

柿叶黄酮的降血压作用及其作用机制研究

Antihypertensive Effect and Its Mechanism of Persimmon Leaf Flavonoid

覃斐章,林 兴,张绪东,黄仁彬

QIN Fei-zhang, LIN Xing, ZHANG Xu-dong, HUANG Ren-bin

(广西医科大学药理学教研室,广西南宁 530021)

(Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China)

摘要:用一氧化氮合酶抑制剂 N^G-硝基-L-精氨酸甲酯(N^G-nitro-L-arginine-methylester, L-NAME)复制高血压大鼠模型研究柿叶黄酮对高血压大鼠的降血压作用。试验分为正常对照组、模型对照组,柿叶黄酮低、中、高剂量组(20mg·kg⁻¹·d⁻¹, 40mg·kg⁻¹·d⁻¹, 80mg·kg⁻¹·d⁻¹)、卡托普利组(10 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。每周测大鼠尾动脉压,给药4周后处死大鼠,测定血清中一氧化氮(NO)、血浆内皮素(ET)和血管紧张素(Ang)Ⅱ的含量。结果显示,柿叶黄酮能明显降低 L-NAME 诱导的高血压大鼠的血压($P < 0.05$),并在剂量范围内呈剂量依赖性;与模型对照组相比,血清 NO 含量上升[(77.15±15.14)μmol·L⁻¹ vs (30.77±10.62)μmol·L⁻¹, $P < 0.01$],血浆 ET 含量降低[(56.21±9.23)pg·ml⁻¹ vs (87.28±11.75)pg·ml⁻¹, $P < 0.01$],血浆 Ang Ⅱ 含量降低[(503.4±33.40)pg·ml⁻¹ vs (666.62±33.45)pg·ml⁻¹, $P < 0.01$]。柿叶黄酮可能是通过增加内源性舒血管活性物质的释放和减少内源性收缩血管活性物质的释放来调节两者之间的平衡而发挥其抗高血压作用。

关键词:柿叶黄酮 降血压 高血压

中图分类号:R285 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2009)03-0310-04

Abstract: In order to study hypotensive effects and its mechanism of persimmon leaf flavonoid, hypertensive in rats was induced by L-NAME. Hypertensive rats were induced by NG-vitro-L-arginine-methylester (L-NAME), and were divided into six groups. The normal control group was treated by normal saline, model group was treated by L-NAME alone, Low-, mid-, and high-dose of flavone groups were treated by flavone at the doses of 20, 40 and 80mg·kg⁻¹·d⁻¹, respectively, and captopril group was treated by captopril at dose of 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹. Tail blood pressure was measured every week. Rats were sacrificed to determine serum nitric oxide (NO), plasma endothelin (ET) and angiotension Ⅱ (Ang Ⅱ) after four weeks of treatment. Persimmon leaf flavonoid could decrease the tail blood pressure of rats in a dose dependant manner ($P < 0.05$). Persimmon leaf flavonoid could increase the serum NO (77.15±15.14 vs 30.77±10.62 μmol·L⁻¹, $P < 0.01$), and decrease the plasma ET (56.21±9.23 vs 87.28±11.75 pg·ml⁻¹, $P < 0.01$) and Ang Ⅱ (503.4±33.40 vs 666.62±33.45 pg·ml⁻¹, $P < 0.01$) as compared with model group. It is suggested that persimmon leaf flavonoid may adjust the imbalance of cardiovascular active substances by increasing the release of endogenous vasodilators and reducing the release of endogenous vasoconstrictors, resulting in antihypertention.

Key words: persimmon leaf flavonoid, antihypertension, hypertensive

高血压是我国常见的心血管疾病,在我国发病率高达10%~20%,是危害人类健康的主要疾病。目前寻找安全可靠,不良反应少的降血压药是高血压病的

研究重点。黄酮对心血管系统具有良好的药理学作用^[1]。柿科(Ebenaceae)柿属(*Diospyros* L.)植物柿(*Diospyros kaki* L. f.)的新鲜或干燥叶,具有抗菌消炎、生津止渴、清热解毒、润肺强心、镇咳止血、抗癌防癌等多种保健功能,可以用于治疗冠心病、心绞痛、胃溃疡出血、肺结核出血、功能性子宫出血等内脏出血

收稿日期:2008-11-17

修回日期:2009-01-29

作者简介:覃斐章(1981-),女,硕士研究生,主要从事心血管药理学研究。

证^[2]。目前认为,柿叶的主要有效成分之一就是黄酮类^[3]。本实验用聚酰胺树脂分离提纯富集柿叶黄酮,研究其降血压作用。

1 材料和方法

1.1 仪器

ALC-nibp 无创尾动脉血压测量分析系统(上海奥尔科特有限责任公司出品);722s 型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司出品);SN-682Y 闪烁计数器(上海核福光电仪器有限公司出品)。

