

痰湿壅盛证高血压大鼠模型的建立与评价

吴 赛¹ 姜月华² 杨传华² 孟宪卿^{1,2} 郝 东³ 亓英姿³

摘要 **目的** 观察痰湿壅盛证高血压模型大鼠的证候表现、理化指标及可能的病理机制。**方法** 50 只 Wistar 大鼠采用高脂饲料饲养的方法制备痰湿壅盛证大鼠模型,同时设对照组(10 只),给予普通饲料饲养。两组均持续饲养 25 周后,选取造模大鼠中体重、血压均超过对照组平均值 25% 的大鼠纳入模型组(22 只)。检测两组大鼠体重、血压、血脂及相关血清学指标;观察靶器官形态变化;采用实时荧光定量 PCR (q-PCR)检测主动脉中瘦素受体(leptin receptor, LepR)、Janus 蛋白络氨酸激酶 2 (Janus kinase2, Jak2)、信号转导子和转录激活子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, Stat3)、细胞因子信号抑制蛋白-3 (suppressor of cytokine signaling-3, Socs3)、血管紧张素 II 1 型受体(angiotensin II receptor type 1, AT1)、AT2、磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)、丝苏氨酸蛋白激酶 (serine threonine kinase, Akt)、核转录因子 kBp65 (nuclear factor of kappa B, NF- κ Bp65)、核因子 kB 激酶抑制蛋白 α (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase α , IKK α)、核因子 kB 抑制蛋白 β 亚基(NF-kappa-B inhibitor β , IKK β)、核因子 kB 抑制蛋白 α 亚基(NF-kappa-B inhibitor α , IKK α)和磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) mRNA 表达水平。根据 q-PCR 结果,分别采用免疫组化和 Western blot 检测主动脉中 AT1、LepR 的表达。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠体重、血压、血脂升高,血清 Lep、Ang II、同型半胱氨酸(Hcy)、内皮素 1 (ET-1)、TNF- α 、IL-6、 β_2 微球蛋白(β_2 -MG)升高,NO 下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。模型组大鼠主动脉内皮损伤、平滑肌细胞增生,伴发心、肾损害。与对照组比较,模型组大鼠主动脉中 LepR、Jak2、Stat3、Socs3、AT1、PI3K、Akt、NF- κ B p65、IKK β 、IKK α 、AMPK mRNA 表达上调($P < 0.05$),IKK α 下调($P < 0.05$)。免疫组化显示:模型组 AT1 和 LepR 棕黄色沉积明显增多、阳性部位分布更加广泛。Western blot 显示:与对照组比较,模型组大鼠主动脉中 AT1 和 LepR 蛋白表达增加($P < 0.05$)。**结论** 模型大鼠呈现典型的证候特征,体重增加,呈腹形肥胖状态,毛色黯淡,纳呆嗜睡,活动度下降,饮食减少,便溏,舌黯红,苔白厚腻。瘦素可作为评价痰湿壅盛证高血压大鼠模型的客观指标之一。

关键词 痰湿壅盛证;高血压;模型评价;瘦素

Establishment and Evaluation of Hypertensive Rat Model with Excessive Accumulation of Phlegm-dampness Syndrome WU Sai¹, JIANG Yue-hua², YANG Chuan-hua², MENG Xian-qing^{1,2}, HAO Dong³, and QI Ying-zi³ 1 First Clinical Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250355); 2 Department of Emergency, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250011); 3 Basic Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250355)

ABSTRACT **Objective** To observe manifestations of syndrome and biochemical indices of hypertensive model rats with excessive accumulation of phlegm-dampness syndrome (EAPDS), and to explore its possible pathological mechanism. **Methods** EAPDS rat model was prepared in 50 Wistar rats by feeding with high fat forage. Meanwhile, a normal control group consisting of 10 Wistar rats was set up by feeding with normal forage. After 25-week continuous feeding, 22 rats with body weight (BW) and blood

基金项目:泰山学者岗位建设资金资助项目(No. 2012-55);山东省科技发展计划项目(No. 2014GSF119011);山东省自然科学基金项目(No. ZR2014HL096)

作者单位:1. 山东中医药大学第一临床医学院(济南 250355); 2. 山东中医药大学附属医院急诊科(济南 250011); 3. 山东中医药大学基础医学院(济南 250355)

