

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217(2016) 06-0519-05

玉夏胶囊对自发性高血压大鼠心肌损伤的保护作用

沈媛媛, 卢毅宁, 胡坤媚, 胡浩然, 郝伟, 杨解人

(皖南医学院 国家级中药药理三级实验室, 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 观察玉夏胶囊对自发性高血压大鼠(SHR)心肌 iNOS、NADPH 氧化酶亚单位 p22^{phox} 和 p47^{phox} 表达的影响, 探讨玉夏胶囊对 SHR 心肌损伤的保护作用机制。方法: 14 周龄雄性 SHR 28 只, 随机分为 SHR 模型组 [0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 5 mL/kg], 玉夏胶囊高、中、低 (0.6、0.3、0.15 g/kg) 剂量组, 每组 7 只。另设 WKY (0.5% CMC-Na 5 mL/kg) 正常对照组 7 只。各组每日灌胃 1 次, 连续 10 周, 于给药前和末次给药后尾袖法测定血压; 比色法测定心肌组织 SOD、MDA、T-AOC 及 H₂O₂ 的含量; 硝酸还原酶法测定心肌组织 NO 含量; 免疫组化法表达心肌诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 阳性细胞; Western Blot 表达心肌组织 iNOS、p22^{phox} 及 p47^{phox} 蛋白。结果: 玉夏胶囊随着剂量的增加, 能显著降低 SHR 的血压 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 减少 SHR 心肌组织 MDA、H₂O₂ 及 NO 的含量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 提高 SOD 和 T-AOC 的含量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 抑制心肌 iNOS 阳性细胞表达, 下调心肌 iNOS、p22^{phox} 和 p47^{phox} 蛋白 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 玉夏胶囊具有抗 SHR 心肌氧化应激的作用, 其机制可能与下调心肌 iNOS 及 p22^{phox}、p47^{phox} 所介导的氧化应激损伤有关。

【关键词】玉夏胶囊; 自发性高血压大鼠; 氧化应激; iNOS; p22^{phox}; p47^{phox}

【中图分类号】R 285.5 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2016.06.003

Protective effect of Yuxia capsule on myocardium injury in spontaneously hypertensive rats

SHEN Yuanyuan, LU Yining, HU Kunmei, HU Haoran, HAO Wei, YANG Jieren

National Grade Three Laboratory for Traditional Chinese Medicine, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To investigate the mechanisms of Yuxia capsule in protecting the myocardium injury in spontaneously hypertensive rats (SHR) through observing the effect of this agent on the expression of iNOS, NADPH oxidase subunits p22^{phox} and p47^{phox}. **Methods:** Twenty-eight male SHRs aged 14-week, were randomized into SHR model group (0.5% CMC-Na, 5 mL/kg), high dosage group (Yuxia capsule, 0.6 g/kg), middle dosage group (0.3 g/kg) and low dosage group (0.15 g/kg) ($n = 7$ for each group). Another 7 Wistar-kyoto (WKY) rats were included as normal control group (0.5% CMC-Na, 5 mL/kg). Rats in each group intragastrically administrated with Yuxia capsule once a day for consecutive 10 weeks, measured for the blood pressure by tail cuff before and final administration. The changes of rat myocardium MDA, H₂O₂, SOD, T-AOC and NO levels in myocardium homogenate and expression of myocardium iNOS positive cells were determined by immunohistochemistry and the expression of iNOS, p22^{phox} and p47^{phox} protein was detected by Western blotting. **Results:** Increased dose of Yuxia capsule had significantly decreased the blood pressure ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and reduced the levels of MDA, H₂O₂ and NO, yet enhanced the levels of SOD and T-AOC in myocardium ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) as well as inhibited expression of iNOS, p22^{phox} and p47^{phox} protein and iNOS positive cells in the myocardium ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Yuxia capsule could decrease the expression of iNOS, p22^{phox} and p47^{phox} protein to reduce oxidative stress at myocardium in SHR, suggesting that this agent has protective effect on myocardium damage in SHRs.

