

显齿蛇葡萄叶总黄酮对原发性高血压大鼠的降血压研究

赵喜兰

(漯河医学高等专科学校, 河南漯河 462002)

摘要:为了探讨显齿蛇葡萄叶总黄酮对原发性高血压大鼠的影响,采用超声波辅助提取,D-101大孔树脂纯化制备显齿蛇葡萄叶总黄酮,将SHR大鼠40只随机分成正常组、模型组、显齿蛇葡萄叶黄酮组(100、200和400 mg/kg)和依那普利组(5 mg/kg),显齿蛇葡萄叶黄酮组和依那普利组按照体重分别给予对应药物灌胃10周,分别在10周和12周测定血压及血清中各项指标。同时利用显齿蛇葡萄叶黄酮不同剂量喂养正常大鼠6个月,测定血压及血清各项指标。结果显示,显齿蛇葡萄叶黄酮治疗原发性高血压大鼠10周后能明显降低血压,另外也降低血清中血浆肾素、血管紧张素Ⅱ、内皮缩血管肽和丙二醛的含量和提高一氧化氮、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽的含量,对正常Wistar大鼠喂养后发现对血压基本没有影响。提示显齿蛇葡萄叶黄酮对原发性高血压大鼠具有明显的降血压效果,潜在的机理可能与肾素-血管紧张素的-醛固酮系统(RAAS)调制和抗氧化系统有关,另外显齿蛇葡萄叶黄酮对正常大鼠的血压没有影响,表明显齿蛇葡萄叶黄酮可用来作为天然药物或功能食品来预防高血压。

关键词:显齿蛇葡萄叶,总黄酮,原发性高血压大鼠,降血压

Effect of the flavonoid fraction of *Ampelopsis grossedentata* on spontaneously hypertensive rats

ZHAO Xi-lan

(Luohe Medical College, Luohe 462002, China)

Abstract: The present study aimed to assess the effect of the total flavonoids *Ampelopsis grossedentata* on (TFA) spontaneously hypertensive rats and normotensive rats, TFA was extracted by ultrasonic method and purified by D-101 macroporous resin. The spontaneously hypertensive rats in experimental group were intragastrically administrated with TFA at 100, 200 and 400 mg/kg once a day for consecutive 10 weeks. Rats were given intragastrically with 5 mg/kg enalapril as controls. At end of 10 week, some rats were randomly selected for blood pressure determination and were anesthetized for serum preparation. After keeping normally for 2 weeks, the remaining rats were subjected to blood pressure measurement and serum isolation. The concentration of PRA, ANG II, ET, NO, SOD, CAT, GSH, MDA were evaluated. After the healthy SD rats were treated with TFA for 6 months, the blood pressure, the concentration of Na^+ , K^+ , Cl^- and Na^+/K^+ were measured. TFA significantly reduced the blood pressure, the concentration of PRA, ANG II, ET and MDA in serum and increase the level of NO, SOD, CAT, GSH in primary hypertension rats for 10-week treatment. There was no significant changes in blood pressure of control rats after TFA treatment. TFA significantly reduced the blood pressure in primary hypertension rats. The potential mechanism may be related with the antioxidant system regulation by RAAS. No significant effect was observed on healthy rats. All these suggested that ampelopsis grossedentata showed significant effect on preventing hypertension as natural medicine and natural function food.

Key words: *Ampelopsis grossedentata*; flavonoids; spontaneously hypertensive rats; antihypertensive

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)06-0351-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.06.062

显齿蛇葡萄 (*Ampelopsis grossedentata*) 属于葡萄科蛇葡萄属藤本植物, 中国特有种, 主要分布在湖南、湖北、贵州等省份, 一直为侗族、苗族和土家族等少数民族常用的茶代用品^[1], 其嫩叶做成茶后俗称“藤

