

史许锋,刘侃,王莉,等. 葫芦巴碱的预防性使用可减轻妊高症大鼠模型的症状并保护胎儿生长和血管内皮功能 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 62-70.

Shi XF, Liu K, Wang L, et al. The preventive use of trigonelline can alleviate symptoms in a rat model of pregnancy-induced hypertension and protect fetal growth [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 62-70.

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-7856. 2021. 07. 010

葫芦巴碱的预防性使用可减轻妊高症大鼠模型的症状并保护胎儿生长和血管内皮功能

史许锋,刘侃,王莉,王焕萍,张敬丽,武海英*

(河南省人民医院产科,郑州 450003)

【摘要】 目的 旨在确定妊娠早期使用葫芦巴碱对于一氧化氮合酶拮抗剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯 (LNAME) 诱导的 PE 大鼠的治疗作用。**方法** 在妊娠第 0 天,将 28 只 Sprague-Dawley (SD) 大鼠随机分为 4 组,怀孕对照组,LNAME 诱导的 PE 组和预防性使用葫芦巴碱的小剂量组和大剂量组;测量孕鼠血压和蛋白尿并通过股动脉超声评估孕鼠内皮功能,通过 ELISA 检测炎症因子和内皮相关因子的表达,最后收获孕鼠胎盘和肾进行免疫组化分析,同时通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 和蛋白免疫印迹法 (Western blot) 分析炎症相关通路状态。**结果** 预防性给予小剂量和高剂量葫芦巴碱可改善 LNAME 引起的高血压、蛋白尿、孕期大鼠体重减轻、胎儿生长受限和血流介导的扩张,而葫芦巴碱可能通过途径 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$ 而平衡内皮相关因子并减轻胎盘和肾组织中的炎症活化。**结论** 葫芦巴碱在 LNAME 诱导的 PE 样大鼠模型中的预防性使用可减轻 PE 症状,促进胎儿生长,保护内皮功能并减少炎症。

【关键词】 葫芦巴碱;先兆子痫;内皮功能;蛋白尿;妊娠早期

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0062-09

The preventive use of trigonelline can alleviate symptoms in a rat model of pregnancy-induced hypertension and protect fetal growth

SHI Xufeng, LIU Kan, WANG Li, WANG Huanping, ZHANG Jingli, WU Haiying*

(Department of Obstetrics, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China)

【Abstract】 Objective To determine the therapeutic effect of trigonelline in early pregnancy on rats with preeclampsia (PE) induced by the nitric oxide synthase antagonist N-nitro-L-arginine methyl ester (LNAME). **Methods** On day zero of pregnancy, 28 Sprague-Dawley rats were randomly assigned to four groups: pregnancy control group, LNAME-induced PE group, and prophylactic use of trigonelline small dose group and high-dose group. Blood pressure and proteinuria of the pregnant rats were measured, endothelial function of pregnant rats was evaluated by femoral artery ultrasound, and the expression of inflammatory factors and endothelial-related factors were detected by ELISA. Finally, the placenta and kidney of pregnant rats were harvested for immunohistochemical analysis and to analyze the status of inflammation-related pathways by Real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot. **Results** Prophylactic administration of low-dose or high-dose trigonelline improved hypertension, proteinuria, and weight loss during pregnancy,

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (2018020417)。

[作者简介] 史许锋 (1984—), 女, 硕士, 研究方向: 产科。E-mail: yhfeng99@126.com

[通信作者] 武海英 (1968—), 女, 硕士, 研究方向: 产科重症、胎儿医学。E-mail: degeuliu@163.com

fetal growth restriction and blood flow-mediated dilation caused by LNAME. Trigonelline may act through the $\text{I}\kappa\text{B}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$ pathway, balance endothelium-related factors and reduce inflammation activation in placenta and kidney tissues.

Conclusions The preventive use of trigonelline in a PE-like rat model induced by LNAME can reduce PE symptoms, promote fetal growth, protect endothelial function and reduce inflammation.

【Keywords】 trigonelline; preeclampsia; endothelial function; proteinuria; early pregnancy

子痫前期 (preeclampsia, PE) 是一种严重的母体炎症性疾病,具有内皮细胞功能障碍,尚缺乏有效的治疗和预防方法。子痫前期是一种妊娠特异性综合征,全球发病率在 2%~8% 之间,是导致早产、孕产妇死亡的主要原因^[1-2]。PE 定义为妊娠 20 周或之后伴有新发蛋白尿,子宫胎盘功能障碍或其他母体器官功能障碍的妊娠高血压^[3]。除终止妊娠外,尚无有效的 PE 治疗方法,对 PE 高风险孕妇的预防措施也很有限^[4]。此外,有 PE 病史的女性患心血管疾病的风险更高^[5]。因此,预防 PE 对预防女性心血管疾病具有重要意义。

PE 的发病机制仍不清楚,有证据表明它与局部和全身性血管内皮损伤以及炎症的过度活化有关^[6]。PE 患者胎盘中抗血管生成分子和炎症因子分泌明显增加,从而导致内皮表面分子模式的急剧变化,并导致全身性内皮功能障碍、血管收缩和随后的高血压^[7]。因此,调节抗血管生成因子的平衡,减少过度的炎症激活以及保护内皮功能是治疗和预防 PE 的关键目标。葫芦巴碱 (trigonelline) 为传统中药益母草的有效成分,具有抗氧化、保护心脏、提高生育等作用,以往研究指出,葫芦巴碱的使用可以通过 JAK/Stat3 等信号通路而抑制炎症机制的过度激活,促进血管新生,并通过 NO-cGMP 途径起血管舒张作用,最终发挥血管保护作用^[8]。此外,在异氟醚麻醉的小鼠模型中,葫芦巴碱的预防性使用可以抑制异氟醚麻醉诱导的心肌凋亡^[9]。然而,预防性使用葫芦巴碱对于 PE 症状的治疗作用尚未见报道,因此,本研究旨在确定妊娠早期使用葫芦巴碱对于一氧化氮合酶拮抗剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯 (LNAME) 诱导的 PE 大鼠的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 28 只,8~10 周龄,体重 200~220 g。购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2016-0006],将大鼠饲养于郑州大学动物实验中心 [SYXK (豫) 2019-00013]。温度控制在 $(23\pm 3)^{\circ}\text{C}$,湿度 $(50\pm 10)\%$ 和光照-黑暗周期

