

当归挥发油对自发性高血压大鼠 ET-1、 PGI₂、VEGF 表达水平的影响*

王利红¹ 谢青¹ 纪禄凤¹ 石向慧¹ 伊琳¹

[摘要] 目的:通过观察当归挥发油对自发性高血压大鼠血管内皮活性物质表达的影响来探讨其降压的作用机制。方法:将自发性高血压大鼠随机分为模型组、缬沙坦组(8 mg/kg)、当归挥发油不同剂量(3、6、12 mg/kg)组,同周龄 Wistar 大鼠设为正常组作对照,每组 10 只。模型组和正常组给予等量生理盐水,连续灌胃 4 周。采用无创血压检测系统测定给药前后大鼠尾动脉收缩压;给药 4 周后麻醉大鼠,分离胸主动脉,苏木精-伊红染色观察其内皮形态改变;腹主动脉采血,ELISA 检测大鼠血清中内皮素(ET)-1、前列环素 I₂(PGI₂)、内皮生长因子(VEGF)水平。结果:与模型组比较,当归挥发油不同剂量组收缩压呈不同程度下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);苏木精-伊红染色显示:与模型组比较,各给药组均能不同程度改善胸主动脉内皮形态和内膜弹力纤维曲度,降低弹力纤维的增生;ELISA 结果显示:与正常组比较,模型组 ET-1、VEGF 水平明显升高($P < 0.05$),PGI₂ 水平明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组 ET-1、VEGF 水平明显降低($P < 0.05$),PGI₂ 水平无明显变化($P > 0.05$)。结论:当归挥发油具有明显的降压效果,对胸主动脉内皮具有保护作用,其降压作用可能与抑制血清中的 ET-1、VEGF 水平有关。

[关键词] 当归;血管内皮;自发性高血压大鼠;内皮素;内皮生长因子

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2018.03.020

[中图分类号] R544.1 **[文献标志码]** A

Effects of Angelica Sinensis Oil on ET-1, PGI₂ and VEGF Expression in Spontaneously Hypertensive Rats

WANG Lihong XIE Qing JI Lufeng SHI Xianghui Irene

(Integrative Medicine Clinical College of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, 730000, China)

Corresponding author: Irene, E-mail: 631776763@qq.com

Abstract Objective: To observe the effects of volatile oil of angelica on the vascular endothelial activity of substances in spontaneously hypertensive rats and to explore its antihypertensive mechanism of action. **Method:** The spontaneous hypertensive rats were randomly divided into model group, valsartan group (8 mg/kg), angelica sinensis volatile oil different dose groups (3 mg/kg, 6 mg/kg, and 12 mg/kg), and Wistar rats of the same age as the normal control group, each group of 10. The model group and the normal group were given the same amount of saline, gavage for 4 weeks. The noninvasive blood pressure detection system was used to measure the systolic pressure of the caudal artery in rats before and after administration. Four weeks after the administration, the rats were anesthetized and the thoracic aorta was isolated and the morphology of the endothelium was observed by HE staining. Serum levels of endothelin 1 (ET-1), prostacyclin I₂ (PGI₂), and endothelial growth factor (VEGF) were measured by ELISA. **Result:** Compared with the model group, systolic blood pressure decreased to varying degrees in the angelica volatile oil different dose groups, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). And the morphology of endothelium of thoracic aorta and the curvature of endometrial elastic fiber were improved and the proliferation of elastic fibers were reduced after treatment with different dose of angelica volatile oil. Meanwhile, the increased levels of ET-1 and VEGF were significantly recovered ($P < 0.05$) but reduced PGI₂ level remained no change after treatment with angelica volatile oil ($P > 0.05$). **Conclusion:** Angelica essential oil has a significant antihypertensive effect, thoracic aorta endothelial protection, the antihypertensive effect may be related to the inhibition of serum ET-1 and VEGF levels.

