

基于蛋白质组学技术探讨7-羟乙基白杨素防治高原脑水肿的作用靶点

张冬梅, 李晓琳, 杨陈煜, 景临林, 何 蕾, 马慧萍

中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院药剂科 全军高原医学实验室, 甘肃兰州 730050

[摘 要] **目的:**研究7-羟乙基白杨素(7-HEC)治疗大鼠高原脑水肿的作用靶点及机制。**方法:**54只雄性Wistar大鼠随机分为正常对照组、模型对照组和7-HEC组, 每组18只。后两组于实验第4天置于模拟7000 m海拔的大型低压低氧舱持续暴露72 h建模。7-HEC组于建模前三天起每日腹腔注射7-HEC($150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), 模型对照组注射等量等渗氯化钠溶液。运用串联质谱标签定量蛋白质组学技术检测并筛选差异表达蛋白, 筛选标准为表达倍数变化1.2倍以上且 $P<0.05$ 。采用蛋白质印迹法对差异表达蛋白进行验证, 并对其进行基因本体(GO)富集分析、京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析和蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析。**结果:**与正常对照组比较, 模型对照组有256个差异表达蛋白;与模型对照组比较, 7-HEC组有87个差异表达蛋白。19个在模型对照组中差异表达的蛋白质在7-HEC干预后得到纠正, 其中7个(HSPA4、Arhgap20、SERT、HACL1、CCDC43、POLR3A和PCBD1)经蛋白质印迹法得到验证。对模型对照组与7-HEC组差异表达的蛋白质进行GO富集分析显示, 差异表达蛋白共涉及13个生物学过程、5个细胞组分和2个分子功能;KEGG富集分析表明, 差异表达蛋白与mRNA监测信号通路、Th17细胞分化、5-羟色胺能突触、RNA聚合酶、内质网中的蛋白质加工、过氧化物酶体、神经活性配体-受体相互作用、叶酸合成等信号通路有关。PPI网络分析结果显示, 经蛋白质印迹法验证的差异表达蛋白HSPA4、POLR3A、HACL1与多个信号通路相关, 其度值排名前二十, 提示其可能为核心调控因子;Arhgap20、SERT和PCBD1也与多个蛋白质发生相互作用, 可能是参与调控的关键蛋白质;未发现CCDC43与其他蛋白质相互作用。**结论:**筛选出7-HEC防治高原脑水肿的7个潜在靶点可能通过维持细胞稳态、改善氧化应激、调节能量代谢和降低血管通透性等途径参与高原脑水肿形成。



收稿日期(Received):2024-06-29 修改返回日期(Revised):2025-05-28 接受日期(Accepted):2025-06-25 网络预发表日期(Online):2025-07-21

基金项目(Funding):甘肃省科技计划(22JR11RA014);军队卫勤保障能力创新与生成专项计划(21WQ045);甘肃省卫生健康行业科研项目(GSWSKY2022-46);第九四〇医院内科科研项目(2021yxky046, 2022yxky004, 2023yxky028)

第一作者(First author):张冬梅, 主管药师, 主要从事高原缺氧损伤分子机制研究;E-mail:835935150@qq.com;ORCID:0000-0002-5708-8387

通信作者(Corresponding author):马慧萍, 主任药师, 教授, 硕士生导师, 主要从事高原缺氧损伤机制及新药研究;E-mail:mahui ping2022@aliyun.com;ORCID:0000-0003-4560-2155

[关键词] 高原脑水肿;7-羟乙基白杨素;差异表达蛋白;蛋白质组学;串联质谱
标签;生物信息学;大鼠

[中图分类号] R965.1 [文献标志码] A

Study on the targets and mechanisms of 7-hydroxyethyl chrysin in prevention and treatment of high-altitude cerebral edema using proteomics technology

ZHANG Dongmei, LI Xiaolin, YANG Chenyu, JING Linlin, HE Lei, MA Huiping
(Department of Pharmacy, the 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army, Key Laboratory of Plateau Medicine, Lanzhou 730050, China)
Corresponding author: MA Huiping, E-mail: mahuiping2022@aliyun.com, ORCID: 0000-0003-4560-2155

