

## 益气化痰方调节高血压大鼠脑血管适应性功能及炎症小体的研究

袁冬梅<sup>1</sup>, 张涨<sup>1</sup>, 谭炜<sup>2</sup>, 莫霄云<sup>2</sup>, 林琳<sup>2</sup>, 张清伟<sup>2</sup>, 何贵新<sup>2</sup>

(1. 广西中医药大学, 广西南宁 530001; 2. 广西中医药大学第一附属医院心血管二区, 广西南宁 530023)

**摘要:**【目的】观察益气化痰方(QPR)对高血压大鼠脑血管适应性调节功能的影响。【方法】在实验前1周, QPR组和血管紧张素受体拮抗剂(ARB)组SD大鼠分别预先灌胃益气化痰方和替米沙坦, 其余大鼠灌胃相同容量的磷酸盐缓冲溶液(PBS), 设为PBS组。大鼠麻醉后, 经颞窗持续灌流林格氏液, 当平均动脉压(MAP)稳定时, 测量基线大脑血流(CBF)值。分别经静脉泵入内皮素1(ET-1)或者血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)制作2种高血压模型, 以单独泵入林格氏液作为空白对照组。分别通过触须刺激或者局部灌流乙酰胆碱诱发功能性充血, 再次测量CBF值。CBF的变化以相对于基线水平的升高百分比表示。采用蛋白免疫分析(Western Blot)法检测各组大鼠主动脉组织中的Nod样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)和剪切型白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )蛋白的表达。【结果】泵入AngⅡ后, 大鼠CBF上升幅度较泵入林格氏液组明显降低( $P < 0.05$ )。AngⅡ+QPR组、AngⅡ+ARB组CBF上升幅度均高于单纯泵入AngⅡ组( $P < 0.05$ )。泵入ET-1后, 大鼠CBF上升幅度较泵入林格氏液组降低( $P < 0.05$ ), QPR组、ET-1+BQ123组CBF上升幅度均高于单纯泵入ET-1组( $P < 0.05$ )。以乙酰胆碱灌流检测脑血管内皮依赖性的充血反应, 也获得类似的治疗结果。Western Blot结果显示, 与PBS组比较, QPR组、ARB组大鼠主动脉组织的NLRP3和剪切型IL-1 $\beta$ 蛋白的表达水平均明显下调( $P < 0.05$ )。【结论】QPR具有拮抗大脑皮层功能性充血反应和脑血管内皮依赖性充血反应的作用, 可改善高血压大鼠的脑循环适应性调节功能, 其作用机制可能与阻断炎症小体激活有关。

**关键词:** 益气化痰方; 高血压; 脑循环; 脑血管; 炎症小体; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)02-0352-07

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.02.024

## Study on Qi-Replenishing and Phlegm-Resolving Recipe Regulating Adaptive Function of Cerebral Vessels and Inflammasomes in Hypertension Rats

YUAN Dong-Mei<sup>1</sup>, ZHANG Zhang<sup>1</sup>, TAN Wei<sup>2</sup>, MO Xiao-Yun<sup>2</sup>,  
LIN Lin<sup>2</sup>, ZHANG Qing-Wei<sup>2</sup>, HE Gui-Xin<sup>2</sup>

(1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001 Guangxi, China; 2. Section 2. of Cardiovasology, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023 Guangxi, China)

**Abstract: Objective** To observe the effect of Qi-Replenishing and Phlegm-Resolving Recipe (QPR) on cerebral vessel-regulated adaptive function in rats with hypertension. **Methods** One week before surgery, the rats in QPR group and angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ) receptor blocker (ARB) group were beforehand given intragastric administration of QPR and Telmisartan, respectively, and the other rats were given intragastric administration of phosphate buffer solution (PBS), served as PBS group. The value of cerebral blood flow (CBF) in anesthetized rats persistently perfused with Ringer's solution through tempus window was monitored just at stabilization of mean arterial pressure (MAP). The 2 kinds of hypertension models were established by intravenous infusion pump with endothelin (ET-1) or Ang Ⅱ, and the vehicle control group was set up by intravenous infusion of Ringer's solution alone. And then CBF value was measured again after functional hyperemia induced by vibrissa stimulation or local perfusion with acetylcholine. CBF change was expressed as percentage of CBF increase relative to baseline level. The expression levels of Nod-like receptor protein 3 (NLRP3) and cleaved interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) in aorta tissue was determined by Western blotting assay. **Results** The increase amplitude of CBF in rats infused with Ang Ⅱ

