

清眩降压汤对自发性高血压大鼠肾脏损害的保护作用

刘望予, 陈宏伟, 陈达鑫, 彭军, 褚剑锋*

(福建中医药大学中西医结合研究院, 福建省福州市闽侯上街邱阳路 1 号, 350122)

摘要 目的 探讨清眩降压汤对高血压所致的肾脏损害的保护作用及其可能机制。方法 20 只自发性高血压大鼠 (SHR) 随机分为模型组、清眩降压汤组, 每组 10 只; 10 只 Wistar 大鼠为正常组。清眩降压汤组给予清眩降压汤 5.4 g/(kg·d) 灌胃, 模型组给予生理盐水 1 ml/d 灌胃, 正常组不予干预。每周用无创血压计测量各组大鼠的收缩压, 8 周后观察大鼠肾脏组织形态, 肾组织中氧化应激水平的还原型辅酶 II 氧化酶 2 (NOX2)、还原型辅酶 II 氧化酶 4 (NOX4) 情况, 以及相关炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6) 表达。结果 模型组第 1~8 周的收缩压明显高于正常组 ($P < 0.05$); 从第 3 周起, 与模型组相比, 清眩降压汤组的收缩压明显降低 ($P < 0.05$); 清眩降压汤组大鼠肾小管损伤程度比模型组大鼠的损伤程度轻。与正常组比较, 模型组大鼠肾组织 NOX2、NOX4、TNF- α 、IL-6 表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 清眩降压汤组大鼠肾组织 NOX2、NOX4、TNF- α 、IL-6 表达降低 ($P < 0.05$)。结论 清眩降压汤可降低 SHR 的收缩压, 并具有一定肾脏保护作用, 而其作用机制可能与降低氧化应激水平、减少相关炎症因子有关。

关键词 高血压病; 清眩降压汤; 肾脏损害; 氧化应激; 炎症因子

高血压病是多种危险因素引起的一类综合性疾病, 以体循环的动脉收缩压和 (或) 舒张压升高为特征, 是常见的心血管疾病之一^[1]。肾脏损害与高血压病的发生发展有着密切的关系^[2-3]。有文献报道, 高血压病导致的肾损害与氧化应激有着密切的联系^[4-5]。高血压病患者体内氧化和抗氧化水平出现失衡, 产生大量的自由基, 从而造成肾小管上皮细胞的损害, 使肾小管结构受到破坏, 进而损害肾脏的功能^[6]。清眩降压汤是陈可冀院士的经验方。临床研究表明, 清眩降压汤有较好的降压效果, 能明显改善高血压病临床症状和生存质量, 对靶器官具有较好的保护作用^[7-8]。我们的前期研究也发现, 清眩降压汤控制自发性高血压大鼠 (SHR) 收缩压升高的同时对于肾脏也具有确切的保护作用^[9]。本研究旨在进一步探讨清眩降压汤对肾脏的保护作用及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

4 周龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 10 只, 4 周龄

SPF 级雄性 SHR 大鼠 20 只, 体质量均为 200 ~ 250 g, 购自上海斯莱克公司, 实验动物合格证号: SCXK (沪) 2007-0005。

1.2 药物

清眩降压汤组成: 天麻 30 g, 钩藤 50 g (后下), 苦丁茶 30 g, 杜仲 30 g, 夜交藤 30 g, 川牛膝 10 g, 菊花 15 g, 桑叶 15 g, 黄芩 10 g, 鲜地黄 30 g, 均购自福建中医药大学附属第三人民医院, 采用水蒸气回流法蒸煮, 所得药液减压过滤后于蒸发皿内蒸干, 真空干燥至粉末封装于 4℃ 备用。

1.3 主要试剂和仪器

4% 多聚甲醛 (批号 80096618, 中国国药沪试集团有限公司); 苏木素染色试剂瓶 (批号 G1140)、伊红染色试剂瓶 (批号 G1100), 均为中国索莱宝科技有限公司产品; 超敏免疫组织化学一步法检测试剂盒 (批号 KIT9720, 福州迈新生物技术开发有限公司); DAB 显色液 (批号 KGP1045, 南京凯基生物技术法有限公司); 还原型辅酶 II 氧化酶 2 (NOX2) 抗体 (批号 19013-1-AP)、还原型辅酶 II 氧化酶 4 (NOX4) 抗体 (批号 14347-1-AP)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 抗体 (批号 17590-1-AP)、白细胞介素 6 (IL-6) 抗体 (批号 21865-1-AP), 均为武汉三鹰技术有限公司产品。

