

玫瑰茄水提物抗贫血作用的研究

曾荣¹, 方舒婷², 赵文俊¹, 林淇淇¹, 何锡媛¹, 王嫣如¹

(1. 佛山科学技术学院食品科学与工程学院, 广东佛山 528200)

(2. 广东省测试分析研究所, 广东省化学危害应急检测技术重点实验室, 广东广州 510070)

摘要: 初步探究玫瑰茄水提物的抗贫血作用机制。建立 IDA 大鼠模型, 随机分成 4 组, 对 IDA 大鼠灌胃低、中、高剂量的玫瑰茄水提物。30 d 后, 解剖大鼠, 取十二指肠和肝脏。利用 Q-PCR 和 Western blot 技术分别检测试验大鼠十二指肠中二价金属转运体 (DMT-1)、膜铁转运蛋白 (FPN-1)、膜铁转运辅助蛋白 (Hp) 及其 mRNA 的表达量, 肝脏铁调素 (Hepcidin) 及其 mRNA 的表达水平。结果表明, 与低铁对照组比较, 玫瑰茄水提物低、中剂量组对 DMT-1、FPN-1、Hp 表达量的下调幅度不超过 9%, mRNA 的表达水平则超过 50%, 低、中剂量均对 Hp mRNA 无显著性差异; 高剂量组对 DMT-1、FPN-1、Hp 及其 mRNA 表达量的下调程度不一。低剂量组 Hepcidin-25 的表达量是低铁对照组的 1.61 倍; 高剂量组的表达量则下调了 65.79%; 各剂量组均抑制了相关 mRNA 的表达。因此, 玫瑰茄水提物通过提供有效成分促进机体铁的吸收, 从而影响 IDA 大鼠的 DMT-1、FPN-1、Hp、Hepcidin-25 及其 mRNA 的表达, 维持机体铁稳态。

关键词: 玫瑰茄水提物; 二价金属转运体; 膜铁转运蛋白; 膜铁转运辅助蛋白; 铁调素

文章编号: 1673-9078(2019)11-16-24

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.11.003

The Mechanism Underlying the Anti-anemia Effect of an Aqueous Extract of *Hibiscus sabdariffa* L.

ZENG Rong¹, FANG Shu-ting², ZHAO Wen-jun¹, LIN Qi-qi¹, HE Xi-yuan¹, WANG Yan-ru¹

(1.College of Food Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528200, China) (2.Guangdong Provincial Key Laboratory of Emergency Test for Dangerous Chemicals, Guangdong Institute of Analysis, Guangzhou 510070, China)

Abstract: Preliminary study was conducted on the mechanism underlying the anti-anemia function of an aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* L. (HS). The IDA rat model was established and the resulting rats were randomly divided into 4 groups. The IDA rats were administered with low, medium and high doses of HS. After 30 days, the rats were dissected and their duodenum and liver were taken. Then, Q-PCR and Western blot techniques were used to detect the expression levels of divalent metal transporter 1 (DMT-1), ferroportin (FPN), hephaestin (Hp) and their mRNA in the duodenum as well as the expression of hepcidin and its mRNA in the liver of the rats. The results showed that the decreases in the expression levels of DMT-1, FPN-1 and Hp for the low and medium HS dose groups were not more than 9%, while the mRNA expression level were over 50%, compared with those of low-iron control group. There were no significant difference in Hp mRNA between the low dose and medium dose groups. The decreases in the expression of DMT-1, FPN-1, Hp and their mRNA induced by the high-dose HS varied. The expression level of Hepcidin-25 in the low-dose group was 1.61 times as high as that for the low-iron control group, whilst the expression level in the high-dose group decreased by 65.79%. HS at different doses all showed an inhibitory effect on the mRNA expression. Therefore, HS promotes the absorption of iron in the body by providing active constituents, thereby affecting the expression of DMT-1, FPN-1, Hp, Hepcidin-25 and its mRNA in IDA rats, to maintain the iron homeostasis inside the body.

Key words: aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* L.; DMT-1; FPN-1; Hp; Hepcidin-25

缺铁性贫血 (IDA) 是常见的营养素缺乏症之一, 是长期负铁平衡的最终结果, 严重影响人们的身体健康。近年来的科学研究^[1-5]认为 IDA 的发生紧密联系

收稿日期: 2019-05-04

基金项目: 佛山市植物功能性食品研究科技创新平台; 佛山科学技术学院校级大学生创新创业计划项目 (XJ2019231)

作者简介: 曾荣 (1978-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品加工与安全

着体内多种铁代谢指标的变化, 对该病的研究范围逐渐发展到分子铁代谢水平。如祁慧^[1]的研究成果表明与健康体检者比较, IDA 患者的血清铁蛋白含量显著下降, 探讨了血清铁蛋白在贫血临床诊断中的检测价值; 赵凤华^[2]以缺铁性贫血患儿作为研究对象, 通过临床实验说明血清铁 (SI)、血清铁蛋白 (SF)、血清转铁蛋白 (TRF) 可作为筛查营养性缺铁性贫血的重

要检测指标,与徐丽华^[3]等研究相符;王浩^[4]等研究检测 IDA 患儿的血清铁调素 (Hepcidin) 和血清转铁蛋白受体 (sTfR) 两项指标,结果表明患儿 Hepcidin 水平显著下降,而 sTfR 水平明显上升;李娜^[5]研究了非铁剂健脾补血中药复方对缺铁性贫血患儿的相关分子铁代谢指标的影响,从分子水平上初步探讨中药治疗 IDA 的机理。

玫瑰茄花萼富含矿物质铁和抗坏血酸,而抗坏血酸有助于人体吸收非血红素铁,表明了其在治疗贫血方面的潜力^[6]。近年来,玫瑰茄治疗贫血的科学研究已取得了一定的进展^[7-10]。这些研究主要是检测血液学和多种分子铁代谢指标在本病病程中的含量水平变化,多数是在整体上观察玫瑰茄治疗贫血的效果,因此,国内外对玫瑰茄抗贫血活性的研究还相对有限,其作用机制尚未清楚。

