



7-羟乙基白杨素对高原脑水肿的作用机制初探

石志群, 高迎春, 张冬梅, 陈克明, 景临林, 马慧萍

A preliminary study on the mechanism of 7-HEC on high altitude cerebral edema

SHI Zhiquan, GAO Yingchun, ZHANG Dongmei, CHEN Keming, JING Linlin, MA Huiping

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202205090>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

模拟高原缺氧环境对大鼠心、脑组织损伤的研究

Study on myocardium and brain damage in rats by simulating high altitude

药学实践与服务. 2018, 36(3): 250-254 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.03.013

$\alpha 7$ n型乙酰胆碱能受体在小胶质细胞中下调炎症水平的作用及其机制研究

The anti-inflammatory role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in microglial cells and its mechanisms

药学实践与服务. 2021, 39(4): 340-344, 358 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202103028

毛蕊花苷对高原缺氧小鼠记忆损伤的改善及机制研究

Ameliorate effect and mechanism of verbascoside on memory impairment in hypoxic mice

药学实践与服务. 2019, 37(1): 23-26 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.006

巨噬源性泡沫细胞中p62蛋白上调作用和机制的研究

A study on the role and mechanism of upregulated p62 protein in macrophage-derived foam cells

药学实践与服务. 2019, 37(5): 400-405, 426 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.004

同型半胱氨酸激活JNK信号通路诱导血管平滑肌细胞氧化应激的损伤研究

Oxidative stress induced by homocysteine via activating JNK signaling pathway in vascular smooth muscle cells

药学实践与服务. 2018, 36(6): 499-502, 511 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.06.005

五味子乙素通过ROS介导内质网应激诱导人乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡的研究

Schisandrin B induces apoptosis of human breast cancer MDA-MB-231 cells through ROS mediated endoplasmic reticulum stress

药学实践与服务. 2021, 39(6): 499-503, 533 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202106123



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 高原缺氧损伤机制与防护专题 ·

7-羟乙基白杨素对高原脑水肿的作用机制初探

石志群^{1a,2}, 高迎春^{1a}, 张冬梅^{1a}, 陈克明^{1b}, 景临林^{1a}, 马慧萍^{1a,2} (1. 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院: a. 全军高原医学实验室, b. 基础医学实验室, 甘肃 兰州 730050; 2. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000)

【摘要】 目的 研究7-羟乙基白杨素(7-HEC)对高原脑水肿(HACE)的可能作用机制。方法 建立大鼠高原脑水肿模型,测定大鼠脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)的活性及丙二醛(MDA)的含量,采用蛋白质印迹法检测细胞凋亡、周期及自噬相关蛋白的表达水平,探究7-HEC对高原脑水肿的保护作用及其机制。结果 与对照组相比,缺氧模型组大鼠脑组织中MDA含量显著上调,SOD活力显著下调,周期蛋白 CyclinD1、CyclinE1、CDK6、CDK2,凋亡蛋白 Bcl-2、PARP,自噬蛋白 LC3-B 相对表达下调,凋亡蛋白 Bax,自噬蛋白 P62 的相对表达上调,差异均具有统计学意义($P<0.05$);与缺氧模型组相比,7-HEC 给药组 MDA 含量下调,SOD 活力显著上调,周期蛋白 CyclinD1、CyclinE1、CDK6、CDK2,凋亡蛋白 Bcl-2、PARP,自噬蛋白 LC3-B 的相对表达上调,凋亡蛋白 Bax,自噬蛋白 P62 的相对表达下调,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。结论 7-HEC 对高原脑水肿具有一定的保护作用,其机制可能与调控细胞周期、自噬、凋亡以及氧化应激等通路有关。

【关键词】 高原脑水肿;氧化应激;凋亡;周期;自噬

【中图分类号】 R285 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2097-2024(2022)05-0399-04

