# α-水芹烯通过NO-sGC-cGMP通路保护低氧性肺动脉高压大鼠的右心室结构和功能

王义文[1], 潘 旭[1], 白古月[1], 白海军[1], 李占强[2], 芦殿香[3], 杨占婷[1*]

(1. 青海大学医学院公共卫生系, 青海 西宁 810001; 2. 青海大学高原医学研究中心, 高原医学教育部重点实验室, 青海高原医学实验室, 青海 西宁 810001; 3. 成都大学附属医院, 四川 成都 610081)

**摘要**: 右心室 (right ventricular, RV) 功能障碍是肺动脉高压患者预后的关键因素。低氧刺激能够引起肺血管收缩和心肌损伤效应, 加速肺动脉高压患者RV重构的过程。前期, 本课题组利用体外血管环实验发现α-水芹烯 (α-phellandrene, PE) 具有舒张血管的药效, 但其对低氧诱导的大鼠RV结构和功能影响及调控机制尚未阐明。基于此, 本研究通过构建低氧性肺动脉高压 (hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension, HPH) 大鼠模型, 利用小动物超声检测系统、组织形态学分析及Western blot等方法系统评估PE对HPH大鼠RV多尺度病理改变的干预效果, 最后利用H9C2细胞研究PE对一氧化氮 (nitric oxide, NO)-可溶性鸟苷酸环化酶 (soluble guanylyl cyclase, sGC)-环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine phosphate, cGMP) 信号通路的调控机制。结果显示, 与模型组相比, PE增加了HPH大鼠三尖瓣环收缩期位移、肺动脉加速时间、RV面积变化分数和RV射血分数的水平, 有效改善RV收缩功能; 同时降低舒张期RV游离壁厚度及内径, 缓解低氧诱导的RV重构。与模型组相比, PE显著降低了HPH大鼠的平均肺动脉压力和RV肥厚指数的水平。组织形态学分析显示, PE降低RV胶原沉积及纤维化标志物α-平滑肌肌动蛋白、I型胶原蛋白和III型胶原蛋白的水平。分子机制研究发现, PE通过上调大鼠RV组织和H9C2细胞中内皮型一氧化氮合酶表达、增加NO生物利用度, 激活sGC-cGMP信号轴, 进而减少低氧性氧化损伤并降低纤维化水平。本研究揭示了PE能通过调控NO-sGC-cGMP信号通路降低低氧导致的RV氧化损伤和纤维化水平, 改善低氧性RV重构和功能障碍, 为开发RV靶向的HPH治疗策略提供实验依据。本研究经青海大学实验动物伦理审查委员会批准 (批准号: PJ-202302-01)。

**关键词**: α-水芹烯; 低氧性肺动脉高压; 氧化损伤; 右心结构和功能; NO-sGC-cGMP通路

**中图分类号**: R966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)11-3447-10

# α-Phellandrene attenuates the right ventricular structure and function in HPH rats *via* the NO-sGC-cGMP pathway

WANG Yi-wen[1], PAN Xu[1], BAI Gu-yue[1], BAI Hai-jun[1], LI Zhan-qiang[2], LU Dian-xiang[3], YANG Zhan-ting[1*]

(*1. Department of Public Health, Qinghai University Medical College, Xining 810001, China; 2. Key Laboratory of Ministry of Education for High Altitude Medicine, Qinghai Plateau Medicine Laboratory, Research Center for High Altitude Medicine, Qinghai University, Xining 810001, China; 3. Affiliated Hospital of Chengdu University, Chengdu 610081, China*)

**Abstract**: Right ventricular (RV) dysfunction is a pivotal prognostic determinant in patients with pulmonary

收稿日期: 2025-03-20; 修回日期: 2025-07-06.

基金项目: 青海省科技厅自然科学基金项目 (2024-ZJ-979); 青海大学青年科研基金项目 (2022-QNY-4); 青海大学青年科研基金项目 (2022-QNY-7); 国家自然科学基金面上项目 (82374148).

*通讯作者 Tel: 18997133053, E-mail: ztyang1121@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0306

arterial hypertension (PAH). Hypoxic stimulation induces hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) and exerts cardiotoxic effects, thereby accelerating RV remodeling in PAH. Previous *in vitro* vascular ring experiments demonstrated that α-phellandrene (PE) exhibits vasodilatory effects, but its impact on hypoxia-induced RV structural and functional alterations and underlying mechanisms remain unclear. To address this, we established a hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension (HPH) rats model and comprehensively evaluated the therapeutic effects of PE on multi-scale RV pathological remodeling through echocardiography, histomorphometric analyses, and Western blot. Additionally, the molecular mechanisms underlying PE-mediated modulation of the nitric oxide (NO) -soluble guanylyl cyclase (sGC) -cyclic guanosine monophosphate (cGMP) signaling pathway were investigated using H9C2 cardiomyocytes. Results demonstrated that compared with the model group, PE treatment significantly improved RV systolic function in HPH rats, as evidenced by increased tricuspid annular plane systolic excursion, pulmonary artery acceleration time, fractional area change, and RV ejection fraction. Concurrently, PE reduced RV free wall thickness in diastole and RV inner diameter, effectively attenuating hypoxia-induced RV remodeling. PE administration also markedly decreased mean pulmonary artery pressure and RV hypertrophy index compared to the model group. Histomorphological analysis demonstrated that PE treatment significantly reduced collagen deposition in RV tissues and downregulated expression of fibrotic markers, including α-smooth muscle actin, collagen I and collagen III. Mechanistic investigations revealed that PE upregulated endothelial nitric oxide synthase expression in both rats RV tissues and H9C2 cardiomyocytes, enhanced NO bioavailability, and activated sGC- cGMP signaling axis. These molecular effects collectively ameliorated hypoxia-induced oxidative damage and attenuated fibrotic progression. This study reveals that PE ameliorates hypoxia-induced RV remodeling and dysfunction by modulating the NO-sGC-cGMP signaling pathway to reduce oxidative damage and fibrotic remodeling in hypoxic conditions. These findings provide experimental evidence for developing RV-targeted therapeutic strategies against HPH. All animal experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Qinghai University (approval No: PJ-202302-01).

**Key words**: α-phellandrene; hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension; oxidative injury; right ventricular structure and function; NO-sGC-cGMP pathway

右心室 (right ventricular, RV) 功能障碍是肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 患者主要的致病及致死因素。在PAH发展过程中, 肺动脉压 (pulmonary arterial pressure, PAP) 的进行性升高初期会导致RV代偿性适应反应, 然而随着后负荷的持续升高, 这种代偿机制将逐渐失代偿, 最终导致RV病理性的重构: 包括心室腔扩张、舒张末压异常升高、弥漫性间质纤维化及微血管密度降低等形态学改变[1,2], 这些病理改变共同引发RV衰竭 (RV failure, RVF) 直至患者发生心源性死亡[3,4]。

低氧环境在PAH发生发展中具有双重致病效应。慢性低氧不仅通过诱发低氧性肺血管收缩 (hypoxic pulmonary vasoconstriction, HPV) 增加肺循环阻力, 也能直接损害心肌, 促进心肌重塑的恶性循环[5]。虽然大量循证医学证据证实RV功能状态是决定低氧性肺动脉高压 (hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension, HPH) 预后的独立预测因子, 但现有治疗方案仍局限于肺血管收缩和重构的干预, 缺乏针对RV心肌保护的特异性治疗手段。因此, 除改善肺循环血流动力学的目标外, HPH的治疗策略更应聚焦于RV结构和功能保护的靶向治疗方法。