茶”, 用来治疗或者预防多种疾病, 具有抗氧化、降血糖、抗菌消炎、降血压等功效, 据民间流传, 显齿蛇葡萄的主要功能是降血压^[2]。

显齿蛇葡萄叶富含黄酮, 主要包括二氢杨梅素、

收稿日期: 2015-06-12

作者简介: 赵喜兰(1969-), 女, 大学本科, 主要从事药学方面的研究, E-mail: zxl69@163.com。

杨梅素、山奈酚、二氢山奈酚、杨梅素-3-O-L-鼠李糖苷、阿福豆素、1,5,8-三羟基-3-甲氧基酮、槲皮素-3-O- α -L-吡喃鼠李糖苷、杨梅素-3'-O- β -D-吡喃木糖苷、蛇葡萄素、杨梅素-3-O- β -D-葡萄糖苷、紫云英苷、杨梅素-3-O- β -D-半乳糖苷等黄酮类化合物^[9]。其中以二氢杨梅素含量最高^[10]，目前国内外有关显齿蛇葡萄的研究主要集中在成分研究，相关研究还未见报道，本研究以显齿蛇葡萄叶的总黄酮(The flavonoid fraction of *Ampelopsis grossedentata*, TFA)对SHR大鼠进行降血压及其机制研究，为该天然植物的进一步开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

显齿蛇葡萄叶 采集于湖南省康龙自然保护区，经鉴定为葡萄科蛇葡萄属藤本植物，采集的显齿蛇葡萄叶嫩叶洗净，晾干，120℃杀青10 min后60℃烘干粉碎，过60目筛；血管紧张素转换酶(ACE)和马尿酸组胺酰亮氨酸(HHL) Sigma公司；血浆肾素、血管紧张素Ⅱ、内皮缩血管肽放射免疫试剂盒 北京市福瑞生物工程公司；SOD、CAT、NO和MDA试剂盒 南京建成生物科技公司；K⁺、Na⁺和Cl⁻测定试剂盒 北京利德曼生化技术有限公司；依那普利 武汉益生堂药业有限公司生产；其他试剂 均为分析纯。

ALC-NIBP多通道无创伤大鼠尾动脉血压计 上海奥尔科特生物科技有限公司；RA-201旋转蒸发器 上海亚荣仪器设备有限公司；GMJ型全自动放射免疫 γ 计数器 江苏省医疗电子研究所；7170A全自动生化检测仪 日本日立；2450紫外分光光度仪 日本岛津。

1.2 实验动物

自发性高血压大鼠(SHR)40只，雄性，12周龄，体重(200±25)g，清洁级，购于中国医学科学院实验动物研究所，编号：SCKK(京)：2005-0013。清洁级Wistar大鼠40只，雌雄各半，体重(180±25)g，购于河南省实验动物中心，编号：SYXK(豫)2010-0001。在温度(25±2)℃，相对湿度50%±5%，光照时间为每天12 h环境下适应性喂养一周后进行实验。实验过程中均严格按照动物委员会所颁布的实验动物护理和使用指南来进行操作。

1.3 实验方法

1.3.1 TFA的制备和测定

1.3.1.1 TFA的提取和纯化 称取干燥显齿蛇葡萄叶嫩叶5 kg，用60%乙醇浸泡24 h后利用循环式超声波提取仪提取45 min，减压浓缩回收乙醇得浸膏，浸膏80℃的热水溶解后过滤得滤液，上D-101大孔树脂，先用20%的乙醇洗脱去除杂质，再用60%的乙醇洗脱，得总黄酮的乙醇溶液，减压浓缩回收乙醇后烘干粉碎得显齿蛇葡萄叶总黄酮粉末。

1.3.1.2 TFA含量测定的标准曲线的绘制 精密称取在80℃干燥至恒重的槲皮素对照品20 mg，置100 mL容量瓶中，加70%乙醇50 mL，置于水浴上微热使溶解，放冷，加乙醇稀释至刻度，摇匀。使之成为浓度为0.2 mg/mL的槲皮素标准品溶液，精密吸取对照液0、

0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL分别置于25 mL量瓶中，加5%亚硝酸钠溶液1.0 mL，摇匀放置6 min后，加10%氯化铝溶液1.0 mL，摇匀。放置6 min后，加1.0 mol/L NaOH 10 mL，最后各用60%乙醇稀释至刻度，摇匀，放置15 min。用第一瓶作空白，在510 nm处测吸光度，以吸光度(A)作纵坐标，芦丁浓度(C)作横坐标绘制标准曲线，得出回归方程： $A=0.0825C-0.0008$ ($r=0.9996$)。

