

文章编号 1006-8147(2022)01-0058-07

论著

山柰酚对大鼠高原肺水肿的预防作用及机制研究

曹丽睿¹, 查玉杰¹, 何庆²

(1. 西南交通大学医学院, 成都 610036; 2. 西南交通大学附属医院成都市第三人民医院, 成都 610030)

摘要 目的:探究山柰酚干预对大鼠急性高原肺水肿的保护作用和可能存在的机制。方法:将32只雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠随机分为对照组(N组)、模型组(M组)、山柰酚组(KA组)和乙酰唑胺组(ACZ组),每组8只,预给药7d后利用高原性疾病环境模拟系统(模拟海拔6000m高原环境)建立急性高原肺水肿大鼠模型。造模完成后,观察各组大鼠肺组织病理学变化,计算肺含水量,试剂盒检测肺组织超氧化物歧化酶(SOD)和一氧化氮合酶(NOS)活性、丙二醛(MDA)含量、炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)水平,并检测肺组织磷脂酰肌醇3激酶(Phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)、丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(Protein-serine-threonine kinase, Akt)mRNA水平和蛋白相对含量。结果:与N组相比,M组肺含水量上升,肺水肿病理表现显著,肺组织TNF- α 、IL-6水平升高($t=14.753, 7.666$, 均 $P<0.01$),SOD和NOS活性下降($t=9.663, 4.681$, 均 $P<0.01$),MDA含量上升($t=13.906, P<0.01$);与M组比较,KA组的肺含水量降低,肺水肿病理表现减轻,炎症因子TNF- α 和IL-6水平均明显下降($t=9.104, 3.843$, 均 $P<0.01$),SOD活性上升($t=3.715, P<0.01$),NOS活性上升($t=2.629, P<0.05$),MDA含量下降($t=9.196, P<0.01$)。与N组相比,M组PI3K、Akt1 mRNA表达水平升高($t=7.069, 5.896$, 均 $P<0.01$)、蛋白相对含量升高($t=3.552, 7.930$, 均 $P<0.05$);与M组比较,KA组PI3K、Akt1 mRNA表达水平降低($t=8.468, 5.871$, 均 $P<0.01$)、蛋白含量降低($t=6.701, 4.010$, 均 $P<0.05$)。结论:山柰酚可以通过减轻氧化损伤和抑制炎症反应,预防低气压低氧诱导的急性高原肺水肿的发生,这种保护作用可能与下调PI3K/Akt信号通路有关。

关键词 山柰酚;高原肺水肿;PI3K/Akt信号通路;保护机制

中图分类号 R563.9

文献标志码 A

Preventive effect and mechanism of kaempferol on high altitude pulmonary edema in rats

CAO Li-rui¹, ZHA Yu-jie¹, HE Qing²

(1. Medical College, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610030, China; 2. Affiliated Hospital of Southwest Jiaotong University, Third People's Hospital, Chengdu 610036, China)

Abstract **Objective:** To explore the protective effect and possible mechanism of kaempferol intervention on acute high altitude pulmonary edema in rats. **Methods:** Thirty-two male Sprague-Dawley(SD) rats were randomly divided into control group (N group), model group (M group), kaempferol group (KA group) and acetazolamide group (ACZ group), with 8 rats in each group. After 7 days of pre-administration, the acute high altitude pulmonary edema model was established through a high-altitude disease environment simulation system (simulating environment of 6000 m at high altitude). After the modeling was completed, the pathological changes of lung tissue, the lung wet/dry ratio, superoxide dismutase (SOD), nitric oxide synthase (NOS), malondialdehyde (MDA), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) levels, the mRNA level and protein expression of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) and serine threonine protein kinase (Akt) were detected. **Results:** Compared with group N, group M showed increased wet/dry ratio, marked pathological changes, increased levels of TNF- α and IL-6 in lung tissues ($t=14.753, 7.666$, both $P<0.01$), and decreased SOD and NOS activities ($t=9.663, 4.681$, both $P<0.01$), the content of MDA increased ($t=13.906, P<0.01$). Compared with group M, the wet/dry ratio of group KA was reduced, the pathological manifestations of pulmonary edema were alleviated, and the levels of TNF- α and IL-6 decreased significantly ($t=9.104, 3.839$, both $P<0.01$), SOD and NOS activity increased ($t=3.715, 2.629, P<0.01, P<0.05$), MDA content decreased ($t=9.196, P<0.01$). Compared with group N, the PI3K and Akt1 mRNA expression of group M increased ($t=7.069, 5.896$, both $P<0.01$), and the protein content increased ($t=3.552, 7.930$, both $P<0.05$); compared with group M, PI3K and Akt1 mRNA expression levels in the KA group decreased ($t=8.468, 5.871$, both $P<0.01$), and protein content decreased ($t=6.701, 4.010$, both $P<0.05$). **Conclusion:** Kaempferol can prevent the occurrence of acute high altitude pulmonary edema induced by low pressure and hypoxia by reducing oxidative damage and inhibiting inflammation. This protective effect may be related to the down-regulation of PI3K/Akt signal pathway.