通讯作者:杨传华, Tel: 0531-68616602, E-mail: yangchuanhua1962@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.02.0222

pressure (BP) exceeding 25% those of the control group were selected as a model group. BW, BP, blood lipids, and related serological indicators were detected in all rats. Morphological changes of target organs were observed. mRNA expression levels of leptin receptor (LepR), Janus kinase2 (Jak2), signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), suppressor of cytokine signaling-3 (Socs3), angiotensin II receptor type 1 (AT1), angiotensin II receptor type 2 (AT2), phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), serine threonine kinase (Akt), nuclear factor of kappa B (NF- κ Bp65), inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase α (IKK α), NF-kappa-B inhibitor β (IKK β), NF-kappa-B inhibitor α (IKB α), and AMP-activated protein kinase (AMPK) were detected by quantitative real-time PCR (qPCR). Expression levels of AT1 and LepR in aorta were detected by immunohistochemical assay and Western blot respectively. Results Compared with the control group, BW, BP, and blood lipids increased; serum levels of leptin (Lep), Ang II, Hcy, ET-1, TNF- α , IL-6, and β_2 -MG increased, but NO decreased in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Aortal endothelial injury and smooth muscle cell proliferation occurred in the model group, accompanied with heart and renal injury. Compared with the control group, mRNA expression levels of LepR, Jak2, Stat3, Socs3, AT1, PI3K, Akt, NF- κ B p65, IKK β , IKB α , and AMPK in aorta were up-regulated significantly ($P < 0.05$), while the expression of IKK α decreased ($P < 0.05$). Immunohistochemical staining showed, brownish yellow deposit of AT1 and LepR was obviously increased, with more extensively positive distribution. Western blot results showed, as compared with the control group, protein expression levels of AT1 and LepR obviously increased in the model group ($P < 0.05$). Conclusions Model rats exhibited typical syndromes of EAPDS. They put up weight with fat abdomen, gloomy hair, poor appetite, hypersomnia, lowered activities, reduced food intake, loose stool, dark red tongue, white tongue with white, thick, greasy fur. Lep could be taken as one of objective indicators for evaluating hypertension rat model with EAPDS.

KEYWORDS excessive accumulation of phlegm-dampness; hypertension; evaluations of model; leptin

近年来,我国高血压病的发病率呈逐年增高趋势。在引发高血压的诸多原因之中,超重和肥胖起了不容忽视的作用。肥胖已被证实是原发性高血压病的独立危险因素,两者具有强烈的协同作用,且肥胖性高血压常伴有多种神经、内分泌异常,易并发其他心脑血管和代谢性疾病,促进不良心脑血管事件的发生^[1]。

痰湿是肥胖性高血压病的重要致病因素,朱丹溪即曾提出“肥白人多痰湿”、“无痰不作眩”的观点。近年来,临床研究显示大多数痰湿壅盛证患者伴随体重指数(BMI)的升高^[2-4],很多患者治疗中体重和血压难以得到有效控制,而化湿祛痰、平肝熄风类中药对本病证具有独到的疗效,在肥胖性高血压病研究领域具有重要的意义。但目前被认可的中医病证结合动物模型较少,研究较为表浅,本研究旨在建立由饮食诱导的痰湿壅盛证高血压大鼠模型,观察其证候表现及相关理化指标,明确其生物学基础并初步探讨可能的病理机制。

材料与方法

1 动物 60 只 Wistar 大鼠,雄性 8 周龄,SPF 级,体重 200 ~ 240 g,鲁抗集团提供,动物合格证编

号:SCXK(鲁)0130001。高脂饲料配方:普通饲料 60%,猪油 12%,蔗糖 5%,奶粉 5%,花生粉 5%,鸡蛋 10%,麻油 1%,食盐 2%,由鲁抗集团加工制作^[5]。大鼠在恒温、恒湿、明暗交替条件下饲养,适应性喂养 1 周。

2 试剂及仪器 酶联免疫吸附法(ELISA)检测瘦素(Lep,批号:L36247-09)试剂盒;血管紧张素II(AngII,批号:A25364-09)试剂盒;同型半胱氨酸(Hcy,批号:H13269-09)、内皮素1(ET-1,批号:E26367-09)、TNF- α (批号:T46070-09)、IL-6(批号:I10772-09)、NO(批号:N20908-09)、 β_2 微球蛋白(β_2 -MG,批号:41538-09)试剂盒,均由上海博蕴生物科技有限公司生产;兔抗大鼠瘦素受体(LepR)多克隆抗体(批号:20966-1-AP),武汉 Proteintech 公司;兔抗大鼠 AngII 1 型受体(AT1)多克隆抗体(批号:bs-0630R)、SABC 免疫组化试剂盒(批号:SP-0023),北京博奥森公司;DAB 显色试剂盒(批号:ZLI-9031),北京中杉金桥生物技术有限公司;Trizol(批号:E174),美国 Amresco 公司;逆转录试剂盒(批号:RR047A),大连 TaKaRa 公司;SYBR Green I Master PCR 试剂盒(批号:10559520),美国罗氏公司;血脂委

