

· 实验研究 ·

# 清达颗粒通过 p38 MAPK 通路抑制大鼠高血压 心肌肥厚的作用机制研究<sup>※</sup>

王天一<sup>1</sup> 祁江晗<sup>1</sup> 张珊苑<sup>1</sup> 何晨晨<sup>1</sup> 褚剑锋<sup>1,2▲</sup>

**摘要 目的:**探讨清达颗粒抑制高血压心肌肥厚的作用机制。**方法:**将12只5 w龄雄性自发性高血压大鼠随机分为模型组、清达颗粒组,每组6只,选取6只雄性同周龄正常血压大鼠作为对照组。清达颗粒组按0.9 g/(kg·d)给予清达颗粒干预,对照组和模型组给予等量生理盐水干预,每日1次,连续8 w。监测大鼠血压和体重,观察各组大鼠心脏重量指数、心脏收缩功能和病理形态、心房钠尿肽(ANP)、脑利钠肽(BNP)的mRNA和蛋白的表达变化,以及p38 MPAK通路相关蛋白的活化。**结果:**干预8 w后,与模型组比较,清达颗粒组大鼠血压显著降低( $P<0.05$ ),心脏收缩功能显著改善( $P<0.05$ ),心脏重量指数显著降低( $P<0.05$ ),心肌纤维增粗肿胀、排列紊乱、溶解断裂、炎症细胞浸润等病理情况明显改善,心脏组织ANP、BNP的mRNA和蛋白的表达显著降低( $P<0.05$ ),心脏组织p-p38/p38 MPAK蛋白的表达显著降低( $P<0.05$ )。**结论:**清达颗粒通过p38 MPAK通路抑制高血压心肌肥厚。

**关键词** 清达颗粒;高血压心肌肥厚;自发性高血压大鼠;p38 MAPK

心脏是高血压最常见的靶器官损害之一,长期高血压导致心肌细胞代偿性增殖,间质细胞分泌增多<sup>[1-2]</sup>,导致心肌肥厚和间质纤维化,最终发生心室重构<sup>[3]</sup>。因此,降低血压、抑制心肌肥厚的发生发展是防治高血压心肌肥厚的有效途径,是降低其他心血管疾病患病率和死亡率的关键所在。p38丝裂原活化蛋白激酶(p-38 Mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,调控细胞增殖与肥大<sup>[4]</sup>,充当“信息开关”的作用,对心肌肥厚有着非常重要的作用<sup>[5]</sup>。

清达颗粒由天麻、钩藤、黄芩和莲子心组成,全方共奏平肝潜阳、清泄心火的功效,是陈可冀院士临床经验方,主要用于治疗新发1级高血压,临床疗效显著。课题组前期研究发现,清达颗粒可以降低多种高血压动物模型的血压,在改善高血压导致的心肌肥厚及心肌纤维化,抑制心室重构等方面疗效显著<sup>[6-9]</sup>,但

具体机制尚未阐明。本实验评估了清达颗粒对自发性高血压大鼠血压、心脏收缩功能和形态学、心脏重量指数、心肌肥厚指标的影响,验证了清达颗粒通过p38 MAPK通路抑制高血压心肌肥厚的机制,为清达颗粒降低血压、改善心肌肥厚提供了实验依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 动物** 12只5 w龄无特定病原体(Specific Pathogen Free, SPF)级雄性自发性高血压大鼠(Spontaneously Hypertensive Rat, SHR),6只同周龄正常血压(Wistar-Kyoto, WKY)大鼠,由北京维通利华实验动物技术有限公司购入,动物许可证号为SCXK(京)2019-0009。动物饲养于福建中医药大学医学实验动物中心[SYXK(闽)2009-0001],自由进食、饮水,饲养温度与相对湿度恒定,昼夜交替时间各为12 h。