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the targets and mechanisms of 7-hydroxyethyl chrysin (7-HEC) in prevention and treatment of high-altitude cerebral edema (HACE) in rats. **Methods:** Fifty-four male Wistar rats were randomly divided into normal control group, HACE model group, and 7-HEC-treated group (18 rats in each group). Except for the normal control group, rats in the two other groups were exposed to a hypobaric hypoxic chamber simulating a 7000 m altitude for 72 h to establish the HACE model. The 7-HEC-treated group was intraperitoneally injected with 7-HEC ($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) for 3 consecutive days before modeling, while the model group received equivalent isotonic sodium chloride solution. Tandem Mass Tag (TMT) proteomics technology was used to detect differentially expressed proteins (DEPs) with screening criteria set at a fold change >1.2 and $P < 0.05$. Western blotting was used to verify the expression levels of target proteins. Gene Ontology (GO) enrichment analysis, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis, and protein-protein interaction (PPI) network analysis were performed. **Results:** Compared with the normal control group, 256 DEPs were identified in the HACE model group. Compared with the HACE model group, 87 DEPs were identified in the 7-HEC-treated group. Among them, 19 DEPs that were dysregulated in the HACE model group were restored after 7-HEC intervention, of which seven (HSPA4, Arhgap20, SERT, HACL1, CCDC43, POLR3A, and PCBD1) were confirmed by Western blotting. GO enrichment analysis of the DEPs between the HACE model and 7-HEC-treated groups revealed their involvement in 13 biological processes, five cellular components, and two molecular functions. KEGG pathway analysis indicated associations with the mRNA surveillance pathway, Th17 cell differentiation, serotonergic synapse, RNA polymerase, protein processing in the endoplasmic reticulum, peroxisome, neuroactive ligand-receptor interaction, folate biosynthesis. PPI network analysis demonstrated that HSPA4, POLR3A, and HACL1, which were validated by Western blotting, interacted with multiple signaling pathways and ranked among the top 20 hub proteins by degree value, suggesting their potential role as core regulatory factors. Arhgap20, SERT and PCBD1 also exhibited interactions with several proteins, suggesting their potential as key regulatory proteins, whereas no interactions for CCDC43 were identified. **Conclusions:** This study applied TMT proteomics to identify seven potential

therapeutic targets of 7-HEC for the prevention and treatment of HACE. These targets may be involved in the pathogenesis of HACE through multiple pathways, including maintaining cellular homeostasis, ameliorating oxidative stress, regulating energy metabolism, and reducing vascular permeability.

[**Key words**] High-altitude cerebral edema; 7-Hydroxyethyl chrysin; Differentially expressed proteins; Proteomics; Tandem mass tags; Bioinformatics; Rats

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2025, 54(4): 549-558.]

[**缩略语**] 7-羟乙基白杨素(7-hydroxyethyl chrysin, 7-HEC); 串联质谱标签(tandem mass tags, TMT); 5-羟色胺转运体(serotonin transporter, SERT); 热休克蛋白家族A(heat shock protein family A, HSPA); 蝶呤-4 α -甲醇胺脱水酶(pterin-4 α -carbinolamine dehydratase, PCBD); 2-羟酰基辅酶A裂解酶(2-hydroxy phytanoyl CoA lyase, HACL); 卷曲螺旋结构域蛋白(coiled-coil domain-containing, CCDC); Rho GTP酶激活蛋白(Rho GTPase-activating proteins, Arhgap); RNA聚合酶Ⅲ亚基A(RNA Polymerase Ⅲ Subunit A, POLR3A); 苏木精-伊红染色(hematoxylin and eosin staining, HE染色); 伊文思蓝(Evans blue, EB); 十二烷基硫酸钠(sodium dodecylsulfate, SDS); 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT); 二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA); 主成分分析法(principal component analysis, PCA); 基因本体(Gene Ontology, GO); 京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG); 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI); 含吐温-20的Tris缓冲液(Tris buffered saline with Tween-20, TBST); 信使RNA(messenger RNA, mRNA); 辅助性T细胞(helper T cell, Th细胞); 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)