托山东中医药大学附属医院检验科代测;引物由上海生物工程技术有限公司合成,见表 1。主要仪器:全自动大小鼠无创血压测量系统(型号:BP-300A,成都泰盟公司);LightCycler 480 II 荧光定量 PCR 仪(型号:Light-Cycler 480 II,美国 Roche 集团);NanoDrop2000 微量紫外可见分光光度计(型号:ND2009,美国 Thermo Scientific 公司);Multiskan Go 酶标仪(型号:1510,美国公司);Mini-Protean Tetra 电泳系统(型号:Mini-Protean Tetra,美国 Bio-Red 公司);Trans-Blot Turbo 转膜仪(型号:170-4150,美国 Bio-Rad 公司);Fluor Chem Q 成像分析系统(型号:Fluor Chem Q,美国 Protein Simple 公司)。

表 1 目的基因引物序列

基因名称	引物序列	扩增产物大小(bp)
LepR	上游: 5'-TGACCACTCCAGATTCCACA-3' 下游: 5'-ACACTCATCTCAGAGTTCC-3'	107
Jak2	上游: 5'-GTATGCTCCCGAATCCTTGA-3' 下游: 5'-TCTGCCCTTGTTATCATTGC-3'	158
Stat3	上游: 5'-CGCCACTCTGGTGTTTCATA-3' 下游: 5'-CAGGAAGTCTGATTCTTCG-3'	115
Socs3	上游: 5'-GTCACCCACAGCAAGTTTCC-3' 下游: 5'-TCCAGTAGAATCCGCTCTCC-3'	142
AT1	上游: 5'-CAGCCGTCATCTACCGAA AC-3' 下游: 5'-GAACACGAAGCCAGAAATGT-3'	134
AT2	上游: 5'-GCAGATAAGCATTGGAA GCA-3' 下游: 5'-AGTAAGTCAGCCACAGCCAGA-3'	158
PI3K	上游: 5'-GAGGAGGACGCCAAGAAGTA-3' 下游: 5'-TGATGCCAAGAACAAGATGG-3'	103
Akt	上游: 5'-TGGACCTTTATTGGCTACA-3' 下游: 5'-CCGCTCTGCTTCATCAGC-3'	106
AMPK	上游: 5'-ATGATGAGGTGGTGAGCA-3' 下游: 5'-AGTGAATGGTTCTCGGCTGT-3'	118
NF-κB p65	上游: 5'-GACCTGGAGCAAGCCATTAG-3' 下游: 5'-CACTGTCACTGGAAGCAGA-3'	123
IKKα	上游: 5'-GAGTTCTGCTCGCTCTCTTGT-3' 下游: 5'-GAGGATGTTACAGGTCTGCT-3'	101
IKKβ	上游: 5'-GCGGGTGATTTACTCTCAGC-3' 下游: 5'-CGGACCACAGTCTTCTCATC-3'	120
IKBα	上游: 5'-AGCATCTCCACTCCGTCCT-3' 下游: 5'-AGCACCCAAAGTCACCAAGT-3'	113
β-actin	上游: 5'-CGTTGACATCCGTAA AGA-3' 下游: 5'-AGCCACCAATCCACACAG-3'	150

3 动物分组及模型建立 大鼠随机分为造模组(50 只)和对照组(10 只)。参考文献[6],造模组喂食高脂饲料,对照组喂食普通饲料,自由饮水摄食,两组均喂养 25 周。每天观察大鼠一般情况;每周测量大鼠体重、身长(鼻尖至尾根),计算 Lee's 指数 = 体重(g)^{1/3} × 10/体长(cm);每周于上午 08:00—

11:00 尾动脉加压法测量大鼠清醒状态下血压,连续测量至少 5 次,每次间隔 3 min,取平均值,记录大鼠收缩压、舒张压、脉压及平均动脉压。25 周后,以体重、血压均超过对照组平均值 25% 作为判定“肥胖性高血压大鼠模型”成功的标准^[7],筛选大鼠共 22 只纳入模型组,其余大鼠麻醉处死。

4 检测指标及方法

4.1 组织留取及病理学观察 观察结束后,3% 戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)麻醉,下腔静脉取血,分离血清。冰上分离胸主动脉,分为 3 份,一份以 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋,切片厚度 4 μm,进行苏木素-伊红(HE)染色及免疫组化,一份于 -80℃ 冻存行实时荧光定量 PCR(qPCR)和 Western blot 检测,一份以 2.5% 戊二醛固定,扫描电镜观察主动脉内皮形态,电镜样品制备和观察委托山东省立医院电镜室进行。冰上分离心、肾、肝组织,HE 染色观察组织病理学改变。

4.2 血清指标检测 生化法检测大鼠 TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平;ELISA 法检测血清中 Lep、Ang II、Hcy、ET-1、TNF-α、IL-6、NO、β2-MG 含量,各观察 3 个复孔。