**1.2 药品与试剂** 清达颗粒由江阴天江药业提供(批号:1704306);苏木素染色液(批号:G1140)、伊红染色液(批号:G1100)购买于北京索莱宝科技有限公司;异氟烷(批号:970-00026-00)购买于深圳瑞沃德生命科技有限公司;组织总RNA提取试剂盒(批号:RE-03011)、逆转录试剂盒(批号:RT-01021)、qRT-PCR试剂盒(批号:QP-01011)购买于FOREGENE公司;ANP抗体(批号:PA5-79758)、BNP抗体(批号:

※基金项目 国家自然科学基金项目(No.81774135);福建省自然科学基金项目(No.2018J01884);福建省卫健委医学创新人才项目(No.2018-CX-42)

▲通信作者 褚剑锋,男,教授。研究方向:中西医结合心血管病基础与临床研究。E-mail:jianfengchu@126.com

• 作者单位 1.福建中医药大学中西医结合研究院(福建福州350100);2.福建省中西医结合老年性疾病重点实验室(福建福州350100)

PA5-96084)、BCA 蛋白定量分析试剂盒(批号:23227)购买于美国 Thermo Fisher Scientific 公司;p-p38 MAPK 抗体(批号:4511S)、p38 MAPK(批号:8690S)、羊抗兔二抗(批号:7074S)购买于美国 CST 公司;GAPDH 抗体(批号:10494-1-AP)购买于美国 Proteintech 公司;其他试剂购买于上海碧云天及美国 MCE 公司。

**1.3 仪器** Kent Scientific CODA 八通道无创血压测量仪(美国 Kent Scientific 公司);Vero2100 超高分辨率小动物彩色超声多普勒成像系统(加拿大 Visual Sonics 公司);生物自动脱水仪及石蜡包埋机(湖北孝感亚光医用电子技术有限公司);全自动石蜡切片机(德国 Leica 公司);Nanodrop One 分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);DM4000B 显微镜(德国 Leica 公司);ChemiDoc MP Bio-Rad 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);7500 Real time-PCR 仪(美国 ABI 公司)。

**1.4 动物分组与给药** 适应性喂养 1 w 后,将自发性高血压大鼠随机分为模型组(SHR 组)和清达颗粒组(SHR+QDG 组),每组 6 只;6 只同周龄 WKY 大鼠作为对照组(WKY 组)。清达颗粒组按照 0.9 g/(kg·d)将清达颗粒加入一定比例生理盐水溶解,给予灌胃给药;对照组和模型组给予等体积生理盐水,每日 1 次,连续 8 w。

**1.5 无创尾动脉加压法测量血压** 每周固定同一时间,采用无创尾动脉加压法测量血压,记录每只大鼠清醒状态下尾动脉的收缩压(Systolic blood pressure, SBP)、舒张压(Diastolic blood pressure, DBP)和平均动脉压(Mean arterial pressure, MAP),连续监测 8 w。

**1.6 超声心动图检测** 末次给药后,剔除胸部毛发,异氟烷吸入麻醉,采用 Vero 2100 成像系统检测大鼠心脏收缩功能变化。将探头置于大鼠胸骨左缘,通过 M 型心动图测量关键指标,计算左心室射血分数(left ventricle ejection fractions, LVEF)和左室短轴缩短率(left ventricle fractional shortening, LVFS),取连续 3 个周期测量的平均值作为最终结果。

**1.7 心脏重量指数计算** 经腹主动脉取血后取出大鼠心脏,切除心耳,清洗干净后,水平方向横切为三部分,中间部分置于 4% 多聚甲醛固定液中,心尖部分置于 -80 °C 超低温冰箱保存。称量大鼠体重(body weight, BW),测量大鼠胫骨长度(tibial length, TL),计算得出大鼠心脏重量指数(Heart Weight Index, HWI)。计算公式:HWI=BW/TL。