Key words angelica; endothelium; spontaneous hypertensive rats; endothelin; endothelial growth factor

* 基金项目:国家自然科学基金(No:81460669);甘肃省自然科学基金(No:1310RJZA084)

¹ 甘肃中医药大学中西医结合临床学院(兰州,730000)

通信作者:伊琳, E-mail: 631776763@qq.com

当归为伞形科植物当归干燥的根,现代药理研究证明,当归对于心血管系统具有积极调控作用。其中挥发油是当归的有效成分之一,研究表明当归挥发油可降低兔胸主动脉平滑肌的张力,扩张血管^[1],减轻炎症反应。目前研究证实多种血管活性物质与原发性高血压发病紧密相关^[2]。为进一步探讨当归的降压机制,本实验以自发性高血压大鼠作为研究对象,观察当归挥发油对其血压、血管内皮形态及血清中内皮素(ET)-1、前列环素 I₂(PGI₂)、内皮生长因子(VEGF)水平等方面的影响,来探讨其可能的降压机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8 周龄雄性 SHR 及同龄 Wistar 大鼠,体质量 180~220 g,分别购自北京维通利华实验动物有限责任公司[动物许可证号 SCXK(京)2012-0001]和甘肃中医药大学实验动物中心。实验期间自由摄食,自由饮水,室温(20±2)℃。试验程序和方法得到甘肃中医学院医学伦理学会同意。

1.2 药物、试剂和仪器

当归挥发油(藁本内酯>70%)采用超临界 CO₂ 萃取技术提取(甘肃省岷县康达药业有限责任公司提供);缬沙坦(海南澳美华制药有限公司提供,批号:H20030153);ET-1、PGI₂、VEGF 的 ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司生产,批号:1062185)。BP-98A 动物无创血压测定系统(TMC203 型,日本东芝公司);多功能酶标仪(Tecan Infinite,瑞士);电子显微镜(OLYMPUS, U-TV0.63XC)。

1.3 方法

1.3.1 分组及给药 将 SHR 随机分为 5 组,即模型组,缬沙坦组,当归低剂量、当归中剂量、当归高剂量组;另设同周龄 Wistar 大鼠为正常对照组(正常组),每组 10 只。缬沙坦组每日给予缬沙坦药液 8 mg/kg 灌胃,相当于成人临床用量的 6 倍;当归低剂量组每天给予浓度为 1%的当归挥发油乳剂 10 ml/kg 灌胃,为成人每天当归药材使用剂量(15 g)的 3 倍;当归中剂量组每天给予浓度为 3%的当归挥发油乳剂 10 ml/kg 灌胃,为成人用量的 6 倍;当归高剂量组每天给予浓度为 9%的当归挥发油乳剂 10 ml/kg 灌胃,为成人用量的 12 倍;模型组和正常组分别给予等量生理盐水灌胃,1 次/d,连续给药 4 周。

1.3.2 血压检测 采用无创性套尾法测定大鼠清醒状态下尾动脉收缩压,测量前用 40℃的恒温水浸泡鼠尾使鼠尾变软,尾部皮肤转为微红,鼠尾动脉充分扩张。安装尾套并尽可能固定在鼠尾的根部,

使大鼠尾动脉与 PowerLab 无创尾动脉血压测定分析系统的脉搏传感器紧密接触,待动物安静后,血压检测界面出现稳定的脉搏波时开始测定血压。正式实验前每天测血压训练 1 次,连续 1 周。

1.3.3 标本采集 连续给药 4 周后,给予 10%水合氯醛 0.3 ml/100 g 腹腔注射麻醉大鼠,取胸主动脉血管置入 4%中性多聚甲醛中固定;于腹主动脉取血 8 ml,静置 30 min,以 3 000×g 离心 10 min(4℃条件下),分离血清备用;取胸主动脉血管置入 4%中性多聚甲醛中固定。

1.3.4 ELISA 检测血清 ET-1、PGI₂、VEGF 水平

严格按照试剂盒说明书设置空白孔、标准孔和待测样品孔,每组设 1 个复孔,标准品稀释成 5 个梯度(浓度为 0 的标准品为空白孔),每孔 50 μl;样品孔先加样品稀释液 40 μl,后加待测样品 10 μl(样品最终稀释度为 5 倍);空白孔除外,标准品孔和样品孔中每孔加入酶标试剂 50 μl,封板膜封板后置 37℃温育 30 min 后;弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,如此重复洗板 5 次,拍干;每孔加入显色剂 A、B 各 50 μl,轻轻震荡混匀,37℃避光显色 10 min;每孔加入终止液 50 μl,终止反应,以空白孔调零,15 min 内于 450 nm 波长处依序测定各孔的吸光度值。以标准品浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,按曲线方程计算各样本浓度值,各样本浓度×5 即为样本实际浓度。

