

# 天麻钩藤饮对自发性高血压大鼠血管功能及肾脏蛋白表达的影响

栗源<sup>1</sup> 可燕<sup>2</sup> 蒋嘉烨<sup>2</sup> 李晓军<sup>1</sup> 江永波<sup>1</sup>

**摘要** **目的** 探讨天麻钩藤饮对自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)血管内皮功能和肾脏蛋白表达的影响及其可能机制。**方法** 6 周龄 SHR 18 只,按照随机区组设计分为 SHR 空白组、天麻钩藤饮组与卡托普利组,每组 6 只。同时设同周龄 Wistar Kyoto(WKY)大鼠 6 只为 WKY 对照组。天麻钩藤饮组给药量为 10.26 g/(kg·d),卡托普利组给药量为 3.375 g/(kg·d),大鼠 6~24 周龄每天灌胃 1 次,同时 SHR 空白组和 WKY 对照组按 2 mL/100 g 灌胃蒸馏水。各组大鼠每 2 周检测 1 次血压变化;采用血管环舒张度实验法测定肠系膜上动脉与胸主动脉舒张度以反映内皮功能;通过双向电泳分离肾脏总蛋白,Western blot 法验证显著差异蛋白。**结果** (1)与 SHR 空白组比较,卡托普利组(10~24 周龄)血压下降明显( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ );天麻钩藤饮组在血压升高初期(10~12 周龄)降压效果明显( $P < 0.01$ ),随着高血压进程的发展,降压效果不明显( $P > 0.05$ )。(2)与 SHR 空白组比较,天麻钩藤饮组肠系膜上动脉血管舒张度得到明显改善( $P < 0.05$ ),WKY 对照组肠系膜上动脉及胸主动脉血管舒张度明显优于 SHR 空白组( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ );而卡托普利组各指标差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。(3)肾脏蛋白的双向电泳分析:双向电泳发现 16 个显著差异肾蛋白,主要涉及一氧化氮系统、氧化应激及细胞骨架蛋白。Western blot 结果显示:天麻钩藤饮对 Cu-Zn 超氧化物歧化酶(Cu-Zn SOD)、4- $\alpha$ -氨基甲喋呤脱水酶 1(PCBD1)、精氨酸二甲基氨基水解酶 2(DDAH2)的表达有明显改善作用( $P < 0.05$ )。**结论** 天麻钩藤饮对 SHR 大鼠肠系膜上动脉舒张功能具保护作用,其对高血压早期肾损伤的干预机制可能与调节一氧化氮系统与抗氧化应激相关。

**关键词** 自发性高血压大鼠;天麻钩藤饮;双向电泳;血管内皮功能

Effect of Tianma Gouteng Decoction on the Endothelial Function and the Renal Protein Expression in Spontaneously Hypertensive Rats LI Yuan<sup>1</sup>, KE Yan<sup>2</sup>, JIANG Jia-ye<sup>2</sup>, LI Xiao-jun<sup>1</sup>, and JIANG Yong-bo<sup>1</sup> 1 College of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203), China; 2 Experimental Center for Teaching and Learning, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203), China

**ABSTRACT** **Objective** To observe the effect of Tianma Gouteng Decoction (TGD) on the endothelial function and the renal protein expression of spontaneously hypertensive rats, and to analyze its possible mechanism. **Methods** Totally 18 6-week-old SHR were randomly divided into 3 groups according to randomized block design, the SHR control group, the TGD group, and the captopril group, 6 in each group. Meanwhile, Wistar Kyoto (WKY) rats of the same age were recruited as a WKY control group. Rats in the TGD group were administered with TGD at the daily dose of 10.260 g/kg. Rats in the captopril group were administered with captopril at the daily dose of 3.375 g/kg. 2 mL/100 g distilled water was administered to rats in the SHR control group and the WKY control group. All medication was performed by gastrogavage once per day till rats were 24 weeks old. Changes of blood pressure were measured once per two weeks. The relaxation of the thoracic aorta and the superior mesenteric artery was determined by vascular ring *in vitro* to reflect the endothelial function. The total renal protein was separated by two-dimensional electropho-

基金项目:上海市卫生局中医药科研基金资助项目(No. 2012J008A);上海高校青年教师培养资助计划(No. shzy017)

作者单位:1.上海中医药大学中药学院(上海 201203);2.上海中医药大学教学实验中心(上海 201203)

