

· 基础研究 ·

天麻芎苈止眩片对自发性高血压大鼠
ACE2/Ang (1-7) /Mas 轴的影响刘 林^{1,2} 李 弘³ 任卫琼² 李 苏² 蔺晓源² 王宇红³ 柏正平^{1,3}

摘要 目的 探讨天麻芎苈止眩片 (TXZT) 对自发性高血压大鼠 (SHR) 血管紧张素转换酶 (ACE) 2/血管紧张素 (Ang, 1-7) /Mas 轴的调控作用, 探讨其防治高血压病的作用机制。方法 50 只 SHR 大鼠随机分为模型组、厄贝沙坦组、TXZT 高、中、低剂量组, 另取 10 只 WKY 大鼠作为正常组, 厄贝沙坦组给予厄贝沙坦 27 mg/kg 灌胃; TXZT 高、中、低剂量组分别给予 TXZT 2.0、1.0、0.5 g/kg 灌胃; 模型组和正常组分别给予等量蒸馏水灌胃。各组均连续给药 4 周。测量干预前后大鼠收缩压; ELISA 法检测血清中肾素 (REN)、醛固酮 (ALD)、Ang II、ACE2、Ang (1-7) 的含量变化; 免疫组化法检测主动脉 Ang II、ACE2 蛋白表达; Western Blot 法检测主动脉 ACE2、Mas 蛋白表达; RT-PCR 法检测主动脉 ACE2、Mas mRNA 表达。结果 与正常组比较, 模型组各时间收缩压升高, 血清 REN、ALD、Ang II 水平、主动脉 Ang II 表达升高, 血清 ACE2、Ang (1-7) 水平、主动脉 ACE2、Mas 蛋白及 mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较, 干预后各组各时间收缩压降低, 主动脉 ACE2 mRNA 表达增加 ($P<0.05$); 厄贝沙坦组大鼠血清 REN、ALD、Ang II 水平、主动脉 Ang II 表达降低, 血清 ACE2、Ang (1-7) 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); TXZT 高剂量组大鼠血清 REN、ALD、Ang II 水平、主动脉 Ang II 表达降低, 血清 ACE2、Ang (1-7) 水平、主动脉 ACE2 蛋白、Mas mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); TXZT 中剂量组血清 ALD、Ang II 水平、主动脉 Ang II 表达降低, 血清 ACE2、Ang (1-7) 水平、主动脉 ACE2、Mas 蛋白、Mas mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); TXZT 低剂量组大鼠血清 Ang II 水平降低 ($P<0.05$)。与厄贝沙坦组比较, TXZT 高剂量组给药后第 2、4 周、TXZT 中剂量组给药后各时间、TXZT 低剂量组给药后第 2、3、4 周收缩压升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 TXZT 有明显、持续、稳定的降压作用, 调节 ACE2/Ang (1-7) /Mas 受体轴抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 系统活性可能是其降压效应的重要机制之一。

关键词 高血压; 肾素-血管紧张素-醛固酮系统; 血管紧张素转换酶 2/血管紧张素 (1-7) /Mas 轴

Effect of Tianma Xiongling Zhixuan Tablet on ACE2/Ang (1-7) /Mas Axis in Spontaneously Hypertensive Rats

LIU lin^{1, 2}, LI Hong³, REN Wei-qiong², LI Su², LIN Xiao-yuan², WANG Yu-hong³, and BAI Zheng-ping^{1, 3} 1 Personnel Department, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha (410013); 2 Medical Innovation Experiment Center of the First Hospital, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410007); 3 Science and Technology Innovation Center, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410208)

ABSTRACT Objective To explore the regulatory effect of Tianma Xiongling Zhixuan Tablets (TXZT) on angiotensin converting enzyme (ACE) 2/angiotensin (Ang, 1-7) /Mas axis in spontaneously hypertensive rats (SHR), and to explore its mechanism of prevention and treatment of hypertension. **Methods** Fifty SHR rats were randomly divided into the model group, the Irbesartan group, the high-, medium-, and low dose TXZT groups, and another 10 WKY rats were taken as

基金项目: 国家重大科技专项 (No.2019ZX09301-103); 中国博士后基金项目 (No.2018M632966); 湖南省卫健委项目 (No.20190960); 长沙市杰出创新青年培养 (No.kq1802008); 湖南中医药大学中医学国内一流建设学科资助 (No.2018-2020 年)

作者单位: 1. 湖南省中医药研究院人事处 (长沙 410013); 2. 湖南中医药大学第一附属医院医学创新实验中心 (长沙 410007); 3. 湖南中医药大学科技创新中心 (长沙 410208)