高原环境具有低压、低氧、低温、低湿度和强紫外线辐射的特点,长期生活在平原的人进入高原后极易发生急性高原病^[1]。近年来,前往高原地区的人数不断增加,因快速进入高海拔地区而面临急性高原病风险的人数也随之上升。大脑作为人体的高耗氧器官,对高海拔、低压、缺氧环境极为敏感,快速进入高海拔地区过程中易频发急性低压缺氧反应,这是诱发急性高原病的重要因素^[2-3]。高原脑水肿是一种急性重症高原病,其临床症状主要为严重神经、精神症状,包括神志昏迷、共济失调等。该病好发于急速进入海拔4500~5500 m高原的人群,具有病情发展迅猛的特点,若未及时干预,患者可在24 h内出现昏迷,病死率极高^[4]。由于高原脑水肿的发病机制复杂,目前尚无特异性治疗药物,常用治疗药物包括地塞米松、乙酰唑胺和甘露醇等,但这些药物存在全身性不良反应风险^[5-6]。

研究发现,中药的一些有效成分可以缓解高

原脑水肿,减轻低压和缺氧环境引发的氧化应激,如银杏叶提取物、槲皮素和经过修饰改造的黄酮类化合物等^[7-8]。7-HEC是一种由天然化合物白杨素经结构修饰获得的新型衍生物,具有良好的抑制氧化应激和神经元凋亡、改善脑水肿和认知功能等药理作用^[9]。本课题组最新研究表明,7-HEC具有良好的抗高原脑水肿作用^[10],但具体机制尚不明确。本研究采用基于TMT标记的高通量定量蛋白质组学分析技术筛选7-HEC抗高原脑水肿的差异表达蛋白谱,通过生物信息学方法从中筛选出差异表达的蛋白质以及对应的信号通路和关键分子,并采用蛋白质印迹法验证了筛选出的部分关键差异蛋白质的表达,为进一步探讨7-HEC抗高原脑水肿的治疗靶点提供线索。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂和仪器

TMT10plex™ 同量异位标记试剂和试剂盒

(90111)为美国 ThermoFisher Scientific 公司产品;抗 SERT 抗体[EPR12735](ab181034)、抗 HSPA4 抗体(ab244315)、重组抗 PCBD1 抗体[EPR9760(B)](ab138518)、重组抗 HACLI 抗体[EPR16812](ab197025)、CCDC43 抗体(bs-8132R)、Arhgap20 抗体(bs-4271R)为中国北京博奥森生物技术有限公司产品;POLR3A 抗体(GTX106241)为美国 GeneTex 公司产品;山羊抗兔(ZB-2307)、山羊抗鼠(ZB-2305)、 β -肌动蛋白(TA-09)为中国北京中杉金桥生物技术有限公司产品。

超高效液相色谱仪 ACQUITY UPLC 和 BEH C18 色谱柱(1.7 μm , 2.1 mm $\times$ 150 mm)为美国 Waters 公司产品;液相色谱系统(EASY-nLCTM 1200 系统)、Q ExactiveTM 组合型四极杆 OrbitrapTM 质谱仪和 PepMapTM 100 C18 LC 色谱柱(2.0 μm , 75 μm $\times$ 25 cm)为美国 ThermoFisher Scientific 公司产品;SpectraMax i3 全自动荧光酶标仪为美国 Molecular Devices 公司产品;FLYDWC20-II A 大型低压低氧动物实验舱为中国贵州风雷航空军械有限责任公司产品。

1.2 动物分组及处理

无特定病原体级雄性 Wistar 成年大鼠(体重 180~200 g)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)2012-0020]。所有动物在室温 18~25 $^{\circ}\text{C}$ 下进行为期 7 d 的适应性饲养。

将 54 只大鼠随机分为正常对照组、模型对照组和 7-HEC 组,每组 18 只。所有大鼠在实验期间均正常摄食和饮水,其中正常对照组大鼠正常饲养,7-HEC 组每日腹腔注射 7-HEC (150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),模型对照组每日腹腔注射等量等渗氯化钠溶液。除正常对照组外,其余两组于实验第 4 天置于模拟 7000 m 海拔的大型低压低氧动物实验舱内持续饲养 72 h,舱内温度控制为 12 $^{\circ}\text{C}$ (8:00—20:00)、2 $^{\circ}\text{C}$ (20:00—次日 8:00)。

