

林檎叶提取物对 N_{ω} -硝基-L-精氨酸(L-NNA)诱导 KM 小鼠高血压的预防效果

廖雪艳¹, 王琦², 汪克纯^{1*}

(1. 四川大学华西第四医院, 老年医学/心血管内科, 四川成都 610041)

(2. 成都市第六人民医院检验科, 四川成都 610051)

摘要: 该研究旨在探讨林檎叶在 L-NNA 诱导的小鼠高血压模型中的预防作用。林檎叶提取物可降低高血压小鼠收缩压 (SBP)、平均血压 (MBP)、舒张压 (DBP)。林檎叶提取物作用高血压小鼠后, 小鼠血清、心脏、肝脏、肾脏、胃中的一氧化氮 (NO) 含量均高于模型组, 丙二醛 (MDA) 含量低于模型组。林檎叶提取物作用高血压小鼠后血清内皮素-1 (ET-1)、血管内皮生长因子-A (VEGF-A)、E-selectin 水平降低, 但降钙素基因相关肽 (CGRP) 水平升高。林檎叶提取物作用高血压小鼠可使小鼠心脏和血管组织中的血红素加氧酶-1 (HO-1)、神经元型一氧化氮合酶 (nNOS)、内皮型一氧化氮合酶 (eNOS)、受体活性修饰蛋白 2 (RAMP2) mRNA 表达上调, 肾上腺髓质素 (ADM)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 表达下调。分析结果显示, 林檎叶提取物含有金丝桃苷、异槲皮苷、二氢槲皮素、槲皮苷、橙皮苷、杨梅素、异黄芩苷、新橙皮苷二氢查尔酮、槲皮素, 含量分别为 104.92、83.05、15.14、242.83、60.24、13.87、125.53、11.23、28.92 mg/g。同时高浓度林檎叶提取物具有更好的预防作用, 与高血压药物卡托普利相近。这些结果表明, 林檎叶对实验性高血压具有良好的预防作用。

关键词: 林檎叶; 高血压; L-精氨酸 (L-NNA); 一氧化氮合酶 (NOS); 小鼠

文章编号: 1673-9078(2022)01-134-142

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.0484

Preventive Effect of *Malus* Leaf Extract on Hypertension Induced by L-NNA in Mice

LIAO Xueyan¹, WANG Qi², WANG Kechun^{1*}

(1. Geriatric/Cardiovascular Department, West China Fourth Hospital Sichuan University, Chengdu 610041, China)

(2. Laboratory Department, the Sixth People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610051, China)

Abstract: The preventive effect of *Malus* leaves extract in a model of L-NNA-induced hypertension mice was investigated in this study. The systolic blood pressure (SBP), i.e. the blood pressure (MBP) and diastolic blood pressure (DBP) in hypertensive mice were reduced by treatment with *Malus* leaf extract. After treatment of hypertension mice with *Malus* leaf extract, the levels of nitric oxide (NO) in the serum, heart, liver, kidney, and stomach of the mice were higher than those in the model group, while the levels of malondialdehyde (MDA) were lower than those in the model group. The serum levels of endothelin-1 (ET-1), vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), E-selectin were decreased, but the level of calcitonin gene related peptide (CGRP) was increased in hypertension mice treated with *Malus* leaf extract. The mRNA expression of heme oxygenase-1 (HO-1), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and receptor activity modifying protein 2 (RAMP2) in heart and vascular tissues of hypertensive mice were up-regulated, and the expressions of adrenomedullin (ADM), and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were down-regulated by *Malus* leaf extract. The results showed that

引文格式:

廖雪艳,王琦,汪克纯.林檎叶提取物对 N_{ω} -硝基-L-精氨酸(L-NNA)诱导 KM 小鼠高血压的预防效果[J].现代食品科技,2022,38(1): 134-142

LIAO Xueyan, WANG Qi, WANG Kechun. Preventive effect of *Malus* leaf extract on hypertension induced by L-NNA in KM mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 134-142

收稿日期: 2021-05-07

作者简介: 廖雪艳 (1985-), 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 高血压、心衰防治机制, E-mail: lxyalice77@126.com

通讯作者: 汪克纯 (1966-), 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 冠心病防治机制, E-mail: horse434000@sohu.com

Malus leaf extract contain hyperoside, isoquercitrin, dihydroquercetin, quercitrin, hesperidin, myricetin, isobaicalin, neohesperidin dihydrochalcone and quercetin, and the contents were 104.92, 83.05, 15.14, 242.83, 60.24, 13.87, 125.53, 11.23 and 28.92 mg/g, respectively. Meanwhile high concentration of *Malus* leaf extract had better preventive effect, which was close to the hypertension drug captopril. These results suggest that leaves of *Malus* leaf have a good preventive effect on experimental hypertension.

Key words: *Malus* leaf; hypertension; L-NNA; Nitric oxide synthase (NOS); mice

高血压是一种临床综合症, 主要特征表现为人体的收缩压大于等于 140 mm Hg 和舒张压大于等于 90 mm Hg。高血压病的发病机制较为复杂, 肝、肾、心、脾功能失调造成机体的正常生理活动失衡, 从而可能导致机体出现高血压^[1]。高血压除了对大脑有损害, 也会一定程度造成心脏和肾脏的损伤, 甚至也会对眼睛造成影响, 是一种对多个人体器官有危害的疾病, 2018 年全国高血压调查结果发现我国 18 岁及以上成人高血压患病率为 27.9%, 而且患病率呈上升趋势^[2]。天然无毒的植物, 特别是可作为食品直接使用的植物, 已经被证实能通过促进血液循环、缓解血瘀、调节血脂、恢复血压调节来起到良好的高血压预防和干预效果^[3-5]。林檎 (*Malus pumila*) 可作为中药使用, 林檎叶则可以制成保健茶作为饮品进行使用, 林檎叶作为一种食品资源已广泛使用^[6]。研究显示林檎叶含有丰富的黄酮、多种氨基酸、生物碱以及多种矿物质成分^[7]。林檎叶能够提高人体免疫力和提高人体细胞新陈代谢的活性都有一定的作用, 同时林檎叶还具有较好的抗氧化效果、改善心脏功能和促进微循环的效果^[8], 林檎叶的这些生物活性作用都将可能产生预防和干预高血压的作用。