1.3.1.3 TFA的含量测定 精确称取显齿蛇葡萄总黄酮粉末5.0 g，加乙醇溶解后，用水定容至100 mL的容量瓶中，量取1 mL，参照标准曲线的制作方法测定TFA的含量。

1.3.2 TFA体外降血压研究 分别取300 μ L底物马尿酸组胺酰亮氨酸溶液于5支试管中，向其中的4支管分别加入30 μ L样品溶液，另一只试管作为对照，加入30 μ L蒸馏水。37℃水浴条件下放置5 min。任取一支添加有样液的试管，向其添加250 μ L 1 mol/L HCl溶液。再向5支试管中分别加入100 μ L血管紧张素转换酶溶液，置于涡旋混合器上充分搅拌。在37℃水浴条件下反应60 min。终止反应需向各试管中添加250 μ L 1 mol/L HCl(预先加入的试管除外)，在漩涡混合器上充分搅拌。取1.5 mL乙酸乙酯加入各试管中，涡旋混合器上搅拌约1 min后进行离心分离(3000 r/min, 10 min)。用移液管移取上层溶液(乙酸乙酯层)1 mL，用旋转蒸发器干燥(40~45℃)。再经减压干燥60 min后，用3 mL蒸馏水溶解，228 nm波长处测吸光度。

$$\text{抑制率}(\%) = (A_c - A_s) / (A_c - A_b) \times 100$$

式中： A_s 为试样的吸光度值； A_c 为蒸馏水的吸光度值； A_b 为预先加入盐酸组的吸光度值。

1.3.3 TFA对SHR大鼠的降血压研究 50只SHR大鼠随机分为5组，第Ⅰ组为模型组，第Ⅱ组依那普利组，显齿蛇葡萄叶黄酮低、中、高剂量组，其中模型组给予蒸馏水，剂量为10 g/kg体重。依那普利治疗组每天灌胃依那普利(5 mg/kg体重)，显齿蛇葡萄叶总黄酮低、中、高剂量组分别为100、200、400 mg/kg体重。每2周测定SHR的收缩压(SBP)、舒张压(DBP)，喂养10周后停药，每组取4只SHR大鼠麻醉摘除眼眶取血离心得血清备用，剩下的SHR大鼠继续喂养2周后测量收缩压(SBP)、舒张压(DBP)。同样麻醉摘除眼眶取血离心得血清，用于生化指标的测定。

1.3.4 血清生化指标的测定 采集的血清，采用放射免疫分析法测定血浆肾素(PRA)、血管紧张素Ⅱ(ANGⅡ)、内皮缩血管肽(ET)，根据试剂盒说明用全自动生化检测仪检测超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、NO和丙二醛(MDA)。

1.3.5 TFA长期喂养对正常大鼠的血压影响 Wistar大鼠40只，随机分为4组，第Ⅰ组正常组，每天除基本饲料外喂蒸馏水，第Ⅱ-Ⅳ组分别喂养显齿蛇葡萄叶黄酮剂量为100、200、400 mg/kg体重，每天一次，连续喂养6个月，最后一天测定血压，然后麻醉，摘除眼眶取血离心得血清，采用分光光度法测定血清中K⁺、Na⁺和Cl⁻浓度。

1.3.6 统计学分析 全部数据用SPSS 13.00软件包处理,正态分布的资料以($\bar{x} \pm s$)表示,非正态分布的资料均取自然对数正态化后进行统计分析。以 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 为统计学显著水平。

2 结果与分析

2.1 TFA的含量

显齿蛇葡萄叶嫩叶经60%乙醇浸泡,超声波辅助提取,减压浓缩得1894.5 g浸膏,浸膏经D-101大孔树脂纯化后减压浓缩得浸膏982.6 g,最后测定黄酮的含量为86.4%。

2.2 TFA体外对ACE活性的抑制

采用ACE抑制体外检测方法,利用血管紧张素转换酶水解血管紧张素的体外模拟物马尿酸组氨酸亮氨酸产生马尿酸,然后在228 nm测定吸光值计算马尿酸的含量从而计算ACE抑制剂的活性。测得的抑制率越高,说明降血压能力越强。对显齿蛇葡萄叶黄酮的降血压活性测定的结果见图1。不同剂量的显齿蛇葡萄叶黄酮具有一定的降血压活性,并且随着显齿蛇葡萄叶黄酮浓度的增加,降血压活性逐渐增加。