本课题组前期研究结果显示, α-水芹烯 (α-phellandrene, PE) 能够舒张去甲肾上腺素预收缩的大鼠肺小动脉和胸主动脉环且具有剂量依赖性[6]。预实验结果也显示PE能降低HPH大鼠的平均肺动脉压力 (mean pulmonary arterial pressure, mPAP)。本研究通过构建HPH大鼠模型, 利用小动物超声检测系统、形态学分析及Western blot实验, 从器官血流动力学水平、纤维结构水平及细胞分子水平多维度评估PE对HPH大鼠的RV结构和功能的影响。

## 材料与方法

**主要仪器** 麻醉机空气泵 (型号: R510-29, 深圳市瑞沃德生命科技有限公司); 小动物超声成像系统 (型号: Vevo 3100LT, 加拿大富士Visual Sonics公司); 低压氧舱室 (型号: DYC-300, 贵州风雷氧舱有限公司)。

**试剂** PE[7] (批号: N26GY169109)、西地那非 (sildenafil, Sild, 批号: 139755-83-2)、*N*-硝基-*L*-精氨酸甲酯 (*N*-nitro-*L*-arginine methyl ester, L-NAME, 批号: 51298-62-5) 均购自上海源叶生物科技有限公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 测定试剂盒 (批号:

20240603)、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 测定试剂盒 (批号: 20250111)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 测定试剂盒 (批号: 20240601)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX) 试剂盒 (批号: 20240531) 均购自南京建成生物工程研究所; 大鼠N-末端脑钠肽 (N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-pro BNP) 酶联免疫吸附试剂盒 (批号: WS052RL21062)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 比色法测试盒 (批号: WL08T66X9395)、环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine phosphate, cGMP) 酶联免疫吸附试剂盒 (批号: WL06BPJ49862) 均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; Masson三色染色试剂盒 (批号: 240001001) 购自北京索莱宝科技有限公司。α-平滑肌肌动蛋白 (α-smooth muscle actin, α-SMA, 批号: 80008-1-RR) 抗体、内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS, 批号: 27120-1-AP) 抗体、可溶性鸟苷酸环化酶 (soluble guanylyl cyclase, sGC, 批号: 19011-1-AP) 抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司; I型胶原蛋白 (collagen I, col I) 抗体 (批号: BS-10423R) 购自北京博奥森生物技术有限公司; III型胶原蛋白 (collagen III, col III) 抗体 (批号: AF5457) 购自江苏亲科生物研究中心有限公司; H9C2细胞购自武汉博士德生物工程有限公司; CCK-8试剂盒 (批号: 2310102) 购自广州互成技术有限公司。

**药物配置** PE与Tween 80 (Sigma-Aldrich公司) 按体积比1 000∶1混合, 于研钵中低温 (4 ℃) 研磨至均质化。随后以蒸馏水梯度稀释, 配制实验所需浓度 (12.5、25、50 mg·kg$^{-1}$·d$^{-1}$) 的溶液。

**实验动物** 雄性Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (60只) 购自西安交通大学, 体重为120 ± 10 g, 动物生产许可证号: SCXK (陕) 2023-002。实验大鼠在温度22 ± 2 ℃、相对湿度45%～55%的标准条件下饲养。本研究已通过青海大学科技伦理委员会审批 (批准号: PJ-202302-01), 符合实验动物伦理要求, 实验遵循动物伦理指南 (ARRIVE指南)。

**HPH大鼠模型的构建** 60只健康雄性SD大鼠, 适应性饲养2天后, 将大鼠按随机数字表法分为6组, 每组10只。对照组 (control): 大鼠不进行低氧处理, 每天灌胃给予1 mL生理盐水; 模型组 (hypoxia): 大鼠暴露于模拟海拔为5 000 m低压氧舱中持续低氧4周, 利用贵州风雷低压氧舱自动检测系统检测并维持舱内温度为21 ℃、相对湿度为64.1%、压力为52.93 kPa、风量为137 m$^3$·h$^{-1}$、$CO_2$浓度为22%、氧分压量为10.58 kPa、相对海平面含氧量为10.86%; 阳性对照组 (Sild): 大鼠暴露于模拟海拔为5 000 m的低压氧舱, 灌胃给予Sild 30 mg·kg$^{-1}$·d$^{-1}$直至4周; PE低剂量组 (PE-L): 大鼠暴露于模拟海拔为5 000 m低压氧舱, 灌胃给予PE 12.5 mg·kg$^{-1}$·d$^{-1}$; PE中剂量组 (PE-M): 大鼠暴露于模拟海拔为5 000 m低压氧舱中, 灌胃给予PE 25 mg·kg$^{-1}$·d$^{-1}$; PE高剂量组 (PE-H): 大鼠暴露于模拟海拔为5 000 m低压氧舱中, 灌胃给予PE 50 mg·kg$^{-1}$·d$^{-1}$进行干预。

**RV功能检测** 去除大鼠胸前被毛, 在室温下用R510-29麻醉机空气泵用2%异氟烷/氧混合物麻醉大鼠。使用MS250探头 (16和21 MHz) 检测大鼠RV功能相关指标。舒张期RV内径 (RV inner diameter diastole, RVID-D) 和收缩期RV内径 (RV inner diameter systole, RVID-S)、舒张期RV游离壁 (RV free wall thickness in diastole, RVWT-D) 和收缩期RV游离壁 (RV free wall thickness systole, RVWT-S)、右心室射血分数 (RV ejection fraction, RVEF) 在二维模式下测量。三尖瓣环平面收缩偏移 (tricuspid annular plane systolic excursion, TAPSE) 的检测是在二维超声下的M型超声心动图中获得。肺动脉加速时间 (pulmonary artery acceleration time, PAT)、肺动脉射血时间 (pulmonary artery ejection time, PET) 和RV流出道速度时间积分 (RV outflow tract velocity time integral, RVOT VTI) 由胸骨旁短轴视图中肺动脉瓣环处的脉搏波多普勒图测得。面积变化分数 (fractional area change, FAC) 在RV心尖四腔镜中测量。FAC·mPAP$^{-1}$和TAPSE·PASP$^{-1}$用于评估RV-肺动脉 (RV-pulmonary arterial, RV-PA) 耦合。将测量后的心超指标使用Vevo LAB 5.6.0进行量化分析。

**平均肺动脉压检测** 本研究采用右心导管术测量HPH大鼠的mPAP。大鼠用2%戊巴比妥钠麻醉后以仰卧位固定, 剪开大鼠右侧颈部皮肤, 充分暴露右侧颈外静脉。在颈外静脉向心方向开一个切口, 将充有肝素的聚乙烯静脉导管的一端插入RV, 然后靠近肺动脉, 导管的另一端连接信息化信号采集仪记录肺动脉波形。

**RV组织形态学评估** 大鼠处死后, 迅速将各组大鼠RV组织固定在10%中性缓冲甲醛溶液中48 h, 分别按照HE染色和Masson染色试剂盒说明书要求进行常规染色和封片, 在光学显微镜下观察拍照, 并使用ImageJ量化分析。

**RV组织中纤维化水平检测** 取各组大鼠RV组织100 mg, 加入1 mL RIPA裂解液和蛋白酶磷酸酶抑制剂混合液在冰上裂解30 min, 4 ℃、12 000 r·min$^{-1}$离心20 min, 获得蛋白上清液作为待测品。采用BCA蛋白质检测试剂盒测得蛋白含量, 加入对应体积的5×上样缓冲液, 在100 ℃条件下煮样10 min。取等量变性