由于高血压是一种综合症, 发病的原因也不尽相同, 临床上在药物的选择上也需要区分对待, 患病后用药和治疗都较为复杂。但是不同原因造成的高血压大部分具有相同的特点, 体内一氧化氮的水平均有异常。一氧化氮的一个重要生理作用是调节血管张力, 降低血压^[9]。研究报道一氧化氮是预防包括高血压在内的心脑血管疾病的关键因子^[10]。L-精氨酸是一种一氧化氮合成酶抑制剂, 能抑制一氧化氮的生成, 从而导致实验性高血压, 常用于诱导实验动物高血压^[11]。NOS 抑制剂能抑制多种血管舒张因子调控的内皮依赖性舒张^[12]。大量 NOS 抑制剂能在短时间内强烈抑制小鼠血管内皮细胞中的一氧化氮的生成, 改变血管组织结构, 导致内皮功能受损和动脉血压升高, 从而维持动物持续高血压^[13]。通过调控机体内的 NOS/NO, 可以起到预防和干预高血压的作用^[10]。能够调控机体内的 NOS/NO 水平的天然食品在维持人体健康, 保持血压平稳上具有重要的现实意义。林檎叶对心脏功能的调节作用也可能来源于其对 NOS/NO 的调节作用,

本研究将对其进一步验证。

本研究也采用 L-NNA 诱导小鼠发生高血压, 建立动物实验模型, 对林檎叶提取物预防实验性高血压的效果进行研究。通过测定小鼠的血压与分析小鼠血液和组织中的相关指标验证林檎叶提取物的效果, 并结合林檎叶提取物的成分分析, 初步探讨了林檎叶对高血压预防作用的机制, 为进一步开发林檎叶为功能性食品积累理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

林檎叶, 重庆市巫山县峡江茶业有限公司; 一氧化氮 (NO)、丙二醛 (MDA)、内皮素-1 (ET-1)、降钙素基因相关肽 (CGRP)、血管内皮生长因子-A (VEGF-A) 和 E-选择素 (E-selectin), 南京建成生物工程研究所; RNAzol 试剂, 血红素加氧酶-1 (HO-1)、肾上腺髓质素 (ADM)、受体活性修饰蛋白 2 (RAMP2)、神经元型一氧化氮合酶 (nNOS)、内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 引物, 美国赛默飞公司; Oligo(dT)18、RNase、dNT 和 MLV 酶, 瑞士罗氏公司; 异槲皮苷、橙皮苷、杨梅素、新橙皮苷二氢查尔酮、槲皮苷、二氢槲皮素、黄芩苷、槲皮素和金丝桃苷标准品, 上海源叶生物科技有限公司; No-硝基-L-精氨酸 (L-NNA), 上海信帆生物研究所; 卡托普利, 美国 Sigma 公司; 其余试剂为分析纯。

雄性昆明 (KM) 小鼠购于重庆医科大学, 动物生产许可证号: SCXK(渝)2018-0003。

1.2 仪器与设备

Biomate3S 分光光度仪、Sepone Plus 定量 PCR 仪、U3000 高效液相色谱仪, 均为美国赛默飞公司; RE-201D 旋转蒸发仪, 郑州长征仪器制造有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 林檎叶提取物的制备

称取干燥的林檎叶 200 g, 将其粉碎后按液料比 20:1 加入 70%乙醇, 在 60 °C 水浴下提取 3 h, 抽滤,

收集粗提取液,然后提取液过 FL-3 大孔树脂 3 次,将最后的提取液进行旋转蒸发得到林檎叶提取物。

1.3.2 林檎叶提取物的高效液相色谱法成分分析

精密称取干燥的异槲皮苷、橙皮苷、杨梅素、新橙皮苷二氢查尔酮、槲皮苷、二氢槲皮素、黄芩苷、槲皮素、金丝桃苷标准品各 2 mg 置于 5 mL 的离心管中,再分别加入 2 mL 的 99% 甲醇溶液混匀,作为标准储备液。按色谱条件测定林檎叶提取物的成分,色谱柱: Thermo Scientific Accucore C18 (4.6 mm×150 mm、2.6 μm), 梯度洗脱的流动相 C 为乙腈,流动相 B 为 0.5% 冰醋酸水溶液,流速 0.5 mL/min,柱温 35 °C,检测波长 360 nm,进样量为 10 μL。依据 HPLC 法对林檎叶提取物用外标峰面积法计算其组成化合物的含量,计算公式如下:

$$M_C = C_1 \times A_1 \times C \div A_R$$

式中:

M_C ——样品中各组成成分的含量, mg/g;

C_1 ——标准品浓度, mg/mL;

A_R ——标准品峰面积;

A_1 ——样品峰面积;

C ——样品原液浓度, 0.0025 g/mL。

1.3.3 动物实验

50 只 7 周龄雄性 KM 小鼠在温度为 25±2 °C、相对湿度 50±5%、2 h/12 h 光/暗循环的环境下适应性饲养一周后,将小鼠随机分为 5 组,分别为正常组、模型组,林檎叶低浓度组,林檎叶高浓度组和卡托普利组(药物阳性对照组)。所有小鼠自由摄取饮食和饮水,实验开始后第 1 d 到第 20 d,正常组和模型组小鼠每日每只灌胃 0.2 mL 蒸馏水,林檎叶低浓度组和高浓度组小鼠每日按浓度 50 和 100 mg/kg 灌胃林檎叶提取物,卡托普利组小鼠每日按浓度 50 mg/kg 灌胃卡托普利溶液。从第 21 d 开始到第 30 d,除正常组外其余各组小鼠按浓度 700 mg/kg 灌胃 L-NNA,同时林檎叶低浓度组和高浓度组小鼠每日继续按浓度 50 和 100 mg/kg 灌胃林檎叶提取物,卡托普利组小鼠也继续每日按浓度 50 mg/kg 灌胃卡托普利溶液^[14]。实验过程中每 5 d 采用鼠尾袖带法测定 L-NNA 处理后 45 min 的收缩压(SBP)、平均压(MBP)和舒张压(DBP)。实验 30 d 后对所有小鼠采用断颈法处死小鼠,取心、肝、肾、胃组织及血样。本研究中实验方案经四川大学华西第四医院实验动物伦理委员会批准,伦理审批批准号: Gwll2020028。

1.3.4 小鼠组织中 NO 和 MDA 含量的测定

采用生化试剂盒测定心、肝、肾、胃组织中 NO

和 MDA 的含量。

1.3.5 小鼠血清中 NO、MDA、ET-1 和 CGRP 的水平测定

采用试生化试剂盒测定血清 NO、MDA、ET-1 和 CGRP 的水平,采用 ELISA 试剂盒测定血清 VEGF 水平。

1.3.6 小鼠组织中 mRNA 表达的测定

使用 RNAzol 试剂从心肌组织中提取总 RNA。测定提取总 RNA 的浓度后然后调整浓度到 1 μg/μL。然后在总 RNA 提取液中分别加入 1 μL 的 Oligo(dT)18、RNase、dNT、MLV 酶和 10 μL 的 5×buffer。在 37 °C 持续 120 min、99 °C 持续 4 min 和 4 °C 持续 3 min 条件下合成 cDNA。然后再加入上下游引物(表 1)各 1 μL 充分混合后,溶液在 95 °C 持续 90 s,40 个循环的 95 °C 持续 30 s、60 °C 持续 30 s、72 °C 持续 30 s、95 °C 持续 30 s 和 55 °C 持续 35 s。按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对于模型组其余各组不同表达的相对基因表达水平,其中 GAPDH 作为持家基因进行实验^[15]。