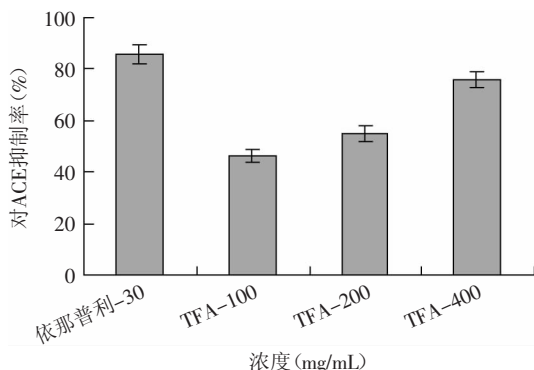


图1 TFA体外对ACE的抑制效果

Fig.1 The inhibitory ration of TFA on ACE

2.3 TFA对SHR大鼠的血压影响

如图2所示,治疗前,SHR大鼠的收缩压在166~175 mmHg之间。舒张压在136~149 mmHg之间。经过不同剂量显齿蛇葡萄叶黄酮和依那普利的治疗后发现,显齿蛇葡萄叶黄酮对SHR的血压都具有一定降低效果,并呈现剂量依赖性,但是效果不如依那普利的降血压效果,停药2周后,依那普利治疗组的血压具有明显的回升,但是显齿蛇葡萄叶黄酮治疗后2周的血压基本维持在停药前。

2.4 TFA对SHR大鼠血清中PRA,ANG II,ET和NO的影响

从图3得知,经过10周的治疗,TFA-100剂量组大鼠血清中的血浆肾素(PRA)、血管紧张素 II (ANG II) 和内皮缩血管肽(ET)的含量相对模型组大鼠的含量没有明显的下降,而TFA-200、TFA-400以及依那普利治疗组血清中的PRA、ANG II有明显的降低,而ET的含量变化不明显,另外,TFA-100剂量组大鼠血清中的NO含量没有明显的升高,而其他治疗组血清中

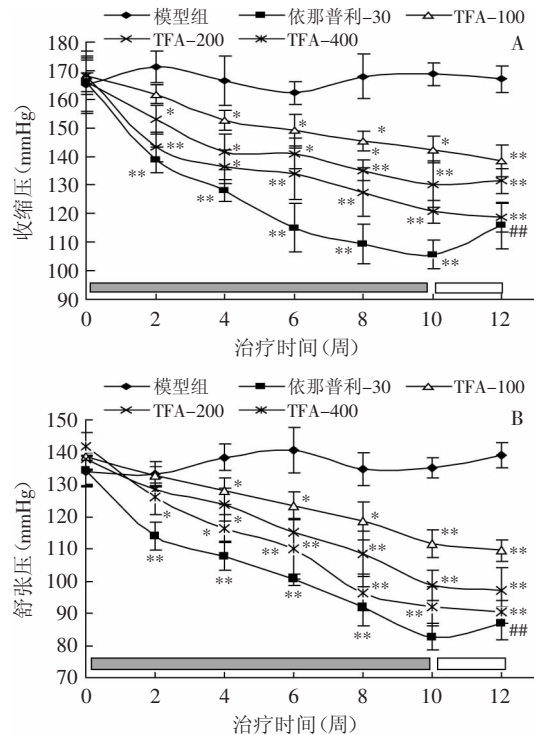


图2 显齿蛇葡萄叶黄酮对SHR大鼠血压的影响($n=10$)

Fig.2 The effect of TFA on blood pressure of the SHRS ($n=10$)

注:与模型组比较,* $p < 0.05$ 表示差异显著,** $p < 0.01$ 表示差异极显著;与各自治疗末比较,# $p < 0.05$ 表示差异显著,## $p < 0.01$ 表示差异极显著;图3、图4同。

的NO含量有明显的提高;经过10周治疗停药2周后发现,依那普利治疗组血清中PRA、ANG II 和ET的含量有明显的升高,而NO含量明显降低,其他治疗组变化不明显。

2.5 TFA对SHR大鼠血清中SOD、CAT、GSH和MDA的影响

从图4可知,经过10周治疗后不同治疗组,除TFA-100外,其他组血清中的SOD、CAT和GSH的含量明显升高,而MDA含量有明显的下降,但是停药2周后依那普利组与治疗末相比,血清中的SOD、CAT、GSH含量明显降低,MDA含量明显升高,其他治疗组无明显的变化。