4.3 qPCR 检测相关基因表达 qPCR 检测主动脉中 LepR、Janus 蛋白络氨酸激酶 2 (Janus kinase2, Jak2)、信号转导子和转录激活子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, Stat3)、细胞因子信号抑制蛋白-3 (suppressor of cytokine signaling-3, Socs3)、AT1、AT2、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)、丝苏氨酸蛋白激酶 (serine threonine kinase, Akt)、核转录因子 κBp65 (nuclear factor of kappa B, NF-κBp65)、核因子 κB 激酶抑制蛋白 α (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase α, IKKα)、核因子 κB 抑制蛋白 β 亚基 (NF-kappa-B inhibitor β, IKKβ)、核因子 κB 抑制蛋白 α 亚基 (NF-kappa-B inhibitor α, IKBα) 和磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) mRNA 表达水平。Trizol 法提取主动脉总 RNA,根据试剂盒说明书逆转录合成 cDNA。建立 20 μL PCR 反应体系:2 × Master Mix 10.0 μL、水 6.0 μL、引物 2.0 μL、cDNA 2.0 μL。反应条件:95℃ 预变性 5 s;95℃ 变性 10 s,60℃ 退火 10 s,72℃ 延伸 10 s,扩增 45 个循环;95℃ 变性 5 s,65℃ 延伸 60 s,97℃ 酶瞬间灭活;40℃ 冷却 10 s。数据采用 2^{-ΔΔCt} 法分析^[8]。数据以两组基因的相对表达差异 (Fold Change) 表示。

4.4 免疫组化检测主动脉 AT1 受体和 LepR 的表达 主动脉切片,依次滴加兔抗大鼠 AT1 和 LepR 一抗(均 1:200 稀释),4℃ 过夜,羊抗兔 IgG 二抗、SABC,显微镜下 DAB 显色、苏木素复染, PBS 代替一抗作为阴性对照,以棕黄色颗粒沉积者判定为阳性。

4.5 Western blot 检测主动脉 AT1 受体与 Lep R 蛋白表达 取主动脉组织 100 mg,加入 RIPA 裂解液(含 1% PMSF),冰上裂解 5 min,12 000 r/min 离心 15 min,提取组织蛋白。BCA 法检测蛋白浓度。12% SDS-PAGE 电泳,上样量 50 μg,PVDF 膜常规电转印,含 5%脱脂奶的 PBS-T 室温封闭 1 h。弃封闭液,不洗,加入兔抗大鼠 LepR 一抗或兔抗大鼠 AT1 一抗(均 1:300 稀释),以 β-actin 为内参,4℃ 孵育过夜。次日加入山羊抗兔 IgG 二抗(1:20 000),室温孵育 1 h,ECL 显色,Fluor Chem Q 下曝光、条带半定量分析。

5 统计学方法 应用 SPSS 19.0 进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各时间点比较采用两组独立样本 *t* 检验,组间比较采用 *Student's t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠一般表现 模型组大鼠呈现典型的痰湿证表现,大鼠体重明显增加,呈腹形肥胖状态,精神萎靡不振,毛色萎黄黯淡,纳呆嗜睡,活动度下降,饮食减少,便溏,肛周不洁,舌黯红,苔白厚腻。对照组大鼠体型瘦长,活动度良好,反应灵敏,毛色柔顺,有光泽,大便黏软有形,肛周洁净,舌质淡红,苔薄白。

2 各组大鼠造模各时间点血压和体重比较(表 2) 与对照组比较,模型组大鼠收缩压和舒张压在第 5~25 周明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),平均动脉压在 20~25 周明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在造模过程中,两组大鼠脉压差比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

与对照组比较,模型大鼠第 5~25 周体重明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);Lee's 指数对照组为 2.85 ± 0.12 ,模型组为 3.46 ± 0.13 ,模型组高于对照组($P < 0.05$),模型成功率为 44%。

3 各组大鼠血清学指标比较(表 3、4) 喂食高脂饲料 25 周后,与对照组比较,模型组大鼠 TC、LDL-C 明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);两组