**1.8 HE 染色实验** 48 h 后,将放置于 4% 的多聚甲醛固定液中的心脏组织,经脱水包埋后,采用全自动石蜡切片机制备 4 μm 石蜡切片,将切片脱蜡,用于苏木精-伊红(HE)染色,封片后在显微镜下拍摄。

**1.9 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative reverse transcription, qRT-PCR)检测心脏组织心房钠尿肽(Atrial natriuretic peptide, ANP)、脑利钠肽(Brain natriuretic peptide, BNP)的 mRNA 表达** 提取各组大鼠心脏组织 mRNA,逆转录纯化的 mRNA,合成 cDNA。根据说明书进行 qRT-PCR 分析。以 GAPDH 为内参,引物序列见表 1。采用 2<sup>-ΔCt</sup> 相对定量方法进行数据分析:ΔCt(实验组/对照组)=Ct(实验组/对照组目标基因)-Ct(实验组/对照日内参基因)。

表 1 mRNA 引物序列

基因名称	序列
ANP-F(Rat)	GCTCCCAGGCCATATTGGAG
ANP-R(Rat)	CTTCATCGGTCTGCTCGCTC
BNP-F(Rat)	TCAAAGGACCAAGGCCCTAC
BNP-R(Rat)	TAAAACAACCTCAGCCCGTC
GAPDH-F(Rat)	ACGGCAAGTCAACGGCACAG
GAPDH-R(Rat)	GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC

**1.10 Western Blot 检测心脏组织 ANP、BNP、p38 MPAK 以及 p-p38 MPAK 蛋白的表达** 取出 -80 °C 保存的心脏组织,每 100 mg 加入 1 mL Western 及 IP 裂解液(裂解液中含有 1×Cocktail、1×Phosstop 和 10×PMSF),震荡涡旋、裂解、离心后,取上清液,采用 BCA 法定量蛋白浓度。配制 SDS-PAGE 凝胶,固定于电泳槽中,恒压 90 v,30 min;120 v,1 h 进行电泳。将凝胶放入转膜夹,在转膜槽中恒压 110 V 转膜。封闭后按照说明书稀释比例分别孵育一抗(ANP、BNP、p38 MPAK、p-p38 MPAK)、羊抗兔二抗后,使用 Image Lab 凝胶成像系统进行曝光,应用 Image J 软件进行定量分析。

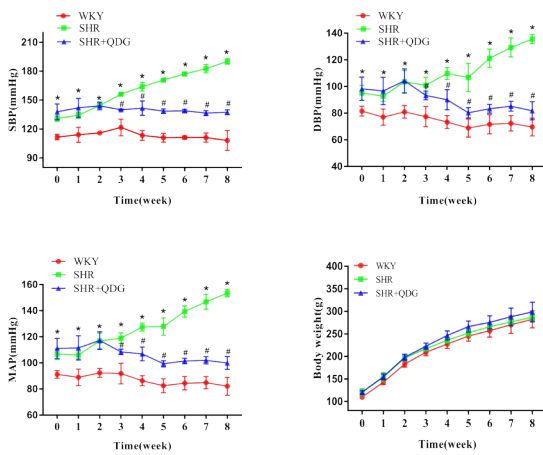
**1.11 统计学方法** 采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据处理,所有数值均表示为平均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ ),两组比较时,首先判断是否符合正态分布,符合时采用 t 检验;三组比较时,同样先判断是否符合正态分布,符合时采用单因素方差分析。不符合正态分布时,采用非参数检验。 $P < 0.05$  表明差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 清达颗粒对自发性高血压大鼠血压和体重的影响** 每周血压监测发现,与 WKY 组相比,SHR 组

SBP、DBP 和 MAP 均显著升高( $P<0.05$ )。给药第 3 w 开始,与 SHR 组相比,SHR+QDG 组 SBP、DBP 和 MAP 均显著降低( $P<0.05$ )。同时,每周称量体重发现清达颗粒对大鼠体重无明显影响( $P>0.05$ )。结果表明,清达颗粒降低自发性高血压大鼠血压且对体重无影响。见图 1。