(12 h:12 h) 的条件下,自由进食和饮水。本实验的研究过程遵循实验动物 3R 原则。本研究经我院医学伦理委员会批准 ((2019) 伦审第 (38) 号)。

1.2 主要试剂与仪器

LNAME (江蓝纯生物试剂有限公司,中国);葫芦巴碱 (安诺伦生物科技有限公司,中国);CMC (安诺伦生物科技有限公司,中国);高碘酸席夫 (Schiff, 美国);PrimeScript RT 试剂盒 (成都灵动生物技术有限公司,中国);TB Green Premix Ex Taq II (Takara Biotechnology, 日本);总蛋白提取试剂 (维润赛润生物试剂有限公司,中国);聚偏二氟乙烯膜 (Millipore, 美国);HPR 偶联的二抗 (博拓生物科技股份有限公司,中国);sFlt-1 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒、PlGF ELISA 试剂盒、NO ELISA 试剂盒、eNOS ELISA 试剂盒、TNF- α ELISA 试剂盒和 IL-6 ELISA 试剂盒 (试剂盒均购置于利翰生物科技有限公司,中国);光学显微镜 (Leica Microsystems, 德国);MS550D 换能器和 Visual Sonic 超声系统 (Visual Sonic, 美国);ABI Prism 7300 系统 (Applied Biosystems, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 治疗方法

将雌性大鼠与雄性大鼠 (2:1) 交配,并且检测到阴栓时记为妊娠日 GD 0,然后将雌性大鼠从 GD 0 随机分为四组,每组 7 只。对照组:GD 9-20 时通过经口管饲法给予 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC);LNAME 组:GD 9-20 时皮下注射 75 mg/(kg·d) 的 LNAME^[10];低剂量葫芦巴碱组 (LT 组, $n = 7$):GD 9-20 时皮下注射 75 mg/(kg·d) 的 LNAME,并以 2 mg/(kg·d) 的剂量经口管饲法给予葫芦巴碱-20 溶于 CMC;(4) 高剂量葫芦巴碱组 (HT 组):GD 9-20 时皮下注射 75 mg/(kg·d) 的 LNAME,并以 10 mg/(kg·d) 的剂量经口管饲法给予葫芦巴碱-20 (溶于 CMC)。

LNAME 是一种一氧化氮合成酶抑制剂,孕鼠注射 LNAME 可产生与人类 PE 类似的表型,主要表现在高血压和蛋白尿,通过上述可以判断 PE 模型的情况。

1.3.2 血压测量

使用无创自动血压分析仪(第一三共株式会社,日本)通过尾袖法^[11]在有意识大鼠中测量收缩压(SBP),舒张压(DBP)和平均动脉压(MAP)。

1.3.3 蛋白尿监测

在 GD 0 和 GD 18 时采用代谢笼收集 24 h 的尿液,将样品储存在-80℃并进行分析以评估蛋白质浓度(Thermo Scientific,美国)。

1.3.4 高频超声成像

在 GD 19 时使用高频超声成像检测母体血流介导的股动脉扩张(FDM)和股动脉壁切应力(WSS),使用 MS550 D 换能器和 Visual Sonic 超声系统获得图像,测量值(静态图像和视频剪辑/电影循环)以数字方式存储,用于脱机分析血流介导的扩张^[12]。

1.3.5 组织取样

在 GD 20 时脱颈处死检查子宫的胎盘和胎儿的重量和长度,同时切除母鼠肾,将胎盘和肾转移到液氮中,并保存在-80℃进行 Western blot 印迹或聚合酶链反应(PCR)分析,或保存在 4%多聚甲醛中进行组织学检查。

1.3.6 组织学和免疫组化

将胎盘组织样品在 4%多聚甲醛中固定 48 h,包埋在石蜡中,切成 5 μm 厚的切片,并用苏木精和曙红染色;将肾组织切成 3 μm 厚的切片,用高碘酸席夫染色后评估肾小球硬化指数^[13]。

对于免疫组织化学,将切片与抗大鼠抗 p-NF-κB p65(Abcam,英国,1:500)抗体一起孵育,使用光学显微镜进行显微镜分析,通过 Image J 对结果进行定量分析。

1.3.7 sFlt-1、PlGF、NO、eNOS、TNF-α 和 IL-6 激活测定

在 GD 20 时从主动脉收集血液到抗凝管中,以 2000 r/min 离心 15 min 分离血浆,根据制造商的说明,使用 sFlt-1 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、PlGF ELISA 试剂盒、NO ELISA 试剂盒、eNOS ELISA 试剂盒、

TNF-α ELISA 试剂盒和 IL-6 ELISA 试剂盒测量 sFlt-1、PlGF、NO、eNOS、TNF-α 和 IL-6 的血浆浓度。

1.3.8 实时定量 PCR

按照制造商的说明使用 TRIzol 提取组织总 RNA,通过 Agilent 2100 生物分析仪检测 RNA 的完整性,使用 PrimeScript RT 试剂盒从等量的不同样品 RNA 中合成 cDNA,并使用 TB Green Premix Ex Taq II 用于进行 PCR 反应,以 GAPDH 用作内部对照,通过 ABI Prism 7300 系统测量 TNF-α、IL-6、NF-κB p65 和 GAPDH 的表达。引物组的序列列于表 1。

1.3.9 蛋白质印迹分析

按照制造商的说明使用总蛋白提取试剂提取组织总蛋白,在 100℃下加热 5 min,将蛋白质裂解物(35 mg)在 Tris-甘氨酸缓冲的 10% SDS-PAGE 上通过电泳分级分离,并将印迹转移到聚偏二氟乙烯膜上,将膜在室温下封闭 2 h,然后与 p-IκBα、IκBα、p-NF-κB p65 和 NF-κB p65 的相应一抗孵育过夜,随后将膜与 HRP 偶联的二抗在室温下孵育 1 h,将蛋白质表达标准化为 GAPDH 的表达,使用增强化学发光法(ECL,Keygen)检测蛋白信号,并使用 Image J 2x 软件分析条带。

