

編號：CCMP92-RD-005

併用黃耆萃取物對 Atenolol 降血壓作用的影響

洪宏杰

中國醫藥大學中醫系

摘 要

本計劃的主要目的為探討黃耆 (*Astragalus membranaceus*) 萃取物對 β -blocker 類藥物 (atenolol) 的降血壓效果的影響，是否有加成或拮抗的作用。此外，本實驗也評估黃耆本身及其精抽物 γ -aminobutyric acid 對血壓的調控作用，並深入探討其作用機轉。實驗方法為以先天性高血壓鼠為實驗模型來模擬人類高血壓的形成，觀察黃耆萃取物及 γ -aminobutyric acid (黃耆精抽物) 對 atenolol 降血壓作用的影響。並以正常血壓鼠 WKY 作對照組。此外為了了解其中交互作用的機轉，本實驗在併用黃耆萃取物或 γ -aminobutyric 和 atenolol 後，觀測其血管反應性、血漿中 nitrate 濃度以及胸主動脈中 eNOS 及 iNOS 蛋白質表現量變化，以期能更了解黃耆萃取物及 γ -aminobutyric acid (黃耆精抽物) 的藥理作用以及與 atenolol 之交互作用機轉，作為臨床醫師用藥的參考。

結果顯示靜脈注射給予高血壓大鼠及一般血壓鼠黃耆粗抽物 (10 mg/kg) 後，30 分鐘後注射給予 atenolol (20 mg/kg)，其降血壓作用明顯降低。此結果顯示黃耆粗抽物會干擾 atenolol 的降血壓作用。靜脈注射給予 γ -aminobutyric acid 後也會顯著的影響到 atenolol 的降血壓作用。這個結果指出黃耆干擾 atenolol 降血壓作用可能和黃耆所含有的 γ -aminobutyric acid 有關。此外，每天餵食黃耆 (1 g/kg) 或生理食鹽水一星期後，連續餵食 atenolol 3 天，觀察 atenolol 的降血壓作用，餵食黃耆組與生理食鹽水組間並沒有顯著差異。這個結果顯示黃耆對 atenolol 降血壓作用的干擾作用要在給予時間間隔很近時才會發生。此外，黃耆粗抽物以及其成份 γ -aminobutyric acid 本身都有明顯的降血壓作用。更進一步在血管實驗觀察中顯示，黃耆粗抽物可以明顯增加血管反應性，尤其可以

增加血管的內皮功能，值得注意的是 γ -aminobutyric acid 並無將強血管內皮功能的結果，進一步的研究則顯示增強血管內皮功能可能與其增加血管中的 eNOS 蛋白質有關。

結論是黃耆及所含 γ -aminobutyric acid 都可以明顯降低血壓，但 γ -aminobutyric acid 無法加強其內皮功能。黃耆本身的降血壓作用，除了與其成分 γ -aminobutyric acid 有關外，還有與增加 eNOS 蛋白質，進而增強血管內皮功能有關。若是同時給予黃耆與 atenolol，則黃耆會明顯的干擾 atenolol 降血壓作用。故由實驗結果建議黃耆可以在高血壓患者中使用，但與 atenolol 避免同時服用，以免互相干擾。此外，黃耆的加強內皮功能作用與所含 γ -aminobutyric acid 並無明顯的關聯性，此作用是由黃耆的何種成分導致，有待進一步的研究探討。

關鍵詞：自發性高血壓鼠、黃耆、atenolol

Number : CCMP92-RD-005

The influence of Astragalus Membranaceus on the antihypertensive effect of atenolol in spontaneously hypertensive rats.

Hong-Jye Hong

China Medical University

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the influence of Astragalus membranaceus on the anti-hypertensive effect of β -blocker drug, such as atenolol, in spontaneously hypertensive rats. In this study, the spontaneously hypertensive rats were chosen to simulate the development of hypertension. The WKY rats were used as control group. The influences of the extraction of Astragalus membranaceus, and aminobutyric acid (a chemical compound of Astragalus membranaceus), on the effect of atenolol in SHR and WKY were observed. In addition, to further clarify the mechanisms involved, the vascular reactivity determination, the plasma nitrate levels, and the eNOS (endothelial nitric oxide synthase) and iNOS (inducible nitric oxide synthase) expression of aorta, were investigated. We believe this study will be contributive to clarify the pharmacological effects of Astragalus membranaceus and aminobutyric acid. Moreover, the interactions between Astragalus membranaceus and atenolol will be further comprehended.