通讯作者: 柏正平, Tel: 0731-88857209, E-mai: bzp121@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20211013.112

normal group. Rats in the Irbesartan group were administered with irbesartan (27 mg/kg per day); the rats in high-, medium- and low dose group were administered with TXZT 2.0, 1.0 and 0.5 g/kg per day, respectively. Equal volume of distilled water were administered to rats in the model group and normal group. The treatment course for all was 4 weeks. Systolic blood pressure (SBP) were measured before and after intervention. The contents of renin (REN), aldosterone (ALD), Ang II, ACE2 and Ang (1-7) in serum were detected by ELISA. The expression of Ang II and ACE2 in aorta were detected by immunohistochemistry. The expression of ACE2 and Mas in aorta were detected by Western Blot. The ACE2 and Mas mRNA expression in aorta were detected by RT-PCR. **Results** Compared with the normal group, SBP of the model group increased at each time point, the levels of REN, ALD and Ang II in serum and the expression of Ang II in aorta increased, while the levels of ACE2 and Ang (1-7) in serum and the expression of ACE2, Mas protein and mRNA in aorta decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the SBP of each intervention group decreased at each time after intervention and the expression of ACE2 mRNA in aorta increased ($P<0.05$, $P<0.01$). The levels of REN, ALD, Ang II in serum and Ang II expression in aorta of rats in irbesartan group decreased, while the levels of ACE2 and Ang (1-7) increased ($P<0.05$, $P<0.01$). In the high dose TXZT group, the levels of REN, ALD, Ang II in serum and Ang II expression in aorta decreased, while the levels of ACE2 and Ang (1-7) in serum, ACE2 expression in aorta and Mas mRNA increased ($P<0.05$, $P<0.01$). The levels of ALD and Ang II in serum and the expression of Ang II in aorta in the medium dose TXZT group decreased, and the levels of ACE2 and Ang (1-7) in serum and the expression of ACE2, Mas and Mas mRNA in aorta increased ($P<0.05$, $P<0.01$). In the low dose TXZT group, The levels of Ang II decreased ($P<0.05$). Compared with the Irbesartan group, SBP increased in the high dose TXZT group at week 2 and 4 after administration, in the medium dose TXZT group at all time points after administration, and in the low dose TXZT group at week 2, 3 and 4 after administration ($P<0.05$). **Conclusion** TXZT has obvious, sustained and stable antihypertensive pharmacological characteristics, and inhibition of renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) system activity by modulating the ACE2/Ang (1-7)/mas receptor axis may be one of the important mechanisms of its antihypertensive effect.

KEYWORDS hypertension; renin-angiotensin-aldosterone system; Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin (1-7)/mas axis

研究显示,我国 18 岁以上居民高血压患病率为 25.2%,全国约有高血压病患者 2.7 亿,有效控制血压和保护左心室、血管等靶器官损伤是高血压病研究的重要方面^[1]。肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin angiotensin aldosterone system, RAAS) 是高血压病引起中风、冠心病等血管疾病的重要发病机制^[2]。近期研究发现,血管紧张素转换酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2)-血管紧张素 1-7[angiotensin-1-7, Ang (1-7)]-Mas 受体轴对传统 RAAS 系统具有负性调节作用,该轴与经典的 ACE-Ang II-Ang I 型 (angiotensin type 1, AT1) 受体轴相互制约,调节机体系统平衡,对血压、炎症、血管生成等方面具有重要作用^[3-5]。天麻芎藭止眩片 (简称 TXZT) 由天麻、川芎、茯苓等中药组方而成,为湖南中医药大学第一附属医院王行宽教授应用多年治疗原发性高血压病的临床经验方,具有平肝息风、清热化痰之

功,临床用于肝火亢盛兼痰热内蕴型原发性高血压或难治性高血压疗效显著^[6]。本研究观察 TXZT 对自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rats, SHR) 血压以及 ACE2/Ang (1-7)/Mas 受体轴相关指标变化,探讨 TXZT 防治高血压病的作用机制,为临床运用提供实验依据。

材料与方法

1 动物 6~7 周龄雄性 SHR 大鼠 50 只,SPF 级。6~7 周龄雄性 Wistar-kyoto (WKY) 大鼠 10 只,SPF 级。均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK (京) 2016-0006。本研究在湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心进行,实验动物环境设施合格证号:SYXK (湘) 2015-0003。本研究通过湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会实验动物伦理审核 (No. ZYFY20180603)。

2 药物 TXZT (0.46 g/片), 湖南中医药大学第一附属医院药剂科制备, 生产批号 20180224, 由天麻、钩藤、罗芙木、茯苓、野菊花、川芎按 3:2:5:2:3:3 比例组成。厄贝沙坦片 (75 mg/片), 扬子江药业集团北京海燕药业有限公司生产, 生产批号 17122111。

