

肉苁蓉苯乙醇苷对慢性高原病模型大鼠的治疗作用及机制研究

曙丽盼·木拉提, 江荣松, 张伟怡*, 陶义存*

新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830000

摘要:通过测定血液红细胞数、血红蛋白含量、红细胞比容、肺组织匀浆液中内皮素-1 (endothelin-1, ET-1)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 含量、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 活力以及过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR- α)、缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1 α) 及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) mRNA 水平和蛋白表达的变化, 探究肉苁蓉苯乙醇苷 (phenylethanoid glycosides from cistanche, PhGCs) 对慢性高原病 (chronic mountain sickness, CMS) 模型大鼠的治疗作用及作用机制。结果显示, 与模型组大鼠相比, PhGCs 和大花红景天能降低 CMS 大鼠右心室肥厚和 ET-1 含量、升高 NO 含量和总一氧化氮合酶 (total nitric oxide synthase, T-NOS)、内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 酶活力, 下调肺组织 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白的表达, 上调 PPAR- α 蛋白的表达, 同时降低肺组织中 HIF-1 α 的 mRNA 水平; 此外, 大鼠血液红细胞数、血红蛋白含量及红细胞比容无明显变化。该研究表明 PhGCs 可能是通过抑制 HIF 通路、激活 NO 通路发挥作用。

关键词:肉苁蓉苯乙醇苷; 慢性高原病; 低氧诱导因子通路

中图分类号: R961.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)4-0648-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.4.012

Therapeutic effect and mechanism of cistanche phenylethanoid glycosides on chronic altitude disease model rats

SHULIPAN · Mulati, JIANG Rong-song, ZHANG Wei-yi*, TAO Yi-cun*

School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

Abstract: To observe the therapeutic effect and mechanism of phenylethanoid glycosides from cistanche (PhGCs) on chronic mountain sickness (CMS) model rats, the red blood corpuscle, hemoglobin, hematocrit value, endothelin-1 (ET-1), and nitric oxide (NO) content, nitric oxide synthase (NOS) enzyme activity, the expression and mRNA levels of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- α), hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor (VEGF) in the homogenate of lung tissue were measured. Results showed that PhGCs and Rhodiola rosea can reduce the right ventricular hypertrophy and the ET-1 content, increase the NO content and the enzyme activity of total nitric oxide synthase (T-NOS), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), inducible nitric oxide synthase (iNOS), down-regulate the expression and mRNA levels of HIF-1 α and VEGF, up-regulate the expression of PPAR- α in the homogenate of lung tissue of CMS; furthermore, the red blood corpuscle, hemoglobin and hematocrit value had no significant changes compared with rats in model group. In this study, it was confirmed that PhGCs inhibit HIF pathways and activate NO pathways.

Key words: phenylethanoid glycosides from cistanche; chronic mountain sickness; hypoxia-inducible factor pathway

高原病是由于人体对高原低压性缺氧不适应, 导致机体病理生理上一系列改变而引起的各种临床表现的总称。该病一般分为急性和慢性两类, 慢性

高原病 (chronic mountain sickness, CMS) 指原有急性高原病症状迁延不愈或抵高原后半年以上方发病者^[1,2]。研究人员发现藏族人群 Egl 9 同源物 1 (Egl nine homolog 1, EGLN1) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR- α) 两种基因异于低海拔地区人群, 能够抑制藏族人群中血红蛋白, 使血红蛋白保持在低

收稿日期: 2022-09-01

接受日期: 2022-10-02

基金项目: 新疆省天然药物有效成分与释放技术重点实验室基金 (XJDX1713)

* 通信作者 E-mail: taoyicun001@126.com, zwy13132150812@163.com

浓度,这也是藏族人能够在高海拔生存的部分原因^[3]。该研究认为上述两个基因是低氧反应通路上的候选基因,最终通过缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1 α) 通路发挥作用^[4]。其中 EGLN1 为 HIF-1 α 的上游基因,而 PPAR- α 则是 HIF-1 α 的下游靶标^[5]。

低氧能阻断 HIF-1 α 的羟基化和乙酰化,增加其稳定性,通过调控下游众多基因如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)^[6]、内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 等的转录和表达来实现诱导基因转录信息传递,从而引起肺血管重塑,进一步导致肺水肿和高原心脏病^[6,7]。与 ET-1 作用相反,一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是由一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 催化 L-精氨酸产生,作用广泛的气体信息分子^[7,8]。

本研究采用西北特殊环境人工实验舱模拟高原低氧环境,综合考虑高原与平原地区主要差异因素,建立高原病动物模型,研究 HIF-1 α 通路在高原病的发病中的作用及内在联系,并在此基础上观察肉苁蓉苯乙醇苷 (phenylethanoid glycosides from *Cistanche*, PhGCs) 对高原病的防治作用及其作用机制,为研究高原病发病机制和开发新的抗高原病药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 主要试剂

