

藏紫菀总黄酮对模拟高原缺氧小鼠抗氧化能力及细胞凋亡的影响

何 蕾, 马慧萍, 景林临, 蒙 萍, 贾正平

兰州军区兰州总医院 药剂科, 全军高原环境损伤防治重点实验室, 甘肃 兰州 730050

摘 要: **目的** 探讨藏紫菀总黄酮对高原缺氧小鼠抗氧化能力及细胞凋亡的影响。**方法** 采用常压密闭实验筛选藏紫菀总黄酮最佳抗缺氧剂量; 40 只小鼠随机分为对照组、模型组、乙酰唑胺 (200 mg/kg) 组和藏紫菀总黄酮 (500 mg/kg) 组, 模拟海拔 8000 m 高原环境, 减压缺氧 12 h, 测定小鼠脑组织中的过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, Western blotting 法检测 Nrf-2、SOD、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达。**结果** 常压密闭实验中, 藏紫菀总黄酮 500 mg/kg 剂量组小鼠的存活时间最长, 为最佳给药剂量; 与对照组比较, 缺氧后小鼠脑组织中 SOD、CAT、GSH 和 GSH-Px 活性均显著降低, Nrf-2 蛋白表达显著升高, SOD 蛋白表达和 Bcl-2/Bax 比值显著降低 ($P < 0.01$); 经藏紫菀总黄酮预处理后, 小鼠脑组织中 SOD、CAT、GSH 和 GSH-Px 活性均显著升高, Nrf-2、SOD 蛋白表达和 Bcl-2/Bax 比值显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 藏紫菀总黄酮提高高原缺氧小鼠脑组织抗氧化能力, 降低细胞凋亡。**关键词:** 藏紫菀总黄酮; 常压密闭缺氧; 高原缺氧; 抗氧化; 凋亡

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)02-0211-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.02.011

Effects of total flavonoids from *Aster souliei* on hypoxia and apoptosis-associated proteins in brain of mice under hypobaric hypoxia condition

HE Lei, MA Hui-ping, JING Lin-lin, MENG Ping, JIA Zheng-ping

Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Command of PLA; Key Lab of PLA for Prevention and Treatment of Injuries induced by High Altitude, Lanzhou, 730050, China

Abstract: Objective To study the effects of total flavonoids from *Aster souliei* (ASF) on the expression of hypoxia-associated and apoptosis-associated proteins in brain of mice under hypobaric hypoxia condition. **Methods** The best dose of ASF to antihypoxia was determined by closed normobaric hypoxia experiment. Forty BALB/c mice were randomly divided into control group, model group, acetazolamide (200 mg/kg) group, and ASF (500 mg/kg) group. The mice were exposed to a simulated high altitude of 8 000 m for 12 h. After hypoxic exposure, mice were sacrificed and the activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), and reduced glutathione tablets (GSH-Px) in brain were determined. Nrf-2, SOD, Bax, and Bcl-2 were detected by Western blotting. **Results** Compared with control group, the CAT, SOD, GSH, and GSH-Px activity in model group significantly decreased. In addition, the expression of Nrf-2 increased, SOD and Bcl-2/Bax ratio decreased ($P < 0.01$). Prior administration of ASF effectively increased CAT, SOD, GSH, and GSH-Px activity as well as the expression of Nrf-2, SOD, and Bcl-2/Bax ratio ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** ASF can improve the ability of anti-oxidant enzymes, alleviate oxidative stress as well as inhibit myocardial apoptosis of mice under hypobaric hypoxia condition.

