

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.22.007

文章编号: 1005-8982 (2018) 22-0038-06

## 天麻钩藤饮对自发性高血压大鼠血管内皮细胞自噬相关信号通路 $Ca^{2+}$ /AMPK/mTOR 的影响

李云攀<sup>1</sup>, 刘美云<sup>2</sup>

(1. 潍坊护理职业学院, 山东 潍坊 262500; 2. 山东省潍坊市益都中心医院, 山东 潍坊 262500)

**摘要:目的** 探讨天麻钩藤饮对自发性高血压大鼠 (SHR) 血管内皮细胞自噬相关信号通路  $Ca^{2+}$ /AMPK/mTOR 的影响。**方法** 将 30 只雄性 SHR 大鼠随机分为 SHR 组、尼莫地平组 (5.4 mg/kg) 及天麻钩藤饮组 (10.26 g/kg), 另设京都种大鼠 (WKY) 作为对照组, 灌胃体积为 10 ml/kg, 连续给药 6 周。采用无创血压仪分别检测各组给药前、给药 2 周后、给药 4 周后及给药 6 周后的大鼠尾动脉收缩压; 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测给药 6 周后各组大鼠血浆血管紧张素 II (ANG II)、白细胞介素 1 (IL-1) 及钙调素 (CaM) 水平; 采用 Western blot 检测给药 6 周后各组大鼠血管内皮细胞中自噬标志物 (Beclin-1)、微管相关蛋白轻链 (LC3- II) 及自噬通路相关腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK), 以及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 的表达情况; 采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测给药 6 周后各组大鼠血管内皮细胞中自噬通路相关 AMPK、mTOR 基因的表达情况。**结果** 与 WKY 组比较, SHR 组大鼠尾动脉收缩压增高, 血浆 ANG II、IL-1 及 CaM 含量增加, 血管内皮细胞中自噬标志物 Beclin-1、LC3- II 和自噬通路相关 AMPK、mTOR 蛋白及 mRNA 表达水平平均上调 ( $P < 0.05$ ); 与 SHR 组比较, 尼莫地平组和天麻钩藤饮组大鼠血压均降低 ( $P < 0.05$ ), 血浆 ANG II、IL-1 及 CaM 含量下降, 且两者血管内皮细胞中自噬标志物 Beclin-1、LC3- II 和自噬通路相关 AMPK、mTOR 蛋白及 mRNA 表达水平平均降低 ( $P < 0.05$ )。**结论** 天麻钩藤饮对自发性高血压大鼠血管内皮细胞自噬相关信号通路  $Ca^{2+}$ /AMPK/mTOR 具有明显的调控作用, 可能是其降压的重要机制之一。

**关键词:** 天麻钩藤饮; 自发性高血压大鼠; 自噬; ANG II; Beclin-1; LC3- II; AMPK; mTOR

**中图分类号:** R285.5

**文献标识码:** A

## Effect of Tianma Gouteng Decoction on $Ca^{2+}$ /AMPK/mTOR signaling pathway of vascular endothelial cells in spontaneous hypertensive rats

Yun-pan Li<sup>1</sup>, Mei-yun Liu<sup>2</sup>

(1. Weifang Nursing Vocational College, Weifang, Shandong 262500, China; 2. Yidu Central Hospital of Weifang, Weifang, Shandong 262500, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of Tianma Gouteng Decoction on the autophagy-related  $Ca^{2+}$ /AMPK/mTOR pathway of vascular endothelial cells in spontaneous hypertensive rats (SHR). **Methods** In this study 30 male rats with spontaneous hypertension were randomly divided into 3 groups, i.e. an SHR group, a Nimodipine (5.4 mg/kg) group and a Tianma Gouteng Decoction (10.26 g/kg) group. Meanwhile, 10 male WKY rats were employed for a control group. Then all the rats had intragastric administration of corresponding drugs (10 ml/kg) for consecutive 6 weeks. The systolic blood pressure (SBP) of SHR was separately detected by noninvasive blood