收稿日期: 2020-01-16

作者简介: 袁冬梅(1995-), 女, 硕士研究生; E-mail: 1670370609@qq.com

通讯作者: 谭炜(1982-), 男, 副主任医师, 医学博士; E-mail: tanwei82@126.com

基金项目: 广西自然科学基金青年基金资助项目(编号: 2015GXNSFBA139121)

was lower than that in the vehicle control group ( $P < 0.05$ ). The increase amplitude of CBF in the Ang II + QPR group and Ang II + ARB group was higher than that in the Ang II alone infusion group ( $P < 0.05$ ). The increase amplitude of CBF in rats infused with ET-1 was lower than that in the vehicle control group ( $P < 0.05$ ). The increase amplitude of CBF in the ET-1 + QPR group and ET-1 + BQ123 group was higher than that in the ET-1 alone infusion group ( $P < 0.05$ ). However, the treatment results for functional hyperemia induced by local perfusion of acetylcholine were also obtained, being similar to the above results. Western Blotting results showed that the expression levels of NLRP3 and cleaved IL-1 $\beta$  in aorta tissue in QPR group and ARB group were reduced as compared with those in PBS group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** QPR has effects on resisting cerebrocortical functional hyperemia response and cerebrovascula endothelial-dependent hyperemia response, and ameliorating adaptive regulation of cerebral circulation in hypertension rats, the mechanism possible is related with blocking activation of inflammasome.

**Keywords:** Qi-Replenishing and Phlegm-Resolving Recipe; hypertension; cerebral circulation; cerebral vessels; inflammasome; rats

大脑是人体静息状态下耗氧量最大的器官,生理状态下“功能性充血”是脑循环关键适应性调节功能的重要方面。当某一脑区的需氧量上升,内皮细胞会释放一系列血管活性因子,协同作用引起血管舒张<sup>[1]</sup>,使局部大脑血流(CBF)增加,是功能性充血的基础。高血压状态时,“功能性充血”会发生改变<sup>[2]</sup>。Kazama等<sup>[3]</sup>在正常血压小鼠中发现,血管紧张素II(Ang II)能明显抑制刺激诱导的感觉皮层CBF上升幅度,说明短时间的血压升高就能改变“功能性充血”。Faraco等<sup>[4]</sup>的研究表明,内皮素1(ET-1)同样具有改变静息CBF和“功能性充血”的效应。一氧化氮合酶(eNOS)表达减少以及一氧化氮(NO)含量降低也是高血压导致脑循环调节功能障碍的机制之一<sup>[5]</sup>。

我们的前期研究<sup>[6-7]</sup>发现,益气化痰方能显著改善自发高血压大鼠动脉内皮依赖性舒张功能,具有调节自发性高血压大鼠脑血管适应性功能的作用,而动脉局部的炎症反应是内皮功能障碍的重要基础。因此,我们推测益气化痰法可能具有改善脑循环关键调节功能的作用。本研究拟从“功能性充血”入手,评价益气化痰方是否能改善ET-1、Ang II造成的高血压大鼠模型的脑循环调节功能,并从炎症小体的激活方面探讨其可能的作用机制,现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方

1.1 动物 24只SPF级6~8周龄雄性SD大鼠,体质量200~250g,购自广东省实验动物中心,动

物质量合格证号:SYXK桂2019-0001。本实验遵循广西中医药大学实验中心实验动物使用管理规定,并通过广西中医药大学伦理委员会批准。于广西中医药大学SPF级实验室完成实验,室内温度20~25℃,湿度60%~70%,喂食SPF级大鼠饲料,喂饮无菌水。

1.2 药物、试剂与仪器 益气化痰方由黄芪30g、茯苓15g、法半夏10g、天麻10g、川芎15g、炙甘草6g组成。上述药材均购自广西中医药大学第一附属医院中药房,按处方称取药材,加8倍水,煎煮2次,每次1h,合并提取液,滤过备用。替米沙坦(德国勃林格殷格翰公司)。BQ123、ET-1、Ang II、乙酰胆碱(美国Sigma Aldrich公司);蛋白酶抑制剂(瑞士Roche公司);Nod样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)抗体、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 抗体(美国Cell Signaling Technology公司);GAPDH抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(美国Bioword公司)。小动物呼吸机(美国Kent Scientific公司);激光多普勒血流仪(瑞士Perimed AB公司);Tanon-4100全自动数码凝胶图像分析系统(上海天能公司)。

1.3 给药方法 在手术开始前1周,益气化痰方组(简称“QPR组”)和血管紧张素受体拮抗剂(ARB)组的动物分别对应预先灌胃益气化痰方(给药量相当于饮片 $3.87\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )和替米沙坦(给药浓度为 $0.3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )<sup>[8]</sup>,确保实验时能达到稳定的血药浓度。其余动物灌胃相同容量的磷酸盐缓冲液(PBS),设为PBS组。