Key words: total flavonoids from *Aster souliei*; closed normobaric hypoxia; high altitude anoxia; anti-oxidant; apoptosis

高原地区占我国领土面积的三分之一, 其特有的低压低氧环境给急进高原的人们带来了许多疾病危害。主要因为高原上机体无法获得足够量的氧气, 从而使初入高原者极易出现急性高原反应 (acute mountain sickness, AMS), 继而可能出现脑水肿和

肺水肿, 导致死亡^[1]。而碳酸酐酶抑制剂乙酰唑胺是美国 FDA 唯一批准用于防治 AMS 的药物, 可以明显改善气体交换和运动效率, 减轻 AMS, 但明显的毒副作用限制了其广泛应用^[2]。国内长期用红景天制剂预防 AMS, 但最新的临床研究表明, 红景天

收稿日期: 2016-01-21

基金项目: 全军医药卫生科研基金课题 (CLZ11JA06); 甘肃省自然科学基金 (1107RJZA100)

作者简介: 何 蕾, 女, 硕士, 研究方向为抗高原缺氧新药。Tel: (0931)8994671 E-mail: helei800@163.com

*通信作者 马慧萍, 女, 教授, 研究生导师, 研究方向为抗高原环境损伤防护研究。Tel: (0931)8994652 E-mail: 360089525@qq.com

的提取物对 AMS 无预防效果^[3]。因此,开发新型的抗高原缺氧的药物具有重要的意义。

AMS 发病机制复杂,但目前公认缺氧是其重要的诱发因素之一。缺氧可抑制线粒体中的电子传递,改变电子载体中的氧化还原电位,增加活性氧(ROS)的产生,引起组织细胞发生氧化损伤而导致凋亡,因此,防止细胞氧化损伤是防治 AMS 发生的有效策略^[4]。研究证明,藏紫菀总黄酮具有良好的体外抗氧化作用和体内抗缺氧活性^[5-6]。本研究首先采用常压密闭缺氧实验对藏紫菀总黄酮进行剂量筛选,选择最佳实验结果剂量,随后采用小型低压低氧动物实验舱模拟高原低压性缺氧环境,进一步研究其对高原缺氧小鼠脑组织抗氧化蛋白和凋亡蛋白水平的影响,探讨其抗缺氧的可能机制。

1 材料

1.1 药物与主要试剂

藏紫菀,购自拉萨当雄商贸有限公司,经兰州大学药学院生药学研究所杨永建教授鉴定为菊科紫菀属植物缘毛紫菀 *Aster souliei* Franch. 的干燥花序。藏紫菀总黄酮为实验室自制,制备工艺为:取适量藏紫菀药材,加 12 倍量水,提取 2 次,每次提取 2 h, 60 °C 真空干燥。藏紫菀总黄酮质量分数可达到 29.70%,批号 20150107。

乙酰唑胺(批号 100114),购自武汉远城科技发展有限公司;BCA 法蛋白定量、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、还原型谷胱甘肽(GSH)和超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所;Nrf-2、SOD、Bax 和 Bcl-2 兔单克隆抗体,均购自 abcam 公司;β-actin 山羊抗小鼠单克隆抗体、IgG/辣根酶标记抗体和辣根标记山羊抗兔 IgG,均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;ECL 超敏发光液,购自美国 Sigma 公司。

1.2 主要仪器

FLYDWC50-IIIC 低压低氧动物实验舱(贵州风雷航空军械有限公司);DK-8A 型电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司);冷冻高速离心机(德国赫利氏公司);Spectramax i3 多功能酶标仪(Molecular Devices 公司);Tanon-4200SF 数码凝胶图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

1.3 动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠,体质量(20±2)g,由兰州军区兰州总医院动物实验科提供,生产许可证号 SCXK(军)2014-0029。温度 21~23 °C、湿

度 45%~65%、12 h 明暗周期饲养,全价颗粒饲料喂养,自由进食和饮水。

2 方法

2.1 常压密闭缺氧实验

将 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠随机分成 5 组,模型组,乙酰唑胺(200 mg/kg)组,藏紫菀总黄酮低、中、高剂量(300、500、700 mg/kg)组,每组 10 只。ig 给药,模型组给予同等体积生理盐水,50 min 后将小鼠放入 250 mL 广口瓶中(瓶中事先放入 5 g 碱石灰,用于吸收二氧化碳和水,在瓶底放入适量滤纸吸取尿液与粪便),在瓶口涂抹凡士林进行密闭,随后开始计时,当小鼠呼吸停止时结束计时,记录小鼠在密闭实验瓶中的存活时间。