pressure meter before drug administration, 2, 4 and 6 weeks after administration. The plasma levels of Ang II, IL-1 and CaM in all groups of rats were detected by enzyme-linked immunosorbent assay after 6 weeks of administration. The expressions of autophagy marker protein Beclin-1, LC3-II, autophagy pathway-related protein AMP and mTOR in the vascular endothelial cells of all the rats were detected by Western blot after 6 weeks of administration. The expressions of autophagy pathway-related AMPK and mTOR mRNAs in vascular endothelial cells of all groups of rats were detected by RT-PCR after 6 weeks of administration. **Results** Compared with the WKY group, SBP and plasma levels of Ang II, IL-1 and CaM were markedly increased in the SHR group ( $P < 0.05$ ); the expressions of Beclin-1, LC3- II, AMP and mTOR proteins and mRNAs in the vascular endothelial cells were obviously up-regulated in the SHR group ( $P < 0.05$ ). Compared with the SHR group, SBP, plasma levels of Ang II, IL-1 and CaM were obviously decreased in both Nimodipine and Tianma Gouteng Decoction groups ( $P < 0.05$ ); so as the expressions of Beclin-1, LC3-II, AMP and mTOR proteins and mRNAs in the vascular endothelial cells in the two groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Tianma Gouteng Decoction can significantly regulate the autophagy-related pathway  $Ca^{2+}$ /AMPK/mTOR of vascular endothelial cells in spontaneous hypertensive rats, which is probably one of the important mechanisms of its antihypertensive effect.

**Keywords:** Tianma Gouteng Decoction; spontaneous hypertensive rat; autophagy; Ang II; Beclin-1; LC3- II; AMPK; mTOR

高血压是一种常见的严重危害人类身体健康的心血管疾病,其发病率和病死率逐年增加,呈年轻化趋势显著,给患者造成极大的医疗负担<sup>[1]</sup>。相关研究表明,血管内皮功能障碍是诱发和加重高血压病的重要分子机制,在高血压病理状态下,血管活性物质和炎症介质等因素长期刺激血管壁,导致血管内皮细胞外基质异常降解和沉积、抗凝和促凝功能紊乱、血管收缩因子和血管舒张因子调节失衡,最后引发血管内皮功能障碍<sup>[2-4]</sup>。

此外,有文献报道自噬与血管内皮细胞功能密切相关,其对内皮细胞增殖、黏附、分泌及血管形成等功能方面发挥着至关重要的作用<sup>[5-7]</sup>,而自噬是一把双刃剑,基础水平自噬能有效保护内皮细胞功能与结构受损,但自噬过度激活反而会加重高血压病情。目前,中药对高血压自噬影响的文献报道甚少,且血管内皮功能障碍与高血压自噬之间的发生机制亦未见相关实验研究,因此,本文拟采用自发性高血压模型大鼠,初步探讨天麻钩藤饮对自发性高血压大鼠血管内皮细胞自噬相关信号通路  $Ca^{2+}$ /AMPK/mTOR 的影响,以阐述其降压机制与调控自噬的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 雄性 SPF 级京都种大鼠 (wistar-kyoto rat, WKY) 10 只、自发性高血压大鼠 (spontaneous hypertensive rat, SHR) 30 只,体重 180 ~ 220 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物质量合格证

号为 SCXK(京)2012-0001。

**1.1.2 药物** 天麻钩藤饮由天麻 9 g、钩藤 12 g、生决明 18 g、黄芩 9 g、栀子 9 g、川牛膝 12 g、桑寄生 9 g、朱茯神 9 g、杜仲 9 g、夜交藤 9 g、益母草 9 g 组成,统一购自北京同仁堂大药房并符合国家药典标准,尼莫地平片购自天津市中央药业有限公司。

**1.1.3 试剂** RIPA 蛋白抽提试剂、HRP-山羊抗兔 IgG 二抗购自武汉博士德生物工程有限公司,Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,大鼠 ANG II、IL-1 ELISA kit 购自武汉博士德生物工程有限公司,大鼠 CaM ELISA kit 购自武汉华美生物科技有限公司,兔抗大鼠 Beclin-1、LC3- II、腺苷酸活化蛋白酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK) 及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 多克隆抗体购自美国 Proteintech 公司,其余常用试剂均为市场分析纯。