1.4 统计学方法

数据分析使用 SPSS 24.0(美国 SPSS Inc.)进行,结果表示为平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)。如果数据呈正态分布且具有均一的方差,则使用 *t* 方差单向分析后通过最低显著性差异(LSD)进行 *t* 检验,以计算各个研究组之间的差异;方差不一致时,则使用 Dunnett T3 分析组之间的差异。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 葫芦巴碱可预防 PE 大鼠的妊娠高血压,蛋白尿,低母体体重和胎鼠生长受限

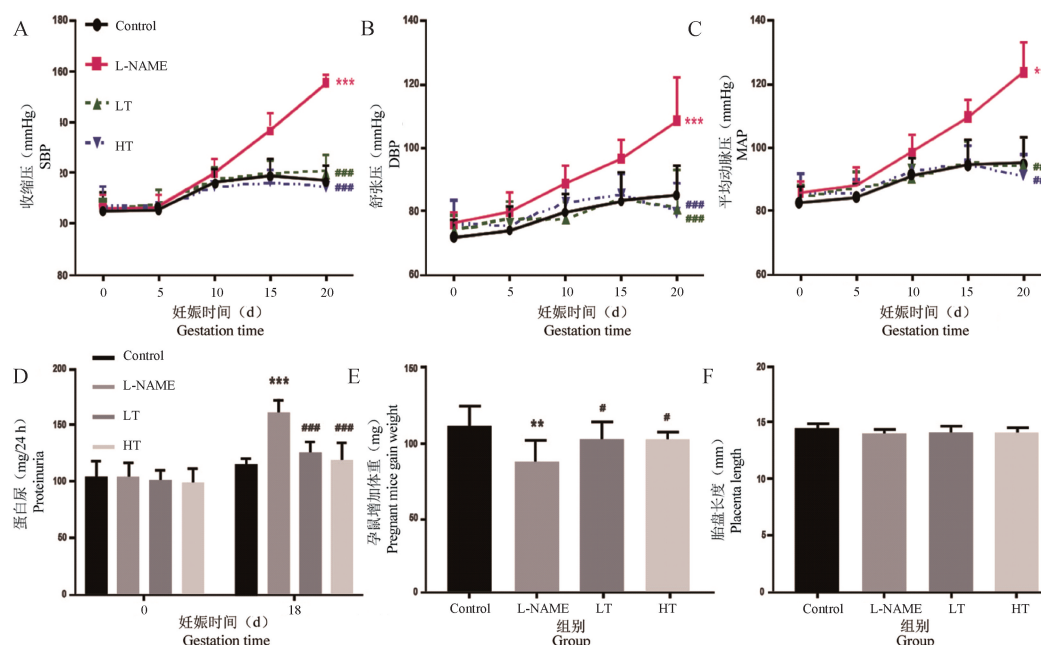
妊娠初期四组血压无明显差异,在 GD10 时,LT 和 HT 组的血压显著低于 LNAME 组的血压,且 LT

表 1 PCR 所用引物序列
Table 1 Primer sequences for PCR

基因 Gene	正向引物(5'-3') Positive primer	反向引物(5'-3') Reverse primer
TNF-α	GACTGTGTTACCGTCATGGC	ACTTGGTTTTTCATAACAGCGGA
NF-κB p65	AGTTGAGGGGATTTCACAGG	TCAACTCCCCTGAAAGGGCC
IL-6	AGTGTGTTGTCAGTGCCAA	GCACCATCATTCACAGAC
GAPDH	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT

和 HT 组的血压在整个怀孕期间仍与对照组相似($P > 0.05$, 图 1A、1B、1C); 此外, GD 0 时四组蛋白尿之间无显著差异($P > 0.05$), 而在 GD18 上, LT 和 HT

组的蛋白尿明显低于 LNAME 组($P < 0.001$), LNAME 组的蛋白尿明显高于对照组($P < 0.001$), LT, HT 和对照组之间则无显著差异($P > 0.05$, 图

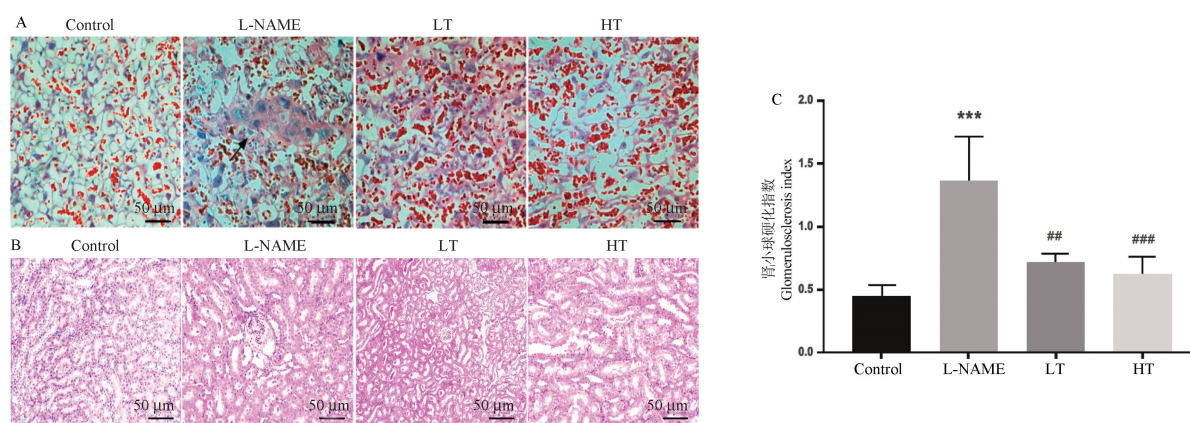


注: A~C: 四组妊娠大鼠的血压; D: 蛋白尿; E: 妊娠大鼠增加体重; F: 胎盘长度。与对照组相比, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; 与 LNAME 组相比, $#P < 0.05$, $###P < 0.001$ 。

图 1 葫芦巴碱对子痫前期症状的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Note. A~C, Blood pressure in four groups of pregnant rats. D, Proteinuria. E, Weight gain in pregnant rats. F, Placental length. Compared with control group, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$. Compared with LNAME group, $#P < 0.05$, $###P < 0.001$.