Key words kaempferol; acute high altitude pulmonary edema; PI3K/Akt signal pathway; protective mechanism

基金项目 四川省科技计划重点研发项目(2017FZ0058)

作者简介 曹丽睿(1994-),女,硕士在读,研究方向:急性高原缺氧;通信作者:何庆, E-mail: 123hq@163.com。

高原肺水肿(high altitude pulmonary edema,HAPE)是一种严重的急性高原疾病,是快速上升至海拔超过 2 500 m 的高原环境时,机体对高原低压低氧环境不适应所引起的特发性疾病^[1-2],HAPE 起病迅速且死亡率高^[3-4],对需要急进高原地区的人群危害极大,严重者可能会危及生命^[4-5]。近年来随着川藏地区经济建设和高原作业的不断增多,需要从低海拔地区进入高原环境的人群数量逐年增加,急性高山病(acute mountain sickness,AMS)的发病率持续升高^[6]。如何使平原地区人群进入高原地区后快速适应高原环境,提高生活质量和工作能力,减少 HAPE 的发病率,是目前急需解决的问题。尽管已有研究对 AMS 和 HAPE 的机制和防治措施进行探索,但可以用于临床且疗效和安全性都有一定保障的预防和治疗措施仍然比较缺乏,因此加强 HAPE 及其相关防治药物的研究,具有重大的临床意义。

山柰酚(kaempferol,KA)又名山柰酚-3,是一种黄酮醇类化合物,具有抗炎、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤等多种生物活性^[7-9]。有实验研究表明山柰酚能够清除氧自由基,抑制炎症细胞因子产生,保护组织免受缺氧损伤^[10],而 HAPE 的产生与炎症、氧化应激增强密切相关^[11-12],因此猜测山柰酚对 HAPE 也具有一定的防治作用,但目前对于山柰酚预防 HAPE 的作用及相关机制研究还未见报道。

本研究利用高原性疾病环境模拟系统模拟海拔 6 000 m 高原环境以建立 HAPE 大鼠模型,以乙酰唑胺作为对照组,通过预给药的方式探讨山柰酚是否通过缓解氧化应激和炎症作用对 HAPE 大鼠产生保护作用以及可能存在的相关机制,以期如山柰酚的临床运用和 HAPE 的防治提供新的思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~7 周龄的 SPF 级雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 32 只,体重 180~220 g,购于成都达硕实验动物有限公司,实验单位动物使用许可证编号:SYXK(川)2019-189。饲养于 SPF 级动物饲养中心,室温保持 20~24℃,相对湿度维持 45~65%,人工光照昼夜 12 h 循环,大鼠自由进食、饮水。

1.1.2 实验试剂 山柰酚(原料药,纯度>98.5%,成都埃法生物科技有限公司,AB0715),乙酰唑胺(原料药,纯度≥98%,上海皓元生物医药科技有限公司,HY-B0782),Tween-80(Amresco,BDH7781-2),RNA 提取液、5×蛋白还原型上样缓冲液、HRP 标记山羊抗大鼠、HRP 标记山羊抗兔、β-actin、GAPDH

(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为 G3013、G2013、GB23302、GB23303、GB12002、GB12003)。丙二醛(malondialdehyde,MDA)测试盒、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase,NOS)测试盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)测试盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 A003-1、A014-2-2、A001-1);白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)检测试剂盒、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)检测试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司,批号分别为 L200807450、L200927099);BCA 蛋白定量检测试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为 G2026、G2003)。

1.1.3 实验仪器 高原性疾病环境模拟系统(成都达硕生物科技有限公司,DS-F),酶标检测仪(BioTek 仪器有限公司),电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司,ME203E/02),台式高速冷冻离心机(北京大龙,D3024R),病理切片机(上海徕卡仪器有限公司),全景切片扫描仪[(3DHISTECH(Hungary))],电子显微镜(日本 Nikon 电子公司,Eclipse Ci-L),荧光定量 PCR 仪(Bio-rad,CFX),超微量分光光度计(Thermo,NanoDrop2000)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物造模及给药 将 32 只 6~7 周龄的健康 SD 大鼠随机分为 4 组,每组 8 只,分别为对照组(N组)、模型组(M组)、山柰酚给药组(KA组)、乙酰唑胺给药组(ACZ组)。对照组与模型组生理盐水灌胃,剂量为 10 mL/kg;山柰酚给药组按 10 mL/kg 容量灌胃给予大鼠配制好的浓度为 10 μmol/mL 的药液,乙酰唑胺组根据体表面积折算法,将临床常用的人体用药剂量折算为大鼠的用药剂量,按照 44.66 mg/kg 剂量给药。各实验组每日均灌胃给药 1 次,持续 7 d,实验期间密切观察大鼠的一般状况。

第 8 天 N 组给药后仍照常饲养,其余 3 组在给药 1 h 后放入模拟海拔 6 000 m 低氧环境的低压氧舱内(动物进舱后以 10 m/s 速度减压上升,10 min 达到海拔 6 000 m,氧含量 9.8%,之后维持氧含量在 9.7%~9.9%范围内,舱内大气压维持在 46.57~49.02 kPa 范围内,湿度维持在 49%~55%之间,室内温度由中央空调统一控制,白天保持 22~24℃,夜晚 16~18℃。N 组大鼠在同一实验室常压常氧条件下饲养 48 h,其余 3 组大鼠在低压低氧舱内饲养 48 h,维持各组大鼠其他饲养条件相同。饲养结束后,按 N 组、M 组、KA 组、ACZ 组的顺序依次取出各组大鼠,观察一般情况、称量体重并记录后,腹腔注射 10%水合氯醛溶

