

去甲汉黄芩素对低压低氧诱导急性心肌损伤的保护作用与机制研究

景临林^{1,2}, 邹蓓蕾¹, 辛宇¹, 马慧萍^{1*}

¹中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院药剂科, 兰州 730050; ²西安交通大学第一附属医院药学部,

西安 710061

摘要: 为了考察去甲汉黄芩素对低压低氧诱导小鼠急性心肌损伤的保护作用及其作用机制, 将雄性 BALB/c 小鼠 78 只随机分为正常对照组、模型组、芦丁组、去甲汉黄芩素低、中、高剂量组。除正常对照组外, 其他组置于模拟海拔 8 000 m 暴露 24 h, 随后处死小鼠, 取血清和心脏。HE 染色评估小鼠心肌组织病理变化; 商用试剂盒检测心肌组织中过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 的水平评估氧化应激状态; 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血清和心肌组织中白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的含量评估炎症反应; 蛋白质印迹 (Western blot) 检测相关蛋白的表达。结果显示去甲汉黄芩素能显著减少低压低氧诱导的心肌组织病理学变化, 明显提高心肌组织中 SOD 和 GSH 的水平, 降低 H₂O₂ 和 MDA 的含量以及缺氧相关蛋白[缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)]的水平。去甲汉黄芩素还能够降低血清和心肌组织中炎症因子 (IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6) 的水平以及心肌组织中炎症相关蛋白[核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 和 TNF- α]的表达。此外, 去甲汉黄芩素还能调控心肌组织中抗氧化应激相关蛋白[核因子-E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 和血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)]以及凋亡相关蛋白[B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma 2 apoptosis regulator, Bcl-2), Bcl-2 关联 X 蛋白 (Bcl-2 associated protein X apoptosis regulator, Bax) 和裂解的半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved Caspase-3)]的表达。以上结果表明: 去甲汉黄芩素通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路抑制氧化应激、炎症反应和细胞凋亡缓解低压低氧诱导的小鼠急性心肌损伤。

关键词: 急性低压低氧; 去甲汉黄芩素; 心肌损伤; 氧化应激; 炎症反应; 细胞凋亡

中图分类号: R965.1 **文献标识码:** A

Protective effect and mechanism of norwogonin against acute heart injury induced by hypobaric hypoxia

JING Lin-lin^{1,2}, ZOU Bei-lei¹, XIN Yu¹, MA Hui-ping^{1*}

¹Department of Pharmacy, the 940th Hospital of Joint Logistics Support force of PLA, Lanzhou 730050, China;

²Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Abstract: To investigate the protective effects and mechanisms of norwogonin against acute hypobaric hypoxia (HH) induced heart injury in mice, 78 male BALB/c mice were randomly divided into control group, model group, rutin group, low, medium, and high-dose norwogonin groups. Except for the control group, the mice in other groups were exposed to a simulated altitude of 8 000 m for 24 h. Then the mice were killed, and the serum and heart were taken. The pathological changes of heart tissues were assessed by HE staining. Commercial kits were

used to detect the levels of hydrogen peroxide (H₂O₂), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) in heart tissues to assess the state of oxidative stress. The levels of interleukin-1 beta (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in serum and heart tissues was detected by ELISA for assessing the inflammatory response. The expressions of related proteins were measured by Western blot. Norwogonin significantly reduced HH induced histopathological changes in heart tissues, markedly increased the levels of SOD and GSH, and decreased the levels of H₂O₂ and MDA, as well as the expressions of hypoxia related proteins (HIF-1 α and VEGF) in heart tissues. Moreover, norwogonin was also able to reduce the levels of inflammatory factors (IL-1 β , TNF- α , and IL-6) in serum and heart tissues as well as the expression of inflammation-related proteins [nuclear factor kappa-B (NF- κ B) and TNF- α] in heart tissues. In addition, norwogonin modulated the expression of anti-oxidative stress related proteins [nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1)] and apoptosis related proteins [B-cell lymphoma 2 apoptosis regulator (Bcl-2), Bcl-2 associated protein X apoptosis regulator (Bax), cleaved Caspase-3] in heart tissues. These results suggest that norwogonin alleviates HH induced acute heart injury in mice by inhibiting oxidative stress, inflammatory response and apoptosis via activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway.

Key words: acute hypobaric hypoxia; norwogonin; myocardial injury; oxidative stress; inflammatory response; apoptosis

高原地区独特的低压缺氧 (hypobaric hypoxia) 环境被认为是引起低氧血症和组织缺氧的最主要致病因素, 能够诱发机体多器官损伤^[1]。心脏作为耗氧量最高的器官之一, 对缺氧极为敏感^[2]。近年来, 随着经济、军事和科技的发展, 到高原地区工作或休闲的人数增加迅速^[3]。因此, 探索如何防治低压低氧引起的心肌损伤成为高海拔医学研究的重点方向之一。

研究表明, 低压低氧诱导的氧化应激是心肌损伤的一个重要机制^[4]。低压低氧条件下, 过量产生的 ROS 无法被内源性抗氧化系统有效清除, 并通过脂质过氧化导致细胞损伤^[5]。此外, 低压低氧还可能诱发炎症反应, 进一步加重心肌功能障碍^[6]。因此, 研究人员提出了针对氧化应激和炎症反应以治疗低压低氧诱导心肌损伤的策略。

去甲汉黄芩素 (norwogonin, Now), 化学名为 5,7,8-三羟基黄酮 (结构见图 1), 是一种从唇形科植物黄芩中发现的天然黄酮类化合物, 具有抗氧化^[7]、抗菌^[8]、抗病毒^[9]等多种生物活性。去甲汉黄芩素在天然产物中含量较低, 为此, 课题组以来源丰富的白杨素为起始原料合成得到去甲汉黄芩素^[10], 并证明其具有优异自由基清除和抗缺氧活性^[11]。但是, 去甲汉黄芩素能否改善高原缺氧诱导心肌损伤尚不清楚。

本研究拟利用低压低氧诱导急性心肌损伤小鼠模型, 探讨去甲汉黄芩素对高原缺氧损伤保护作用以及可能的机制, 为去甲汉黄芩素的开发利用和高原缺氧急性心肌损伤的防治提供潜在药物。

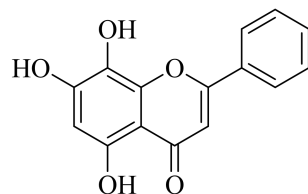


图 1 去甲汉黄芩素的化学结构式

Fig. 1 The chemical structure of norwogonin

1 材料和方法

1.1 仪器

DYC-3070 大型低压低氧动物实验舱（贵州风雷航空军械有限公司）；Microfuge22R 台式微量冷冻离心机（美国 Beckman Coulter 有限公司）；SpectraMax i3 酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）；TissueLyse-24 组织研磨仪（上海净信科技有限公司）；ChemiDoc MP 化学发光凝胶成像系统（伯乐生命医学产品（上海）有限公司）。