因此,在前期试验研究的基础上,本试验将采取 Q-PCR 和 Western blot 技术分别检测经玫瑰茄水提取物 (Aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* L., HS) 治疗后的 IDA 大鼠的十二指肠和肝脏中相关基因和蛋白的表达水平,以期从基因和蛋白水平初步探索其作用机制。

1 材料和方法

1.1 试验样品

经 HS 治疗后的 IDA 大鼠的十二指肠和肝脏。肝脏组织中的铁调素 (Hepcidin-25) 和十二指肠中的二价金属转运体 (Divalent metal transporter 1, DMT-1)、膜铁转运蛋白 (Ferroportin 1, FPN-1)、膜铁转运辅助蛋白 (Hephaestin, Hp) 及其 mRNA 的含量水平采用 Western blot 和 Q-PCR 的方法进行检测。每组别选取三个样品,每个样品重复三次试验。

1.2 主要试剂

FPN-1 抗体 (货号: AB239511)、DMT-1 抗体 (货号: AB55735)、Hepcidin-25 抗体 (货号: AB95137)、Hp 抗体 (货号: AB95137) 均购自于英国 Abcam 公司; GAPDH 抗体 (货号: KC-5G4) 购自于上海康成生物工程有限公司; HRP 羊抗小鼠 IgG (货号: BA1050)、HRP 羊抗兔 IgG (货号: BA1054) 购自于武汉博士德生物工程有限公司; 总蛋白提取试剂、蛋白酶和磷酸化酶抑制剂、BCA-100 蛋白定量分析试剂盒 (货号: K3000) 购自于上海博彩生物科技有限公司; PVDF 膜 (货号: IPVH00010) 购自于美国 Millipore 公司; 总 RNA 提取试剂盒 (货号: LS1040) 购自于

上海 Promega 公司; 逆转录试剂盒 (K1622) 购自于 Thermo Scientific; Marker1 (一抗) (货号: M1081) 购自于广州东盛生物科技有限公司。

1.3 仪器和设备

FastPrep-24 匀浆机, MP 公司; 5424 手掌型离心机, 德国 Eppendorf 艾本德公司; YXQ-LS-30S II 立式压力蒸汽灭菌器, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; RCT 加热磁力搅拌器, 德国 (IKA) 艾卡公司; ZF-288 自动凝胶图像分析仪, 上海金鹏分析仪器有限公司; Step One Q-PCR 仪, Applied Biosystems; VORTEX 漩涡混合器, 上海达姆实业有限公司; VE-180 微型垂直电泳槽、VE-186 转移电泳槽, 上海精科实业有限公司; SPH-344 脱色摇床, 上海世平实验设备有限公司。

1.4 HS 的制备

试验过程中采用传统的水煎法制备。玫瑰茄经干燥、粉碎后, 过 60 目筛, 得干花粉末。选择料液比 (粉末/水) 1:15, 浸泡 0.5 h, 煎煮 1 h, 八层纱布进行过滤, 滤液经旋转蒸发仪减压浓缩至最终浓度为 1 g 生药/mL。在此基础上, 再分别制得浓度为 0.5、0.25 g 生药/mL 的 HS 样品, 分装, 4℃ 保存备用。

1.5 检测 HS 中的铁含量和 pH 值

玫瑰茄水提取物三个试验组别 (低、中、高浓度分别为 0.25 g 生药/mL、0.5 g 生药/mL、1 g 生药/mL) 的铁含量委托中国广州分析测试中心进行测定, 检测方法依据 GB 5009.90-2016 第二法; 其 pH 值检测由实验室人员按照常规的方法进行。

1.6 建立大鼠缺铁性贫血模型

将初断乳雌性大鼠在实验环境下适应 5 d 后, 除正常对照组外, 其余大鼠开始饲喂低铁饲料和去离子水, 采用不锈钢笼和食罐, 实验过程防止铁污染。自第 2 周开始, 每周对造模大鼠尾根静脉进行放血, 放血量约 1 mL/次, 共 3 次, 收集第 3 次放血血液并测定 Hb。

1.7 HS 治疗 IDA 大鼠的恢复试验

建立 IDA 大鼠模型, 选取 HGB <100 g/L 的大鼠作为试验动物, 根据大鼠体重和 HGB 水平, 随机分为低铁对照组 (Model)、阳性对照组 (FeSO₄) 和低剂量 (Low-dose aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* L., L-HS)、中剂量 (Medium-dose aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* L., M-HS)、高剂量 (High-dose

aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* L., H-HS) 3 个受试样品剂量组, 另设正常对照组 (Normal), 每组 8 只。L-HS、M-HS、H-HS 三个样品剂量组分别给予低浓度 (250 mg/kg·bw)、中浓度 (500 mg/kg·bw)、高浓度 (1000 mg/kg·bw) 的 HS 样品, FeSO₄ 组给予 2 mg/kg·bw FeSO₄ 溶液, 低铁对照组和正常对照组给予相同量的生理盐水。试验期间各试验组继续饲喂低铁饲料和去离子水, 正常对照组饲喂普通饲料和纯净水, 每天按照 1 mL/100 g·bw 经口灌胃 1 次, 连续 30 d。

试验结束后, 处死全部组别的大鼠, 迅速剥离肝脏、十二指肠, 除去各脏器粘连的筋膜, 于生理盐水中冲洗两遍, 吸干表面水分, 迅速将肝脏及十二指肠样本经液氮速冻后保存于 -80 °C 超低温冰箱中, 用于后续的 Q-PCR 和 Western blot 检测。

1.8 组织总蛋白的提取

将每个样本组织称重 50 mg 置于相应的匀浆管中, 向每支匀浆管中注射 500 μ L RIPA、5 μ L PMSF 以及 5 μ L 磷酸酶抑制剂, 进行组织电动匀浆。将所得产物转移至 2.0 mL 的离心管中, 低温 (4 °C) 高速离心 30 min。离心结束后, 取上清液, 严格按照 BCA-100 蛋白定量分析试剂盒说明书测定总蛋白浓度, 使用细胞裂解液把各样品的总蛋白浓度调整为 20 g/L。按体积比 (1:4) 加入 loading buffer (5 $\times$), 充分混匀 2~3 min, 接着 100 °C 沸水浴 10 min, 令蛋白发生变性, 最后室温条件下进行自然冷却、分装, 待测样品保存于 -80 °C。