大花红景天口服液 (西藏藏药集团股份有限公司,货号:120503); PhGCs (杏辉天力药业有限公司,货号 120401); ET-1 试剂盒 (北京北方生物技术研究,货号:131002); 免疫组化染色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司,货号:SP-9000); HIF-1 α (Lot No: L4895)、PPAR- α (Lot No: L7389) 以及 VEGF (Lot No: G2201) 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology。

1.1.2 主要仪器

西北特殊环境人工实验舱 (贵州风雷航空军械有限责任公司, DY-2); 光学显微镜 (日本 Nikon, E200); 组织切片机 (德国美康, HM340E); 水平电泳仪 (北京市六一仪器厂, DYCP-31DN); 化学发光成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司, Chemiscope 3000)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组与用药

Wistar 大鼠 72 只, SPF 级, 雌雄各半, 体重 180 ~ 220 g, 购自新疆医科大学实验动物中心, 动物生产许可证号: SCXK (新) 2011-0004, 动物使用许可证号: SYXK (新) 2011-0004。Wistar 大鼠按照随机分组方法均衡体重性别随机分为 6 组: 对照组 (control group, Con), 模型组 (model group, Mod), 大花红景天 (*Rhodiola crenulate*, RC) 组 (1.78 mL/kg), PhGCs 低剂量 (75 mg/kg) 组 (PhGCs-L)、PhGCs 中剂量 (150 mg/kg) 组 (PhGCs-M)、PhGCs 高剂量 (300 mg/kg) 组 (PhGCs-H), 每组 12 只。Con 在 SPF 环境饲养, 其余各组置于模拟海拔 5 000 m 高原环境的人工实验舱中饲养。第 5 周各组开始灌胃给药, Con 和 Mod 灌胃蒸馏水, 其余各组按相应剂量灌胃给药, 灌胃体积 1 mL/100 g, 给药 4 周。

1.2.2 血流动力学指标的检测

末次给药后, 各组大鼠眼内眦取血, 置于抗凝采血管中, 轻轻转动采血管保证充分抗凝, 送检测定红细胞计数、血红蛋白、红细胞压积。

1.2.3 肺组织 NO、NOS 含量测定

NOS 催化 L-Arg 和分子氧反应生成 NO, NO 与亲核性物质形成有色化合物, 在 530 nm 波长下测定吸光度, 根据吸光度的大小可计算出 NOS 活力。NOS 主要有三种类型: 即总一氧化氮合酶 (total nitric oxide synthase, T-NOS)、内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)。

1.2.4 肺组织 ET-1 含量测定

ET-1 含量测定采用放射免疫试剂盒, 具体操作按说明书进行, 在新疆医科大学第一附属医院核医学科检测。

1.2.5 免疫组化测定 VEGF、PPAR- α 的表达

采用亲合素-生物素复合物 (avidin biotin complex, ABC) 染色, 二苯基联苯胺显色法。进行切片, 烤片、脱蜡、水化, 组织抗原修复, 淬灭内源性过氧化物酶活性, 封闭, 加入一抗, 加入二抗, 滴加 ABC, 二氨基联苯胺显色, 复染、分化、透明, 封片。

1.2.6 组织病理学观察

组织放入 4% 的多聚甲醛中固定后, 脱水、包埋、切片、苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色, 不同倍数光学显微镜下观察病理改变, 并拍摄图片。

1.2.7 HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达的测定

通过荧光实时定量 PCR 法,以 β -actin 为内参,对肺组织中 HIF-1 α 、VEGF、PPAR- α 基因的 mRNA 表达量进行测定。提取肺组织总 RNA,定量并测定其纯度后逆转录得到不同干预组的 cDNA,上 PCR 扩增仪进行扩增反应。HIF-1 α 、VEGF 荧光实时定量 PCR 引物由上海生工有限公司合成(见表 1)。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	序列 Sequence
HIF-1 α	F,5'-ACTTGGACGCTCTGCCTATG-3'
	R,5'-TTGCGGGGTTCTAGA-3'
VEGF	F,5'-TGCCAAGTGGTCCAG-3'
	R,5'-GTGAGTTTGATCCGC-3'
β -actin	F,5'-GAGACCTCAACACCCAGC-3'
	R,5'-ATGTCACGCACGATTCCC-3'

表 2 各组动物死亡率及四肢水肿率比较

Table 2 Mortality and incidence of peripheral edema of rats in different groups

组别 Group	总数 Total	死亡数 Number of death	死亡率 Mortality(%)	水肿只数 Number of edema	水肿率 Edema rate(%)
Con	24	0	0.00	0	0.00
Mod	24	7	29.17 [*]	9	37.50 [*]
RC	24	4	16.67	4	16.67
PhGCs-L	24	4	16.67	4	16.67
PhGCs-M	24	1	4.17 [#]	2	8.33 [#]
PhGCs-H	24	4	16.67	4	16.67

注:与 Con 相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与 Mod 相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$,下同。

Note:Compared with Con,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;Compared with Mod,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$,the same below.

