

红大戟醇提物对缺氧诱导的小鼠肺上皮 细胞损伤的保护作用及机制

杨秀玲, 李昊, 龙云, 杨真琴, 申利, 邱斌, 李学芳, 张范*

云南中医药大学, 云南 昆明 650500

摘要 目的:探讨红大戟醇提物对缺氧诱导的小鼠肺上皮细胞 TC-1 损伤的保护作用及机制。方法:利用液相色谱-质谱联用仪(LC-MS)分析红大戟醇提物中的化合物。通过三气培养箱(37℃、5% CO₂、94% N₂、1% O₂)建立细胞缺氧模型。将 TC-1 细胞分为常氧组(Normal 组)、缺氧组(Hypoxia 组)、缺氧+红大戟醇提物低剂量组(Hypoxia+KRL 组, 90 μg/mL)、缺氧+红大戟醇提物高剂量组(Hypoxia+KRH 组, 180 μg/mL)。CCK-8 法测定细胞活力;倒置显微镜观察细胞形态变化并统计细胞个数;检测细胞培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)的泄露量及细胞中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)及 ATP 含量;荧光显微镜观察细胞中活性氧(ROS)荧光强度;RT-qPCR 法检测缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)、内皮一氧化氮合酶(eNOS)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的 mRNA 表达量;Western blot 法检测细胞中 HIF-1α、eNOS、iNOS 的蛋白表达水平。结果:在红大戟醇提物中找到 22 个化合物。TC-1 细胞经过 24 h 的缺氧处理后,细胞肿大变圆、死细胞增多,ROS($P<0.01$)、LDH($P<0.01$)、MDA($P<0.01$)、TNF-α($P<0.01$)及 IL-6($P<0.01$)含量显著升高,SOD($P<0.01$)和 ATP($P<0.01$)含量则显著降低,HIF-1α($P<0.01$)与 iNOS($P<0.01$)的 mRNA 及蛋白表达水平显著升高,eNOS($P<0.01$)的表达水平则降低。在红大戟醇提物处理后细胞数量显著增加,细胞形态趋于 Normal 组,ROS($P<0.01$)、MDA($P<0.05$)、TNF-α($P<0.01$)及 IL-6($P<0.01$)含量降低;HIF-1α($P<0.05$)、iNOS($P<0.05$)的 mRNA 及蛋白表达水平降低;SOD($P<0.01$)、ATP($P<0.01$)、eNOS($P<0.05$)则显著升高。结论:红大戟醇提物在 TC-1 细胞受到缺氧刺激时能够下调 HIF-1α 的表达,改善细胞能量代谢紊乱、氧化应激反应和炎症反应来发挥抗缺氧作用。

关键词 红大戟;缺氧损伤;氧化应激;HIF-1α/eNOS

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1002-2392(2026)03-0024-10

DOI:10.19664/j.cnki.1002-2392.260050

缺氧是指机体内组织或细胞因氧气供应不足或用氧障碍,从而导致组织或细胞的形态结构、生理功能及能量代谢等发生异常变化的病理过程^[1]。多学科研究表明缺氧损伤致病为复杂过程,涉及机体对氧气的摄取、运输、分配和利用系统,其病理特征为组织器官缺血缺氧引起的氧化应激、炎症反应、微循环障碍、线粒体功能障碍以及细胞凋亡等系统性病变^[2-3]。乙酰唑胺是 FDA 批准用于防治高原病的化学药物,但使用

后伴随耳鸣、厌食、恶心、呕吐、腹泻、多尿等毒副作用^[4]。尼莫西平、呋塞米和布洛芬等药物也常用于缓解高原病症状,但因疗效有限、毒副作用过大、适用人群受限而无法满足实际临床需求^[5]。中药资源丰富,且具有多成分、多途径、多靶点以及安全性高和功能性丰富等优势,从中挖掘潜在治疗缺氧药物和健康产品的前景广阔。

中医认为缺氧成因大多与气虚、气滞、痰浊、瘀血、阴虚等有关,因此中医药对缺氧的防治以补气活血、益气健脾、活血化瘀、豁痰开窍等为原则^[6-7]。红大戟为茜草科植物红大戟[*Knoxia roxburghii* (Sprengel) M. A. Rau, KR],习称红牙戟、紫大戟、红芽大戟等,味苦、辛,性寒,归肺、脾、肾经,始载于《小儿药证真诀》,在《中医志》和《中药大辞典》中均有记载^[8]。在相关彝

收稿日期:2025-01-22 修回日期:2025-09-24

基金项目:云南省基础研究计划项目(202101AZ070001-006);云南省生物医药重大专项(202302AA310014)

作者简介:杨秀玲(2000-),女,硕士研究生,专业:药物分析学。

*通信作者:张范(1982-),男,博士,副研究员,硕士生导师,主要从事分子药理学研究。

药书籍中记载其具有补肝益肾、活血消炎、利水消肿等功效,彝族常用于治疗脾虚食少、疳积贫血、肾炎水肿、肺虚咳嗽等^[9],应用经验表明红大戟具有健脾生血、气血双补之效^[10-11]。在著名彝医张之道主要医疗经验与特色疗法研究^[12]中也记载其具有健脾生血、气血双补的作用,常用于治疗劳伤、贫血、营养不良、四肢无力等症。红大戟所含的三萜类化合物阿江榄仁酸^[13-14];黄酮类成分毛蕊异黄酮^[15]、大黄酮^[16];蒽醌类成分甲基异茜草素^[17]、甲基异茜草素-1-甲醚^[18]等都具有较好的抗炎、抗氧化的作用。同时也有相关文献^[19]证明红大戟提取物对小鼠哮喘具有显著的治疗效果,可明显改善哮喘小鼠肺组织炎性浸润等,也可以用于治疗肺气肿、肺癌^[20]等多种疾病。因此本研究利用低氧培养小鼠肺上皮细胞 TC-1 作为低氧型肺损伤细胞模型,探讨红大戟对低氧诱导 TC-1 细胞损伤的影响,为红大戟应用于低氧型肺损伤的相关研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

小鼠肺上皮细胞 TC-1,购自镜像绮点(上海)细胞技术有限公司(Cellverse Co. Ltd.)。

1.2 药材

红大戟购自云南省大理州,经云南中医药大学邱斌正高级工程师鉴定为茜草科植物红大戟 *Knoxia roxburghii* (Sprengel) M. A. Rau 的干燥块根。