1.9 Western blot 分析

预电泳后, 依次添加标准品 (Marker) 和待分析样品, 待分析样品上样量为 10 μ L, 即 40 μ g。选择 80 V 恒压进行电泳, 等到溴酚蓝染料前端到达两胶交界

处, 更换到 120 V 恒压继续电泳, 直至溴酚蓝染料前沿下至凝胶末端处, 即可停止电泳操作。电泳结束后, 将蛋白转移到 PVDF 膜上, 使用 TBST 缓冲液清洗 PVDF 膜 5 min, 重复洗涤步骤两次。接着在室温条件下, 将 PVDF 膜放入封闭液 (含 5% BSA) 中, 进行摇床振动, 封闭 2 h。按照说明书的推荐内容将一抗稀释到相应倍数, 并在 4 °C 下孵育过夜。一抗孵育结束后, 用 TBST 洗涤膜 10 min, 重复此步骤 3 次。二抗稀释 15000 $\times$, 50 r/min 室温摇床 1 h, TBST 缓冲液清洗膜 10 min, 重复 3 次。然后进行 ECL 化学发光、显影和定影。扫描胶片并使用 SensiAnsys 软件进行目的蛋白条带的灰度分析。

1.10 总 RNA 的提取

提取组织 RNA 时, 每 40~60 mg 组织中添加 500 μ L RNA 裂解液, 在匀浆机上进行裂解, 然后加入 500 μ L RNA 稀释液, 充分混匀, 室温静置 5 min, 低温高速离心 10 min。取上清液, 添加 0.5 倍体积的无水乙醇, 混合充分后, 冰浴 10 min 以沉淀 RNA。取出离心管, 将混合物转移至离心管中, 12000~14000 r/min 离心 1 min, 弃滤液; 加入 600 μ L RNA 洗液, 高速 (12000~14000 r/min) 离心 45 s, 弃滤液; 将 50 μ L DNA 酶 I 孵育液加入到吸附膜中央, 室温下放置 5 min; 加入 600 μ L RNA 洗液, 12000~14000 r/min 离心 45 s, 弃滤液, 重复一次。最后将离心管重新安放在收集管上, 在 12000~14000 r/min 的转速条件下离心 2 min; 接着将离心管转移至洗脱管上, 在膜中央加入 18 μ L 无核酸酶水, 室温静置 2 min, 12000~14000 r/min 短暂离心, 弃去废液, 收集 RNA, 保存于 -70 °C, 或直接用于下一步操作。

1.11 逆转录

表 1 各基因引物序列及产物片段长度

Table 1 The primer sequences and length of product fragments

Primer 名称	序列 (5'-3')	序列号	扩增长度/bp
β -actin	Forward primer: GCAGGAGTACGATGAGTCCG	NM_031144.3	83
	Reverse primer: GGGTGTAACACGCAGCTCAG		
DMT-1	Forward primer: TGGTTAGCGTGGCTTATCTGG	NM_013173.2	204
	Reverse primer: ACACACTGGCTCTGATGGCT		
FPN-1	Forward primer: GGGCTTCGACTGTATCACCA	NM_133315.2	130
	Reverse primer: TCGACGTAGCCAAGTGAAGG		
Hp	Forward primer: TCTACTGCTCATTGCTCTGGC	NM_133304.1	231
	Reverse primer: CCTTTCCTACTACCTCTACCCCT		
Hepcidin-25	Forward primer: CAGACGAGACAGACTACGGC	NM_053469.1	95
	Reverse primer: TCTCGCTTCCTTCGCTTCAG		

表 2 Q-PCR 反应体系及条件

Q-PCR 反应体系		Q-PCR 反应条件
试剂名称	加入量	
CDNA 模板	1 μL	UDG 预处理 50 °C 2 min 预变性 95 °C 10 min ↓
SYBRGreen/ROXqPCR Master Mix (2×)	5 μL	
引物-1 (10 μM)	0.5 μL	变性 95 °C 15 s ↓
引物-2 (10 μM)	0.5 μL	
ddH ₂ O	补水至 10 μL	退火 60 °C 1 min ↓
总体积	10 μL	
		Melt

在 1.5 mL EP 管中加入相同量的 (约 0.5 μg) 模板 RNA, 1 μL Oligo (dT) 18/u6 RT primer/mir21 RT primer 引物,加入 DEPC 水,使得最终的体积为 12 μL,离心 2 min。65 °C 水浴 5 min 后,放置冰上进行冷冻,再次短暂离心后,加入 4 μL 5×reaction Buffer, 1 μL Ribolock™ Ribonuclease Inhibitor, 2 μL (10 mmol) dNTP mix, 1 μL (200 U/μL) ReverAid M-MuLV 反转录酶,最终总反应体积为 20 μL。样液离心后,42 °C 水浴 60 min 进行反转录;在 70 °C 条件下,将逆转录酶水浴灭活 5 min,然后停止反应,冰上冷冻后-20 °C 保存,或马上 PCR 操作。根据专业软件计算得出的 Ct 值,以 β-actin 为内参,每组均与低铁对照组进行比较,采用 2^{-ΔΔCt} 的方法进行半定量分析。各基因引物序列设计如表 1 所示。

1.12 荧光定量及产物检测

Q-PCR 的反应体系及条件见表 2。

1.13 数据处理与分析

所得数据以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示,组间差异性使用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析,使用 Graph Pad prism 7 软件进行绘图, $p<0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果与分析

2.1 HS 中的铁含量和 pH 值

表 3 HS 中的铁含量和 pH 值

Table 3 The iron content and pH value in HS (x±SD)

组别	铁含量/(μg/mL)	pH 值
L-HS	185.00±0.02	2.53±0.02
M-HS	313.00±0.01	2.38±0.05
H-HS	569.00±0.01	2.06±0.02