【DOI】 10.12206/j.issn.2097-2024.202205090

A preliminary study on the mechanism of 7-HEC on high altitude cerebral edema

SHI Zhiqun^{1a,2}, GAO Yingchun^{1a}, ZHANG Dongmei^{1a}, CHEN Keming^{1b}, JING Linlin^{1a}, MA Huiping^{1a,2} (1. No. 940 Hospital of Joint Logistics Support Force of the PLA: a. Key Laboratory of the Plateau Medicine, b. Fundamental Medical Science Research Laboratories, Lanzhou 730050, China; 2. College of pharmacy, Gansu university of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

【Abstract】 **Objective** To study the possible mechanism of 7-hydroxyethyl chrysin (7-HEC) on high altitude cerebral edema (HACE). **Methods** A rat model of high altitude cerebral edema was established. The activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) in rat brain tissues were measured. The expression levels of apoptosis, cell cycle and autophagy related proteins were detected by Western blotting to explore the protective effect of 7-HEC on high altitude cerebral edema and its mechanism. **Results** Compared with the control group, the content of MDA in the brain tissue of the hypoxia model group was significantly up-regulated; the activity of SOD was significantly down-regulated, the relative expression of CyclinD1, CyclinE1, CDK6 and CDK2, apoptotic proteins Bcl-2, PARP, and autophagy protein LC3-B were down-regulated; and the relative expression of apoptotic protein Bax and autophagy protein P62 were up-regulated; the difference was statistically significant ($P<0.05$); Compared with the hypoxia model group, the content of MDA was down-regulated and the activity of SOD was significantly up-regulated in the 7-HEC administration group. The relative expression of CyclinD1, CyclinE1, CDK6, CDK2, apoptotic proteins Bcl-2, PARP, autophagy protein LC3-B was up-regulated and the relative expression of apoptotic proteins Bax and the relative expression of autophagy protein P62 was down-regulated in the 7-HEC administration group. The difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** 7-HEC has a certain protective effect on high altitude cerebral edema, and its mechanism may be related to the regulation of cell cycle, autophagy, apoptosis and oxidative stress pathways.

【Key words】 high altitude cerebral edema; oxidative stress; apoptosis; cycle; autophagy

随着我国经济的发展以及居民生活水平的提高

【基金项目】 国家自然科学基金(81571847);军队后勤科研计划面上项目(CWH17J010);军队卫勤保障保障能力创新与生成专项计划(21WQ045)。

【作者简介】 石志群, 硕士研究生, 研究方向: 抗高原缺氧新药研究, Email: zqshi1997@163.com,

【通信作者】 马慧萍, 主任药师, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 高原缺氧损伤机制及新药研发; E-mail: mahuiping2022@aliyun.com

高,越来越多的人来到高原生活、工作和旅游,但由于高原地区氧分压较低,高原病的发病率呈现逐年上升的趋势^[1]。高原脑水肿(HACE)是高原病发展过程中最为严重的阶段,其临床表现为头痛、协调丧失、虚弱、意识水平降低^[2],并对机体造成不可逆的损伤。7-羟乙基白杨素(7-hydroxyethyl chrysin, 7-HEC)是课题组前期筛选发现并合成的具有自主知识产权的抗高原缺氧化合物^[3],研究发现^[4-5],其

对脑缺血再灌注大鼠和模拟高原低压性缺氧致脑组织损伤大鼠均具有明显的保护作用,并能够减轻低压低氧诱导的认知功能损伤^[6],在抗高原缺氧方面表现出优异的活性与前景。因此,本文主要从7-HEC对高原脑水肿的可能作用机制出发,探究其与自噬、周期、凋亡等通路之间的关系,为防治高原脑水肿的可能作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂与仪器

27只SPF级雄性Wistar大鼠(体重180~200g),购自联勤保障部队第九四〇医院动物实验科,合格证号:SCXX(军)2012-0029,动物伦理委员会编号:2021KYLL173。

7-HEC由实验室景林临副教授自行合成;MDA、SOD试剂盒(南京建成生物工程研究所);CDK2、CDK6、CyclinD1、CyclinE2、PARP、Bax、Bcl-2、P62、LC3B抗体(英国Abcom公司);BCA蛋白试剂盒(Solarbio公司);脱脂奶粉(美国BD公司);Western Bright TM ECL(美国Advansta)。