M 组、PhGCs-H 组和 RC 组大鼠与 Mod 相比,大鼠血液红细胞数、血红蛋白含量及红细胞比容无显著变化,仍显著高于 Con。大鼠血液红细胞数、血红蛋白

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行分析,计量数据均采用均数 \pm 标准差表示,数据先进行正态性检验,符合正态分布组间比较采用独立样本 t 检验,不符合进行对数转换。

2 结果

2.1 PhGCs 对 CMS 大鼠一般状况的影响

Con 大鼠毛色正常、状态良好,未见死亡和四肢水肿。随着造模时间的延长,Mod 大鼠出现精神萎靡,出现四肢水肿,并有死亡。RC 组、PhGCs-L 组、PhGCs-M 组和 PhGCs-H 组大鼠也出现四肢水肿和死亡。计算给药结束时各组大鼠死亡率和出现四肢水肿的动物百分比进行统计分析发现,Mod 大鼠死亡率和四肢水肿率高于 Con;PhGCs-M 组大鼠死亡率和四肢水肿率显著低于 Mod(见表 2)。

2.2 PhGCs 对 CMS 大鼠血常规指标的影响

与 Con 相比,Mod 大鼠血液红细胞数、血红蛋白含量及红细胞比容显著升高。PhGCs-L 组、PhGCs-

含量及红细胞比容在 PhGCs-L 组、PhGCs-M 组、PhGCs-H 组与 RC 组间差异无统计学意义,具体结果见表 3。

表 3 各组大鼠红细胞计数、血红蛋白、红细胞比容($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Number of red blood cells,hemoglobin,hematocrit of rats in different groups($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	动物数 Number of animal	红细胞数 Red blood cell($\times 10^{12}/L$)	血红蛋白 Hemoglobin(g/L)	红细胞比容 Hematocrit
Con	12	6.80 \pm 0.69	140.33 \pm 9.54	37.35 \pm 3.27
Mod	9	9.83 \pm 0.94 ^{**}	220.62 \pm 15.23 ^{**}	52.83 \pm 16.87 ^{**}
RC	10	9.41 \pm 1.66 ^{**}	204.90 \pm 29.12 ^{**}	55.32 \pm 8.99 ^{**}
PhGCs-L	10	10.49 \pm 1.27 ^{**}	232.18 \pm 23.04 ^{**}	62.76 \pm 7.76 ^{**}
PhGCs-M	11	9.09 \pm 2.79 ^{**}	207.20 \pm 36.12 ^{**}	56.74 \pm 18.00 ^{**}
PhGCs-H	10	9.64 \pm 2.05 ^{**}	217.09 \pm 35.14 ^{**}	59.12 \pm 11.29 ^{**}

2.3 PhGCs 对 CMS 大鼠肺组织 NO 和 NOS 的影响

与 Con 相比,Mod 大鼠肺组织 NO 含量降低,T-NOS、iNOS 和 eNOS 活力均下降。PhGCs-L 组、PhGCs-M 组、PhGCs-H 组和 RC 组大鼠肺组织 NO 含量、T-NOS、iNOS 和 eNOS 活性都高于 Mod。PhGCs-L 组、PhGCs-H 组和 RC 组肺组织 NO 含量、T-NOS

和 eNOS 活性仍低于 Con;PhGCs 低 PhGCs-M 组鼠肺组织 NO 含量、T-NOS 和 eNOS 活性与 Con 无显著差异。PhGCs-L 组、PhGCs-M 组、PhGCs-H 组大鼠肺组织 NO 含量、T-NOS、iNOS 和 eNOS 活性未见与 RC 组有显著差异,具体结果见表 4。