1.2 材料和试剂

1.2.1 实验动物

6~8 周龄， 20 ± 2 g 雄性 SPF 级 BALB/c 小鼠 78 只，由斯贝福（北京）生物技术有限公司提供。实验动物生产许可证号：SCXK（京）2019-0010，实验动物使用许可证号：SYXK（军）2014-0029。饲养条件为：温度 25 ± 2 °C，相对湿度 40%-60%，明暗交替 12 h，期间自由饮食饮水，适应性饲养 3 d 后开展实验。本项目研究方案经中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院伦理委员会审核批准（2021KYLL170）。

1.2.2 实验试剂

去甲汉黄芩素按照课题组前期报道的方法合成^[10]（HPLC>98%）；芦丁（HPLC>98%）购自陕西慈缘生物技术有限公司；过氧化氢（hydrogen peroxide, H_2O_2 ）（货号：A064-1-1）、丙二醛（malondialdehyde, MDA）（货号：A003-1-2）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）（货号：A003-3-2）、谷胱甘肽（glutathione, GSH）（货号：A006-2-1）测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）；小鼠白细胞介素 6（interleukin-6, IL-6）（货号：RX203049M）、白细胞介素 1β （Interleukin-1 beta, IL- 1β ）（货号：RX203063M）和肿瘤坏死因子 α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）（货号：RX202412M）ELISA 检测试剂盒（泉州市睿信生物科技有限公司）；BCA 法蛋白定量试剂盒（货号：PC0020）和 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒（货号：P1200）（北京索莱宝科技有限公司）； β -actin（货号：ab8227）、缺氧诱导因子-1 α （hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α ）（货号：ab179483）、血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）（货号：ab46154）、核因子-E2 相关因子 2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2）（货号：ab62352）、血红素加氧酶-1（heme oxygenase-1, HO-1）（货号：ab13243）、核因子 κ B（nuclear factor kappa-B, NF- κ B）（货号：ab16502）、TNF- α （货号：ab215188）、B 淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma 2 apoptosis regulator, Bcl-2）（货号：ab196495）、Bcl-2 关联 X 蛋白（Bcl-2 associated protein X apoptosis regulator, Bax）（货号：ab182733）和裂解的半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶-3（cleaved Caspase-3）（货号：ab214430）等一抗（艾博抗（上海）贸易有限公司）；二抗（莱恩生物科技有限公司）。

1.3 方法

1.3.1 实验分组与模型构建

将 78 只小鼠随机分为正常对照（control, Con）组、模型（model, Mod）组，200 mg/kg

芦丁 (rutin, Rut) 组, 去甲汉黄芩素低剂量 (Now-L, 50 mg/kg)、中剂量 (Now-M, 100 mg/kg)、高剂量 (Now-H, 200 mg/kg) 组, 每组 13 只, 各给药组小鼠腹腔注射给予相应药物, Con 组和 Mod 给予等体积生理盐水。给药 1 h 后, Con 组小鼠置于氧舱外 (海拔 1400 m), 其他组别小鼠放置于大型低压低氧模拟动物实验舱中, 以 10 m/s 升至模拟海拔 8 000 m, 保持 24 h, 然后以 10 m/s 将下降至模拟海拔 3 500 m 对小鼠进行处理以减少缺氧复氧损伤。腹腔注射水合氯醛麻醉小鼠, 眼眶取血, 离心后得到血清, 随后处死小鼠, 取心脏, 清洗后, 用于后续实验。

1.3.2 心肌组织病理检测

每组随机选取 3 只小鼠的心脏, 加入 4%多聚甲醛固定液固定 24 h, 使用 4%多聚甲醛固定 24 h、石蜡包埋、切成 5 μm 薄片后, 进行苏木精-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色, 显微镜下观察心肌组织病理变化。

1.3.3 心肌组织中氧化应激指标检测

取小鼠心肌组织, 称重后加入 9 倍量生理盐水在低温组织研磨仪中进行组织匀浆, 随后 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 500 r/min, 离心 10 min 得到上清液。使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。按照试剂盒说明书检测心肌组织中的氧化应激指标, 包括 MDA、SOD、 H_2O_2 和 GSH。

1.3.4 血清和心肌组织中炎性指标检测

取小鼠血清和心肌组织, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平。

1.3.5 蛋白免疫印迹实验

将小鼠心肌组织称重, 加入 9 倍量 RIPA 蛋白裂解液, 低温组织研磨仪研磨处理后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 r/min 离心 10 min, 取上清, BCA 法测定蛋白浓度后加蛋白上样缓冲液。100 $^{\circ}\text{C}$ 处理 10 min 使蛋白变性。然后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离并将蛋白转至 PVDF 膜上, 5%脱脂牛奶室温封闭 1 h 后, 加入 HIF-1 α (1 : 1 000)、VEGF (1 : 2 000)、NF- κB (1 : 1 500), TNF- α (1 : 1 000)、Nrf2 (1 : 1 000)、HO-1 (1 : 1 000)、Bax (1 : 2 000)、Bcl-2 (1 : 2 000)、cleaved Casepase-3 (1 : 1 000)、 β -actin (1 : 3 000) 等一抗稀释液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。膜经 TBST 漂洗后, 加入二抗 (1 : 10 000) 室温摇床孵育 1~2 h, TBST 漂洗后, ECL 发光液显色曝光, 以 β -actin 为内参, 使用 Image J 软件进行分析。

1.3.6 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计学分析, 数据用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 两两比较采用独立样本 t 检验或者 Dunnett 检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 去甲汉黄芩素对低压低氧小鼠心肌组织病理学的影响

小鼠心肌组织 HE 染色结果如图 2 所示, Con 组小鼠心肌组织结构完整, 心肌纤维排列整齐; Mod 组小鼠心肌组织细胞肿胀, 肌纤维排列紊乱, 肌纤维界限模糊, 给予 Rut 和 Now