表 1 本研究使用的 qPCR 引物

Table 1 qPCR primers were used in this study

引物名	引物序列
HO-1	上游序列:5'-GATAGAGCGCAACAAGCAGAA-3'
	下游序列:5'-CAGTGAGGCCCATACCAGAAG-3'
ADM	上游序列:5'-GCTGGTTTCCGTCGCCCTGATGT-3'
	下游序列:5'-CGTTGTCCTTGTCTTATCTGTG-3'
RAMP2	上游序列:5'-GGACGGTGAAGAAGTATGAG-3'
	下游序列:5'-ATCATGGCCAGGAGTACATC-3'
nNOS	上游序列:5'-CCCAACGTCAITTTCTGTCCGT-3'
	下游序列:5'-TCTACCAGGGGCCGATCATT-3'
eNOS	上游序列:5'-TCAGCCATCACAGTGTTCCT-3'
	下游序列:5'-ATAGCCCGCATAGCGTATCAG-3'
iNOS	上游序列:5'-GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA-3'
	下游序列:5'-GTGGACGGGTCGATGTCAC-3'
GAPDH	上游序列:5'-TGGCTTCCGTGTTCTTAC-3'
	下游序列:5'-GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA-3'

1.4 统计学分析

实验数据以平均值表示±标准偏差。采用单因素方差分析(ANOVA)和邓肯多区间检验(Duncan's multiple range tests)评估各组间的平均值在 $p < 0.05$ 水平下是否具有统计学差异。

2 结果与讨论

2.1 林檎叶提取物的成分分析

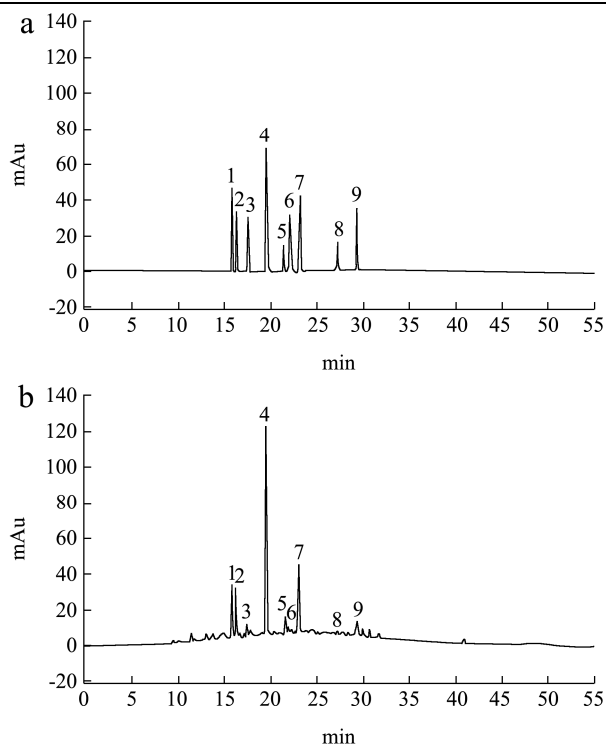


图1 林檎叶成分分析的高效液相色谱图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of the components in *Malus* leaf

注: a 标准品图谱; b 林檎叶图谱; 1: 金丝桃苷、2: 异槲皮苷、3: 二氢槲皮素、4: 槲皮苷、5: 橙皮苷、6: 杨梅素、7: 异黄酮苷、8: 新橙皮苷二氢查尔酮、9: 槲皮素。

如图1所示, 样品峰与杂质峰之间分离明显, 基线平稳, 基本可以对林檎叶中的化合物成分进行定性分析。发现所测林檎叶中的黄酮类物质占主要成分, 提取物中有9种物质, 分别是金丝桃苷、异槲皮苷、二氢槲皮素、槲皮苷、橙皮苷、杨梅素、异黄酮苷、新橙皮苷二氢查尔酮、槲皮素, 含量分别为104.92、83.05、15.14、242.83、60.24、13.87、125.53、11.23、28.92 mg/g。金丝桃苷、异槲皮苷、二氢槲皮素、槲皮苷、橙皮苷、杨梅素、异黄酮苷、新橙皮苷二氢查尔酮、槲皮素均具有良好的抗氧化效果, 且具有一定的抗炎作用, 能够调节机体, 发挥有益作用^[16-21]。特别是二氢槲皮素、槲皮苷、橙皮苷、杨梅素和槲皮素已经被验证具有活化血管的作用, 通过对心血管活力的增强作用, 发挥干预高血压的作用^[21-25], 特别是含量最高的槲皮苷, 已被研究证实具有舒张血管的作用^[26], 从而有可能是林檎叶发挥预防高血压作用的最关键成分; 金丝桃苷在林檎叶提取物中的含量也较高, 有研究表明金丝桃苷能够调节血管张力, 抑制血管重塑, 从而起到降血压的作用^[27]。这9种化合物已经被证实具有对人体有利的活性作用, 这些有效活性物质的联合作用可能使林檎叶具有预防高血压的作用, 但是这些化合物的联合作用与单独化合物作用之间的差