1.3.5 胸主动脉组织形态学观察 麻醉大鼠,无菌条件下剪开胸腔,分离胸主动脉血管用 4%多聚甲醛溶液固定,之后依次使用梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋、切片,然后使用二甲苯和梯度酒精脱蜡,苏木素染色,1%盐酸酒精溶液分色,自来水清洗后经氢氧化铵溶液返蓝,之后用伊红染液染色,再次使用梯度酒精脱水、二甲苯透明,切片后加适量中性树胶封片,于×200 高倍镜下观察组织形态学变化并摄片。

1.4 统计学处理

采用 SPSS21.0 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,血压值采用重复测量的多因素方差分析;2 组间比较采用独立样本 *t* 检验,方差不齐时采用 *t'* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 当归挥发油对 SHR 血压的影响

与正常组比较,模型组大鼠收缩压明显升高,差异有统计学意义(*P*<0.05);与模型组比较,当归挥发油不同剂量组收缩压明显下降,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。

表 1 当归挥发油对 SHR 尾动脉收缩压的影响

Table 1 The effect of Volatile Oil from Angelica on systolic blood pressure in SHR

组别	剂量 /(mg · kg ⁻¹)	$\bar{x} \pm s$				
		给药前 /mmHg [△]	给药 1 周 /mmHg	给药 2 周 /mmHg	给药 3 周 /mmHg	给药 4 周 /mmHg
正常组(10 只)	—	136.50 ± 3.01	138.40 ± 2.37	139.60 ± 1.28	140.80 ± 2.89	139.50 ± 2.06
模型组(10 只)	—	204.00 ± 5.10 ¹⁾	202.70 ± 4.34 ¹⁾	203.60 ± 4.54 ¹⁾	204.90 ± 4.28 ¹⁾	205.10 ± 5.22 ¹⁾
缬沙坦组(10 只)	8	201.80 ± 4.09	191.80 ± 7.36 ²⁾	181.90 ± 7.66 ²⁾	170.80 ± 5.27 ²⁾	162.90 ± 6.76 ²⁾
当归低剂量组(10 只)	3	200.00 ± 2.65	192.30 ± 7.84 ²⁾	184.30 ± 6.96 ²⁾	172.30 ± 4.92 ²⁾	163.70 ± 6.63 ²⁾
当归中剂量组(10 只)	6	202.70 ± 3.69	192.10 ± 7.69 ²⁾	183.10 ± 6.41 ²⁾	170.90 ± 5.03 ²⁾	164.10 ± 5.41 ²⁾
当归高剂量组(10 只)	12	201.60 ± 3.50	191.90 ± 7.09 ²⁾	182.70 ± 6.83 ²⁾	170.60 ± 5.24 ²⁾	163.80 ± 5.58 ²⁾

[△]1 mmHg=0.133 kPa。与正常组比较,¹⁾P<0.05;与模型组比较,²⁾P<0.05。

2.2 胸主动脉内膜形态的比较

正常组胸主动脉血管内壁光滑,几乎无内皮细胞脱落,无内皮损伤,弹力纤维细、曲度好、无融合;与正常组比较,模型组血管内壁粗糙,有内皮损伤及内皮细胞脱落,弹力纤维增生变粗、变直,曲度差,出现融合;与模型组比较,各给药组血管内壁及内皮细胞均有不同程度的改善,表现为血管内壁变光滑,内皮细胞损伤程度降低,脱落的内皮细胞变少,弹力纤维增生缓解,曲度变好,融合减轻。见图 1。