1.2 试剂

柿叶黄酮由广西医科大学药理教研室自行制备,新鲜柿叶用 70% 乙醇提取后用乙酸乙酯萃取分离得到一定含量的粗黄酮,然后用聚酰胺树脂吸附分离黄酮类物质,含量达 76%,批号:070502。L-NAME 是美国 Sigma 公司产品。卡托普利是常州制药厂产品,批号:20060611。内皮素(ET)试剂盒和血管紧张素(Ang) II 试剂盒是北京北方生物技术研究所产品,批号:20070429、20070430。NO 试剂盒是南京建成生物工程研究所产品,批号:20070405。

1.3 动物

SD 大鼠 60 只,♂,体重(200±10)g,由广西医科大学实验动物中心提供。

1.4 复制高血压大鼠模型

根据 Sigmon 等^[4]的方法,将 L-NAME 溶于水中(75g·100L⁻¹)连续喂饲 3 周(75mg·kg⁻¹·d⁻¹)复制高血压大鼠模型。

1.5 实验分组及给药

取高血压大鼠 50 只,SD 大鼠 10 只,分为 6 组:柿叶黄酮低剂量组(20 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、柿叶黄酮中剂量组(40 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、柿叶黄酮高剂量组(80 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、卡托普利组(10 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、模型对照组(灌服等容积蒸馏水)、正常对照组(灌服等容积蒸馏水)。每组 10 只,每日给药 1 次,连续给药 4 周。

1.6 指标检测

每周用 ALC-nibp 无创尾动脉血压测量分析系统测量清醒状态下大鼠尾动脉血压。完成血流动力学指标测定后,上述各组动物以戊巴比妥 30mg·kg⁻¹腹腔注射麻醉,迅速从腹主动脉取血,用分光光度法检测血中 NO,放免法测定血浆 ET 和 Ang II 含量,均按说明书操作。

1.7 统计学处理

实验数据采用 SPSS 10.0 软件处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表

示,多组间比较采用方差分析,两均数比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 L-NAME 处理后血压测定值变化

对照组和高血压组在开始实验前(即正常血压值),收缩压(SP)和舒张压(DP)均无显著性差异;高血压组喂饲 L-NAME 3 周后,收缩压(SP)平均升高 46.59% ($P < 0.05$),舒张压(DP)平均升高 42.59% ($P < 0.05$),而对照组 3 周后收缩压和舒张压均无显著性差异。结果见表 1。

表 1 L-NAME 处理 3 周后血压测定值变化(kPa, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 The change of BP induced by treatment with L-NAME for 3 weeks(kPa, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	血压 Blood pressure	正常 Normal	3 周后 3 weeks later
对照组 Control group	SP	13.01±0.70	13.34±0.46
	DP	10.83±0.35	10.99±0.41
高血压组 Hypertension group	SP	12.75±0.87	19.45±0.69* #
	DP	10.79±0.50	15.95±1.04* #

与高血压组的正常血压比较: * $P < 0.05$; 与对照组比较: # $P < 0.05$. vs. normol value in hypertension group; * $P < 0.01$; vs. control group; # $P < 0.05$.

2.2 柿叶黄酮对一氧化氮缺乏性高血压大鼠血压的影响

模型对照组大鼠收缩压(SP)、舒张压(DP)、平均压(MP)与正常对照组相比均明显升高 ($P < 0.01$);连续给药 4 周,卡托普利组与模型对照组相比血压显著降低 ($P < 0.01$);柿叶黄酮高剂量组在给药第 2 周后血压开始出现下降趋势 ($P < 0.05$),柿叶黄酮中、低剂量组在给药第 3 周后血压也开始下降 ($P < 0.05$),柿叶黄酮各剂量组在给药第 4 周后降压作用更为明显,SP、DP、MP 与模型对照组相比显著性下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),柿叶黄酮对血压的降低呈剂量依赖性。结果见表 2。

2.3 柿叶黄酮对一氧化氮缺乏性高血压大鼠血浆 ET, Ang II 及 NO 含量的影响

模型对照组大鼠血浆 ET、Ang II 含量均较对照组明显升高 ($P < 0.01$),NO 含量较正常对照组明显降低 ($P < 0.01$)。给药组各组血浆 ET 和 Ang II 含量较模型对照组有所降低,NO 含量有所升高 ($P < 0.05$)。柿叶黄酮中、高剂量组可以显著升高血清 NO 含量。柿叶黄酮对血浆 ET 和 Ang II 含量的降低及 NO 含量的升高均呈剂量依赖性。结果详见表 3。