表 4 各组大鼠肺组织 NO 和 NOS ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Content of NO and enzyme activity of NOS in rat lung in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	动物数 Number of animal	NO ($\mu\text{mol/gprot}$)	T-NOS (U/mgprot)	iNOS (U/mgprot)	eNOS (U/mgprot)
Con	12	6.02 \pm 1.30	9.28 \pm 1.38	1.32 \pm 0.19	7.96 \pm 1.69
Mod	9	1.92 \pm 0.75 **	4.68 \pm 1.06 **	0.82 \pm 0.20 **	3.86 \pm 0.95 **
RC	10	4.81 \pm 0.51 ## **	6.79 \pm 1.62 ## **	1.20 \pm 0.26 ##	5.58 \pm 1.58 # **
PhGCs-L	10	4.50 \pm 1.35 ## **	6.42 \pm 1.65 # **	1.21 \pm 0.47 #	5.21 \pm 1.78 # **
PhGCs-M	11	5.72 \pm 1.41 ##	8.24 \pm 1.80 ##	1.23 \pm 0.35 ##	7.09 \pm 1.84 ##
PhGCs-H	10	4.86 \pm 1.28 ## **	7.43 \pm 1.66 ## **	1.28 \pm 0.32 ##	6.14 \pm 1.72 ## **

2.4 PhGCs 对 CMS 大鼠肺组织 ET-1 含量的影响

与 Con 相比,Mod 大鼠肺组织中 ET-1 含量显著升高。PhGCs-L 组、PhGCs-M 组、PhGCs-H 组和 RC 组大鼠肺组织 ET-1 含量低于 Mod,差异有统计学意

义。各给药组大鼠肺组织 ET-1 含量仍显著高于 Con。PhGCs-L 组、PhGCs-M 组、PhGCs-H 组与 RC 组大鼠肺组织 ET-1 含量差异无统计学意义。具体结果见表 5。

表 5 各组大鼠肺组织 ET-1 含量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Content of ET-1 in rat lung in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	动物数 Number of animal	肺组织 ET-1 含量 ET-1 content in lung tissue (pg/mL)
Con	12	418.72 \pm 71.26
Mod	9	916.25 \pm 78.63 **
RC	10	639.65 \pm 70.47 ## **
PhGCs-L	10	643.78 \pm 70.93 ## **
PhGCs-M	11	630.53 \pm 87.28 ## **
PhGCs-H	10	665.65 \pm 91.58 ## **

2.5 组织病理形态学观察 PhGCs 对 CMS 大鼠右心室病理改变的影响

光镜下观察各组大鼠右心室病理改变可见,Con 右心室心肌结构清楚,排列紧密,无毛细血管充血,无水肿及坏死。Mod 右心室心肌明显增厚肥大,毛细血管明显充血水肿、嗜酸性变,部分间质有少量炎性细胞浸润。RC 组大鼠右心室心肌肥厚较轻,毛细血管充血范围明显减轻,仅见各别血管充血,嗜酸性变细胞减少,无明显炎性细胞浸润。PhGCs-L 组右心室心肌肥厚比 Mod 减轻,充血水肿明显减轻,

部分细胞嗜酸性变,炎性细胞浸润较少。PhGCs-M 组右心室心肌增厚较轻,炎性细胞浸润少,充血水肿明显减轻,偶见部分细胞嗜酸性变,基本与 RC 组类似。PhGCs-H 组心肌肥大较轻,充血明显,部分细胞嗜酸性变,细胞及血管周围少量或散在炎性细胞浸润(见图 1)。

2.6 组织 VEGF、HIF-1 α mRNA 的含量变化

2.6.1 各组肺组织 VEGF mRNA 的含量变化

与 Con 相比,Mod 大鼠肺组织中 VEGF mRNA 的含量为其 7.64 倍,显著增多。PhGCs-L 组、Ph

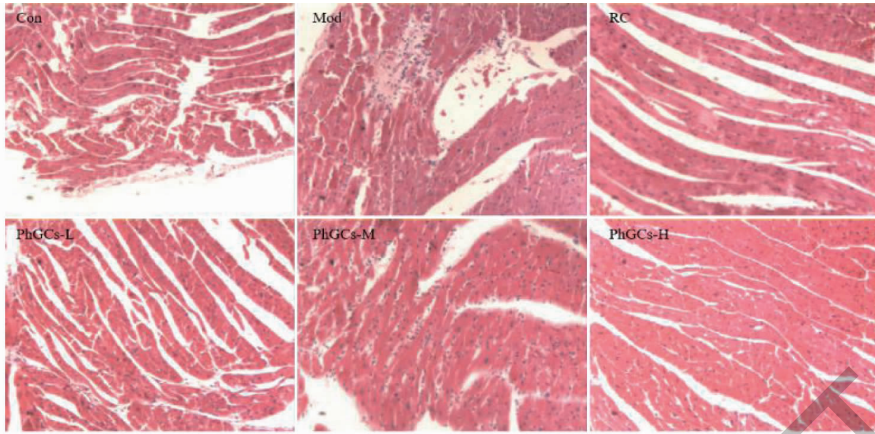


图1 各组大鼠右心室病理结果(HE, ×100)