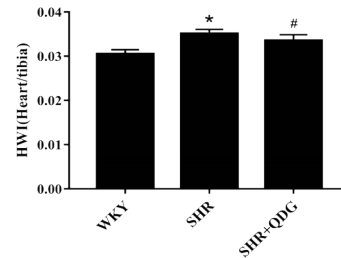
## 2.2 清达颗粒对自发性高血压大鼠心脏重量指数的影响



与 WKY 组相比,  $^*P<0.05$ ; 与 SHR 组相比,  $^{\#}P<0.05$

图 1 清达颗粒对自发性高血压大鼠血压和体重的影响

影响 计算各组大鼠心脏重量指数,即心脏重量与胫骨长度的比值。与 WKY 组相比,SHR 组心脏重量指数显著升高( $P<0.05$ );与 SHR 组相比,SHR+QDG 组心脏重量指数显著降低( $P<0.05$ )。结果表明,清达颗粒可以降低自发性高血压大鼠心脏重量指数。见图 2。

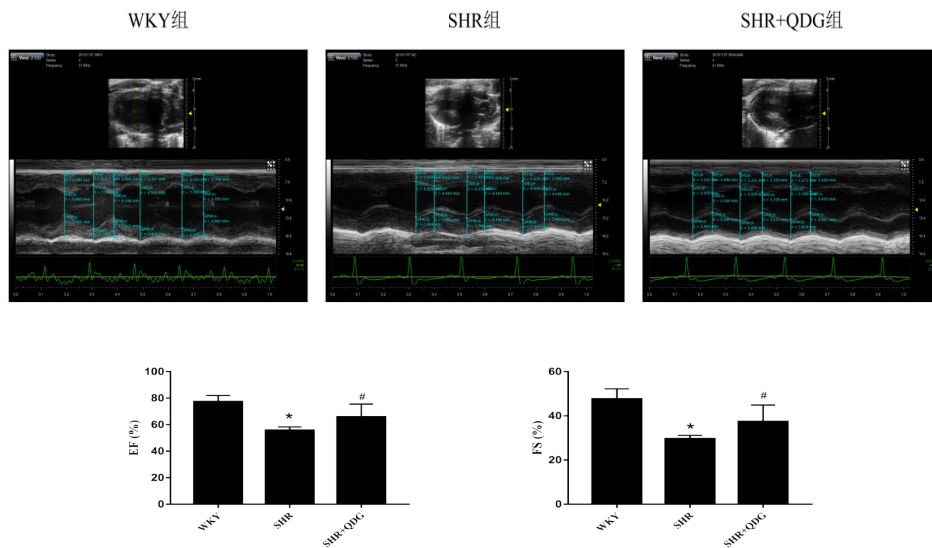


与 WKY 组相比,  $^*P<0.05$ ; 与 SHR 组相比,  $^{\#}P<0.05$

图 2 清达颗粒对自发性高血压大鼠心脏重量指数的影响

## 2.3 清达颗粒对自发性高血压大鼠心脏收缩功能的影响

灌胃 8 w 后,超声心动图显示,与 WKY 组相比,SHR 组射血分数、短轴缩短率显著降低( $P<0.05$ );与 SHR 组相比,SHR+QDG 组可以显著抑制射血分数、短轴缩短率的降低( $P<0.05$ )。结果表明,清达颗粒可以改善自发性高血压大鼠心脏收缩功能。见图 3。



与 WKY 组相比,  $^*P<0.05$ ; 与 SHR 组相比,  $^{\#}P<0.05$

图 3 清达颗粒对自发性高血压大鼠心脏收缩功能的影响

2.4 清达颗粒对自发性高血压大鼠心脏组织病理变化的影响 心脏组织 HE 染色可发现,WKY 组大鼠心肌纤维排列整齐;SHR 组心肌纤维增粗肿胀、排列紊乱,心肌细胞束出现溶解断裂、炎性细胞浸润;SHR+