蛋白样品进行凝胶电泳, 将蛋白湿转至PVDF膜上, 用5%脱脂牛奶进行封闭 (1 h)。然后分别加入兔抗col I (1∶1 000)、col III (1∶1 000)、$\alpha$-SMA (1∶50 000) 和$\beta$-actin (1∶5 000) 后于4 ℃条件下孵育过夜, 1×TBST洗3次后二抗 (1∶7 000) 室温孵育1 h。最后利用化学发光法检测蛋白含量, 以$\beta$-actin蛋白表达为内参, 结果以目的蛋白/内参的灰度比值表示, 用ImageJ对不同条带的灰度值进行量化分析。

**RV组织中抗氧化水平的检测** 取适量的上述RV组织中纤维化水平检测方法制得的蛋白上清液, 严格按照MDA、GSH、SOD和GSH-PX试剂盒的操作步骤, 检测大鼠RV组织中的各项指标的水平。

**CCK-8法检测细胞活力** 将细胞接种于96孔板 ($5\times10^3$个细胞/孔), 饥饿处理12 h后, 分别用DMEM或不同浓度的PE (3.125、6.25、12.5、25、50和100 μmol·L$^{-1}$) 处理细胞, 随后在常氧或低氧条件下培养24 h。采用CCK-8试剂盒于450 nm下检测吸光度 ($A$) 值。

**细胞分组及处理** 取生长状况良好的5～10代H9C2细胞, 胰酶消化制成单细胞悬液, 细胞按照每孔$2\times10^5$个接种于6孔板, 随机分为6组: 常氧组 (control): 在10%完全培养基, 20% $O_2$-5% $CO_2$下培养; 低氧组 (hypoxia): 细胞在10%完全培养基, 培养箱 (1% $O_2$-5% $CO_2$-94% $N_2$) 下培养; 低氧+PE-M组、低氧+PE-H组、低氧+L-NAME组和低氧+PE-H+L-NAME组分别用10%完全培养基配制PE药物浓度为12.5和25 μmol·L$^{-1}$、eNOS抑制剂 (L-NAME) 100 μmol·L$^{-1}$、PE (25 μmol·L$^{-1}$)+L-NAME (100 μmol·L$^{-1}$) 的药物培养基, 低氧条件下培养24 h。

**RV组织和H9C2细胞中NO、cGMP含量测定** 将H9C2细胞接种于6孔板中, 按分组向每孔中加入药物处理后, 去除每孔多余的培养基, 使用PBS洗涤2次, 每孔加入200 μL RIPA缓冲液进行裂解, 收集裂解液于1.5 mL离心管中进行离心, 取每组蛋白上清液作为待测品。取上述RV组织纤维化水平检测方法中制得的蛋白上清和H9C2细胞蛋白上清液, 严格按照NO测试盒、cGMP试剂盒的操作步骤, 检测大鼠RV组织和H9C2细胞中的含量。

**RV组织和H9C2细胞中eNOS和sGC蛋白表达水平检测** 取上述RV组织中纤维化水平检测方法中制得的蛋白上清和H9C2细胞中NO、cGMP含量测定方法中制得的蛋白上清液, 加入对应体积的5×上样缓冲液, 100 ℃条件下变性10 min, 分别加入兔抗eNOS (1∶2 000)、sGC (1∶2 500) 和$\beta$-actin (1∶5 000) 后于4 ℃条件下孵育过夜, 1×TBST洗3次后, 二抗 (1∶7 000) 室温孵育1 h。最后利用化学发光法测蛋白含量, 以$\beta$-actin蛋白表达为内参, 结果以目的蛋白/内参的灰度比值表示, 用ImageJ对不同条带的灰度值进行量化分析。

**统计学分析** 使用GraphPad Prism 10软件对数据进行统计学分析并作图。服从正态分布和方差齐的计量资料在描述性统计时采用 ($\bar{x} \pm s$) 的方式, 采用单因素方差ANOVA进行多组间数据比较分析, $P < 0.05$时表示差异有统计学意义。

## 结果

### 1 PE对HPH大鼠RV功能的影响

为研究PE对HPH大鼠RV功能的影响, 本研究使用无创超声心动图检测HPH大鼠RV功能相关的指标。结果发现, 与对照组相比, 模型组大鼠的TAPSE、PAT、PAT·PET$^{-1}$和RVOT VTI显著降低; 与模型组相比, PE和Sild干预组大鼠的TAPSE、PAT、PAT·PET$^{-1}$和RVOT VTI显著增加 (图1A、E, D、F, G, H)。与对照组相比, 模型组大鼠的RVWT-D、RVWT-S、RVID-D和RVID-S显著增加; 与模型组相比, PE和Sild干预组大鼠的RVWT-D、RVWT-S、RVID-D和RVID-S显著降低 (图1B、I, J, C、K, L)。

### 2 PE对HPH大鼠RV肥厚指数和mPAP的影响

大鼠在低压氧舱中处理4周后, 利用右心导管检测mPAP。如图2所示, 模型组大鼠的mPAP、RV·BW$^{-1}$、RV·(LV+S)$^{-1}$比值和NT-pro BNP的含量相较于对照组显著增加; PE和Sild干预组大鼠的mPAP、RV·BW$^{-1}$、RV·(LV+S)$^{-1}$比值和NT-pro BNP的含量相较于模型组显著降低。

### 3 PE对HPH大鼠RV-PA耦合水平的影响

为了研究肺动脉同RV之间的耦合关系, 本研究使用无创心脏超声影像技术对相关耦合指数进行分析。如表1所示, 与对照组相比, 模型组大鼠的FAC、RVEF、FAC·mPAP$^{-1}$和TAPSE·PASP$^{-1}$显著降低; 与模型组相比, PE和Sild干预组大鼠的FAC、RVEF、FAC·mPAP$^{-1}$和TAPSE·PASP$^{-1}$显著增加。

### 4 PE对HPH大鼠RV组织纤维化水平

如图3A～C所示, 与对照组相比, 模型组大鼠RV组织中胶原纤维增生、肌纤维排列不规则或坏死显著增加; 与模型组相比, PE和Sild干预组大鼠RV组织中胶原纤维增生程度和肌纤维坏死程度显著降低, 且肌纤维排列更为规则。

如图3D～F所示, 与对照组相比, 模型组大鼠RV组织的col I、col III和$\alpha$-SMA的表达水平显著增加; 与模型组相比, Hyp+M、Hyp+H和Sild干预组大鼠RV组织的col I和col III表达水平显著降低, PE和Sild干预