细胞缺氧损伤均有所缓解，细胞肿胀减少，肌纤维排列较为整齐。

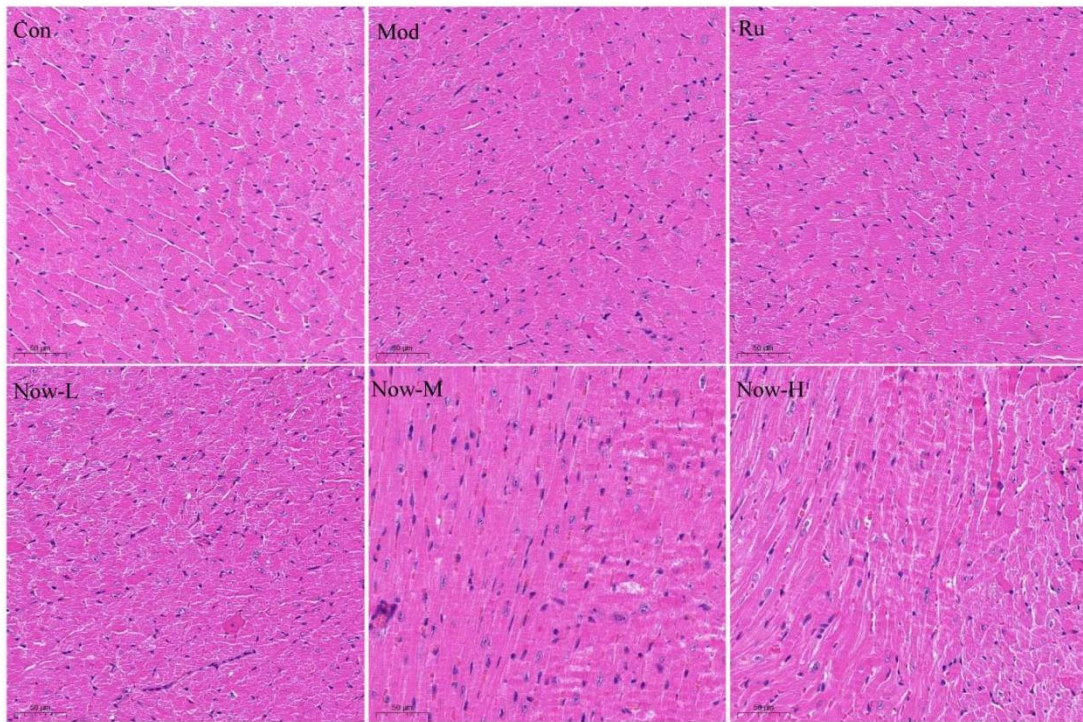
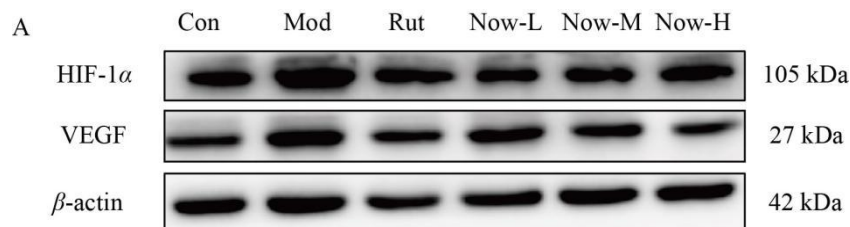


图 2 去甲汉黄芩素对低压低氧小鼠心肌组织病理学的影响 (HE 染色, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of norwogonin on pathological change of heart tissue in mice exposed to acute hypobaric hypoxia (HE staining, $\times 400$)

2.2 去甲汉黄芩素对低压低氧小鼠心肌组织中缺氧相关蛋白表达的影响

为了考察去甲汉黄芩素对低压低氧小鼠心肌组织缺氧状态的改善作用,我们对心肌组织中缺氧诱导因子 HIF-1 α 及其下游蛋白 VEGF 的表达水平进行检测,结果如图 3 所示,与 Con 组相比,Mod 组小鼠心肌组织中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达均显著上调 ($P < 0.01$);与 Mod 组相比,Rut 和高剂量 Now 预处理后低压低氧小鼠心肌组织中的 HIF-1 α 蛋白表达显著下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),Rut 和中、高剂量 Now 预处理后低压低氧小鼠心肌组织中 VEGF 蛋白表达显著下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



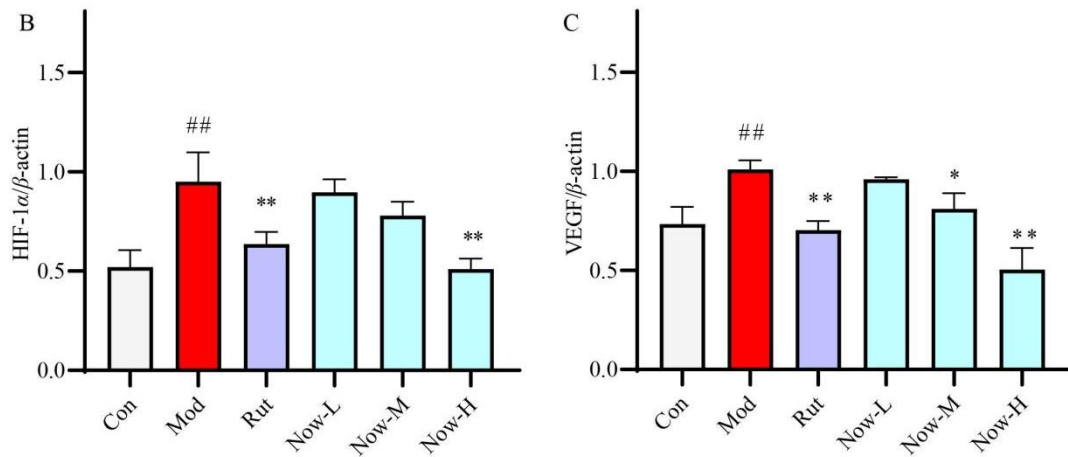


图3 去甲汉黄芩素对低压低氧小鼠心肌组织中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

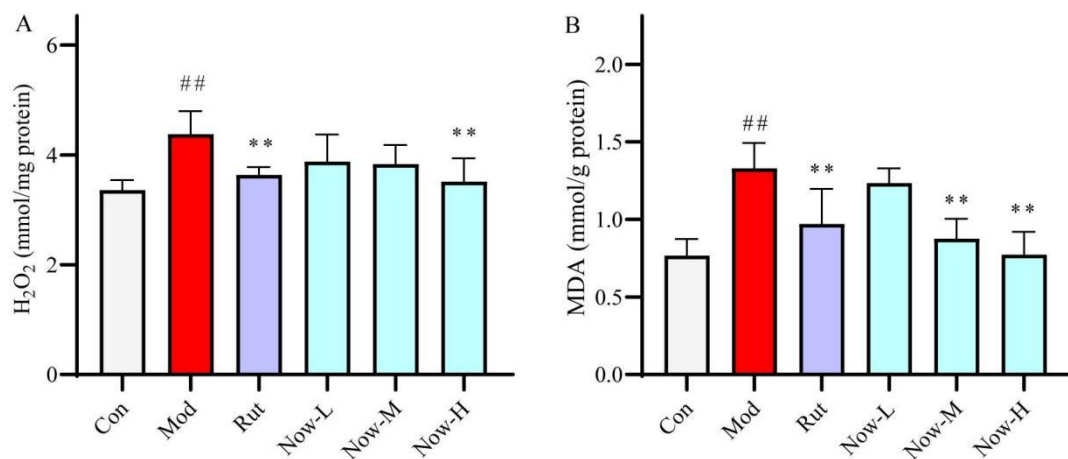
Fig. 3 Effect of norwogonin on the expressions of HIF-1 α and VEGF in the heart tissue of mice exposed to hypobaric hypoxia ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注: 与 Con 组相比, ^{##} $P < 0.01$; 与 Mod 组相比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, 下同。