SHR and WKY were treated with Astragalus membranaceus (10mg/kg i.v.). Atenolol (20 mg/kg) was treated in SHR and WKY 30 minutes later. Results demonstrated that Astragalus membranaceus significantly suppressed the blood

pressure decrease induced by atenolol. Moreover, γ -aminobutyric acid also significantly suppressed blood pressure decrease induced by atenolol. This indicated γ -aminobutyric acid may be involved in the effect of Astragalus membranaceus.

Next, SHR and WKY were treated with Astragalus membranaceus (1 g/kg per day) for seven days. Atenolol was treated in SHR and WKY for 3 days. The blood pressure decrease effect of atenolol was not influenced by Astragalus membranaceus or γ -aminobutyric acid. This indicated that the interaction of Astragalus membranaceus and atenolol only occurred when these two drugs were treated at the same time. Furthermore, results also demonstrated that Astragalus membranaceus and γ -aminobutyric acid had potent blood pressure decrease effect. The in vitro study also demonstrated that Astragalus membranaceus could significantly improve the vascular endothelial function. However, γ -aminobutyric acid could not affect the vascular endothelial function. Similarly, Western blotting assay demonstrated that Astragalus membranaceus but not γ -aminobutyric acid significantly increase the eNOS expression.

In conclusion, Astragalus membranaceus and γ -aminobutyric have potent blood pressure decrease effect. γ -aminobutyric could not improve the vascular endothelial function. However, the effect of Astragalus membranaceus may be mediate by improve the vascular endothelial function and increase the eNOS expression.

Keywords: Astragalus membranaceus, atenolol, spontaneously hypertensive rats

壹、前言

根據行政院衛生署 89 年的統計資料顯示，國人十大死因中：腦血管疾病與心臟疾病分別占第二與第三位。這兩種循環系統疾病都與高血壓有密切的關聯性。此外，排名第七位的腎變性疾病也和高血壓有關。由此可見高血壓嚴重的影響國人健康。高血壓為老年人常見疾病，對人體的影響是全身性且具破壞性，幾乎沒有一個器官可以倖免，常伴隨著腎臟、心臟及血管結構上的病變，可能造成末端血管疾病，如腎臟衰竭、心臟衰竭以及冠狀動脈疾病等 (Kaplan, 1991; Sharma et al., 1999)，此外，高血壓常會引發一些致死率很高的疾病，如：心肌梗塞、缺血性腦中風及末梢血管阻塞等疾病 (James, 1997; Rubattu et al., 2000; Weir, 1999)。值得一提的是，高血壓往往在在疾病末期才出現症狀，發現症狀時，往往已經對器官產生不可挽回的傷害，臨床上也發現，及早發現高血壓並加以控制血壓，對於減少心血管疾病，有莫大的助益。 β -blocker 類藥物如：atenolol 常被用來控制血壓，在臨床上有良好的效果。但在中醫系統中，黃耆常被用在血管疾病上，早在 1973 年，就有學者提出黃耆萃取物及 γ -aminobutyric acid (黃耆精抽物) 有明顯的舒張血管效果 (山西藥品標準辦公室)，在 1993 年，Lei 提出研究報告顯示黃耆在心血管系統上有良好的保護效果 (Lei, 1993)。此外，在 1998 年，Miller 更進一步指出，黃耆對心血管系統功能的保護作用可能來自其抗氧化作用 (Miller, 1998)。還有，在 2000 年 Zhou 等學者發現黃耆注射液對心血管的保護作用可能與 NOS 系統有關 (Zhou, et al., 2000)。臨床上，大劑量黃耆常被用於高血壓以及相關併發症之治療，民間習用之補陽還五湯中黃耆劑量更是高達 4 兩，加上高血壓患者常表現疲倦等氣虛證，黃耆是國人常用保健中藥，因此與西藥尤其是降血壓藥 atenolol 併用機會甚高。但是卻沒有併用黃耆與 atenolol 有關其交互作用的文獻報告，因此，我們認為應評估併用黃耆與 atenolol 是否對血壓的調控有加成或拮抗效果，並進一步評估黃耆對些血壓的調控機轉，也進一步分析黃耆單獨使用以及併用 atenolol 對動物體內氧游離基以及 NOS 系統的影響，並進而分析其對 eNOS 以及 iNOS 的蛋白以及核酸表現，如此不但能作為臨床醫生對黃耆與 atenolol 併用的參考，也能進一步瞭解黃耆的作用機轉，使我們了解黃耆的藥理作用並能讓西方國家也能接受黃耆為一種有效的心血管保護藥。