基金项目: 国家自然科学基金 (81774135); 福建省科技厅自然科学基金 (2018J01887); 福建中医药大学校管科研课题 (X2017008-重点)

* 通讯作者: JianfengChu@126.com, 18950498395

ALC-NIBP 型无创鼠尾血压计 (上海奥尔科特生物科技有限公司); ZT-44S3 型生物组织自动脱水机, YB-6LF 型生物组织石蜡包埋机, 均为湖北孝感亚光医用电子技术有限公司产品; RM2235 型全自动石蜡切片机, 德国莱卡公司; YS100 型光学显微镜 (株式会社尼康); 图像采集及分析系统 Motic 6.0 (北京麦克奥迪图像技术有限公司)。

1.4 动物分组和给药

20 只 SHR 大鼠依照初始体重值输入 Excel 2007 表格中, 随后对体重值进行随机数对应, 最后通过对随机数按照从大至小顺序排列, 以 10 个数值为一组, 将相应的大鼠分为模型组和清眩降压汤组, 每组 10 只。10 只 Wistar 大鼠设为正常组。根据《药理实验方法学》^[10] 标准动物的等效剂量折算系数法确定药物的使用剂量, 模型组给予生理盐水 1 ml/d 灌胃, 清眩降压汤组给予清眩降压汤 5.4 g/(kg·d) 灌胃, 每次 1 ml, 每日早上灌胃, 连续给药 8 周。正常组不干预。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 收缩压 将无创鼠尾血压计安装好, 将大鼠放入固定器中, 随后将固定器和大鼠尾部均放置在加热板上, 让大鼠稳定约 3 min。设置好血压测量软件后开始测定, 每只大鼠预测定 10 个循环, 正式测定 15 个循环, 每个循环 30 s, 记录收缩压, 每周测量 1 次。

1.5.2 肾组织病理 给药 8 周后, 取大鼠左侧肾脏, 将肾脏沿纵轴分开, 其中一块肾脏立即放入装有 4% 多聚甲醛的离心管中进行固定。并在固定满 24 h 后, 采用低浓度至高浓度的无水乙醇进行组织脱水处理, 二甲苯透明, 在浸腊之后对肾脏组织进行石蜡包埋处理, 运用常规切片法将组织厚度切成 3 μm, 随后进行二甲苯透明处理, 并用高浓度至低浓度的无水乙醇进行脱蜡, 苏木素染色, 自来水冲洗, 随后放入水中进行返蓝, 10 min 后开始伊红染色, 最后将片吹干, 以中性树胶封片, 于镜下观察组织形态。

1.5.3 肾组织 NOX2、NOX4、TNF-α、IL-6 表达 将包埋好的肾脏组织蜡块继续进行切片处理, 置

于 37 ℃ 烤箱中过夜。次日将切片放进 60 ℃ 烘箱, 烘烤 1 h 后, 用高浓度至低浓度的无水酒精脱蜡, 随后对组织切片进行抗原修复, 然后用免疫组织化学一步法试剂盒, 将石蜡切片分别进行染色, 并以 1 × PBS 作为阴性对照, 置于 4 ℃ 过夜, 次日孵育链霉素与二抗, 进行 DAB 的组织显色。在镜下找出阳性表达部位, 并选择 6 个视野进行拍照 (400 ×)。结果采用阳性率进行半定量分析。采用 Motic 6.0 图像分析系统分析所获取的图片。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件处理数据, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD 法。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间收缩压比较

表 1 示, 第 1 ~ 8 周, 模型组收缩压明显高于正常组 ($P < 0.05$); 给药第 1 周, 清眩降压汤组收缩压低于模型组, 从第 3 周起, 降压作用趋于稳定, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。表明清眩降压汤对于 SHR 大鼠收缩压的升高有明显抑制作用。