**1.1.4 仪器** BP98A 型无创血压检测仪 (北京软隆科技有限责任公司),GS-800 型凝胶扫描成像系统 (美国 Bio-Rad 公司),LA612 型超纯水仪 (美国 Elga 公司),PowerPac 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司),5427R 型台式高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组及给药** 将 30 只雄性 SHR 大鼠按体重随机分为 SHR 组、尼莫地平组及天麻钩藤饮组,另设正常对照组 (WKY 组),每组 10 只。参照文献 [8] 并按体表面积与人临床等效剂量换算,中药组大鼠灌胃给予天麻钩藤饮生药 10.26 g/kg,西药组大鼠灌胃给予尼莫

地平 5.4 mg/kg, WKY 组和 SHR 组大鼠则给予等量蒸馏水, 灌胃体积为 10 ml/kg, 1 次/d, 连续给药 6 周。

**1.2.2 大鼠血压检测** 采用 BP98A 型无创血压仪检测各组大鼠尾动脉收缩压, 在清醒与非激怒状态下, 取连续 3 次大鼠尾动脉收缩压的平均值作为其血压, 所有大鼠首次给药前测定血压, 然后每隔 2 周于给药 1 h 后测量血压, 并固定每次测量时间均在上午。

**1.2.3 血浆血管紧张素 II、白细胞介素 1、钙调素含量检测** 各组动物给药 6 周后, 4% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 腹主动脉采血, 肝素钠抗凝, 3 000 r/min 离心 10 min, 收集血浆, 采用酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测各组大鼠血浆中 ANG II (Angiotensin II, ANG II)、IL-1 (Interleukin-1, IL-1) 及 CaM 含量 (Calmodulin, CaM), 具体操作步骤详见 ELISA 试剂盒说明书。

**1.2.4 自噬标志物、微管相关蛋白轻链检测** 各组动物给药 6 周后, 4% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 即刻分离胸主动脉, 置于离心管中, 加入 PMSF-RIPA (1 : 100) 试剂抽提总蛋白, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, BCA 试剂盒检测自噬标志物 (autophagy-related, Beclin-1) 和微管相关蛋白轻链 (microtubule-associated protein II light chain-3, LC3-II) 蛋白含量。将蛋白样本与上样缓冲液混匀、变性后, 以每孔 60  $\mu$ g 加入至 SDS-PAGE 凝胶中, 电泳、转膜 2.5 h, 于摇床 5% BSA 室温封闭 1 h。加入一抗 (Beclin 11 : 1 000, LC3-II 1 : 1 000, GAPDH 1 : 1 000) 4 $^{\circ}$ C 培养过夜, TBST 洗 3 次  $\times$  10 min, 加入 HRP-山羊抗兔二抗 (1 : 1 000), 室温振荡培养 1 h, TBST 洗 4 次  $\times$  10 min, ECL 化学发光后通过蛋白印迹成像和定量分析系统进行扫描, 并计算各蛋白的相对光密度值。

**1.2.5 自噬通路相关 AMPK 和 mTOR 蛋白检测** 同上操作抽提总蛋白后, 离心、取上清, BCA 试剂盒测定 AMPK 和 mTOR 蛋白含量, 蛋白样本与上样缓冲液混合、变性, 每孔 60  $\mu$ g 加入 SDS-PAGE 凝胶中, 电泳、转膜 3 h, 5% BSA 封闭 1 h, 加入一抗 (AMPK 1 : 1 000, mTOR 1 : 1 000, GAPDH 1 : 1 000) 4 $^{\circ}$ C 培养过夜, TBST 洗 3 次  $\times$  10 min, 加入 HRP-山羊抗兔二抗 (1 : 1 000), 室温振荡培养 1 h, TBST 洗 4 次  $\times$  10 min, ECL 化学发光, 最后采用蛋白印迹成像和定量分析系统计算各蛋白的相对光密度值。

**1.2.6 自噬通路相关 AMPK 和 mTOR 基因检测** 取各组大鼠胸主动脉, 分别加入 Trizol 试剂, 参照试剂

盒步骤抽提总 RNA, 采用核酸定量仪测定其浓度及纯度。进行逆转录聚合酶链反应合成 cDNA : 42 $^{\circ}$ C 60 min、75 $^{\circ}$ C 5 min, 然后扩展基因产物 : 95 $^{\circ}$ C 预变性 35 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 40 次循环。其中内参  $\beta$ -actin 引物序列正向引物 : 5'-CATCGCTTGCGGCAGTCACCTG-3', 反向引物 : 5'-CGTACTGCGTGCGATGAGTCACTT-3'; AMPK 引物序列正向引物 : 5'-CGACGTGGAGCTGTACTGACGT-3', 反向引物 : 5'-CATACTCAGTCAGATCTCTATC-3'; mTOR 引物序列为正向引物 : 5'-TCGAGTGTTAGCCAC TATAG-3', 反向引物 : 5'-CCTATTATCGACGCATCCG A-3'。最后以内参为对照计算各基因的相对表达量。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 不同时间点的各组大鼠尾动脉收缩压的比较采用重复测量设计的方差分析, 组间两两比较采用 *t* 检验, 多组间的比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 天麻钩藤饮对 SHR 大鼠血压的影响