Figure 1 Effect of Trigonelline on preeclampsia

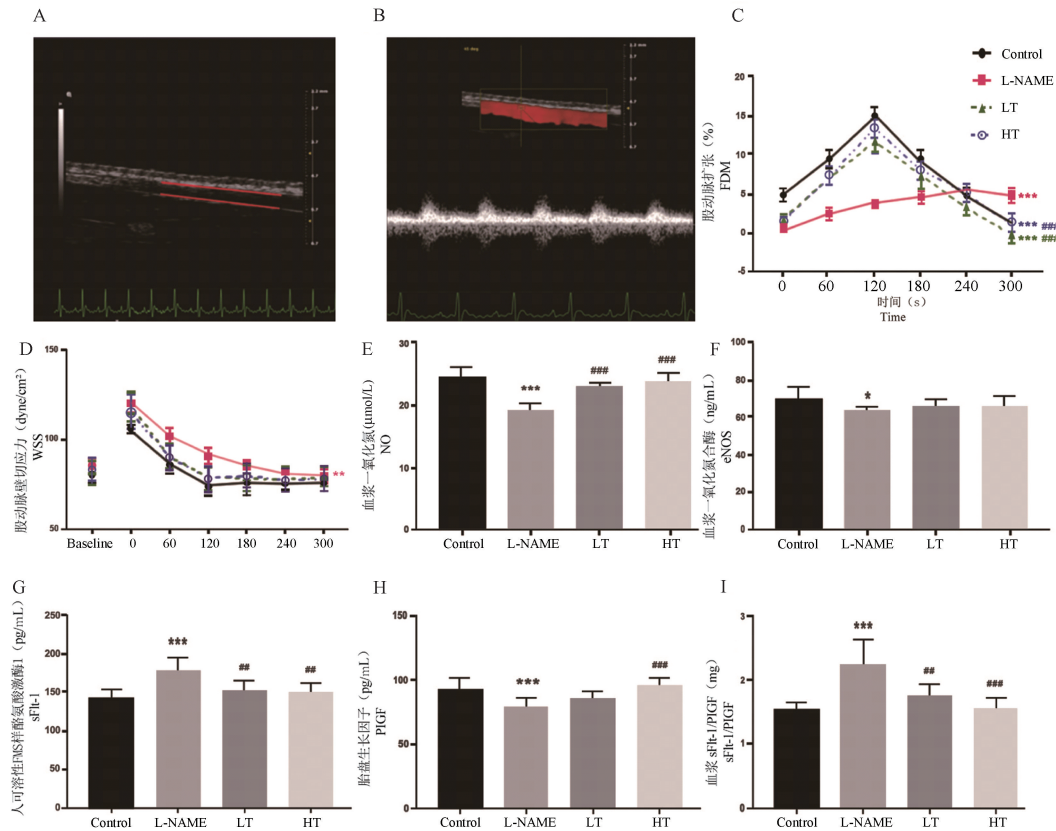


注: A: 胎盘的 HE 染色图像 ($n=4$, 合胞性结节用箭头标记); B: 肾的 PAS 染色图像 (肾小球硬化用箭头标记; $n=3$); C: 各组大鼠的肾小球硬化指数 ($n=3$)。与对照组相比, $***P < 0.001$; 与 LNAME 组相比, $##P < 0.01$, $###P < 0.001$ 。

图 2 葫芦巴碱减轻 LNAME 诱发的先兆子痫样大鼠的胎盘和肾的形态损伤 ($\bar{x} \pm s$)

Note. A, HE staining images of placenta ($n=4$, Keywords syncytial nodules marked with arrows). B, PAS staining images of the kidneys (Glomerular sclerosis marked with arrows, $n=3$). C, Glomerular sclerosis index ($n=3$). Compared with control group, $***P < 0.001$. Compared with LNAME group, $##P < 0.01$, $###P < 0.001$.

Figure 2 Trigonelline attenuates LNAME induced morphological damage to the placenta and kidneys in preeclampsia rats



注:A:四组大鼠股动脉直径;B:脉冲波多普勒图像;C:血流介导的扩张作用;D:壁切应力;E:血浆中 NO;F:eNOS;G:sFlt-1;H:PlGF;I:sFlt-1/PlGF 比值。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.001$;与 LNAME 组相比, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

图 3 葫芦巴碱对内皮功能和血管生成因子的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Note. A, Femoral artery diameter in four groups of rats. B, Pulse Doppler images. C, Blood flow-mediated dilation. D, Wall shear stress. E, NO in plasma. F, eNOS. G, sFlt-1. H, PlGF. I, sFlt-1/PlGF ratios. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.001$. Compared with LNAME group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 3 Effects of Trigonelline on endothelial function and angiogenic factors

1D)。Control 组胎儿数量 (11.5 ± 1.7) 与 L-NAME 组 (12.4 ± 0.8)、LT 组 (11.8 ± 2.1)、HT 组 (12.6 ± 1.6) 之间无显著差异 ($P > 0.05$)。LNAME 组的体重降低,胎儿身长 ($P < 0.001$) 和体重 ($P < 0.01$) 显著低于其他组,而 LT 和 HT 组母体体重和胎儿生长被明显保护(图 1E、1H、1I),四组胎盘直径或重量无显著差异 ($P > 0.05$,图 1F)

2.2 葫芦巴碱可以缓解 PE 样大鼠的胎盘和肾组织学损伤

对照组的胎盘迷路区规则且血液丰富,而 LNAME 组大鼠胎盘迷路区混乱并存在合胞性结节,这些结节可能阻碍胎盘的血液供应并降低胎盘的功能,在预防性使用葫芦巴碱后,大鼠胎盘迷路区显示出明显的改善,结节数量明显减少(图 2A, $P < 0.001$),此外, LNAME 组的肾小球硬化指数显著高于对照组,与 LNAME 组相比,LT 和 HT