2.2 各组大鼠肾组织病理结果

正常组肾小球体积正常, 无萎缩及肿胀; 肾小管排列整齐, 管腔结构清晰; 间质内无炎症细胞浸润; 毛细血管壁薄且清晰。模型组肾小管的上皮细胞排列紊乱, 有空泡现象, 肾小管腔内可见蛋白颗粒析出, 同时也可发现炎症细胞的浸润, 肾小管扩张导致其结构损伤严重。与模型组比较, 清眩降压汤组肾小管管腔较清晰, 炎症细胞浸润减少, 肾小管损伤结构有所改善, 说明清眩降压汤可改善由高血压导致的肾小管病理现象。

2.3 各组大鼠肾组织 NOX2、NOX4、TNF-α、IL-6 表达比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组大鼠肾组织 NOX2、NOX4、TNF-α、IL-6 表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 清眩降压汤组大鼠肾组织 NOX2、NOX4、TNF-α、IL-6 表达降低 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠不同时间收缩压比较 (mmHg, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周	第 7 周	第 8 周
正常组	8	120.03 ± 1.24	123.58 ± 2.00	119.12 ± 1.87	122.02 ± 1.29	125.44 ± 1.26	127.32 ± 1.82	126.23 ± 2.38	126.58 ± 1.55
模型组	8	178.22 ± 2.92*	183.12 ± 2.76*	186.93 ± 3.05*	190.25 ± 2.54*	207.36 ± 2.26*	218.12 ± 2.91*	215.66 ± 3.05*	216.21 ± 3.20*
清眩降压汤组	8	168.92 ± 1.66 [△]	178.44 ± 3.90	174.52 ± 3.46 [△]	175.92 ± 2.99 [△]	179.36 ± 3.24 [△]	177.22 ± 2.72 [△]	172.43 ± 2.46 [△]	170.28 ± 2.20 [△]

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 各组大鼠肾组织 NOX2、NOX4、TNF- α 、IL-6 表达比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NOX2	NOX4	TNF- α	IL-6
正常组	6	12.38 $\pm$ 4.46	12.00 $\pm$ 4.78	11.36 $\pm$ 6.58	15.87 $\pm$ 3.73
模型组	6	34.45 $\pm$ 5.43*	33.97 $\pm$ 5.21*	33.33 $\pm$ 5.40*	32.58 $\pm$ 5.52*
清眩降压组	6	19.00 $\pm$ 5.18 $^{\Delta}$	18.11 $\pm$ 5.30 $^{\Delta}$	17.45 $\pm$ 7.39 $^{\Delta}$	23.78 $\pm$ 4.70 $^{\Delta}$

注: NOX2, 还原型辅酶 II 氧化酶 2; NOX4, 还原型辅酶 II 氧化酶 4; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-6, 白细胞介素 6; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

3 讨论

高血压病属于中医学“眩晕”“头痛”等范畴,其病因多与情志失调、饮食不节、内伤虚劳、先天禀赋等有关。这些因素作用于机体引起肝肾阴阳失调,气血失和,血行不畅,形成血瘀;肥甘厚味则损伤脾胃,脾为生痰之源,脾虚失运,则聚湿成痰阻于血脉,形成血瘀;肝肾阴虚,阴虚则津亏,煎熬营血,而成血瘀。瘀阻脉络,血行不畅,影响心、脑、肾等脏腑功能,引起多种严重并发症如心、脑血管病和肾病。高血压性肾病多为高血压病发病日久,致阴阳失调,脾肾亏虚,气血失和,气虚血瘀,痰湿内蕴,肾络瘀阻。其基本病机为脾肾亏虚为本,湿浊内蕴,瘀血阻络为标。脾失健运、肾元不足是高血压性肾病的启动因素和发展转归的根本,痰湿内蕴、气血瘀滞是高血压性肾病的病理基础和转化进展的主要机制。清眩降压汤方中苦丁茶散肝风、清头目、活血脉,天麻、钩藤平肝潜阳为君;杜仲补益肝肾,夜交藤搜风通络、养心安神,黄芩、菊花、桑叶清肝热、平肝阳为臣;佐以川牛膝祛瘀通络,引血下行以折其阳,鲜地黄清热养阴滋肾水。诸药合用,共奏益肝肾、清肝热、平肝阳之功,主要用于高血压肝肾阴虚、肝阳上亢证。冬青皂苷是苦丁茶的主要有效成分,其在由去甲肾上腺素、CaCl₂ 所诱发的血管收缩中具有显著抑制作用^[1]。天麻主要成分天麻素能抑制由儿茶酚胺所导致的缩血管效应^[2]。黄芩苷所具有的总抗氧化功能除了能降低肝组织和血浆中胆固醇甘油三酯浓度外,还可以升高密度脂蛋白水平^[3]。本研究结果显示,清眩降压汤对于 SHR 大鼠收缩压的升高有明显抑制作用。