液将大鼠麻醉,无菌条件下解剖。取出整个肺组织,观察并记录肺组织的形态是否正常,以及各组大鼠肺组织的颜色和大小有无差异,将肺组织分解并妥善保存。

1.2.2 大鼠肺含水量测定 取大鼠左上肺组织,生理盐水冲洗 2 次,无菌水淋洗 3 次,用无菌滤纸吸干水分,置于锡箔纸上称重,得到的肺组织重量记录为湿重[W(g)],用锡箔纸包裹好肺组织后置于烘箱中,设置温度为 80℃,连续烘干 48 h,待肺组织重量恒定后称重,记录为干重[D(g)]。根据公式肺含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%,计算得到肺含水量。

1.2.3 苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织病理学变化 取大鼠右下肺组织,用 0.9%的生理盐水冲洗后,采用 4%多聚甲醛溶液固定 48 h,等待固定充分后,依次将其进行蜡封、包埋、切片,随后将切片进行二甲苯脱蜡、清洗、苏木精和伊红染色、脱水、中性树脂封片,光镜下观察病理改变并拍照记录。

1.2.4 ELISA 法检测炎症因子 TNF-α 和 IL-6 水平 取大鼠右上肺组织,用 9 倍匀浆介质(0.9%生理盐水)研磨,然后将研磨液 3 000~4 000 r/min,离心 10 min,取上清制备成 10%的组织匀浆,用 ELISA 试剂盒测定样本中 TNF-α 和 IL-6 水平。所有操作按试剂盒规定步骤,根据 ELISA 标准曲线计算组织样本中的各个指标含量。

1.2.5 大鼠肺组织 NOS、MDA、SOD 变化检测 取大鼠右上肺组织,用 9 倍匀浆介质(0.9%生理盐水)研磨,然后将研磨液 3 000~4 000 r/min,离心 10 min,取上清制备成 10%的组织匀浆,根据试剂盒操作要求测定肺组织和血浆中 SOD 活性、MDA 浓度和 NOS 活性。

1.2.6 Western 印迹检测磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 1(Akt1)蛋白水平 从冰箱中取出大鼠右下肺组织,准确称量,研磨匀浆,冰上裂解 30 min 后,离心获得上清液,采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度,然后配制 SDS-PAGE 凝胶(10%分离胶、5%浓缩胶)、电泳、转膜,加入 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入 Akt1、PI3K、内参蛋白 β-actin 一抗(1:1 000),4℃孵育摇床过夜后洗涤后加入二抗(1:3 000),室温孵育 2 h,孵育结束后洗涤,ECL 反应液充分反应,压片并显影定影,整理去色并分析目标带的光密度值。

1.2.7 RT-PCR 检测 PI3K、Akt1 mRNA 水平 取右下肺组织,研磨后提取 RNA,配制逆转录反应体系,混匀并离心,设定好逆转录程序。在 NCBI 数据库 Nucleotide 中查询大鼠 PI3K(NM_053481.2)、Akt1

(NM_033230.3)、GAPDH(NM_017008.4)的 mRNA 相应基因号,结合参考文献,委托武汉 ServiceBio 生物科技公司完成引物设计、合成与验证,见表 1。采用两步法 PCR 扩增标准程序进行 Real-Time PCR 反应,使用实时荧光定量 PCR 仪分析结果,得出各个样本的 Ct 值,采用 ΔΔCt 法分析数据,得到目的基因的相对表达量。

表 1 目的基因的引物序列

Tab 1 Primer sequence of target genes

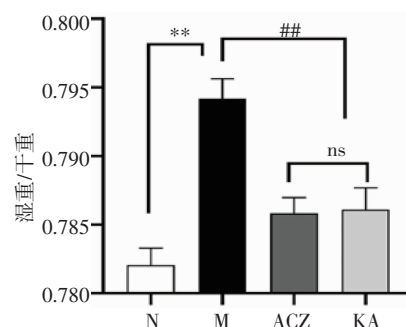
| 目的基因 | 扩增长度(bp) | 引物序列(5'-3') |
|-------|----------|-------------------------------|
| Akt1 | 291 | 上游 GGACAACCGCCATCCAGACT |
| | | 下游 GCCAGGGACACCTCCATCTC |
| PI3K | 337 | 上游 CTGTGCTCCATTACACCTCT |
| | | 下游 GCCTCTAATCTTCTCCCTCTCTTTCT |
| GAPDH | 138 | 上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG |
| | | 下游 GGTGAAGAATGGGAGTTGCT |

注:PI3K:磷脂酰肌醇 3 激酶,Akt1:丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 1; GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