2.2 高原低压缺氧脑损伤模型的制备

随机数字表法将小鼠分为对照组、模型组、乙酰唑胺(阳性药,200 mg/kg)组、藏紫菀总黄酮(500 mg/kg)组,每组 10 只,ig 给药,对照组和模型组给予等体积生理盐水。给药 50 min 后,除对照组外,将其余 3 组小鼠置于低压低氧动物实验舱中,以 10 m/s 的速度升至海拔 8 000 m,并维持 12 h,随后快速将实验舱中气压升至与外界大气压相同,将小鼠取出实验舱后,立刻脱臼处死,取脑组织。

2.3 抗氧化酶活性测定

取小鼠脑组织样本,称质量后加入 9 倍冰生理盐水,使用组织匀浆器在冰水浴中匀浆,4 °C、3 500 r/min 离心 10 min,取上清,-20 °C 保存,用作抗氧化酶指标 CAT、SOD、GSH-Px、GSH 水平测定,具体操作严格按照相关试剂盒说明书进行。

2.4 氧化和凋亡相关蛋白表达水平的测定

取小鼠脑组织样本,称质量后加入 9 倍冰生理盐水,使用组织匀浆器在冰水浴中匀浆,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清,采用 BCA 法计算蛋白浓度。蛋白样品中加入 4×上样缓冲液,沸水煮 15 min,-20 °C 保存备用。进行 Western blotting 实验,取 30 μg 样品上样,采用 5% SDS-PAGE 浓缩胶、10% SDS-PAGE 分离胶进行分离,湿法将蛋白转至硝酸纤维素膜上,5%脱脂牛奶封闭 2 h 后,加入一抗,包括 Nrf-2、SOD、Bcl-2 和 Bax(1:500)和 β-actin(1:1000),4 °C 过夜,TBST 缓冲液漂洗 3 次,每次 10 min。加入二抗,除 β-actin 蛋白使用山羊抗小鼠 IgG/辣根酶标记抗体(1:2 000),其余均用辣根标记山羊抗兔 IgG(1:5 000),室温孵育 2 h,化学发光法显色,Tanon-4200SF 全

自动数码凝胶图像分析系统曝光,灰度值用Image-Pro Plus 6.0 软件扫描测定。

2.5 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,两间组均值比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 对常压密闭缺氧小鼠存活时间的影响

为了考察藏紫苑总黄酮的最佳有效剂量,本研究通过常压密闭实验对小鼠的存活时间进行了考察。与模型组比较,乙酰唑胺和藏紫苑总黄酮中、高剂量组均能显著地延长小鼠的存活时间 ($P < 0.01$),其中藏紫苑总黄酮中剂量组小鼠的存活时间最长,为最佳给药剂量。结果见表 1。

表 1 藏紫苑总黄酮对常压密闭缺氧小鼠存活时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of ASF on survival time of mice under closed normobaric hypoxia ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	存活时间/min	延长率/%
模型	—	30.09 ± 3.78	—
乙酰唑胺	200	38.24 ± 2.46**	27.09
藏紫苑总黄酮	300	34.80 ± 8.30	15.65
	500	49.30 ± 8.50**	63.84
	700	40.80 ± 4.50**	35.59