Fig. 1 Histopathological observation of rat right ventricle in different groups (HE, 100 ×)

GCs-M组、PhGCs-H组和RC组大鼠肺组织中 VEGF mRNA 的含量分别为 Mod 的 0.17、0.16、0.17、0.19 倍,显著低于 Mod。PhGCs-L组、PhGCs-M组、PhGCs-H组和RC组大鼠肺组织中 VEGF mRNA 的含

量与 Con 相比,仍高于 Con。PhGCs-M组、PhGCs-H组大鼠肺组织中 VEGF mRNA 的含量低于 RC 组。具体结果见表 6。

表6 各组大鼠中 VEGF mRNA 的含量($\bar{x} \pm s$)Table 6 Expression of VEGF mRNA in rat lung in different groups($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	动物数 Number of animal	肺组织 VEGF mRNA/Con VEGF mRNA in lung tissue/Con
Con	12	1.00 ± 0.00
Mod	9	7.64 ± 1.34 **
RC	10	1.43 ± 0.92 **
PhGCs-L	10	1.31 ± 0.98 ***
PhGCs-M	11	1.22 ± 0.95 *** ▲▲
PhGCs-H	10	1.28 ± 1.01 *** ▲

注:与 Con 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 Mod 相比, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$;与 RC 相比, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$,下同。

Note: Compared with Con, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with Mod, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$; Compared with RC, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$, the same below.

2.6.2 各组肺组织中 HIF-1 α mRNA 含量

与 Con 相比, Mod 大鼠肺组织 HIF-1 α mRNA 的含量为其 1.03 倍,差异无统计学意义。RC 组大鼠肺组织 HIF-1 α mRNA 的含量为 Con 的 1.06 倍,与

Mod 和 Con 无显著差异。PhGCs-L组、PhGCs-M组、PhGCs-H组大鼠肺组织 HIF-1 α mRNA 的含量分别是 Con 的 0.78、0.58、0.60 倍,明显低于 Mod 和 Con,与 RC 组相比也显著降低。具体结果见表 7。

表7 各组大鼠肺组织的 HIF-1 α mRNA 的含量($\bar{x} \pm s$)Table 7 Expression of HIF-1 α mRNA in rat lung in different groups($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	动物数 Number of animal	肺组织 HIF-1 α mRNA/Con HIF-1 α mRNA in lung tissue/Con
Con	12	1.00 ± 0.00
Mod	9	1.03 ± 0.23
RC	10	1.06 ± 0.23
PhGCs-L	10	0.78 ± 0.16 *** ▲▲
PhGCs-M	11	0.58 ± 0.18 *** ▲▲
PhGCs-H	10	0.60 ± 0.08 *** ▲▲

2.7 免疫组化测定 VEGF、PPAR- α 的表达

2.7.1 PhGCs 对 CMS 大鼠肺小动脉 VEGF 蛋白表达的影响

免疫组化法检测大鼠肺小动脉 VEGF 蛋白表达量变化,光镜下观察可见,Con 大鼠肺动脉内皮层 VEGF 蛋白无表达或弱阳性表达,Mod 大鼠肺动脉

内皮层 VEGF 表达显著增加,为强阳性,RC 组、PhGCs 低、中、PhGCs-H 组大鼠肺动脉内皮层 VEGF 蛋白表达弱阳性,尤其 PhGCs 各剂量组表达与 Con 相似。可见 Mod 大鼠肺动脉内皮层 VEGF 蛋白表达量显著高于 Con,各给药组大鼠肺动脉内皮层 VEGF 蛋白表达量比 Mod 明显减少(见图 2)。

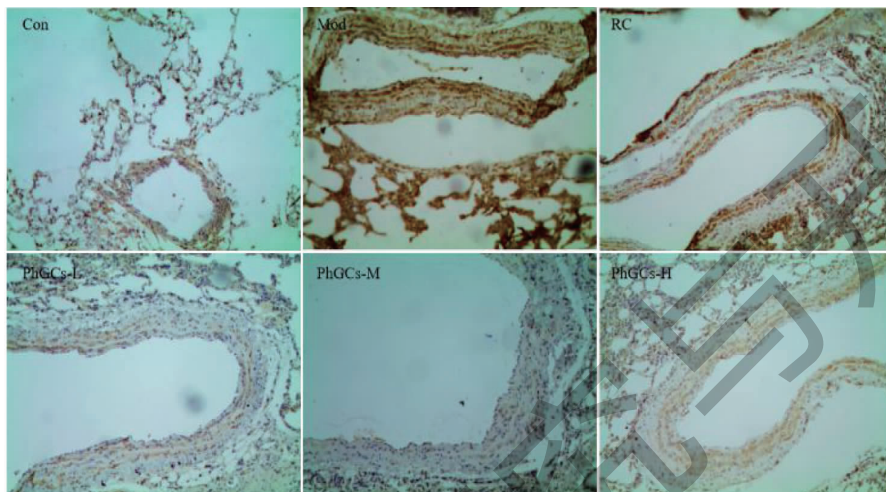


图 2 各组大鼠肺组织 VEGF 表达(100 \times)