通讯作者:可燕, Tel:021-51322539, E-mail:keyantcm@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.04.0481

resis (2-DE). The significantly deviated protein was verified by Western blot. Results (1) Compared with the SHR control group, blood pressure was significantly lowered in rats (10–24 weeks old) of the captopril group ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). The hypotensive effect of TGD was obvious at the beginning of hypertension (10–12 weeks) ( $P < 0.01$ ). But along with the progression of hypertension, its hypotensive effect was not obvious ( $P > 0.05$ ). (2) Compared with the SHR control group, the relaxation of the superior mesenteric artery was obviously improved in the TGD group ( $P < 0.05$ ); the relaxation of the thoracic aorta and the superior mesenteric artery was obviously superior in the WKY control group ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). But there was no statistical difference in each relaxation index between the captopril group and the SHR control group ( $P > 0.05$ ). (3) Results of 2-DE found 16 significantly differential renal protein, mainly involved nitric oxide (NO) system, oxidative stress, and cytoskeleton-related proteins. Results of Western blot showed that TGD could significantly improve expressions of Cu-Zn superoxide dismutase (SOD), N(G), N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 (DDAH2), and pterin-4- $\alpha$ -carbinolamine dehydratase 1 (PCBD1) ( $P < 0.05$ ). Conclusion TGD could protect the endothelial function of the superior mesenteric artery in SHR, and its intervention mechanism of hypertension induced early renal injury might be relevant to regulating the NO system and antioxidative stress.

**KEYWORDS** spontaneously hypertensive rat; Tianma Gouteng Decoction; two-dimensional electrophoresis; endothelial function

天麻钩藤饮选自《中医内科杂病证治新议》，功用平肝熄风、清热活血、补益肝肾。临床广泛应用于治疗肝阳上亢型高血压病、眩晕、中风等神经系统相关疾病<sup>[1-3]</sup>。但有关天麻钩藤饮对高血压病作用机制的研究较少，有报道显示，天麻钩藤饮可以通过降低两肾一夹高血压模型大鼠血浆中的血管紧张素 II 和心肌醛固酮含量，对抗高血压引起的心肌纤维化<sup>[4,5]</sup>。

高血压病作为常见心血管疾病，其发展常与多种疾病密切相关，肾脏为高血压病的主要靶器官<sup>[6]</sup>。本实验比较了天麻钩藤饮与卡托普利对自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR) 血压和血管内皮功能的修复作用，同时采用双向电泳实验，观察天麻钩藤饮作用于 SHR 肾脏蛋白的表达变化，从而探讨其对于改善高血压的作用靶点及高血压造成肾损伤的相关机制。

## 材料与方法

**1 动物** SHR 18 只和 Wistar Kyoto (WKY) 大鼠 6 只，6 周龄，清洁级，雄性，体重约 300 g，购于上海斯莱克实验动物有限责任公司，动物许可证号：SCXK (沪) 2007-0005。

**2 药物** 天麻钩藤饮 (天麻 9 g 钩藤 12 g 生决明 18 g 山栀 9 g 黄芩 9 g 川牛膝 12 g 杜仲、益母草、桑寄生、夜交藤、朱茯神各 9 g)，购于上海康桥饮片厂 (天麻批号：080401，钩藤批号：080502，生决明批号：080509，山栀子批号：080427，黄芩批号：080606，川牛膝批号：080417，杜仲批号：

080711，益母草批号：080709，桑寄生批号：080619，夜交藤批号：080505，朱茯神批号：080521)，经上海中医药大学可燕教授鉴定为药典规定品种，据临床成人每日服用量，水提液浓缩至每毫升含生药 1.026 g。卡托普利 (规格：12.5 mg/片，中美上海施贵宝有限公司，批号：0809031)。

**3 主要试剂及仪器** 主要试剂：乙酰胆碱 (Acetylcholine, ACh)、去氧肾上腺素 (Phenylephrine, PE)、弗斯可林 (Forskolin, FSK)、尿素 (Urea)、3-[3-(胆酰胺基丙基)二甲胺基]丙磺酸盐 (CHAPS)、二硫苏糖醇 (DTT)、四甲基乙二胺 (TEMED)、碘乙酰胺 (Iodoacetamide)、过硫酸铵 (APS)、溴酚蓝 (Bromophenol Blue)，均购自 Sigma 公司；IPG 预制胶条 (pH 3~10, 17 cm, nonlinear)、载体两性电解质 (carrier ampholytes)、矿物油 (mineral oil)、低熔点琼脂糖封胶液，均购自 Bio-Rad 公司；丙烯酰胺 (Acrylamide)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、甘氨酸 (glycine)、十二烷基硫酸钠 (SDS) 均购自生工公司；ECL 显影液购自 Milipore；PCBD1 抗体为 Prosci 产品；精氨酸二甲基氨基水解酶 2 (DDAH2) 抗体为 Abcam 产品；铜锌超氧化物歧化酶抗体为 Enzo 产品；其他试剂均使用国产分析纯。

主要仪器：Powerlab 8/30 8 通道多功能生理记录仪 (AD Instruments 公司，澳大利亚)，PROTEAN IEF System 型双向电泳等电聚焦仪 (Bio-Rad 公司，美国)，PROTEAN II xi Cells 型垂直电泳仪 (Bio-Rad 公司，美国)，JY-ZY5 型 western 电泳仪 (Bio-Rad 公司，