与模型组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs model group

表 2 藏紫苑总黄酮对高原缺氧小鼠脑组织 CAT、SOD 和 GSH-Px 活性、GSH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of ASF on CAT, SOD, and GSH-Px activity, GSH levels in brain of mice under hypobaric hypoxia condition ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	CAT/(U·g ⁻¹)	SOD/(U·g ⁻¹)	GSH/(mmol·g ⁻¹)	GSH-Px/(U·g ⁻¹)
对照	—	125.69 ± 8.56	127.72 ± 12.03	90.68 ± 8.67	90.68 ± 8.27
模型	—	87.57 ± 11.18 ^{##}	98.77 ± 4.57 ^{##}	79.08 ± 7.40 ^{##}	71.08 ± 7.04 ^{##}
乙酰唑胺	200	94.79 ± 7.32	108.21 ± 8.99	167.76 ± 6.11**	165.76 ± 6.71**
藏紫苑总黄酮	500	118.91 ± 13.31**	139.16 ± 10.68**	140.91 ± 9.91**	148.91 ± 9.19**

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group

3.2 对脑组织 CAT、SOD 和 GSH-Px 活性、GSH 水平的影响

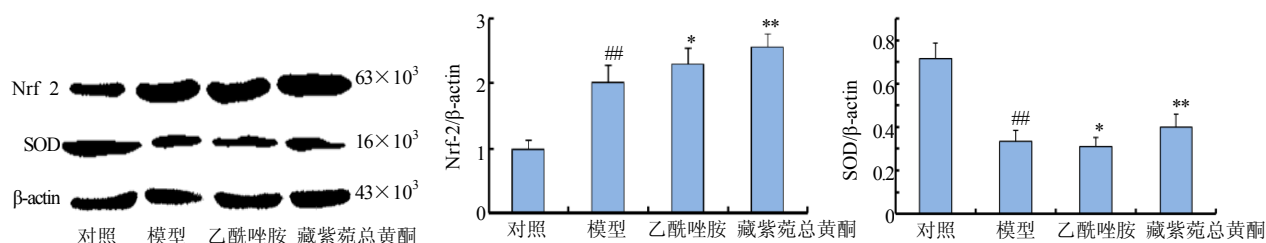
与对照组比较,模型组 CAT、SOD 和 GSH-Px 活性, GSH 水平均显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较,乙酰唑胺组 CAT 和 SOD 活性有升高趋势,但差异不显著,而藏紫苑总黄酮显著提高 CAT 和 SOD 活性 ($P < 0.01$); 乙酰唑胺和藏紫苑总黄酮组小鼠脑组织中 GSH 和 GSH-Px 活性均显著升高 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

3.3 对脑组织 Nrf 2、SOD 蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组小鼠脑组织中 Nrf 2 的蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), SOD 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$); 乙酰唑胺可明显升高脑组织中 Nrf 2 蛋白表达 ($P < 0.05$), 藏紫苑总黄酮可明显升高脑组织中 Nrf 2 和 SOD 蛋白表达 ($P < 0.01$)。结果见图 1。

3.4 对凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达的影响

与对照组比较,模型组 Bcl-2/Bax 蛋白比值显著降低 ($P < 0.01$), 说明急性减压缺氧可以造成小鼠脑组织细胞凋亡; 给予藏紫苑总黄酮后, 脑组织中 Bcl-2/Bax 蛋白比值显著升高 ($P < 0.01$), 说明藏紫苑总黄酮具有抗细胞凋亡的作用。结果见图 2。



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

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图 1 藏紫苑总黄酮对高原缺氧小鼠脑组织抗氧化相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of ASF on anti-oxidation associated proteins in brain of mice under hypobaric hypoxia condition ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