表 2 柿叶黄酮对一氧化氮缺乏性高血压大鼠血压的影响(kPa, $\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of persimmon leaf flavonoid on BP of L-NAME induced hypertensive in rats (kPa, $\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Group	血压 Blood pressure	给药前 Before treatment	给药 1 周后 One week after administration	给药 2 周后 Two weeks after administration	给药 3 周后 Three weeks after administration	给药 4 周后 Four weeks after administration
正常对照组 Normal control group	SP	13.01±0.70	12.71±0.61	13.01±0.56	12.80±0.57	13.14±0.46
	DP	10.83±0.85	10.64±0.73	10.71±0.92	10.91±0.58	10.79±0.82
	MP	11.44±0.82	11.22±0.93	11.36±0.75	11.42±0.60	11.46±0.95
模型对照组 Model group	SP	19.41±0.71*	19.57±0.65*	20.09±0.94*	19.86±0.90*	19.45±0.69*
	DP	15.95±1.04*	16.01±0.95*	15.88±0.85*	16.05±0.74*	15.92±1.05*
	MP	16.93±0.47*	17.02±0.94*	17.11±0.86*	17.14±0.91*	16.93±0.55*
卡托普利组 Captopril group	SP	19.64±0.70	15.23±0.77##	15.02±0.73##	14.88±0.73##	14.93±0.59##
	DP	15.85±0.96	11.84±0.94##	11.64±0.83##	11.50±0.74##	11.65±0.55##
	MP	16.94±0.77	12.84±0.73##	12.64±1.08##	12.50±1.15##	12.62±0.65##
黄酮低剂量组 Low dosage of flavonoid	SP	19.68±1.11	19.37±1.20	19.12±0.93	18.79±1.19	18.12±1.10#
	DP	16.02±0.81	15.70±0.91	15.44±0.83	14.38±0.51#	13.50±0.60#
	MP	17.07±0.90	16.75±0.57	16.50±0.88	15.69±0.72	14.89±0.71#
黄酮中剂量组 Medium dosage of flavonoid	SP	19.32±1.16	19.00±1.22	18.75±1.08	17.81±0.88#	17.06±1.15#
	DP	15.74±0.77	15.45±0.63	15.22±0.87	14.11±0.80#	12.70±0.75#
	MP	16.74±0.96	16.47±0.75	16.23±0.64	15.20±0.93	14.02±0.69##
黄酮高剂量组 High dosage of flavonoid	SP	19.17±0.9	18.77±1.07	18.04±0.75#	17.06±0.48##	16.08±0.65##
	DP	16.09±0.85	15.62±0.90	13.93±0.50#	13.01±0.69##	12.05±0.79##
	MP	16.95±1.07	16.50±0.48	15.12±0.54#	14.22±0.70#	13.26±0.54##

与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。vs. the normal control group; * $P < 0.01$; vs. model group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

表 3 柿叶黄酮对一氧化氮缺乏性高血压大鼠血浆 ET、Ang II 及 NO 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effects of persimmon leaf flavonoid on the levels of ET, Ang II and NO in L-NAME induced hypertensive in rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Group	ET 含量 ET content (pg · ml ⁻¹)	Ang II 含量 Ang II content (pg · ml ⁻¹)	NO 含量 NO content (μmol · L ⁻¹)
正常对照组 Normal control	16.45±6.05	177.98±35.68	105.45±19.53
模型对照组 Model group	87.28±11.75*	666.62±33.45*	30.77±10.62*
卡托普利组 Captopril group	19.57±8.25##	189.97±38.45##	82.81±16.86##
黄酮低剂量组 Low dosage of flavonoid	70.91±15.05#	592.81±29.21#	42.79±11.85#
黄酮中剂量组 Medium dosage of flavonoid	66.35±9.45#	570.82±30.78#	62.00±11.85#
黄酮高剂量组 High dosage of flavonoid	56.21±9.23##	503.45±33.40##	77.15±15.14##

与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。vs. normal control group; * $P < 0.01$; vs. model group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

3 讨论

应用一氧化氮合成酶抑制剂 L-NAME 复制高血压大鼠模型,该方法简单易行,连续喂饲 L-NAME 3 周后即可形成稳定的高血压^[5]。在本实验中,与对照组相比,高血压组收缩压和舒张压明显升高 ($P < 0.05$) 和持续而稳定的高血压表明造模成功。给药 1 月,给药组各组大鼠的尾动脉血压较模型对照组明显