**1.4 一般手术流程** 所有的操作都经过广西中医药大学实验动物伦理委员会讨论并通过。实验动物用体积分数5%异氟烷诱导麻醉,气管插管后,接小动物呼吸机人工通气,并将异氟烷减少至1.5%~1.7%,维持麻醉至手术结束。加热板将肛温维持在37.5℃左右。分别穿刺股动脉、股静脉并留置套管,用以取血样、监测动脉血压、输注药物。所有大鼠静脉推注0.15 mL肝素(500 IU/mL)以防止鞘管内血液凝固堵塞。

**1.5 静息CBF和功能性充血反应** 大鼠经麻醉后固定,暴露颞骨并钻一个直径为1.5 mm的孔,小心去除硬脑膜,暴露出大脑皮层表面。将激光多普勒血流仪探头对准大脑皮层表面并固定,经颞窗持续灌流林格氏液(0.2 mL/h),当平均动脉压(MAP)稳定时,测量基线CBF值。然后分别经静脉泵入ET-1(50 pmol·kg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>)、Ang II(0.25 μg·kg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>)制作2种高血压模型,ET-1、Ang II均溶解于林格氏液中;单独泵入林格氏液(0.2 mL/h)的大鼠作为空白对照组。30 min后,当MAP达到稳态时,通过触须刺激(3~5 Hz, 60 s)诱发功能性充血,再次测量CBF值。用于观察BQ123拮抗作用的大鼠,在静脉泵入ET-1的同时,其颞窗灌流液应更换为含有BQ123(1 μmol/L)的林格氏液。

为了检测脑血管内皮依赖性的充血反应,将乙酰胆碱(10 μmol/L)经颞窗局部灌流至大脑皮层表面,记录CBF的变化。乙酰胆碱可通过激活eNOS释放NO作用于血管平滑肌使血管扩张,被滴注到颞窗后,CBF上升,3~5 min达到稳态。通过对比药物刺激前后CBF的变化幅度,分别检测脑血管内皮依赖性的充血反应。CBF的变化以相对于基线水平的升高百分比表示,根据如下公式计算: CBF升高百分比(%) = (CBF<sub>最大值</sub> - CBF<sub>基线</sub>) / CBF<sub>基线</sub> × 100%。

**1.6 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测主动脉炎症小体的表达** 末次给药后禁食24 h后处死大鼠,迅速开胸,分离主动脉、剪下后放置在滤纸上吸干,放入EP管中,于-80℃保存,用于后续的Western Blot检测。将主动脉组织在PBS中清洗,继而在含有1%蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液中研磨(全程置于冰上),以12 000 r/min 4℃离心20 min后,将上清液转移至新的EP管中,二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白质浓度。加入上样缓冲液,将等量的蛋白质溶液上样到预制的12%十二烷基

硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶上,垂直电泳,再湿法电转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。以含50 g/L脱脂牛奶的TBST(Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20)溶液室温封闭2 h。分别在含有下列一抗的溶液中4℃孵育过夜: NLRP3抗体(1:500稀释)、IL-1β抗体(1:500稀释),GAPDH抗体(1:10 000稀释)做为内参。分别用含有下列二抗的溶液室温下孵育1 h: 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(1:2 000稀释)或辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(1:5 000稀释)。最后将配制好的DAB工作液滴加到印记膜上,孵育1~5 min显色,用全自动数码凝胶图像分析系统成像。用ImageJ软件进行条带灰度分析,所有的目标蛋白定量均用GAPDH进行均一化。数据结果以PBS组作为基准,其余2组的目的蛋白表达量与其进行对比来表示。

**1.7 统计方法** 采用SPSS 13.0统计软件进行数据分析。所有数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,如果符合正态分布,2组间比较采用*t*检验,否则即采用Mann-Whitney *U*检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验。以*P* < 0.05为差异有统计学意义。

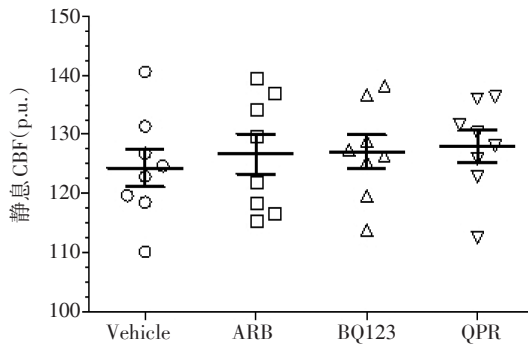
## 2 结果

**2.1 预先给药对大鼠静息CBF的影响** 为了观察预先给予益气化痰方、替米沙坦以及BQ123对大鼠静息CBF的影响,在固定好激光多普勒探头后,经颞窗持续灌流林格氏液(0.2 mL/h),BQ123组的大鼠则灌流含BQ123的林格氏液(1 μmol/L),当MAP稳定时,测量基线CBF值。