IEC-Micromax高速离心机(美国ThermoElectron公司);Tissuelyser快速研磨仪(上海净信科技公司);BP210S电子天平(赛多利斯有限公司);HP-8453紫外分光光度计(美国惠普公司);SpectraMax i3全自动荧光酶标仪(美国Molecular Devices公司);FLYDWC20-II A大型低压低氧动物实验舱(中航贵州风雷航空军械有限责任公司)。

1.2 动物分组及高原脑水肿模型的建立^[7]

将27只SPF级雄性Wistar大鼠适应性饲养3d后,随机分为3组,正常对照组、缺氧模型组、7-HEC给药组。给药组连续灌胃7-HEC(350mg/kg)7d,对照组和模型组给予等量灭菌注射用水。第四天,模型组和给药组放入大型低压低氧动物实验舱中,以10m/s速度减压上升至相当于海拔6000m处,缺氧处理3d后处死,取脑组织。缺氧处理期间,氧舱温度:8:00~20:00,12℃,20:00~次日8:00,

2℃;动物自由摄食及饮水;给药组继续灌胃给药。

1.3 脑组织氧化应激指标的检测

每组分别取6只大鼠脑组织标本,准确称重后,按质量(g):体积(ml)=1:9加入生理盐水制成10%组织匀浆,采用WST-1法检测SOD活性,采用硫代巴比妥酸法检测MDA含量,以上操作均按试剂盒说明书进行。

1.4 蛋白质印迹法测定凋亡、周期、自噬相关蛋白的表达

每组选取3只大鼠脑组织,称重后加入9倍量高效裂解液,使用组织研磨仪进行组织匀浆,于冰上裂解30min,低温离心后吸取上清匀浆液10μl,BCA法测蛋白含量,剩余上清与4×上样缓冲液按体积3:1比例混匀,封口膜封口,95℃煮沸10min进行蛋白变性,取等量蛋白样品上样,采用SDS-PAGE进行分离,电泳完成后将蛋白转至PVDF膜上,含5%脱脂牛奶室温封闭2h,一抗4℃孵育过夜。用TBST缓冲液漂洗4次,每次10min。加入二抗,室温孵育2h,TBST缓冲液洗涤PVDF膜4次,每次10min。配制ECL发光液,按照A液和B液1:1进行配制,涂抹发光液,放入ChemiDoc MP Imaging System全能型成像系统进行曝光。用Image J软件对蛋白条带进行灰度值分析。

1.5 统计学分析

实验结果以($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 21.0软件进行数据分析,选用单因素方差分析法进行组间变量分析,LSD-t法比较组间差异。以 $P < 0.05$ 表示有显著性差异,以 $P < 0.01$ 表示有极显著性差异。

2 结果

2.1 氧化应激相关指标的测定

大鼠脑组织中氧化应激相关指标MDA与SOD的测定结果如图1所示,与对照组相比,缺氧组大鼠脑组织中MDA含量显著性升高,SOD活力显著性下调($P < 0.05$),当给予7-HEC时,缺氧组大鼠脑组织中MDA含量下调,SOD活力上调,且差