Note: ^{##} $P < 0.01$ vs Con group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs Mod group, the same below.

2.3 去甲汉黄芩素对低压低氧小鼠心肌组织中氧化应激水平的影响

为了考察去甲汉黄芩素对低压低氧诱导氧化应激的改善作用,我们检测了 H₂O₂、MDA、SOD、GSH 四个常见的氧化应激指标。实验结果如图 4 所示,与 Con 组相比,Mod 组小鼠心肌组织中 H₂O₂ 和 MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$),SOD 酶活力和 GSH 水平显著降低 ($P < 0.01$);与 Mod 组相比,经 Rut 和高剂量组 Now 处理后,心肌组织中 H₂O₂ 和 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而 GSH 水平和 SOD 酶活力显著升高 ($P < 0.05$)。这些结果表明高剂量 Now 可以显著缓解低压低氧条件下小鼠心肌组织的氧化应激水平。



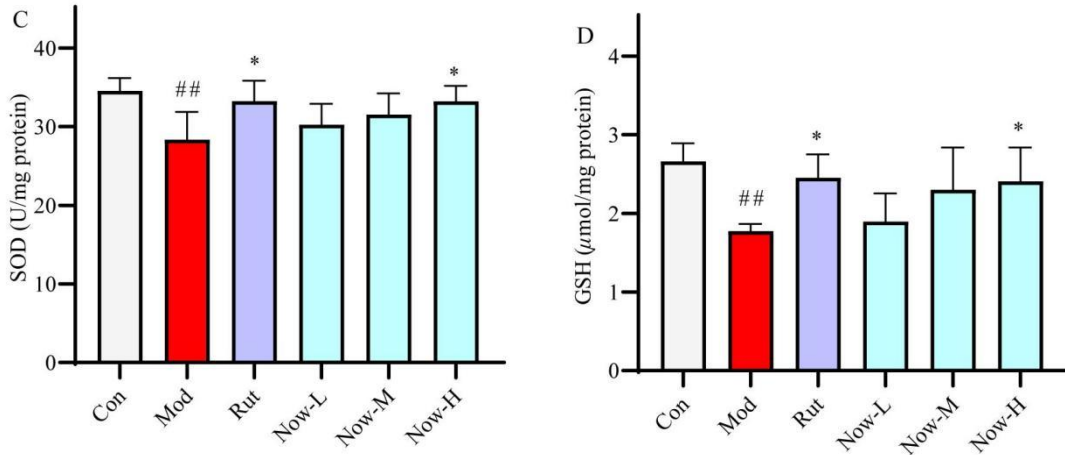


图4 去甲汉黄芩素对低压低氧小鼠心肌组织中氧化应激水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of norwogonin on the levels of oxidative stress in the heart tissue of mice exposed to hypobaric hypoxia ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.4 去甲汉黄芩素对低压低氧小鼠心肌组织中 Nrf2/HO-1 通路相关蛋白表达的影响

为了考察去甲汉黄芩素是否通过 Nrf2/HO-1 通路改善低压低氧诱导的氧化应激损伤,我们对心肌组织中 Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达水平进行检测,结果如图 5 所示,与 Con 组相比,Mod 组小鼠心肌组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达均显著上调 ($P < 0.01$);与 Mod 组相比,中、高剂量 Now 预处理后低压低氧小鼠心肌组织中 Nrf2 和 HO-1 进一步上调 ($P < 0.01$)。

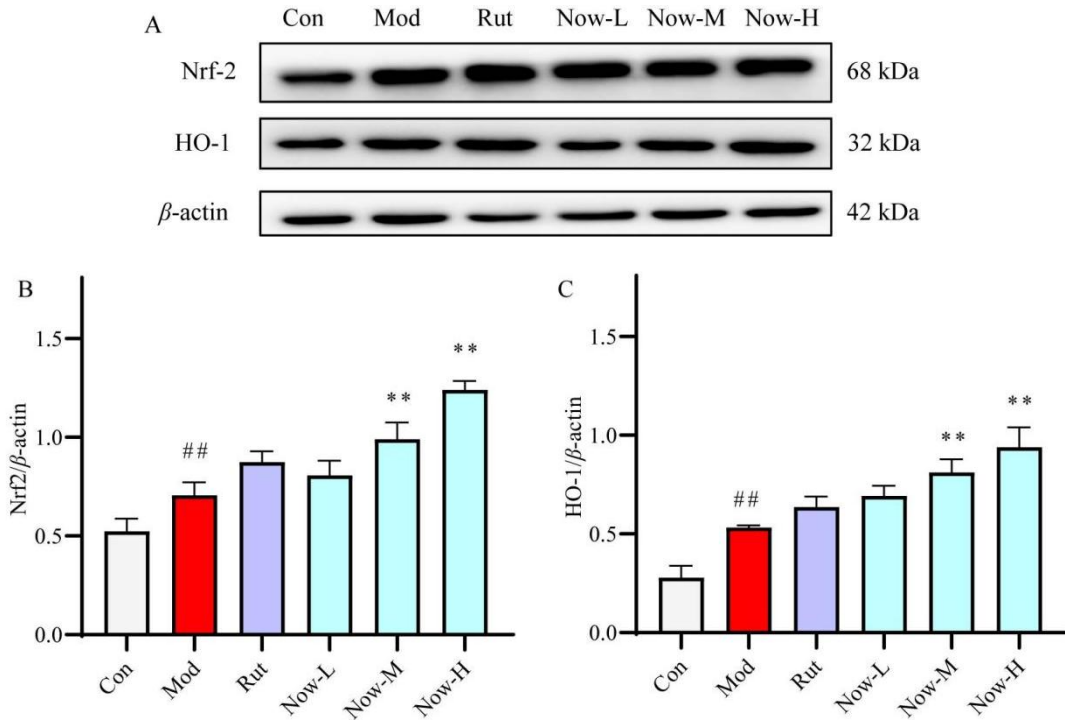


图5 去甲汉黄芩素对低压低氧小鼠心肌组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of norwogonin on the expressions of Nrf2 and HO-1 in the heart tissue of mice exposed to hypobaric hypoxia ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.5 去甲汉黄芩素对急性低压低氧小鼠血清和心肌组织中炎症指标的影响