美国),GS-800 型凝胶扫描成像系统(Bio-Rad 公司,美国),Forma 705 型超低温冰箱(Thermo,美国),D-78532 型高速冷冻离心机(Eppendorf,德国),ZF3000001 型纯水装置(Millipore,美国),4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer 串联飞行时间质谱仪(ABI,美国),JY92-2D 型高速超声匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司),SPECTRAMX 190 连续波长酶标仪(Molecular Devices,美国)。

**4 动物分组及干预方法** 将 18 只 SHR 按照随机区组设计分为天麻钩藤饮组、卡托普利组与 SHR 空白组,每组 6 只,同时 6 只相对应周龄的 WKY 大鼠作为 WKY 对照组。天麻钩藤饮组给药量为 10.26 g/(kg·d),卡托普利组为 3.375 g/(kg·d),给药剂量均按照体表面积法换算,相当于临床成人用量的 6.3 倍,两组大鼠分别从 6 周龄开始,每天各灌胃给药 1 次,按 2 mL/100 g 体重给药,从 6 周龄开始连续给药至大鼠 24 周龄,每周称重 1 次,根据体重调整灌胃药量,直至 24 周龄时处理。同时 SHR 空白组和 WKY 对照组按 2 mL/100 g 灌胃蒸馏水。

## 5 观察指标及检测方法

**5.1 大鼠血压变化** 采用 Powerlab 仪记录动脉压,6 周起每 2 周用无创鼠尾动脉血压测定系统监测血压变化,24 周龄时颈动脉插管测定血压。

**5.2 血管环舒张度检测** 参照文献[7]。取各组动物的肠系膜上动脉与胸主动脉,置于 Krebs-Henseleit (K-H)工作液(pH 7.4)中,清除血管周围结缔组织,将动脉剪成约 4 mm 的血管环。置于 4 mL、37 ℃ 的恒温浴槽内,槽内持续充入 95% O<sub>2</sub> 与 5% CO<sub>2</sub> 混合气体。血管环一端固定于槽底,另一端连接张力换能器,并给予 1.5 g 的静息拉力,每 20 min 换液 1 次。在平衡 60 min 后,给予 60 mmol/L 的氯化钾(KCl)预收缩 2 次,而后加入 10<sup>-6</sup> mol/L 的 PE 收缩,待血管拉力达坪值,依次加入梯度浓度的 ACh (10<sup>-9</sup> mol/L、10<sup>-8</sup> mol/L、10<sup>-7</sup> mol/L、10<sup>-6</sup> mol/L 和 10<sup>-5</sup> mol/L),根据 ACh 10<sup>-5</sup> mol/L 浓度的舒张度比较给药组与空白组的舒张性差异,从而判断内皮功能。

## 5.3 肾脏蛋白的双向电泳分析

**5.3.1 肾脏总蛋白的提取及含量测定** 将天麻钩藤饮组、SHR 空白组与 WKY 对照组的肾脏组织经液氮研磨后加入蛋白裂解液中匀浆,冰上静置 2 h 后,在 4 ℃、14 000 r/min 条件下离心 1.5 h,取上清于 -80 ℃ 冰箱中分装保存。采用 Bradford 法测定蛋白含量,以水化上样缓冲液调整蛋白浓度至 225 μg/mL,将 IPG 预制

胶条在 20 ℃、50 V 电压条件下,主动水化 16 h。

**5.3.2 一向等电聚焦与二向 SDS-PAGE 凝胶电泳** 参照文献[8]。按照以下步骤依次设定 IPG 胶条升压:250 V 线性升压 1 h,1 000 V 快速升压 2.5 h 以除盐;10 000 V 线性升压 5 h 而后总计 60 000 V·h 的等电聚焦以使蛋白按照等电点充分聚焦,在 500 V 的低电压下保持胶条,直到取出。去除胶条表面矿物油,于 -80 ℃ 中速冻 15 min。以胶条平衡母液依次溶解 DTT 与碘乙酰胺,在 30 ℃ 以下依次平衡胶条 15 min,使聚焦后的胶条充分打开折叠蛋白。配置 20 cm × 20 cm × 1.5 mm,浓度为 12.5% 的聚丙烯酰胺凝胶,待凝胶完全凝固后,将已平衡的胶条与胶面完全贴合,以低熔点琼脂糖将胶面封住。经 7.5 h (1.5 h, 75 V 与 6 h, 200 V) 的凝胶电泳,得到肾脏总蛋白凝胶。