4 组大鼠给药前、给药 2 周、给药 4 周及给药 6 周后的血压值比较采用重复测量设计的方差分析, 结果 : ①不同时间点的血压值有差异 ( $F = 42.282$ ,  $P = 0.000$ ); ②不同组之间的血压值有差异 ( $F = 10.518$ ,  $P = 0.004$ ); ③不同组之间的血压值变化趋势有差异 ( $F = 217.009$ ,  $P = 0.000$ )。给药 2、4 和 6 周后, 与相应时间点 WKY 组比较, SHR 组大鼠血压增高 ( $t = 22.822$ 、31.183 和 32.482,  $P = 0.009$ 、0.005 和 0.005); 与相应时间点 SHR 组比较, 尼莫地平组大鼠血压降低 ( $t = 14.342$ 、40.932 和 20.683,  $P = 0.019$ 、0.003 和 0.010), 天麻钩藤饮组大鼠血压亦降低 ( $t = 9.226$ 、11.389 和 13.494,  $P = 0.039$ 、0.028 和 0.021), 这提示天麻钩藤饮对自发性高血压大鼠具有降压作用。见表 1。

### 2.2 天麻钩藤饮对 SHR 大鼠血浆 ANG II、IL-1 及 CaM 水平的影响

ELISA 检测结果显示, 给药 6 周后, 4 组大鼠血浆 ANG II、IL-1 及 CaM 水平比较, 差异有统计学意义 ( $F = 16.073$ 、10.052 和 28.712,  $P = 0.001$ 、0.004 和 0.000); 与 WKY 组比较, SHR 组大鼠血浆中 ANG II、IL-1 及 CaM 含量均增加, 差异有统计学意义 ( $t = 44.280$ 、25.230 和 68.112,  $P = 0.000$ 、0.001 和 0.000), 与 SHR

表 1 天麻钩藤饮对 SHR 大鼠尾动脉收缩压的影响

 $(n=10, \text{mmHg}, \bar{x} \pm s)$ 

组别	给药前	给药 2 周	给药 4 周	给药 6 周
SHR 组	166.2 ± 9.6 <sup>1)</sup>	182.7 ± 14.3 <sup>1)</sup>	185.6 ± 11.7 <sup>1)</sup>	191.5 ± 13.6 <sup>1)</sup>
尼莫地平组 (5.4 mg/kg)	167.9 ± 10.4 <sup>1)</sup>	141.6 ± 12.2 <sup>2)</sup>	131.3 ± 8.9 <sup>2)</sup>	145.9 ± 10.8 <sup>2)</sup>
天麻钩藤饮组 (10.26 g/kg)	169.1 ± 11.3 <sup>1)</sup>	152.1 ± 10.0 <sup>2)</sup>	156.6 ± 9.2 <sup>2)</sup>	154.0 ± 11.3 <sup>2)</sup>
WKY 组	127.7 ± 8.5	135.5 ± 9.4	138.4 ± 8.8	137.1 ± 9.4

注: 1) 与 WKY 组比较  $P < 0.05$ ; 2) 与 SHR 组比较  $P < 0.05$ 

组比较, 尼莫地平组大鼠血浆 ANG II、IL-1 及 CaM 水平均降低 ( $t=18.819$ 、 $10.415$  和  $41.320$ ,  $P=0.001$ 、 $0.004$  和  $0.000$ ), 天麻钩藤饮组大鼠上述 3 个因子水平亦降低 ( $t=13.374$ 、 $9.574$  和  $7.711$ ,  $P=0.003$ 、 $0.009$  和  $0.008$ ), 这提示天麻钩藤饮能有效降低 SHR 大鼠炎症水平、抑制血管内皮因子过度激活和细胞内钙增加。见表 2。