貳、材料與方法

* 實驗方法與步驟：

藥物基源與藥物製備

本實驗使用之黃耆為豆科植物膜莢黃耆 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的乾燥根。黃耆基源鑑定，委由順天科學中藥廠附屬台灣必安研究所執行。取膜莢黃耆 80 克，第一次先以 10 倍藥材之水浸泡 1 小時後，以大火將水煮開後轉小火再煮 60 分鐘，將煮好之藥汁倒出後，接著同樣再加入 10 倍藥材之水煮第二次，大火將水煮開後轉小火再煮 50 分鐘。將兩次煮完的藥汁以傾析法與藥渣分離，再以 200 篩過濾，濾液以旋轉式蒸發的方式濃縮，將旋轉式濃縮機的溫度設為 50C，轉速 120 rpm，再以真空減壓濃縮的方式濃縮成 80ml 濃縮液，使濃縮液最後濃度為每 1 克黃耆生藥/ml 以便於給藥。 γ -aminobutyric acid 為黃耆的成分之一，有明顯的舒張血壓效果，一般相信黃耆對高血壓的效果主要來自於此，因此，本實驗也測試 γ -aminobutyric acid 與 atenolol 的交互作用。

實驗動物

本實驗採用週齡為 12 週，體重 250-350 克之雄性 SHR 及 WKY 大鼠來進行實驗。大鼠的原始來源為 Charles River Breeding Laboratory (Tokyo, Japan)。大鼠擬由國家科學委員會所屬國家實驗動物繁殖及研究中心 (National Laboratory Council, Taiwan) 購買。動物飼養在乾淨的塑膠盒內，維持恆定的室溫 23±1C，溼度 55±5%，光暗週期 12/12 小時。

實驗分組

以三個月大已形成高血壓之先天性高血壓公鼠為實驗對象，分為四組，每組 10 隻。(第一組)：給予 atenolol (10 mg/kg, ip) 每日注射三次，之後一個星期內每日以非侵入式尾壓測量法測量一次血壓，觀察 atenolol 對先天性高血壓鼠的降血壓作用。(第二組)：同時給予 atenolol 以及黃耆萃取物，觀察黃耆萃取物對 β -blocker 藥物降血壓作用長期影響。(第三組)：單獨給予黃耆萃取物。(第四組)：未投與任何藥物作為對照組。此外，正常血壓鼠 (WKY) 也如上述分成 4 組進行實驗最為參照。

血壓的測量

1. 非侵入式尾壓測量法：使用自動血壓偵測系統（UR-5000, UEDA, Tokyo Japan）以尾部脈波描記法（tail cuff method），測量清醒動物的血壓及心跳。
2. 侵入式測量法：對動物實行手術，以充有肝素的聚乙烯導管（PE-50）作股動脈插管，將之連到張力轉換器，另利用血壓搏動連於心跳監測器可紀錄其心跳。