**5.3.3 凝胶的银染、分析、串联飞行时间质谱仪(MALDI-TOF/TOF MS)鉴定蛋白结构与检索** 采用硝酸银染色法使凝胶上的蛋白点显色,其步骤为固定、敏化、清洗、银染、清洗、显色、终止、清洗。将所得凝胶经 GS-800 扫描仪截取胶面图像,以 PDQuest 软件分析不同给药组间变化的蛋白点,根据 PDQuest 对图像的校正、点检测、匹配及校正,获取蛋白点的相应信息,根据其对蛋白点灰度值 Student-t 检验分析,选取  $P < 0.01$  的蛋白点进行 MALDI-TOF/TOF MS 鉴定。取目的蛋白进行胶内酶解,经水洗、脱色处理后,获得蛋白质肽混合样品。采用 4800 串联飞行时间质谱仪分析,PMF 质量扫描范围为 800 ~ 4 000 Da,选择信噪比 > 50 的母离子进行二级质谱(MS/MS)分析,每个样品点上选择 8 个母离子,MS/MS 激光激发 2 500 次。美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology, NCBI)数据库检索、获得相应蛋白质的信息<sup>[9]</sup>。

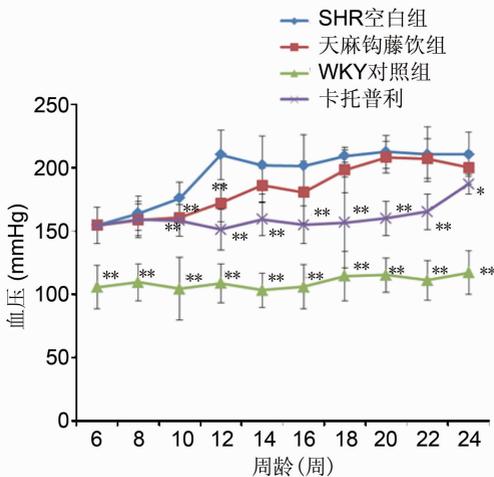
**5.4 Western blot 实验** 配置浓度为 12% 分离胶加 4% 堆积胶的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶,肾脏蛋白标定浓度后按 80 μg 上样量混合 loading buffer 于 95 ℃ 变性 10 min。经 75 V,3 h 电泳,采用湿转法将凝胶上的蛋白转移至 0.45 μm 的硝酸纤维素膜,以 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后孵育一抗,4-α-氨基喋呤脱水酶 1(PCBD1)(1:500)、DDAH2(1:300)、Cu-Zn 超氧化物歧化酶(Cu-Zn SOD)(1:1 000)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(1:5 000),于 4 ℃ 层析柜中过夜。次日取出后,TBST 清洗,PCBD1 及 SOD 加入抗兔(1:5 000),DDAH2 加入抗羊(1:5 000),常温下孵育 2 h 后 TBST 清洗。加入 ECL 结合

1 min,于暗室中拍片,压片时间 0.5~4 min。Quantity One 软件分蛋白析条带光密度值,目的蛋白的相对值=目的蛋白的光密度值/GAPDH 的光密度值)。

6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计分析软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1 各组大鼠给药后血压变化比较(图 1) SHR 空白组大鼠在 6 周龄血压已开始升高,在 16 周龄趋于稳定。与 SHR 空白组比较,卡托普利组(10~24 周龄)血压下降明显( $P < 0.01, P < 0.05$ ),天麻钩藤饮组在血压升高初期(10~12 周龄)有降压效果( $P < 0.01$ ),随着高血压进程的发展,虽有降低血压趋势,但降压效果不明显( $P > 0.05$ )。



注:与 SHR 空白组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图 1 各组大鼠给药后血压变化比较图

2 各组大鼠血管舒张度比较(表 1) 与 SHR 空白组比较,天麻钩藤饮组肠系膜上动脉血管在 ACh  $10^{-5}$  mol/L 浓度的舒张度明显改善( $P < 0.05$ ),WKY 对照组肠系膜上动脉及胸主动脉血管舒张度明显优于 SHR 空白组( $P < 0.01, P < 0.05$ ),而卡托普利组与 SHR 空白组血管舒张度比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

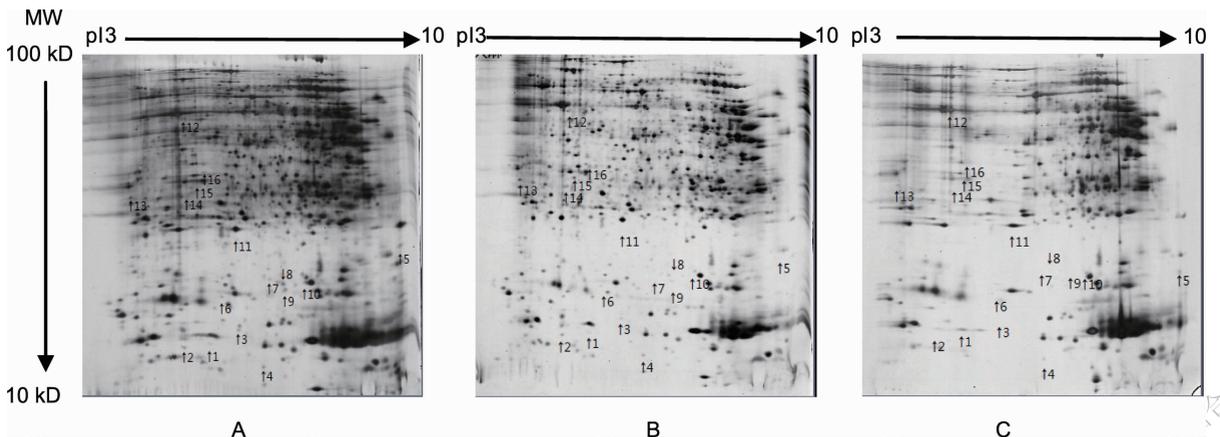
表 1 各组大鼠血管舒张度比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	血管舒张度	
		肠系膜上动脉	胸主动脉
SHR 空白	6	64.30 ± 12.61	42.20 ± 6.08
天麻钩藤饮	6	80.60 ± 11.45 *	49.83 ± 8.43
卡托普利	6	72.49 ± 13.15	50.78 ± 6.26
WKY 对照	6	92.43 ± 9.17 **	70.15 ± 6.24 *