3 试剂及仪器 肾素 (renin, REN)、醛固酮 (aldosterone, ALD)、Ang II、ACE2 和 Ang (1-7) ELISA 测定试剂盒, 均由 JingTian 公司生产, 批号分别为 E2108052801、E2108052808、E2108052812、E2108052809、E2108052822。Ang II、ACE2、Mas 一抗, 均由 Bioss 公司生产, 批号分别为 AD091209、AD081217、AC01305689。BP2010 无创血压检测仪 (北京软隆科技有限责任公司); AUW2200 分析天平 (日本岛津公司); Olympus 倒置显微镜和照相装置 (日本 Olympus 公司); KS400 型图像分析仪 (德国 Zisse 公司)。

4 分组及给药 SHR 大鼠按照随机数字表法分为模型组、厄贝沙坦片组、TXZT 高、中、低剂量组, 共 5 组, 每组 10 只, 另设 10 只 WKY 大鼠为正常组。厄贝沙坦片组大鼠给予厄贝沙坦 27 mg/kg 灌胃; TXZT 高、中、低剂量组分别给予 TXZT 2.0、1.0、0.5 g/kg 灌胃, 相当于人体剂量的 4、2、1 倍^[7]; 模型组和正常组分别给予等量蒸馏水灌胃给药。各组均连续给药 4 周。全部大鼠均完成实验观察。

5 检测指标及方法

5.1 血压 分别在治疗前及给药后 1、2、3、4 周, 采用尾动脉测压法测量大鼠血压。

5.2 ELISA 法检测血清 RAAS 相关蛋白水平 末次给药后, 实验动物禁食 12 h, 用 10% 水合氯醛 (0.3 mL/100 g) 腹腔注射麻醉; 腹主动脉采血, 不抗凝, 4 ℃ 静置 4 h 后, 离心 (4 500 r/min, 10 min) 分离血清, 取上清于 1.5 mL EP 管中, -80 ℃ 保存备用。严格按照试剂盒说明书的步骤操作, 测定血清中 REN、Ang II、ALD、ACE2、Ang (1-7) 的含量。

5.3 免疫组化法检测主动脉 Ang II、ACE2 蛋白表达 迅速取主动脉, 清洗干净, 置于 4% 多聚甲醛中固定, 脱水、透明、浸蜡与包埋, 将蜡块常规切片, 切片后脱蜡水化, Ang II、ACE2 抗体按照 1:100 稀释, 滴加一抗, 37 ℃ 显色 1~2 h, 应用 DAB 溶液显色, 检测 Ang II、ACE2 表达情况。

5.4 Western Blot 法检测主动脉 ACE2、Mas 蛋白表达 迅速取主动脉组织约 20 mg, 加入 RIPA 裂解液 (含 PMSF 和蛋白酶抑制剂), 制成 10% 匀浆

液, 4 ℃, 12 000 ×g 离心 15 min, 取上清液, BCA 法进行蛋白定量。每泳道上样总蛋白 10 μL, SDS-PAGE (12% 分离胶、5% 浓缩胶) 后电转移至硝酸纤维素膜上, 依相对分子质量大小切取条带, 5% 脱脂奶粉室温下封闭 2 h。洗膜后分别加入一抗 (1:1 000 比例稀释)。4 ℃ 过夜, 孵育一抗的膜用 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。随后根据用量, 按照 1:10 000 稀释 HRP 标记的二抗, 与膜室温孵育 1 h 或 4 ℃ 孵育过夜。用 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。洗膜后加入 ECL 显影, 全自动化学发光分析仪中检测, 通过 TANON GIS 软件读取相关条带数据, 以 ACE2、Mas 蛋白与 β-actin 条带结果比值作为目的蛋白的相对表达量。

5.5 RT-PCR 法检测主动脉 ACE2、Mas mRNA 表达 取主动脉各 20 mg, Trizol 法提取总 RNA, 逆转录成 cDNA。Real-time PCR 采用 SYBR Green 染料法, 反应总体积 20 μL。PCR 反应条件为: 95 ℃, 3 min; 95 ℃, 5 s; 56 ℃, 10 s; 72 ℃, 25 s; 65 ℃, 5 s; 95 ℃, 50 s。共 41 个循环, 测出 ΔCt 值并分析溶解曲线, 以 β-actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算出基因 mRNA 的相对表达量: $\Delta\Delta Ct = (\text{实验组目的基因 Ct 值} - \text{实验组内参基因 Ct 值}) - (\text{对照组目的基因 Ct 值} - \text{对照组内参基因 Ct 值})$ 。所有引物由武汉天一辉远生物科技有限公司合成, 引物序