1.3 统计学处理 本研究数据分析采用 SPSS 25.0 软件处理,作图工具采用 Graphpad Prism 8.01。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Kolmogorov-Smirnov 检验评估变量的正态性。多组间比较先行方差齐性检验(Levene 检验),若方差齐用单因素方差分析(analysis of variance,ANOVA),采用 LSD-t(least-significant-difference)检验进行组间差异的多重比较。以 $P < 0.05$ 作为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肺含水量与 N 组比较 M 组、KA 组、ACZ 组的肺含水量都有所升高。与 N 组相比,M 组的肺含水量显著上升($t=17.946, P < 0.01$)。与 M 组相比,KA 组的肺含水量降低($t=11.949, P < 0.01$),ACZ 组与 M 组相比,肺含水量也呈下降趋势($t=12.358, P < 0.01$)。

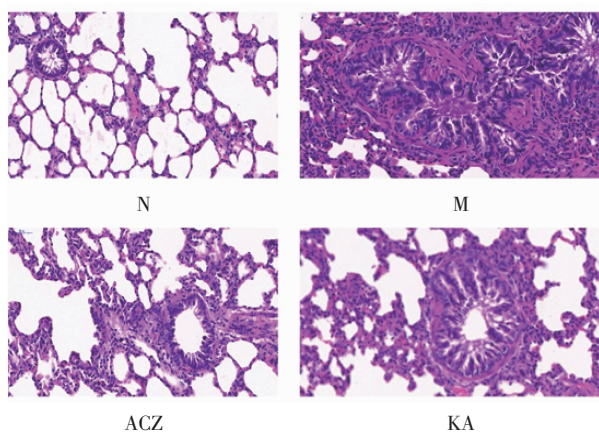


注:N:对照组;M:模型组;ACZ:乙酰唑胺组;KA:山柰酚组;与 N 组比较,* $P < 0.01$;与 M 组比较,## $P < 0.01$;ns:无统计学意义

图 1 大鼠肺组织含水量

Fig 1 Water content in lung tissue of rats

2.2 大鼠肺组织 HE 染色结果 如图 2 所示,N 组大鼠肺组织结构正常,无明显病理改变,肺泡腔结构清晰完整,肺泡壁未见明显增厚,也未观察到炎性细胞浸润。与 N 组相比,M 组存在明显的肺组织结构破坏,显微镜下可见肺泡塌陷水肿,肺泡壁增厚且厚度不均一,肺泡腔缩小,伴有大量淋巴细胞与中性粒细胞浸润,局部支气管管腔狭窄变形,管腔内可见大量炎性细胞浸润和嗜酸性黏液分泌。KA 组和 ACZ 组可见肺泡壁增厚和肺泡腔缩小伴炎性细胞浸润,但与 M 组相比这种变化显著减轻。

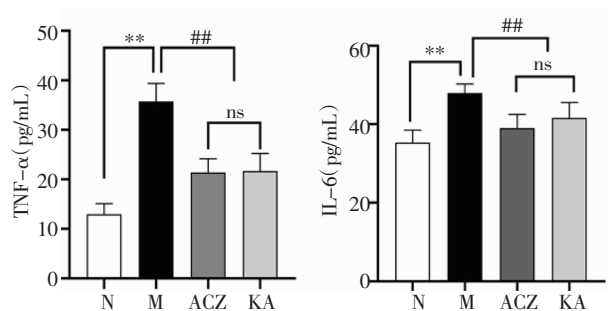


注:N:对照组;M:模型组;ACZ:乙酰唑胺组;KA:山柰酚组

图2 大鼠肺组织 HE 染色(200×)

Fig 2 HE staining of lung tissue in rats (200×)

2.3 大鼠肺组织炎症因子 TNF- α 和 IL-6 水平变化 如图 3 所示,与 N 组比较,M 组 TNF- α 、IL-6 水平升高($t=14.753$ 、 7.666 ,均 $P<0.01$)。与 M 组相比,KA 组 TNF- α 和 IL-6 水平均明显下降($t=9.104$ 、 3.843 ,均 $P<0.01$);与 M 组相比,ACZ 组 TNF- α 、IL-6 水平均下降($t=9.299$ 、 5.407 ,均 $P<0.01$),且 KA 组与 ACZ 组之间并无明显差异($t=0.201$ 、 1.564 ,均 $P>0.05$)。



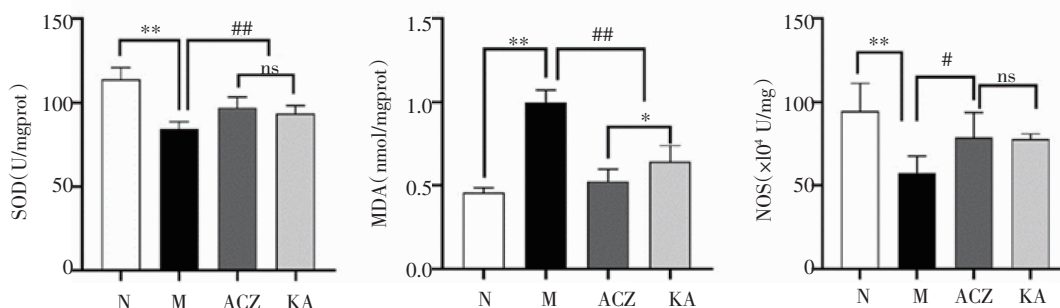
注:TNF- α :肿瘤坏死因子- α ;IL-6:白细胞介素-6;N:对照组;M:模型组;ACZ:乙酰唑胺组;KA:山柰酚组;与 N 组比较,** $P<0.01$;与 M 组比较,## $P<0.01$;ns:无统计学意义