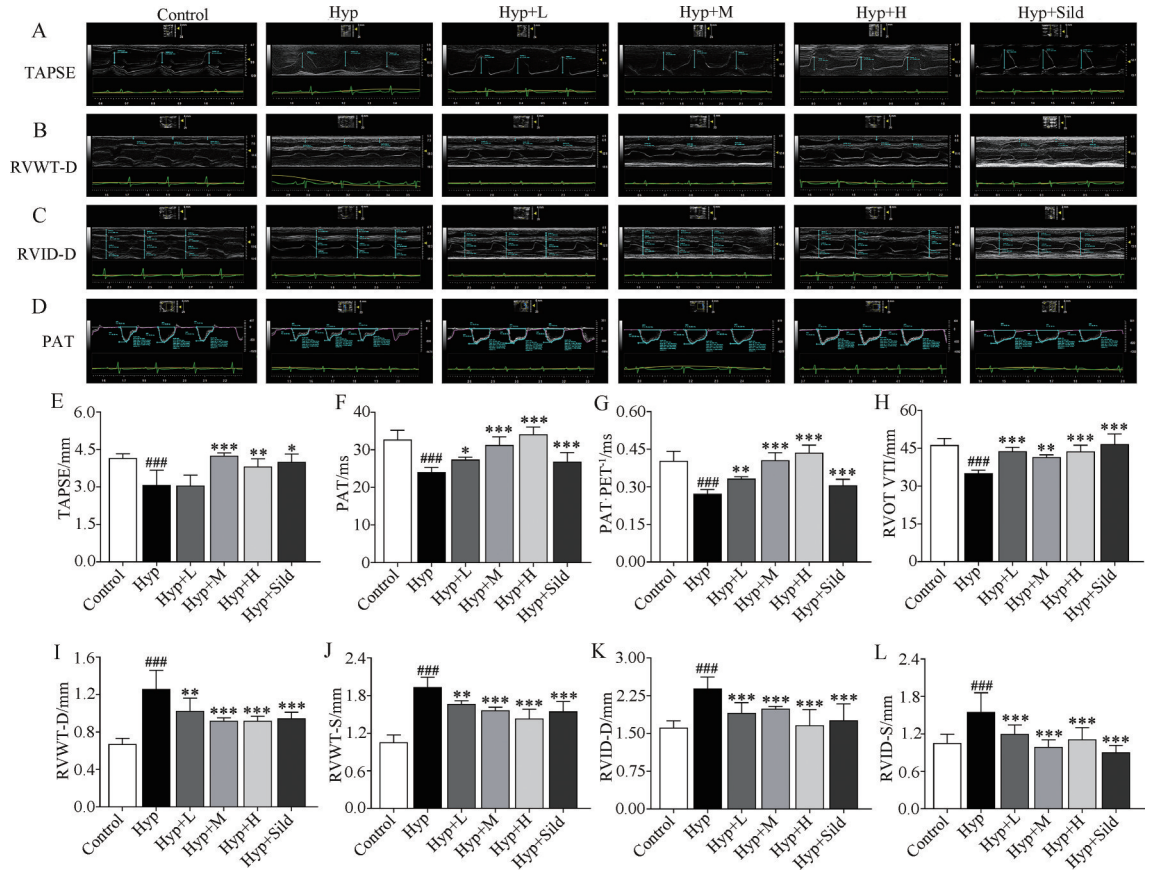



**Figure 1** PE significantly improves RV function in hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension (HPH) rats. Rats were divided into the following groups: Control group: Rats in the control group were raised for 4 weeks in the normal environment. Hypoxia (Hyp) group: Rats were kept in a hypobaric chamber for 4 weeks at a simulated altitude of 5 000 m; Hyp+PE group: Rats were intragastrically administered with 12.5 (L), 25 (M), and 50 (H) mg·kg$^{-1}$·d$^{-1}$ of PE before kept them in the hypobaric chamber and then treated for 4 weeks; Hyp+Sild group: Rats were intragastrically administered with Sild (30 mg·kg$^{-1}$·d$^{-1}$) for 4 weeks. A, E: Representative TAPSE images and statistical results; B, I, J: Representative RVWT-D, RVWT-S images and statistical results; C, K, L: Representative RVID-D, RVID-S images and statistical results; D, F, G, H: Representative PAT, PAT·PET$^{-1}$, RVOT VTI images and statistical results. $n$ = 5, $\bar{x} \pm s$. $^{###}P < 0.001$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* Hyp group. RV: Right ventricular; PE: α-Phellandrene; Sild: Sildenafil; TAPSE: Tricuspid annular plane systolic excursion; RVWT-D: RV free wall thickness in diastole; RVWT-S: RV free wall thickness systole; RVID-D: Right ventricular inner diameter diastole; RVID-S: Right ventricular inner diameter systole; PAT: Pulmonary artery acceleration time; RVOT VTI: Right ventricular outflow tract velocity time integral; PAT·PET$^{-1}$: Pulmonary artery acceleration time/pulmonary artery ejection time

组大鼠RV组织的α-SMA表达水平显著降低。

### 5 PE改善HPH大鼠RV组织氧化水平的损伤

如图4所示, 与对照组相比, 模型组大鼠RV组织的MDA含量显著增加, SOD活性、GSH-PX活性和GSH含量显著降低; 与模型组相比, PE和Sild干预组大鼠RV组织的MDA含量显著降低, SOD活性、GSH含量和GSH-PX活性显著增加。

### 6 PE能够恢复HPH大鼠RV组织中NO-sGC-cGMP通路相关因子的含量和蛋白的表达水平

如图5A～C所示, 与对照组相比, 模型组大鼠RV组织的eNOS和sGC表达显著下降; 与模型组相比, PE-H干预组大鼠RV组织的eNOS表达水平显著增加, PE和Sild干预组大鼠RV组织的sGC表达水平显著增加。

如图5D、E所示, 与对照组相比, 模型组大鼠RV组织的cGMP和NO含量显著降低; 与模型组相比, PE和Sild干预组大鼠RV组织的cGMP和NO含量显著增加。

### 7 H9C2细胞活力检测

本课题组选择3.125、6.25、12.5、25、50和100 μmol·L$^{-1}$梯度浓度进行筛选, 如图6所示, 3.125 μmol·L$^{-1}$的$A$值与低氧组相当; 随剂量的增加, 细胞的$A$值增加; 25和50 μmol·L$^{-1}$的$A$值相当, 到100 μmol·L$^{-1}$时, $A$值降低。同时, 课题组也检测了不同浓度PE对细胞活力的影响, 发现在100 μmol·L$^{-1}$时对细胞有毒性。故选择12.5