异有待进一步研究, 天然化合物组成的优势也有待深入研究。

2.2 林檎叶提取物对小鼠血压的影响

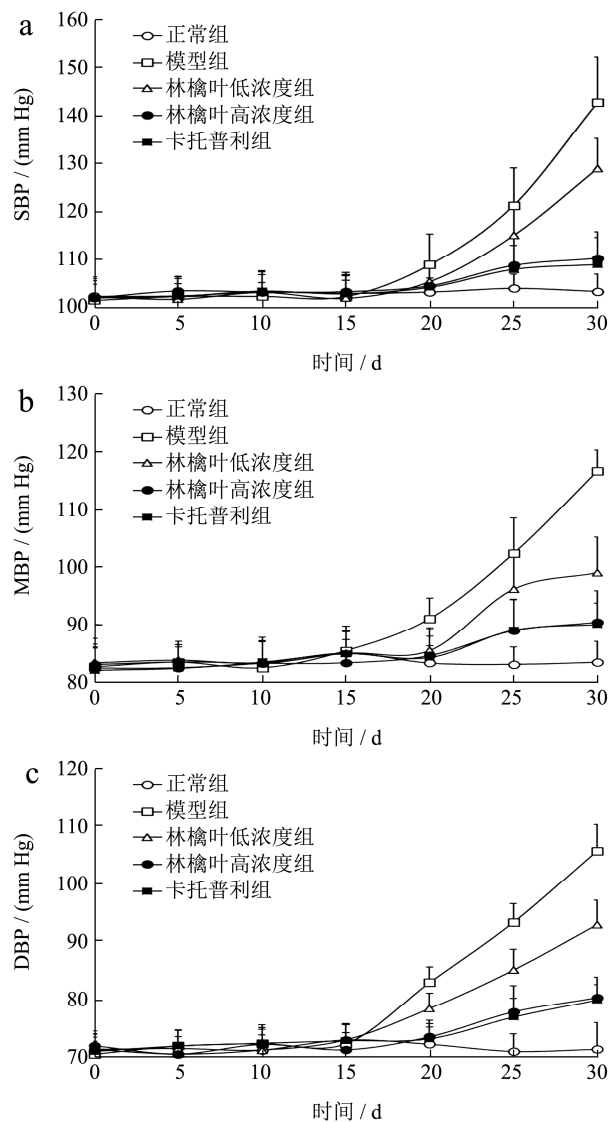


图2 林檎叶对L-NNA诱导的高血压小鼠SBP(a)、MBP(b)和DBP(c)的影响

Fig.2 Effects of *Malus* leaf on SBP (a), MBP (b) and DBP (c) in L-NNA-induced hypertension mice

研究证实林檎叶用70%乙醇溶液提取得到的提取物无毒性作用, 是安全的天然提取物^[28], 因此本研究中直接采用林檎叶提取物对高血压小鼠进行作用。在L-NNA作用前, 除卡托普利组外, 各组小鼠的收缩压(SBP)、平均血压(MBP)和舒张压(DBP)无显著差异($p < 0.05$), 而卡托普利组小鼠的血压低于其余各组(图2)。而小鼠经过L-NNA作用后, 相较于未经过L-NNA作用的正常组小鼠, 其余各组小鼠的SBP、MBP和DBP均升高。其中模型组小鼠的SBP、MBP和DBP均高于其他各组, 林檎叶低浓度组小鼠

的 SBP、MBP 和 DBP 也高于林檎叶高浓度组和卡托普利组小鼠, 林檎叶高浓度组小鼠的 SBP (110.35 mm Hg)、MBP (90.35 mm Hg) 和 DBP (80.35 mm Hg) 仅高于正常组 (103.39 mm Hg、83.39 mm Hg、71.39 mm Hg) 和卡托普利组 (108.97 mm Hg、89.97 mm Hg、79.97 mm Hg), 且林檎叶高浓度组和卡托普利组之间无显著差异, 都低于林檎叶低浓度组。血压测定的结果显示在 L-NNA 作用前, 卡托普利已经起到降低血压的作用, 对普通小鼠的血压有一定的副作用。L-NNA 建模后小鼠血压上升, 建模成功, 林檎叶起到了降血压作用, 且无明显副作用。

2.3 林檎叶提取物对小鼠 NO 含量的影响

如表 2 所示, 正常组小鼠的血清及心、肝、肾、胃组织中 NO 含量最高, 分别为 6.86 $\mu\text{mol/L}$ 、7.99 $\mu\text{mol/g prot}$ 、2.67 $\mu\text{mol/g prot}$ 、7.59 $\mu\text{mol/g prot}$ 和 9.55 $\mu\text{mol/g prot}$, 而模型组小鼠的 NO 含量最低, 分别为 3.76 $\mu\text{mol/L}$ 、3.01 $\mu\text{mol/g prot}$ 、0.41 $\mu\text{mol/g prot}$ 、3.27 $\mu\text{mol/g prot}$ 和 5.26 $\mu\text{mol/g prot}$ 。林檎叶高浓度组和卡托普利组小鼠上述组织中 NO 含量均显著高于模型组 ($p < 0.05$) 和林檎叶低浓度组。而林檎叶高浓度 (5.36 $\mu\text{mol/L}$ 、5.98 $\mu\text{mol/g prot}$ 、2.02 $\mu\text{mol/g prot}$ 、3.27 $\mu\text{mol/g prot}$ 、8.36 $\mu\text{mol/g prot}$) 和卡托普利 (5.40 $\mu\text{mol/L}$ 、6.02 $\mu\text{mol/g prot}$ 、2.09 $\mu\text{mol/g prot}$ 、3.27 $\mu\text{mol/g prot}$ 、8.45 $\mu\text{mol/g prot}$) 提升 NO 含量的能力强于林檎叶低浓度。NO 作为体内重要的信号分子, 能激活血

管平滑肌细胞中可溶性鸟苷酸环化酶, 产生 cGMP, 激活一系列生理效应, 舒张血管平滑肌, 降低血压^[29]。当一氧化氮合成受阻时, 血管表现为血管舒张功能障碍和小动脉纤维化, 从而升高血压并形成高血压。林檎叶提取物也与以往的研究^[17]得到了相似的结果, 活性成分通过调控 NO 含量能发挥降血压作用。

2.4 林檎叶提取物对小鼠 MDA 含量的影响

L-NNA 诱导小鼠高血压后, 模型组小鼠血清、心脏、肝脏、肾脏和胃中的 MDA 含量最高 (11.69 nmol/mL、4.52 nmol/mg prot、1.09 nmol/mg prot、2.96 nmol/mg prot、3.52 nmol/mg prot, 表 3)。林檎叶和卡托普利能显著降低高血压小鼠的 MDA 含量 ($p < 0.05$), 且林檎叶高浓度 (4.92 nmol/mL、2.78 nmol/mg prot、0.50 nmol/mg prot、1.62 nmol/mg prot、2.03 nmol/mg prot) 和卡托普利 (4.86 nmol/mL、2.75 nmol/mg prot、0.49 nmol/mg prot、1.57 nmol/mg prot、1.96 nmol/mg prot) 能使高血压小鼠的血清和组织 MDA 含量接近正常小鼠, 同时林檎叶高浓度和卡托普利效果相当, 均显著低于林檎叶低浓度组 ($p < 0.05$)。NO 含量较低会导致自由基攻击内皮细胞膜^[30]。脂质过氧化, 最终产物为丙二醛。因此, 许多研究通过检测体内 NO 和 MDA 水平来判断高血压的严重程度^[31], 林檎叶提取物也得到了类似的结果, 能够下调 MDA 水平起到抑制高血压造成的机体损伤, 体现出预防和干预高血压的重要作用。