图1结果显示:预先给予益气化痰方灌胃、替米沙坦灌胃以及灌注BQ123的大鼠静息CBF分别为(128.0 ± 7.7)p.u.、(126.7 ± 9.7)p.u.、(127.0 ± 8.1)p.u.,与灌胃PBS的大鼠静息CBF(124.4 ± 9.1) p.u.比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。说明预先给药对于大鼠的静息CBF无明显影响。

**2.2 益气化痰方减轻Ang II对大鼠大脑皮层功能性充血的影响** 采用重复挠拨大鼠颞窗对侧的触须测量大脑皮层功能性充血。图2结果显示:泵入Ang II的大鼠大脑皮层CBF上升幅度较泵入林格氏液的大鼠明显降低(*P* < 0.05)。Ang II + QPR组、Ang II + ARB组的CBF上升幅度高于单纯泵入

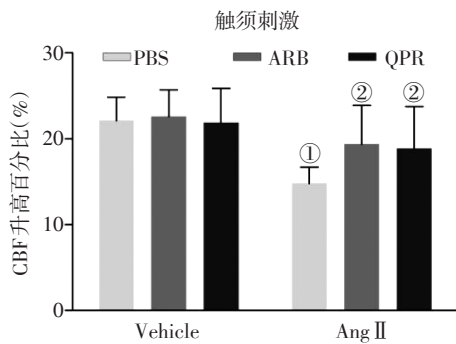




注: 图中符号代表林格氏液 (Vehicle) 组、血管紧张素受体拮抗剂 (ARB) 组、BQ123 组、益气化痰方 (QPR) 组中的 1 只大鼠

图1 预先给药对大鼠静息基线大脑血流 (CBF) 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , 每组 8 只)

Figure 1 Effects of various pretreatment on rat baseline CBF ( $\bar{x} \pm s$ , 8 rats in each group)



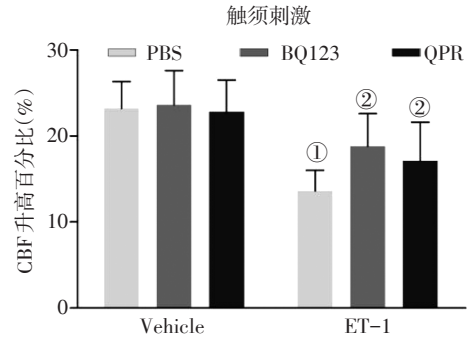
①  $P < 0.05$ , 与泵入林格氏液 (Vehicle) 组比较; ②  $P < 0.05$ , 与单纯泵入 Ang II 组比较

图2 益气化痰方 (QPR) 减轻 Ang II 对大鼠大脑皮层功能性充血的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , 每组 8 只)

Figure 2 QPR reduces the effects of Ang II on functional hyperemia in rat cerebral cortex ( $\bar{x} \pm s$ , 8 rats in each group)

Ang II 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。说明益气化痰方和替米沙坦均能明显减轻 Ang II 对大鼠脑循环充血反应的影响。

**2.3 益气化痰方减轻 ET-1 对大鼠大脑皮层功能性充血的影响** 仍采用重复挠拨大鼠颞窗对侧的触须测量大脑皮层功能性充血。图 3 结果显示: 泵入 ET-1 的大鼠大脑皮层 CBF 上升幅度较泵入林格氏液的大鼠明显降低 ( $P < 0.05$ )。ET-1 + QPR 组、ET-1 + BQ123 组的 CBF 上升幅度高于单纯泵入 ET-1 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。说明益气化痰方和 BQ123 均能明显减轻 ET-1 对大鼠大脑皮层充血反应的影响。



①  $P < 0.05$ , 与泵入林格氏液 (Vehicle) 组比较; ②  $P < 0.05$ , 与单纯泵入 ET-1 组比较

图3 益气化痰方 (QPR) 减轻 ET-1 对大鼠大脑皮层功能性充血的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , 每组 8 只)

Figure 3 QPR reduces the effects of ET-1 on functional hyperemia in rat cerebral cortex ( $\bar{x} \pm s$ , 8 rats in each group)