1.3 主要试剂及仪器

CCK-8(PMK0854)试剂盒购于武汉普美克生物技术有限公司;RPMI Medium 1 640 培养基(6124375)、0.25% Trypsin-EDTA(2926408)购于赛默飞世尔科技有限公司;胎牛血清(SA240409)购于武汉普诺赛生物技术有限公司;LDH(A020-2)、MDA(A003-4-1)、SOD(A001-3)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;TNF- α (EMC102a)、IL-6(EMC004)试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司;ATP 含量测定试剂盒(BC0305)购自北京索莱宝科技有限公司;BCA 蛋白浓度检测试剂盒(P10010)、活性氧检测试剂盒(S0033S)购自碧云天生物技术有限公司;Total RNA 提取试剂(TCH0200)购自宝日医生物技术有限公司;All-in-One First-Strand Synthesis MasterMix(EG15133S)、Taq SYBR Green qPCR Premix(EG20117M)购自江苏百时美生物科技有限公司;HIF-1 α (bs-0737R)、iNOS(bs-0162R)、eNOS(bsm-33176M)、 β -actin(bs-0061R)购自北京博森生物科技有限公司。

MCO-20AIC 型二氧化碳培养箱(日本三洋科技有限公司);OX-101C 型三气培养箱(上海塔望智能科技有限公司);ECLIPSE TS100 型荧光倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司);G6545 液相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司);SpectraMax Plus 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);QuantStudio 1 Plus 实时荧光定量 PCR 仪(赛默飞世尔上海仪器有限公司)。

1.4 红大戟提取物的制备及成分分析

将干燥的红大戟块根粉碎后过 4 号筛,用 10 倍量的 75% 乙醇浸泡 2 h,回流提取 3 次,合并提取液,减压浓缩得浸膏,置 -80 °C 冰箱中 24 h 后冷冻干燥。

在配备双 AJS 电喷雾电离的 6 540 UHD 精确质量四级杆飞行时间(Q-TOP)光谱仪(ESI, Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA, USA)上使用 LC-MS 对 KR 醇提物中的化学成分进行初步表征。

色谱条件:色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μ m);检测波长 280 nm;流速 0.3 mL/min;进样体积 5 μ L。流动相由洗脱液 A(乙腈)和洗脱液 B(0.1% 甲酸水溶液, V/V)组成。梯度洗脱条件为 0 min, 22% A; 15 min, 18% A; 20 min, 28% A; 45 min, 38% A; 55 min, 68% A; 65 min, 68% A; 75 min, 78% A; 80 min, 100% A; 90 min, 22% A。

质谱条件:质谱采用正负离子同时扫描模式检测。离子源为 ESI;毛细管温度:350 °C;喷雾风速:8 L/min;加热模块:250 °C;接口电压:(+) 3.5 kV, (-) 2.8 kV;质量范围 m/z: 100 ~ 1 200 Da; MS2, m/z: 50 ~ 1 000 Da;工作站:Agilent Mass Hunter B.0 6.00, 用于数据处理、分子式预测和精确分子量计算。

1.5 细胞培养及分组

小鼠肺上皮细胞 TC-1 用 7 mL 含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 1 640 培养基在 T25 培养瓶中置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养,待细胞生长至 80% 密度时,传代、铺板,进行后续实验。

将 TC-1 细胞分为 4 组,分别为常氧组(Normal 组)、缺氧组(Hypoxia 组)、缺氧+红大戟醇提物低剂量组(Hypoxia + KRL 组)、缺氧+红大戟醇提物高剂量组(Hypoxia + KRH 组)。各组造模前在正常二氧化碳培养箱中培养 24 h 后,Normal 组更换为新鲜的完全培养基正常培养;Hypoxia 组更换为新鲜的完全培养基,Hypoxia + KRL 组和 Hypoxia + KRH 组分别给予 90 μ g/mL、180 μ g/mL 的含有红大戟醇提物的完全培养基后均置于 37 °C、5% CO₂、94% N₂、1% O₂ 的三气培养箱中低氧培养 24 h。

1.6 CCK-8 法检测细胞活力

取处于对数生长期的细胞以每孔 1×10^4 个/mL 细胞的密度接种在 96 孔板内,正常二氧化碳培养箱中培养 24 h 后进行上述分组处理。造模结束后,弃去旧培养基,每孔用 PBS 漂洗 2 次后加入 100 μ L 含有 10% CCK-8 工作液的完全培养基,将 96 孔板放回培养箱中继续避光培养 1 h,用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度值,根据每孔吸光度值对细胞存活率进行计算。

1.7 倒置显微镜观察缺氧培养下细胞的形态变化

取处于对数生长期的细胞以每孔 5×10^4 个/mL 细胞的密度接种在 24 孔板内,正常二氧化碳培养箱中培养 24 h 后进行上述分组处理,每组设置 3 个复孔。除 Normal 组外,其余组置于三气培养箱中培养 24 h。在倒置显微镜下观察各组细胞形态的变化,并利用 ImageJ 软件统计细胞个数。

1.8 检测 LDH、MDA 含量及 SOD 活性

取处于对数生长期的细胞以每孔 1×10^5 个/mL 细胞的密度接种在 6 孔板内,正常二氧化碳培养箱中培养 24 h 后进行上述分组处理。造模结束后,收集细胞培养上清液 11 000 r/min 离心 15 min,用于 LDH 含量测定。用细胞刮刀将细胞刮下转移到离心管中,用细胞超声破碎仪冰水浴破碎细胞,4 $^{\circ}$ C、11 000 r/min 离心 15 min。收集上清,弃去沉淀,按照试剂盒说明书测定 MDA 含量以及 SOD 活力。

1.9 ELISA 法检测 TNF- α 、IL-6 水平

按照“1.8”的给药方式处理后,收集细胞培养上清液 11 000 r/min 离心 15 min,按照 ELISA 试剂盒使用操作说明完成 TNF- α 、IL-6 检测,保存数据并进行统计分析。

1.10 ATP 含量测定

按照“1.8”的给药方式处理后,将细胞收集到离心管内,按照细胞数量加入适量的提取液,用细胞超声破碎仪破碎细胞,4 $^{\circ}$ C、11 000 r/min,离心 15 min;收集上清液加入 500 μ L 的氯仿充分振荡混匀,4 $^{\circ}$ C、11 000 r/min,离心 5 min 后取上清,置冰上待测。根据试剂盒的说明书,检测板中每孔加入 20 μ L 样品或标准品和 180 μ L ATP 检测工作液,混匀后放入酶标仪中检测并计算样品中的 ATP 含量。