表 1 RT-PCR 反应的引物序列

名称	引物序列 (5'~3')	产物大小 (bp)
ACE2	F-5'-AAGCCACCTTACGAGCCTCCTG-3'	81
	R-3'-AACAATGCCAACCCTACCGTTC-3'	
Mas	F-5'-GCCACCGTCATCCTGTTCCCTTG-3'	185
	R-3'-CTCTTCTCCTCAGACTGCCTACC-3'	
β-actin	F-5'-CGTTGACATCCGTAAGAC-3'	110
	R-3'-TAGGAGCCAGGGCAGTA-3'	

列见表 1。

6 统计学方法 应用 SPSS 19.0 统计软件, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有资料进行正态性检验; 符合正态分布者, 多组计量资料采用单因素方差分析, 多重比较方差齐者用 LSD 或 SNK 法, 方差不齐者用 Tamhane's T2 或 Dunnett's T3 法; 不符合正态分布者采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

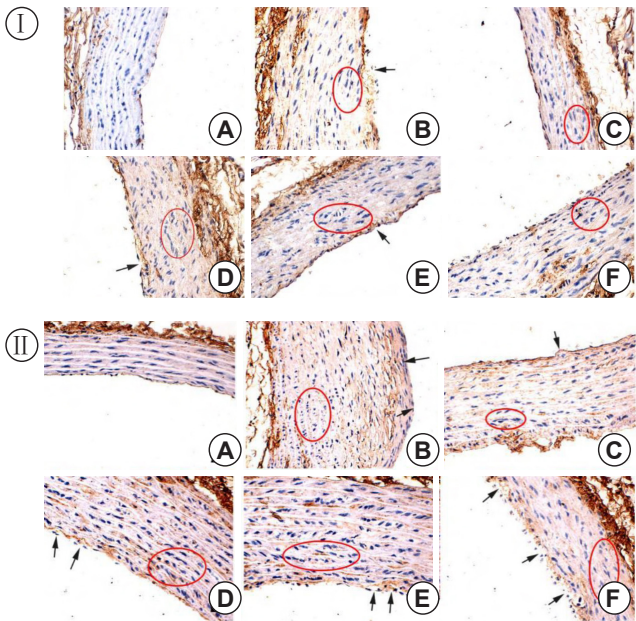
1 各组 SHR 大鼠各时间收缩压比较 (表 2) 与本组治疗前比较, 正常组收缩压第 4 周显著上升 ($P < 0.05$); 模型组收缩压第 2、3、4 周上升

($P<0.05$, $P<0.01$); 厄贝沙坦组各时间收缩压下降 ($P<0.01$); TXZT 高剂量组收缩压第 1、3、4 周降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); TXZT 中剂量组收缩压第 4 周降低 ($P<0.05$); TXZT 低剂量组各时间收缩压降低, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与正常组比较, 模型组各时间收缩压升高 ($P<0.01$)。干预后与模型组同时比较, 厄贝沙坦组、TXZT 高、中、低剂量组各时间收缩压降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与厄贝沙坦组比较, TXZT 高剂量组给药后第 2、4 周、TXZT 中剂量组给药后各时间、TXZT 低剂量组给药后第 2、3、4 周收缩压升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

2 各组大鼠血清 RAAS 相关指标活性比较 (表 3) 与正常组比较, 模型组 REN、ALD、Ang II 的水平升高, ACE2、Ang (1-7) 水平降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 厄贝沙坦组、TXZT 高剂量组大鼠血清 REN、ALD、Ang II 水平降低, ACE2、Ang (1-7) 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); TXZT 中剂量组 ALD、Ang II 水平降低, ACE2、Ang (1-7) 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); TXZT 低剂量组 Ang II 水平降低 ($P<0.05$)。与厄贝沙坦组比较, TXZT 低剂量组大鼠血清 ALD 水平显著升高 ($P<0.01$)。

3 各组动脉 Ang II、ACE2 表达比较 (表 4, 图 1) 正常组阳性表达较弱, SHR 模型组大鼠见强阳性染色, 细胞增殖, 中膜增厚, 内膜损伤, 治疗 4 周后, TXZT 高剂量组大鼠血管可见弱阳性染色, 平滑肌细胞增殖。TXZT 中剂量组大鼠血管可见弱阳

性染色, 平滑肌细胞增殖, 内膜损伤。TXZT 低剂量组血管外膜、中膜、内膜可见较强阳性染色, 平滑肌细胞增殖, 内膜损伤。与正常组比较, 模型组 Ang II 表达升高, ACE2 表达下降 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与模型组比较, 厄贝沙坦组及 TXZT 高、中剂量组 Ang II 表达下降, TXZT 高剂量组 ACE2 表达上升