低 (0.25 g 生药/mL)、中 (0.5 g 生药/mL)、高浓度 (1 g/生药 mL) 玫瑰茄水提物三个试验组别的铁含

量及其 pH 如表 3 所示。

2.2 HS 对十二指肠中 DMT-1 及其 mRNA 相

对表达水平的影响

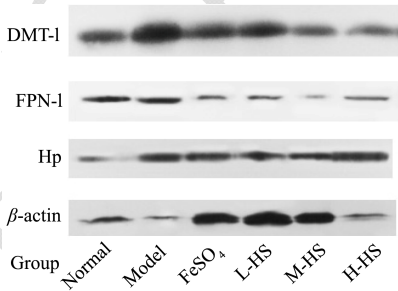


图 1 DMT-1、FPN-1 及 Hp 蛋白表达条带图

Fig.1 The protein expression bands of DMT-1, FPN-1 and Hp

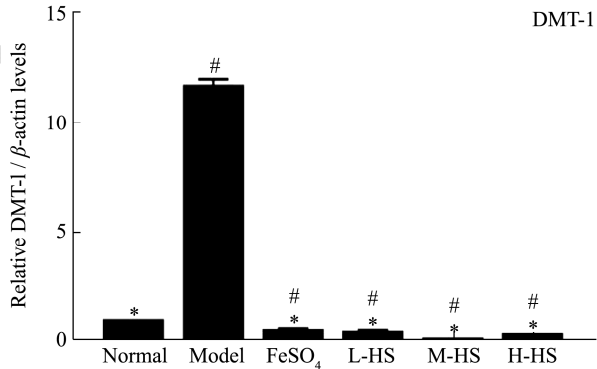


图 2 各组大鼠十二指肠中 DMT-1 相对表达水平

Fig.2 The relative expression levels of DMT-1 in the duodenum of each group of rats

注:与 Normal 组比较: # $p<0.05$;与 Model 组比较: * $p<0.05$ 。下同。

各组大鼠十二指肠中 DMT-1 及其 mRNA 相对表达水平的结果见图 1~3。IDA 大鼠在经过给予 HS 处理后,各剂量组大鼠十二指肠中的 DMT-1 及其 mRNA 相对表达水平明显低于 Model 组, L-HS、M-HS 及 H-HS 三组大鼠 DMT-1 相对表达量分别是 Model 组的 0.04 倍、0.01 倍和 0.03 倍,其相对应的 mRNA 水平分别下降 52.83%、51.44%和 51.33%。与 Normal 组比

较, HS 各剂量组大鼠十二指肠中 DMT-1 水平分别是 Normal 组的 0.49 倍、0.18 倍和 0.39 倍, 蛋白表达量显著下降 ($p<0.05$); 而 mRNA 水平分别升高了 4.59 倍、6.98 倍和 6.77 倍, 基因表达量则明显升高 ($p<0.05$); FeSO_4 组大鼠十二指肠中 DMT-1 水平显著降低, 但其 mRNA 表达水平无明显变化。

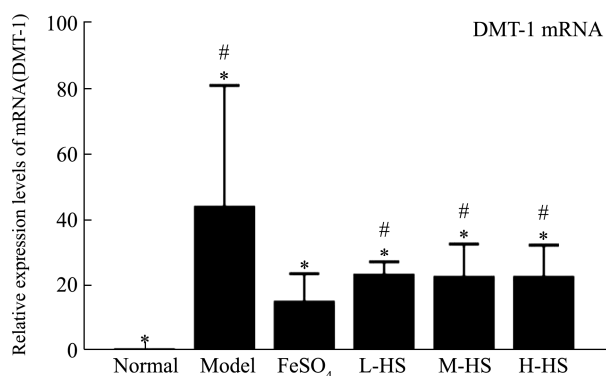


图3 各组大鼠十二指肠中 DMT-1 mRNA 相对表达水平

Fig.3 The relative expression levels of DMT-1 mRNA in the duodenum of each group of rats

缺铁时可引起贫血等一系列疾病, 铁过载会形成大量的自由基, 导致氧化损伤^[11,12], 对人体健康造成严重损害。因此, 人体具有一套严格的系统机制来调节铁的吸收和维持铁的稳态。随着研究不断深入, DMT-1、FPN-1、Hp 和 Hcpidin 等参与机体内铁调节机制的主要分子前后相继被发现, 其中 DMT-1、FPN-1 及 Hp 在十二指肠中高度表达。DMT-1 主要对二价金属离子进行摄取和转运, 是唯一一种介导膳食中非血红素铁转移至肠道细胞中的铁转运蛋白^[13], 其 mRNA 的表达水平受到铁生理状况的调节, 与铁含量呈依赖性关系^[14]。Model 组大鼠由于出现 IDA 的病症, 机体十二指肠中与铁吸收和转运相关的 DMT-1 及其 mRNA 的表达水平均出现代偿性升高。经 HS 治疗后, DMT-1 相对表达水平明显下降, 其原因有: 一是补充 HS 可为 IDA 大鼠提供足够的铁元素, 使得 IDA 大鼠机体内的铁离子逐渐恢复到正常水平, IDA 大鼠十二指肠中的 DMT-1 及其 mRNA 代偿性水平下降; 二是 HS 对 IDA 大鼠十二指肠中的 DMT-1 及其 mRNA 的表达具有抑制作用。值得注意的是, HS 组与 Normal 组比较, MDT-1 mRNA 的相对表达水平明显上升, 与蛋白的表达趋势并未表现出一致性, 前人的研究同样出现过类似现象。如刘茂玄^[15]在复方阿胶浆对贫血的治疗作用及作用机制的研究中结果显示, 与模型组比较, DMT-1 mRNA 表达水平明显下降, 而高剂量组却显著高于正常组, 其研究并未检测蛋白的表达水平。因此我们猜测这与大鼠的生理状况(正常大鼠与 IDA 大鼠生理状况的差异)、HS 治疗剂量和治疗时间等

有关, 另外也可能 DMT-1 表达的抑制与其他相关蛋白的互相作用有关。具有原因有待进一步深入探究, 如可通过扩大治疗剂量范围和延长治疗时间或检测其他相关蛋白的表达量来验证。