图3 山柰酚干预后肺组织 TNF- α 、IL-6 含量的变化

Fig 3 The changes of TNF- α and IL-6 in the lung tissue of the rats

2.4 大鼠肺组织氧化应激指标变化 如图 4 所示,与 N 组相比,M 组大鼠肺组织 SOD 活性显著下降($t=9.663$, $P<0.01$),MDA 含量显著上升($t=13.906$, $P<0.01$),NOS 活性下降($t=4.681$, $P<0.01$);与 M 组相比,KA 组和 ACZ 组大鼠肺组织的 SOD 活性上升($t=3.715$ 、 4.417 ,均 $P<0.01$),MDA 含量减少($t=9.196$ 、 12.215 , $P<0.01$),NOS 活性上升($t=2.629$ 、 4.327 ,均 $P<0.05$);且 KA 组与 ACZ 组比较,NOS 和 SOD 均无明显差异($t=0.135$ 、 1.204 ,均 $P>0.05$),KA 组 MDA 高于 ACZ 组($t=3.016$, $P<0.05$)。

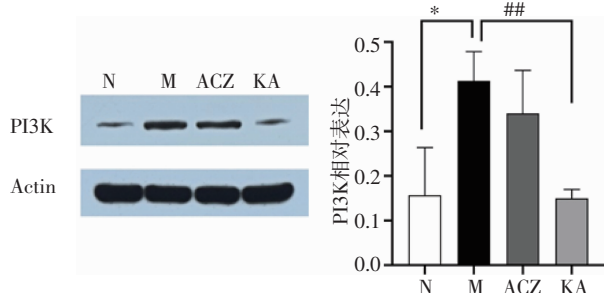
2.5 山柰酚干预后大鼠肺组织中 PI3K/Akt 通路激活情况检测 如图 5、图 6 所示,与 N 组相比,M 组 PI3K 和 Akt1 相对含量均显著升高($t=3.552$ 、 7.930 ,均 $P<0.05$)。与 M 组比较,KA 组 PI3K 表达降低($t=6.701$, $P<0.01$),Akt1 表达降低($t=4.010$, $P<0.05$)。与 M 组相比,ACZ 组 PI3K 蛋白和 Akt1 蛋白相对含量略有降低,但差异无统计学意义($t=1.092$ 、 1.414 ,均 $P>0.05$)。



注:SOD:超氧化物歧化酶;MDA:丙二醛;NOS:一氧化氮合酶;N:对照组;M:模型组;ACZ:乙酰唑胺组;KA:山柰酚组;与 N 组比较,** $P<0.01$;与 M 组比较,## $P<0.05$,### $P<0.01$;与 ACZ 组比较,* $P<0.05$;ns:无统计学意义

图4 大鼠肺组织氧化应激生化指标变化

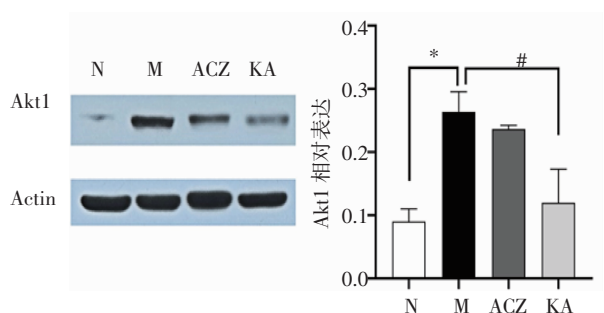
Fig 4 The changes of levels of oxidative stress in the lung tissue of the rats



注:PI3K:磷脂酰肌醇 3 激酶;N:对照组;M:模型组;ACZ:乙酰唑胺组;KA:山柰酚组;与 N 组比较,* $P<0.05$;与 M 组比较,## $P<0.01$

图 5 大鼠肺组织 PI3K 蛋白表达含量的变化

Fig 5 The changes of expression of PI3K protein in the lung tissue of the rats

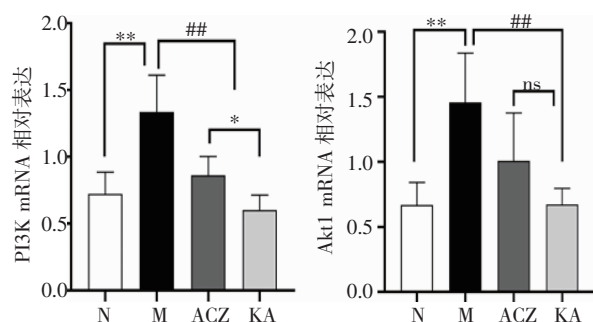


注:Akt1:丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 1;N:对照组;M:模型组;ACZ:乙酰唑胺组;KA:山柰酚组;与 N 组比较,* $P<0.05$;与 M 组比较,# $P<0.05$