**2.4 各组大鼠脑血管内皮依赖性充血反应情况的比较** 将乙酰胆碱 ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) 经颞窗局部灌流至大脑皮层表面, 记录 CBF 的变化, 检测脑血管内皮依赖性的充血反应。预先给予益气化痰方、替米沙坦和 BQ123 均不影响 PBS 组的 CBF 上升幅度。

图 4 结果显示: 泵入 Ang II 的大鼠大脑皮层 CBF 上升幅度较泵入林格氏液的大鼠明显降低 ( $P < 0.05$ )。Ang II + QPR 组、Ang II + ARB 组的 CBF 上升幅度高于单纯泵入 Ang II 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。泵入 ET-1 的大鼠的 CBF 上升幅度较泵入林格氏液的大鼠明显降低 ( $P < 0.05$ )。ET-1 + QPR 组、ET-1 + BQ123 组的 CBF 上升幅度高于单纯泵入 ET-1 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

说明益气化痰方均能明显减轻 Ang II 和 ET-1 对大鼠脑血管内皮依赖性充血反应的影响。

**2.5 各组大鼠主动脉 NLRP3 和 IL-1 $\beta$  的表达水平比较** NLRP3 是炎症小体的重要组成部分, 炎症小体通过激活 Caspase-1 进而切割 IL-1 $\beta$  前体, 生成剪切型 IL-1 $\beta$ , 即为成熟的促炎因子 IL-1 $\beta$ 。通过检测各组大鼠主动脉组织中的 NLRP3 和剪切型 IL-1 $\beta$  蛋白的表达, 图 5 结果显示: 与 PBS 组比较, 灌服替米沙坦和益气化痰方大鼠主动脉的 NLRP3 和剪切型 IL-1 $\beta$  蛋白的表达水平均明显下调, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。说明预先灌服益气化痰方和替米沙坦均能抑制大鼠主动脉组织中 NLRP3 和剪切型 IL-1 $\beta$  的表达。

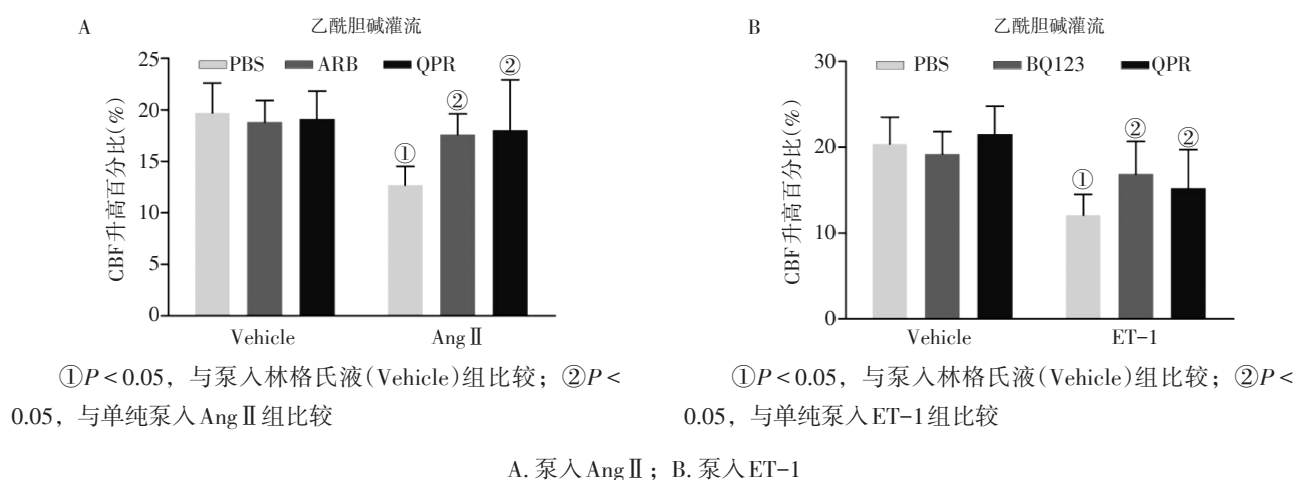


图4 各组大鼠脑血管内皮依赖性充血反应情况比较( $\bar{x} \pm s$ , 每组8只)

Figure 4 Comparison of endothelial dependent hyperemia response in cerebral vessels of various groups

( $\bar{x} \pm s$ , 8 rats in each group)