【Key words】 Yuxia capsule; spontaneously hypertensive rats; oxidative stress; iNOS; p22^{phox}; p47^{phox}

高血压是心脑血管疾病主要的危险因素, 其中高血压性心脏病是高血压最常见并发症^[1]。近年来研究表明, 高血压心脏病进程中常伴有氧化应激 (oxidative stress), 后者在高血压的病程发展中起着重要作用^[2]。研究表明高血压病理状态下一氧化

氮合酶 (iNOS) 和 NADPH 氧化酶这两种酶的表达和活性都被不同程度的诱导增强, 导致机体氧化应激损伤^[3-5]。玉夏胶囊主要成分含夏枯草、玉米须、莱菔子及防己等。文献报道, 玉夏胶囊对不同证型的高血压病患者均有显著的降压效果^[6-8]。动物实验

收稿日期: 2016-05-30

作者简介: 沈媛媛 (1989-), 女, 2014 级硕士研究生, (电话) 18255363538, (电子信箱) 471007201@qq.com;

杨解人, 女, 教授, 硕士生导师, (电子信箱) jryang1955@sina.com, 通信作者。

发现玉夏胶囊对肾性高血压大鼠具有降压作用^[5]。但关于玉夏胶囊对自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR) 心肌损伤的保护作用未见报道。故本研究选用 SHR 为对象,观察玉夏胶囊对 SHR 心肌氧化应激损伤的保护作用,并通过研究 iNOS 及 NADPH 氧化酶亚单位 p22^{phox}、p47^{phox} 的蛋白表达来探讨其可能机制,为临床用药提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物 SPF 级 14 周龄雄性 SHR 28 只, Wistar-Kyoto (WKY) 大鼠 7 只,体质量 260~320 g,许可证号: SCXK(京) 2015-0001 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。大鼠单笼饲养,自然光照,自由进食(饲料购于南京市江宁区青龙山动物繁殖场) 饮水,室温 23~25℃ 相对湿度 60%~65%。

1.2 药物、试剂与仪器 玉夏胶囊(安徽省芜湖市中医医院制剂室提供, 0.3 g/粒),羧甲基纤维素钠(CMC-Na, 国药集团化学试剂有限公司);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)、过氧化氢(H₂O₂)、一氧化氮(NO)及 BCA 蛋白检测试剂盒(江苏碧云天生物技术研究);即用型 SABC 和 DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)、兔抗大鼠 iNOS 抗体(北京博奥森生物技术有限公司)、兔抗大鼠 p22^{phox} 和 p47^{phox} 抗体(美国 Sant Cruz 公司);小鼠抗大鼠 GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 和山羊抗小鼠 IgG(江苏碧云天生物技术研究);Lunimata™ Crescendo 发光液(美国 Millipore 公司)。ALC-NIBP 无创血压测定分析系统(上海奥尔科特生物科技有限公司)、DNM-9602 型酶标仪(北京普朗新技术有限公司)、Eppendorf 离心机(德国 Eppendorf 公司)、电泳系统、转膜系统(北京市六一仪器厂)、化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)、石蜡切片机(德国 Leica 公司)、BX-41 型奥林巴斯显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

1.3 分组及给药 玉夏胶囊成人量 1.2 g/日,按人体质量为 60 kg 计算,折算大鼠等效量是 0.15 g/日,按 2 倍递增依次为 0.3 g/kg、0.6 g/kg。将 SHR 28 只适应性喂养 1 周后随机分为 SHR 模型组(0.5% CMC-Na 5 mL/kg),玉夏胶囊高、中、低(0.6、0.3、0.15 g/kg) 剂量组,每组 7 只。另设 WKY 正常对照组(0.5% CMC-Na 5 mL/kg) 7 只。按上述设定剂量于每日下午 3 时给药,连续 10 周。

1.4 血压测定和标本采集 分别于给药前及末次给药后尾袖法测大鼠尾动脉舒张压(DBP/mmHg)。1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉,取心脏,分离左心室,取部分左心室制备 10% 组织匀浆,用于测定 SOD、MDA、T-AOC、H₂O₂ 和 NO 的含量;另取部分左心室 4% 多聚甲醛溶液固定 48 h,常规石蜡包埋,用于免疫组化测定。剩余左心室放置 -80℃ 冰箱保存,用于 Western blot。