表 2 天麻钩藤饮对 SHR 大鼠血浆 ANG II、IL-1 及 CaM 水平的影响  $(n=10, \text{pg/ml}, \bar{x} \pm s)$ 

组别	ANG II	IL-1	CaM
SHR 组	56.3 ± 6.9 <sup>1)</sup>	98.4 ± 15.6 <sup>1)</sup>	29.7 ± 4.3 <sup>1)</sup>
尼莫地平组 (5.4 mg/kg)	34.2 ± 5.5 <sup>2)</sup>	61.5 ± 12.2 <sup>2)</sup>	12.1 ± 2.0 <sup>2)</sup>
天麻钩藤饮组 (10.26 g/kg)	37.8 ± 5.4 <sup>2)</sup>	65.4 ± 10.1 <sup>2)</sup>	20.5 ± 3.8 <sup>2)</sup>
WKY 组	26.4 ± 3.6	46.6 ± 8.7	7.3 ± 1.9

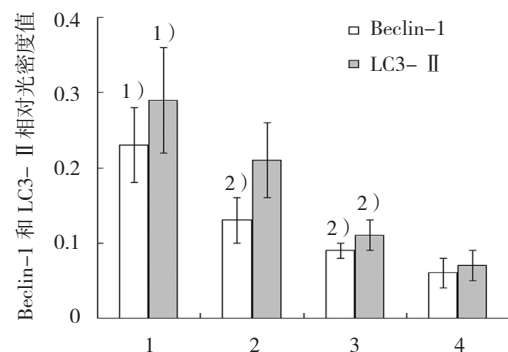
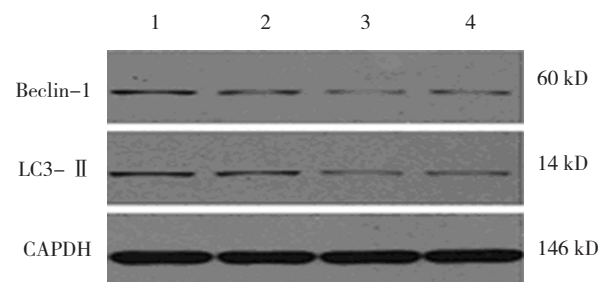
注: 1) 与 WKY 组比较  $P < 0.05$ ; 2) 与 SHR 组比较  $P < 0.05$ 

### 2.3 天麻钩藤饮对自噬标志物 Beclin-1 和 LC3-II 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示, 给药 6 周后, SHR 组大鼠血管内皮细胞中自噬标志物 Beclin-1 和 LC3-II 蛋白表达与 WKY 组比较差异有统计学意义 ( $t=29.897$  和  $27.396$ ,  $P=0.005$  和  $0.006$ ), SHR 组上调, 表明 SHR 大鼠血管内皮细胞中自噬被激活; 尼莫地平组大鼠自噬标志物 Beclin-1 蛋白表达与 SHR 组比较, 差异有统计学意义 ( $t=8.824$ ,  $P=0.041$ ), 尼莫地平组降低; 天麻钩藤饮组大鼠 Beclin-1 和 LC3-II 蛋白表达均降低 ( $t=22.615$  和  $18.340$ ,  $P=0.009$  和  $0.013$ ), 这提示天麻钩藤饮能有效降低 SHR 大鼠自噬水平。见图 1。

### 2.4 天麻钩藤饮对 AMPK 和 mTOR 表达的影响

Western blot 检测结果显示, 给药 6 周后, WKY 组



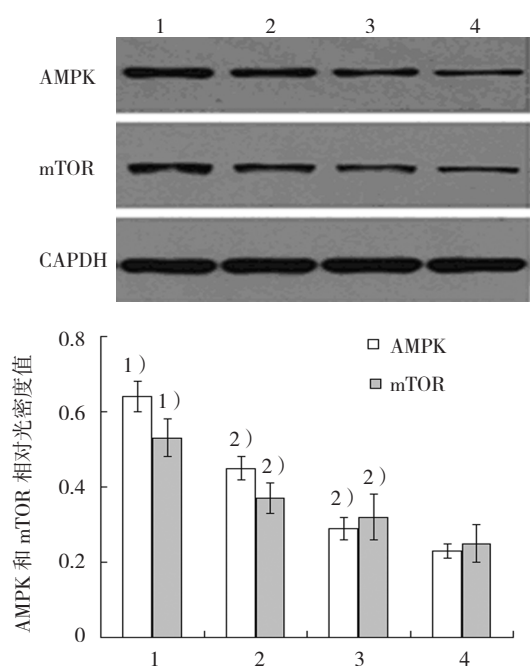
1: SHR 组; 2: 尼莫地平组; 3: 天麻钩藤饮组; 4: WKY 组。  
1) 与 WKY 组比较  $P < 0.05$ ; 2) 与 SHR 组比较  $P < 0.05$