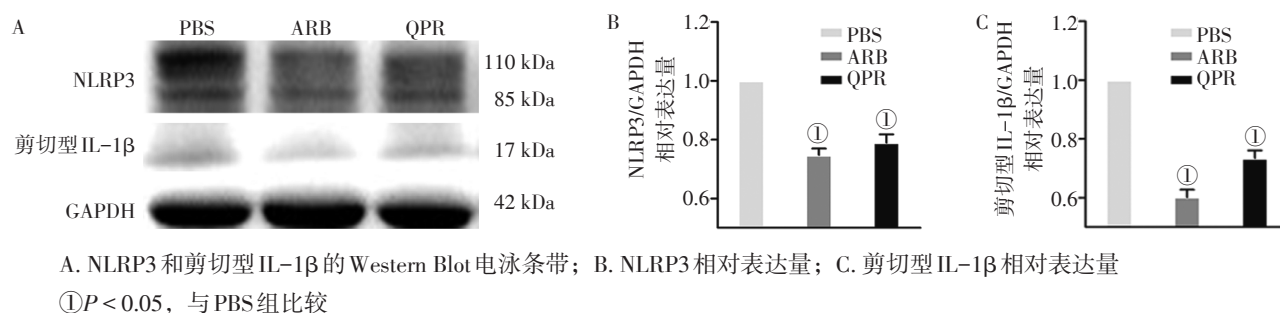


图5 各组大鼠主动脉 NLRP3 和 IL-1β 的表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ , 每组8只)

Figure 5 Comparison of the expression levels of NLRP3 and IL-1β in aorta tissue of various groups

( $\bar{x} \pm s$ , 8 rats in each group)

### 3 讨论

本研究主要观察了益气化痰方对高血压大鼠模型的脑血管适应性调节功能的影响。分别泵入 Ang II 和 ET-1 造成 2 种高血压模型后, 通过重复挠拨大鼠颞窗对侧的触须, 以及经颞窗局部灌注乙酰胆碱溶液, 检测大脑皮层的充血反应。结果显示, 泵入 Ang II 或 ET-1 后, 大鼠大脑皮层的 CBF 上升幅度明显减小, 预先 1 周给予益气化痰方能显著减轻 Ang II 和 ET-1 对大鼠大脑皮层充血反应的影响。

功能性充血反应是脑循环关键适应性功能的重要方面。脑组织的血液供应并不是均等的, 不同脑区的能量需求不同, 血液供应也有差别。当某一脑区的神经元功能活跃时, 需氧量上升, 此时局部 CBF 就会增加, 这就是“功能性充血”。神经元活动增加时, 脑动脉内皮细胞通过释放血管舒张因子(如 NO)和收缩因子(如内皮素)对血管张

力产生影响<sup>[9-10]</sup>。内皮细胞产生的血管活性物质参与调节静息状态的血管张力, 也参与协调脑实质小动脉和脑膜下动脉之间的血管舒缩反应, 使局部 CBF 增加。

高血压时, 功能性充血也会发生改变。在长期高血压的患者中, 通过刺激某一脑区的活动而诱发的 CBF 增加, 其上升幅度明显低于正常血压患者<sup>[11-12]</sup>。经静脉全身给予 Ang II 造成血压升高, 此时, 刺激胡须诱导的感觉皮层 CBF 上升幅度受到明显抑制<sup>[3]</sup>, 说明 Ang II 导致“功能性充血”的改变发生在血管重构之前。ET-1 也同样具有改变静息 CBF 和“功能性充血”的效应<sup>[4]</sup>。

预先灌胃益气化痰方能显著改善 Ang II 和 ET-1 对大鼠大脑皮层功能性充血反应的影响, 其升高幅度与替米沙坦和 BQ123 类似。替米沙坦和 BQ123 分别是 Ang II 受体和 ET-1 受体的特异性拮抗剂, 既往的研究发现, 替米沙坦<sup>[8]</sup>和 BQ123<sup>[4]</sup>能拮抗 Ang II

和ET-1对功能性充血反应的影响,说明益气化痰方也具有拮抗Ang II或ET-1对脑血管调节功能影响的作用。

炎症小体(inflammasome)是由胞浆内模式识别受体(PRRs)参与组装的多蛋白复合物。炎症小体能够识别病原相关分子模式(PAMPs)或者宿主来源的危险信号分子(DAMPs),招募和激活促炎症蛋白酶Caspase-1。活化Caspase-1切割IL-1 $\beta$ 和IL-18的前体,产生成熟的炎症因子。