降低 ($P < 0.05$),而且在给药剂量范围内呈剂量依赖性。表明柿叶黄酮及卡托普利在给药后均具有良好的降血压作用。

血管内皮细胞既可以产生收缩血管物质,也能产生舒张血管物质,在维系血管舒缩平衡、正常张力中起着重要作用^[6]。NO 是内皮细胞释放的主要舒血管物质,除可以直接舒张血管外,还可以通过阻断 Ang II 对近曲小管钠的重吸收及降低胞内 cAMP 影响肾

脏对水盐的重吸收和滤过,抑制肾小球旁细胞分泌等作用调节血压^[7];此外,NO还可以使血管平滑肌细胞处于细胞增殖静止状态抗血管壁增殖^[8]。ET是由血管内皮分泌的缩血管多肽,是目前已知缩血管作用最强最持久的细胞因子,且具有很强大的促进平滑肌增殖的作用^[9]。目前认为,血管壁中还存在着持久作用的促生长因子,如Ang II^[10]。Ang II除了产生血管收缩效益导致血压增高外,也能促进血管增殖,产生心脏血管重构效应^[11]。Ang II、ET、NO之间相互联系,相互影响。ET有血管紧张素转化酶活性^[12],可以催化合成Ang II,而Ang II可诱导内皮细胞ET基因表达增强^[13],故ET和Ang II可以相互促进。Ang II与NO除具有相反的血管紧张度外,在高血压动物模型中也存在相反的血管和细胞增殖反应^[14]。ET和NO是一对具有拮抗作用的血管活性物质,它们在生物学效应和生物合成方面有相互调节作用,它们之间的动态平衡维持着血管的正常张力^[9]。本实验结果显示,模型对照组大鼠血压明显升高,血清NO水平降低,ET水平显著升高,这与鄢定红等^[15]研究结果一致。经柿叶黄酮治疗后,大鼠血清NO水平显著升高,血浆ET和Ang II水平降低,提示柿叶黄酮的降压作用可能与促进血管内源性舒血管物质的释放及抑制内源性缩血管物质的释放,调节体内两者的平衡状态有关,其确切的降压机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] 吴立军. 天然药物化学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2003:177-178.
 [2] 林娇芬,林河通,谢联辉,等. 柿叶的化学成分、药理作用、临床应用及开发利用[J]. 食品与发酵工业,2005,31(7):90.
 [3] 谭仁祥. 植物成分分析[M]. 北京:科学出版社,2002:486-502.
 [4] Sigmon D H,Beierwaltes W. Nitric oxide influence blood flow distribution in renovascular hypertension [J]. Hypertens,1994,24(Suppl1):34-39.
 [5] Toda N,Ayajiki K,Okamura T. Neural mechanism underlying basilar arterial constriction by intracisternal L-NNA in anesthetized dogs [J]. Am-J-Physiology,

1993,265(1 Pt 2):103-107.
 [6] 凌湘力,罗雄,贺志光. 黄芪活血汤对糖尿病大鼠ET、NO影响的实验研究[J]. 贵阳中医学院学报,2007,29(6):14.
 [7] Granger J,Novak J,Schnackenberg C,et al. Role of renal nerves in mediating the hypertensive effects of nitric oxide synthesis inhibition[J]. Hypertens,1996,27(3 Pt 2):613-617.
 [8] Gibba S M. Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide[J]. Mol Neurobiol,2003,27(2):107-120.
 [9] Yanagisawa M,Kuihara H,Kimura S. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cell[J]. Nature,1998,332:411.
 [10] Sadoshima J,Izumo S. Autocrine secretion of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro[J]. Contrib Nephrol,1996,118:214-221.
 [11] Diez J,Panizo A,Hernandez M,et al. Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats [J]. Hypertension,1997,30:1029-1034.
 [12] Fakhouri F,Placier S,Tharoux P I. Angiotensin II interacts with endothelin and TGF- β to produce activation of collagen type I gene in renal and aortic vasculature of transgenic mice[J]. J AM Soc Nephrol,2001,12:2710-2711.
 [13] 郑晓明,吴寿领,高竟生,等. 正心泰对急性心肌梗死家兔心肌及血管内皮细胞一氧化氮合酶、内皮素基因表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2004,11(3):145-147.
 [14] Dubey R K,Overbeck H W. Culture of rat mesenteric arteriolar smooth muscle cells:effects of platelet-derived growth factor,angiotensin,and nitric oxide on growth [J]. Cell Tissue Res,1994,275(1):133-141.
 [15] 鄢定红,程晓曙,王雪梅,等. 一氧化氮缺乏在高血压及心血管重构中的作用[J]. 高血压杂志,2002,8(4):349-354.

(责任编辑:邓大玉)