图 1 天麻钩藤饮对血管内皮细胞自噬标志物 Beclin-1 和 LC3-II 蛋白表达的影响

与 SHR 组大鼠血管内皮细胞中自噬通路 AMPK 和 mTOR 比较, 差异有统计学意义 ( $t=252.150$  和  $47.040$ ,  $P=0.000$  和  $0.002$ ), SHR 组表达上调; 与 SHR 组比较, 尼莫地平组大鼠自噬通路相关 AMPK 和 mTOR 蛋白表达降低 ( $t=43.320$  和  $18.732$ ,  $P=0.003$  和  $0.012$ ), 天麻钩藤饮组大鼠 AMPK 和 mTOR 蛋白表达亦降低 ( $t=147.001$  和  $21.689$ ,  $P=0.000$  和  $0.009$ ), 这提示天麻钩藤饮对自噬通路相关 AMPK 和 mTOR 蛋白具有调控作用。见图 2。

### 2.5 天麻钩藤饮对自噬通路相关 AMPK 和 mTOR 基因表达的影响

RT-PCR 检测结果显示, 给药 6 周后, 4 组大鼠 AMPK 和 mTOR 基因表达水平比较, 差异有统计学意义 ( $F=10.482$  和  $8.126$ ,  $P=0.004$  和  $0.008$ ); WKY 组与 SHR 组大鼠血管内皮细胞自噬通路相关 AMPK 和 mTOR mRNA 比较, 差异有统计学意义 ( $t=26.113$  和  $22.601$ ,  $P=0.001$  和  $0.002$ ), SHR 组表达上调; 与 SHR 组比较, 尼莫地平组大鼠自噬通路相关 AMPK 和 mTOR mRNA 表达均降低 ( $t=14.530$  和  $9.125$ ,  $P=0.003$  和  $0.011$ ), 天麻钩藤饮组大鼠上述两基因表达水平亦降低 ( $t=7.769$  和  $9.654$ ,  $P=0.011$  和  $0.008$ ), 这提示天麻钩藤饮对自噬通路相关 AMPK 和 mTOR 基因具有明显的调控作用。见表 3。



1: SHR 组; 2: 尼莫地平组; 3: 天麻钩藤饮组 4: WKY 组。

1) 与 WKY 组比较  $P < 0.05$ ; 2) 与 SHR 组比较  $P < 0.05$

图 2 天麻钩藤饮对血管内皮细胞自噬通路相关 AMPK 和 mTOR 蛋白表达的影响

表 3 天麻钩藤饮对血管内皮细胞自噬通路相关 AMPK、mTOR 基因表达的影响 ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	AMPK	mTOR
SHR 组	$1.637 \pm 0.272^{1)}$	$1.432 \pm 0.187^{1)}$
尼莫地平组 (5.4 mg/kg)	$0.924 \pm 0.176^{2)}$	$1.015 \pm 0.149^{2)}$
天麻钩藤饮组 (10.26 g/kg)	$1.073 \pm 0.221^{2)}$	$0.987 \pm 0.163^{2)}$
WKY 组	$0.729 \pm 0.144$	$0.842 \pm 0.106$

注: 1) 与 WKY 组比较  $P < 0.05$ ; 2) 与 SHR 组比较  $P < 0.05$

### 3 讨论

自噬是指细胞内受损、变性及衰老的蛋白和细胞碎片被运输到溶酶体, 并对其进行消化降解, 以胞质内自噬体出现为标志的一种程序化的细胞自我降解过程<sup>[9]</sup>。在此过程中 Beclin-1、LC3- II 蛋白是哺乳动物自噬相关基因的编码产物, 两者通过与哺乳动物空泡序列蛋白质 34 (mammalian Vacuolar sorting proteins-34, mVps-34)、B 细胞淋巴瘤蛋白 2 (B Cell Leukemia-2, Bcl-2) 等因子相互作用, 激活细胞自噬, 故 Beclin-1、LC3- II 蛋白常常作为自噬标志分子来检测细胞自噬水平<sup>[10]</sup>。相关研究发现, 血管内皮功能障碍与高血压病的发生密切相关, 并且是后者的重要