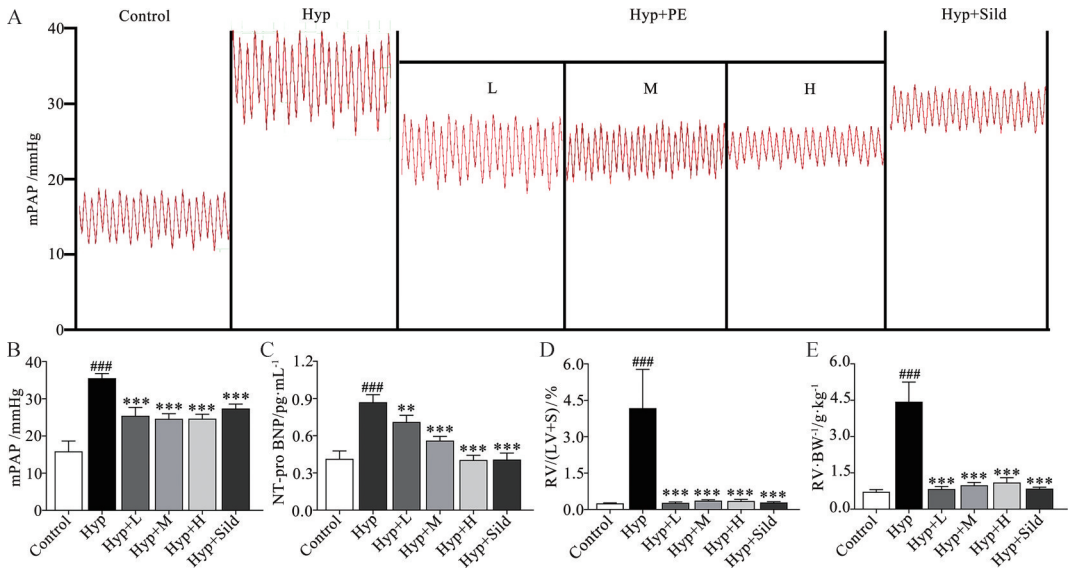



**Figure 2** Effects of PE on physiological parameters in SD rats exposed to hypoxia for 4 weeks. A, B: Representative wave images and quantitative evaluation of mPAP; C: Representative the content of NT-pro BNP; D: Representative the level of RV·(LV+S)$^{-1}$; E: Representative the level of RV·BW$^{-1}$; $n$ = 5, $\bar{x} \pm s$. $^{###}P < 0.001$ *vs* control group; $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* Hyp group. mPAP: Mean pulmonary arterial pressure; RV·BW$^{-1}$: The ratio of right ventricular weight and body weight; RV·(LV+S)$^{-1}$: Ratio of right ventricular weight to left ventricular (LV) plus septal (S) weight; NT-pro BNP: N-Terminal pro-brain natriuretic peptide

**Table 1** Effect of PE on RV-PA coupling function in HPH rats. $n$ = 5, $\bar{x} \pm s$. $^{###}P < 0.001$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* Hyp group. FAC: Fractional area change, calculated as (end-diastolic area-ESA)·end-diastolic area$^{-1}$×100% (where ESA represents end-systolic area); RVEF: RV ejection fraction; FAC·mPAP$^{-1}$: Fractional area change divided by mean pulmonary artery pressure×100%; TAPSE·PASP$^{-1}$: Tricuspid annular plane systolic excursion divided by pulmonary artery systolic pressure

| Parameter | Control | Hyp | Hyp+L | Hyp+M | Hyp+H | Hyp+Sild |
|---|---|---|---|---|---|---|
| FAC/% | 66.06 ± 7.01 | 26.16 ± 2.92$^{###}$ | 38.50 ± 3.57$^{***}$ | 45.96 ± 3.21$^{***}$ | 62.04 ± 1.09$^{***}$ | 56.88 ± 2.77$^{***}$ |
| RVEF | 92.30 ± 2.64 | 44.2 ± 10.11$^{###}$ | 65.25 ± 4.48$^{***}$ | 82.42 ± 4.06$^{***}$ | 88.81 ± 2.21$^{***}$ | 81.37 ± 3.12$^{***}$ |
| FAC·mPAP$^{-1}$/% | 4.31 ± 1.07 | 0.74 ± 0.09$^{###}$ | 1.52 ± 1.56$^{***}$ | 1.87 ± 0.18$^{***}$ | 2.52 ± 0.15$^{***}$ | 2.08 ± 0.07$^{***}$ |
| TAPSE·PASP$^{-1}$ | 0.27 ± 0.05 | 0.09 ± 0.02$^{###}$ | 0.13 ± 0.01$^{*}$ | 0.17 ± 0.01$^{***}$ | 0.16 ± 0.01$^{***}$ | 0.15 ± 0.01$^{**}$ |

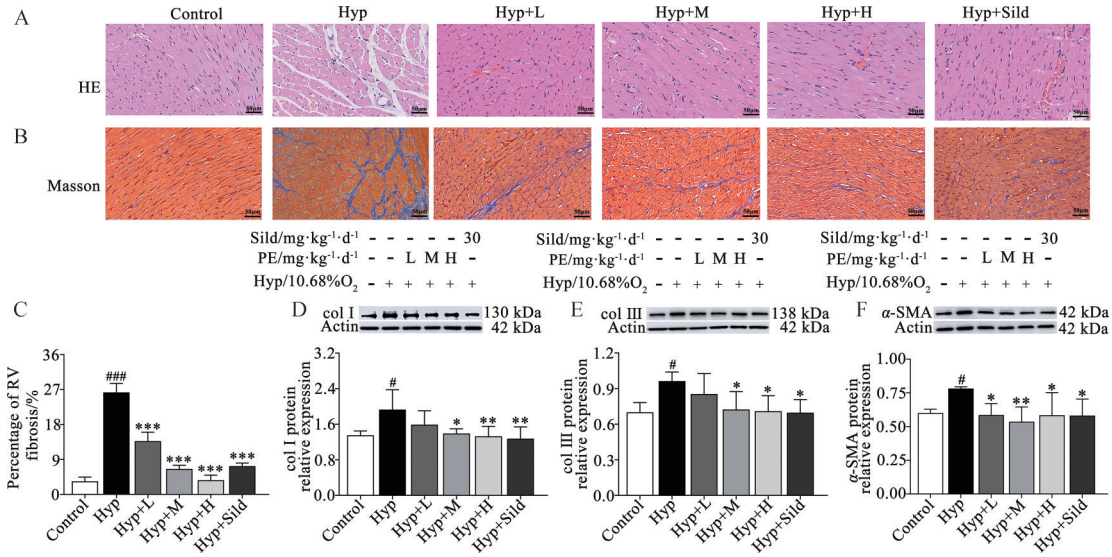



**Figure 3** Effects of PE on RV tissue fibrous structure in HPH rats (40×). A, B: HE staining (A) and Masson staining (B) for pathological analysis of RV tissue ($n$ = 3); C: Representative the percentage of RV fibrosis; D: Representative the expression of col I ($n$ = 5); E: Representative the expression of col III ($n$ = 5); F: Representative the expression of α-SMA ($n$ = 5). $\bar{x} \pm s$. $^{#}P < 0.05$, $^{###}P < 0.001$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* Hyp group. col I: Collagen I; col III: Collagen III; α-SMA: α-Smooth muscle actin; HE: Hematoxylin and eosin staining; Masson: Masson's trichrome staining

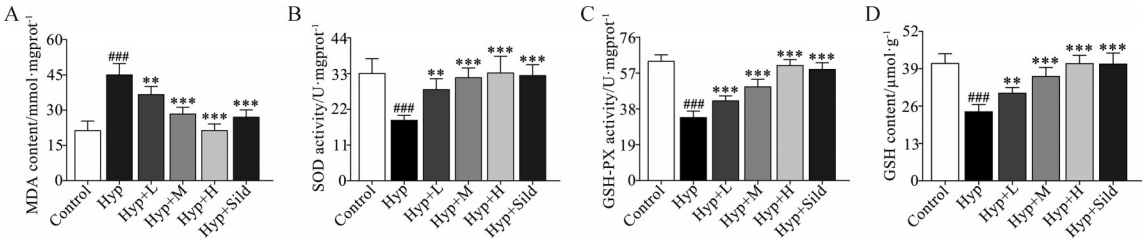



**Figure 4** PE improves oxidative levels in RV tissues of HPH rats. A: Representative the content of MDA; B: Representative the activity of SOD; C: Representative the activity of GSH-PX; D: Representative the content of GSH. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* control group; $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* Hyp group. MDA: Malondialdehyde; SOD: Superoxide dismutase; GSH-PX: Glutathione peroxidase; GSH: Glutathione