1.5 生化指标测定 BCA 法测定心肌蛋白浓度;比色法、ABTS 法、二甲酚橙比色法分别检测心肌 SOD、MDA、T-AOC 和 H₂O₂ 含量;硝酸还原酶法测定心肌 NO 含量。具体步骤按试剂盒说明书进行。

1.6 免疫组化法表达心肌组织 iNOS 阳性细胞 取心肌石蜡切片(厚度 5 μm/片),常规脱蜡至水,抗原修复,封闭, iNOS 一抗(1:100) 4℃ 过夜,二抗(1:200), DAB 显色,苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,封片,镜下观察胞质内 iNOS 阳性细胞表达(阳性表达呈黄至棕黄色颗粒)。大鼠染色切片在相同条件下随机选取 6 个区域拍摄,采用 Image-pro plus 6.0 图像分析软件半定量分析,测定平均积分光密度值(AIOD), AIOD 越大表示 iNOS 表达愈高,反之则表达愈低。

1.7 Western blot 表达心肌组织 iNOS、NADPH 氧化酶亚基 p22^{phox} 和 p47^{phox} 蛋白 低温提取心肌蛋白。每孔上样 40 μg 蛋白, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离样品,转膜,封闭,分别加入 GAPDH(1:1000)、iNOS(1:400)、p22^{phox}(1:200) 和 p47^{phox}(1:200) 一抗 4℃ 过夜,加入相应二抗(1:2000),室温孵育 2 h,加发光液,采用 Bio-Rad ChemiDoc XRS+ 成像系统进行拍摄,用 Image J 1.43(National Institutes of Health) 软件测定集成光密度值。

1.8 统计学处理 实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学分析。多组间比较采用单因素方差分析;组间两两比较采用 *q* 检验, *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