注: 图 I 为 Ang II, 图 II 为 ACE2; A 为正常组, B 为模型组, C 为厄贝沙坦片组, D 为 TXZT 低剂量组, E 为 TXZT 中剂量组, F 为 TXZT 高剂量组; 箭头所指为内膜损伤, 红色圆圈内为平滑肌细胞增殖
图 1 各组主动脉 Ang II、ACE2 蛋白表达比较 (IHC, $\times 400$)

表 2 各组 SHR 大鼠收缩压比较 (mmHg, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	干预前	给药 1 周	给药 2 周	给药 3 周	给药 4 周
正常	10	128.2 $\pm$ 7.2	128.7 $\pm$ 9.5	135.5 $\pm$ 9.1	135.8 $\pm$ 10.5	136.4 $\pm$ 8.2*
模型	10	162.6 $\pm$ 11.8 $\Delta\Delta$	168.7 $\pm$ 12.4 $\Delta\Delta$	173.7 $\pm$ 11.4* $\Delta\Delta$	175.2 $\pm$ 12.2* $\Delta\Delta$	186.4 $\pm$ 13.1** $\Delta\Delta$
厄贝沙坦	10	164.6 $\pm$ 12.4 $\Delta\Delta$	142.3 $\pm$ 12.4 $\Delta^{**}\Delta\Delta$	139.6 $\pm$ 13.1*** $\Delta\Delta$	139.0 $\pm$ 11.2** $\Delta\Delta$	132.5 $\pm$ 9.8** $\Delta\Delta$
TXZT 低剂量	10	163.1 $\pm$ 10.8 $\Delta\Delta$	153.2 $\pm$ 14.7 $\Delta\Delta\Delta$	160.9 $\pm$ 10.7 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	155.8 $\pm$ 8.9 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	154.5 $\pm$ 8.4 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$
TXZT 中剂量	10	164.1 $\pm$ 13.4 $\Delta\Delta$	155.4 $\pm$ 13.2 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	160.2 $\pm$ 11.5 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	156.0 $\pm$ 7.6 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	151.7 $\pm$ 11.1 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$
TXZT 高剂量	10	162.9 $\pm$ 8.5 $\Delta\Delta$	151.7 $\pm$ 10.0 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	155.3 $\pm$ 13.3 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	146.0 $\pm$ 5.7 $\Delta^{**}\Delta\Delta$	145.8 $\pm$ 8.9 $\Delta^{***}\Delta\Delta\Delta$

注: 与本组治疗前比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与正常组同期比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$; 与模型组同期比较, Δ^* $P<0.05$, $\Delta\Delta^*$ $P<0.01$; 与厄贝沙坦组比较, Δ° $P<0.05$, $\Delta\Delta^{\circ}$ $P<0.01$

表 3 各组大鼠 RAAS 相关指标活性比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	REN	ALD	Ang II	ACE2	Ang (1-7)
正常	10	232.5 $\pm$ 23.2	443.1 $\pm$ 34.1	160.4 $\pm$ 22.3	58.3 $\pm$ 6.2	42.1 $\pm$ 8.8
模型	10	272.4 $\pm$ 27.9*	589.1 $\pm$ 33.6*	225.5 $\pm$ 28.3*	45.3 $\pm$ 10.3*	30.7 $\pm$ 5.2*
厄贝沙坦	10	237.1 $\pm$ 32.8 Δ	487.6 $\pm$ 42.3 Δ	185.3 $\pm$ 32.3 $\Delta\Delta$	62.6 $\pm$ 8.4 $\Delta\Delta$	39.2 $\pm$ 7.5 $\Delta\Delta$
TXZT 低剂量	10	252.8 $\pm$ 25.2	556.9 $\pm$ 41.6 Δ^*	201.1 $\pm$ 20.3 Δ	55.0 $\pm$ 12.3	35.5 $\pm$ 7.1
TXZT 中剂量	10	249.2 $\pm$ 24.3	526.9 $\pm$ 42.3 $\Delta\Delta$	200.8 $\pm$ 23.6 Δ	56.3 $\pm$ 8.1 Δ	36.2 $\pm$ 6.5 Δ
TXZT 高剂量	10	245.3 $\pm$ 27.4 Δ	510.8 $\pm$ 42.6 $\Delta\Delta$	187.5 $\pm$ 21.0 $\Delta\Delta$	61.3 $\pm$ 11.5 $\Delta\Delta$	38.5 $\pm$ 8.2 Δ