1.11 DCFH-DA 荧光探针法检测 ROS 水平

按照“1.6”的给药方式处理后,弃去旧培养基后用无血清的培养基清洗 3 次,每孔加入 1 mL 用无血清的培养基按照 1:1 000 的稀释比稀释的 DCFH-DA 探针,放回培养箱中避光孵育 20 min,孵育结束后用无血

清的培养基洗涤 3 次,充分去除未进入细胞的 DCFH-DA,在荧光显微镜进行观察 ROS 荧光强度,用 Image J 软件统计每组细胞的荧光密度分析值,荧光密度分析值越高表明细胞 ROS 水平越高。

1.12 RT-qPCR 检测各组细胞中 HIF-1 α 、eNOS、iNOS 的 mRNA 表达水平

使用 Total RNA 提取试剂从 TC-1 细胞中提取总 RNA,进行定量后根据逆转录试剂盒的说明,逆转录合成 cDNA,分装放于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。逆转录结束后于 qPCR 仪上进行扩增。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 30 sec 预变性,95 $^{\circ}$ C 30 sec 变性,60 $^{\circ}$ C 10 sec 退火,72 $^{\circ}$ C 30 sec 延伸,循环 40 次。目的基因相对 mRNA 表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算,引物序列见下表 1。

表 1 引物序列

基因		引物序列	扩增片段长度/bp
iNOS	F	ACT TTG GAG CGA GTT GTG GAT TGT C	131
	R	TAG GTG AGG GCT TGG CTG AGT G	131
eNOS	F	GCA AGA GGA AGG AGT CTA GCA ACA C	79
	R	GAG CCC AGC CCA AAC ACA CAG	79
HIF-1 α	F	GCA ATT CTC CAA GCC CTC CAA G	111
	R	ATT CAT CAG TGGTGG CAG TTG TG	111
GAPDH	F	CCT CGT CCC GTA GAC AAA ATG	133
	R	TGA GGT CAA TGA AGG GGT CGT	133

1.13 Western blot 技术检测各组细胞中 HIF-1 α 、eNOS、iNOS 的蛋白表达水平

按照“1.8”的给药方式处理后,提取各组细胞中的总蛋白,BCA 法测定蛋白质浓度,提取液中加入 $5 \times$ 蛋白上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C 变性 10 min。经 SDS-PAGE 凝胶电泳,将蛋白质转移到 PVDF 膜上,转移完毕后用含 5% 的脱脂奶粉的封闭液室温封闭 1 h,加入抗体 (1:1 000) 稀释 HIF-1 α 、iNOS、eNOS,室温孵育 1 h。用 TBST 洗膜 3 次后,加入二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h,并用 ECL 显影曝光条带。利用 ImageJ 软件分析蛋白质条带的灰度值,与内参 β -actin 进行比较分析各组蛋白的相对表达量。

1.14 统计学处理

利用 GraphPad Prism 9 进行数据处理及统计学分析。数据符合正态分布,以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间两两比较采用 t 检验,多组间两两比较分析采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 红大戟醇提物中化合物的鉴定

通过 LC-MS 分析,从红大戟醇提物中鉴定出 22 种成分,其中包括三萜类、黄酮类、蒽醌类等,见表 2。

表 2 红大戟化学成分

序号	名称	分子式	实际分子量	m/s	t _R /min	ppm	ms/ms	文献
1	阿江榄仁酸 (Arjunolic acid)	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487.342 9	487.341 7	43.753	−2.462 33	487.336 3 454.170 5	[13]
2	甲基异茜草素 (Rubiadin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253.050 6	253.049 4	37.233	−4.742 13	224.044 0 209.059 5	[21]
3	6-羟基茜草素 (6-Hydroxyrubiadin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.045 5	269.043 7	33.308	−6.690 32	251.030 9 225.045 4	[8]
4	甲基异茜草素-1-甲醚 (Rubiadin-1-methyl ether)	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	267.064 3	267.064 0	28.767	−1.123 32	251.030 4 223.035 6	[21]
5	去甲虎刺醛 (Nordamnacanthal)	C ₁₅ H ₈ O ₅	267.029 9	267.029 1	9.006	−2.995 92	239.026 0 211.035 8 195.042 9	[21]
6	异茜草素 (Xanthopurpurin)	C ₁₄ H ₈ O ₄	239.035 0	239.034 4	34.023	−2.510 09	211.032 6 197.022 7 167.046 7	[21]
7	大黄酸 (Rhein)	C ₁₅ H ₈ O ₆	283.024 8	283.023 3	2.370	−5.299 89	238.029 4 211.031 9	[22]
8	毛蕊异黄酮 (Calycosin)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.060 2	283.059 3	7.825	−3.179 54	268.030 9 239.029 4 211.031 9	[22]
9	槲皮素 (Quercetin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.035 4	301.035 3	33.308	−0.332 19	272.024 2 244.032 7	[22]
10	5-羟甲基糠醛 (5-Hydroxymethylfurfural)	C ₆ H ₆ O ₃	127.039 0	127.038 4	2.029	−4.722 96	81.097 5 53.038 4	[22]
11	芦荟大黄素 (Aloeemodin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.055 0	269.043 7	4.249	−6.690 32	269.040 6 251.030 1 151.873 1	[22]
12	维采宁-2 (Vicenin-2)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.151 2	593.152 4	4.682	2.023 09	353.566 6 325.050 2	[22]
13	牡荆素 (Vitexin)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.098 4	431.098 7	9.339	0.695 89	341.687 3 281.041 1	[22]
14	高丽槐素 (Maackiain)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.060 2	283.059 1	10.886	−3.886 10	255.053 0 175.036 6 163.067 8	[8]
15	山柰酚 (Kaempferol)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.040 5	285.039 5	35.769	−3.508 27	258.044 6 213.052 0 151.052 9	[8]
16	芦西定 (Lucidin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.045 5	269.043 4	21.698	−7.805 37	251.031 0 223.036 6 195.088 2	[21]
17	豆异黄酮 (Glycitin)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	445.114 0	445.111 8	5.513	−4.942 55	445.109 6 283.056 2	[23]