2.3 HS 对十二指肠中 FPN-1 及其 mRNA 相对表达水平的影响

各组大鼠十二指肠中 FPN-1 及其 mRNA 相对表达水平的结果见图 1、4、5。L-HS、M-HS 及 H-HS 三组大鼠十二指肠中 FPN-1 相对表达量分别是 Model 组的 0.02 倍、0.002 倍和 0.14 倍, 其相对应的 mRNA 水平分别下降 70.37%、63.70%和 73.33%; 与 Model 组比较, 两者相对表达水平均显著降低, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$)。与 Normal 组比较, FeSO_4 组及 HS 各剂量组大鼠十二指肠中 FPN-1 水平均显著降低 (L-HS、M-HS 及 H-HS 组分别下降了 6.84%、0.85%、47.01%), 而各组大鼠 FPN-1 mRNA 相对表达水平不具有统计学意义 ($p>0.05$)。

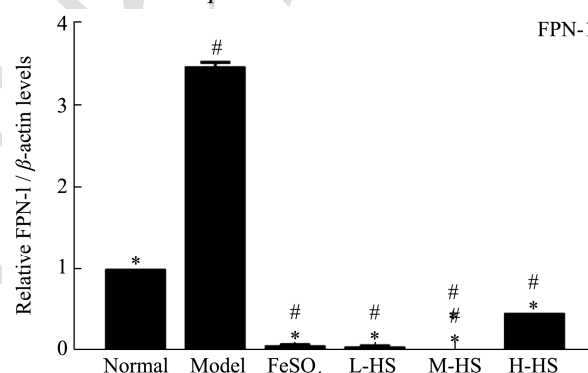


图4 各组大鼠十二指肠中 FPN-1 相对表达水平

Fig.4 The relative expression levels of FPN-1 in the duodenum of each group of rats

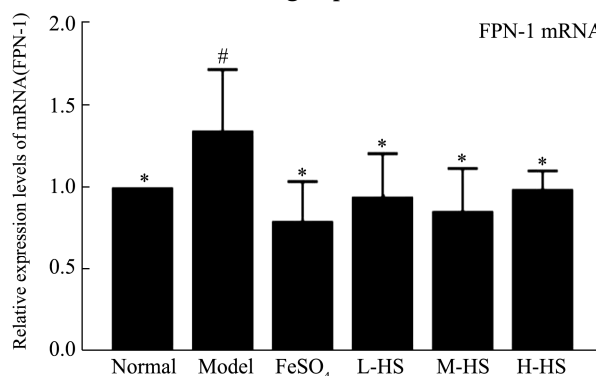


图5 各组大鼠十二指肠中 FPN-1 mRNA 相对表达水平

Fig.5 The relative expression levels of FPN-1 mRNA in the duodenum of each group of rats

FPN-1 是迄今为止已知的唯一的膜铁输出蛋白, 在肠道铁转运进入血液循环的过程中起到了至关重要

的作用,是铁吸收机制的必需蛋白;然而,FPN-1不能直接转运二价铁离子,需要与Hp结合才能将铁转运至血液循环中^[16-21]。其表达调控机制中的铁调节蛋白(IRP)mRNA的结合活性受细胞内铁浓度的调节,与肠铁含量紧密联系^[22,23]。试验结果表明,IDA大鼠体内的铁离子得到了有效补充,逐渐恢复正常的生理水平,从而下调了FPN-1及其mRNA的相对表达水平。我们推测HS中可能含有某些活性成分抑制了FPN-1 mRNA的翻译过程和/或肝脏中Hepcidin-25作用于小肠绒毛吸收细胞从而调控FPN-1的表达^[24]。

2.4 HS对十二指肠中Hp及其mRNA相对表达水平的影响

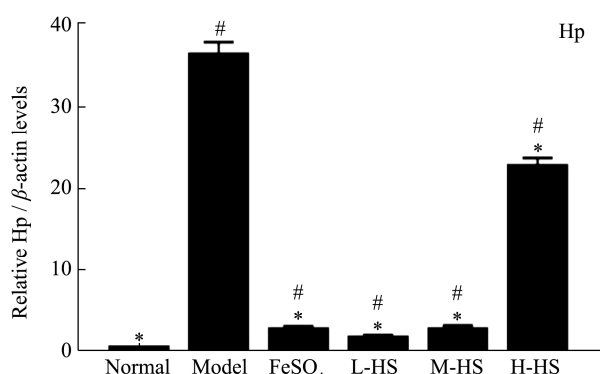


图6 各组大鼠十二指肠中Hp相对表达水平

Fig.6 The relative expression levels of Hp in the duodenum of each group of rats

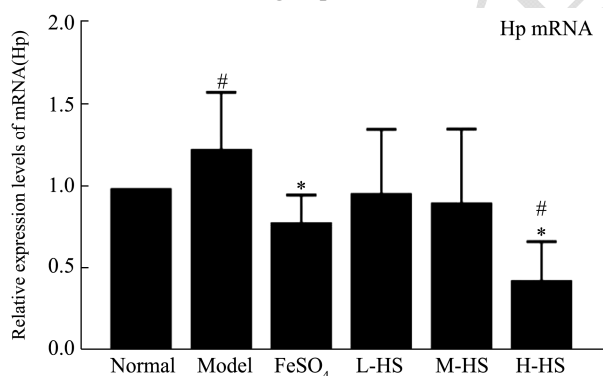


图7 各组大鼠十二指肠中Hp mRNA相对表达水平

Fig.7 The relative expression levels of Hp mRNA in the duodenum of each group of rats

各组大鼠十二指肠中Hp及其mRNA的相对表达水平见图1、6、7。与Model组比较,L-HS、M-HS及H-HS组大鼠十二指肠中的Hp相对表达水平分别下降了6.08%、8.70%和62.61%;L-HS组、M-HS组大鼠的Hp mRNA水平均无显著性差异($p>0.05$);FeSO₄组与H-HS组大鼠的Hp mRNA水平显著降低(分别为63.71%和35.48%),差异有统计学意义

($p<0.05$)。与Normal组比较,L-HS、M-HS及H-HS组大鼠十二指肠中Hp相对表达量升高了2.33倍、3.33倍和24倍,H-HS组大鼠十二指肠中Hp mRNA水平下降了47.83%,差异具有统计学意义($p<0.05$);L-HS组、M-HS组和FeSO₄组大鼠十二指肠中的Hp mRNA水平均无显著性差异($p>0.05$)。