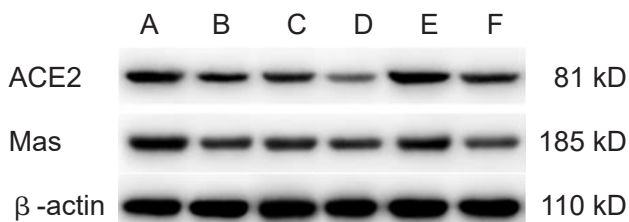
注: 与正常组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$; 与厄贝沙坦组比较, Δ^* $P<0.01$

表 4 各组大鼠动脉 Ang II、ACE2 蛋白平均光密度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ang II	ACE2
正常	10	0.40 ± 0.08	0.39 ± 0.07
模型	10	0.49 ± 0.05**	0.32 ± 0.05*
厄贝沙坦	10	0.42 ± 0.06 [△]	0.36 ± 0.05
TXZT 低剂量	10	0.45 ± 0.04	0.34 ± 0.05
TXZT 中剂量	10	0.43 ± 0.06 [△]	0.36 ± 0.04
TXZT 高剂量	10	0.43 ± 0.05 [△]	0.37 ± 0.05 [△]

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.05$ ($P<0.05$)。

4 各组大鼠主动脉 ACE2、Mas 蛋白表达比较 (图 2, 表 5) 与正常组比较,模型组 ACE2、Mas 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, TXZT 高、



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为厄贝沙坦片组; D 为 TXZT 低剂量组; E 为 TXZT 中剂量组; F 为 TXZT 高剂量组

图 2 Western Blot 法检测动脉 ACE2、Mas 蛋白表达

表 5 各组动脉 ACE2、Mas 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ACE2	Mas
正常	10	0.61 ± 0.04	0.62 ± 0.03
模型	10	0.53 ± 0.02*	0.55 ± 0.02*
厄贝沙坦	10	0.57 ± 0.04	0.58 ± 0.02
TXZT 低剂量	10	0.54 ± 0.06	0.57 ± 0.03
TXZT 中剂量	10	0.58 ± 0.03 [△]	0.60 ± 0.02 [△]
TXZT 高剂量	10	0.57 ± 0.01 [△]	0.59 ± 0.02 [△]

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.01$

中剂量组大鼠 ACE2、Mas 蛋白表达增加 ($P<0.01$)。

5 各组大鼠主动脉 ACE2、Mas mRNA 表达比较 (表 6) 与正常组比较,模型组 ACE2、Mas mRNA 表达水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,厄贝沙坦组及 TXZT 高、中、低剂量组 ACE2 mRNA 表达增加 ($P<0.05$); TXZT 高、中剂量组 Mas mRNA 表达增加 ($P<0.05$)。

讨 论

高血压病作为最常见的慢性病之一,严重威胁人类健康。RAAS 的过度激活是高血压的重要发病机制之一^[8]。肾素使血管紧张素原变为 Ang I 经 ACE 的作用变为 Ang II, Ang II 与 AT1 受体结合,使平滑

表 6 各组大鼠 ACE2、Mas mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ACE2	Mas
正常	10	1.03 ± 0.25	1.03 ± 0.31
模型	10	0.61 ± 0.14**	0.64 ± 0.16*
厄贝沙坦	10	0.80 ± 0.14 [△]	0.85 ± 0.22
TXZT 低剂量	10	0.78 ± 0.10 [△]	0.80 ± 0.17
TXZT 中剂量	10	0.79 ± 0.10 [△]	0.83 ± 0.11 [△]
TXZT 高剂量	10	0.83 ± 0.18 [△]	0.87 ± 0.19 [△]

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.05$

肌细胞收缩,刺激交感神经系统,通过与特定受体结合,促进水钠潴留,使循环血容量增加,血压升高^[9]。Ang II 在收缩血管、增强醛固酮分泌和升高血压等方面具有很强的生物活性。醛固酮可增强钠和水的重吸收,从而增加血容量和血压。厄贝沙坦为一线抗高血压药物,选择性拮抗 AT1 受体,抑制 RAAS 而发挥降压作用。中药一般通过抑制 RAAS 活性,阻断 Ca^{2+} 通道,从而产生降压作用^[10]。因此,抑制 RAAS 的激活是高血压患者降低血压的主要策略之一。