续表 2

序号	名称	分子式	实际分子量	m/s	t _R /min	ppm	ms/ms	文献
18	茜草素 (Alizarin)	C ₁₄ H ₈ O ₄	239.035 0	239.034 9	33.491	-0.418 35	211.040 2 210.033 4 155.045 4	[23]
19	黄芩素 (Baicalein)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.045 5	269.043 8	22.047	-6.318 63	251.031 1 224.038 0 195.043 4	[23]
20	异牡荆素 (Isovitexin)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.098 4	431.099 0	64.780	1.391 79	239.034 9 281.003 6 323.007 6	[23]
21	红紫素 (Purpurin)	C ₁₄ H ₈ O ₅	255.029 9	255.030 7	27.258	3.136 89	171.045 4 183.044 5 227.034 7	[22]
22	山柰苷 (Kaempferitrin)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	577.156 3	577.156 7	9.091	0.693 05	287.054 2 285.039 0 149.046 7	[24]

2.2 缺氧环境下 TC - 1 的细胞活性变化

CCK - 8 结果显示,与 Normal 组相比,缺氧 24 h 后细胞活力显著降低 ($P < 0.01$)。与 Hypoxia 组相比,Hypoxia + KRL 组细胞活力明显上升 ($P < 0.01$),Hypoxia + KRH 组细胞活力显著上升 ($P < 0.01$),见表 3。说明红大戟醇提物能够提高缺氧环境下的细胞活力。

表 3 不同浓度红大戟醇提物对 TC - 1 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	细胞活力
Normal 组	100.24 ± 1.87
Hypoxia 组	63.74 ± 6.78 ^{##}
Hypoxia + KRL 组	75.27 ± 6.67 ^{**}
Hypoxia + KRH 组	83.04 ± 6.75 ^{**}

注:与 Normal 组比较,^{##} $P < 0.01$;与 Hypoxia 组比较,^{**} $P < 0.01$ 。

2.3 细胞形态变化

Normal 组细胞呈椭圆形或梭形,排列整齐密集,连接紧密,少见死细胞。与 Normal 组相比,Hypoxia 组细胞数量显著减少 ($P < 0.01$),死细胞增多透光性增加,排列紊乱,部分细胞肿大变圆,严重的皱缩变形。与 Hypoxia 组相比,Hypoxia + KRL 组中细胞数量明显增加 ($P < 0.01$),死细胞的数量明显减少,细胞连接增多;Hypoxia + KRH 组细胞数量显著增多 ($P < 0.01$),死细胞较少,细胞连接紧密,细胞轮廓相对清晰,形态

更加趋向于 Normal 组,见图 1,表 4。实验结果表明红大戟醇提物可以维持缺氧细胞的形态结构,保障细胞的生理功能。

表 4 细胞个数统计 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	细胞个数
Normal 组	1 388.67 ± 79.07
Hypoxia 组	492.67 ± 73.92 ^{##}
Hypoxia + KRL 组	809.33 ± 29.69 ^{**}
Hypoxia + KRH 组	1 049.00 ± 22.11 ^{**}

注:与 Normal 组比较,^{##} $P < 0.01$;与 Hypoxia 组比较,^{**} $P < 0.01$ 。

2.4 氧化应激反应相关指标变化

在细胞培养液上清中,与 Normal 组相比,缺氧 24 h 后细胞培养上清中 LDH 的泄漏量显著升高 ($P < 0.01$)。给予不同浓度的红大戟醇提物后 LDH 的含量有下降趋势但差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 5。与 Normal 组相比,缺氧 24 h 后,MDA 含量显著上升 ($P < 0.01$),SOD 活力显著下降 ($P < 0.01$)。与 Hypoxia 组相比,Hypoxia + KRL 组中 MDA 含量明显降低 ($P < 0.05$),SOD 活力明显升高 ($P < 0.01$);Hypoxia + KRH 组中 MDA 含量有下降趋势但差异无统计学意义 ($P > 0.05$),SOD 活力明显升高 ($P < 0.01$),见表 5。说明红大戟醇提物的干预可缓解缺氧导致的氧化应激损伤。

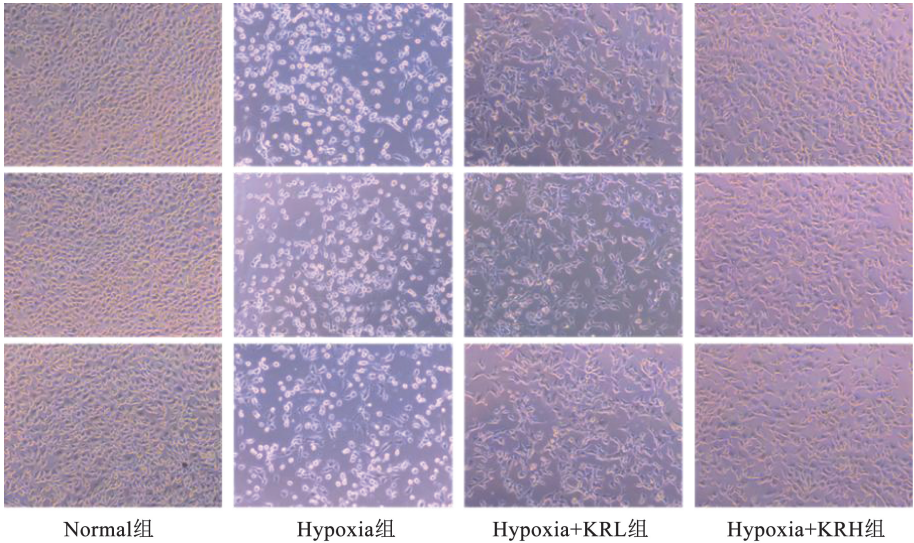


图 1 缺氧条件下细胞形态变化(×100)

表 5 红大戟醇提物对 TC - 1 细胞氧化应激指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)			
组别	LDH/(U/gprot)	MDA/(nmol/mgprot)	SOD/(U/mgprot)
Normal 组	484.6 ± 73.83	0.85 ± 0.12	6.66 ± 0.06
Hypoxia 组	748.66 ± 81.70 ^{###}	2.15 ± 0.33 ^{###}	2.45 ± 0.51 ^{###}
Hypoxia + KRL 组	609.92 ± 7.77	1.54 ± 0.07 [*]	3.64 ± 0.34 ^{**}
Hypoxia + KRH 组	653.62 ± 19.63	1.72 ± 0.09	3.76 ± 0.07 ^{**}

注: 与 Normal 组比较, ^{###} $P < 0.01$; 与 Hypoxia 组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