注:与 SHR 空白组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

3 肾脏蛋白双向电泳分析结果(图 2,表 2) 双向电泳实验所得各图谱呈现(523 ± 16)个蛋白点。与 SHR 空白组比较,WKY 对照组有显著差异的蛋白点共有 90 个(> 2 - fold,  $P < 0.05$ ),天麻钩藤饮组具有显著差异的蛋白点共有 50 个(> 2 - fold,  $P < 0.05$ )。选取  $P < 0.01$  的 16 个蛋白进行质谱鉴定,发现 SHR 空白组与 WKY 对照组比较,显著变化蛋白集中在一氧化氮系统、氧化应激和能量代谢与细胞骨架蛋白等方面。

在 16 个蛋白中,与氧化应激和能量代谢有关的蛋白包括:ATP 酶 F 亚型、核苷二磷酸激酶 B、腺苷酸激酶同工酶 4、Cu-Zn 超 SOD、羟基酸氧化酶 2、质子 ATP 酶催化亚基 A 与果糖双磷酸酶 1。天麻钩藤饮对此均有明显的调节作用,尤其 SOD 的表达明显改善。与内皮功能相关的蛋白包括 PCBD1、热休克蛋白 60 与 DDAH2。双向电泳结果显示,经过天麻钩藤饮作用



注:A 为 SHR 空白组;B 为天麻钩藤饮组;C 为 WKY 对照组

图 2 各组大鼠肾脏双向电泳图谱

表 2 经 MALDI-TOF/TOF MS 鉴定的肾脏差异蛋白点

编号	蛋白名称	等电点	分子量	评分	天麻对比 SHR 表达
1	PCBD1	6.28	12 049.0	100.0	↑
2	ATP 酶 F 亚型	5.52	13 362.0	100.0	↑
3	角蛋白	5.10	56 698.6	99.9	↑
4	核苷二磷酸激酶 B	6.92	17 385.9	100.0	↑
5	核糖体蛋白 L11	9.82	19 240.2	99.9	↓
6	Cu-Zn SOD	5.88	16 072.9	99.7	↑
7	热休克蛋白 60	5.91	61 088.4	99.9	↑
8	胶转蛋白 2	8.41	22 550.2	100.0	↓
9	羧基氧化酶 2	7.55	39 632.6	100.0	↑
10	阴离子胰蛋白酶-1	4.71	26 626.9	98.2	↓
11	腺苷酸激酶同工酶 4	7.79	25 301.3	100.0	↓
12	果糖双磷酸酶 1	5.54	40 040.3	100.0	↑
13	蛋白酶体 α5	4.79	26 545.2	99.9	↓
14	肌动蛋白	5.31	42 107.9	100.0	↑
15	质子 ATP 酶催化亚基	5.42	68 563.7	100.0	↑
16	DDAH2	5.66	30 011.5	100.0	↑

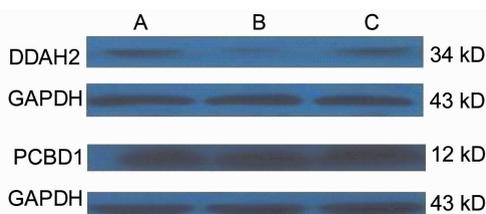
后,PCBD1 与热休克蛋白图表达含量出现显著回升,DDAH2 蛋白表达也出现回升。此外,还包括角蛋白、胶转蛋白 2、蛋白酶体 α5 和肌动蛋白,共 4 个细胞骨架蛋白,角蛋白和肌动蛋白在 SHR 中低表达,WKY 中高表达,而胶转蛋白 2 与蛋白酶体 α5 在 SHR 中高表达而在 WKY 中低表达,天麻钩藤饮对细胞骨架蛋白的改善作用不及能量代谢与内皮功能相关蛋白明显。