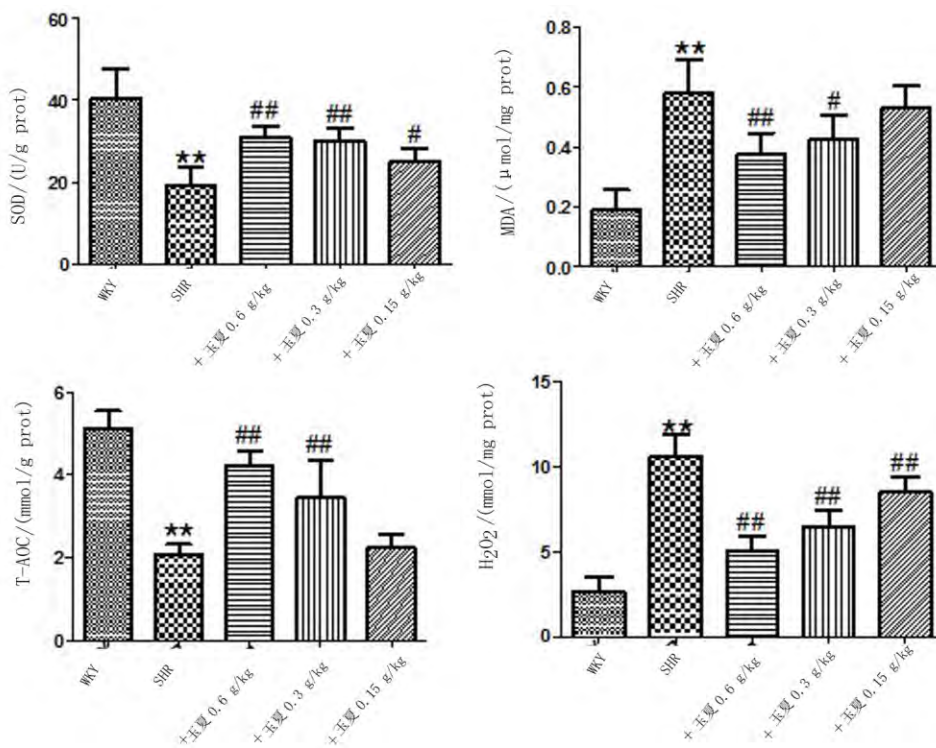
2 结果

2.1 玉夏胶囊对 SHR 尾动脉舒张压的影响 给药前各组大鼠舒张压明显高于 WKY 组(*P* < 0.01);给药 10 周后,与 WKY 组比, SHR 组舒张压显著升高,玉夏胶囊各给药组舒张压较 SHR 组明显降低(*P* < 0.01),且玉夏胶囊高剂量组降压效果最为明显,提示玉夏胶囊具有一定的降压作用(见表 1)。

表1 玉夏胶囊对 SHR 尾动脉舒张压的影响($\bar{x}\pm s$ $n=7$)

组别	剂量 (g/kg)	血压/mmHg	
		给药前	给药 10 周后
WKY	-	96±10.67	97±11.20
SHR	-	151±11.15**	175±13.05**
+玉夏	0.6	152±12.56**	126±14.49##
+玉夏	0.3	156±9.20**	134±15.98##
+玉夏	0.15	153±15.17**	148±14.67##
F 值		31.99	29.57
P 值		0.00	0.00

* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ vs. WKY; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs. SHR。



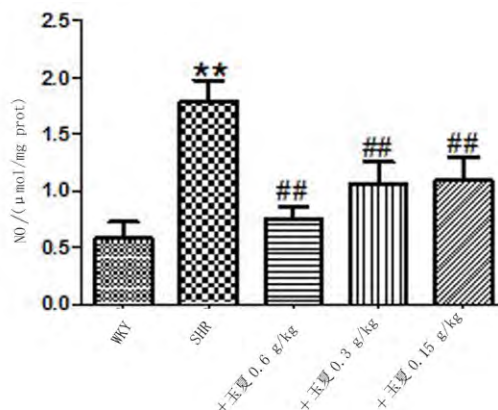
* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ vs. WKY; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs. SHR; $F_{SOD} = 20.99$ $F_{MDA} = 24.11$ $F_{T-AOC} = 45.84$ $F_{H_2O_2} = 68.40$ 。

图1 玉夏胶囊对 SHR 心肌组织 SOD、MDA、T-AOC 和 H_2O_2 含量的影响($\bar{x}\pm s$ $n=7$)

2.3 玉夏胶囊对 SHR 心肌组织 NO 含量的影响
与 WKY 组比 ,SHR 组心肌组织 NO 含量明显上升 ($P < 0.01$) ;与 SHR 组比 ,玉夏胶囊各剂量组均有不同程度的下降 ($P < 0.01$) ,提示玉夏胶囊可以降低 SHR 心肌 NO 含量(见图 2)。

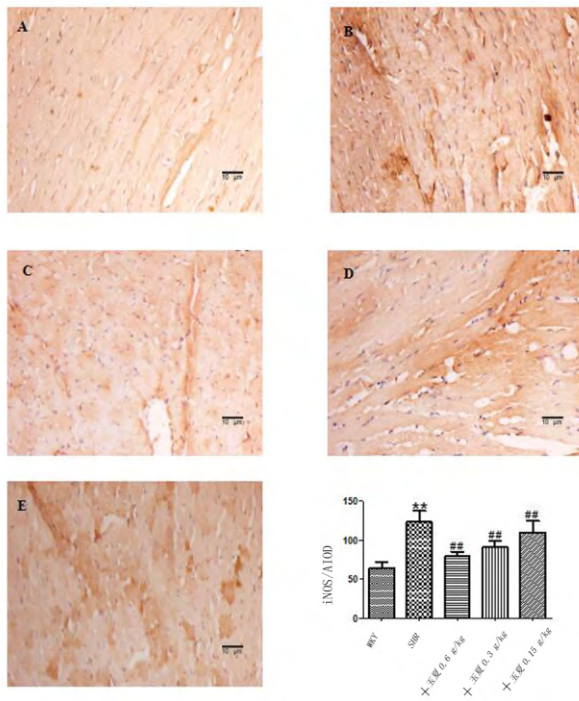
2.4 玉夏胶囊对 SHR 心肌 iNOS 阳性细胞表达的影响
免疫组化结果显示 ,SHR 组心肌 iNOS 阳性细胞表达显著高于 WKY 组 ($P < 0.01$) ;与 SHR 组比 ,玉夏胶囊各剂量组随着剂量增加心肌 iNOS 阳性细胞的表达显著降低 ($P < 0.01$) ,提示玉夏胶囊能降低 SHR 心肌 iNOS 阳性细胞的表达(见图 3)。