2.5 炎症反应相关指标变化

与 Normal 组相比, Hypoxia 组细胞炎症因子 IL - 6、TNF - α 水平显著升高($P < 0.01$), 表明缺氧加剧细胞炎症反应。在 Hypoxia + KRL 组与 Hypoxia + KRH 组中炎症因子 IL - 6、TNF - α 水平显著下降($P < 0.01$)。表明红大戟醇提物可能通过抑制 TC - 1 细胞炎症反应缓解缺氧带来的损伤, 见表 6。

表 6 各组细胞中炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s, n = 3, \text{pg/mL}$)		
组别	IL - 6	TNF - α
Normal 组	75.69 ± 0.44	75.67 ± 0.65
Hypoxia 组	83.73 ± 0.60 ^{##}	83.94 ± 0.11 ^{##}
Hypoxia + KRL 组	76.00 ± 0.29 ^{**}	77.12 ± 0.62 ^{**}
Hypoxia + KRH 组	76.24 ± 0.27 ^{**}	76.34 ± 0.86 ^{**}

注: 与 Normal 组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与 Hypoxia 组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。

2.6 线粒体功能变化

与 Normal 组比较, Hypoxia 组细胞中 ATP 含量显著下降($P < 0.01$), 表明缺氧导致细胞能量代谢出现障碍, 使细胞功能受损加重。与 Hypoxia 组相比, 在 Hypoxia + KRL 组中 ATP 含量显著增加($P < 0.01$), Hypoxia + KRH 组 ATP 含量得到明显改善($P < 0.01$),

提示红大戟醇提物可能通过改善 TC - 1 细胞线粒体能量代谢方面缓解缺氧损伤。见表 7。

表 7 红大戟醇提物处理后细胞中 ATP 含量、ROS 水平变化($\bar{x} \pm s, n = 3$)		
组别	ATP/($\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}$)	ROS
Normal 组	9.63 ± 0.29	0.25 ± 0.02
Hypoxia 组	4.81 ± 0.10 ^{##}	1.67 ± 0.28 ^{##}
Hypoxia + KRL 组	6.02 ± 0.47 ^{**}	0.4 ± 0.06 ^{**}
Hypoxia + KRH 组	5.87 ± 0.08 ^{**}	0.49 ± 0.08 ^{**}

注: 与 Normal 组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与 Hypoxia 组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。

2.7 ROS 水平变化

与 Normal 组相比, 缺氧 24 h 后的 ROS 平均荧光强度显著升高($P < 0.01$), 说明缺氧条件可刺激细胞中 ROS 的产生。与 Hypoxia 组相比, Hypoxia + KRL 组与 Hypoxia + KRH 组中的 ROS 平均荧光强度显著降低($P < 0.01$), 说明红大戟醇提物可以抑制由缺氧导致的 ROS 产生, 见图 2, 表 7。

2.8 各组 TC - 1 细胞中 HIF - 1 α 、eNOS、iNOS 的 mRNA 表达水平变化

缺氧状态下, Hypoxia 组中 HIF - 1 α 与 iNOS 的 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.01$), eNOS 的 mRNA 表达水平有下降趋势但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 Hypoxia 组比较, Hypoxia + KRL 组与 Hypoxia + KRH 组 HIF - 1 α 、iNOS 的 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.05$), eNOS 的 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.05$)。结果表明, 红大戟醇提物可能通过抑制 iNOS、HIF - 1 α , 促进 eNOS 的 mRNA 表达来发挥缺氧保护作用。见表 8。

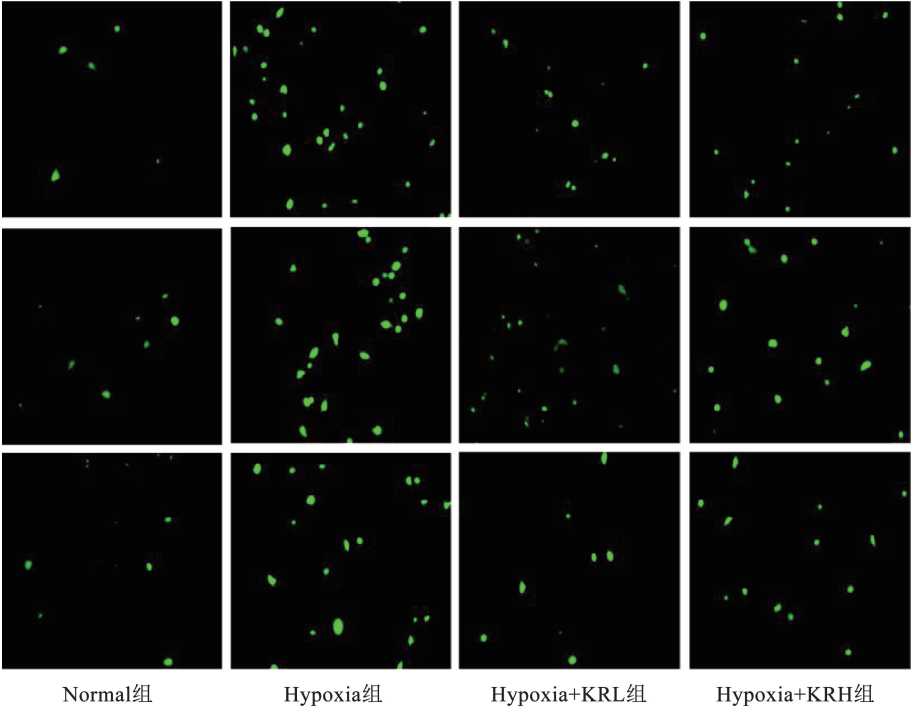


图 2 红大戟醇提物处理后细胞中 ROS 表达水平(×200)

表 8 红大戟醇提物处理后细胞中 HIF - 1α、iNOS、eNOS mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	HIF - 1α	iNOS	eNOS
Normal 组	0.32 ± 0.02	0.42 ± 0.04	1.01 ± 0.15
Hypoxia 组	0.75 ± 0.02 ^{###}	0.70 ± 0.03 ^{###}	0.54 ± 0.04
Hypoxia + KRL 组	0.52 ± 0.05 ^{**}	0.53 ± 0.05 ^{**}	2.19 ± 0.39 ^{**}
Hypoxia + KRH 组	0.61 ± 0.08 [*]	0.51 ± 0.03 ^{**}	1.25 ± 0.19 [*]

注: 与 Normal 组比较, ^{###} $P < 0.01$; 与 Hypoxia 组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