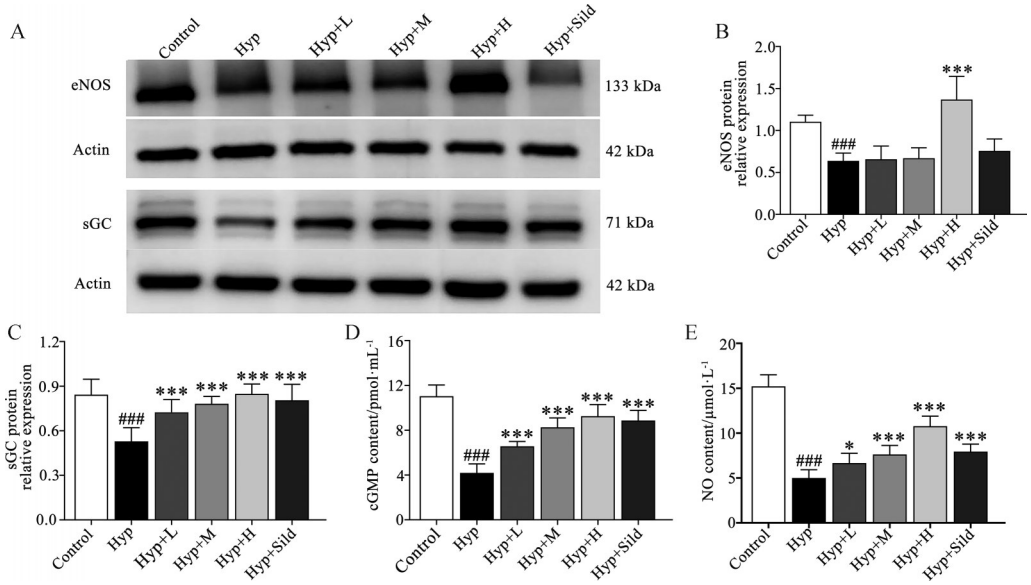



**Figure 5** Effects of PE on the expression levels of NO-sGC-cGMP pathway-related proteins in RV tissues of HPH rats. A: Representative the protein banding pattern; B, C: The protein level of eNOS and sGC; D, E: The content of cGMP and NO. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$ *vs* Hyp group. eNOS: Endothelial nitric oxide synthase; NO: Nitric oxide; sGC: Soluble guanylyl cyclase; cGMP: Cyclic guanosine phosphate

和25 μmol·L$^{-1}$分别作为PE-M和PE-H浓度进行机制验证。

## 8 PE能够恢复低氧H9C2细胞中NO-sGC-cGMP通路相关因子的含量和蛋白的表达水平

如图7A、B所示, 与对照组相比, 模型组H9C2细胞培养上清液中NO和cGMP的含量显著降低; 与模型组相比, PE干预组H9C2心肌细胞培养上清液中NO和cGMP的含量显著增加; 与L-NAME组相比, PE-H+L-NAME干预组H9C2心肌细胞培养上清液中NO和cGMP的含量显著增加。

随后研究发现, 如图7C～E所示, 与对照组相比, 模型组H9C2心肌细胞中eNOS和sGC表达显著降低;

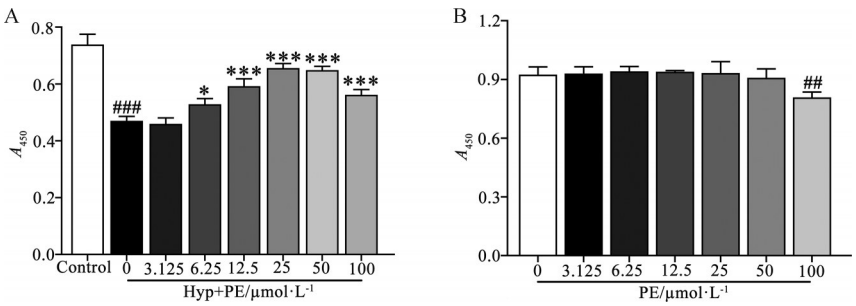



**Figure 6** PE ameliorates H9C2 cells from hypoxia-induced injury. A: Effects of PE on the viability and apoptosis of hypoxia-induced H9C2 cells; B: Effects of different concentrations of PE on the viability of H9C2 cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$ *vs* Hyp group

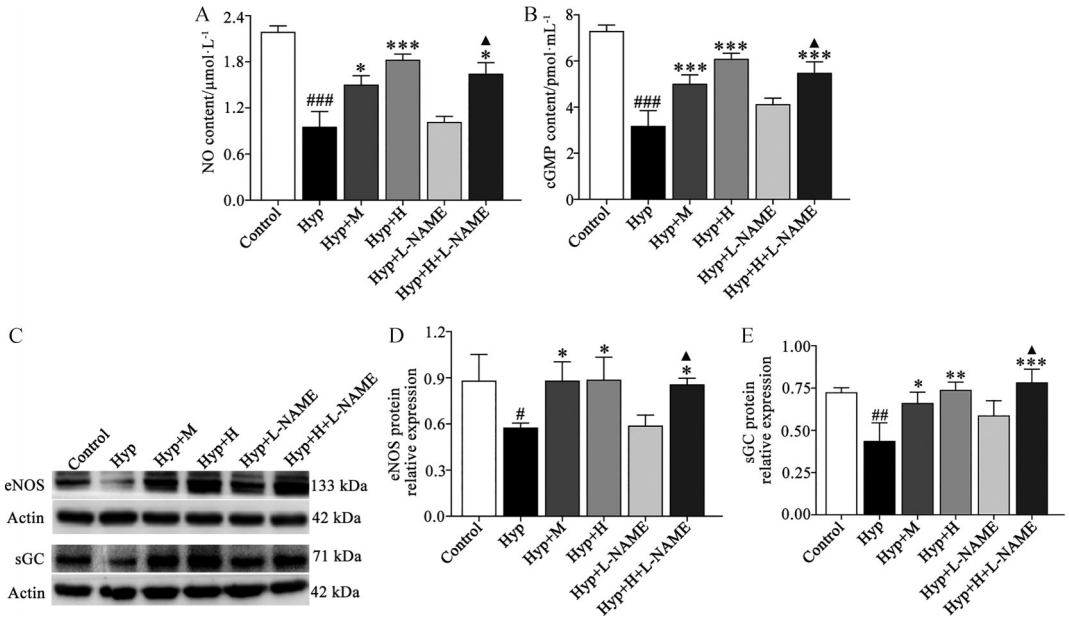



**Figure 7** PE ameliorates H9C2 cells from hypoxia-induced injury. H9C2 were exposed to 1% $O_2$ with or without PE or L-NAME treatment for 24 h. A, B: Measured the content of NO and cGMP in H9C2 supernatant; C: Representative the protein banding pattern; D, E: The protein level of eNOS and sGC. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* Hyp group; $^{\blacktriangle}P < 0.05$ *vs* Hyp + L-NAME group

与模型组相比, PE 干预组 H9C2 心肌细胞中 eNOS 和 sGC 表达水平显著增加; 与 L-NAME 组相比, PE-H+L-NAME 干预组 H9C2 心肌细胞中 eNOS 和 sGC 表达水平显著增加。