为了考察去甲汉黄芩素对低压低氧诱导炎症反应的改善作用,我们对血清和心肌组织中炎症因子进行检测。实验结果如图 6 所示,与 Con 组相比,Mod 组小鼠血清和心肌组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量显著升高 ($P < 0.01$);与 Mod 组比较,Rut 组和 Now 低、中、高剂量组小鼠血清中 IL-1 β 和 IL-6 的含量显著降低 ($P < 0.01$),Rut 组和 Now 高剂量组小鼠血清中 TNF- α 含量显著降低。同时,Rut 组和 Now 低、中、高剂量组小鼠心肌组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

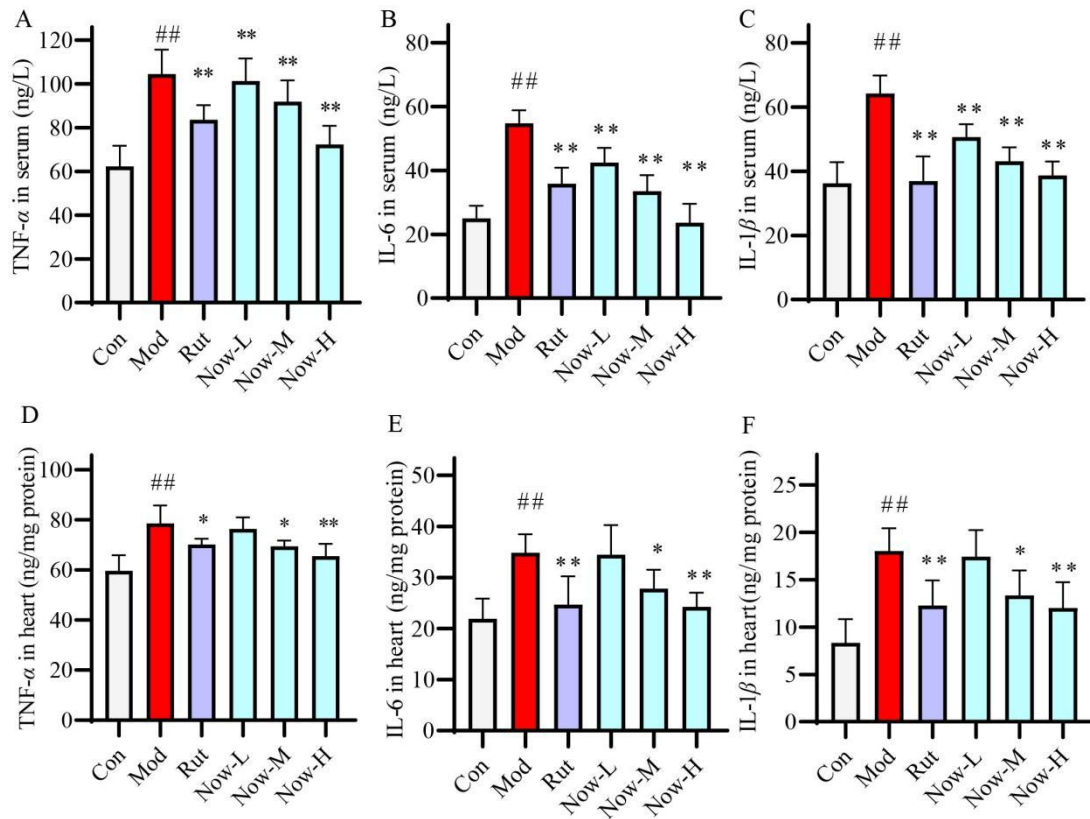
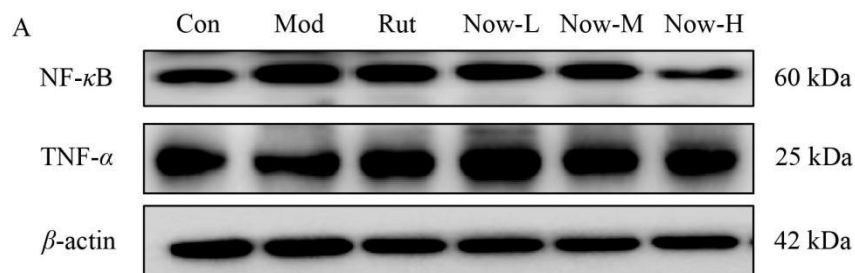


图 6 去甲汉黄芩素对急性低压低氧小鼠血清和心肌组织中炎症指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of norwogonin on the levels of inflammatory factors in the serum and heart tissue of mice exposed to acute hypobaric hypoxia ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

为了进一步明确去甲汉黄芩素对低压低氧诱导炎症反应的作用,我们对心肌组织中 NF- κ B 和 TNF- α 的蛋白表达水平进行检测,结果如图 7 所示,与 Con 组相比,Mod 组小鼠心肌组织中 NF- κ B 和 TNF- α 蛋白表达均显著上调 ($P < 0.01$);与 Mod 组相比,中、高剂量 Now 和 Rut 预处理后低压低氧小鼠心肌组织中 NF- κ B 的表达显著下调 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),高剂量 Now 和 Rut 预处理后低压低氧小鼠心肌组织中 TNF- α 的表达显著下调 ($P < 0.01$)。