Hp的主要作用则分为两部分,一是转运二价铁,即协助FPN-1将二价铁离子从肠上皮细胞运至血液循环中;二是参与二价铁离子的氧化,将其转化为三价铁离子。试验结果说明了HS能够抑制Hp及其mRNA的表达,且具有一定的剂量依赖性。此外,我们还发现H-HS组大鼠Hp的表达量较L-HS、M-HS组的明显上升,其mRNA表达水平则明显下降,推测是H-HS中含有某些足量有效成分抑制相应的受体表达,从而使Hp mRNA水平下调。

2.5 HS对肝脏中Hepcidin-25及其mRNA相对表达水平的影响

各组大鼠肝脏中Hepcidin-25及其mRNA相对表达水平的结果见图8~10。与Model组相比,L-HS组的Hepcidin-25相对表达水平升高了1.61倍,M-HS组无明显变化,H-HS组则显著下降了65.79%;FeSO₄组大鼠肝脏中Hepcidin-25 mRNA水平出现显著性差异,而HS各剂量组大鼠肝脏中Hepcidin-25 mRNA水平均没有明显变化。与Normal组比较,HS各剂量组的Hepcidin-25及其mRNA的相对表达水平均显著下调,同时Hepcidin-25的表达具有剂量依赖性。

Hepcidin是一种由肝细胞产生的小分子多肽,是影响机体内铁代谢和铁稳态的关键物质因子,目前已发现三种Hepcidin,分别为Hepcidin 22、Hepcidin 25和Hepcidin 20,而后两者是Hepcidin的主要存在形式^[25-27]。Hepcidin在调节机体内铁平衡中起负反馈调节作用,当体内铁过多时,Hepcidin分泌较正常时增加,作用促使FPN-1内化和降解来阻止肠道铁的吸收,防止发生铁过载的情况,而铁缺乏会抑制Hepcidin的产生,增加肠道中铁的吸收来弥补机体铁不足^[28-32]。因此,在机体患有IDA时,Hepcidin表达量会下调,以促进机体对铁的吸收^[33]。通过分析各组IDA大鼠肝脏中Hepcidin-25及其mRNA表达水平的试验结果,可以发现Model组的大鼠由于体内严重缺铁,导致机体出现代偿性反应,下调Hepcidin-25及其mRNA的表达水平。本试验结果显示各HS组的Hepcidin-25均显著低于Normal组,而仅H-HS组的Hepcidin-25显著低于Model组,说明贫血状态下,HS能抑制

Hepcidin-25 表达以促进机体对铁的吸收, 且与剂量呈相关性。而与 Model 组比较, 各 HS 组的 Hepcidin-25 mRNA 没有明显变化, 表明 HS 抑制 Hepcidin-25 的表达不是通过抑制 Hepcidin-25 mRNA 的表达来实现, 可能是经信号转导途径, 蛋白互相作用的方式来调节。研究表明^[34,35] Hepcidin 表达受到某些特定信号通路的调控, 其中之一是 BMP/SMAD 信号通路, HS 抑制 Hepcidin-25 的表达是否与此通路有关, 将是我们下一步的研究工作。

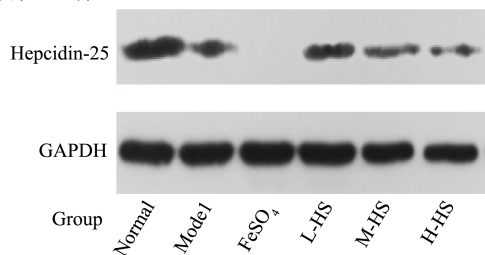


图8 Hepcidin-25 蛋白条带图

Fig.8 The protein band diagram of Hepcidin-25

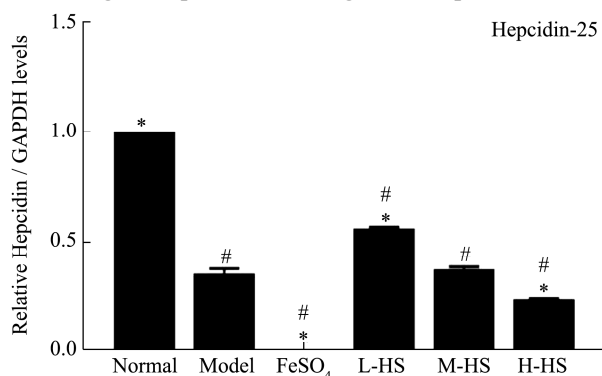


图9 各组大鼠肝脏中 Hepcidin-25 相对表达水平

Fig.9 The relative expression levels of Hepcidin-25 in the liver of each group of rats

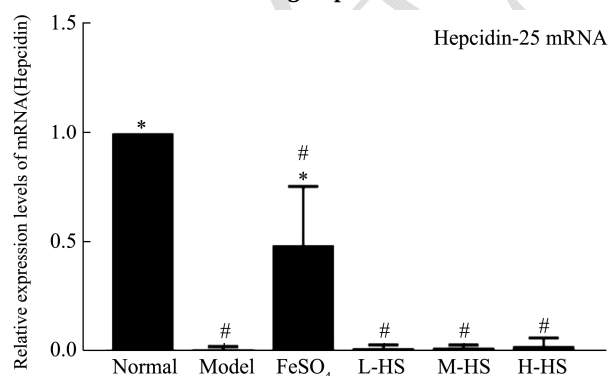


图10 各组大鼠肝脏中 Hepcidin-25 mRNA 相对表达水平

Fig.10 The relative expression levels of Hepcidin-25 mRNA in the liver of each group of rats

3 结论

综上所述, 我们可以发现 HS 对 IDA 大鼠十二指肠中的 DMT-1、FPN-1、Hp 及其 mRNA 相对表达水

平具有抑制作用, Hp 及其 mRNA 的表达量与一定剂量范围内的 HS 具有浓度依赖性。低浓度的 HS 能够促进 IDA 大鼠肝脏中 Hepcidin-25 表达, 高浓度的 HS 则抑制 Hepcidin-25 的表达, 各剂量组均抑制了相关 mRNA 的表达。因此, 玫瑰茄水提取物主要通过提供有效成分促进机体铁的吸收, 从而影响 IDA 大鼠的 DMT-1、FPN-1、Hp、Hepcidin-25 及其 mRNA 的表达, 维持机体铁稳态。