表 2 L-NNA 致高血压小鼠血清、心、肝、肾、胃中一氧化氮含量的变化

Table 2 The nitric oxide contents in serum, heart, liver, kidney and stomach of L-NNA induced hypertension mice (mean \pm SD, n=10)

组别	血清/ $(\mu\text{mol/L})$	心脏/ $(\mu\text{mol/g prot})$	肝脏/ $(\mu\text{mol/g prot})$	肾脏/ $(\mu\text{mol/g prot})$	胃/ $(\mu\text{mol/g prot})$
正常组	6.86 \pm 0.18 ^a	7.99 \pm 1.23 ^a	2.67 \pm 0.21 ^a	7.59 \pm 0.47 ^a	9.55 \pm 0.42 ^a
模型组	3.76 \pm 0.08 ^d	3.01 \pm 0.27 ^d	0.41 \pm 0.07 ^d	3.27 \pm 0.22 ^d	5.26 \pm 0.38 ^d
林檎叶低浓度组	4.33 \pm 0.11 ^c	3.89 \pm 0.20 ^c	1.03 \pm 0.15 ^c	4.19 \pm 0.26 ^c	6.89 \pm 0.36 ^c
林檎叶高浓度组	5.36 \pm 0.12 ^b	5.98 \pm 0.25 ^b	2.02 \pm 0.18 ^b	3.27 \pm 0.22 ^d	8.36 \pm 0.40 ^b
卡托普利组	5.40 \pm 0.15 ^b	6.02 \pm 0.22 ^b	2.09 \pm 0.19 ^b	3.27 \pm 0.22 ^d	8.45 \pm 0.39 ^b

注: 不同字母表示对应两组之间在 $p < 0.05$ 水平具有显著差异, 相同字母表示对应两组之间在 $p < 0.05$ 水平没有显著差异, 表 3、表 4、图 2 和图 3 同。

表 3 L-NNA 致高血压小鼠血清、心、肝、肾、胃中丙二醛含量的变化

Table 3 The malonaldehyde contents in serum, heart, liver, kidney and stomach of L-NNA induced hypertension mice (mean \pm SD, n=10)

组别	血清/ (nmol/mL)	心脏/ (nmol/mg prot)	肝脏/ (nmol/mg prot)	肾脏/ (nmol/mg prot)	胃/ (nmol/mg prot)
正常组	3.79 \pm 0.38 ^d	2.03 \pm 0.18 ^d	0.33 \pm 0.07 ^d	1.11 \pm 0.15 ^d	1.23 \pm 0.17 ^d
模型组	11.69 \pm 0.52 ^a	4.52 \pm 0.28 ^a	1.09 \pm 0.15 ^a	2.96 \pm 0.31 ^a	3.52 \pm 0.24 ^a
林檎叶低浓度组	7.68 \pm 0.29 ^b	3.80 \pm 0.21 ^b	0.85 \pm 0.12 ^b	2.10 \pm 0.21 ^b	2.77 \pm 0.18 ^b
林檎叶高浓度组	4.92 \pm 0.19 ^c	2.78 \pm 0.16 ^c	0.50 \pm 0.16 ^c	1.62 \pm 0.15 ^c	2.03 \pm 0.22 ^c
卡托普利组	4.86 \pm 0.22 ^c	2.75 \pm 0.18 ^c	0.49 \pm 0.19 ^c	1.57 \pm 0.13 ^c	1.96 \pm 0.18 ^c

表 4 L-NNA 致高血压小鼠血清 ET-1、CGRP、VEGF 和 E-selectin 水平的变化

Table 4 The ET-1, CGRP, VEGF and E-selectin serum levels of L-NNA induced hypertension mice (mean±SD, n=10)

组别	ET-1/(pg/mL)	CGRP/(pg/mL)	VEGF/(pg/mL)	E-selectin/(ng/mL)
正常组	68.92±5.24 ^d	184.02±8.52 ^a	106.52±7.88 ^d	408.93±22.50 ^d
模型组	110.57±7.20 ^a	55.69±4.32 ^d	341.48±11.59 ^a	855.97±35.14 ^a
林檎叶低浓度组	94.14±6.03 ^b	78.92±5.89 ^c	274.36±10.65 ^b	742.09±22.81 ^b
林檎叶高浓度组	75.17±5.36 ^c	147.82±7.55 ^b	202.45±8.92 ^c	547.63±24.53 ^c
卡托普利组	72.39±4.98 ^c	150.68±8.28 ^b	195.79±11.33 ^c	539.98±21.99 ^c

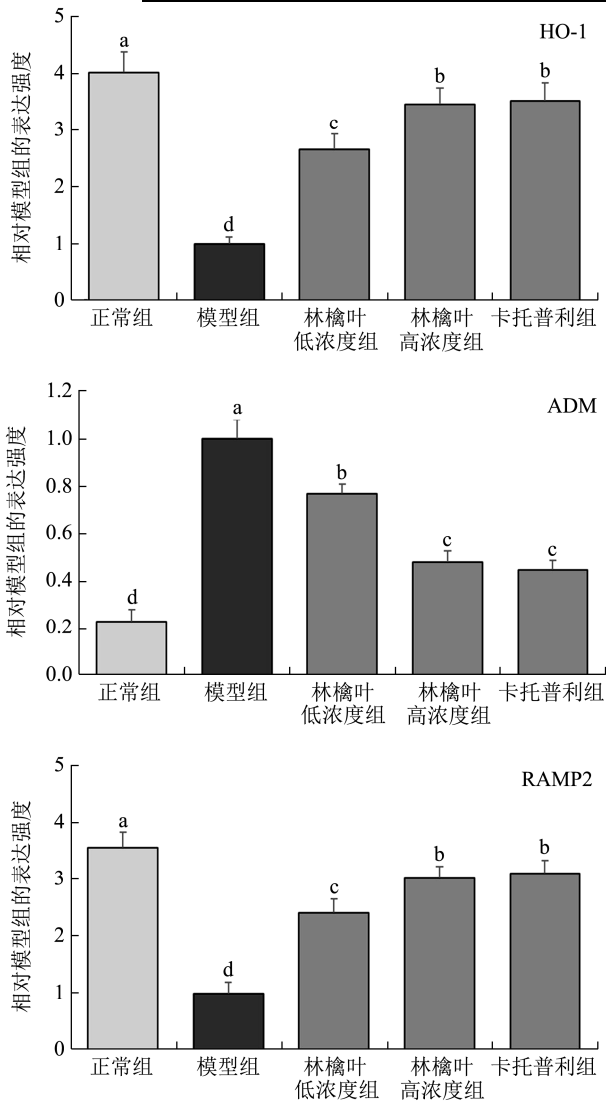


图 3 林檎叶对 L-NNA 诱导的高血压小鼠心肌组织中 HO-1、ADM 和 RAMP2 的 mRNA 表达的影响

Fig.3 Effects of *Malus* leaf on the mRNA expression of HO-1, ADM and RAMP2 in heart muscle of L-NNA induced hypertension mice