表 2 各组大鼠血压及体重比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	体重(g)	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)	平均动脉压(mmHg)	脉压差(mmHg)
模型	22	0 周	232.81 ± 28.57	132.73 ± 10.68	102.26 ± 7.32	114.38 ± 6.76	33.27 ± 7.15
		5 周	467.26 ± 48.03 *	164.13 ± 6.38 *	124.75 ± 5.18 *	130.87 ± 4.93	39.38 ± 5.65
		10 周	590.69 ± 54.35 **	155.17 ± 9.24 *	122.81 ± 9.81 *	131.46 ± 9.52	32.88 ± 6.51
		15 周	694.19 ± 54.75 *	154.63 ± 8.78 *	126.63 ± 10.60 *	128.63 ± 9.50	34.53 ± 6.33
		20 周	737.75 ± 52.58 *	164.5 ± 12.84 *	130.08 ± 10.73 *	134.50 ± 10.04 *	32.50 ± 7.56
		25 周	844.31 ± 64.19 *	171.63 ± 10.59 *	132.25 ± 10.21 *	139.38 ± 8.66 *	33.07 ± 6.67
对照	10	0 周	236.72 ± 32.03	135.23 ± 12.94	105.54 ± 8.21	113.68 ± 10.94	36.37 ± 6.28
		5 周	329.53 ± 40.53	136.89 ± 11.98	104.89 ± 8.61	115.56 ± 10.08	34.58 ± 6.17
		10 周	476.59 ± 36.43	133.67 ± 10.59	98.22 ± 8.65	113.04 ± 10.95	35.44 ± 6.14
		15 周	583.73 ± 33.13	134.58 ± 15.71	103.56 ± 9.37	112.59 ± 8.66	30.81 ± 6.57
		20 周	659.88 ± 22.35	136.13 ± 13.73	101.13 ± 9.48	110.79 ± 9.16	37.41 ± 6.49
		25 周	675.28 ± 21.89	135.13 ± 12.69	100.86 ± 9.62	113.67 ± 10.32	34.84 ± 5.58

注:与对照组同期比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 3 高脂饮食 25 周后各组大鼠血脂水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TC	TG	HDL-C	LDL-C
模型	22	2.13 ± 0.29 *	1.15 ± 0.27	0.41 ± 0.04	0.47 ± 0.06 *
对照	10	1.45 ± 0.20	0.76 ± 0.11	0.51 ± 0.08	0.24 ± 0.02

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

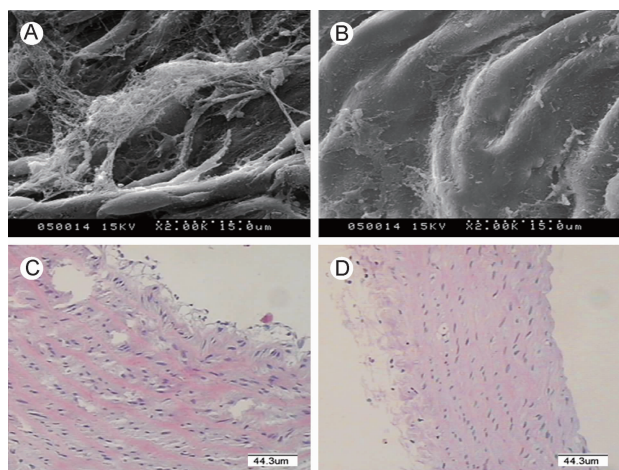
表 4 各组大鼠血清学指标变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ang II (ng/L)	Lep (ng/mL)	ET-1 (ng/mL)	Hcy (μmol/L)	NO (μmol/L)	β2-MG (ng/mL)	TNF-α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
模型	22	192.44 ± 18.27 *	6.33 ± 0.31 *	59.29 ± 6.41 *	11.08 ± 0.73 *	36.32 ± 3.04 *	26.61 ± 2.42 *	208.31 ± 11.47 *	2 727.11 ± 151.98 *
对照	10	120.29 ± 17.13	2.74 ± 0.28	33.62 ± 6.67	9.68 ± 0.61	51.73 ± 6.18	17.18 ± 2.55	143.22 ± 9.36	2 183.36 ± 75.31

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

TG、HDL-C 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);与对照组比较,模型组 Ang II、Hcy、Lep、ET-1 及 $\beta 2$ -MG 升高($P < 0.05$),NO 下降($P < 0.05$);血清中炎症因子 TNF- α 和 IL-6 升高($P < 0.05$)。

4 各组大鼠主动脉形态学观察(图 1) 电镜显示:对照组大鼠主动脉血管条索排列整齐,内皮细胞间连接完整,黏膜光滑,无明显附着物;模型组血管平滑肌层增厚,内壁不光滑,血管内皮可见脱落、破损,聚集成分,条索部分紊乱,细胞间连接丢失,内膜可见大量纤维、脂质等斑块附着物。HE 染色显示:对照组大鼠主动脉管壁厚薄均匀,内皮呈连续波浪状,中层平滑肌细胞排列整齐,细胞核大小一致;模型组大鼠主动脉内皮排列紊乱,中层平滑肌的细胞层数明显增加,细胞核密集,体积增大,核深染。