4 各组 DDAH2、PCBD1 及 Cu-Zn SOD 蛋白表达灰度值比较(表 3、图 3) 与 WKY 对照组比较,SHR 空白组肾脏中 DDAH2、PCBD1 及 Cu-Zn SOD 表达量均明显降低( $P < 0.05$ );与 SHR 空白组比较,

表 3 各组 DDAH2、PCBD1 及 Cu-Zn SOD 蛋白表达灰度值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	DDAH2	PCBD1	Cu-Zn SOD
WKY 对照	6	0.24 ± 0.01	0.58 ± 0.04	0.76 ± 0.08
SHR 空白	6	0.11 ± 0.01*	0.37 ± 0.04*	0.36 ± 0.07*
天麻钩藤饮	6	0.22 ± 0.01 <sup>△</sup>	0.48 ± 0.03 <sup>△</sup>	0.66 ± 0.04 <sup>△</sup>

注:与 WKY 对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与 SHR 空白组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$



注:A 为 WKY 对照组;B 为 SHR 空白组;C 为天麻钩藤饮组

图 3 各组 DDAH2、PCBD1 及 Cu-Zn SOD 蛋白表达印迹图

天麻钩藤饮组各检测蛋白表达量均升高( $P < 0.05$ ),这与双向电泳的实验结果变化一致。

### 讨 论

天麻钩藤饮作为临床常用复方,方中天麻、钩藤平肝熄风,石决明平肝潜阳,牛膝引血下行、活血利水,杜仲、桑寄生补益肝肾,栀子、黄芩清肝降火,夜交藤、朱茯神宁心安神,诸药合用,共成平肝熄风、清热活血、补益肝肾之剂,其降血压作用已有相关的实验研究<sup>[10,11]</sup>,采用模型大多集中在两肾一夹型肝阳上亢大鼠,所用复方也常有加减。同时,高血压对于各靶器官的累及过程漫长,而中医学理论表明,药物通过其药性与归经,可兼顾靶器官保护<sup>[12]</sup>。

血管环舒张度实验表示,24 周龄 SHR 的胸主动脉与肠系膜上动脉内皮舒张功能均已降低,且胸主动脉的损伤程度高于肠系膜上动脉。说明在高血压进程中,血压的升高导致大动脉内皮功能损伤,而卡托普利对此种损伤修复不显著,这与本课题组前期的研究结果相一致<sup>[7]</sup>。血管内皮功能是否健全关系到多种慢性病的发生发展,长期的高血压会导致肾损伤,而肾脏功能的减退可能与内皮损伤密切相关。本实验结果显示,天麻钩藤饮可通过改善肠系膜上动脉舒张度,从而保护内皮。已有报道显示,天麻水煎剂对家兔离体主动脉的舒张作用是内皮依赖性的<sup>[13]</sup>。说明了中药复方在降压作用的同时,在保护高血压血管损伤方面的独特作用,对抑制高血压所导致靶器官损伤起到积极作用。

双向电泳实验发现的差异蛋白,集中于一氧化氮系统、氧化应激与细胞骨架蛋白方面。其中参与内皮功能保护的 PCBD1、DDAH2 与热休克蛋白经天麻钩藤饮干预,均出现高表达。PCBD1 与 DDAH2 与 NO 密切相关,内皮功能的紊乱,尤其 NO 途径的破坏,会显著影响体内环境稳态调节。PCBD1 可减少体内四氢生物喋呤(BH4)的循环与利用,而 BH4 是诱导 eNOS 生成 NO 的辅因子,BH4 含量不足时可引起内皮由合成 NO 转为合成过氧化物,在缺少 NO 舒张血管的同时引入了具负面意义的氧化应激反应<sup>[14]</sup>。因此 PCBD1 的含量提高,对于保护内皮功能具有积极意义。DDAH2 对体内的非对称二甲精氨酸(ADMA)具有分解作用,ADMA 为 NOS 的内源性竞争性抑制剂,当 ADMA 大量积累时,会减弱心血管的压力应答,导致 NO 活性降低并带来过氧化损伤,因此 DDAH2 的含量升高,可间接提高 NOS 活性,从而保护内皮功能<sup>[15]</sup>。热休克蛋白是在机体应激状态下高度表达的

蛋白,其本身具有炎症因子作用,可引发局部组织血管的炎症反应。肾损伤常与肾小球病变相关,而 NO 系统正是维持肾小管内皮细胞功能的关键所在。天麻钩藤饮复方中,杜仲、桑寄生补益肝肾,牛膝引血下行,其归经皆包含肾经。因此推测天麻钩藤饮对肾蛋白表达改善的部分作用靶点在于保护内皮蛋白功能活性。