2.2 玉夏胶囊对 SHR 心肌组织 SOD、MDA、T-AOC 和 H_2O_2 含量的影响
与 WKY 组比 ,SHR 组心肌组织匀浆 MDA 和 H_2O_2 含量显著升高 ($P < 0.01$) ,SOD 和 T-AOC 含量明显降低 ($P < 0.01$) ;与 SHR 组比 ,玉夏胶囊各剂量组 MDA 和 H_2O_2 含量明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ,SOD 和 T-AOC 含量显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ,提示玉夏胶囊具有一定的抗氧化作用(见图 1)。



* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ vs. WKY; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs. SHR $F = 48.23$ 。

图2 玉夏胶囊对 SHR 心肌组织 NO 含量的影响($\bar{x}\pm s$ $n=7$)

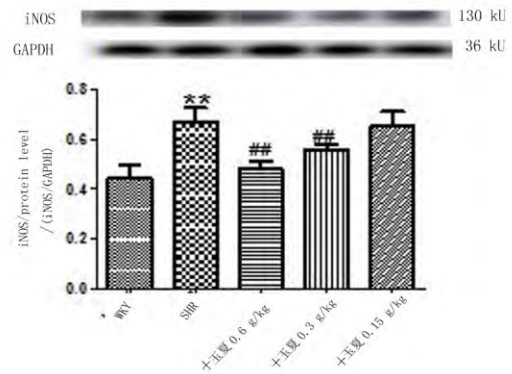


A: WKY 组; B: SHR 组; C: 玉夏 0.6 g/kg 组; D: 玉夏 0.3 g/kg 组; E: 玉夏 0.15 g/kg 组; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. WKY; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. SHR。

图 3 玉夏胶囊对 SHR 心肌 iNOS 阳性细胞表达的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n=6$ 400 \times)

2.5 玉夏胶囊对 SHR 心肌 iNOS 蛋白表达的影响
Western blot 检测发现,SHR 组心肌 iNOS 蛋白的

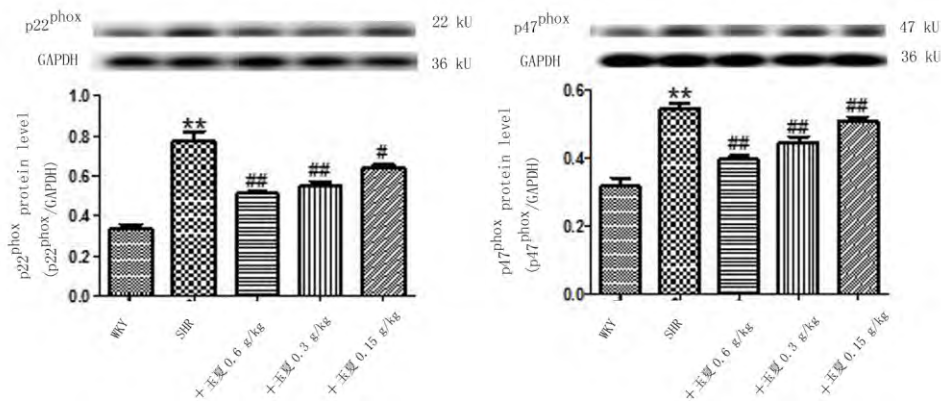
表达水平显著高于 WKY 组 ($P < 0.01$); 与 SHR 组比,玉夏胶囊高、中剂量组能显著下调 SHR 心肌 iNOS 蛋白的表达 ($P < 0.01$),提示玉夏胶囊可下调 SHR 心肌 iNOS 蛋白表达(见图 4)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. WKY; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. SHR。