2.9 各组 TC - 1 细胞中 HIF - 1α、eNOS、iNOS 的蛋白表达水平变化

与 Normal 组相比, Hypoxia 组中 HIF - 1α 与 iNOS 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), eNOS 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与 Hypoxia 组比较, Hypoxia + KRL 组中 HIF - 1α 与 iNOS 的表达水平显著降低 ($P < 0.01, P < 0.05$), eNOS 的表达水平无明显上升趋势。Hypoxia + KRH 组中 HIF - 1α 与 iNOS 的表达水平无明显降低趋势, eNOS 的表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。见图 3, 表 9。

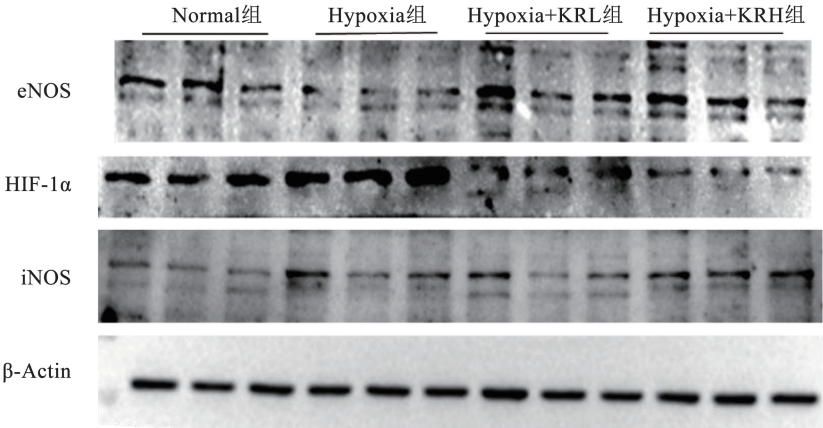


图 3 各组细胞中 HIF - 1α、iNOS、eNOS 蛋白表达印迹图

表9 红大戟醇提物处理后细胞中 HIF-1 α 、iNOS、eNOS 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HIF-1 α	iNOS	eNOS
Normal 组	0.62 $\pm$ 0.20	0.40 $\pm$ 0.04	0.92 $\pm$ 0.07
Hypoxia 组	1.47 $\pm$ 0.20 ^{##}	0.67 $\pm$ 0.10 ^{##}	0.57 $\pm$ 0.07 ^{##}
Hypoxia + KRL 组	0.68 $\pm$ 0.10 ^{**}	0.45 $\pm$ 0.08 [*]	0.65 $\pm$ 0.10
Hypoxia + KRH 组	1.13 $\pm$ 0.10	0.62 $\pm$ 0.03	1.02 $\pm$ 0.12 ^{**}

注: 与 Normal 组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与 Hypoxia 组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

3 讨论

本研究首先通过 LC-MS 分析了红大戟醇提物中的活性成分,其中包含的多种成分均具有抗炎、抗氧化等多种生物活性。阿江榄仁酸被证实具有抗凋亡、抗氧化和抗炎等生物活性^[25-26]。牡荆素被证实具有减轻心肌细胞缺氧复氧损伤,改善哮喘小鼠肺功能、免疫失衡及炎症反应,抑制急性肺损伤等^[27-29]。山柰酚^[30-31]、毛蕊异黄酮^[32]、黄芩素^[33]、槲皮素^[34]等成分抑制缺氧/复氧诱导细胞损伤发挥抗缺氧作用。本研究首次利用细胞缺氧模型评价红大戟醇提物对缺氧细胞的保护作用,为红大戟在抗缺氧领域的进一步研究和开发提供了重要的实验依据和研究思路。实验结果表明红大戟醇提物能显著提高缺氧细胞的存活率。在缺氧条件下,细胞氧化应激水平增加,能量代谢紊乱,ROS 生成增加。给予红大戟醇提物后能够降低细胞内 LDH 的释放,减轻炎症反应,改善细胞能量代谢,增强细胞对缺氧的耐受性。在细胞形态学方面,Hypoxia 组细胞呈现出明显的形态改变,如肿大变圆、皱缩,细胞间连接减少,贴壁能力显著下降。而经红大戟醇提物干预后,细胞形态得到明显改善,细胞轮廓相对清晰,细胞数量增多,细胞间连接增多。与许多研究结果相似^[34-36],发现红大戟醇提物能够调节细胞内的氧化应激水平,维持细胞内环境的稳定,从而减轻缺氧对细胞的损伤。槲皮素显著降低低氧培养的 H9C2 细胞中 LDH 和 MDA 的含量,显著提高 SOD 的含量^[34]。洛伐他汀处理后显著降低 MDA、LDH、ROS 的水平缓解缺氧/复氧诱导的细胞氧化应激^[35]。给予红景天苷后缺氧细胞活力上升,ROS、MDA、LDH 水平降低,SOD 水平、ATP 含量、细胞膜电位水平增加^[36]。ATP 是细胞能量代谢的直观反映,当细胞线粒体功能障碍,能量供应不足,细胞 ATP 含量降低,加速疾病的进展^[37]。研究^[38]发现人参总次苷提高缺氧下 H9C2 细胞中 ATP 含量改善心肌细胞能量代谢,抑制凋亡。人参皂苷 Rg1 可以通过 SIRT3 降低 LDH 表达量,增加 ATP 合

成,减轻 HL-1 细胞缺氧损伤^[39]。

通过 PCR 实验及 Western blot 实验发现红大戟醇提物处理后 HIF-1 α 及其下游相关因子 iNOS 的表达水平减少,eNOS 的表达增多。说明红大戟对缺氧细胞的保护作用与抑制 HIF-1 α 的表达有关。HIF-1 α 是细胞适应缺氧的关键介质,能够促进活性氧的产生,从而导致氧化应激。iNOS 在缺血、缺氧等情况下大量产生,HIF-1 α 可以诱导 iNOS 的产生,iNOS 表达减少,则抑制下游的炎症反应^[40]。缺氧时内皮细胞中的 eNOS 活性下降,导致氧化应激损伤,iNOS 表达升高,进一步加重细胞损伤^[41-42]。槲皮素能明显降低缺氧复氧后心肌细胞 LDH 的释放,增加 eNOS 的表达,减少 iNOS 的表达,显著降低细胞内 NO 的含量^[43]。瓜蒌皮提取物通过上调 eNOS,下调 iNOS 的表达改善缺氧/复氧损伤诱导的心肌细胞损伤^[44]。大量研究证明,HIF-1 α 可以调控 eNOS 的表达。卜婧等^[45]研究发现红景天苷类似物在缺氧时通过 HIF-1 α 调控 VEGF、eNOS 的表达对内皮细胞起到保护作用。蕨麻多酚在血管内皮细胞缺氧时通过下调 HIF-1 α ,上调 eNOS,下调 iNOS,发挥抗缺氧保护作用^[46]。通脉养心丸通过激活 HIF-1 α /eNOS 信号通路,改善心肌缺血再灌注后无复流^[47],附子-干姜药对可通过激活 HIF-1 α /VEGF/eNOS 信号通路促进心肌缺血再灌注大鼠血管舒张促进心肌组织氧气发挥治疗作用^[48]。