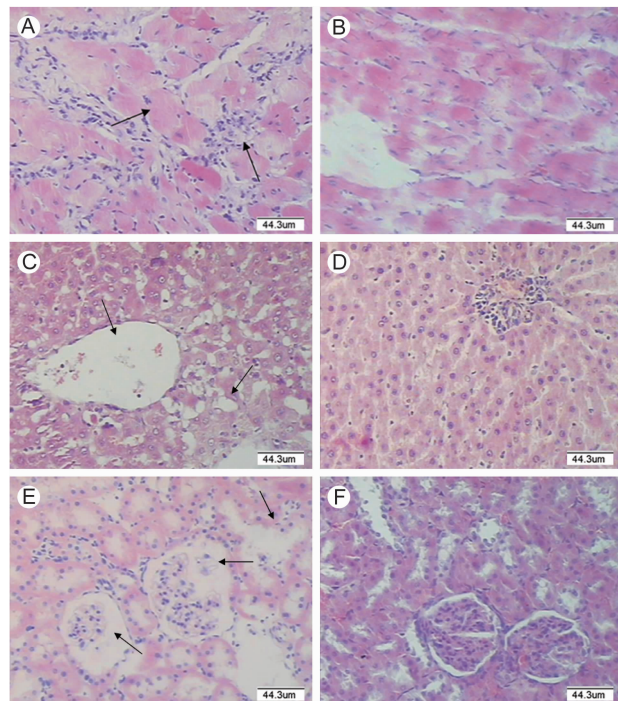
注:A 为电镜下模型组($\times 2000$);B 为电镜下对照组($\times 2000$);C 为 HE 染色后模型组($\times 200$);D 为 HE 染色后对照组($\times 200$)

图 1 各组大鼠主动脉内膜形态比较

5 各组大鼠主要脏器形态学变化(图 2) 对照组心肌细胞形态正常、排列条理,心肌间隙较小,动脉血管周围无炎细胞浸润(2B)。模型组心肌细胞体积增大,心肌间隙增宽,并见小的灶性坏死,部分心肌轻度变性并断裂(2A);模型组心肌细胞动脉血管周围少量慢性炎细胞浸润,管壁空泡、脂肪变性,心肌细胞间质散在少量纤维结缔组织。

对照组肾小球形态正常,球囊间隙较小,肾小管无明显扩张(2F);模型组可见部分肾小球高度扩张,肾小球毛细血管扩张,球囊间隙增宽,个别肾小球变性、坏死、萎缩,部分肾小管扩张,动脉血管内皮增生、玻璃样变和空泡变性(2E)。

对照组肝细胞形态正常、边界清楚、胞浆丰富,中央静脉及其周围放射状排列的肝细胞索清晰(2D);模型组肝细胞呈现典型脂肪肝样变,肝细胞肿胀,细胞质

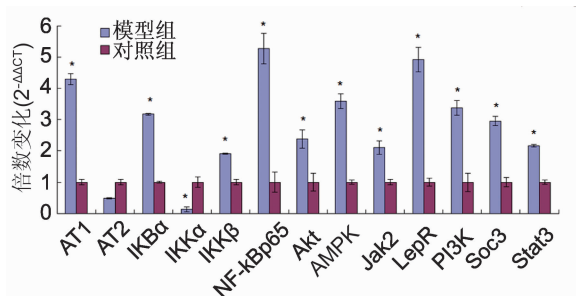


注:A 为模型组左心室组织;B 为对照组左心室组织;C 为模型组肝组织;D 为对照组肝组织;E 为模型组肾组织;F 为对照组肾组织;箭头所指为病变组织

图 2 各组大鼠心、肝、肾组织形态比较 (HE 染色, $\times 200$)

中可见大的脂滴空泡,细胞核居边(2C)。

6 各组大鼠主动脉中各基因表达水平比较(图 3) 与对照组比较,模型组大鼠主动脉中 LepR、Jak2、Stat3、Socs3、AT1、PI3K、Akt、NF- κ Bp65、IKK β 、IKB α 、AMPK mRNA 表达明显上调($P < 0.05$),IKK α 表达下调($P < 0.05$),AT2 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:与对照组比较, * $P < 0.05$

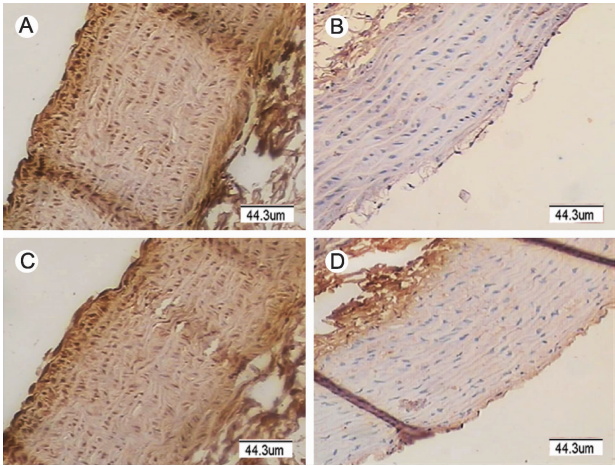
图 3 各组大鼠主动脉中各基因表达比较

7 各组大鼠主动脉中 AT1 和 LepR 蛋白表达比较(图 4、5,表 5) 免疫组化显示:模型组主动脉棕黄色沉积明显增多、阳性部位分布更加广泛,模型组大鼠主动脉中 LepR、AT1 分布增加。Western

blot 条带的半定量分析结果表明,经高脂饲料 25 周后,模型组大鼠主动脉的 LepR、AT1 表达增加 ($P < 0.05$)。

表 5 各组大鼠 AT1 及 LepR 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	n	LepR/ β -actin	AT1/ β -actin
模型	22	0.284 $\pm$ 0.026 *	0.347 $\pm$ 0.031 *
对照	10	0.212 $\pm$ 0.022	0.269 $\pm$ 0.024