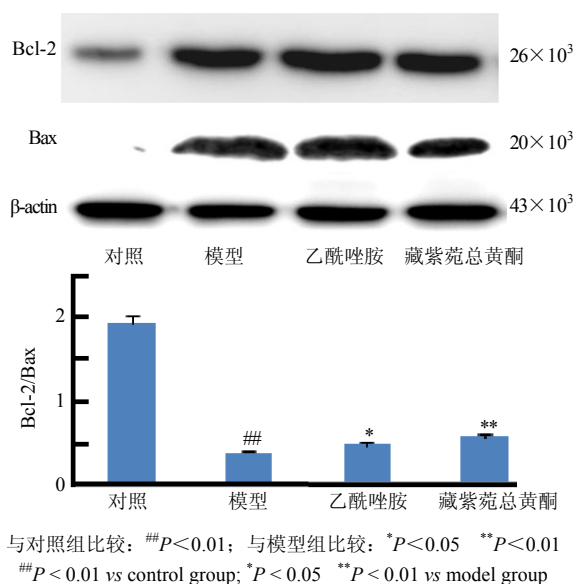


图2 藏紫苑总黄酮对高原缺氧小鼠脑组织中凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 2 Effect of ASF on apoptosis-associated proteins in brain of mice under hypobaric hypoxia condition ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

脑是机体主要的耗氧器官之一,脑组织对低压低氧环境极其敏感。缺氧能够引起脑组织中的自由基代谢失衡,产生的HO 损害膜磷脂不饱和酸,使磷脂降解生成花生四烯酸,后者在级联反应中产生更多的自由基,上述过程循环往复,加重脑组织损害,从而导致记忆损伤,思维反应迟缓,严重时可出现脑水肿危及生命^[7-9]。本课题组前期发现藏紫苑总黄酮具有良好的体外清除自由基作用以及体内良好的抗缺氧作用,但是作用机制尚不明确。

缺氧诱导脑组织产生大量自由基,如果不能及时处理,就会导致机体产生氧化应激损伤^[10]。而SOD、CAT、GSH 和 GSH-Px 是机体内主要的抗氧化酶系,对机体的氧化和抗氧化平衡起着重要的作用,帮助机体清除自由基,保护细胞免受损伤^[11]。研究结果显示,高原缺氧模型小鼠脑组织中SOD、CAT、GSH 和 GSH-Px 活性显著降低,说明机体氧化应激产生大量ROS,抑制SOD、CAT、GSH 和 GSH-Px 活性。与模型组比较,藏紫苑总黄酮显著提高小鼠脑组织中SOD、CAT、GSH 和 GSH-Px 活性,改善低压低氧所致的氧化应激失调,维持脑组织中的氧化和抗氧化平衡。

研究发现,核因子2 (NF-E2) 相关因子 (Nrf 2)

是调控细胞对抗氧化损伤的关键转录因子, Nrf 2 在氧化应激性疾病中起着重要的调控作用^[12]。Nrf 2 的激活可诱导一系列内源性抗氧化酶和抗氧化蛋白上调,这些酶类和蛋白可催化自由基转化为无毒物质并增加其水溶性,协同加强细胞清除自由基的防御系统,维持细胞内还原电位^[13-14]。实验结果表明,与对照组比较,模型组小鼠脑组织中 Nrf 2 显著升高, SOD 显著降低,说明在氧自由基的刺激下,机体产生相应的抗氧化调节, Nrf 2 降解减少,相对水平升高,但大量的氧自由基仍消耗了大量 SOD。与模型组比较,藏紫苑总黄酮组 Nrf 2 水平显著升高, SOD 水平显著升高,说明藏紫苑总黄酮可以促进 Nrf 2 的产生,从而刺激机体产生更多的 SOD。结果表明,藏紫苑总黄酮可能通过 Nrf 2-ARE 通路防治急性高原病。

ROS 是细胞内重要的第二信使,在细胞基因调控“信号转导”过程中发挥重要生理功能。大量 ROS 可诱导前列腺素等细胞因子释放,导致细胞的损伤和凋亡。大量文献报道缺氧会造成细胞凋亡,其可能原因就是缺氧诱导大量 ROS 产生^[15]。Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 家族的关键蛋白,在凋亡途径中发挥着截然相反的作用。其中 Bcl-2 被称为抗凋亡蛋白,能够通过抑制细胞色素 c 的释放抑制凋亡,而 Bax 被称为促凋亡蛋白,其过度表达能够促进细胞凋亡^[16]。通过 Bcl-2/Bax 比率可以反映细胞凋亡的趋势。与对照组比较,模型组比值降低,说明缺氧造成细胞凋亡。藏紫苑总黄酮组比值显著升高,说明藏紫苑总黄酮在抑制细胞缺氧凋亡方面有一定的药理作用。