QDG 组可显著改善上述病理形态改变。结果表明,清达颗粒可以改善自发性高血压大鼠心脏病理形态的变化。见图 4。

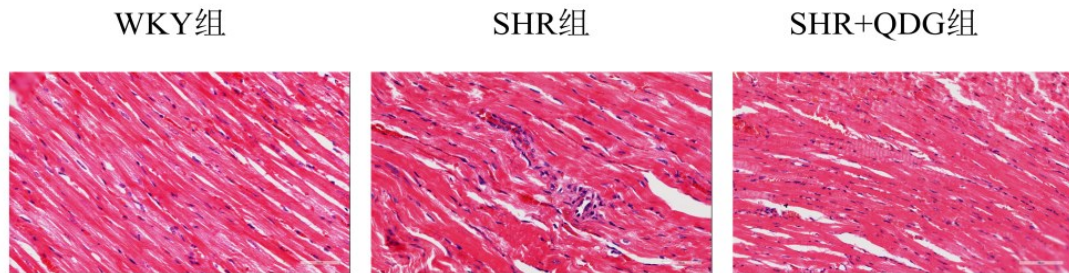
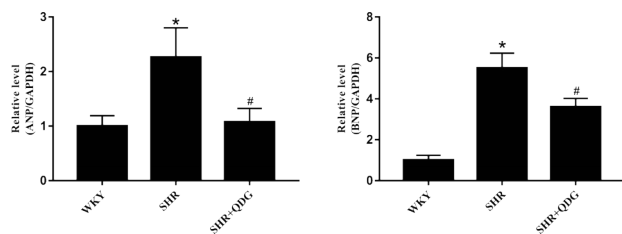


图4 清达颗粒对自发性高血压大鼠心脏病理形态的影响(HE,400×)

**2.5 清达颗粒对自发性高血压大鼠心脏组织 ANP、BNP 的 mRNA 及蛋白表达的影响** 经 qRT-PCR 和 Westren Blot 检测心脏组织 ANP、BNP 的表达发现,与 WKY 组相比,SHR 组心脏组织 ANP、BNP 的 mRNA 和蛋白水平显著升高( $P<0.05$ );与 SHR 组相比,SHR+QDG 组可显著降低 ANP、BNP 的 mRNA 和蛋白水平的表达( $P<0.05$ )。结果表明,清达颗粒可以降低心肌肥厚基因 ANP、BNP 的 mRNA 和蛋白的表达。见图 5-1 及图 5-2。



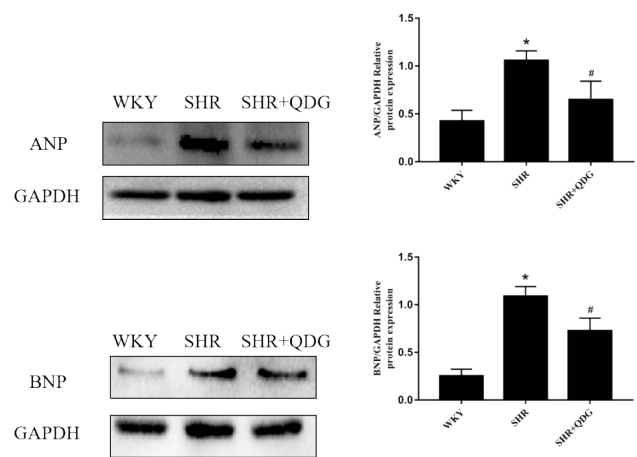
与 WKY 组相比, \* $P<0.05$ ; 与 SHR 组相比, # $P<0.05$

图 5-1 清达颗粒对自发性高血压大鼠心脏组织 ANP、BNP mRNA 的影响

**2.6 清达颗粒对自发性高血压大鼠心脏组织 p38 MAPK 通路相关蛋白表达的影响** 与 WKY 组相比, SHR 组 p-p38/p38 蛋白表达显著升高( $P<0.05$ );与 SHR 组相比,SHR+QDG 组 p-p38/p38 蛋白表达显著降低( $P<0.05$ )。结果表明,清达颗粒可以抑制自发性高血压大鼠心脏 p38 MAPK 通路相关蛋白的活化。见图 6。