Fig. 2 Expression of VEGF in rat lung in different groups (100 \times)

2.7.2 PhGCs 对 CMS 大鼠肺小动脉 PPAR- α 蛋白表达的影响

免疫组化法检测大鼠肺小动脉 PPAR- α 蛋白表达量变化,光镜下观察可见,Con 大鼠肺动脉内皮层 PPAR- α 蛋白阳性表达,Mod 大鼠肺动脉 PPAR- α 蛋

白表达弱阳性或阴性,RC 组、PhGCs 低、中、PhGCs-H 组大鼠肺动脉 PPAR- α 蛋白表达阳性,尤其 PhGCs-M 组表达强阳性。可见 Mod 大鼠肺动脉内皮 PPAR- α 蛋白表达量显著低于 Con,各给药组大鼠肺动脉 PPAR- α 蛋白表达量比 Mod 明显增多(见图 3)。

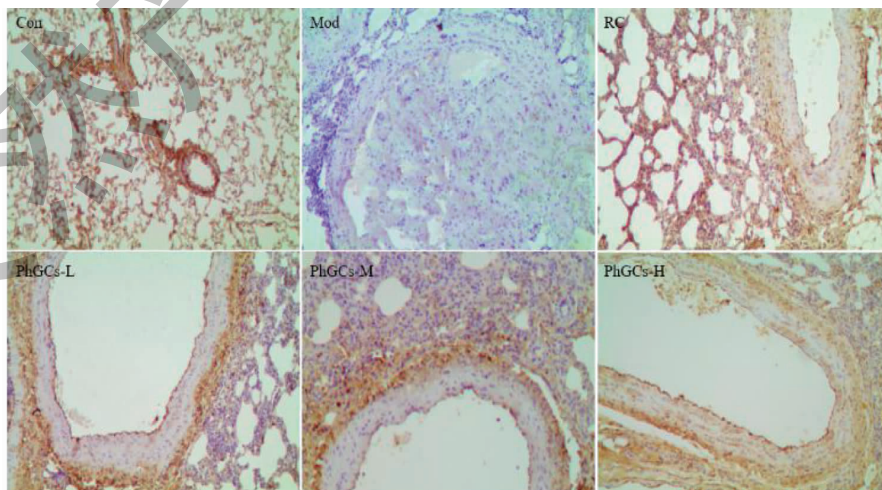


图 3 各组大鼠肺组织 PPAR- α 表达(100 \times)

Fig. 3 Expression of PPAR- α in rat lung in different groups (100 \times)

2.8 PhGCs 对 CMS 大鼠肺组织 HIF-1 α 、VEGF、PPAR- α 蛋白表达的影响

2.8.1 PhGCs 对 CMS 大鼠肺小动脉中 PPAR- α 蛋白表达的影响

检测大鼠肺组织 PPAR- α 蛋白表达量变化,与 Con 比较,Mod 大鼠肺组织 PPAR- α 蛋白表达量显著下降,肉苁蓉苯乙醇苷低剂量组、PhGCs-M 组、PhGCs-H 组和 RC 组大鼠肺组织 PPAR- α 蛋白表达高于 Mod,差异有统计学意义,尤其肉苁蓉苯乙醇苷 PhGCs-M 组表达高于正常组。肉苁蓉苯乙醇苷 PhGCs-M 组大鼠肺组织 PPAR- α 蛋白高于 RC 组,具体结果见图 4 和 5。

2.8.2 PhGCs 对 CMS 大鼠肺组织中 VEGF 蛋白表达的影响

与 Con 比较,Mod 中 VEGF 蛋白表达显著增多,表达量是 Con 的 1.98 倍。PhGCs 低、中、PhGCs-H 组,RC 组中 VEGF 蛋白表达低于 Mod。PhGCs-M 组表达量与正常组相比无显著差异。肉苁蓉苯乙醇苷 PhGCs-M 和 PhGCs-H 组中 VEGF 蛋白表达显著低于 RC 组,具体结果见图 4 和 5。