组的肾小球硬化指数被明显改善 ($P < 0.01$,图 2B、2C)。

2.3 葫芦巴碱可改善 PE 大鼠血浆中的内皮依赖性血管舒张,内皮功能生物标志物和平衡的血管生成分子

四组大鼠基线股动脉直径差异无统计学意义(图 3A、3B, $P > 0.05$),缺血 5 min 后,对照组,LT 组和 HT 组的 FMD 随时间逐渐增加,在 120 s 达到峰值, LNAME 组在 240 s 达到峰值, LNAME 组的 FMD 峰值显著低于对照组,LT 和 HT 组(图 3C);此外,四组之间基线 WSS 没有显著差异,缺血后四组 WSS 随时间变化,与 LNAME 组相比,葫芦巴碱使 LT 和 HT 组的 WSS 明显降低(图 3D)。

与 LNAME 组相比,LT 和 HT 组的血浆 NO 恢复到正常水平,与对照组相似(图 3E, $P > 0.05$),血浆 eNOS 水平得到改善(图 3F, $P < 0.001$),与

LNAME 组相比,LT 和 HT 组的血浆 sFlt-1 水平显著降低(图 3G),HT 组的血浆 PlGF 值恢复至与对照组相似的水平(图 3H, $P>0.05$),同时,LT 和 HT 组的 sFlt-1/PlGF 比率明显低于 LNAME 组的比率(图 3I, $P<0.001$)。

2.4 葫芦巴碱可以抑制 PE 样大鼠血浆和组织中炎症细胞因子的释放

LNAME 诱导的大鼠的血浆 TNF- α 和 IL-6 水平显著高于对照组($P<0.01$),而 LT 和 HT 组的血浆水平显著降低($P<0.01$,图 4A、4B),与对照组相比,LNAME 组血浆与肾中 TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 水平显著增加($P<0.001$),而 LT 和 HT 组 TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 水平明显降低,且 HT 组的表现优于 LT 组(图 4C、4D、4E、4F)。

2.5 葫芦巴碱可抑制 PE 大鼠胎盘中的炎症

免疫组织化学分析显示,LT 和 HT 组的胎盘中 p-NF- κ B 水平明显低于 LNAME 组($P<0.001$),NF- κ B 的 mRNA 表达明显降低($P<0.001$),而 HT 组的表现优于 LT 组(图 5A、5B、5C),此外,与 LNAME 组相比,葫芦巴碱组中 p-I κ B α 与 I κ B α 的比率以及 NF- κ B 与 p-NF- κ B 的比率显著降低(图 5D、5E、5F、5G, $P<0.001$),这些数据表明葫芦巴碱抑制 LNAME 诱导的 PE 样大鼠胎盘中的炎症可能与 I κ B α /NF- κ B 信号通路有关。

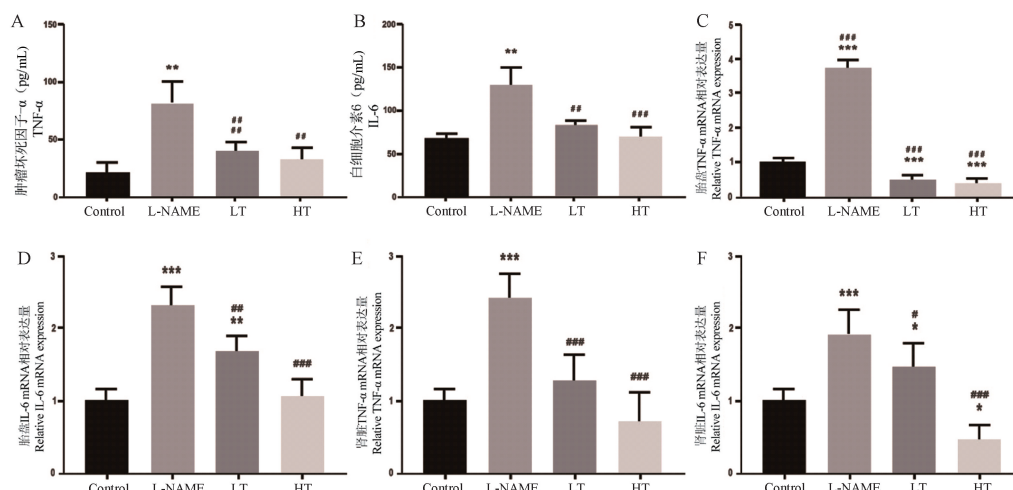
2.6 葫芦巴碱可以抑制 PE 大鼠肾的炎症

免疫组织化学分析显示,LT 和 HT 组的肾中 p-NF- κ B 与 NF- κ B 的 mRNA 水平明显低于 LNAME 组($P<0.01$),而 HT 组的表现优于 LT 组(图 6A、6B、6C),此外,与 LNAME 组相比,葫芦巴碱组中 p-I κ B α 与 I κ B α 的比率以及 NF- κ B 与 p-NF- κ B 的比率显著降低(图 6D、6E、6F、6G, $P<0.01$)。这些数据表明葫芦巴碱抑制 LNAME 诱导的 PE 样大鼠肾的炎症可能与 I κ B α /NF- κ B 信号通路有关。

3 讨论

由于妊娠期间宫内暴露于高血压,妊娠高血压的母亲及其后代都有长期的心血管后遗症,因此,患有 PE 高危因素的孕妇的患者应进行预防性干预^[14-15]。但是,预防 PE 的措施是有限的,而阿司匹林是唯一具有可靠预防 PE 的药物^[16]。研究表明^[17],PE 与炎症反应和内皮功能障碍有关,葫芦巴碱可以通过抑制炎症舒张血管平滑肌而发挥内皮功能保护作用。因此,在这项研究中,我们使用葫芦巴碱进行 PE 的预防性治疗。

葫芦巴碱的预防性给药可预防 LNAME 诱导的 PE 样妊娠大鼠的高血压,同时降低孕鼠尿蛋白,将胎盘的长度和重量恢复至正常水平,此外,由于葫芦巴碱可以缓解胎儿生长限制,孕期孕鼠的体重增