2.6 TFA对正常大鼠的血压和血清 Na^+ 、 K^+ 和 Cl^- 的影响

从表1可知,喂养不同剂量显齿蛇葡萄叶黄酮6个月,与正常组大鼠比较,不同剂量组大鼠血压没有明显变化,另外测定血清中 Na^+ 、 K^+ 和 Cl^- 的含量发现, Na^+ 的含量没有明显变化,而 K^+ 的含量与正常组大鼠比较有稍微的提高,而 Na^+/K^+ 的比值有变小趋势, Cl^- 的浓度也没有明显的变化。

3 讨论

SHR是一种比较成熟的高血压模型,在药理学和病理学上,已广泛被使用在降血压的相关研究^[5],本研究证明了显齿蛇葡萄叶总黄酮对SHR大鼠的血压具有良好的降血压效果,发现在第二周就有明显的降血压功能,并且该效果至少能维持2周在治疗10

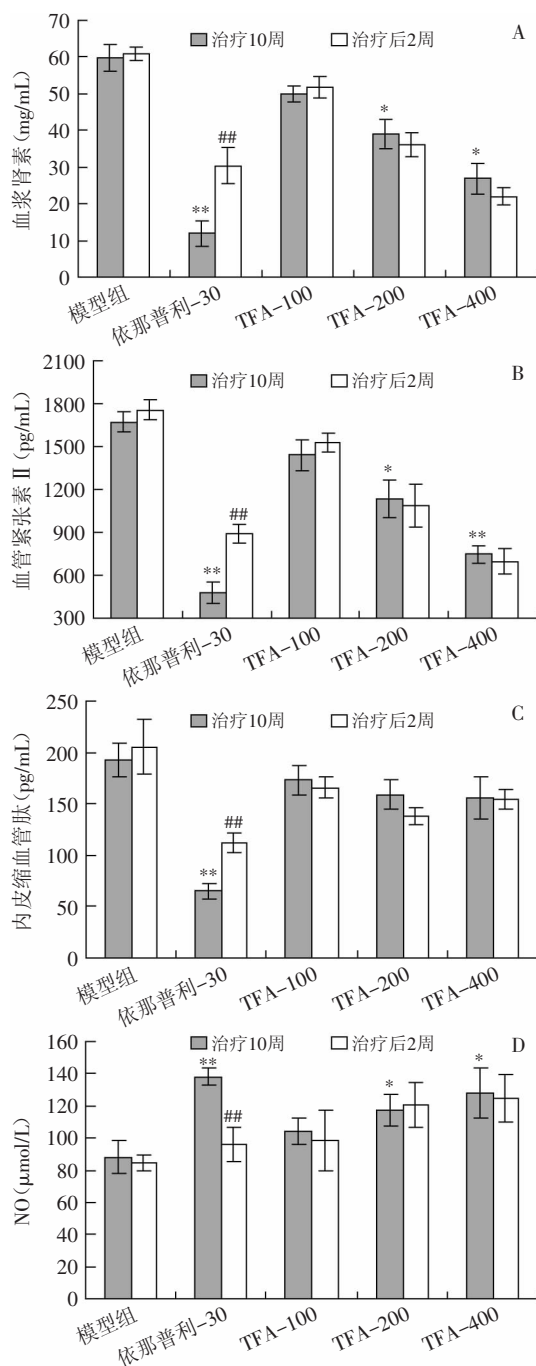


图3 TFA对SHR大鼠血清中PRA, ANG II, ET和NO的影响
Fig.3 The effect of TFA on PRA, ANG II, ET and NO of the SHRS