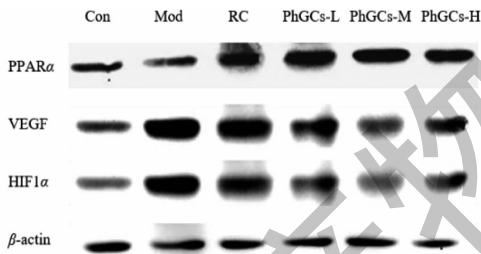


图 4 各组肺组织 PPAR- α 、VEGF、HIF-1 α 表达条带比较

Fig. 4 Expression of PPAR- α , EGF, HIF-1 α in rat lung in different groups

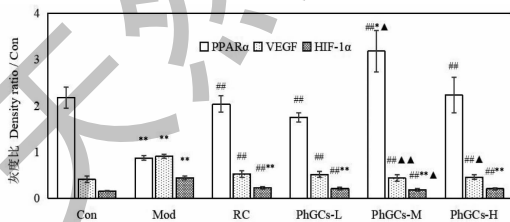


图 5 各组肺组织 PPAR- α 、VEGF、HIF-1 α 表达量

Fig. 5 Expression of PPAR- α , VEGF, HIF-1 α in rat lung in different groups

注:与 Con 相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 Mod 相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;与 RC 相比,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ 。Note: Compared with Con,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;Compared with Mod,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;Compared with RC,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ 。

2.8.3 PhGCs 对 CMS 大鼠肺组织 HIF-1 α 蛋白表达的影响

与 Con 比较,Mod 大鼠肺组织中 HIF-1 α 蛋白表达显著增多,表达量分别是 Con 的 2.75 倍。PhGCs 低、中、PhGCs-H 组,RC 组中 HIF-1 α 表达低于 Mod (分别为 Mod 的 0.50、0.43、0.47 和 0.52 倍),但仍高于 Con(分别为 Con 的 1.38、1.19、1.31 和 1.43 倍),PhGCs-M 组大鼠肺组织中 HIF-1 α 蛋白表达量显著低于 RC 组,具体结果见图 4 和 5。

3 讨论与结论

PhGCs 是从南疆管花肉苁蓉中提取得到,相关研究成功分离得到了多种苯乙醇苷,包括松果菊苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、2'-乙酰基毛蕊花糖苷、肉苁蓉苷 A 等,还含有红景天苷^[9]。多年来已对 PhGCs 的抗氧化,清除自由基,抗衰老等药理作用进行了深入的研究^[10]。本次实验中 PhGCs-M 组能够显著降低大鼠右心室肥厚指数,说明肉苁蓉苯乙醇苷可以改善 CMS 大鼠的血流动力学和右心室肥厚程度,具有一定治疗 CMS 的作用。本研究从与血氧饱和度存在相关性的指标推测,PhGCs 是在相同红细胞数和血红蛋白含量的情况下,提高血液的血氧饱和度,减少缺氧对机体的损害,增加机体对缺氧损伤的耐受力,从而达到治疗高原病的目的。PhGCs 治疗后 CMS 大鼠死亡率和四肢水肿的发生率显著下降,进一步说明其治疗 CMS 的有效性。

NO 作为内皮依赖性的血管舒张因子,在内皮血管舒张中起重要作用,因其直接松弛肺血管平滑肌,从而产生明显的肺血管舒张,并且具有抑制肺血管平滑肌细胞的增殖和迁移、抑制血小板聚集等作用,在维持肺循环稳定中起重要的作用^[11,12]。本研究发现,Mod 肺组织匀浆中 NO 含量下降,T-NOS、iNOS、eNOS 的活性下降,PhGCs 能够通过增强 T-NOS、iNOS、eNOS 活性而增加肺组织中 NO 含量,起到对抗肺动脉平滑肌增殖肌化的作用,发挥治疗 CMS 的作用。

ET-1 是迄今发现的最强的血管收缩因子,低氧可明显增加血液中 ET-1 的水平^[13,14]。Rajput 等^[15]对比高原居住者和平原居住者中 ET-1 等位基因的差异,发现 ET-1 某些等位基因在高原居住者中过度表达,且 ET-1 等位基因表达与血浆 ET-1 水平明显相关。在本文中,Mod 大鼠肺组织 ET-1 含量显著升高,说明低氧诱导肺组织 ET-1 分泌增加,与其他研究一致。PhGCs 给药可以使 CMS 大鼠肺组织 ET-1