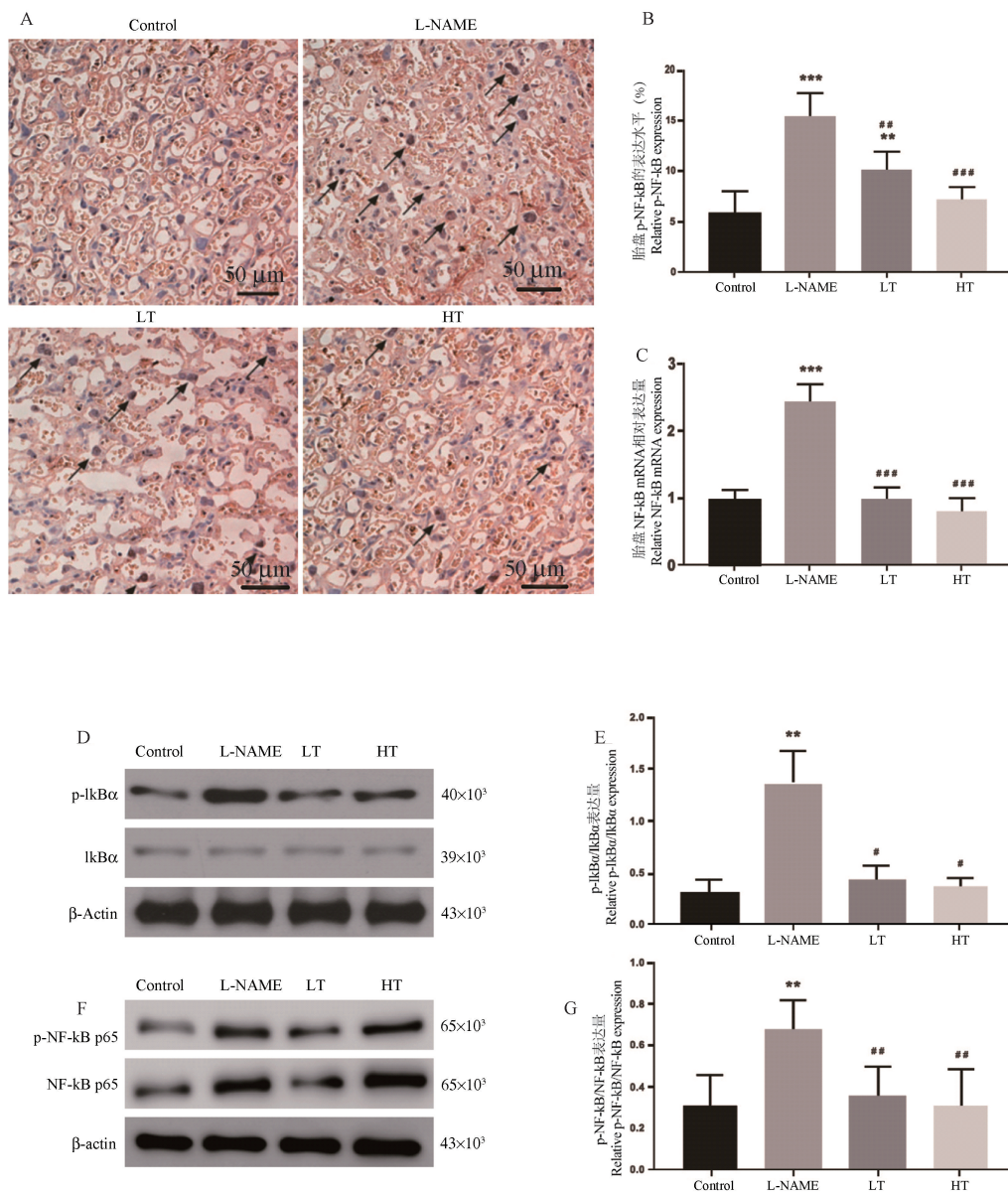


注:A~B:四组大鼠血浆中 TNF- α 和 IL-6 的水平;C~D:四组大鼠胎盘 TNF- α 和 IL-6 mRNA 的表达;E~F:四组大鼠肾中 TNF- α 和 IL-6 mRNA 的表达。与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与 LNAME 组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

图 4 葫芦巴碱的预防性给药可以下调血浆,胎盘和肾中的炎症细胞因子($\bar{x} \pm s$)

Note. A/B, Levels of TNF- α and IL-6 in plasma of four groups of rats. C/D, Expression of TNF- α and IL-6 mRNA in rat placenta of four groups. E/F, TNF- α and IL-6 mRNA expression in the kidney of four groups of rats. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with LNAME group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

Figure 4 Prophylactic administration of Trigonelline can downregulate inflammatory cytokines in plasma, placenta and kidney



注:A:四组大鼠胎盘组织 p-NF-κB 的免疫组织化学染色;B:胎盘中 p-NF-κB 的表达;C:NF-κB 的 mRNA 水平;D:p-IκBα 和 IκBα 的蛋白质印迹图片;E:p-IκBα 与 IκBα 的比率;F:p-NF-κB 与 NF-κB 的蛋白质印迹图片;G:p-NF-κB 与 NF-κB 的比率。与对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 LNAME 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