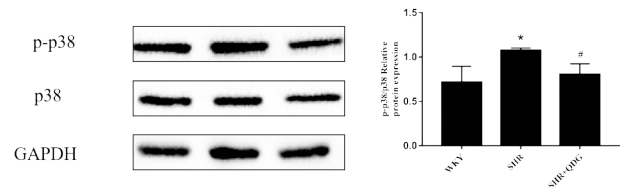
### 3 讨论

现代医学研究表明,高血压心脏病的特点是以心肌细胞的肥大和间质细胞的增殖为主,不仅使心肌细



与 WKY 组相比, \* $P<0.05$ ; 与 SHR 组相比, # $P<0.05$

图 5-2 清达颗粒对自发性高血压大鼠心脏组织 ANP、BNP 蛋白表达的影响



与 WKY 组相比, \* $P<0.05$ ; 与 SHR 组相比, # $P<0.05$

图 6 清达颗粒对自发性高血压大鼠心脏组织 p38 MAPK 通路相关蛋白表达的影响

胞面积增大,而且激活肥厚基因,是心血管事件的独立危险因素<sup>[10-12]</sup>。心肌肥厚特异性因子 ANP 是心肌细胞肥厚的反应指标<sup>[13]</sup>,在 SHR 心脏组织 ANP 的 mRNA 表达较 WKY 显著升高,并且随高血压的发生、发展而相应增加<sup>[14]</sup>,同时,胚胎基因 BNP 的表达在心肌肥厚过程中也明显增加<sup>[15]</sup>。本实验发现,清达颗粒可显著降低心脏组织 ANP、BNP 的 mRNA 和蛋白的表达,改

善心脏功能及心脏组织病理变化,提示清达颗粒可以抑制自发性高血压大鼠心肌肥厚。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,调控细胞增殖与肥大<sup>[4]</sup>。p38 MAPK作为MAPK家族的主要成员,参与细胞增殖和凋亡、心肌肥厚及能量代谢等<sup>[16]</sup>,在应激刺激引起的心肌细胞肥大中具有重要作用<sup>[17]</sup>。一方面,活化的p38 MAPK激活下游细胞质蛋白和转录因子进而介导肥大信号转导;另一方面,p38 MAPK的激活直接导致心肌肥厚标志物如ANP、BNP启动子的活化。Wu等<sup>[18]</sup>发现减弱p38 MAPK的激活可以改善压力超负荷引起的心脏重构和心脏功能;Hui等<sup>[19]</sup>发现抑制p38 MAPK可显著改善病理性心肌肥厚;血管紧张素Ⅱ干预的大鼠心肌细胞肥厚模型中,抑制p38 MAPK信号通路可以抑制心肌肥厚标志物的表达水平,改善心肌肥厚<sup>[20]</sup>。

前期研究发现,清达颗粒对多种高血压动物模型作用显著,既可以降低血压,又可以保护高血压导致的靶器官损害,在改善高血压导致的心肌肥厚及心肌纤维化,抑制心室重构等方面疗效显著<sup>[6-9]</sup>。多次重复体内实验发现清达颗粒以0.9 g/(kg·d)的给药剂量时,对自发性高血压大鼠的降压效果最为显著<sup>[21-22]</sup>,因而本次实验选择0.9g/(kg·d)的给药剂量。本实验通过Western Blot验证了清达颗粒对p38 MAPK通路相关蛋白活化的影响,结果发现,清达颗粒可以显著降低心脏组织p-p38/p38的表达,抑制p38 MAPK通路的活化,初步验证了清达颗粒通过p38 MAPK通路抑制高血压心肌肥厚的机制。

## 参考文献

[1] NAKAMURA M, SADOSHIMA J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15 (7) : 387-407.

[2] OLDFIELD C J, DUHAMEL T A, DHALLA N S. Mechanisms for the transition from physiological to pathological cardiac hypertrophy [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2020, 98(2):74-84.

[3] SHIMIZU I, MINAMINO T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 97:245-62.