图 4 玉夏胶囊对 SHR 心肌 iNOS 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n=4$)

2.6 玉夏胶囊对 SHR 心肌 p22^{phox} 和 p47^{phox} 蛋白表达的影响 与 WKY 组比,SHR 组心肌 p22^{phox} 和 p47^{phox} 蛋白表达明显上调 ($P < 0.01$); 与 SHR 组比,玉夏胶囊各剂量组 p22^{phox} 和 p47^{phox} 蛋白表达均有不同程度的下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示玉夏胶囊具有下调 SHR 心肌 p22^{phox} 和 p47^{phox} 蛋白的作用(见图 5)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. WKY; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. SHR。

图 5 玉夏胶囊对 SHR 心肌 p22^{phox} 和 p47^{phox} 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n=4$)

3 讨论

SHR 是一种与人类原发性高血压相似的遗传高血压模型。研究表明,长期高血压可导致左心室肥厚和心肌纤维化等心肌损伤^[9]。文献报道,心肌损伤的各个环节都有氧化应激的参与^[2]。氧化应激是活性氧簇(reactive oxygen species,ROS)或自由基(O₂⁻、H₂O₂和 OH⁻) 在细胞内或细胞外产生对细胞有毒性的一种应激状态^[10]。MDA 含量可间接反

映机体脂质过氧化程度,H₂O₂ 是活性氧代谢的副产物,SOD 是生物体内一种重要的抗氧化酶,T-AOC 是机体包括酶促和非酶促体系的抗氧化能力衡量指标。本研究发 26 周 SHR 心肌氧自由基(MDA、H₂O₂) 明显升高,而抗氧化能力(SOD、T-AOC) 明显减弱,提示 SHR 心肌存在明显氧化应激状态。当给予玉夏胶囊治疗 10 周后,SHR 心肌组织 SOD 活性和 T-AOC 能力明显提高,MDA 和 H₂O₂ 含量显著降

低,说明玉夏胶囊对 SHR 心肌的氧化应激损伤具有一定保护作用,其保护作用可能与玉夏胶囊组方中莱菔子和防己增加大鼠心肌组织 SOD 活性,降低 MDA 含量,清除氧自由基,提高总抗氧化能力,改善氧化应激有关^[11-12]。但玉夏胶囊是通过何种机制来改善 SHR 心肌氧化应激损伤?为此本研究从 iNOS-NO 通路及 NADPH 氧化酶亚基 p22^{phox}和 p47^{phox}途径,探讨玉夏胶囊抗 SHR 心肌氧化应激损伤的可能机制。

心肌细胞内主要存在 iNOS。生理状态下心肌细胞内 iNOS 含量极少,病理状态下在细胞因子(如 TGF- β 1、TNF- α)等刺激后,可诱导 ROS 聚集,心肌细胞内 iNOS 表达增加,产生大量 NO^[3]。NO 是参与体内信号传导的气体信号分子,与超氧离子(O₂⁻)反应生成亚硝基,造成氧化应激损伤^[13-14]。故本实验采用硝酸还原酶法测定心肌 NO 含量,免疫组化法和 Western Blot 法分别检测心肌组织 iNOS 阳性细胞和蛋白。结果发现 SHR 心肌组织中 NO 含量增高,iNOS 阳性细胞和蛋白表达明显上调,说明 SHR 心肌 iNOS 蛋白大量表达,过量 NO 产生,从而引起心肌氧化应激损伤。通过玉夏胶囊治疗 10 周后,SHR 心肌组织内 NO 的含量明显下降,iNOS 阳性细胞和蛋白表达明显下调,提示玉夏胶囊减少 NO 产生,下调 iNOS 蛋白表达,改善 SHR 心肌氧化应激损伤。