注:与对照组比较, * $P < 0.05$



注:A 为模型组主动脉 LepR 表达;B 为对照组主动脉 LepR 表达;C 为模型组主动脉 AT1 受体表达;D 为对照组主动脉 AT1 受体表达

图 4 各组大鼠主动脉中 LepR 及 AT1 的表达和分布 (免疫组化染色, $\times 200$)

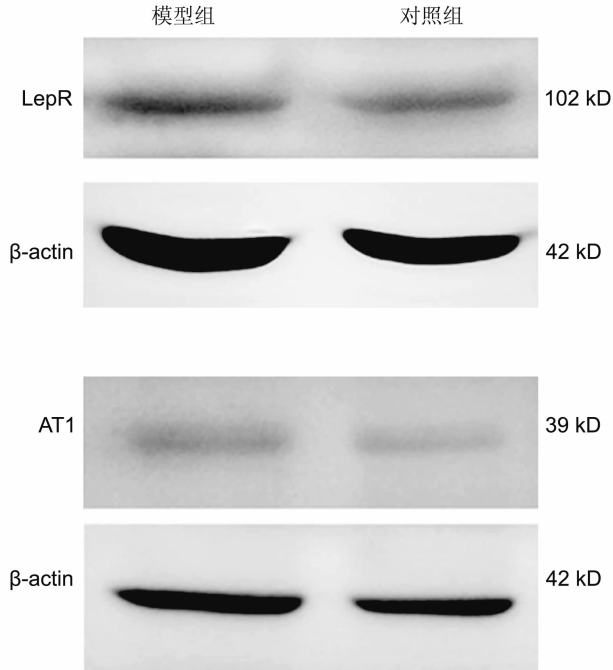


图 5 各组大鼠主动脉中 LepR、AT1 蛋白表达电泳图

讨 论

痰湿壅盛证是高血压病常见证型之一。其病因病机,多因情志失调、饮食不节、嗜食肥甘厚味、油腻炙博、劳逸过度、体质因素等导致脾胃健运失司,不能布散水谷精微,导致体内痰湿凝聚,上蒙清窍,发为眩晕。痰湿日久阻碍气血运行,导致气滞血瘀,久而化火生风,亦可上扰头目,导致眩晕头痛。肥胖是痰湿证形成的重要诱因。清《石室秘录》载:“肥人多痰,乃气虚也,虚则气不运行,故痰生之”。《杂病广要》指出病机为“气虚肥白之人,湿痰滞于上,阴火起于下,是以痰挟虚火,上冲头目”。本研究通过长期高脂饮食诱导建立大鼠模型,旨在模拟人高血压病痰湿壅盛证的发病过程及“脾虚失运,痰湿内生”的病机特点。经过 25 周的高脂饲料喂养后模型大鼠呈现典型的证候表现,包括饮食减少、嗜睡、活动度下降、反应慢、便溏等大鼠呈腹型肥胖,体重、Lee’s 指数及血压均明显升高,且在高脂饮食早期升高较为迅速。血脂升高,肝细胞呈脂肪肝样变。模型大鼠在症状体征与各项理化指标方面均符合“痰湿壅盛”证型特点,且指标稳定,无可逆性变化,提示造模成功。国外研究显示高脂饮食诱导肥胖性高血压模型成模率约为 50%^[6],本研究的成模率为 44%,与国外研究相符。

模型大鼠血清中 Ang II 显著升高提示肾素—血管紧张素(RAS)系统的激活;Hcy、ET-1 升高,NO 降低,提示内皮损伤和内皮功能的紊乱;TNF- α 、IL-6 升高提示机体处于炎症反应状态; β 2-MG 的升高提示肾小球滤过功能受损和高血压肾损害早期,该结果客观支持了痰湿壅盛高血压模型的成功。Ang II 持续的缩血管效应导致血管缺血缺氧,引发炎症反应,大量炎性细胞浸润,激活免疫细胞如单核-巨噬细胞表达释放大量的 TNF- α 、IL-6 等炎性细胞因子, TNF- α 、IL-6 可进一步促进血管内皮细胞的损伤,增强缩血管因子效应^[9]。血清 Hcy 可直接激活 RAS 系统,减少 NO 生成、引起内皮紊乱、平滑肌细胞过度增殖,加速弹力纤维溶解、胶原纤维合成,加速细胞衰老和组织纤维化,是冠心病、脑卒中的独立危险因素^[10]。