離體胸主動脈血管環對藥物之反應性測定

動物麻醉後，剪開胸腔，迅速分離並取出胸主動脈，置於充有 95% 的氧及 5% 的二氧化碳之 Krebs' 溶液（單位為 mM: NaCl 118, KCl 4.7, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2 MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, glucose 11）中，隨後將胸主動脈上的結締組織與脂肪去除，剪成 3-4 mm 的血管環，用一對 S 型白金鉤穿過血管環，將其懸掛於含有 20 ml Krebs' 溶液的組織恆溫槽中，維持固定溫度 37C，並充以 95% 的氧及 5% 的二氧化碳的混和氣。白金鉤一端固定於組織恆溫槽中，另一端則接於 Grass FTO3 力能轉換器（force-displacement transducer），由多項紀錄器紀錄其張力。

血漿中 nitrate 濃度測定

動物採血後，以 9000 rpm 離心，取上清血漿 50 μ l，加入 95% 酒精 100 μ l 充分混何反應後離心去除期中蛋白質，取上清液 10 μ l 注入充滿強力還原劑 VCl₃ 的反應槽中，並保持 95C 恆溫，如此血漿中的 nitrite 及 nitrate 都會被還原成 NO。再以鈍性氣體（氬氣）將 NO 帶入一氧化氮分析儀（NO Chemiluminescence analyzer, Model 270B, Sievers Co. Ltd）中與臭氧反應。偵測反應後釋出波長 600nm 以上冷光，並以 NaNO₂ 作標準曲線。對照後可得 nitrate 濃度。

測量 iNOS 及 eNOS 的蛋白表現（西方墨點分析法）

The aortic vessels were homogenated and then centrifuged at 3000g for 20 min at 48C. Twenty mg of each sample was diluted in sodium dodecylsulfate (SDS)-treated buffer and heated to 95 C for 5 min. Gels were run at 200 V for 40 min and then transferred to nitrocellulose at 15 V for 16 h with the transfer buffer (1.2 g Tris[hydroxymethyl]aminomethane, 57.6 glycine, 3200 ml H₂O and 800 ml methanol). Membranes were treated with 5% non-fat-milk for 1 h then probed with mouse anti-iNOS and anti-eNOS (Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky,

U.S.A.) and rabbit anti-nitrotyrosine (Upstate Biotechnology, Saranac Lake, NY, U.S.A.) 1 mg ml 71 overnight at 48C. The blot was washed three times with TTBS (0.01 M Tris, 0.15 M NaCl, 0.1% Tween 20) and then incubated for 1.5 h with secondary antibody, goat anti-mouse and anti-rabbit-horseradish peroxidase, conjugated (1 : 3000). The blot was washed three times with TTBS, then 1.5 ml mixed ECL chemiluminescence was added for 1 min. The blot was then exposed to X-ray film for 5 min (Chou et al., 1998).

分析方法

數值以平均值 (mean) + 標準誤差 (standard error) 來表示。N 代表取樣數目。本實驗使用 two-way ANOVA 來分析資料，當兩組之間有顯著差異時，使用 Newman-Keul 作事後比較。P 值小於 0.05 代表有顯著的差異存在。

參、結果

1. 黃耆萃取物及 γ -aminobutyric acid (黃耆精抽物) 對 atenolol 降血壓作用短期影響。

將自發性高血壓大鼠 (SHR) 及一般血壓鼠 (WKY) 分為控制組、黃耆萃取物組以及 γ -aminobutyric acid 組。將動物股動脈插管，以侵入式測量法精確測量者血壓其血壓變化。股靜脈插管以便給藥。先分別給予生理食鹽水、黃耆萃取物 (1 g/kg) 以及 γ -aminobutyric acid (100 mg/kg)，30 分鐘後腹腔注射 atenolol (20 mg/kg)，觀察血壓變化 30 分鐘。結果顯示黃耆萃取物與 γ -aminobutyric acid 本身及有明顯的降血壓作用，控制組則無明顯變化 (見圖 1A)。此外，圖 1B 顯示黃耆萃取物組以及 γ -aminobutyric acid 組的 atenolol 降血壓反應較控制組明顯降低。此結果顯示同時給予黃耆萃取物或 γ -aminobutyric acid 與 atenolol 會對 atenolol 降血壓作用有明顯的影響。