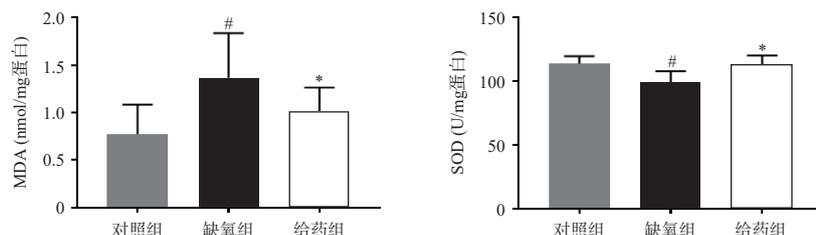


图1 各组脑组织中MDA含量及SOD活力比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

[#] $P < 0.05$,与对照组比较;^{*} $P < 0.05$,与模型组比较

异具有统计学意义($P<0.05$)。结果提示,7-HEC可能参与机体氧化应激的调节,起到防护高原脑水肿的效果。

2.2 凋亡相关蛋白的表达

如图2所示,大鼠脑组织中 PARP 与 Bcl-2 的蛋白表达在缺氧组下调,给药后显著上调($P<0.01$),大鼠脑组织中 Bax 的蛋白表达在缺氧组上调,给药组显著下调($P<0.01$),为进一步探讨 Bcl-2 与 Bax 对凋亡的易感性,对 Bax/Bcl-2 的比例进行比较,结果显示,与对照组相比,缺氧组显著下降,与缺氧组相比,给药组极显著上调($P<0.01$)。结果提示,7-HEC 可能参与细胞凋亡从而防治高原脑水肿。

2.3 周期相关蛋白的表达

如图3所示,与对照组相比,大鼠脑组织中周期相关蛋白 CyclinE2、CyclinD1、CDK6、CDK2 的表达在缺氧组均下调($P<0.05$);与缺氧组相比,在给药组中, CyclinE2、CyclinD1、CDK6、CDK2 蛋白的表达显著上调($P<0.05$)。结果提示,7-HEC 可能参与细胞周期调控从而防治高原脑水肿。

2.4 自噬相关蛋白的表达

如图4所示,大鼠脑组织中 P62 的蛋白表达在缺氧组极显著上调,给药后显著下调($P<0.01$);与

对照组相比,大鼠脑组织中 LC3-B 的蛋白表达在缺氧组显著下降,与缺氧组相比,给药组极显著上调($P<0.01$)。结果提示,7-HEC 可能参与细胞自噬过程从而防治高原脑水肿。

3 讨论

氧化应激是一种有害事件,可导致活性氧大量产生或抗氧化防御功能不足,损害神经血管单元的完整性,造成神经元不可逆死亡,进而血脑屏障破坏形成脑水肿^[8]。MDA 是脂质过氧化的产物,其含量可以间接反映组织氧化应激的水平, SODs 是一类具有催化超氧化物生成过氧化氢的抗氧化酶^[9],可以直接或间接地反映氧化应激的水平。本研究发现,经给药干预后,大鼠脑组织 MDA 含量显著降低, SOD 活力显著提高,表明 7-HEC 可改善脑水肿大鼠的氧化损伤,从而对脑水肿起到一定的预防作用。

研究表明,缺氧与细胞周期、凋亡、自噬密切相关,细胞周期蛋白表达异常会引发细胞凋亡^[10]。细胞周期失调的细胞有机会通过 DNA 损伤反应的各种机制来阻止 DNA 修复、细胞周期调节和 DDR 基因转录。目前研究认为,自噬是另一种 DDR 机制,它通过促进或防止细胞死亡来应对 DNA 损伤,

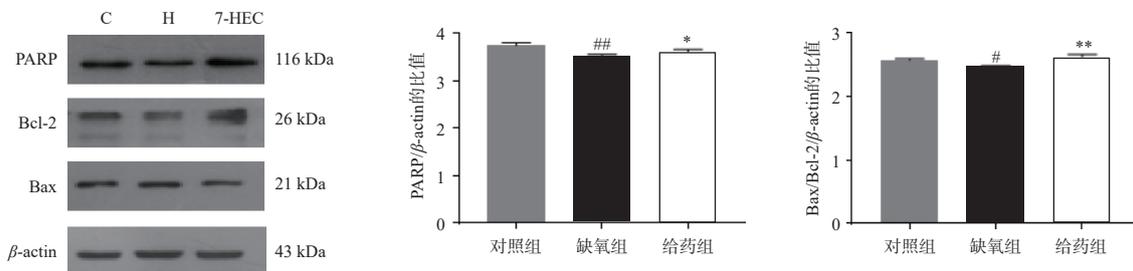


图2 大鼠脑组织中凋亡相关蛋白电泳图及蛋白表达量($\bar{x} \pm s, n=3$)