NADPH 氧化酶存在于吞噬细胞以及非吞噬细胞,主要有位于胞膜的 p22^{phox}和 gp91^{phox}以及胞质中的 p47^{phox}、p67^{phox}等亚单位,是心血管组织中 ROS 的主要来源^[14]。NADPH 氧化酶过度激活,促使 ROS 大量生成,导致氧化应激损伤,参与高血压及其并发症的形成^[4-5]。本研究发现 SHR 心肌 p22^{phox}、p47^{phox}蛋白表达均升高,给予玉夏胶囊治疗后,SHR 心肌 p22^{phox}、p47^{phox}蛋白表达显著下降,说明玉夏胶囊通过下调心肌 NADPH 氧化酶亚基 p22^{phox}和 p47^{phox}通路,改善心肌氧化应激损伤。

综上所述,玉夏胶囊对 SHR 心肌氧化应激损伤具有保护作用,其机制可能通过降低心肌自由基含量,提高抗氧化能力,抑制心肌 iNOS-NO 以及 NADPH 氧化酶亚基 p22^{phox}和 p47^{phox}所介导的通路密切

相关,确切机制有待于进一步研究。

【参考文献】

- [1] LOW KJ, MITCHELL A, PELTER PHARMD FCSHP *et al.* Identification and Evaluation of Risk Factors in Patients With Continuously Uncontrolled Hypertension [J]. *Journal of Clinical Hypertension* 2015, 17(4): 281-289.
- [2] RIZZI E, CERON CS, GUIMARAES DA *et al.* Temporal changes in cardiac matrix metalloproteinase activity, oxidative stress, and TGF- β in renovascular hypertension-induced cardiac hypertrophy [J]. *Experimental & Molecular Pathology* 2013, 94(1): 1-9.
- [3] COOK S. Coronary artery disease, nitric oxide and oxidative stress: the "Yin-Yang" effect—a Chinese concept for a worldwide pandemic [J]. *Swiss Medical Weekly* 2006, 136(7-8): 103-113.
- [4] WANG P, WU X, BAO Y *et al.* Tanshinone IIA prevents cardiac remodeling through attenuating NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species production in hypertensive rats [J]. *Pharmazie*, 2011, 66(7): 517-524.
- [5] SAHOO S, MEIJLES DN, PAGANO PJ. NADPH oxidases: key modulators in aging and age-related cardiovascular diseases [J]? *Clinical Science* 2016, 130(5): 317-335.
- [6] 郑梅生, 朱琳. 玉夏胶囊治疗高血压病 526 例临床观察 [J]. *中医杂志* 2011(18): 1562-1565.
- [7] 郑梅生, 王幸, 朱琳, 等. 玉夏稳压胶囊治疗痰湿证老年高血压的疗效观察 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2009, 7(9): 1025-1027.
- [8] 郑梅生, 朱琳, 郑云菊. 中药玉夏胶囊对肾性高血压大鼠的降压作用 [J]. *中华中医药杂志* 2011(4): 847-850.
- [9] PETRIZ BA, FRANCO OL. Effects of hypertension and exercise on cardiac proteome remodelling [J]. *Biomed Research International*, 2014, 2014(1): 297-308.
- [10] GRIMM S, HÖHN A, GRUNE T. Oxidative protein damage and the proteasome [J]. *Amino Acids* 2012, 42(1): 23-38.
- [11] 朱祖成. 粉防己碱对肾性高血压大鼠血压及抗氧化作用影响研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2013(4): 44-46.
- [12] 张国侠, 盖国忠. 莱菔子水溶性生物碱对 ApoE 基因敲除小鼠内皮细胞的抗氧化保护作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(19): 2811-2812.
- [13] LIU FQ, ZHANG XL, GONG L *et al.* Glucagon-like peptide 1 protects microvascular endothelial cells by inactivating the PARP-1/iNOS/NO pathway. [J]. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 2011, 339(1-2): 25-33.
- [14] VIRÁG L, ÉVA SZABÓ, GERGELY P *et al.* Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention [J]. *Toxicology Letters* 2003, 140-141(7): 113-124.