参考文献

- [1] 祁慧.血清铁蛋白检测在贫血性疾病诊断中的价值分析[J].甘肃科技,2018,34(13):133-134
QI Hui. Analysis of the value of serum ferritin detection in the diagnosis of anemia [J]. Gansu Science and Technology, 2018, 34(13): 133-134
- [2] 赵凤华.血清铁、铁蛋白、转铁蛋白联合检测在儿童营养性贫血筛查中的价值[J].中国妇幼保健,2018,33(24):5833-5835
ZHAO Feng-Hua. Value of joint detection of serum iron, ferritin, and transferrin in screening of nutritional iron deficiency anemia among children [J]. Maternal and Child Health Care of China, 2018, 33(24): 5833-5835
- [3] 徐丽华,姚玉前,张克琴.缺铁性贫血患儿治疗前后血清铁蛋白、转铁蛋白和可溶性转铁蛋白检测的临床意义[J].淮海医药,2014,32(6):579-580
XU Li-lua, YAO Yu-qian, ZHANG Ke-qin. Clinical significance of serum ferritin, transferrin and soluble transferrin detection in children with iron deficiency anemia before and after treatment [J]. Journal of Huaihai Medicine, 2014, 32(6): 579-580
- [4] 王浩,许沉龙,周程程,等.缺铁性贫血患儿血清铁调素和可溶性转铁蛋白受体的关系及联合诊断的价值[J].中国卫生检验杂志,2017,27(19):2778-2780
WANG Hao, XU Chen-long, ZHOU Cheng-cheng, et al. Correlation between serum Hepcidin and sTfR in children with iron deficiency anemia and the value of the combined diagnosis [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2017, 27(19): 2778-2780
- [5] 李娜.非铁剂健脾补血中药复方对缺铁性贫血铁代谢的干预研究[D].广州:广州中医药大学,2009
LI Na. Non-iron compound medicine Jianpi Buxue iron deficiency anemia on iron metabolism of the intervention study [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2009
- [6] Riaz G, Chopra R. A review on phytochemistry and

- therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 102: 575-586
- [7] Peter E L, Rumisha S F, Mashoto K O, et al. Ethno-medicinal knowledge and plants traditionally used to treat anemia in Tanzania: A cross sectional survey [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 154(3): 767-773
- [8] Adigun M O, Ogundipe O D, Anetor J I, et al. Dose-dependent changes in some haematological parameters during short-term administration of *Hibiscus sabdariffa* calyx aqueous extract (Zobo) in Wistar albino rats [J]. Afr J Med Med Sci, 2006, 35(1): 73-77
- [9] Emelike C U, Dapper D V. Biochemical effects of oral administration of aqueous extract of hibiscus sabdariffa on wistar albino rats [J]. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences, 2013, 9(1): 35-39
- [10] Peter E L, Rumisha S F, Mashoto K O, et al. Efficacy of standardized extract of *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) in improving iron status of adults in malaria endemic area: A randomized controlled trial [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 209(14): 288-293
- [11] Gangat N, Wolanskyj A P. Anemia of chronic disease [J]. Seminars in Hematology, 2013, 50(3): 232-238
- [12] 张式,郭俊生,秦海宏.小肠铁吸收的分子机制研究进展[J]. 环境卫生学杂志,2004,31(5):282-286
- ZHANG Yi, GUO Jun-sheng, QIN Hai-hong. Molecular mechanism of iron absorption in small intestine [J]. Journal of Environmental Hygiene, 2004, 31(5): 282-286
- [13] 卓钊.不同铁源对机体铁代谢的影响及其在肠道中的吸收机制研究[D].杭州:浙江大学,2017
- ZHUO Zhao. The effects of different iron sources on body iron metabolism and its absorption mechanism in intestine [D]. Hangzhou: Zhejiang university, 2017
- [14] 周理红,许梓荣.二价金属离子转运蛋白的功能和表达调控[J].黑龙江畜牧兽医,2004,2:59-60
- ZHOU Li-hong, XU Zi-rong. Function and expression regulation of divalent metal ion transporters [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2004, 2: 59-60
- [15] 刘茂玄.复方阿胶浆对贫血的治疗作用及作用机制的研究[D].济南:山东大学,2014
- LIU Mao-xuan. Study on the therapeutic effect and mechanism of compound gelatin on anemia [D]. Jinan: Shan Dong University, 2014
- [16] 柯亚,钱忠明.二价金属离子转运蛋白 1: 一个新发现的重要铁转运蛋白[J].生物化学与生物物理进展,2002,29(2): 184-188
- KE Ya, QIAN Zhong-ming. Divalent metal transporter 1: A newly discovered mammalian iron transport protein [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2002, 29(2): 184-188
- [17] Andrews N C. The iron transporter DMT1 [J]. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 1999, 31(10): 991-994
- [18] Trinder D. Localisation of divalent metal transporter 1 (DMT1) to the microvillus membrane of rat duodenal enterocytes in iron deficiency but to hepatocytes in iron overload [J]. Gut, 2000, 46(2): 270-276
- [19] 唐家明,邹亚学,王秋悦,等.DMT 1:多种二价金属离子的转运载体[J].畜牧兽医科技信息,2016,7:10-12
- TANG Jia-ming, ZOU Ya-xue, WANG Qiu-yue, et al. DMT 1: A variety of transport carriers for divalent metal ions [J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016, 7: 10-12.
- [20] 高倩,李蔓,张万山,等.肥胖对小鼠十二指肠 DMT1 和 FPN1 表达的影响[J].中国比较医学杂志,2014,9:18-22
- GAO Qian, LI Man, ZHANG Wan-shan, et al. Effect of obesity on the expression of DMT1 and FPN1 in the duodenum in mice [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2014, 9: 18-22
- [21] Frazer D M, Vulpe C D, Mckie A T, et al. Cloning and gastrointestinal expression of rat hephaestin: relationship to other iron transport proteins [J]. American Journal of Physiology Gastrointestinal & Liver Physiology, 2001, 281(4): 931-939
- [22] 李静,钱忠明,常彦忠,等.膜铁转运蛋白 ferroportin 1 的研究进展[J].生理科学进展,2004,35(4):349-351
- LI Jing, QIAN Zhong-ming, CHANG Yan-zhong, et al. Advances in research on the ferroportin 1 [J]. Progress in Physiological Sciences, 2004, 35(4): 349-351
- [23] 汤有才,刘玉峰,左文丽,等.缺铁大鼠肠道黏膜铁调节蛋白-2 和转铁蛋白受体 mRNA 的表达[J].实用儿科临床杂志,2004,19(5):350-352
- TANG You-cai, LIU Yu-feng, ZUO Wen-li, et al. Expression of iron regulatory protein 2 and transferrin receptor mRNA in intestinal mucosa of rats with iron deficiency [J]. Chinese Journal of Applied Clinical Pediatrics, 2004, 19(5): 350-352
- [24] Yamaji S, Sharp P, Ramesh B, et al. Inhibition of iron transport across human intestinal epithelial cells by hepcidin [J]. Blood, 2004, 104(7): 2178-2180
- [25] 赵晋英,李艳伟,李琳,等.铁调素在贫血诊断和治疗中的应用[J].检验医学,2011,26(9):635-639