本实验发现有 7 种氧化应激相关蛋白在天麻钩藤饮干预下,含量发生显著改变。其中 ATP 酶参与能量代谢与多种神经递质的释放,通过水解 ATP 以释放高能磷酸键所贮存的能量,驱动物质的主动转运。果糖双磷酸酶通过激活  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  泵调剂细胞内外离子平衡,在维持细胞内环境稳定的同时,参与能量释放。核苷二磷酸激酶与腺苷酸激酶同工酶 4 均作用于传递高能磷酸键,协助 ATP 转化为 ADP,为能量传递关键蛋白,在氧化应激中表达异常<sup>[16]</sup>。SOD 参与分解体内多余的超氧阴离子自由基,羟基酸氧化酶 2 参与体内过氧化氢的合成,及时代谢体内的过氧化氢<sup>[17,18]</sup>。天麻钩藤饮对肝肾不足、肝阳偏亢所致生风化热。实验中,通过天麻钩藤饮的作用,SOD 等相关蛋白的表达改善,可见天麻钩藤饮缓和高血压造成的过氧化损伤症状,可能与调控氧化应激与能量代谢相关。并且方中牛膝、桑寄生、杜仲等药均有滋补肝肾,维护肾脏功能功效<sup>[2]</sup>。同时,当 NO 系统中 ADMA 大量累积时,也会间接导致内皮细胞的过氧化损伤。

实验中还发现,天麻钩藤饮对于一些骨架蛋白的表达的改善作用。其中,角蛋白主要参与保持细胞质中微丝的弹性与结构,胶转蛋白参与血管平滑肌细胞的骨架构成,对基质金属蛋白酶具抑制作用。当细胞骨架遭到破坏时,肌动蛋白的含量显著降低。蛋白酶体结合泛素为生物体内蛋白质选择性降解的重要途径,参与细胞凋亡及抑制肿瘤细胞的生长<sup>[19-21]</sup>。细胞骨架的构成与高血压的发生机制并没有直接关联。有文献证明在高血压进程中出现核糖体蛋白高表达<sup>[22]</sup>,可见核糖体蛋白 L11 作为高血压影响的标志性蛋白,对于天麻钩藤饮改善骨架蛋白与核糖体蛋白表达的具体作用机制还有待进一步探明。

肾脏功能与血压的调节关系密切,临床对于高血压初期的肾损伤诊断非常重视<sup>[23,24]</sup>,从实验结果看,天麻钩藤饮可降低 SHR 发病初期血压,虽然其长期稳定的降压效果与卡托普利比较,降压效果不甚显著,但可通过抑制血管内皮损伤,调控相关肾脏蛋白表达,干预高血压肾脏的早期损伤,对临床应用具有重要意义。同时,通过对 SHR 肾脏蛋白表达分析,一方面验证了部分蛋白的显著变化,为临床检测高血压肾功能早期

病变提供了实验基础;另一方面,也证明高血压进程中伴随的全身各级动脉内皮功能障碍与高血压导致的靶器官损伤密切相关,临床治疗高血压应在控制血压的同时着重保护血管内皮功能。

## 参 考 文 献

- [1] 马云枝,范晓歌,田亚振,等.天麻钩藤饮治疗肝阳上亢型头痛临床观察[J].新中医,2012,44(3):37-38.
- [2] 王宏献.天麻钩藤饮治疗高血压病的临床研究[J].中华中医药学刊,2008,26(2):338-342.
- [3] 严保雷,何培林.天麻钩藤饮加味对后循环缺血性眩晕治疗作用的观察[J].中医药临床杂志,2012,24(8):725-726.
- [4] 莫雪妮,杨益宝,黄绍湘,等.天麻钩藤饮对高血压大鼠血管重构的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(9):149-152.
- [5] 任敏之,符德玉,颜乾麟.高血压病患者中医证型与靶器官损害关系的临床研究[J].四川中医,2006,24(9):47-48.
- [6] Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension [J]. Cell, 2001, 104 (4): 545-556.
- [7] 王现珍,蒋嘉焯,陆家凤,等. SHR 高血压进程中不同类型血管内皮功能损伤及药物修复研究[J].中国药理学通报,2010,26(2):163-168.
- [8] 蒋嘉焯,罗珊珊,栗源,等. SHR 高血压进程中肾脏蛋白表达谱的变化[J].中国药理学通报,2012,28(2):189-194.
- [9] Gitau EN, Kokwaro GO, Newton CR, et al. Global proteomic analysis of plasma from mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA using two dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Malaria J, 2011, 10(1): 205.
- [10] 胡世云,冼绍祥,赵立诚,等.天麻钩藤饮对肾血管性高血压大鼠心肌纤维化及 Ang II 和 ALDO 的影响[J].中药药理与临床,2009,25(3):1-3.
- [11] 李卫丽,陈孝银,吴先林.天麻钩藤饮对 SHR 血管平滑肌细胞  $\text{CaL-}\alpha_1\text{C}$  及  $\text{PMCA1 mRNA}$  表达的影响[J].中药材,2009,31(8):1175-1179.
- [12] 段小军,曾星,张娴.天麻钩藤饮对自发性高血压肝阳上亢证大鼠 AngII、ALD 及肝脏蛋白质表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(16):160-163.
- [13] 张团笑,敬华娥,牛彩琴,等.天麻水煎剂对家兔离体主动脉血管舒张作用的研究[J].四川中药,2007,25(9):20-22.
- [14] Iwasaki H. Activities of asymmetric dimethylarginine-related enzymes in white adipose tissue are