2. 黃耆萃取物及 γ -aminobutyric acid (黃耆精抽物) 對 atenolol 降血壓作用長期影響。

將自發性高血壓大鼠 (SHR) 及一般血壓鼠 (WKY) 分為控制組、黃耆萃取物組以及 γ -aminobutyric acid 組。每日定時以口服方式分別給予生理食鹽水、黃耆萃取物以及 γ -aminobutyric acid 一次。連續 7 天。每天以非侵入式尾壓脈波測量法測量其血壓。圖 2B 顯示長期服用黃耆或是 γ -aminobutyric acid 皆有明顯的降血壓反應。之後給予 atenolol 餵食 3 天，觀察其血壓變化百分比。結果顯示三組之間不無顯著差異。見圖 2B。

3. 黃耆萃取物及 γ -aminobutyric acid (黃耆精抽物) 對血管反應性的影響。

將自發性高血壓大鼠 (SHR) 及一般血壓鼠 (WKY) 分為控制組、黃耆萃取物組以及 γ -aminobutyric acid 組。每日定時以口服方式分別給予生理食鹽水、黃耆萃取物以及 γ -aminobutyric acid 一次。連續 7 天。之後將大鼠胸主動脈取出，接上張力轉換器，觀測其張力變化。先以正腎上腺素 (10-5M) 使血管收縮，再加入不同濃度的乙醯膽鹼 (10-8M~10-5M)，觀察其血管對乙醯膽鹼的反應性 (如圖 3)。結果顯示黃耆萃取物組織組大鼠之血管對乙醯膽鹼的反應性明顯較其他兩組高。此結果代表黃耆萃取物可明顯增加自發性高血壓大鼠 (SHR) 及一般血壓鼠 (WKY) 的血管內皮功能。

4. 黃耆萃取物及 γ -aminobutyric acid (黃耆精抽物) 對血漿中 nitrate 的濃度變化的影響。

將自發性高血壓大鼠 (SHR) 及一般血壓鼠 (WKY) 分為控制組、黃耆萃取物組以及 γ -aminobutyric acid 組。每日定時以口服方式分別給予生理食鹽水、黃耆萃取物以及 γ -aminobutyric acid 一次。連續 7 天。之後將大鼠抽血，離心後取上清液，將之去蛋白後測量其血中 nitrate 的濃度。圖 4 顯示在自發性高血壓鼠中，黃耆萃取物組血中 nitrate 的濃度明顯較控制組低。而控制組與 γ -aminobutyric acid 組之間則無明顯差異。在正常血壓鼠中，控制組、黃耆萃取物組以及 γ -aminobutyric acid 組三組之間無顯著差異。

5. 黃耆萃取物及 γ -aminobutyric acid(黃耆精抽物)對胸主動脈中 eNOS 及 iNOS 蛋白質表現。

將自發性高血壓大鼠 (SHR) 及一般血壓鼠 (WKY) 分為控制組、黃耆萃取物組以及 γ -aminobutyric acid 組。每日定時以口服方式分別給予生理食鹽水、黃耆萃取物以及 γ -aminobutyric acid 一次。連續 7 天。之後取胸主動脈，研磨萃取其中蛋白質，測量其中 eNOS 及 iNOS 蛋白質表現。圖 5A 顯示無論在自發性高血壓鼠或者是正常血壓鼠中，黃耆萃取物組大鼠之胸主動脈 eNOS 蛋白質表現明顯較控制組以及 γ -aminobutyric acid 組為高。圖 5B 則顯示在自發性高血壓鼠中黃耆萃取物組大鼠之胸主動脈 eNOS 蛋白質表現明顯較控制組以及 γ -aminobutyric acid 組為低。而在正常血壓鼠中，三組之間則無顯著差異。