[#] $P<0.05$, [#] $P<0.01$, 与对照组比较; ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, 与模型组比较

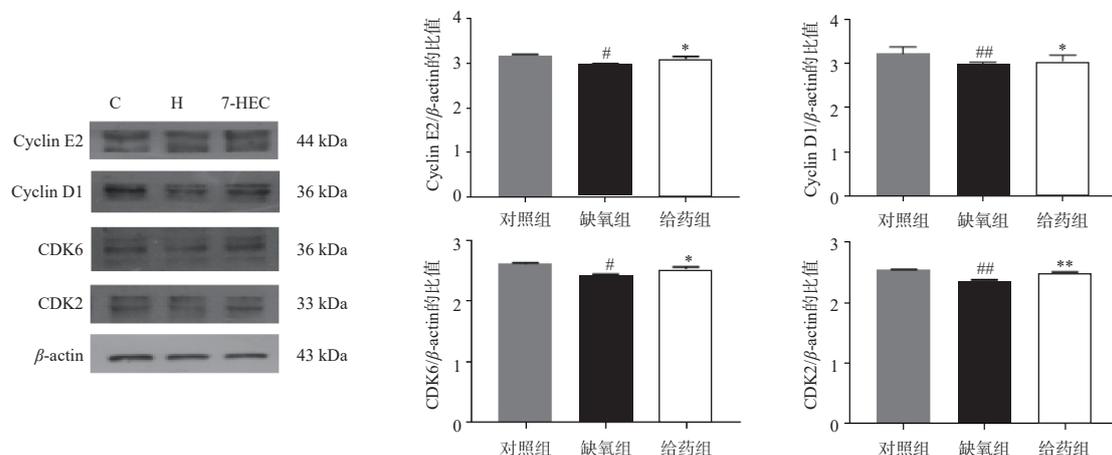


图3 大鼠脑组织中周期相关蛋白电泳图及蛋白表达量($\bar{x} \pm s, n=3$)

[#] $P<0.05$, [#] $P<0.01$, 与对照组比较; ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, 与模型组比较

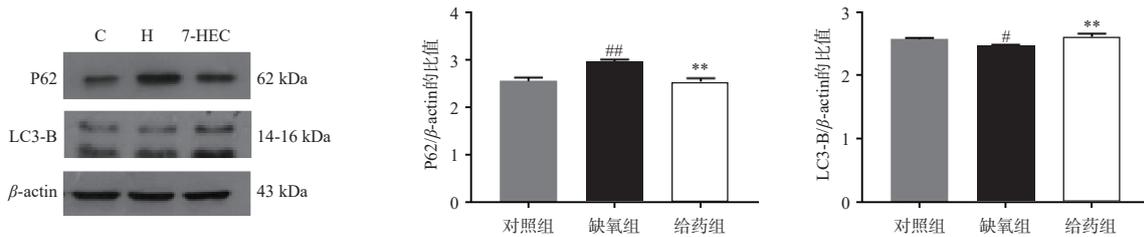


图4 大鼠脑组织中自噬相关蛋白电泳图及蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

[#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, 与对照组比较; ^{**} $P < 0.01$, 与模型组比较

从而发挥作用^[11]。细胞周期从 G1 期到 S 期的调节因子是 CDK2 蛋白, 自噬主要影响细胞周期的 G1 期和 S 期, 因此自噬与周期也存在密不可分的关系。

细胞凋亡是一种受基因调控的细胞程序性死亡方式, 是一种正常的生理变化。缺氧是细胞凋亡的诱导因子之一, 细胞凋亡加剧是低氧环境诱发机体机能损伤的重要途径^[12]。其受 Bax 和 Bcl-2 控制。Bcl-2 蛋白的过表达在动物模型中被证明可以减轻肝和肾的损伤, 而 Bax 的过度表达则可诱导细胞凋亡^[13]。本实验的结果表明, 缺氧组大鼠脑组织中 Bax/Bcl2 比值降低, 诱导细胞凋亡, 加重脑水肿, 7-HEC 可上调 Bax/Bcl2 比值, 进而抑制细胞凋亡, 起到抗高原脑水肿的作用。