致病因素, 在高血压病理进程中, 血管内皮细胞与循环血液内高浓度的 Ang II 直接接触, 刺激产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、IL-1、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 等炎症因子及细胞内钙离子<sup>[11-12]</sup>, 而当  $Ca^{2+}$  超载后, 血浆中钙调素 CaM 增加, 又可激活钙/钙调蛋白激酶依赖性激酶  $\beta$  ( $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase kinase  $\beta$ , CaMKK- $\beta$ ) 增加 AMPK 活性, 然后磷酸化结节蛋白复合物 2 (tuberous sclerosis complex-2, TSC-2) 进而抑制重组人表皮因子 (reconstructed human epidermis, RHE) 分子, 通过负反馈抑制 mTOR 活性, 最终激活细胞自噬<sup>[13-15]</sup>, 因此自噬与高血压发病机制密切相关, 其可通过  $Ca^{2+}$ /AMPK/mTOR 信号途径导致血管内皮细胞坏死与凋亡, 进而加重高血压病情。

天麻钩藤饮源自《杂病证治新义》, 是目前临床上一种治疗高血压病的经典方, 由天麻、钩藤、生决明、黄芩、栀子、川牛膝、桑寄生、朱茯神、杜仲、夜交藤、益母草几味药组成, 方中天麻、钩藤平肝熄风, 石决明平肝潜阳, 黄芩、栀子清肝降火, 川牛膝活血利水, 桑寄生、杜仲补肝益肾, 朱茯神、夜交藤宁心安神, 诸药合用, 共奏平肝熄风、清热活血、补益肝肾之功效<sup>[8, 16]</sup>。临床研究表明, 其降压效果显著, 并能抑制患者细胞内  $Ca^{2+}$  释放、降低血浆内皮素 (Endothelin, ET)、ANG II 含量及超敏 C 反应蛋白 (high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)、TNF- $\alpha$  等炎症因子水平, 有效改善高血压患者受损的血管内皮功能及血管重塑<sup>[17]</sup>。本文实验研究结果发现, 尼莫地平、天麻钩藤饮均能降低 SHR 大鼠尾动脉收缩压和血浆 ANG II 和 CaM 水平、下调血管内皮细胞中自噬标志物 Beclin-1 和 LC3- II 与自噬通路相关 AMPK 和 mTOR 蛋白及 mRNA 表达水平, 这些结果提示抑制自噬相关信号通路与天麻钩藤饮降压机制存在一定的联系。已知阳性药尼莫地平属于钙通道拮抗剂, 研究表明其能有效降低 SHR 大鼠血压<sup>[18-19]</sup>, 且尼莫地平可通过阻断  $Ca^{2+}$ /AMPK/mTOR 信号通路从而抑制细胞自噬<sup>[20]</sup>, 这提示天麻钩藤饮可能也是通过调控  $Ca^{2+}$ /AMPK/mTOR 相关自噬信号通路而发挥降压作用的。

综上所述, 天麻钩藤饮对自发性高血压大鼠血管内皮细胞自噬相关信号通路  $Ca^{2+}$ /AMPK/mTOR 具有明显的调控作用, 其中药整体降压作用与调控自噬密切相关, 推测天麻钩藤饮通过降低 ANG II、IL-1 等血管活性与炎症介质, 然后抑制细胞内钙超载, 继而阻

断  $\text{Ca}^{2+}$ /AMPK/mTOR 自噬信号途径, 这可能是天麻钩藤饮抑制血管内皮细胞自噬发挥降压作用的重要机制之一, 但其具体机制仍有待明确, 后续实验计划采用 AMPK、mTOR 受体阻断剂与激动剂, 并从药物不同作用时间点对其进行更深层次的机制研究。