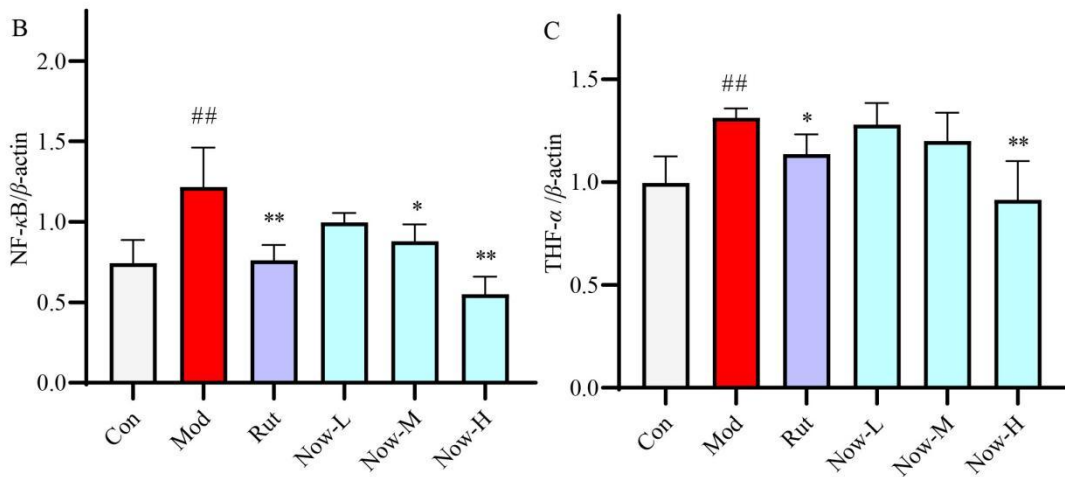
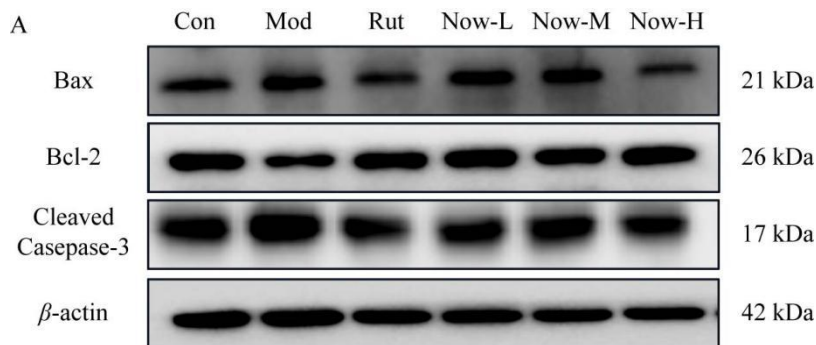


图 7 去甲汉黄芩素对急性低压低氧小鼠心肌组织中炎症蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of norwogonin on the levels of inflammatory related proteins in heart tissue of mice exposed to acute hypobaric hypoxia ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.6 去甲汉黄芩素对低压低氧小鼠心肌组织中凋亡相关蛋白表达的影响

为了考察去甲汉黄芩素对低压低氧诱导凋亡的保护作用,我们对心肌组织中的凋亡相关蛋白表达水平进行检测,结果如图 8 所示,与 Con 组相比,Mod 组小鼠心肌组织中 Bax 和 cleaved Caspase-3 的蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$)、Bax/Bcl-2 比值显著增大 ($P < 0.01$)、Bcl-2 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$); Rut 和高剂量 Now 预处理后低压低氧小鼠心肌组织中的 Bax 和 cleaved Caspase-3 的蛋白表达显著下调 ($P < 0.05, P < 0.01$); Rut 和低、中、高剂量 Now 预处理后低压低氧小鼠心肌组织中的 Bcl-2 蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Bax/Bcl-2 比值显著减小 ($P < 0.01$)。



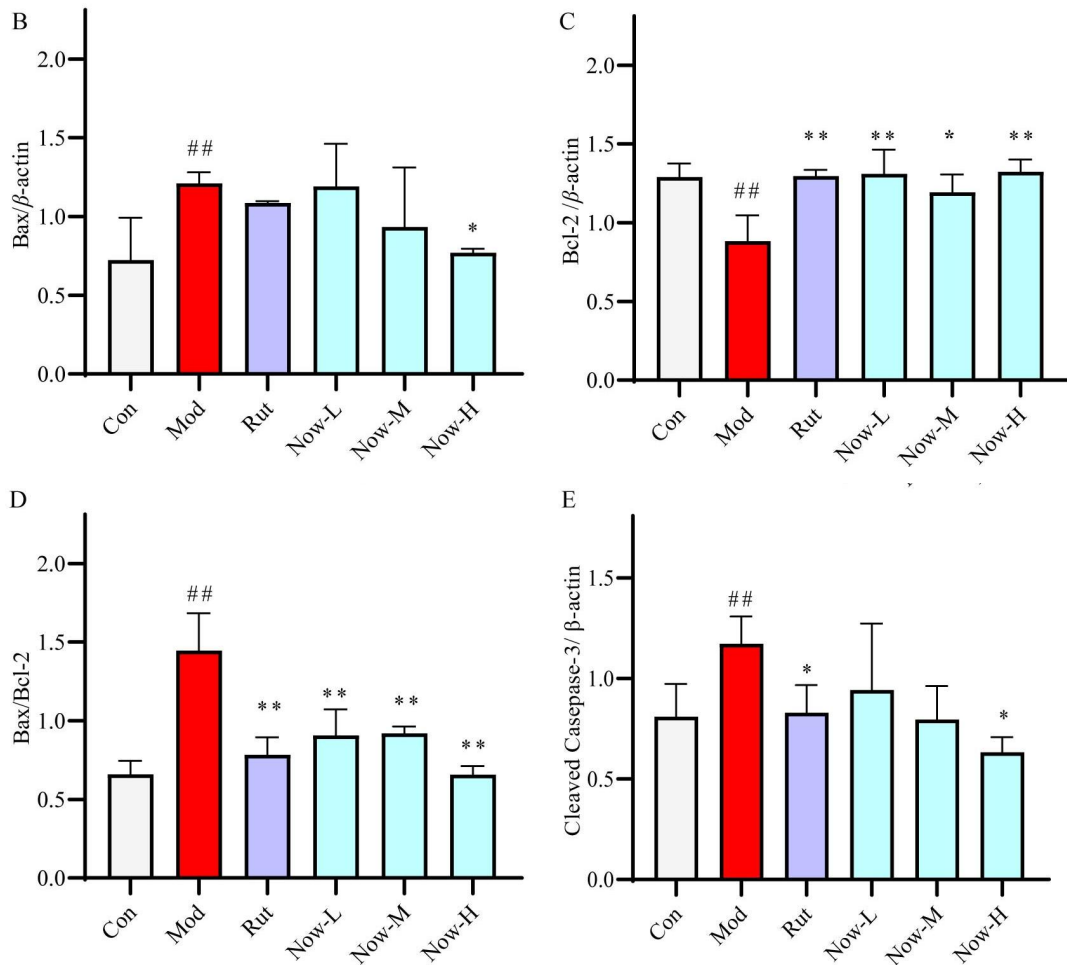


图8 去甲汉黄芩素对低压低氧小鼠心肌组织中凋亡相关蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.8 Effect of norwogonin on the expressions of apoptosis related proteins in the heart tissue of mice exposed to hypobaric hypoxia ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论与结论