TXZT 由天麻、川芎、钩藤等多味中药组成,具有平肝息风、清热化痰的功效。方中天麻平肝息风为君药,川芎活血止痛,钩藤清热平肝、熄风止痉。二者与天麻合用,加强平肝息风之力。天麻临床上主要用于高血压、中风等疾病的治疗,天麻素是其主要生物活性成分,临床研究表明,天麻素可以降低高血压患者的血压水平^[11]。Liu W 等^[12]研究发现,天麻素 (100 mg/kg 腹腔注射) 给药 4 周后可有效干预 RAAS,通过降低 SHR 的收缩压,降低血清中 Ang II 和 ALD 的水平以及心肌组织中 AT1 受体基因表达,同时增加心脏中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 的蛋白合成和 mRNA 表达水平。此外,天麻中的乙酸乙酯提取物对大鼠主动脉具有舒张作用,天麻可能通过调节血管张力从而改善高血压^[13]。川芎主要含有挥发油、生物碱等化学成分,藁本内酯是其挥发油的主要成分^[14]。Deng HJ 等^[15]研究发现藁本内酯可有效改善 SHR 模型病理性内膜增生,其机制可能与 c-Myc 丰度降低、 α -SMA 蛋白水平增加以及血压、血脂水平降低有关。付彦君等^[16]研究发现,天麻川芎可显著降低 SHR 大鼠血浆、心肌及主动脉的肾素和 Ang- II 水平,心肌及主动脉中肾素、Ang II mRNA 的表达也显著降低。钩藤具有降压、抗心律失常、逆转心肌重构等药理作用,钩藤碱是其主要的降压成分,可以显著降低 SHR 的收缩压,降低血浆 Ang II、AT1R、ADMA 水平,升高血清 NO、一氧化氮合酶水平,对血管内皮功能具有保护作用^[17]。

结合本研究结果显示给药 4 周, TXZT 治疗组表现显著降压、改善 RAAS 系统指标活性的药理作用, 可推知通过 RAAS 途径调节机体血压可能是其主要降压作用机制之一。

ACE2/Ang (1-7) /Mas 轴具有逆转经典 RAAS 作用^[18,19]。ACE2 为第一个被发现的人类 ACE 同源物, ACE2 既可催化 Ang I 为保护性肽 Ang (1-7), 也可催化 Ang II 转化 Ang (1-7), ACE2 对 Ang II 的催化作用较对 Ang I 的作用强约 360 倍, ACE2 具有显著的调节 Ang II 活性作用, Ang (1-7) 与受体 Mas 结合, 有促进血管舒张、抗增殖、抗肥大, 维持血管内皮功能以及抗 Ang II 的药理效应^[20]。以 ACE2 为主形成的 ACE2 /Ang (1-7) /Mas 受体轴, 在体内多个系统中发挥着重要的作用, 是高血压病、动脉粥样硬化等心血管疾病新的防治靶点^[21]。RAAS 系统中 ACE2/Ang II /AT1R 轴主要介导血管收缩、血管生成、基质合成、醛固酮的合成和释放, 其绝对表达受到 Ang II 和一些生长因子的调控^[22]。ACE2/Ang (1-7) /Mas 受体轴主要通过拮抗 ACE2/Ang II /AT1R 轴的机制, 从而产生降压作用^[23,24]。研究表明白藜芦醇通过调节 ACE2/Ang (1-7) /Mas 轴发挥抗 SHR 高血压大鼠动脉重塑作用^[25]。江宏等^[26]研究发现五苓散能够降低血压, 其主要机制可能是通过降低 AT1mRNA 的升高 ACE2, 从而调控 RAAS 系统产生作用。本实验研究中, 经中药治疗后 SHR 大鼠动脉病理结构明显改善, 血清 REN、ALD、Ang II 水平降低, ACE2、Ang (1-7) 水升高, Ang II 表达明显下降, ACE2、Mas 表达明显上升, 推测 TXZT 可能通过调节 ACE2/Ang (1-7) /Mas 轴作用, 抑制经典 RAAS 系统活性, 从而产生降压作用。

综上, TXZT 有显著的降压药理作用, 其降压作用与厄贝沙坦类似。TXZT 降压机制通过调节 ACE2/Ang (1-7) /Mas 受体轴, 抑制 RAAS 系统活性可能是其重要机制之一。课题组将进一步检测 ACE2/Ang (1-7) /Mas 轴相关信号分子, 深入探讨中医药防治高血压病作用机制。