#### 参 考 文 献:

- [1] CZARNECKA D, JANKOWSKI P, KOPEĆ G, et al. Polish forum for prevention guidelines on hypertension: update 2017[J]. *Kardiologia Pol*, 2017, 75(3): 282-285.
- [2] PODZOLKOV V I, TARZIMANOVA A I. Dynamics of biochemical markers of endothelial dysfunction in patients with arterial hypertension[J]. *Kardiologia*, 2016, 56(8): 28-32.
- [3] LI X, LIN Y, ZHOU H, et al. Puerarin protects against endothelial dysfunction and end-organ damage in Ang II-induced hypertension[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2017, 39(1): 58-64.
- [4] CHI L, HU X, ZHANG W, et al. Adipokine CTRP6 improves PPAR $\gamma$  activation to alleviate angiotensin II-induced hypertension and vascular endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(4): 727-734.
- [5] DONG Q, XING W, FU F, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside inhibits excessive autophagy and improves microvascular endothelial dysfunction in prehypertensive spontaneously hypertensive rats[J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(7): 1393-1412.
- [6] TENG R J, DU J, WELAK S, et al. Cross talk between NADPH oxidase and autophagy in pulmonary artery endothelial cells with intrauterine persistent pulmonary hypertension[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(7): L651-663.
- [7] SHEN W, TIAN C, CHEN H, et al. Oxidative stress mediates chemerin-induced autophagy in endothelial cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 55(2): 73-82.
- [8] 栗源, 可燕, 蒋嘉焯, 等. 天麻钩藤饮对自发性高血压大鼠血管功能及肾脏蛋白表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(4): 481-487.
- [9] MAEJIMA Y, CHEN Y, ISOBE M, et al. Recent progress in research on molecular mechanisms of autophagy in the heart[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(4): H259-268.
- [10] SCHMITZ K J, ADEMI C, BERTRAM S, et al. Prognostic relevance of autophagy-related markers LC3, p62/sequestosome 1, Beclin-1 and ULK1 in colorectal cancer patients with respect to KRAS mutational status[J]. *World J Surg Oncol*, 2016, 14(1): 189.
- [11] 李喆, 孟航, 张小兰, 等. 安脑丸辅助西医常规治疗老年高血压眩晕对血管内皮细胞功能、血液流变学及血流动力学的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2017, 26(23): 2521-2524.
- [12] PRASAD A M, KETSAWATSOMKRON P, NUNO D W, et al. Role of CaMK II in Ang-II-dependent small artery remodeling[J]. *Vascul Pharmacol*, 2016(87): 172-179.
- [13] CHANG C H, LEE C Y, LU C C, et al. Resveratrol-induced autophagy and apoptosis in cisplatin-resistant human oral cancer CAR cells: A key role of AMPK and Akt/mTOR signaling[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(3): 873-882.
- [14] YANG S, LONG L H, LI D, et al.  $\beta$ -Guanidinopropionic acid extends the lifespan of *Drosophila melanogaster* via an AMP-activated protein kinase-dependent increase in autophagy[J]. *Aging Cell*, 2015, 14(6): 1024-1033.
- [15] WANG Q, GUO W, HAO B, et al. Mechanistic study of TRPM2-Ca(2+)-CAMK2-BECN1 signaling in oxidative stress-induced autophagy inhibition[J]. *Autophagy*, 2016, 12(8): 1340-1154.
- [16] 焦丽艳, 刘勇. 经方天麻钩藤饮中单味药治疗高血压病及其心血管作用的药理研究[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 68(17): 62-63.
- [17] 冯惠枝. 天麻钩藤饮联合波依定对原发性高血压患者血浆 Ang II 表达的影响[J]. *北方药学*, 2017, 14(5): 145-149.
- [18] 李浩, 郭明冬, 刘剑刚. 降压胶囊联合尼莫地平对自发性高血压大鼠 ET、CGRP 及 Ang II 水平的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2007, 11(27): 2178-2180.
- [19] 栗源, 可燕, 蒋嘉焯, 等. 天麻钩藤饮对自发性高血压大鼠血管功能及肾脏蛋白表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(4): 481-487.
- [20] MO Z, FANG Y, HE Y, et al. Change of Beclin-1 dependent on ATP,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and MMP in PC12 cells following oxygen-glucose deprivation-reoxygenation injury[J]. *Cell Biol Int*, 2012, 36(11): 1043-1048.

(张西倩 编辑)