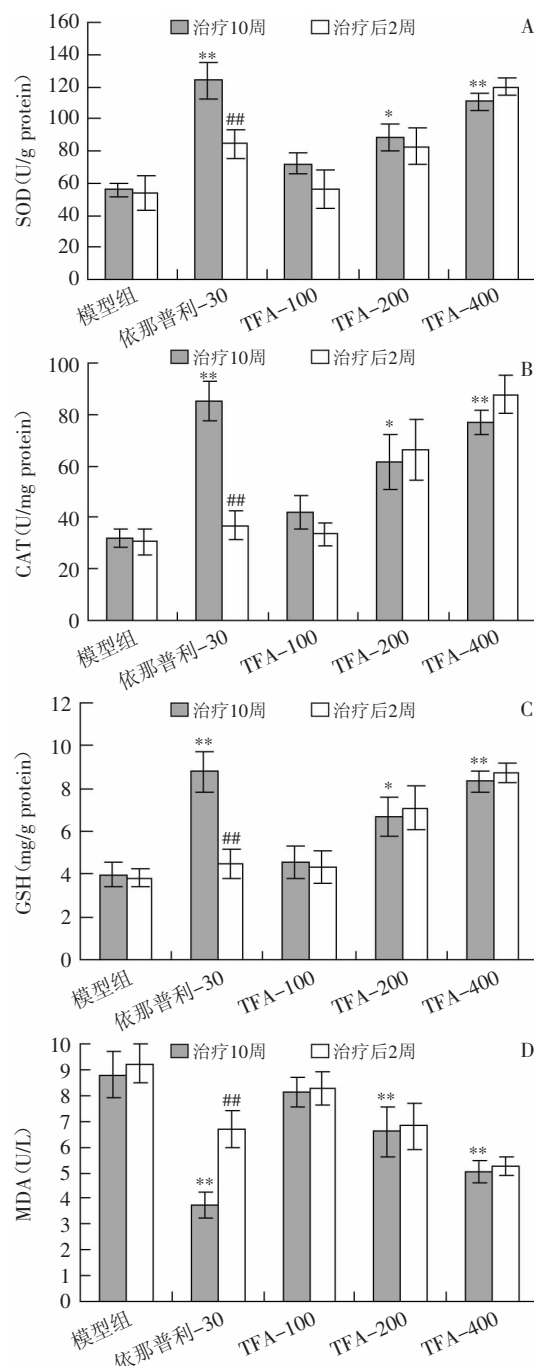


图4 TFA对SHRs大鼠血清中SOD, CAT, GSH 和 MDA的影响
Fig.4 The effect of TFA on plasma SOD, CAT, GSH and MDA of the SHRS

表1 TFA对正常大鼠血压及血清中K⁺, Na⁺和Cl⁻的影响

Table 1 The effect of TFA on the blood pressure, K⁺, Na⁺ and Cl⁻ in normotensive rats

处理	收缩压 (mmHg)	舒张压 (mmHg)	Na ⁺ (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)	Na ⁺ /K ⁺	Cl ⁻ (mmol/L)
正常组	92.3±3.6	68.9±5.6	136.7±1.0	4.2±0.2	32.5±1.2	111.0±0.1
TFA-100	95.3±4.3	72.8±6.6	137.4±2.2	4.6±0.1	29.8±0.8	113.7±0.7
TFA-200	98.6±5.2	73.7±3.3	138.6±4.2	4.7±0.4	29.4±0.6	115.1±0.4
TFA-400	99.4±3.4	78.7±4.7	138.8±1.2	5.0±0.3	27.7±1.2	117.1±0.6

周停药后。通过比较,虽然依那普利治疗组在降低血压、抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统明显优于显齿蛇葡萄叶黄酮,但是本研究发现其本身具有很

大的副作用,在临床上也有明显的报道。尽管显齿蛇葡萄叶黄酮的降血压效果不及依那普利治疗,但是研究发现其基本没有副作用。

肾素-血管紧张素-醛固酮(RAAS)系统在调节体液平衡、电解质和血压起着重要作用。肾素是一种蛋白酶,主要促进生成血管紧张素原和增加血管紧张素 I。血管紧张素 I 可以进一步水解生成血管紧张素 II。在 RAAS 系统,血管紧张素 II 是一个重要组成部分,收缩血管,增加外周阻力,升高动脉血压,调节醛固酮分泌^[6-7]。显齿蛇葡萄叶黄酮不同剂量能够下调肾素血管紧张素 II 的含量,尤其是中剂量和高剂量作用显著,表明显齿蛇葡萄叶黄酮降血压可能是通过调节 RAAS 系统而实现。此外,停药后 2 周发现,血清中的肾素,血管紧张素 II,内皮缩血管肽与依那普利治疗组比较,没有明显的变化,充分说明显齿蛇葡萄叶黄酮在降血压方面没有副作用。

内皮素(ET)由血管内皮细胞分泌,是一种较强的缩血管物质^[8]。而 NO 也被称为内皮依赖性因子,能扩张血管,调节血压,抑制血细胞与内皮细胞的黏附,抑制内皮细胞增殖,从而降低内皮素的分泌。在内皮系统,NO 和内皮素相互制约^[9]。本研究发现显齿蛇葡萄总黄酮能够明显增加 NO 的含量和降低内皮素的含量。