- associated with circulating lipid biomarkers [J]. *Diabetol Metabol Syndrome*, 2012, 4 (1): 1-7.
- [15] Feng JZ, Luo HD, Qiu YH. Down-regulation of DDAH2 and eNOS induces endothelial dysfunction in sinoaortic-denervated rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 661(1-3): 86-91.
- [16] Bai F, Makino T, Ono T. Anti-hypertensive effects of Shichimotsukokato in 5/6 nephrectomized Wistar rats mediated by the DDAH-ADMA-NO pathway [J]. *J Nat Med*, 2012, 66(4): 583-590.
- [17] Yuan W, Wang J, Zhou F. *In vivo* hypotensive and physiological effects of a silk fibroin hydrolysate on spontaneously hypertensive rats [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012, 76(10): 1987-1989.
- [18] Palatini P. Glomerular hyperfiltration: a marker of early renal damage in pre-diabetes and pre-hypertension [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27 (5): 1708-1714.
- [19] Carillon J, Del Rio D, Teissèdre PL. Antioxidant capacity and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of a melon concentrate rich in superoxide dismutase [J]. *Food Chem*, 2012, 135(3): 1298-1302.
- [20] Zhong ZQ, Song MM, He Y. Knockdown of ezrin by RNA interference reverses malignant behavior of human pancreatic cancer cells *in vitro* [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(8): 3781-3789.
- [21] Nishino T, Sasaki N, Chihara M. Distinct distribution of the tensin family in the mouse kidney and small intestine [J]. *Exp Anim*, 2012, 61(5): 525-532.
- [22] Fumagalli S, Ivanenkov VV, Teng T. Supra-induction of p53 by disruption of 40S and 60S ribosome biogenesis leads to the activation of a novel G2/M checkpoint [J]. *Genes Dev*, 2012, 26 (10): 1028-1040.
- [23] 赵友林, 邵小梅. 高血压病患者尿微量白蛋白、 $\beta$ 2-MG、NAG 检测的临床意义 [J]. *国际检验医学杂志*, 2006, 27 (6): 556-557.
- [24] 程钢, 杜红心, 林岚, 等. 高血压、糖尿病早期肾损伤多项生化指标变化 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2010, 24 (7): 716-717.

(收稿:2013-03-15 修回:2014-12-24)

## 世界中联消化病专业委员会第六届消化病大会征文通知 (第一轮)

为加强世界各国(地区)中医防治消化病的学术交流,增进有关专业团体之间的了解与合作,推动本学科在各国健康有序的发展,世界中联消化病专业委员会拟于 2015 年 9 月在中国上海召开第六届消化病学术会议。会议将邀请境内权威中西医临床专家、科研专家等就征文相关主题进行学术报告,诚挚邀请有志于在该领域中做出成绩的各届同仁踊跃参会。现将会议征文及会议有关事宜通知如下。

**征文内容** (1) 消化疾病中医、中西医结合诊疗和实验研究的最新成果;(2) 中医、中西医结合防治消化疾病的经验总结;(3) 中医、中西医结合防治消化疾病的研究方法、思路和发展战略;(4) 中医和中西医结合诊疗消化疾病的进展和评价;(5) 名老中医诊疗消化疾病的临床经验和思路;(6) 中医诊治消化疾病的新理论和新方法;(7) 消化疾病动物模型、病理机制、检测技术及诊断标准的最新进展及动态。

**征文要求** (1) 稿件要求在 2 000~5 000 字以内,并提供 300~500 字以内中文摘要;(2) 来稿请写清联系方式(单位名称、通讯地址、邮编、电话、E-mail 地址),邮件主题注明“世界中联消化病会议征文”;(3) 大会设青年论坛,第一或通讯作者年龄不超过 35 岁并愿意参加青年论坛交流评比者,请在投稿邮件主题同时注明“青年论坛”;(4) 投稿以 E-mail 形式进行,不接受非电子类文字稿件,文章请发至邮箱:shizhonglian527@163.com,截稿日期:2015 年 7 月 15 日。

**会议须知** (1) 会议第一天为国家中医药管理局重点专科培训班;(2) 会议联系邮箱:shizhonglian527@163.com;(3) 会议联系人:张莉 18930362723;赵迎盼 15810964983;(4) 请参加会议的代表务必将会议回执填妥后与 2015 年 8 月 15 日前发送电子邮件至 shizhonglian527@163.com;(5) 参会代表可获得国家级继续教育学分。