直到最近,研究者才发现NLRP3炎症小体在高血压中的重要作用。在“两肾一夹”高血压模型中,敲除NLRP3或ASC能阻止血压升高、降低肾素水平<sup>[13]</sup>。在ATP诱导的高血压模型中,Caspase-1抑制剂WEHD也可降低血压、减少水钠潴留,降低炎症因子IL-1 $\beta$ 水平<sup>[14]</sup>。超氧离子清除实验表明,炎症小体的激活与氧化应激反应有关<sup>[15]</sup>,激活的炎症小体能够通过IL-1 $\beta$ 触发固有免疫反应导致细胞凋亡,最终引起内皮功能不全<sup>[16]</sup>。这些结果说明,炎症小体激活可能是高血压的发展过程中动脉内皮功能损害的重要机制,炎症小体可作为高血压治疗的新靶点。本研究通过分析大鼠主动脉组织中NLRP3和剪切型IL-1 $\beta$ 的表达情况,发现预先灌服益气化痰方能抑制NLRP3和剪切型IL-1 $\beta$ 的表达,提示益气化痰方可能是通过影响炎症小体的激活,进而减轻动脉壁的炎症反应,最终改善动脉的内皮依赖性舒张功能。

中医学认为眩晕的病位在“脑”。痰浊在眩晕的发病过程中起关键作用。临床上单纯以痰浊为病因的患者少见,气虚与痰浊常互为因果,形成恶性循环,老年患者气虚痰浊并见者多见。我们既往的研究<sup>[18]</sup>发现气虚痰浊型患者的脑血管调节功能较差,据此我们认为,气虚痰浊是高血压导致脑循环功能障碍的关键病机,病变的主要脏腑为脑。益气化痰方是以气虚痰浊证为证候基础配伍组方的,由黄芪、茯苓、法半夏、天麻、川芎组成。方中:重用黄芪补脾益气,脾胃健则清阳升,痰湿自去,为君药;茯苓、半夏健脾祛湿,取“小半夏加茯苓汤”之意,并可加强黄芪补气之力,为臣药;天麻祛风定眩,川芎引药上行,共为佐使药。诸药共用,不仅中焦痰湿得化,还可使药力上行,直达脑部,共奏健脾益气、化痰定眩之功。本研究通过实验证实,益气化痰方具有改善高血压大鼠模型的脑循环调节功能的作

用,可与其理论基础相互印证。

综上所述,本研究从大脑皮层的功能性充血入手,评价了益气化痰方对改善高血压大鼠模型脑循环调节功能的影响。研究结果提示,益气化痰方能部分改善高血压大鼠的脑循环适应性调节功能,其作用机制与阻断炎症小体激活有关。

#### 参考文献:

- [1] IADECOLA C, NEDERGAARD M. Glial regulation of the cerebral microvasculature[J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(11): 1369-1376.
- [2] ZAZULIA A R. Regulation of cerebral blood flow in untreated mild-to-moderate hypertension [J]. *Am J Hypertens*, 2009, 22(4): 344.
- [3] KAZAMA K, WANG G, FRYSK K, et al. Angiotensin II attenuates functional hyperemia in the mouse somatosensory cortex [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(5): H1890-H1899.
- [4] FARACO G, MORAGA A, MOORE J, et al. Circulating endothelin-1 alters critical mechanisms regulating cerebral microcirculation[J]. *Hypertension*, 2013, 62(4): 759-766.
- [5] HUANG Z, HUANG P L, MA J, et al. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996, 16: 981-987.
- [6] 谭炜. 复方芪麻胶囊在高血压动脉保护中的作用机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [7] 谭炜, 刘鹏业, 林琳, 等. 益气化痰方改善自发性高血压大鼠脑血管适应性调节功能研究[J]. *新中医*, 2019, 51(7): 10-13.
- [8] KUMAI Y, OOBOSHI H, AGO T, et al. Protective effects of angiotensin II type 1 receptor blocker on cerebral circulation independent of blood pressure[J]. *Exp Neurol*, 2008, 210: 441-448.
- [9] Iadecola C, Davisson R L. Hypertension and cerebrovascular dysfunction[J]. *Cell Metab*, 2008, 7: 476-484.
- [10] IMMINK R V, VAN DEN BORN B J, VAN MONTFRANS G A, et al. Impaired cerebral autoregulation in patients with malignant hypertension[J]. *Circulation*, 2004, 110, 2241-2245.
- [11] BEASON-HELD L L, MOGHEKAR A, ZONDERMAN A B, et al. Longitudinal changes in cerebral blood flow in the older hypertensive brain[J]. *Stroke*, 2007, 38, 1766-1773.
- [12] MAJON M, YOLANDA G, FRANK L V, et al. Hypertension and longitudinal changes in cerebral blood flow: the SMART-MR study[J]. *Ann Neurol*, 2012, 71(6): 825-833.
- [13] WANG Q, SO A, NUSSBERGER J, et al. Impact of NLRP3 inflammasome on the development of hypertension and renal and cardiac hypertrophy in 2K1C and DOCA/salt mice [J]. *Kidney Res Clin Pract*, 2012, 31(2): A83.
- [14] XIA M, XIONG J, BOINI K M, et al. Characteristics and hypertensive actions of renal medullary NALP3 inflammasomes in mice[J]. *FASEB J*, 2012, 26: 879-884.