含量下降,说明 PhGCs 可以抑制 ET-1 引起的血管收缩,降低肺动脉压力,发挥治疗 CMS 的作用。

随后,我们重点观察了 PhGCs 对低氧诱导通路中 HIF-1 α 、VEGF、PPAR- α 的影响。分别利用免疫组化、荧光定量 PCR 及 Western blot 方法检测了他们在各组大鼠肺组织中 mRNA 和蛋白的表达。免疫组化结果发现,在 Mod 大鼠分组肺动脉中 VEGF 的表达量高于 Con,而 PPAR- α 表达量低于 Con。PhGCs 低、中、PhGCs-H 组及 RC 组大鼠肺动脉 VEGF 的表达量较 Mod 降低,而 PPAR- α 表达量增加,说明 PhGCs、大花红景天可以抑制低氧诱导的 VEGF 的表达,促进 PPAR- α 表达从而减轻肺血管增殖肌化,发挥治疗 CMS 的作用。通过实验测定肺组织 HIF-1 α 蛋白和 mRNA 的表达,发现 CMS 模型大鼠肺组织 HIF-1 α 蛋白显著增加而 mRNA 的表达和 Con 无差异,这与相关研究结果显示的低氧主要调控 HIF-1 α 蛋白表达环节是一致的。PhGCs 能够显著降低 HIF-1 α 蛋白和 mRNA 的表达量,说明其对 HIF-1 α 的转录和翻译都可能产生影响。而大花红景天对 HIF-1 α mRNA 表达无显著影响,提示其与低氧一样主要影响蛋白表达环节。

整体上对比,PhGCs 三个剂量中,PhGCs-M 组对 CMS 效果最好,PhGCs-H 治疗效果未出现明显增强,可能与 PhGCs-H 在肠道吸收率反而下降有关。PhGCs-M 与大花红景天治疗效果比较,PhGCs 对 HIF-1 α mRNA、VEGF mRNA 指标的作用优于后者,加上资源优势,具有一定的开发前景。

参考文献

- Garrido E, Botella de Maglia J, Castillo O. Acute, subacute and chronic mountain sickness [J]. Rev Clin Esp (Barc), 2021, 221:481-490.
- Luo YJ, Zou YL, Gao YQ. Gene polymorphisms and high-altitude pulmonary edema susceptibility [J]. Respiration, 2012, 84:155-162.
- Tatum S, Yang YZ, Chad D, et al. Genetic evidence for high-altitude adaptation in Tibet [J]. Science, 2010, 329:72-75.
- Brutsaert TD, Kiyamu M, Revollendo GE, et al. The Andean EGLN1 adaptive allele could be a loss of function variant that increases HIF1- α in skeletal muscle [J]. PNAS, 2020, 117:29286-29287.
- Kruempel JCP, Miller HA, Schaller ML, et al. Hypoxic response regulators RHY-1 and EGL-9/PHD promote longevity through a VHL-1-independent transcriptional response [J]. Geroscience, 2020, 42:1621-1633.
- He Y, Munday JS, Perrott M, et al. Association of age with the expression of hypoxia-inducible factors HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α and VEGF in lung and heart of Tibetan sheep [J]. Animals (Basel), 2019, 9:673.
- Li X, Han ZN, Liu Y, et al. Endogenous ET-1 promotes ANP secretion through activation of COX2-L-PGDS-PPAR γ signaling in hypoxic beating rat atria [J]. Peptides, 2019, 122:170150.
- Ge RL, Mo VY, Januzzi JL, et al. B-type natriuretic peptide, vascular endothelial growth factor, endothelin-1, and nitric oxide synthase in chronic mountain sickness [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 300:H1427-H1433.
- Pei W, Guo R, Zhang J, et al. Extraction of Phenylethanoid glycosides from *Cistanche tubulosa* by high-speed shearing homogenization extraction [J]. J AOAC Int, 2018, 10:18-0039.
- Santolini J. What does "NO-Synthase" stand for [J]. Front Biosci, 2019, 24:133-171.
- Nan ZD, Ren HZ, Zhao MB, et al. Four new cis-phenylethanoid glycosides from stems of *Cistanche deserticola* cultured in Tarim desert [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2018, 43:1169-1174.
- Yang J, Ju B, Hu J. Effects of phenylethanoid glycosides extracted from *Herba Cistanches* on the learning and memory of the APP/PSI transgenic mice with Alzheimer's disease [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021:1291549.
- Imbrogno S, Tota B, Gattuso A. The evolutionary functions of cardiac NOS/NO in vertebrates tracked by fish and amphibian paradigms [J]. Nitric Oxide, 2011, 25:1-10.
- Wolf P, Beck-Sickingler AG. The ring size of monocyclic ET-1 controls selectivity and signaling efficiency at both endothelin receptor subtypes [J]. J Pept Sci, 2021, 27:e3325.
- Rajput C, Najib S, Norboo T, et al. Endothelin-1 gene variants and levels associate with adaptation to hypobaric hypoxia in high altitude natives [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 341:1218-1224.