2.5 林檎叶提取物对小鼠血清 ET-1、CGRP、VEGF-A 和 E-selectin 水平的影响

与正常小鼠相比, L-NNA 诱导的高血压小鼠血清

的 ET-1、VEGF-A 和 E-selectin (110.57 pg/mL、341.48 pg/mL、855.97 ng/mL) 水平显著升高 ($p<0.05$), 而 CGRP 水平显著降低 (55.69 pg/mL, $p<0.05$, 表 4)。林檎叶和卡托普利可降低高血压小鼠血清 ET-1、VEGF-A、E-selectin 水平和提升 CGRP 水平, 且林檎叶高浓度 (75.17、147.82、202.45、547.63 ng/mL) 和卡托普利 (72.39、150.68、195.79、539.98 ng/mL) 对 ET-1、CGRP、VEGF-A 和 E-selectin 水平作用相似, 无显著差异 ($p<0.05$)。且林檎叶高浓度组和卡托普利调控小鼠血清 ET-1、CGRP、VEGF-A 和 E-selectin 水平能力显著强于林檎叶低浓度组 ($p<0.05$)。ET-1 是血管收缩活性多肽, 能使血管平滑肌肥大, 促进血管壁增生和狭窄, 保持血管通畅^[32]。CGRP 也是体内重要的血管活性多肽之一, 其分泌失衡在血管内皮细胞损伤导致高血压的病理过程中起着重要作用^[33]。VEGF-A 是一种血管活性物质, 在调节血管舒缩和血管重塑中起重要作用, 它是血管内皮细胞中一种特异的促细胞因子和血管生成因子, 能促进血管内皮细胞有丝分裂, 刺激内皮细胞增殖, 促进血管生成^[34]。血管内皮细胞受损后内皮细胞变性、坏死、脱落, 动脉壁动脉硬化, 管腔狭窄变形, 从而导致 E-selectin 水平异常上升, 降低 E-selectin 水平也是抑制高血压的手段之一^[35]。林檎叶提取物也具有对 ET-1、CGRP、VEGF-A 和 E-selectin 水平调节的作用, 也证实了与其他研究一样可通过调控 ET-1、CGRP、VEGF-A 和 E-selectin 水平能够起到预防高血压的作用^[32-34]。

2.6 林檎叶提取物对小鼠心肌组织中 HO-1、ADM 和 RAMP2 表达的影响

正常组小鼠心肌组织中 HO-1 和 RAMP2 mRNA 表达最强 (模型组表达强度的 4.02 和 3.56 倍, 图 3), 而 ADM 表达最弱 (模型组表达强度的 0.23 倍); 模型组小鼠呈现出与正常组相反的趋势, HO-1 mRNA 表达最低, ADM 和 RAMP2 表达最强。林檎叶和卡托普利可下调高血压小鼠的 ADM 表达和上调 HO-1、RAMP2 表达, 高浓度的林檎叶效果显著优于低浓度

的林檎叶（模型组表达强度的 0.48、3.45 和 3.02 倍， $p<0.05$ ），且效果与卡托普利接近（模型组表达强度的 0.45、3.52 和 3.11 倍）。研究显示 ADM 是一种与降钙素基因相关的肽，异常状态下心肌组织中存在 ADM 及其受体的高表达。高血压时体内 ADM 代偿水平升高，心肌中 ADM 的表达增加^[36]。RAMP2 是 ADM 的特异性受体，因此 ADM 和 RAMP2 在心血管系统中的表达具有重要的相互促进作用。控制心脏中 ADM 和 RAMP2 的含量可以有效控制高血压^[37]。林檎叶提取物作用下高血压小鼠的 HO-1、ADM 和 RAMP2 表达均出现显著变化，由此可以证明林檎叶提取物也具有通过调控 HO-1、ADM 和 RAMP2 表达对实验性的高血压有实质的影响。

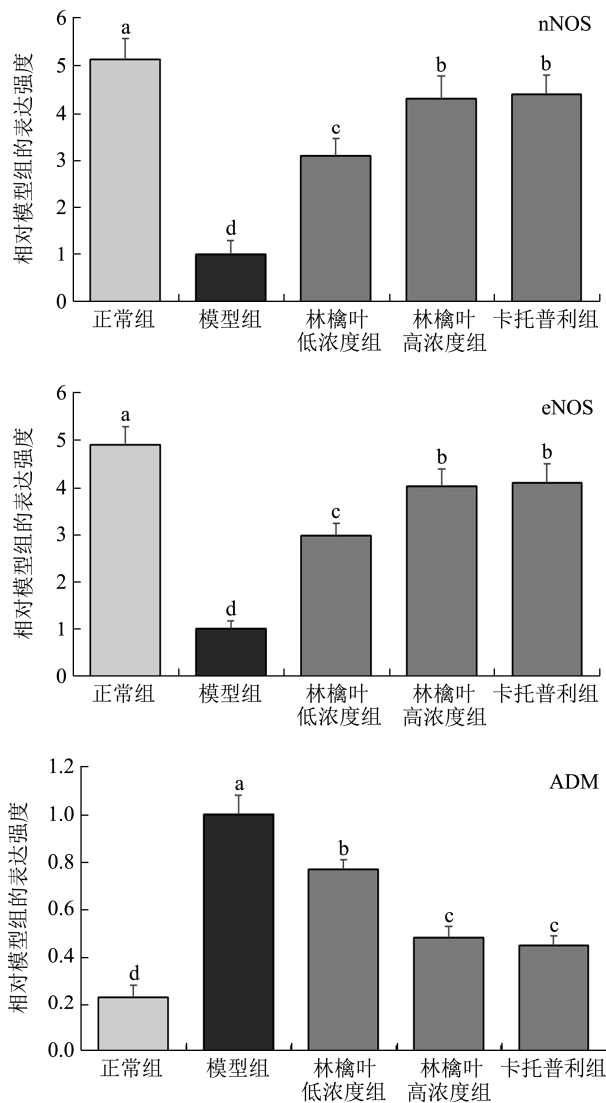


图4 林檎叶对 L-NNA 诱导的高血压小鼠心肌组织中 nNOS、eNOS 和 iNOS 的 mRNA 表达的影响

Fig.4 Effects of *Malus* leaf on the mRNA expression of nNOS, eNOS and iNOS in heart muscle of L-NNA induced hypertension mice