2.3 当归挥发油对 SHR 血清中 ET-1、PGI₂、VEGF 的影响

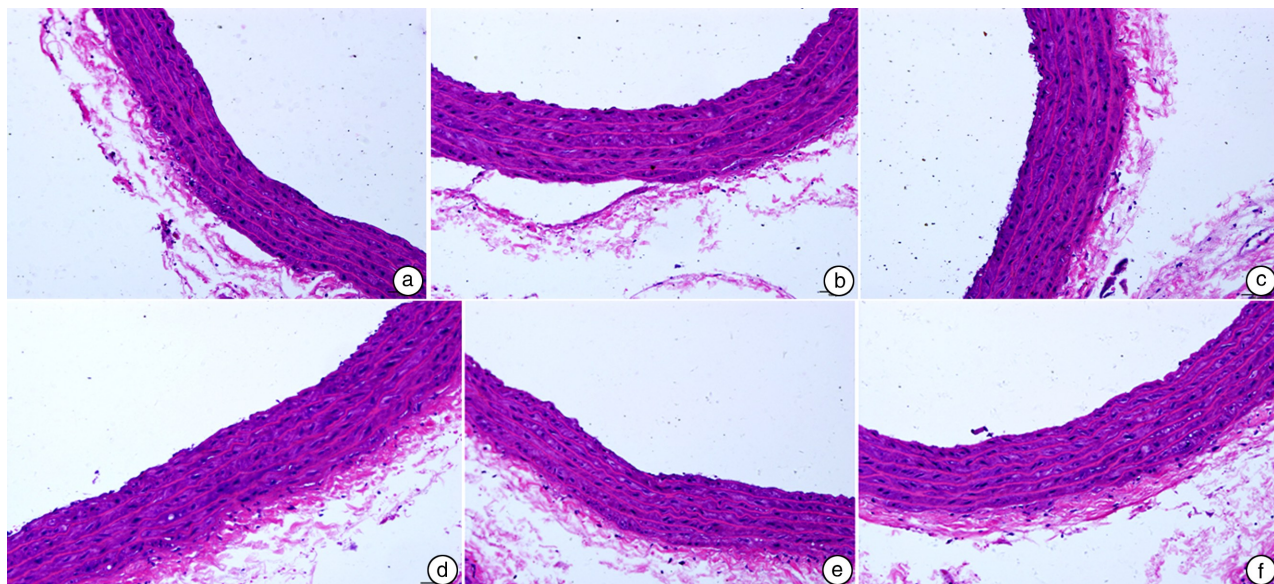
与正常组比较,模型组血清中血管 ET-1 和 VEGF 水平明显升高(P<0.05),PGI₂ 水平明显降低(P<0.05);与模型组比较,各给药组可不同程度地降低血清中 ET-1 和 VEGF 水平(P<0.05);血清 PGI₂ 含量差异无显著性(P>0.05)。说明当归挥发油对大鼠的血管活性物质有影响,且其降压机

制可能通过调节血管活性物质起作用,但其降压作用与血清 PGI₂ 水平无关。见表 2。

3 讨论

在对高血压发病机制的研究中,血管结构和功能的改变以及血管活性物质水平备受关注。因为血管活性物质的变化在高血压的病程进展中发挥着重要的作用。高血压的发病从本质上说是一种以动脉血管病变为主的疾病。血压升高时,内皮细胞结构和功能受损,血液中血管活性物质失衡,进一步加重高血压。有关研究证实多种血管活性物质如 ET、PG 等与原发高血压发病紧密相关^[2]。有研究认为高血压患者内皮功能障碍,血管舒张因子和血管收缩因子的平衡被打破是引起血压升高的主要原因。

ET 是机体内具有最强缩血管作用的活性多肽,其在维持基础血管张力与心血管系统稳态中起重要作用。有关研究表明,ET 可以增加冠状动脉的血管阻力^[3],其与一氧化氮失衡导致血管内皮舒



a: 正常组; b: 模型组; c: 缬沙坦组; d: 当归低剂量组; e: 当归中剂量组; f: 当归高剂量组。

图 1 各给药组胸主动脉苏木精-伊红染色结果(×200)

Figure 1 HE staining results of thoracic aorta(×200)

表 2 当归挥发油对 SHR 血清中 ET-1、PGI2 及 VEGF 含量的影响

Table 2 Effects of Volatile Oil from Angelica on serum ET-1, VEGF, PGI2 in SHR

 $\bar{x} \pm s$

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	ET-1/(μg · L ⁻¹)	PGI2/(ng · L ⁻¹)	VEGF/(pg · ml ⁻¹)
正常组	—	29.29 ± 10.09	76.31 ± 9.10	12.54 ± 1.09
模型组	—	54.05 ± 11.47 ¹⁾	37.98 ± 22.06 ¹⁾	29.35 ± 2.29 ¹⁾
缬沙坦组	8	31.69 ± 9.95 ²⁾	72.02 ± 10.16 ²⁾	13.75 ± 2.41 ²⁾
当归低剂量组	3	35.55 ± 9.79 ²⁾	40.73 ± 16.34	22.55 ± 4.60 ²⁾
当归中剂量组	6	34.99 ± 10.34 ²⁾	42.42 ± 19.67	20.95 ± 2.47 ²⁾
当归高剂量组	12	33.34 ± 7.81 ²⁾	51.57 ± 39.33	18.18 ± 5.73 ²⁾