图 6 大鼠肺组织 Akt1 蛋白表达含量的变化

Fig 6 The changes of expression of Akt1 protein in the lung tissue of the rats

2.6 山柰酚干预后大鼠肺组织中 PI3K、Akt1 mRNA 表达水平测定 如图 7 所示。与 N 组相比,M 组 PI3K、Akt1 mRNA 相对表达量明显升高($t=7.069$ 、 5.896 ,均 $P<0.01$),与 M 组相比,KA 组 PI3K、Akt1 mRNA 相对表达量降低($t=8.468$ 、 5.871 ,均 $P<0.01$)。与 M 组相比,ACZ 组 PI3K、Akt1 mRNA 相对表达量降低($t=5.492$ 、 3.355 ,均 $P<0.05$)。



注:PI3K:磷脂酰肌醇 3 激酶;Akt1:丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 1;N:对照组;M:模型组;ACZ:乙酰唑胺组;KA:山柰酚组;与 N 组比较,** $P<0.01$;与 M 组比较,## $P<0.01$;与 ACZ 组比较,* $P<0.05$;ns:无统计学意义

图 7 大鼠 PI3K、Akt1 mRNA 相对表达量

Fig 7 Expression of PI3K and Akt1 mRNA in the lung tissue of the rats

3 讨论

近年来,HAPE 作为高原疾病中发病率和死亡率都较高的一种疾病日渐受到关注,越来越多的研究说明 HAPE 的发生、发展与氧化应激失衡、炎症等相关^[12]。山柰酚广泛存在于茶叶、花椰菜、洋葱、番茄、草莓和葡萄等可食用的水果和蔬菜以及银杏叶、山楂、连翘、山奈等传统医学常用的植物中,安全性较高,具有良好的抗氧化能力和抗炎能力,可以保护组织免受缺氧损伤,而且山柰酚纯品的提取技术已经相当成熟,具有良好的开发和应用前景。

氧化应激失衡是引起高原肺水肿的因素之一。SOD 是生物体内重要的抗氧化酶,其含量高低可以间接反映机体内源性氧自由基清除能力,MDA 是过氧化反应的代谢产物,可以反映脂质过氧化程度。急进高原低压低氧环境时,SOD 的生成和活性受到炎症因子的抑制,又在清除氧自由基时大量消耗,因此 SOD 的含量和活性降低,而 MDA 的含量增加,血管内皮细胞和肺泡上皮细胞受损,通透性增加,导致肺水肿^[13]。一氧化氮(NO)由 NOS 以 L-精氨酸为底物生成,是重要的血管内皮舒张因子。研究表明,NO 产生不足可以加重气道充血渗出,引起肺水肿^[14]。本研究发现,使用高原性疾病环境模拟系统模拟高原环境可以使大鼠肺组织 SOD 活性增强,MDA 含量增加,NOS 活性降低,氧化和抗氧化平衡失调,引起组织损伤,这种变化与文献报道的 HAPE 的改变一致^[14];而山柰酚和乙酰唑胺预给药处理可以使大鼠 SOD 活性降低,MDA 含量减少,NOS 活性升高,达到抑制氧化应激、改善肺水肿状态的目的。说明山柰酚具有良好的抗氧化活性,可以通过清除自由基减轻氧化损伤,实现对肺组织的保护作用。

TNF- α 和 IL-6 作为重要的促炎因子,在诱导炎症细胞浸润和组织损伤中起到关键作用,其活性的高低可以提示机体的炎症损伤情况^[15-16]。低压低氧诱导炎症细胞激活和炎症因子释放,炎症信号在细胞因子和炎症介质中迅速转导放大,氧自由基和蛋白酶被释放,肺泡毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞损伤,造成微循环障碍,肺泡上皮通透性增强,富含蛋白质和纤维蛋白的液体渗出,进而引起肺水肿^[17]。研究发现在 LPS 所诱导的肺损伤模型中,山柰酚可显著抑制促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-6 产生,并能显著抑制丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和核因子 κ B 活化信号转导通路^[18]。本研究发现在低压低氧诱导的 HAPE 大鼠中,炎症因子 TNF- α 、IL-6 大量释放,炎性反应增强,而山柰酚预给药使大鼠炎症因子 TNF- α 、IL-6 的水平

下降,炎症反应被抑制,肺水肿程度减轻,提示山柰酚可以抑制高原低压低氧引起的炎症反应,进而缓解 HAPE。

PI3K 是重要的信号转导分子,Akt 是 PI3K 的下游效应物,PI3K/Akt 信号通路是同时具有蛋白激酶活性和脂类激酶活性的细胞内信号转导通路,活化的 Akt 可以通过磷酸化下游效应因子调控细胞凋亡和细胞增殖,参与心血管疾病、肿瘤和代谢障碍疾病等多种疾病的病理过程^[19]。近年来研究发现,PI3K/Akt 信号通路也参与急性肺损伤的发病过程,包括炎症、肺水肿、气道重塑和肺气肿等^[20]。