2.7 林檎叶提取物对小鼠心肌组织 nNOS、eNOS 和 iNOS 表达的影响

如图 4 所示，正常组小鼠心肌组织中的 nNOS 和 eNOS mRNA 表达显著高于其余各组小鼠（模型组表达强度的 5.12 和 4.89 倍， $p<0.05$ ），而 iNOS 表达则显著低于其他各组（模型组表达强度的 0.23 倍， $p<0.05$ ）。相比模型组，林檎叶高浓度组（模型组表达强度的 4.32 和 4.02 倍）、林檎叶低浓度组（模型组表达强度的 3.10 和 2.96 倍）和卡托普利组（模型组表达强度的 4.41 和 4.10 倍）小鼠心肌组织中的 nNOS 和 eNOS 表达高于模型组，而 iNOS 表达低于模型组（模型组表达强度的 0.48、0.77 和 0.45 倍）。同时，林檎叶高浓度和卡托普利发挥的作用相似，能使 nNOS、eNOS 和 iNOS 的表达最为接近正常组，效果强于林檎叶低浓度组。内皮细胞和血管平滑肌细胞都含有一氧化氮合酶（NOS）。在 NOS 的催化下，L-精氨酸和分子氧可以生成一氧化氮，NOS 是一氧化氮生成的限速酶^[38]。一氧化氮的含量主要由 NOS 调节，NOS 包括 nNOS、eNOS 和 iNOS，在生理条件下，cNOS（nNOS、eNOS）合成 NO，调节血管张力和血压，持续释放少量 NO，维持血压^[39]。iNOS 不依赖钙离子在正常情况下不表达，但在高血压情况下表达^[40]。实验结果显示林檎叶提取物和相关研究得到了相同的结果，能够通过调控 nNOS、eNOS 和 iNOS 表达能够发挥预防高血压的作用。

3 结论

本研究利用动物模型测定了林檎叶对高血压的预防作用。L-NNA 能够诱导小鼠高血压，林檎叶提取物能降低 L-NNA 诱导的高血压，其机制可能与其调控 NOS 水平的能力有关。林檎叶提取物改善血管活力的功能也有助于预防 L-NNA 引起的高血压，且高浓度林檎叶对高血压的影响更大，与药物卡托普利的效果相近。林檎叶是天然植物，主要由 9 种具有生物活性作用的化合物组成，这些化合物的联合作用形成了林檎叶对高血压的预防作用，同时研究证实其具有无害的特点^[16]，进一步通过本研究验证其在生活中可能适合于轻度高血压或血压异常者，林檎叶可作为保健品进一步开发利用。

参考文献

[1] 闫文娟.试论气机理论对原发性高血压病的临床指导意义[J].新疆中医药,2010,28(2):7-9
YAN Wenjuan. On clinical guiding significance of theory of functional activities of Qi to essential hypertension [J].

- Xinjiang Journal of Traditional Chinese Medicine, 2010, 28(2): 7-9
- [2] 中国高血压联盟《家庭血压监测指南》委员会.2019 中国家庭血压监测指南[J].中国医学前沿杂志,2019,11(5):21-25
Guidelines for Family Blood Pressure Monitoring Committee of China Hypertension Alliance. 2019 guidelines for home blood pressure monitoring in China [J]. Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science, 2019, 11(5): 21-25
- [3] 俞航,胡闭月,奚婧,等.药食同源代茶饮对高血压的辅助治疗效果研究[J].中国医药导报,2020,17(4):189-192,196
YUN Hang, HU Biyue, XI Jing, et al. Study on the effect of homology of medicine and food generation of tea on the adjuvant therapy of hypertension [J]. China Medical Herald, 2020, 17(4): 189-192, 196
- [4] 唐晓婷,唐新淼,崔金刚,等.精芪燕面方对自发高血压大鼠血压升高及心肌损伤的干预研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2018,16(22):3259-3263
TANG Xiaoting, TANG Xinmiao, CUI Jingang, et al. The interventional effects of Jingqi Yanmian formula on elevated blood pressure and myocardial injury in spontaneously hypertensive rats [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio/Cerebrovascular Disease, 2018, 16(22): 3259-3263
- [5] 马妍,张泽生.一种辅助降压保健食品功能性研究[J].食品研究与开发,2013,17:49-54
MA Yan, ZHANG Zesheng. Study on the function of an auxiliary lowering blood pressure health food [J]. Food Research and Development, 2013, 17: 49-54
- [6] Wu Y, Sun H, Yi R, et al. *Malus hupehensis* leaves extract attenuates obesity, inflammation and dyslipidemia by modulating lipid metabolism and oxidative stresses in high-fat-diet-induced obese mice [J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44(11): e13484
- [7] Yi R, Chen X, Li W, et al. Preventive effect of insect tea primary leaf (*Malus sieboldii* (Regal) Rehd.) extract on D-galactose-induced oxidative damage in mice [J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(9): 5160-5171
- [8] Liu B, Zhang C, Zhang J, et al. Wushan Shencha (*Malus asiatica* Nakai. leaves)-derived flavonoids alleviate alcohol-induced gastric injury in mice via an anti-oxidative mechanism [J]. Biomolecules, 2019, 9(5): 169
- [9] Ohta F, Takagi T, Sato H, et al. Low-dose L-arginine administration increases microperfusion of hindlimb muscle without affecting blood pressure in rats [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(4): 1407-1411
- [10] Fujiwara A, Hirawa N, Fujita M, et al. Impaired nitric oxide production and increased blood pressure in systemic heterozygous ATP2B1 null mice [J]. Journal of Hypertension, 2014, 32(7): 1415-1423
- [11] Thomsen K, Rubin I, Lauritzen M. NO- and non-NO-, non-prostanoid-dependent vasodilatation in rat sciatic nerve during maturation and developing experimental diabetic neuropathy [J]. Journal of Physiology, 2002, 543(Pt 3): 977-993
- [12] Simmonds M J, Detterich J A, Connes P. Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell [J]. Biorheology, 2014, 51(2-3): 121-134
- [13] Gangula P, Ravella K, Chukkapalli S, et al. Polybacterial periodontal pathogens alter vascular and gut BH4/nNOS/NRF2-phase II enzyme expression [J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0129885
- [14] Sun P, Zhu K, Wang C, et al. Prophylactic effects of alkaloids from Ba lotus seeds on L-NNA-induced hypertension in mice [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2016, 14(11): 835-843
- [15] Yi R, Deng L, Mu J, et al. The impact of Antarctic ice microalgae polysaccharides on D-galactose-induced oxidative damage in mice [J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8: 651088
- [16] 孙娟娟,葛红,侯婷婷,等.几种有降压作用的植物中芦丁和槲皮素含量测定[J].质量标准,2009,11(1):12-15
SUN Juanjuan, GE Hong, HOU Tingting, et al. Determination of rutin and quercetin in anti-hypertension herbal plants by RP-HPLC simultaneously [J]. Modern Chinese Medicine, 2009, 11(1): 12-15
- [17] Wu D, Ding L, Tang X, et al. Baicalin protects against hypertension-associated intestinal barrier impairment in part through enhanced microbial production of short-chain fatty acids [J]. Frontiers in Pharmacology, 2019, 10: 1271
- [18] Li X, Jiang Q, Wang T, et al. Comparison of the antioxidant effects of quercitrin and isoquercitrin: understanding the role of the 6"-OH group [J]. Molecules, 2016, 21(9): 1246
- [19] Plotnikov M B, Aliev O I, Sidekhmenova A V, et al. Modes of hypotensive action of dihydroquercetin in arterial hypertension [J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2017, 162(3): 353-356
- [20] Maneesai P, Bunbupha S, Potue P, et al. Hesperidin prevents nitric oxide deficiency-induced cardiovascular remodeling in rats via suppressing TGF- β 1 and MMPs protein expression [J]. Nutrients, 2018, 10(10): 1549