综上所述,红大戟醇提物通过甲基异茜草素、大黄酸、毛蕊异黄酮、槲皮素等成分,提高缺氧条件下 TC-1 的细胞活力,减轻细胞氧化应激反应及炎症反应,改善细胞能量代谢,其作用机制可能与调节 HIF-1 α 、eNOS 等蛋白的表达,改善细胞氧化应激损伤有关。

参考文献:

[1] LI Q, XU Z C, FANG F J, et al. Identification of key pathways, genes and immune cell infiltration in hypoxia of high-altitude acclimatization via meta-analysis and integrated bioinformatics analysis[J]. Front Genet, 2023, 14: 1055372.

[2] GAUR P, PRASAD S, KUMAR B, et al. High-altitude hypoxia induced reactive oxygen species generation, signaling, and mitigation approaches[J]. Int J Biometeorol, 2021, 65(4): 601-615.

[3] PROHASKA A, RACIMO F, SCHORK A J, et al. Human disease variation in the light of population genomics[J]. Cell, 2019, 177(1): 115-131.

[4] 焦磊, 刘宇, 徐冲, 等. 太空养心丸对急进高原缺氧的防护作用[J]. 载人航天, 2023, 29(3): 336-344.

[5] 扎西曲宗, 格桑罗布, 次白, 等. 高原病药物预防及治疗的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(11): 1689-1692.

- [6] 李浩然. 论缺氧之中医证治及其机理[J]. 吉林中医药, 1984, 4(4): 16–17.
- [7] 刘笑琪, 牛晓骥, 胡金萍. 补益类中药的抗缺氧作用[J]. 中外医学研究, 2021, 19(35): 185–188.
- [8] 石娅娴. 红大戟的化学成分及其微生物发酵改性研究[D]. 昆明: 云南大学, 2020.
- [9] 王敏, 朱璐元. 楚雄彝州本草[M]. 昆明: 云南人民出版社, 1998: 80–81.
- [10] 李林森. 彝医治疗学[M]. 北京: 中央民族大学出版社, 2011: 209–210.
- [11] 云南省楚雄彝族自治州卫生中药检所. 彝药志[M]. 成都: 四川人民出版社, 1983: 248–249.
- [12] 杨本雷, 王敏, 杨芳, 等. 彝医张之道主要医疗经验与特色疗法研究[J]. 云南中医中药杂志, 2010, 31(9): 11–13.
- [13] 洪一郎, 马丽, 王垣芳, 等. 红大戟中的蒽醌和三萜类化学成分[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21): 4230–4233.
- [14] 权洪峰, 闫欣, 彭晓东. 阿江榄仁酸对 LPS 诱导的小鼠 RAW264.7 巨噬细胞的抗炎作用初步研究[J]. 医学信息, 2017, 30(23): 30–32.
- [15] DING W J, CHEN G H, DENG S H, et al. Calycosin protects against oxidative stress – induced cardiomyocyte apoptosis by activating aldehyde dehydrogenase 2[J]. *Phytother Res*, 2023, 37(1): 35–49.
- [16] LIU J, LI Y M, TANG Y, et al. Rhein protects the myocardial cells against hypoxia/reoxygenation – induced injury by suppressing GSK3 β activity[J]. *Phytomedicine*, 2018, 51: 1–6.
- [17] CHITSAZ R, ZAREZADEH A, ASGARPAHAH J, et al. Rubiadin exerts an acute and chronic anti – inflammatory effect in rodents[J]. *Braz J Biol*, 2021, 83: e243775.
- [18] CAI S Z, CHEN Y Y, CHEN J W, et al. Rubiadin – 1 – methyl ether inhibits BECN1 transcription and Beclin1 – dependent autophagy during osteoclastogenesis by inhibiting NF – κ B p65 activation[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2023, 248(17): 1518–1526.
- [19] 李绍花, 陈福长, 袁圆, 等. 红大戟醇提物灌胃对小鼠支气管哮喘的治疗作用及其机制[J]. 山东医药, 2024, 64(23): 16–20.
- [20] 青岛友诚高新技术有限公司. 一种治疗肺气肿的中药组合物及其制备方法, CN106266730A[P/OL]. 2017–01–04.
- [21] 赵峰, 王素娟, 吴秀丽, 等. 红大戟中的蒽醌类化学成分[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(21): 2980–2986.
- [22] 蒲昕颖. 红大戟优良种质资源筛选评价研究[D]. 昆明: 云南中医药大学, 2023.
- [23] 胡瑜. 红大戟醋法炮制减毒存效机制研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2023.
- [24] 廖思红, 陈建军, 王瑛. 偏斜淫羊藿化学成分研究[J]. 植物科学学报, 2013, 31(4): 385–390.
- [25] 蒋晨, 万新娟, 王绍飞, 等. 阿江榄仁酸由 AMPK/mTOR/HO – 1 信号通路调控自噬对糖尿病视网膜病变影响[J]. 河北医药, 2024, 46(2): 171–175.
- [26] SHERIF I O. Hepatoprotective effect of arjunolic acid against cisplatin – induced hepatotoxicity: Targeting oxidative stress, inflammation, and apoptosis[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021, 35(4): e22714.
- [27] BABAEI F, MOAFIZAD A, DARVISHVAND Z, et al. Review of the effects of vitexin in oxidative stress – related diseases[J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 8(6): 2569–2580.
- [28] 甘琴, 王鑫, 杨换花, 等. 牡荆素调控 Epac1/Rap1 通路介导 H9c2 心肌细胞缺氧复氧损伤的保护作用机制[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2024, 29(10): 1091–1099.
- [29] 费园园, 葛明坤, 卞庆平. 基于 Notch 信号通路探讨牡荆素对哮喘模型小鼠的改善作用[J]. 中国药房, 2024, 35(15): 1849–1854.
- [30] 冉旭. 山奈酚调控 Nr2f/GPX4 通路抑制缺氧/复氧诱导 H9C2 心肌细胞铁死亡的作用机制研究[D]. 佳木斯: 佳木斯大学, 2024.
- [31] 武金盼, 陈继军, 袁青, 等. 山奈酚对缺氧/复氧损伤诱导心肌细胞凋亡的影响及机制研究[J]. 陕西医学杂志, 2024, 53(1): 3–7, 18.
- [32] 张弅宁, 靳晓飞, 周晓红, 等. 毛蕊异黄酮对缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞线粒体凋亡通路的影响[J]. 解剖学报, 2020, 51(3): 332–337.
- [33] 高新富, 边瑞民, 王滨, 等. 黄芩素对缺氧/复氧诱导的心肌损伤保护作用以及 RIPK1/RIPK3 信号通路的影响[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(8): 654–661.
- [34] 何依津, 张鹏志, 田海月, 等. 槲皮素通过 MAPK/ERK1/2 信号途径对 H9C2 细胞抗缺氧损伤的作用[J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(20): 2220–2225.
- [35] 韩小虎, 腾丽峰, 吴清柳, 等. 洛伐他汀通过调控 Akt 通路对缺氧/复氧心肌细胞损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(19): 2826–2830.
- [36] 宋诚. 红景天苷对缺氧小鼠 GC – 1 细胞氧化应激损伤的保护作用机制研究[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2023.
- [37] LEY – NGARDIGAL S, BERTOLIN G. Approaches to monitor ATP levels in living cells: where do we stand? [J]. *FEBS J*, 2022, 289(24): 7940–7969.
- [38] 袁中杰, 肖悦, 刘真, 等. 基于线粒体生物发生探讨人参总次苷对缺氧下 H9c2 细胞凋亡和能量代谢的影响[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(5): 1255–1266.
- [39] 陈原原, 辛高杰, 刘子馨, 等. 人参皂苷 Rg1 调控 SIRT3 介导 ATP5A1 去乙酰化减轻 HL – 1 心肌细胞缺氧/复氧损伤的研究[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(19): 5273–5280.
- [40] 李好. Tubastatin A 对缺氧/复氧巨噬细胞 NLRP3 炎症小体活化的作用研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2023.
- [41] 廖国玲, 马磊, 曾泰. 枸杞黄酮对 H2O2 损伤的血管内皮细胞 NO 及 NOS 作用的研究[J]. 重庆医学, 2015, 44(24): 3323–3324, 3327.
- [42] XIANG M, LU Y D, XIN L Y, et al. Role of oxidative stress in reperfusion following myocardial ischemia and its treatments[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6614009.
- [43] 杨溢, 曾绚, 雷光远. 槲皮素抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的作用及机制研究[J]. 基层医学论坛, 2019, 23(17): 2377–2379.
- [44] 楚冬海, 张振秋. 瓜蒌皮提取物基于 PI3K/Akt/NO 信号通路保护缺氧/复氧损伤心肌细胞的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(22): 42–48.
- [45] 卜婧, 张永亮, 李灵芝, 等. 侧链失碳红景天苷类似物 N04 对缺氧 EA. hy926 内皮细胞缺氧诱导因子及其相关因子的影响[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(8): 798–803.
- [46] 陈晔, 刘丹, 李灵芝, 等. 蕨麻多酚对糖氧剥夺损伤血管内皮细胞一氧化氮、一氧化氮合酶、内皮素及缺氧诱导因子的影响[J]. 中