抗氧化系统减弱是一个高血压的主要并发症^[10],高血压使得血管内皮细胞受损,从而产生大量的活性氧(ROS),反过来,ROS 有助于高血压疾病。ROS 水平调制的内源性抗氧化系统,其中 SOD、CAT 和 GSH 是最重要的抗氧化要素。高血压的条件下,水平 SOD、CAT 和 GSH 降低,ROS 水平升高。过多的 ROS 攻击不饱和脂肪酸在细胞膜上,并引起脂质过氧化,从而上调 MDA 含量。因此,血浆 SOD、CAT、GSH 和 MDA 水平反映 ROS 水平^[11]。本研究中显齿蛇葡萄叶黄酮能够明显的上调 SOD、CAT 和 GSH 的含量,并且明显下调血浆 MDA 水平,表明显齿蛇葡萄叶黄酮具有较好的抗氧化活性。并且停药后 2 周, SOD、CAT、GSH 和 MDA 的含量没有明显的变化。

本研究首次证明了显齿蛇葡萄叶黄酮对正常大鼠血压的影响不明显。在侗族地区,显齿蛇葡萄叶作为茶代品使用有千年的历史,主要用来治疗高血压或正常血压人群引用。所以评价长期食用显齿蛇葡萄叶带来的副作用显得尤为重要。本研究发现,经过 6 个月的喂养正常血压大鼠后发现显齿蛇葡萄叶黄酮对血压和主要器官无影响。但增加了血清 K^+ 含量和降低了 Na^+/K^+ 的比值。与大量药理和临床实验相符。适当降低血清中 Na^+ 和提高 K^+ 的含量有利于心血管系统^[12]。

4 结论

利用超声波提取显齿蛇葡萄中的总黄酮,继而

利用大孔树脂进行纯化,得到了较高纯度的显齿蛇葡萄总黄酮,通过喂养 SHR 大鼠后,通过定期测定 SHR 大鼠的舒张压和收缩压,并且在实验末测定与高血压相关生化指标发现显齿蛇葡萄叶黄酮对原发性高血压大鼠具有明显的降血压效果,并且停药后无反弹,另外,利用显齿蛇葡萄总黄酮喂养正常 SD 大鼠 6 个月,发现对正常大鼠的血压没有影响。通过实验可以证明显齿蛇葡萄叶黄酮可以作为天然药物或功能食品来预防高血压是可行的。

参考文献

- [1] 刘建新,周天达. 藤茶的生药学研究[J]. 中草药,1999,30(6):459-463.
- [2] 易诚. 显齿蛇葡萄研究进展[J]. 经济林研究,2004,22(3):51-56.
- [3] 付明,黎晓英,王登宇,等. 显齿蛇葡萄叶中黄酮类化合物的研究[J]. 中国药学杂志,2015,50(7):574-578.
- [4] 田森林,张友胜,杨英雄,等. 反相高效液相色谱法测定显齿蛇葡萄中二氢杨梅素的含量[J]. 湖南农业大学学报,2002,28(1):33-34.
- [5] Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats[J]. Japanese Circulation Journal, 1963(27):282-293.
- [6] Danser AH. Local renin-angiotensin systems[J]. Molecular and Cellular Biology, 1996(157):211-216.
- [7] Hayoz D. Left ventricular hypertrophy and remodelling of resistance arteries: the role of activation of the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertension[J]. Journal of Hypertension, 2002(20):1295-1296.
- [8] Luscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: Therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs[J]. Circulation, 2000(102):2434-2440.
- [9] Barton M, Uscio LV, Shaw S, et al. ETA receptor blockade prevents increased tissue endothelin-1, vascular hypertrophy, and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension[J]. Hypertension, 1998(31):499-504.
- [10] Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms[J]. Hypertension, 2003(42):1075-1081.
- [11] Fukui T, Folz RJ, Landmesser U, et al. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease[J]. Cardiovascular Research, 2002(55):239-249.
- [12] He FJ, MacGregor GA. Fortnightly review: beneficial effects of potassium[J]. British Medical Journal, 2001, 323(7311):497-501.

一套《食品工业科技》在手,
纵观食品工业发展全貌