利益冲突: 本论文所涉及各方面均无任何利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 等. 中国心血管病报告 2017 概要 [J]. 中国循环杂志, 2018, 33 (1): 1-8.
- [2] Patel SK, Velkoska E, Freeman M, et al. From gene to protein experimental and clinical studies of ACE2 in blood pressure control and arterial hypertension[J]. Front Physiol, 2014, 5: 227.
- [3] 赵晓霖, 彭雯雯, 刘国英, 等. 运动训练激活中枢 ACE2-Ang (1-7) -MAS 轴延缓高血压进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34 (1): 35-40.
- [4] 黄红, 李燕, 全胜麟, 等. 原发性高血压血管紧张素转化酶基因 I/D 多态性与厄贝沙坦降压疗效及血浆肾素血管紧张素-醛固酮系统水平的相关性 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37 (24): 6057-6059.
- [5] Simões e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, et al. ACE2, angiotensin- (1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis[J]. Br J Pharmacol, 2013, 169 (3): 477-492.
- [6] 熊丹. 天麻苧苧止眩片对高血压肾病治疗作用机制及肾脏保护效应相关研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2018.
- [7] 刘林, 李弘, 任卫琼, 等. 天麻苧苧止眩片对自发性高血压大鼠血压及血管重塑的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37 (4): 414-419.
- [8] 曾志聪, 林丰夏, 吴子君, 等. 天麻钩藤饮对老年高血压患者神经内分泌系统及血管内皮功能的影响 [J]. 中医药通报, 2017, 16 (6): 32-34.
- [9] Stella B, Andrea M, Giulia Z, et al. Update on RAAS modulation for the treatment of diabetic cardiovascular disease[J]. J Diab Res, 2016: 891757.
- [10] 董丽, 姜国旺, 樊瑞红. 中医药治疗高血压病的机制研究 [J]. 天津中医药大学学报, 2018, 37 (3): 261-264.
- [11] 柳威, 邓林华, 祁东利, 等. 天麻及其有效成分的药理作用概述 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37 (4): 240-244, 12.
- [12] Liu W, Wang L, Yu J, et al. Gastrodin reduces blood pressure by intervening with RAAS and PPAR γ in SHRs[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015: 828427.
- [13] Dai R, Wang T, Si X, et al. Vasodilatory effects and underlying mechanisms of the ethyl acetate extracts from *Gastrodia elata*[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2017, 95 (5): 564-571.
- [14] 张晓娟, 张燕丽, 左冬冬. 川芎的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2020, 37 (6): 128-133.
- [15] Deng HJ, Lu Q, Wei Z. GW29-e0700

- Ligustilide protects against the pathological intimal hyperplasia in spontaneously hypertensive rats - ScienceDirect[J]. J Am Coll Cardiol, 72 (16): C18.
- [16] 付彦君, 刘晴, 马琛, 等. 天麻川芎对自发高血压大鼠肾素血管紧张素系统的影响 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27 (4): 854-856.
- [17] 田丽娜, 高华武, 龙子江, 等. 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 [J]. 中草药, 2014, 45 (15): 2210-2213.
- [18] Mirabito Colafella KM, Danser A. Recent advances in angiotensin research[J]. Hypertension, 2017, 69 (6): 994-999.
- [19] 金惠敬, 冷吉燕, 郑恩来, 等. 血管紧张素转换酶 2 与心血管疾病研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38 (8): 2024-2026.
- [20] Murugan D, Lau YS, Lau WC, et al. Angiotensin 1-7 protects against angiotensin II -induced endoplasmic reticulum stress and endothelial dysfunction via Mas receptor[J]. PLoS One, 2015, 10 (12): e0145413.
- [21] 陆启璇. 血管紧张素转换酶 2-Ang (1-7) /Mas 轴对心血管系统保护作用研究进展 [J], 长治医学院学报, 2018, 32 (1): 77-80.
- [22] Singh KD, Karnik SS. Angiotensin receptors: structure, function, signaling and clinical applications[J]. J Cell Signal, 2016, 1 (2): 111.
- [23] Yang G, Chu PL, Rump LC, et al. ACE2 and the homolog collectrin in the modulation of nitric oxide and oxidative stress in blood pressure homeostasis and vascular injury[J]. Antioxid Redox Signal, 2017, 26 (12): 645-659.
- [24] 伊琳, 曲强, 纪禄凤, 等. 当归挥发油对自发性高血压大鼠 ACE2/Ang (1-7) /Mas 受体轴的影响 [J]. 临床心血管病杂志, 2017, 33 (6): 584-587.
- [25] 周志宏, 张福伟, 熊槟洋, 等. 白藜芦醇对自发性高血压大鼠主动脉重塑的影响及机制探讨 [J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17 (19): 2029-2033.
- [26] 江宏, 钱林超, 奚胜艳, 等. 五苓散对自发性高血压大鼠血压及肾素-血管紧张素-醛固酮系统的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22 (10): 1319-1322.
- (收稿: 2019-05-08 在线: 2021-11-30)
责任编辑: 邱 禹

中国中西医结合杂志社微信公共账号已开通

中国中西医结合杂志社已经开通微信公共账号, 可通过扫描右方二维码或者搜索微信订阅号“中国中西医结合杂志社”加关注。本杂志社将通过微信不定期发送《中国中西医结合杂志》及 *Chinese Journal of Integrative Medicine* 的热点文章信息, 同时可查看两本期刊的全文信息, 欢迎广大读者订阅。