综上所述,藏紫苑总黄酮对缺氧造成的损伤具有缓解作用,与升高体内抗氧化酶 CAT、SOD、GSH 和 GSH-Px 活性、激活 Nrf 2 信号通路有关,同时,通过抑制促凋亡蛋白 Bax、激活抗凋亡蛋白 Bcl-2,发挥抗凋亡作用。

参考文献

- [1] Carod-Artal F J. High-altitude headache and acute mountain sickness [J]. *Neurologia*, 2014, 29(9): 533-540.
- [2] Wang J, Ke T, Zhang X, et al. Effects of acetazolamide on cognitive performance during high-altitude exposure [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2013, 35: 28-33.
- [3] 齐跃, 符婷, 房加雄, 等. 红景天预防急性高原反应的系统评价 [J]. *武警后勤学院学报(医学版)*, 2016, 01: 41-44.
- [4] 马慧萍, 姚娟, 吴金华, 等. 大苞雪莲石油醚部位对

- 缺氧大鼠脑组织的保护作用及其机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(14): 2710-2715.
- [5] 姚 娟, 马慧萍, 贾正平. 藏紫苑的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 9(17): 286-289.
- [6] 马慧萍, 姚 娟, 吴金华, 等. 大苞雪莲石油醚部位对缺氧大鼠脑组织的保护作用及其机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(14): 2710-2715.
- [7] Wu Y C, Wang Y J, Tseng G F. Ascorbic acid and alpha-tocopherol supplement starting prenatally enhances the resistance of nucleus tractus solitarius neurons to hypobaric hypoxic challenge [J]. *Brain Struct Funct*, 2011, 216(2): 105-122.
- [8] Karle F J 3rd, Auerbach P S. Migraine headache confounding the diagnosis of acute mountain sickness [J]. *Wilderness Environ Med*, 2014, 25(1): 60-68.
- [9] Fan P C, Ma H P, Jing L L, *et al.* The antioxidative effect of a novel free radical scavenger 4'-hydroxyl-2 -substituted phenylnitronyl nitroxide in acute high-altitude hypoxia mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36(6): 917-924.
- [10] Singh M, Shukla D, Thomas P, *et al.* Hypoxic preconditioning facilitates acclimatization to hypobaric hypoxia in rat heart [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 62(12): 1729-1739.
- [11] Castillo R L, Zepeda A B, Short S E, *et al.* Protective effects of polyunsaturated fatty acids supplementation against testicular damage induced by intermittent hypobaric hypoxia in rats [J]. *J Biomed Sci*, 2015, 22(1): 8.
- [12] Lisk C, McCord J, Bose S, *et al.* Nrf 2 activation: A potential strategy for the prevention of acute mountain sickness [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 63:264-273.
- [13] Kolamunne R T, Dias I H, Vernallis A B, *et al.* Nrf 2 activation supports cell survival during hypoxia and hypoxia/reoxygenation in cardiomyoblasts; the roles of reactive oxygen and nitrogen species [J]. *Redox Biol*, doi: 10.1016/j.redox.2013.08.002. eCollection 2013.
- [14] Niture S K, Jaiswal A K. Nrf 2-induced antiapoptotic Bcl-xL protein enhances cell survival and drug resistance [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 57: 119-131.
- [15] Li X, Zhao L, Yue L, *et al.* Evidence for the protective effects of curcumin against oxyhemoglobin-induced injury in rat cortical neurons [J]. *Brain Res Bull*, 2016 Jan; 120:34-40.
- [16] Frenzel A, Grespi F, Chmielewski W, *et al.* Bcl-2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(4): 584-596.