- [15] VILLEGAS L R, KLUCK D, FIELD C, et al. Superoxide dismutase mimetic, MnTE-2-PyP, attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, pulmonary vascular remodeling, and activation of the NALP3 inflammasome[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18: 1753-1764.
- [16] CHEN Z, WEN L, MARTIN M, et al. Oxidative stress activates endothelial innate immunity via sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) transactivation of miRNA-92a[J]. *Circulation*, 2015, 131: 805-814.
- [17] 谭炜, 王清海, 靳利利, 等. 气虚痰浊和肝火亢盛型高血压患者脑血管内皮功能对比研究[J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(4): 961-964.

【责任编辑：侯丽颖】

## 甘草甜素调节骨关节炎大鼠软骨代谢标记物表达及外周血 Th17/Treg 细胞失衡

朱滨<sup>1</sup>, 张前燕<sup>2</sup>, 华贤章<sup>1</sup>, 骆渊城<sup>1</sup>, 敖传西<sup>1</sup>, 刘林<sup>3</sup>

(1. 湖北省恩施土家族苗族自治州民族医院骨伤科, 湖北恩施 445000; 2. 湖北省恩施土家族苗族自治州民族医院急诊科, 湖北恩施 445000; 3. 湖北民族大学附属民大医院骨科, 湖北恩施 445000)

**摘要:**【目的】探讨甘草甜素对骨关节炎大鼠软骨损伤的治疗作用及机制。【方法】将30只SD大鼠随机分为假手术组(6只)和造模组(24只)。造模组通过切断右侧前交叉韧带构建骨关节炎模型, 假手术组大鼠只剪开皮肤和关节腔。将造模成功的22只大鼠随机分为模型组(6只)、甘草甜素低剂量组(5只)、甘草甜素高剂量组(5只)、来氟米特组(6只)。甘草甜素低、高剂量组分别给予腹腔注射甘草甜素25、50 mg/kg, 来氟米特组给予灌胃来氟米特混悬液1.87 mg/kg, 模型组与假手术组大鼠腹腔注射同等体积的生理盐水, 每天1次, 连续给药3周。给药结束后, 番红O-快绿染色观察大鼠软骨组织病理损伤情况; 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测软骨组织中Caspase-3、Caspase-9 mRNA表达情况; 蛋白免疫印迹法检测软骨组织中的Caspase-3、Caspase-9、基质金属蛋白酶(MMP)-1、MMP-13、Collagen II、Aggrecan、转化生长因子(TGF)- $\beta$ 、p-Smad1、Smad1蛋白表达情况; 流式细胞仪检测外周血中辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg)水平。【结果】与假手术组比较, 模型组大鼠软骨组织番红O染色重度或完全失染, 软骨组织中Caspase-3、Caspase-9的mRNA表达及蛋白活化水平均显著升高, MMP-1、MMP-13、TGF- $\beta$ 蛋白表达及Smad1磷酸化水平均显著升高, Collagen II、Aggrecan蛋白表达水平均显著降低, 外周血中Th17细胞水平均显著升高, Treg细胞水平显著降低(均 $P < 0.05$ )。与模型组比较, 甘草甜素低、高剂量组番红O失染情况得到一定的缓解, 来氟米特组大鼠基本恢复至假手术组情况(均 $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 甘草甜素低、高剂量组及来氟米特组大鼠Caspase-3、Caspase-9的mRNA表达与蛋白活化水平显著降低, MMP-1、MMP-13、TGF- $\beta$ 蛋白表达及Smad1磷酸化水平均显著降低, Collagen II、Aggrecan蛋白表达水平均显著升高, 外周血中Th17细胞水平均显著降低, Treg细胞水平显著升高(均 $P < 0.05$ )。【结论】甘草甜素可能通过抑制TGF- $\beta$ /Smad1信号途径, 抑制软骨降解与细胞凋亡, 纠正Th17/Treg细胞失衡, 降低免疫炎症反应来修复OA大鼠软骨损伤。

**关键词:** 甘草甜素; 骨关节炎; 软骨损伤; TGF- $\beta$ /Smad1信号途径; Th17/Treg细胞平衡; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)02-0358-09

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.02.025

收稿日期: 2019-11-26

作者简介: 朱滨(1979-), 男, 硕士, 主治医师; E-mail: zbjqww123@sina.com

基金项目: 湖北省卫生计生科研项目(编号: 150609204)