高血压病的发病过程中涉及神经、内分泌及免疫系统的异常。在本研究中,模型大鼠体态肥胖、血压升高,血清瘦素水平明显升高(2.299 倍),即存在高瘦素血症。瘦素由脂肪组织合成分泌,是联系肥胖和高血压的分子基础^[11]。虽然大鼠血清瘦素升高,但机体对瘦素的反应性减弱或无反应,增加的瘦素无法抑制肥胖的进展和体内脂肪的蓄积,即机体对瘦素的摄食

和体重调节等代谢性作用产生了抵抗;同时,体内增加的脂肪组织持续分泌瘦素,而瘦素对心血管的作用仍然保留,导致血压继续升高,发生心血管损害。模型大鼠主动脉中 *LepR*、*AT1* mRNA 和蛋白质表达显著增加,加强了瘦素的外周效应,从分子水平上说明瘦素和 *Ang II* 参与了血管的重塑。据此推测 *RAS* 系统的激活和高瘦素血症在痰湿壅盛高血压的疾病发展过程中起关键作用。*NF-κB p65* 的上调提示机体的炎症状态,联合构成了本证型的分子基础。

本研究中,模型大鼠主动脉 *LepR*、*Jak2*、*Stat3*、*Socs3*、*AT1*、*PI3K*、*Akt*、*NF-κB p65*、*IKKβ*、*IKBα*、*AMPK* 表达上调,*AT2*、*IKKα* 表达下调,提示本证型的病理机制可能与 *Jak2/Stat3* 通路、*PI3K/Akt* 通路及 *NF-κB* 通路的活化密切相关。增加的瘦素可直接活化 *JAK2/STAT3* 和 *PI3K/Akt* 通路,启动多种基因的转录,改变细胞糖代谢及蛋白质合成等过程,加重血管内皮损伤、减缓平滑肌细胞凋亡^[12],两者通过 *PI3K/Akt* 等分子彼此联系,互相调节。血清 *TNF-α*、*IL-6* 升高,激活了内皮细胞中的 *IKK* 激酶,从而激活 *NF-κB* 通路^[13],参与炎症、免疫、细胞增殖凋亡等多种生理病理过程的调控。

本研究的造模方法是以肥胖是形成痰湿证的重要诱因因为根据。由于造模成功率低,如何提高造模成功率有待进一步研究。本研究主要以肥胖痰湿壅盛证高血压大鼠为主,形体消瘦痰湿证大鼠则不在本研究范围。

参 考 文 献

- [1] Kotchen TA. Obesity-related hypertension: epidemiology, pathophysiology, and clinical management [J]. *Am J Hypertens*, 2010, 23(11): 1170–1178.
- [2] 商秀洋,史琦,石洁,等. 高血压病患者中医证候与体重指数的关系研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,

2009, 7(11): 1265–1267.

- [3] 董海琦. 高血压病痰湿壅盛证现代科学内涵的代谢组学研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2006.
- [4] 钱俐俐. 影响高血压病中医证型相关因素的研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(5): 133–134.
- [5] 程志清, 黄科. 高血压合并肥胖大鼠动物模型的建立[J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31(3): 291–292.
- [6] Dobrian AD, Davies MJ, Prewitt RL, et al. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity [J]. *Hypertension*, 2000, 35(4): 1009–1015.
- [7] Northcott CA, Fink GD, Garver H, et al. The development of hypertension an hyperaldosteronism in a rodent model of life-long obesity [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(4): 1764–1773.
- [8] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades [J]. *Nature*, 2001, 410(6824): 37–40.
- [9] 王艳军, 何冰, 李晓东. *TNF-α*、*IL-6*、*NO* 在高血压胰岛素抵抗患者血浆中的变化及意义 [J]. 中国医科大学学报, 2006, 35(5): 525–529.
- [10] Stühlinger MC, Oka RK, Graf EE, et al. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocysteinemia: role of asymmetric dimethylarginine [J]. *Circulation*, 2003, 108(8): 933–938.
- [11] Simonds SE, Pryor JT, Ravussin E, et al. Leptin mediates the increase in blood pressure associated with obesity [J]. *Cell*, 2014, 159(6): 1404–1416.
- [12] Harlan SM, Rahmouni K. *PI3K* signaling: A key pathway in the control of sympathetic traffic and arterial pressure by leptin [J]. *Mol Metab*, 2013, 2(2): 69–73.
- [13] Chen LF, Williams SA, Mu Y, et al. *NF-kappaB* *RelA* phosphorylation regulates *RelA* acetylation [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(18): 7966–7975.

(收稿:2015-05-06 修回:2015-11-01)