- ZHAO Jin-ying, LI Yan-wei, LI Lin, et al. Application of hepcidin in the diagnosis and treatment of anemia [J]. Laboratory Medicine, 2011, 26(9): 635-639
- [26] 张卉,袁其朋.Hepcidin的生物学特性及其研究进展[J].生物工程学报,2006,22(3):361-365
- ZHANG Hui, YUAN Qi-peng. Properties and advance of Hepcidin [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2006, 22(3): 361-365
- [27] 张媛媛. Hepcidin表达调控与铁代谢研究进展[J].中国卫生产业,2011,34:176
- ZHANG Yuan-yuan. Progress in expression regulation and iron metabolism of Hepcidin [J]. China Health Industry, 2011, 34: 176
- [28] Cameron E W. Iron deficiency anaemia [J]. Nursing Times, 2016, 50(4): 88-97
- [29] Sangkhae V, Nemeth E. Regulation of the iron homeostatic hormone Hepcidin [J]. Advances in Nutrition, 2017, 8(1): 126
- [30] 曾婷.Hepcidin 在慢性病贫血中的研究进展[J].医学综述, 2014,20(12):2176-2177
- ZENG Ting. Research of Hepcidin in chronic anemia [J]. Medical Recapitulate, 2014, 20(12): 2176-2177
- [31] Gael Nicolas, Chauvet C, Viatte L, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide Hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation [J]. Journal of Clinical Investigation, 2002, 110(7): 1037-1044
- [32] Rivera S, Nemeth E, Gabayan V, et al. Synthetic Hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferrmia and is concentrated in ferroportin-containing organs [J]. Blood, 2005,106(6): 2196-2199
- [33] Means R T. Hepcidin and anaemia [J]. Blood Reviews, 2005, 18(4): 219-225
- [34] Babitt J L, Huang F W, Wrighting D M, et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression [J]. Nature Genetics, 2006, 38(5): 531-539
- [35] Andriopoulos, Corradini B, Xia E, et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism [J]. Nature Genetics, 2009, 41(4): 482-487

(上接第6页)

- [19] 卞建春,王林,陈大伟,等.铅镉联合暴露对大鼠肾脏的氧化损伤[J].中国兽医学报,2009,29(12):1617-1619,1628
- GENG Jian-chun, WANG Lin, CHEN Da-wei, et al. Oxidative damage of rat kidney by combined exposure of lead and cadmium [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2009, 29 (12): 1617-1619, 1628
- [20] 韦伟,谢毅强,罗嘉莉,等.南药益智仁对糖尿病肾病氧化应激 iNOS 及 PARL mRNA 表达的影响[J].中国医药导刊, 2018,20(12):752-755
- WEI Wei, XIE Yi-qiang, LUO Jia-li, et al. Effects of Nanzhi Yizhiren on oxidative stress iNOS and PARL mRNA expression in diabetic nephropathy [J]. Chinese Medical Guide, 2018, 20 (12): 752-755
- [21] Stohs S, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metalions [J]. Free Radical Biol Med, 1995,18: 321-336
- [22] Zhan J, Zhou Q X, Wei S H. Advanced study of toxicity mechanism of cadmium on cardiovascular damage Asian [J]. Ecotoxicol, 2011, 5: 466-470
- [23] 王欣欣,耿虹.一氧化氮及其合酶在糖尿病肾病中的作用[J].西部医学,2010,22(2):343-345
- WANG Xin-xin, YAN Hong. The role of nitric oxide and its synthase in diabetic nephropathy [J]. Western Medical Journal, 2010, 22(2): 343-345
- [24] 陈洋,付婷,姜爱花,等.氧化应激与糖尿病肾病的关系[J].西南军医,2012,14(2): 278-280
- CHEN Yang, FU Ting, JIANG Ai-hua, et al. Relationship between oxidative stress and diabetic nephropathy [J]. Southwestern Military Medical Journal, 2012, 14(2): 278-280
- [25] 徐军,王国恩,章时杰,等.1,3,7,9-四甲基尿酸激活 SirT3/AMPK/ACC 信号通路减少高脂饮食小鼠肝脏脂肪化[J].中国药理学通报,2014,30(6):791-795
- XU Jun, WANG Guo-en, ZHANG Shi-jie, et al. 1,3,7,9-tetramethyluric acid activates SirT3/AMPK/ACC signaling pathway to reduce liver fatification in mice with high-fat diet [J]. Chinese Journal of Pharmacology, 2014, 30(6): 791-795
- [26] LI Wei-xin, LI Yi-fang, ZHAI Yu-Jia, et al. Theacrine, a purine alkaloid obtained from *Camellia assamica* var. kucha, attenuates restraint stress provoked liver damage in mice [J]. J Agr Food Chem, 2013, 61(26): 6328-6335