低氧可以刺激 PI3K/Akt 信号通路活化^[21]。研究发现山柰酚通过抑制细胞外调节蛋白激酶/p38 丝裂原活化蛋白激酶 (ERK/p38 MAPK)、PI3K/Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (PI3K/Akt/mTOR) 信号通路的激活,抑制内皮细胞中低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、血管内皮细胞生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 激活,进而抑制内皮细胞血管形成^[22-23]。PI3K/Akt 信号通路在调控中性粒细胞活化和炎症因子释放的过程中起重要作用^[24],并与氧化应激调控密切相关^[25]。ZEA 诱导产生氧化应激,山柰酚刺激核因子 E2 相关因子 2/血红素氧合酶 1 (Nrf2/HO-1) 级联和 PI3K/Akt 信号转导,减轻炎症和脂质过氧化作用,使抗氧化酶 SOD、过氧化氢酶和谷胱甘肽还原酶的表达正常化^[26]。右美托咪定可以抑制脂多糖 (LPS) 诱导的大鼠肺部炎症,抑制肺泡壁增厚和出血,减轻肺水肿,并减轻肺组织细胞凋亡和线粒体凋亡信号激活,这种保护作用与 PI3K/Akt 信号转导通路抑制密切相关^[27]。金雀异黄酮可以与雌激素受体结合激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路,使 NO 的合成与分泌增加,舒张肺血管^[28]。本研究发现,与 N 组相比,M 组大鼠肺组织 PI3K 蛋白和 mRNA 均明显上升,Akt1 蛋白和 mRNA 上升,提示低压低氧诱导 PI3K/Akt 信号通路激活,刺激炎症和氧化平衡失调,进而促进 HAPE 的发生、发展。与 M 组相比,KA 组大鼠肺组织 PI3K 蛋白和 mRNA 减少,Akt1 蛋白和 mRNA 下降,提示山柰酚可以抑制 PI3K/AKT1 信号通路,炎症和氧化应激减轻,HAPE 程度得到改善。说明山柰酚和 PI3K/Akt 信号通路之间存在相关性,山柰酚可以抑制 PI3K/Akt 信号通路,抑制高原低压低氧引起的炎症和氧化应激,进而缓解 HAPE。

综上所述,山柰酚可以通过抑制氧化应激和炎症预防急性高原肺水肿的发生,这种保护作用机制可能与 PI3K/Akt 信号通路抑制有关。

参考文献:

- [1] WOODS P,ALCOCK J. High-altitude pulmonary edema[J]. *Evol Med Public Health*,2021,9(1):118-119.
- [2] WALKER C,MINER B,BOLOTIN T. High-altitude pulmonary edema in Ohio at an elevation of 339 meters [J].*Open Access Emerg Med*,2021,13:151-153.
- [3] ALEXANDER P,ENGAN H,LUNDSTEN D,et al. The effect of dietary nitrate on nocturnal sleep-disordered breathing and arterial oxygen desaturation at high altitude[J]. *High Alt Med Biol*,2018,19(1):21-27.
- [4] GUDBJARTSSON T,SIGURDSSON E,GOTTFREDSSON M,et al. High-altitude illness and related diseases-a review[J]. *Laeknabla-did*,2019,105(11):499.
- [5] WILKINS M R,GHOFRANI H A,WEISSMANN N,et al. Pathophysiology and treatment of high-altitude pulmonary vascular disease[J]. *Circulation*,2015,131(6):582-590.
- [6] WU T,DING S Q,LIU J L,et al. Who should not go high: chronic disease and work at altitude during construction of the Qinghai-Tibet railroad[J]. *High Alt Med Biol*,2007,8(2):88-107.
- [7] TSAI F J,LIN C W,LAI C C,et al. Kaempferol inhibits enterovirus 71 replication and internal ribosome entry site(IRES) activity through FUBP and HNRP proteins[J]. *Food Chem*,2011,128(2):312-322.
- [8] ZHU G,LIU X,LI H,et al. Kaempferol inhibits proliferation, migration, and invasion of liver cancer HepG2 cells by down-regulation of microRNA-21[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*,2018,32.
- [9] IMRAN M,RAUF A,SHAH ZA,et al. Chemo-preventive and therapeutic effect of the dietary flavonoid kaempferol: a comprehensive review[J].*Phytother Res*,2019,33(2):263-275.
- [10] LIAO W,CHEN L,MA X,et al. Protective effects of kaempferol against reactive oxygen species-induced hemolysis and its antiproliferative activity on human cancer cells[J]. *Eur J Med Chem*,2016,114:24-32.
- [11] LI Y,ZHANG Y,ZHANG Y. Research advances in pathogenesis and prophylactic measures of acute high altitude illness[J].*Respir Med*,2018,145:145-152.
- [12] TAN X J,LI G B,ZHANG M,et al. Effects of total polysaccharides of *Brassica rapa* on hypoxic mice in simulated plateau[J]. *West China J Pharmaceut Sci*,2020,35(2):171-175.
- [13] GU Y H,ZHAO Z. Significance of the changes occurring in the levels of interleukins,SOD and MDA in rat pulmonary tissue following exposure to different altitudes and exposure times[J]. *Exp Ther Med*,2015,10(3):915-920.
- [14] LU H,ZHANG H,JIANG Y. Methazolamide in high-altitude illnesses[J]. *Eur J Pharm Sci*,2020,148:105326.
- [15] THOMPSON M,BRITT R D,PABELICK C M,et al. Hypoxia and local inflammation in pulmonary artery structure and function[J]. *Adv Exper Med Biol*,2017,967:325-334.
- [16] ALCHIKH M,CONRAD T,HOPPE C,et al. Are we missing respiratory viral infections in infants and children? Comparison of a hospital-based quality management system with standard of care[J]. *Clin Microbiol Infect*,2019,25(3):380.e9-380.e16.
- [17] 李明,李天苏,杨倩文. 基于 PI3K/Akt 信号通路观察白藜芦醇对呼吸道合胞病毒致肺炎小鼠的保护作用机制[J].*中药材*,2020,

