZHAO G S. New conception of antihypertension treatment: endothelium-nitric oxide-oxidation stress chain [J]. *Nat Med J China(中华医学杂志)*, 2003, 83(7): 532-533.
- [8] LI N, HAO Z M, CUI S X, et al. Protective effects of Ge Gensu on oxidative stress injury of myocardial cell [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med(中国中医基础医学杂志)*, 2014, 20(11): 1501-1503.
- [9] CHEN G, PAN S Q, SHEN C, et al. Puerarin inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy via the redox-sensitive ERK1/2, p38 and NF-κB pathways [J]. *Acta Pharmacol Sin(中国药理学报)*, 2014, 35(4): 463-475.
- [10] LU J P, REN J H, YAO S Y. Protective effect of puerarin on myocardial ischemia and reperfusion injury [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2004, 21(4): 268-271.

收稿日期: 2016-02-25