近年来,随着奔赴高原人数的增加,低压低氧诱发的急性心肌组织损伤日渐受到关注。高原环境对心血管的影响表现为心率、血压、心输出量和收缩力升高,从而加重心肌损伤^[12]。此外,急性低压低氧暴露还可导致严重的肺动脉高压和充血性心力衰竭,造成心肌不可逆转的损伤^[13]。低压低氧诱发急性心肌组织损伤的作用机制复杂,目前尚未完全阐明。较为公认的作用机制主要有氧化应激和炎症反应。去甲汉黄芩素是一种天然黄酮类化合物,安全性较高,其分子结构中三个酚羟基,具有邻二酚羟基结构,表现出优异的抗氧化和抗缺氧活性^[14]。

本研究首先对去甲汉黄芩素改善低压低氧诱导急性心肌病理损伤的作用进行了考察。HE染色结果表明,Mod组小鼠的心肌出现病理损伤,这与以往的研究结果一致,而去甲汉黄芩素预处理改善低压低氧引起的心脏组织病理变化,表现出较为优异的保护作用。

低氧诱导因子1(HIF-1)是一种异源二聚体转录激活因子,由氧气调节的HIF-1 α 亚基和稳定表达的HIF-1 β 亚基组成,是细胞对低氧反应的主调节因子^[15]。在低氧条件下,HIF-1 α 的高表达可作用于一系列缺氧反应靶基因,包括激活VEGF,而VEGF是调节血管生成和血

管通透性的关键基因^[16]。在我们的研究中，低压低氧显著上调小鼠心肌组织中 HIF-1 α 和 VEGF 的表达，去甲汉黄芩素预处理后小鼠心肌组织中的 HIF-1 α 和 VEGF 的表达水平明显降低。这些结果表明：去甲汉黄芩素可以缓解低压低氧引发小鼠心肌组织的缺氧状态与损伤。

氧化应激已被广泛认为是低压低氧诱导心肌组织损伤的潜在机制之一。在低压低氧条件下，ROS 生成增加，而内源性抗氧化剂，如抗氧化酶（SOD）和非酶抗氧化剂（GSH）的水平降低，从而引发氧化应激^[5]。过量的 ROS 可攻击 DNA、蛋白质和脂质，导致脂质过氧化产物 MDA 的积累，造成细胞损伤甚至死亡^[17]。与之前的研究一致，我们也观察到 Mod 组小鼠心肌中的 H₂O₂ 和 MDA 水平明显升高，SOD 和 GSH 水平明显降低。去甲汉黄芩素预处理明显提高了抗氧化能力，降低了 ROS 积累和脂质过氧化水平。这些结果表明，去甲汉黄芩素能够调节内源性抗氧化防御系统，从而缓解低压低氧小鼠心肌损伤。为了进一步研究去甲汉黄芩素的抗氧化机制，我们测定了心肌组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达水平。Nrf2/HO-1 信号通路被认为是细胞对抗氧化应激的主要防御机制。在刺激条件下，Nrf2 被激活并从细胞质转移到细胞核，通过与抗氧化反应元件(ARE)结合控制下游分子，包括 HO-1。HO-1 具有抗氧化、抗炎和抗凋亡作用，是保护心肌细胞最重要的执行者之一^[18]。激活 Nrf2/HO-1 通路有助于预防 AMS^[19]和低压低氧引起的心肌损伤^[20]。最近的一项研究表明：三七皂苷 R1 通过激活 Keap1/Nrf2 信号通路抑制铁死亡，从而减轻高原心肌损伤^[21]。我们的研究结果也表明，Nrf2 和 HO-1 在 Mod 组小鼠心肌组织中的表达明显上调，这可能是机体对抗低压低氧损伤的代偿性机制^[18]。而去甲汉黄芩素预处理后进一步上调 Nrf2 和 HO-1 的表达，提示去甲汉黄芩素可能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路调控内源性抗氧化系统。

炎症在低压低氧引起的心脏损伤中也发挥关键作用。研究表明，低压低氧会诱导 IL-1、IL-6 和 TNF- α 等细胞因子的释放^[22, 23]。我们的研究也发现：在 Mod 组小鼠血清和心肌组织中，促炎细胞因子 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的水平显著升高，去甲汉黄芩素预处理逆转了这种变化。炎症反应受多种信号通路调控，其中包括 NF- κ B 信号通路。NF- κ B 是介导炎症的重要转录因子，在调节炎症细胞因子的释放方面发挥着重要功能^[24]。抑制 NF- κ B 信号通路和促炎因子的释放对低压低氧引起的损伤有明显的保护作用^[25]。在本研究中，低压低氧暴露后小鼠心脏中 NF- κ B 和 TNF- α 的表达明显增加，而去甲汉黄芩素预处理可降低它们的表达水平。这些结果表明，去甲汉黄芩素能够抑制 NF- κ B 炎症通路的激活和炎性因子的释放，减轻低压低氧引起的炎症反应，作用机制见图 9。

过度的氧化应激和炎症能够诱导细胞凋亡，这也是心肌缺氧损伤的主要机制之一^[25]。为了评价心肌组织中的细胞凋亡水平，我们检测了凋亡相关蛋白的表达水平，包括 Bcl-2、Bax 和 cleaved caspase-3。研究表明，暴露于低压低氧会显著增加小鼠心肌组织中促凋亡蛋白 Bax 和 cleaved Caspase-3 的表达，同时降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达，从而升高 Bax/Bcl-2 比值。这些结果与 Hsu 等^[26]的研究结论一致。而去甲汉黄芩素预处理可明显逆转这些变化，抑制细胞凋亡。

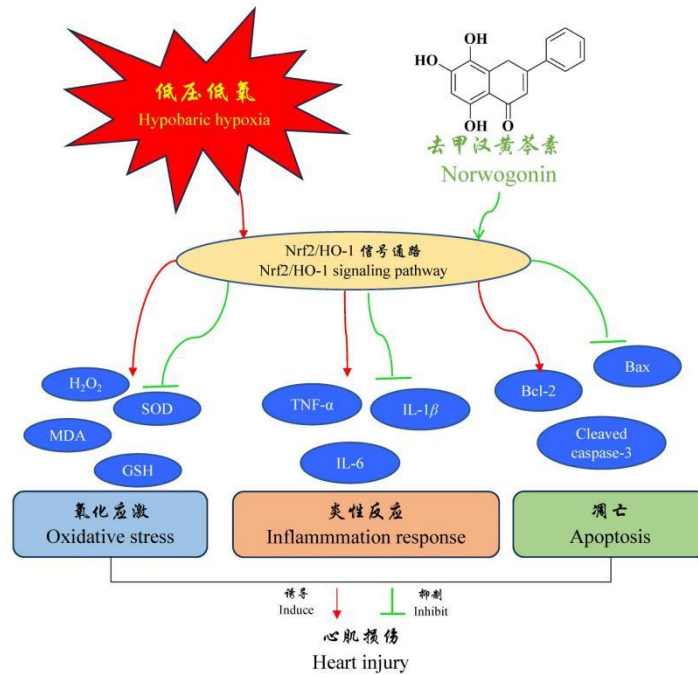


图9 去甲汉黄芩素改善低压低氧诱导小鼠心肌组织损伤的作用机制图

Fig.9 Mechanism of norwogonin in ameliorating acute myocardial tissue injury induced by hypobaric hypoxia in mice