细胞周期在细胞增殖和分裂中起着关键作用, 其由两类蛋白精确调控, CDKs、cyclin 作为关键的周期蛋白。这两类蛋白决定了细胞维持在停滞状态或继续进行细胞周期。细胞周期抑制已被证明可以提供神经保护, 减少星形胶质细胞瘢痕形成和微胶质激活, 并改善创伤性脑损伤后的运动和认知恢复^[14]。在本实验中, 缺氧环境可下调周期蛋白的表达, 而 7-HEC 可上调周期蛋白的表达, 对高原脑水肿起到一定的预防作用。

缺氧与自噬密切相关。缺氧条件下, 会诱导自噬的发生。自噬是一种高度调控的连续过程, 它是一种重要的程序性细胞死亡^[15]。LC3 蛋白与 P62 蛋白相互作用, 是自噬的标志物。P62 蛋白通常存在于自噬体中, 并在自溶酶体形成时被降解^[16]。LC3 蛋白是哺乳动物自噬蛋白和自噬小体标记物, LC3B 是自噬体标记的四种不同亚型中使用最广泛的一种。自噬受体包括 P62 等一系列连接泛素化底物和 LC3 的适配器, 自噬体一旦形成, 就会经历成熟阶段, 然后与溶酶体融合, 发生自噬。此外, P62 还可调节细胞凋亡, 主要通过选择性减少胞质中促凋亡蛋白来减轻细胞死亡, 保护机体免受伤害^[17]。在本实验中 7-HEC 可下调 P62、上调 LC3B 的表达, 从而促进自噬, 保护机体免遭高原脑水肿

损害。

凋亡、自噬、周期三种生物过程相互联系, 相互影响, 作用于机体, 保障机体的正常运行。凋亡、自噬、周期相关因子的变化又会影响氧化应激通路的发生发展。在本实验中, 7-HEC 降低大鼠脑组织中 MDA 含量, 上调 SOD 含量, 从而抑制 HACE 引发的氧化应激; 其还可上调周期和自噬蛋白的表达, 从而增强大鼠脑神经元细胞的增殖活性, 加速损伤细胞的自噬, 保护机体免受 HACE 的损害。综上, 7-HEC 可抑制细胞凋亡和周期, 增强自噬, 进而抑制机体氧化应激, 从而达到防护高原脑水肿的作用。

【参考文献】

- [1] 邱友竹, 王旭萍. 急进高原环境对血管内皮功能的影响及其与急性高原病的关系[J]. 高原医学杂志, 2016, 26(4): 11.
- [2] MACINNIS M J, KOEHLE M S. Evidence for and against genetic predispositions to acute and chronic altitude illnesses[J]. *High Alt Med Biol*, 2016, 17(4): 281-293.
- [3] 马慧萍, 景临林, 樊鹏程, 等. 7-羟乙基白杨素的合成方法及其在制备抗缺氧药物中的应用: CN104926769B[P]. 2018-12-04.
- [4] 吴金华. 白杨素及羟乙基白杨素对急性慢性脑缺血大鼠的保护作用[D]. 兰州: 兰州大学, 2015.
- [5] 景临林, 杨颖, 邵瑾, 等. 7-羟乙基白杨素对低压低氧致脑组织损伤的保护作用[J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37(9): 1025-1029.
- [6] 景临林, 杨颖, 邵瑾, 等. 7-羟乙基白杨素对低压低氧大鼠认知功能的保护作用及机制研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40(15): 1622-1626.
- [7] JING L L, WU N Z, HE L, et al. Establishment of an experimental rat model of high altitude cerebral edema by hypobaric hypoxia combined with temperature fluctuation[J]. *Brain Res Bull*, 2020, 165: 253-262.
- [8] CHENG Y J, CHEN B, XIE W Q, et al. Ghrelin attenuates secondary brain injury following intracerebral hemorrhage by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and promoting Nrf2/ARE signaling pathway in mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 79: 106180.