- [21] Godse S, Mohan M, Kasture V, et al. Effect of myricetin on blood pressure and metabolic alterations in fructose hypertensive rats [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2010, 48(5): 494-498
- [22] Plotnikov M B, Aliev O I, Sidekhmenova A V, et al. Modes of hypotensive action of dihydroquercetin in arterial hypertension [J]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2017, 162: 353-356
- [23] Ohtsuki K, Abe A, Mitsuzumi H, et al. Effects of long-term administration of hesperidin and glucosyl hesperidin to spontaneously hypertensive rats [J]. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2002, 48(5): 420-422
- [24] Larson A J, Symons J D, Jalili T. Quercetin: a treatment for hypertension?-a review of efficacy and mechanisms [J]. *Pharmaceuticals*, 2010, 3(1): 237-250
- [25] 刘慧芳, 欧阳迎春, 刘应才, 等. 槲皮素对高血压大鼠主动脉环的舒张作用及机制[J]. *四川医学*, 2008, 29(11): 1457-1459
LIU Huifang, OUYANG Yingchun, LIU Yingcai, et al. Endothelium-dependent vasodilator effects of quercetin on hypertensive rat aorta [J]. *Sichuan Medical Journal*, 2008, 29(11): 1457-1459
- [26] 杨竹雅, 卫莹芳, 海青山, 等. 槲皮苷对家兔离体主动脉环的作用及其机制探讨[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(1): 90-92
YANG Zhuya, WEI Yingfang, HAI Qingshan, et al. Effects and mechanisms of quercitrin on isolated rabbit aortic rings [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2013, 24(1): 90-92
- [27] 王成, 郭长磊, 李霞, 等. 金丝桃苷对高血压大鼠降血压作用及与血管紧张素转化酶抑制作用的关系[J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(5): 33-39
WANG Cheng, GUO Changlei, LI Xia, et al. The antihypertensive effect of hyperoside as an inhibitor of ACE [J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2018, 34(5): 33-39
- [28] 金雪萍. 林檎叶提取物急性毒性实验研究[J]. *食品与机械*, 2004, 20(2): 16-17
JIN Xueping. The acute toxicity test study on mice with *Malus doumeri* leaves [J]. *Food and Machinery*, 2004, 20(2): 16-17
- [29] 刘炜, 朱陵群, 陈思思, 等. 针刺捻转补泻手法对应激性血压升高大鼠血浆乙酰胆碱及胸主动脉一氧化氮合酶、环鸟苷酸含量的影响[J]. *针刺研究*, 2015, 40(2): 136-140
LIU Wei, ZHU Lingqun, CHEN Sisi, et al. Effect of twirling-reinforcing-reducing needling manipulations on contents of serum acetylcholine and arterial NOS and cGMP in stress-induced hypertension rats [J]. *Acupuncture Research*, 2015, 40(2): 136-140
- [30] Mahinur B, Yi Y, Chen L D, et al. Alkaloids of *Nitraria sibirica* Pall. decrease hypertension and albuminuria in angiotensin II-salt [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2014, 12(4): 266-272
- [31] Zhang S, Yang T, Xu X, et al. Oxidative stress and nitric oxide signaling related biomarkers in patients with pulmonary hypertension: a case control study [J]. *BMC Pulmonary Medicine*, 2015, 15: 50
- [32] Liu H, Peng Y, Liu F, et al. Correlation between endothelin-1 and atherosclerosis in chronic hemodialysis patients [J]. *Journal of Nephrology*, 2010, 23(5): 593-602
- [33] Wang Z, Martorell B C, Wälchli T, et al. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors are important to maintain cerebrovascular reactivity in chronic hypertension [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123697
- [34] Friedlander L T, Hussani H, Cullinan M P, et al. VEGF and VEGFR2 in dentigerous cysts associated with impacted third molars [J]. *Pathology*, 2015, 47(5): 446-451
- [35] Toney B M, Fisher A J, Albrecht M, et al. Selective endothelin-A receptor blockade attenuates endotoxin-induced pulmonary hypertension and pulmonary vascular dysfunction [J]. *Pulmonary Circulation*, 2014, 4(2): 300-310
- [36] Sano M, Kuroi N, Nakayama T, et al. Association study of calcitonin-receptor-like receptor gene in essential hypertension [J]. *American Journal of Hypertension*, 2005, 18(3): 403-408
- [37] Rivero M A, Ramos N, Torres I, et al. 1D.12: the contribution of inflammation and atherosclerosis to hypertension in kidney transplants [J]. *Journal of Hypertension*, 2015, 33(Suppl 1): e18
- [38] Posa A, Pavo N, Hemetsberger R, et al. Protective effect of ischaemic preconditioning on ischaemia/reperfusion-induced microvascular obstruction determined by on-line measurements of coronary pressure and blood flow in pigs [J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 2010, 103(2): 450-460
- [39] Xie J, Joseph K O, Bagby G J, et al. Dissociation of TNF-alpha from endotoxin-induced nitric oxide and acute-phase hypotension [J]. *American Journal of Physiology*, 1997, 273(1 Pt 2): 164-174
- [40] Xu J, Cao H, Liu H, et al. Role of nitric oxide synthase and cyclooxygenase in hyperdynamic splanchnic circulation of portal hypertension [J]. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 2008, 7(5): 503-508