## 讨论

慢性低氧环境暴露会引起 RV 后负荷增加, 严重时会导致以 RV 肥厚和 RV 功能不全为主要病理特征的高原心脏病[8]。PE 存在于植物精油中, 具有抗菌、抗肿瘤、抗痛觉过敏、抗抑郁、抗帕金森病、生物杀虫效果。PE 具有低毒的特性, 其安全性已得到验证, 因此获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准用于食品用途[9-12]。本课题组前期研究表明, PE 对去甲肾上腺素预收缩的大鼠肺小动脉、胸主动脉环具有舒张作用, 其舒张效果可能与 NO-sGC-cGMP 通路有关[6]。本研究通过构建 HPH 大鼠模型, 进一步研究 PE 对 HPH 大鼠 RV 结构和功能的影响及其对 NO-sGC-cGMP 通路的调控机制。

课题组首先利用小动物超声心动图评估 PE 对 HPH 大鼠器官水平右心结构和功能的影响。TAPSE 和 FAC 是评估 RV 收缩功能的重要指标, 其中 TAPSE 反映了 RV 在收缩期三尖瓣环的纵向收缩位移, 是 PAH 和其他心血管疾病强有力的预后标志物; FAC 是指右心室舒张末期与收缩末期容积的变化幅度, 可作为右室射血分数 (RVEF) 的替代指标[13]。本研究结果表明, 与模型组相比, PE 和 Sild 干预均能显著增加 HPH 大鼠的 TAPSE 和 FAC 的水平, 改善 HPH 大鼠的收缩功能。RVWT 和 RVID 是 RV 的关键解剖和功能指标, 其厚度和大小可用于评估 RV 的整体结构变化。课题组发现, 慢性低氧刺激能够增加 RVWT-D、RVWT-S、RVID-D 和 RVID-S, PE 和 Sild 干预均能显著降低 RVWT-D、RVWT-S、RVID-D 和 RVID-S 的水平, 说明 PE 和 Sild 干预能够改善 HPH 大鼠 RV 结构的变化。PAT 是肺动脉瓣开启到肺动脉峰值收缩速度的时间, 与 mPAP 呈负相关, 可以独立使用或与三尖瓣反流速度一起预测 PAH 的进展[14]。此外, PAT 降低会使 $PAT \cdot PET^{-1}$ 比值降低。研究显示, 在肺动脉高压患者中, $PAT \cdot PET^{-1}$ 比值缩短反映了更高的肺动脉压力和更差的右心功能[15], PE 和 Sild 干预显著增加 HPH 大鼠 RV 的 PAT 和 $PAT \cdot PET^{-1}$ 的水平, 因此, PE 对 RV 功能的改善也可能与其对肺血管功能的改善有关。于是课题组进一步评估 PE 对 HPH 大鼠 RV-PA 耦联水平的影响。RV-PA 耦联是评估右心室功能与肺循环负荷匹配的核心指标, 其失衡 (解耦联) 是多种心血管疾病 (如肺动脉高压、心力衰竭、先天性心脏病) 患者预后不良的独立预测因子[16]。$TAPSE \cdot PASP^{-1}$ 是心衰患者不良预后的独立预测指标, 作为侵入性指标收缩期末期/动脉弹性 ($Ees \cdot Ea^{-1}$) 比值的替代性指标, 也是反映 RV-PA 耦合水平的重要指标[8]。此外, $FAC \cdot mPAP^{-1}$ 也能作为 $Ees \cdot Ea^{-1}$ 替代指标用于评估 RV-PA 耦合水平[17,18]。本研

究发现, PE和Sild干预均能够显著增加TAPSE·PASP$^{-1}$和FAC·mPAP$^{-1}$的水平 (表1), 维持HPH大鼠的RV-PA耦联水平。总而言之, PE干预显著改善HPH大鼠器官水平的RV结构和功能, 并维持RV-PA耦联水平。

为进一步阐明PE改善HPH大鼠RV结构和功能的组织学因素, 本课题组使用HE和Masson三色染色进行RV组织形态学的评估 (图3)。 HE染色结果显示, 慢性低氧组大鼠RV心肌细胞呈现典型代偿性肥大特征, 并伴有核固缩及肌纤维排列紊乱[19], PE和Sild有效减少了心肌细胞的核固缩, 并缓解了由慢性低氧刺激引起的心肌肥大。Masson三色染色显示, HPH大鼠RV组织纤维化水平显著高于对照组。PE和Sild干预有效降低RV纤维化水平。在纤维化过程中, α-SMA是肌成纤维细胞的标志, 而col I和col III是主要的细胞外基质成分, 且col I和col III的混合基质能更有效激活成纤维细胞, 促进α-SMA的表达和胶原合成[20,21]。结果显示 (图3), PE和Sild干预均能够显著降低HPH大鼠RV组织中的col I、col III和α-SMA的表达。因此, PE在HPH大鼠中通过减少组织水平的纤维化和胶原含量来改善器官水平的RV结构和功能。

氧化应激通过直接或调控细胞因子和生长因子信号传导的过程导致心肌纤维化[22]。MDA、SOD、GSH-PX和GSH是体内重要的氧化应激标志因子, 能够维持心肌细胞的正常氧化还原状态[23]。作为脂质过氧化的最终产物, MDA是氧化损伤的生物标志物之一[24]。HPH模型组大鼠RV组织中MDA水平增加 (图4), 在PE和Sild干预后其水平显著降低。SOD是生物体内的抗氧化金属酶, 具有清除氧自由基, 发挥抗氧化的作用[25]。本研究发现, PE和Sild显著逆转了由慢性低氧刺激引起的SOD活性的降低。此外, PE对RV的抗氧化效果还通过增加GSH水平和GSH-PX活性来发挥。GSH-PX是关键的抗氧化酶之一, 它特异性地催化GSH与活性氧反应形成氧化型谷胱甘肽, 从而保护细胞免受氧化损伤[26]。

本课题组前期研究表明, PE能够通过促进NO的释放, 发挥血管舒张作用[6]。有研究发现由eNOS旁分泌的NO还可调节心脏收缩功能[27]。课题组发现PE和Sild干预均能够显著增加HPH大鼠RV组织和低氧模型组H9C2细胞中eNOS蛋白表达水平和NO含量。此外, 课题组也利用eNOS的抑制剂L-NAME[28]在细胞水平进行了进一步的验证。结果发现, L-NAME干预能显著降低低氧模型组H9C2细胞中eNOS蛋白表达水平和NO含量, 经PE-H干预能显著增加L-NAME干预组H9C2细胞中eNOS蛋白表达水平和NO含量。因此, PE能够通过增加eNOS的蛋白表达水平, 增加由其分泌的NO含量, 从而发挥改善右心结构和功能的药效。NO通过激活心脏间质细胞中的sGC, 催化生成cGMP, 从而抑制心肌纤维化、降低血管僵硬度并诱导血管舒张[29]。cGMP还能通过抑制TGF-β/Smad信号通路及心肌成纤维细胞增殖, 减轻心脏纤维化与重塑[30]。PE显著增加了HPH大鼠RV组织和低氧模型组H9C2细胞中sGC蛋白表达水平和cGMP含量, 同时还能显著增加L-NAME干预组H9C2细胞中sGC蛋白表达水平和cGMP的含量。因此, PE能够通过增加eNOS的蛋白表达水平, 刺激NO分泌, 并通过上调其下游sGC蛋白的表达水平, 增加cGMP合成, 降低col I、col III及α-SMA的蛋白表达水平, 减轻胶原沉积和纤维化, 改善HPH大鼠RV结构与功能 (图8)。