- 43(4):989993.
- [18] QIAN J, CHEN X, CHEN X, et al. Kaempferol reduces K63-linked polyubiquitination to inhibit nuclear factor- κ B and inflammatory responses in acute lung injury in mice[J]. *Toxicol Lett*, 2019, 306:53–56.
- [19] 史东梅, 董明, 陆颖, 等. PI3K/Akt 信号通路对骨破坏: 问题与机制[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(23):3716–3722.
- [20] CAO H, FENG Y, NING Y, et al. Edaravone protects rats and human pulmonary alveolar epithelial cells against hyperoxia injury: heme oxygenase-1 and PI3K/Akt pathway may be involved[J]. *Exp Lung Res*. 2015. 41(7): 404–414.
- [21] 殷令妮, 陈德宣. PI3K/Akt 通路在低氧诱导脂肪干细胞增殖和向内皮细胞分化中的作用[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(19):3004–3009.
- [22] KIM G D. Kaempferol inhibits angiogenesis by suppressing HIF-1 α and VEGFR2 activation via ERK/p38 MAPK and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in endothelial cells[J]. *Prev Nutr Food Sci*, 2017, 22(4):320–326.
- [23] CHIN H K, HORNG C T, LIU Y S, et al. Kaempferol inhibits angiogenic ability by targeting VEGF receptor-2 and downregulating the PI3K/AKT, MEK and ERK pathways in VEGF-stimulated human umbilical vein endothelial cells[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(5):2351–2357.
- [24] 康新, 王立志, 王屹刚, 等. 重症急性胰腺炎肺损伤时磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B 信号转导通路的表达[J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(11):732–737.
- [25] ZHUANG Y, WU H, WANG X, et al. Resveratrol attenuates oxidative stress-induced intestinal barrier injury through PI3K/Akt-mediated Nrf2 signaling pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:7591840.
- [26] PERAMAIYAN R, BEN A R, ALSAEDI FATMA J, et al. Kaempferol Inhibits Zearalenone-induced oxidative stress and apoptosis via the PI3K/Akt-mediated Nrf2 signaling pathway: in vitro and in vivo studies[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1):217.
- [27] CUI H, ZHANG Q. Dexmedetomidine ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway[J]. *J Anesth*, 2021, 35(3):394.
- [28] CHEN Y H, CHEN D, LIU S J, et al. Systematic elucidation of the mechanism of genistein against pulmonary hypertension via network pharmacology approach[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22):5569.

(2021-04-10 收稿)

(上接第 57 页)

- [4] TEMEL R E, TANG W, MA Y, et al. Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(7):1968
- [5] GE L, QI W, WANG L J, et al. Flotillins play an essential role in Niemann-Pick C1-like 1-mediated cholesterol uptake[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(2):551
- [6] LI P S, FU Z Y, ZHANG Y Y, et al. The clathrin adaptor Numb regulates intestinal cholesterol absorption through dynamic interaction with NPC1L1[J]. *Nat Med*, 2013, 20(1):80
- [7] WEI J, FU Z Y, LI P S, et al. The clathrin adaptor proteins ARH, Dab2, and Numb play distinct roles in Niemann-Pick C1-Like 1 versus low density lipoprotein receptor-mediated cholesterol uptake[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(48):33689
- [8] XIE C, LI N, CHEN Z J, et al. The small GTPase Cdc42 interacts with Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) and controls its movement from endocytic recycling compartment to plasma membrane in a cholesterol-dependent manner[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(41):35933
- [9] ZHANG Y Y, FU Z Y, WEI J, et al. A LIMA1 variant promotes low plasma LDL cholesterol and decreases intestinal cholesterol absorption[J]. *Science*, 2018, 360(6393):1087
- [10] XIE P, ZHU H, JIA L, et al. Genetic demonstration of intestinal NPC1L1 as a major determinant of hepatic cholesterol and blood atherogenic lipoprotein levels[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 237(2):609
- [11] TANG W, JIA L, MA Y, et al. Ezetimibe restores biliary cholesterol excretion in mice expressing Niemann-Pick C1-Like 1 only in liver[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1811(9):549
- [12] XIE P, JIA L, MA Y, et al. Ezetimibe inhibits hepatic Niemann-Pick C1-Like 1 to facilitate macrophage reverse cholesterol transport in mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(5):920

(2021-03-15 收稿)