与正常组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

缩功能障碍与高血压直接相关^[4]。ET 是由血管内皮分泌的一种一氧化氮拮抗物质,是最强的缩血管物质之一^[5]。有研究显示,高血压血浆中的 ET-1 水平明显升高,且随着血压的增高而增高。相关分析结果显示,血浆 ET-1 的水平与 24 h 平均收缩压及平均舒张压呈显著性正相关,血压水平及血压变异与 ET-1 的水平有显著相关性。

血管 VEGF 由血管平滑肌及内皮细胞产生,是一种对血管内皮细胞有特异高效作用的促有丝分裂因子,通过旁分泌和自分泌方式,特异地作用于血管内皮细胞,具有促进新生血管形成、维持血管壁的完整性和正常通透性、调节内皮细胞间及内皮细胞与基质间的相互作用等功能,在与血管内皮细胞增生相关的病理生理中占中心调控地位。体内实验表明血管 VEGF 刺激血管的发生与生长。PGI2 具有扩张血管、降低血管对血管紧张素的敏感性、抑制血小板聚集的功能^[6]。来源于血管内皮的 PGI2 是确保血管畅通的先决条件,若部分内皮细胞处于受损状态会减少 PGI2 的产生量,进而积聚血小板,收缩血管^[7]。

高血压引起全身细小动脉痉挛,管腔内径缩小,血管壁发生透明样变性。小动脉压力持续增高时,内膜血浆蛋白渗入,内膜纤维组织及弹力纤维增生,导致管腔变窄,血压升高。笔者通过实验研究发现当归挥发油具有降压作用,与相关研究结果一致^[8-9]。而且本实验通过苏木精-伊红染色发现当归挥发油能缓解动脉血管弹力纤维增生,使动脉血管弹力纤维曲度变好,融合减轻,说明当归挥发油能抑制胸主动脉血管重塑,改善血管内皮和弹力纤维的形态和结构,增强动脉血管弹力。ELISA 结果显示,与模型组比较,当归挥发油能降低血清中 ET-1、VEGF 的水平,说明其降压作用与血清中的 ET-1 及 VEGF 水平有关。推测当归降压机制可能

与保护血管内皮、改善动脉血管弹力纤维曲度及结构、影响血清中血管活性物质水平等有关,其具体机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 吴国泰,高云娟,田振华,等.当归挥发油对兔离体胸主动脉平滑肌的影响[J].甘肃中医学院学报,2011,28(5):1-3.
- [2] Qcaranza MP, Michea L, Chiong M, et al. Recent insights and therapeutic perspectives of angiotensin-(1-9) in the cardiovascular System[J]. Clin Sci(Lond), 2014,12(9):549-557.
- [3] 王静,刁军,李勇,等.内皮素 1、Toll 样受体 4 与冠状动脉慢血流关系的研究[J].临床心血管病杂志,2016,32(3):255-259.
- [4] Tang EH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension[J]. Pflugers Arch, 2010,459(6):995-1004.
- [5] 蔡海荣,黄玉萍,袁康,等.灯盏细辛注射液对动脉硬化家兔脂代谢、内皮功能及 MMP-9/TIMP-1 表达的影响[J].临床心血管病杂志,2017,33(10):1000-1003.
- [6] Shimizu M, Yoshimura S, Takizawa S, et al. Effect of single nucleotide polymorphisms of the prostacyclin receptor gene on platelet activation in Japanese healthy subjects and patients with cerebral infarction [J]. J Clin Neurosci, 2013,20(6):851-856.
- [7] 王智明.内皮源性血管活性物质与心血管疾病分析[J].中外医学研究,2013,11(6):149-151.
- [8] 伊琳,赵昕,李屹.当归对自发性高血压大鼠脑组织 Tnfaip8l2、Ahsg 及 Tlr3 基因表达的影响[J].中国动脉硬化杂志,2013,21(10):891-893.
- [9] 伊琳,陈蓓蓓,孙少伯,等.当归挥发油对自发性高血压大鼠心肌组织中微小 RNA 差异表达谱的影响[J].吉林大学学报(医学版),2016,42(4):671-675.

(收稿日期:2017-07-13;修回日期:2017-11-14)