还原型辅酶 II 氧化酶是肾小管上皮细胞生成活性氧 (ROS) 的关键来源^[4-6],其中 NOX2 与 NOX4 作为主要成分发挥重要作用。本研究结果表明,模型组大鼠肾组织 NOX2、NOX4 的含量明显上升,表明还原型辅酶 II 氧化酶的活性增加,使 ROS 过度生成,脂质过氧化产物也随之增加,此

时超氧化物歧化酶与氧化氢酶等在机体中的活性降低,导致肾脏中氧化与抗氧化作用失衡,造成肾脏发生氧化应激反应^[7-18]。当肾脏出现氧化应激损伤时,会激活体内的多条信号转导通路生成大量炎症细胞因子,炎症因子浸润肾脏后又进一步加重肾脏组织损害^[9-22]。TNF- α 、IL-6 作为重要的炎症因子,参与了由氧化应激损伤导致肾脏损害的过程^[9]。本实验结果发现,模型组大鼠肾组织中 TNF- α 、IL-6 的表达明显增加,提示高血压所致的肾脏损害可能是通过增加 NOX2 与 NOX4 的表达,刺激氧化应激水平,从而大量释放 TNF- α 、IL-6 炎症细胞因子,使其浸入肾脏组织中所造成,而清眩降压汤能有效改善肾小管损伤及炎症因子浸润的情况。

本研究不是在于仅采用免疫组化的方法检测氧化应激相关因子与炎症细胞因子的表达,在以后的研究中可通过对大鼠肾脏组织进行蛋白与基因的提取,检测相关因子的含量,进一步明确清眩降压汤改善氧化应激,减轻炎症水平的作用,同时也可基于核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路更加深入地探讨清眩降压汤减轻氧化应激损伤的作用机制。

参考文献

- [1] BRENNER R, RIMOLDI SF, REXHAJ E. Arterial hypertension-when are which combination therapies useful [J]. Am J Kid Dis, 2012, 69(5):305-313.
- [2] 春花. 700 例慢性肾功能衰竭病因调查分析 [J]. 西藏大学学报(自然科学版), 2009, 24(2):51-54.
- [3] WEIR MR. The role of combination anti-hypertensive therapy in the prevention and treatment of chronic kidney disease [J]. Am J Hypertens, 2005, 18(4):100-105.
- [4] 尚志星. 氧化应激对盐敏感性高血压肾损害大鼠转化生长因子 β 1 表达的影响 [D]. 太原: 山西医科大学, 2015: 29-30.
- [5] 丁康. 潜育阴颗粒调控氧化应激及炎症信号通路治疗高血压肾损害机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2015: 50-51.
- [6] WANG D, STRANDGAARD S, IVERSEN J, et al. Asymmetric dimethylarginine, oxidative stress and vascular nitric oxide synthase in essential hypertension [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009, 296(2):195-200.