肆、討論

由於黃耆為民間常用補氣藥，且為藥膳中常用之藥品。而高血壓患者常有氣虛症狀，因此兩者並用的機率大。故本實驗主要在探討黃耆與常用第一線降血壓藥物 atenolol 間的交互作用。實驗中顯示，兩者同時給藥，黃耆會明顯的抑制 atenolol 的降血壓作用。服用黃耆一周後，再服用 atenolol 三天，觀察 atenolol 的降血壓作用。發現控制組與給予黃耆組兩組之間的 atenolol 的降血壓作用並無明顯差異。此結果顯示不同時給予黃耆與 atenolol 時，黃耆對 atenolol 的降血壓作用並無明顯影響。此外，文獻以及本實驗中都證實黃耆本身就有明顯的降血壓作用，本實驗也探討了黃耆此降血壓作用的作用機轉。證實黃耆的降血壓作用可能和其中所含 γ -aminobutyric acid 有關。但 γ -aminobutyric acid 並不能完全代表黃耆的降血壓作用 (1)，結果顯示黃耆的降血壓作用，至少有部分是透過增強血管內皮功能，增加血管內皮中的 eNOS 蛋白質的表現所導致。而 γ -aminobutyric acid 對血管內皮功能並無明顯作用。

在先天性高血壓大鼠中，原本體內的血管內皮功能就較正常血壓鼠差，這也是自發性高血壓鼠血壓會不斷上升的原因之一。最近的研究報告指出，其血管內皮功能受損的原因可能與自發性高血壓大鼠的免疫系統異常有關，免疫系統異常造成自發性高血壓大鼠體內產生過量的 NO，這可由自發性高血壓大鼠血中含有較多的 nitrate 而得到證實。研究報告也指出過量的 NO 可能是造成血管內皮損傷，進而功能受損的因素之一。這種現象隨大鼠年齡變大而越發明顯。故這種現象也可以視為一種老化現象。而古籍以及一般相關研究都指出黃耆可能有抗老化作用。這與本實驗結果相符合。故由實驗結果推論，黃耆改善血管內皮功能可能有部分是透過減少其血管平滑肌內的誘導性一氧化氮合成酶的合成，進而減少過量一氧化氮產生有關。

伍、結論與建議

故由實驗結果得知，黃耆本身就有明顯的降血壓作用，此作用途徑有二：一、黃耆所含 γ -aminobutyric acid 有明顯的降血壓作用。二、黃耆有明顯的擴張血管作用，此作用與增加內皮功能，增加血管內皮中的 eNOS 蛋白質的表現有關。故一般人或是高血壓患者服用黃耆都是有益的。但黃耆服用時間若與降血壓藥物 atenolol 同時服藥，則黃耆會干擾 atenolol 的降血壓作用。服藥時間若是錯開，則黃耆對 atenolol 的降血壓作用沒有影響，故建議避免中西藥物黃耆與 atenolol 同時服用。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP92-RD-005 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. 山西藥品標準辦公室. 山西醫藥雜誌. (5~6) : 55, 1974.
2. Kaplan NM. Treating hypertension to prevent coronary disease. *Cleveland Clin. J. Med.* 58: 432-443, 1991.
3. Sharma BK, Sharma N, Jain S. Hypertension and the kidneys-inter-relationship and therapeutic approach. *J. Indian Chem. Soc.* 97: 91-95, 1999.
4. James TN. Complex causes of fatal myocardial infarction. *Circulation* 96:1696-1700, 1997.
5. Rubattu S, Giliberti R, Volpe M. Etiology and pathophysiology of stroke as a complex trait. *Am. J. Hypertens.* 13:1139-1148, 2000.
6. Weir MR. Indicators and treatment of hypertensive heart disease. *Hospital Practice (Office Edition)* 34:93-94, 99-100, 103-104, 1999.
7. Lei ZY. Effect of Astragalus Membranaceus on cardiovascular system. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 13(7): 443-446, 1993.
8. Miller AL. Botanical influences on cardiovascular disease. *Altern Med Rev* 3(6): 422-31, 1998.
9. Zhou S, Shao W, Zhang W. Clinical study of Astragalus injection plus ligustrazine in protecting myocardial ischemia reperfusion injury. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 20(7): 504-7, 2000.

[\(5-07 圖\)--CCMP92-RD-005.doc](#)