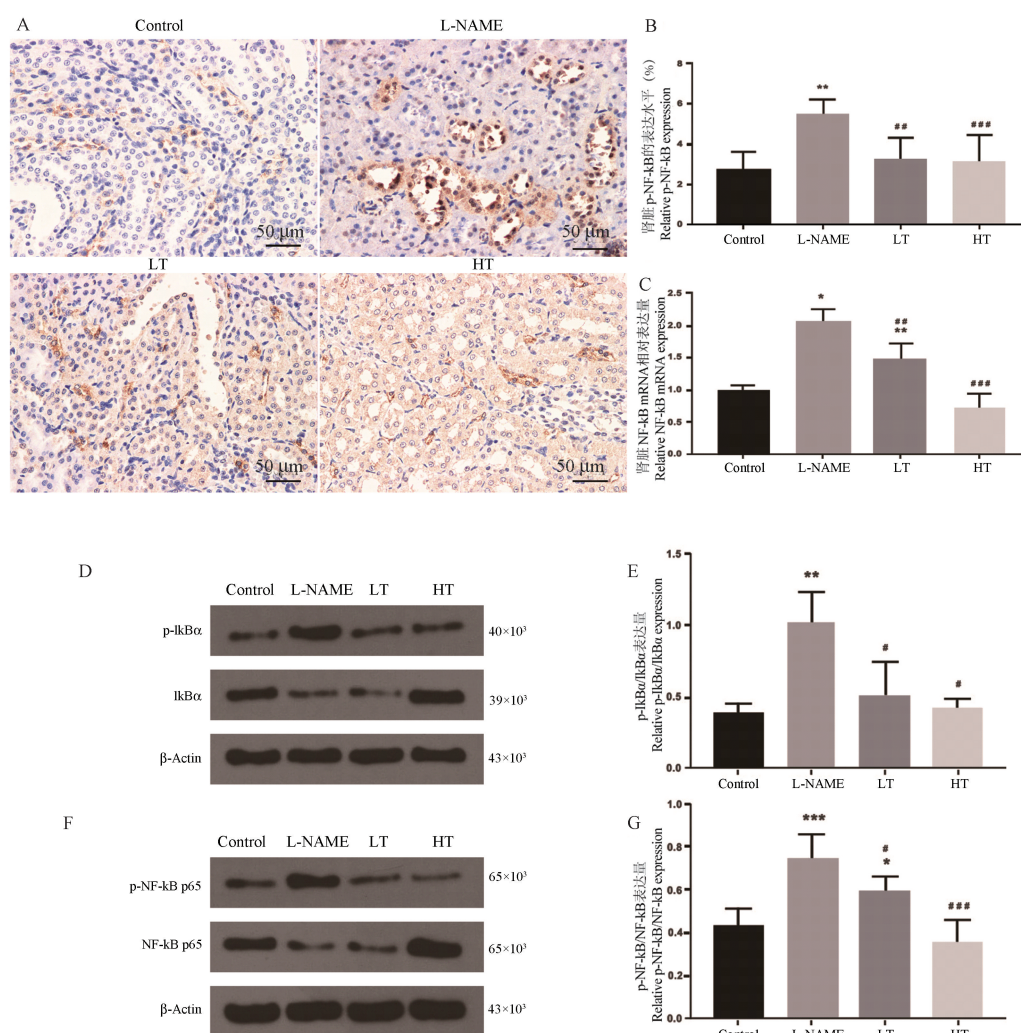
图 5 葫芦巴碱抑制 PE 大鼠胎盘中的 IκBα/NF-κB 信号通路 ($\bar{x} \pm s$)

Note. A, Immunohistochemical staining of placental tissue p-NF-κB in four groups of rats. B, p-NF-κB expression in the placenta. C, NF-κB mRNA level. D, Western blot images of p-NF-κB and IκBα. E, Ratio of p-NF-κB to IκBα. F, Western blot images of p-NF-κB and NF-κB. G, Ratio of p-NF-κB to IκBα. Compared with control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with LNAME group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 5 Inhibition of IκBα/NF-κB signaling pathway in PE rat placenta by Trigonelline

加相应增加,此外,在妊娠早期服用葫芦巴碱时,血压不低于正常水平,这表明葫芦巴碱不会因降低血压而降低母体灌注。最后,胎盘和肾的组织学检查表明葫芦巴碱起保护作用,而蛋白印迹和 PCR 分析提示葫芦巴碱的保护作用与 IκBα/NF-κB 途径抑制相关。

葫芦巴碱的预防性给药可预防 LNAME 诱导的 PE 样妊娠大鼠模型中血流介导的 FMD 峰值明显较低,而 FMD 是一种通过测量短暂性脑缺血后动脉直径的变化来评估内皮功能的技术,与使用内皮素,一氧化氮和其他生物标记物相比,FMD 具有无创,可靠且具有系列特征的特点,被广泛用于评估内皮



注:A:四组大鼠肾组织 p-NF-κB 的免疫组织化学染色;B:肾中 p-NF-κB 的表达;C:NF-κB 的 mRNA 水平;D:p-IκBα 和 IκBα 的蛋白质印迹图片;E:p-IκBα 与 IκBα 的比率;F:p-NF-κB 与 NF-κB 的蛋白质印迹图片;G:p-NF-κB 与 NF-κB 的比率。与对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 LNAME 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

图 6 葫芦巴碱抑制 PE 大鼠肾中的 IκBα/NF-κB 信号通路($\bar{x} \pm s$)

Note. A, Immunohistochemical staining p-NF-κB renal tissue in four groups of rats. B, p-NF-κB expression in the kidneys. C, NF-κB mRNA level. D, Western blot images of p-NF-κB and IκBα. E, Ratio of p-IκBα to IκBα. F, Western blot images of p-NF-κB and NF-κB. G, Ratio of p-NF-κB to NF-κB. Compared with control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared to the LNAME group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 6 Inhibition of IκBα/NF-κB signaling pathway in PE rat kidney by Trigonelline

功能,或者怀孕期间的心血管风险^[18]。葫芦巴碱改善可以内皮舒张功能从而表现为 FMD 峰值的增加,同时降低血管壁的切应力,并恢复 NO 和 eNOS 的血浆水平,改善由 LNAME 诱导的 PE 样大鼠的内皮功能障碍。PE 的病理机制与异常循环血管生成因子有关,可溶性酪氨酸激酶-1 (sFlt-1) 与循环的 PlGF 和 VEGF 结合,从而降低其在子宫胎盘和母体循环中的水平,导致内皮功能障碍,血管收缩和高血压^[19-20]。本研究的结果显示,葫芦巴碱改善孕鼠 sFlt-1 和 PlGF 的平衡,并降低了 sFlt-1/PlGF,表明