- [7] 褚剑锋. 清眩降压汤对 SHR 血压及心脏的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 7(5): 553-554.
- [8] 陈宏伟, 包丽亚, 黄月, 等. 清眩降压汤控制自发性高血压大鼠血压升高与抑制心肾大血管损害的药效学研究 [J]. 康复学报, 2017, 27(2): 28-32.
- [9] 褚剑锋, 吴广文, 郑国华, 等. 清眩降压汤对自发性高血压模型大鼠肾脏的保护作用 [J]. 中医杂志, 2012, 53(5): 420-423.
- [10] 徐淑云. 药理实验方法学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 882-928.
- [11] 李维林, 吴菊兰, 任冰如, 等. 枸骨中 3 种化合物的心血管药理作用 [J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(3): 6-10.
- [12] 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]. 四川中医, 2007, 25(9): 20-22.
- [13] 黄群. 黄芩的药理活性研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(5): 226-227.
- [14] BLOCK K, EID A, GRIENDLING KK, et al. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK-1 in response to angiotensin II: role in mesangial cell hypertrophy and fibronectin expression. [J]. J Biol Chem, 2008, 283(35): 24061-24076.
- [15] GILL PS, WILCOX CS. NADPH oxidases in the kidney [J]. Antioxid Redox Sign, 2006, 8(9-10): 1597-1607.
- [16] BEDARD K, KRAUSE KH. The NOX family of ROS-Generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology [J]. Physiol Rev, 2007, 87(1): 245-313.
- [17] REDDVP, ZHU X, PERRY G, et al. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2009, 16(4): 763-774.
- [18] SENADOR D, KEY M, BROSNIHAN KB, et al. Cardiovascular interactions between losartan and fructose in mice [J]. J Cardiovasc Pharm Ther, 2010, 15(1): 68-77.
- [19] HOU X, SHEN YH, LI C, et al. PPAR α agonist fenofibrate protects the kidney from hypertensive injury in spontaneously hypertensive rats via inhibition of oxidative stress and MAPK activity [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(3): 653-659.
- [20] ZHAO Q, HIXSON JE, RAO DC, et al. Genetic variants in the apelin system and blood pressure responses to dietary sodium interventions: a family-based association study [J]. J Hypertens, 2010, 28(4): 756-763.
- [21] LI JM. Essential role of the NADPH oxidase subunit p47(phox) in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor- α [J]. Circ Res, 2002, 90(2): 143-150.
- [22] MA F, LIN F, CHEN C, et al. Indapamide lowers blood pressure by increasing production of epoxyeicosatrienoic acids in the kidney [J]. Mol Pharmacol, 2013, 84(2): 286-295.

Protective Effects of *Qingxuan Jiangya Decoction* (清眩降压汤) on Kidney Damage in Spontaneously Hypertensive Rats

LIU Wangyu, CHEN Hongwei, CHEN Daxin, PENG Jun, CHU Jianfeng

(College of Integrated Chinese and Western Medicine, Fujian University of Chinese Medicine, Fuzhou 350122)

ABSTRACT Objective To explore the protective effects and mechanism of *Qingxuan Jiangya Decoction* (清眩降压汤) on kidney damage which resulted from essential hypertension. **Methods** A total of 20 spontaneously hypertensive rats (SHR) were randomly divided into model group and *Qingxuan Jiangya Decoction* (QXJYD) group, with 10 rats in each group, and other 10 Wistar rats were taken as normal group. The rats in QXJYD group were treated with 5.4 g/(kg·d) *Qingxuan Jiangya Decoction* intragastric administration while the model group was given 1 ml/d normal saline (NS), and no treatment was performed in normal group. Systolic blood pressure of all groups rats was detected weekly with noninvasive blood pressure meter. After 8 weeks, the pathological changes of kidney tissue, nicotinamide oxidase 2 (NOX2) and nicotinamide oxidase 4 (NOX4) in oxidative stress level in renal tissue and the expression of interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α) were observed. **Results** During the 1-8 week of treatment, the systolic blood pressure of the model group was significantly higher than that of the normal group ($P < 0.05$). Since the 3rd week of treatment, the systolic blood pressure in QXJYD group was significantly decreased compared with the model group ($P < 0.05$). The renal tubular injury in QXJYD group was improved more significantly than that in the model group. Compared with the normal group, the expressions of NOX2, NOX4, IL-6, TNF- α were decreased more in the model group ($P < 0.05$), and above expression levels in QXJYD group were decreased more than those in model group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Qingxuan Jiangya Decoction* is effective in decreasing SHR systolic pressure and protecting the renal tubular tissues from injury. The mechanism might be related to reducing oxidative stress and inflammatory level.

Keywords hypertension; *Qingxuan Jiangya Decoction*; kidney damage; oxidative stress; inflammatory factors

(收稿日期: 2018-03-28; 修回日期: 2018-08-03)

编辑: 王利芬