综上所述, 本研究结果表明: 去甲汉黄芩素能够有效缓解高原心肌组织损伤, 其作用机制与其激活 Nrf2/HO-1 信号通路, 从而改善低压低氧诱导的氧化应激、炎症反应和细胞凋亡有关, 有望成为治疗低压低氧诱导心肌损伤的潜在药物。

参考文献

- 1 Luks AM, Swenson ER, Bärtsch P. Acute high-altitude sickness[J]. Eur Respir Rev, 2017, 26: 160096.
- 2 Bilo G, Villafuerte FC, Faini A, et al. Ambulatory blood pressure in untreated and treated hypertensive patients at high altitude: the high altitude cardiovascular research-andes study[J]. Hypertension, 2015, 65: 1266-1272.
- 3 Luks AM, Hackett PH. Medical conditions and high-altitude travel[J]. N Engl J Med, 2022, 386: 364-373.
- 4 He S, He S, Yang Y, et al. Correlation between neutrophil to lymphocyte ratio and myocardial injury in population exposed to high altitude[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 738817.
- 5 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: 601-615.
- 6 Pena E, Brito J, El Alam S, et al. Oxidative stress, kinase activity and inflammatory implications in right ventricular hypertrophy and heart failure under hypobaric hypoxia[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21: 6421.
- 7 Liu ZQ, Luo XY, Sun YX, et al. The antioxidative effect of icariin in human erythrocytes against free-radical-induced haemolysis[J]. J Pharm Pharmacol, 2004, 56: 1557-1562.
- 8 Miyasaki Y, Rabenstein J D, Rhea J, et al. Isolation and characterization of antimicrobial compounds in plant extracts against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. PLoS One, 2013, 8: e61594.
- 9 Choi HJ, Song HH, Lee JS, et al. Inhibitory effects of norwogonin, oroxylin A, and mosloflavone on enterovirus 71[J]. Biomol Ther (Seoul), 2016, 24: 552-558.
- 10 Jing LL, Fan XF, Jia ZP, et al. Convergent synthesis of moslosooflavone, isowogonin and norwogonin from chrysin[J]. Nat Prod Commun, 2015, 10: 387-388.
- 11 Gao LM. The antioxidant and antihypoxia effect of norwogonin[D]. Lanzhou: Lanzhou university (兰州大

学),2014.

- 12 Luks AM,Hackett PH.Medical conditions and high-altitude travel[J].N Engl J Med,2022,386:364-373.
- 13 Garrido E,de Maglia JB,Castillo O.Acute,subacute and chronic mountain sickness[J].Rev Clin Esp,2021,221:481-490.
- 14 Jing LL,Gao RM,Zhang J,et al.Norwogonin attenuates hypoxia-induced oxidative stress and apoptosis in PC12 cells[J].BMC Complement Med Ther,2021,21:18.
- 15 Lee JW,Ko J,Ju C,et al.Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets[J].Exp Mol Med,2019,51:1-13.
- 16 Pérez-Gutiérrez L,Ferrara N.Biology and therapeutic targeting of vascular endothelial growth factor A[J].Nat Rev Mol Cell Biol,2023,24:816-834.
- 17 Wang B,Wang Y,Zhang J,et al.ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome:mechanisms behind apoptosis,autophagy,and ferroptosis[J].Arch Toxicol,2023,97:1439-1451.
- 18 Zhang CY,Hu XC,Zhang GZ,et al.Role of Nrf2 and HO-1 in intervertebral disc degeneration[J].Connect Tissue Res.2022,63:559-576.
- 19 Lisk C,McCord J,Bose S,et al.Nrf2 activation:a potential strategy for the prevention of acute mountain sickness[J].Free Radic Biol Med,2013,63:264-273.
- 20 Jing LL,Shao J,Sun W,et al.Protective effects of two novel nitronyl nitroxide radicals on heart failure induced by hypobaric hypoxia[J].Life Sci,2020,248:116481.
- 21 Jia N,Shen Z,Zhao S,et al.Eleutheroside E from pre-treatment of *Acanthopanax senticosus* (Rupr.et Maxim.) Harms ameliorates high-altitude-induced heart injury by regulating NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis via NLRP3/caspase-1 pathway[J].Int Immunopharmacol,2023,121:110423.
- 22 Wang Y,Yin Y,Liu Y,et al.Notoginsenoside R1 treatment facilitated Nrf2 nuclear translocation to suppress ferroptosis via Keap1/Nrf2 signaling pathway to alleviated high-altitude myocardial injury[J].Biomed Pharmacother,2024,175:116793.
- 23 Liu R,Shao J,Zhao T,et al.Mosloflavone ameliorates high altitude-induced brain injury via inhibiting oxidative stress and inflammation[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2020,32:1413-1418.
- 24 Liu T,Zhang L,Joo D,et al.NF-κB signaling in inflammation[J].Sig Transduct Target Ther,2017,2:17023.
- 25 Pham K,Parikh K,Heinrich EC.Hypoxia and inflammation:insights from high-altitude physiology[J].Front Physiol,2021,12:676782.
- 26 Nehra S,Bhardwaj V,Kar S,et al.Chronic hypobaric hypoxia induces right ventricular hypertrophy and apoptosis in rats:therapeutic potential of nanocurcumin in improving adaptation[J].High Alt Med Biol,2016,17:342-352.
- 27 Hsu SW,Chang TC,Wu YK,et al.*Rhodiola crenulata* extract counteracts the effect of hypobaric hypoxia in rat heart via redirection of the nitric oxide and arginase 1 pathway[J].BMC Complement Altern Med,2017,17:29.

收稿日期: 2024-05-06 接受日期: xxxx-xx-xx

基金项目: 国家自然科学基金项目(81872796); 西安交通大学第一附属医院科研发展基金(2022MS-11); 甘肃省自然科学基金(22JR11RA011)

*通信作者 Tel: 86-931-8994671; E-mail: huipingmacyk@163.com