葫芦巴碱可以保护 LNAME 诱导的 PE 样大鼠的内皮功能。与健康对照组孕妇和非孕妇相比,PE 妇女的 TNF-α 和 IL-6 水平显著升高,并导致内皮功能障碍^[20]。近期文献报道^[21],甲醛吸入可引起小鼠肺和全身损伤,而葫芦巴碱的给药可降低血浆中的 TNF-α, IL-6 和 KC/GRO 水平,并降低胎盘中 TNF-α 的表达。我们的数据表明,葫芦巴碱的预防性给药可降低血浆中 TNF-α 和 IL-6 的水平,同时抑制 LNAME 诱导的 PE 样大鼠模型的胎盘和肾脏中 TNF-α 和 IL-6 的表达,这表明葫芦巴碱可降

低 LNAME 诱导的 PE 模型中的炎性细胞因子。NF- κ B 是调节炎症的重要因素,它在炎症反应的激活中起着关键作用,而炎症反应涉及许多重要的人类疾病^[22],例如心血管疾病和 PE,此外,研究表明^[23],NF- κ B 信号的激活加剧妊娠孕妇的内皮功能障碍。本研究的结果指出,葫芦巴碱对胎盘和肾的保护作用可能与 IkB α /NF- κ B 信号通路有关,通过抑制其表达和激活而降低胎盘和肾的炎症状态。

总之,本研究的结果表明,葫芦巴碱在 LNAME 诱导的 PE 样大鼠模型中的预防性使用可减轻 PE 症状,促进胎儿生长,保护内皮功能并抑制 IkB α /NF- κ B 途径以减少炎症反应。

参考文献:

- [1] Sen P, Ghosh D, Sarkar C. Erythrocytic membrane anionic charge, sialic acid content, and their correlations with urinary glycosaminoglycans in preeclampsia and eclampsia [J]. Scand J Clin Lab Invest, 2020, 80(4): 343-347.
- [2] Tong J, Niu Y, Chen ZJ, et al. Comparison of the transcriptional profile in the decidua of early - onset and late - onset pre - eclampsia [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2020, 46(7): 1055-1066.
- [3] Rajakumar A, Kane MA, Yu J, et al. Aberrant retinoic acid production in the decidua: Implications for pre-eclampsia [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2020, 46(7): 1007-1016.
- [4] 吴鹏,陶婷,施芳,等. 孕期胎盘生长因子动态检测联合高危因素对子痫前期的预测价值 [J]. 中南医学科学杂志, 2020, 48(4): 399-402.
- [5] 于雅卉,冯欣. 药物基因组学在妊娠期高血压疾病中的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(12): 1726-1728, 1732.
- [6] 陈小燕,陈翔宇,周静. 肾功能损害相关指标、生长因子及 Th1/Th2 细胞因子相关水平与妊娠期高血压综合征的相关性分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(10): 1213-1215.
- [7] 程惠,周曙光. PLGF、IL-6 与妊娠期高血压病情程度及母婴结局的相关性 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(5): 674-677.
- [8] Sathiyaseelan A, Saravanakumar K, Jayalakshmi J, et al. Trigonelline-loaded chitosan nanoparticles prompted antitumor activity on glioma cells and biocompatibility with pheochromocytoma cells [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 163: 36-43.
- [9] 殷姜文,葛明月,李燕,等. TGF- β /SMAD/JNK 通路参与异氟醚后处理减轻大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤 [J]. 临床麻醉学杂志, 2020, 36(6): 574-578.
- [9] Sasaki M, Nonoshita Y, Kajiya T, et al. Characteristic analysis of trigonelline contained in raphanus sativus cv. sakurajima daikon and results from the first trial examining its vasodilator properties in humans [J]. Nutrients, 2020, 12(6): 1872.
- [10] 杜梦繁,张光远,王志玮,等. 基于 LNAME 诱导的高血压小鼠血清代谢组学研究 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(12): 1775-1776.
- [11] 何英姿,黄承飞. 葛根素对妊娠高血压模型大鼠血管活性物质及胎盘组织的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(14): 2042-2044.
- [12] 姚媛媛,张杰. 血栓弹力图在妊娠期高血压疾病中的应用价值 [J]. 血栓与止血学, 2020, 26(4): 592-593, 595.
- [13] 保莉,王妍,刘冉冉,等. 血管紧张素转化酶抑制剂对嘌呤霉素肾炎模型治疗及预防肾小球硬化的作用 [J]. 宁夏医学杂志, 2015, 37(3): 197-199, 192.
- [14] 杨娟娟,韩冰. 硫酸镁负荷疗法对中重度妊娠高血压综合征的疗效 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2020, 30(12): 130-131.
- [15] 彭凯欣. 围生期保健及补钙预防妊娠高血压综合征的临床效果 [J]. 中国当代医药, 2020, 27(13): 71-73.
- [16] 关晶,何琼,王晓侠. 妊娠高血压孕妇补充钙剂、铁剂对妊娠结局及胎儿生长受限的预防作用 [J]. 现代实用医学, 2020, 32(4): 535-537.
- [17] 杨玲,马玉静,肖定福,等. 葫芦巴生物学功能研究进展及其应用 [J]. 动物营养学报, 2020, 32(1): 62-70.
- [18] 方砚,王效浣,郭朝霞. 血流介导性血管扩张评价心血管病患者肱动脉内皮功能的研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2019, 40(5): 793-796.
- [19] Manley CN, Deepak V, Ravikumar N, et al. Transcription factor AP2A affects sFLT1 expression and decidualization in decidual stromal cells: Implications to preeclampsia pathology [J]. Pregnancy Hypertens, 2020, 21: 152-158.
- [20] 朱宇,王素萍,史彦涛. 血清炎症因子在子痫前期病人发病中的作用机制及与氧化应激因子的相关性 [J]. 蚌埠医学院学报, 2020, 45(6): 799-802.
- [21] 代良萍,谢晓芳,熊亮,等. 益母草注射液水溶性生物碱——胆碱和葫芦巴碱对子宫收缩活动的影响 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(10): 2328-2331.
- [22] 林培红. HSP70、NF- κ B 与子痫前期发病的关系 [J]. 中国当代医药, 2015, 22(31): 13-15, 20.
- [23] 陈芳荣,龚护民,茹美艳,等. 子痫前期患者胎盘 NF- κ B 的表达及其与细胞因子变化的相关性 [J]. 海南医学, 2014, 25(4): 483-486.

[收稿日期]2020-08-10