[4] WANG J, LIU K, WANG H, et al. Role of nifedipine and hydrochlorothiazide in MAPK activation and vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis [J]. *Herz*, 2017, 42(6):573-584.

[5] DANIEL P M, FILIZ G, TYMMS M J, et al. Intratumor MAPK and PI3K signaling pathway heterogeneity in glioblastoma tissue correlates with CREB signaling and distinct target gene signatures [J]. *Exp Mol Pathol*,

2018, 105(1):23-31.

[6] 包丽亚,王 怀,周雪玲,等.清达颗粒对自发性高血压大鼠心脏超声指标及病理学形态的影响[J].*中西医结合心脑血管病杂志*,2019,17(1):54-59.

[7] 王 怀,包丽亚,周雪玲,等.高血压心脏局部炎症反应与清达颗粒干预实验研究[J].*中西医结合心脑血管病杂志*,2019,17(2):183-186.

[8] 王 怀.基于MCP-1/CCR2信号通路研究清达颗粒对自发性高血压大鼠心脏炎症的影响及作用机制[D].福州:福建中医药大学,2019.

[9] 包丽亚.基于PPAR- $\alpha$ /PGC-1 $\alpha$ 信号通路研究清达颗粒对SHR心肌脂肪酸 $\beta$ 氧化的影响及作用机制[D].福州:福建中医药大学,2019.

[10] LU J, LU Y, WANG X, et al. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in China: data from 1.7 million adults in a population-based screening study (China PEACE Million Persons Project) [J]. *Lancet*, 2017, 390(10112):2549-2558.

[11] MOHAMED I N, HELMS P J, SIMPSON C R, et al. Using routinely collected prescribing data to determine drug persistence for the purpose of pharmacovigilance [J]. *J Clin Pharmacol*, 2011, 51(2):279-284.

[12] YANG J, LU F, ZHANG C, et al. Prevalence of prehypertension and hypertension in a Chinese rural area from 1991 to 2007 [J]. *Hypertens Res*, 2010, 33(4):331-7.

[13] 张 凤,周广海,王 尧,等.心房钠利尿剂与心肌肥大的关系[J].*中华高血压杂志*,2008,16(8):763-766.

[14] 王阿慧,孙晓鸥,刘 青,等.西地那非对主动脉弓缩窄诱导大鼠心肌肥大的保护作用[J].*广东药学院学报*,2016,32(4):475-480.

[15] 罗 漫,吴晓云,郑 敏,等.心肌细胞肥大过程中心脏发育相关转录因子及下游心脏肥大标志基因的时序性表达规律研究[J].*解放军医学杂志*,2017,42(5):394-401.

[16] WANG Y. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases [J]. *Circulation*, 2007, 116(12):1413-1423.

[17] 赵晓彬.血管紧张素(1-7)经p38MAPK途径逆转心肌肥厚的作用机制研究[D].天津:天津医科大学,2020.

[18] WU L, MEI L, CHONG L, et al. Olmesartan ameliorates pressure overload-induced cardiac remodeling through inhibition of TAK1/p38 signaling in mice [J]. *Life Sci*, 2016, 145:121-126.

[19] HUI X, HU F, LIU J, et al. FBXW5 acts as a negative regulator of pathological cardiac hypertrophy by decreasing the TAK1 signaling to pro-hypertrophic members of the MAPK signaling pathway [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2021, 151:31-43.

[20] CHEN Y, YAO F, CHEN S, et al. Endogenous BNP attenuates cardiomyocyte hypertrophy induced by Ang II via p38 MAPK/Smad signaling [J]. *Pharmazie*, 2014, 69(11):833-7.

[21] CHEN X, LONG L, CHENG Y, et al. Qingda granule attenuates cardiac fibrosis via suppression of the TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 signaling pathway in vitro and in vivo [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137:111318.

[22] WU X, SHEN A, BAO L, et al. Qingda granules attenuate hypertensive cardiac remodeling and inflammation in spontaneously hypertensive rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129:110367.

(收稿日期:2022-10-22)

(本文编辑:蒋艺芬)