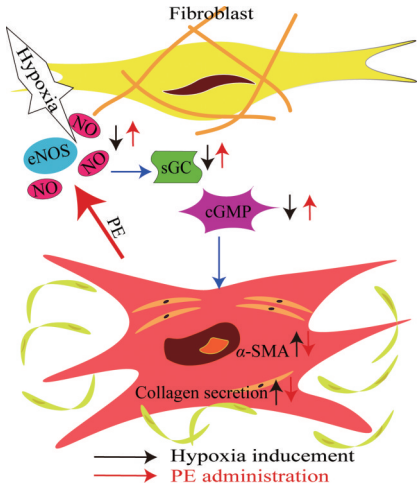



**Figure 8** Regulation of the NO-sGC-cGMP signaling pathway by PE

**作者贡献**: 王义文和杨占婷负责实验设计、相关实验操作、数据分析、文章撰写及修改; 白海军和潘旭负责图表的修改和查找相关文献; 白古月负责培养细胞; 李占强和芦殿香指导本课题的实验思路及技术难题。

**利益冲突**: 所有作者均声明无利益冲突。

## References

[1] Somanshu B, Jason H, Soban U. Comparative analysis of right ventricular metabolic reprogramming in pre-clinical rat models of severe pulmonary hypertension-induced right ventricular failure [J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 9935423.

[2] Odeigah OO, Kwan ED, Garcia KM, et al. A computational study of right ventricular mechanics in a rat model of pulmonary arterial hypertension [J]. Front Physiol, 2024, 15: 1360389.

[3] Wang K, Wang YX, An Q, et al. Effect of individual hyperbaric chamber on right ventricular function andright heart systolic reserve capacity in serviceman advancing rapidly tohigh altitudes

[J]. Chin Med Equip J (医疗卫生装备), 2021, 42: 50-54.

[4] Li YT, Li Y. Research on mechanism of pulmonary vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension [J]. J Med Inform (医学信息), 2020, 33: 26-29.

[5] Wang JM, Yuan TX, Gao L, et al. Research progress on mechanisms and therapeutic drugs of hypoxic pulmonary hypertension [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2022, 38: 1281-1288.

[6] Pan X, Lu DX, Hua Yu MD, et al. Vasodilatory effects and mechanism of phellandrene on the pulmonary arterioles and thoracic aorta rings of NE pre-constricted male rats [J]. J Chin High Alt Med Biol (中国高原医学与生物学杂志), 2025, 46: 1-13.

[7] Liu TT, Zhou G, Gou LJ, et al. Research progress on chemical composition and pharmacological activities of dill essential oil and its extract [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2022, 53: 2582-2596.

[8] Junichi O, Karima H, Tsukasa S, et al. Identification of the long non-coding RNA H19 as a new biomarker and therapeutic target in right ventricular failure in pulmonary arterial hypertension [J]. Circulation, 2020, 142: 1464-1484.

[9] Lima EJSP, Fontes SS, Nogueira LM, et al. Essential oil from leaves of *Conobea scoparioides* (Cham. & Schltdl.) Benth. (Plantaginaceae) causes cell death in HepG2 cells and inhibits tumor development in a xenograft model [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110402.

[10] Matteo R, Andrea D, Raissa B, et al. Alpha-phellandrene and alpha-phellandrene-rich essential oils: a systematic review of biological activities, pharmaceutical and food applications [J]. Life, 2022, 12: 1602.

[11] Pinheiro-Neto FR, Lopes EM, Acha BT, et al. $\alpha$-Phellandrene exhibits antinociceptive and tumor-reducing effects in a mouse model of oncologic pain [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2021, 418: 115497.

[12] Kumar R, Arora S, Alam S, et al. Alpha-phellandrene: a promising natural remedy for rotenone-induced Parkinson's disease [J]. Recent Adv Food Nutr Agric, 2025. DOI: 10.2174/012772574X341801241218051720.

[13] Kandice M, Luc M. Echocardiographic assessment of right ventricular function in paediatric heart disease: a practical clinical approach [J]. CJC Pediatr Congenit Heart Dis, 2022, 1: 136-157.

[14] Trittmann JK, Almazroue H, Nelin LD, et al. PATET ratio by doppler echocardiography: noninvasive detection of pediatric pulmonary arterial hypertension [J]. Pediatr Res, 2021, 92: 631-636.

[15] He Q, Lin Y, Zhu Y, et al. Clinical usefulness of right ventricle-pulmonary artery coupling in cardiovascular disease [J]. J Clin Med, 2023, 12: 2526.

[16] Houston BA, Brittain EL, Tedford RJ. Right ventricular failure [J]. N Engl J Med, 2023, 388: 1111-1125.

[17] Maruyama K, Imanaka-Yoshida K. The pathogenesis of cardiac fibrosis: a review of recent progress [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23: 2617.

[18] López B, Ravassa S, Moreno MU, et al. Diffuse myocardial fibrosis: mechanisms, diagnosis and therapeutic approaches [J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18: 479-498.

[19] Bolivar S, Espitia-Corredor JA, Olivares-Silva F, et al. In cardiac fibroblasts, interferon-beta attenuates differentiation, collagen synthesis, and TGF-$\beta$1-induced collagen gel contraction [J]. Cytokine, 2021, 138: 155359.

[20] Li W, Chi N, Rathnayake RAC, et al. Distinctive roles of fibrillar collagen I and collagen III in mediating fibroblast-matrix interaction: a nanoscopic study [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 560: 66-71.

[21] Sadiq IZ. Free radicals and oxidative stress: signaling mechanisms, redox basis for human diseases, and cell cycle regulation [J]. Curr Mol Med, 2023, 23: 13-35.

[22] Yu X, Su W, Wu YS, et al. Expressions of serum NT-proBNP, PCT and oxidative stress injury indexes in septic shock patients with myocardial injury and their significance [J]. Chin J Nosocomiol (中华医院感染学杂志), 2024, 34: 1944-1948.

[23] Liu ZY, Song K, Tu B, et al. Crosstalk between oxidative stress and epigenetic marks: new roles and therapeutic implications in cardiac fibrosis [J]. Redox Biol, 2023, 65: 102820.

[24] Zhen G, Liang W, Jia H, et al. Melatonin relieves sepsis-induced myocardial injury *via* regulating JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Minerva Med, 2022, 113: 983-989.

[25] Wang C, Yuan W, Hu A, et al. Dexmedetomidine alleviated sepsis-induced myocardial ferroptosis and septic heart injury [J]. Mol Med Rep, 2020, 22: 175-184.

[26] Carlström M, Weitzberg E, Lundberg JO. Nitric oxide signaling and regulation in the cardiovascular system: recent advances [J]. Pharmacol Rev, 2024, 76: 1038-1062.

[27] Panthiya L, Tocharus J, Onsa-Ard A, et al. Hexahydrocurcumin ameliorates hypertensive and vascular remodeling in L-NAME-induced rats [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2022, 1868: 166317.

[28] Sadek MS, Cachorro E, El-Armouche A, et al. Therapeutic implications for PDE2 and cGMP/cAMP mediated crosstalk in cardiovascular diseases [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21: 7462.

[29] Belenkov YN, Kozhevnikova MV. Soluble guanylate cyclase: restoration of the NO-sGC-cGMP signaling pathway activity. A new opportunity in the treatment of heart failure [J]. Kardiologiia, 2023, 63: 68-76.

[30] Mangmool S, Duangrat R, Parichatikanond W, et al. New therapeutics for heart failure: focusing on cGMP signaling [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24: 12866.