- 国药师, 2019, 22(3): 389–394.
- [47] 陈婷, 刘海瑞, 张燕燕, 等. 通脉养心丸通过上调 GPER 激活 HIF-1 α /eNOS 信号通路减轻心肌缺血再灌注后无复流的作用机制研究[J]. 药学报, 2023, 58(11): 3311–3320.
- [48] 谢锋, 张普, 段广靖, 等. 基于 HIF/VEGF/eNOS 信号通路探究附子-干姜药对抗心肌缺血再灌注损伤作用机制[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(9): 2098–2102.

Protective Effect and Mechanism of Knoxia Roxburghii Ethanol Extract on Hypoxia – Induced Lung Epithelial Cell Injury in Mice

YANG Xiuling, LI Hao, LONG Yun, YANG Zhenqin, SHEN Li, QIU Bin, LI Xuefang, ZHANG Fan
Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract Objective: To investigate the protective effect and mechanism of KR ethanol extract on hypoxia – induced TC – 1 injury in mouse lung epithelial cells. Methods: LC – MS was used to analyze the compounds in the alcohol extract of KR. The cell hypoxia model was established by three – gas incubator (37 °C, 5% CO₂, 94% N₂, 1% O₂). TC – 1 cells were divided into normal group (Normal), hypoxia group (Hypoxia), hypoxia + KR alcohol extract low dose group (Hypoxia + KRL, 90 μ g/mL), hypoxia + KR alcohol extract high dose group (Hypoxia + KRH, 180 μ g/mL). Cell viability was measured by CCK – 8 assay. The morphological changes of cells were observed by inverted microscope and the number of cells was counted. The leakage of lactate dehydrogenase (LDH) in the supernatant of cell culture medium and the contents of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), tumor necrosis factor – α (TNF – α), interleukin – 6 (IL – 6) and ATP in cells were detected. The fluorescence intensity of reactive oxygen species (ROS) in cells was observed by fluorescence microscope. The mRNA expression levels of hypoxia – inducible factor – 1 α (HIF – 1 α), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were detected by RT – qPCR. The protein expression levels of HIF – 1 α , eNOS and iNOS in cells were detected by Western blot. Results: Twenty – two compounds were found in the KR ethanol extract. After 24 h of hypoxia treatment, the cells of TC – 1 cells became swollen and round, and the contents of ROS, LDH, MDA, TNF – α and IL – 6 were significantly increased, while the contents of SOD and ATP were significantly decreased. The mRNA and protein expression levels of HIF – 1 α and iNOS were significantly increased, while the expression level of eNOS was decreased. After treatment with KR ethanol extract, the number of cells increased significantly, the cell morphology tended to be Normal group, and the contents of ROS, LDH, MDA, TNF – α and IL – 6 decreased. The mRNA and protein expression levels of HIF – 1 α and iNOS were decreased. SOD, ATP and eNOS were significantly increased. Conclusion: KR ethanol extract can down – regulate the expression of HIF – 1 α when TC – 1 cells are stimulated by hypoxia, and improve cell energy metabolism disorder, oxidative stress response and inflammatory response to exert anti – hypoxia effect.

Key words Knoxia roxburghii; Hypoxia injury; Oxidative stress; HIF – 1 α /eNOS