1.3 干湿重法检测脑含水量

实验第 7 天,每组各取大鼠 9 只,使用 10% 水合氯醛溶液腹腔注射麻醉(0.3 mL/200 g)。麻醉后迅速解剖,摘取大脑并分为左右两个半脑,右侧脑组织冻存于液氮中备用。取左侧脑组织用精密电子天平快速称重,用于检测脑含水量。具体操作:冰上快速剥离大脑,滤纸擦拭脑组织表面血迹,电子天平精确测量脑组织湿重,质量精确到 0.1 mg;然后,将脑组织置于 110 $^{\circ}\text{C}$ 恒温干燥

箱内烘烤 48 h 至恒重,再测量脑组织干重。脑含水量(%)=(脑组织湿重—脑组织干重)/脑组织湿重 $\times$ 100%。

1.4 HE 染色观察脑组织病理学改变

实验第 7 天,每组各取 3 只大鼠,使用 10% 水合氯醛溶液腹腔注射麻醉(0.3 mL/200 g)后迅速解剖,摘取完整脑组织置于 10% 甲醛溶液中固定,固定组织应充分展开,勿挤压和冷冻。待固定充分后,使用石蜡包埋,组织切片后进行 HE 染色,并于光镜下观察。

1.5 EB 染色检测血脑屏障通透性

实验第 6 天,每组各取大鼠 6 只,按 2 mL/kg 体重经腹腔注射 2% EB 溶液。注射后 24 h,使用 10% 水合氯醛溶液腹腔注射麻醉(0.3 mL/200 g)后迅速解剖,取出完整脑组织后在滤纸上将脑组织表面的血液吸净。称取 100 mg 右侧脑组织并剪碎,60 $^{\circ}\text{C}$ 下放置于 3 mL 甲酰胺溶液抽提 24 h。待组织中色素全部浸出后,1500 $\times g$ 离心 5 min,并取上清液,在 620 nm 波长下测定吸光度值。根据标准曲线计算 EB 质量,以每克脑组织湿重含 EB 的质量表示大鼠血脑屏障的通透性。

1.6 液相色谱-串联质谱法采集各组样品的蛋白数据

取 1.3 冻存于液氮中的右侧脑组织,每组各取 3 只大鼠的脑组织,加入 1:9 SDT 裂解液(4% SDS、Tris-HCl 100 mmol/L、DTT 1 mmol/L, pH 7.6)匀浆裂解后,于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 $\times g$ 离心 45 min,取上清液。采用 BCA 法进行蛋白质定量,过滤辅助样品制备法进行胰蛋白酶酶解获取肽段。取出-80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存的 TMT 试剂恢复到室温,1500 $\times g$ 离心 5 min,加入乙腈,再涡旋离心。各样品分别取 100 μg 肽段,加入 0.8 mL 处理后的 TMT 试剂,室温孵育 2 h;加入羟胺,室温反应 15 min。每组标记后的肽段等量混合,并于真空浓缩仪干燥。

将干燥后的样品用 pH 值为 10 的 2% 乙腈水溶液复溶后,用超高效液相色谱进行分离。色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C18(粒径 1.7 μm ,规格 2.1 mm $\times$ 150 mm)。流动相:A 相为 2% 乙腈(氨水调至 pH 10),B 相为 80% 乙腈(氨水调至 pH 10)。采用紫外检测器进行检测,波长为 214 nm,流速为 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。梯度洗脱:0~2 min,0% 流动相 B;2~17 min,0%~3.8% 流动相 B;17~35 min,3.8%~24% 流动相 B;35~38 min,24%~30% 流动相 B;

38~39 min, 30%~43% 流动相 B; 39~40 min, 43%~100% 流动相 B; 40~46 min, 100%~0% 流动相 B; 46~66 min, 0% 流动相 B。总洗脱时间为 66 min, 根据峰型和时间共收取 20 个馏分, 合并成 10 个馏分, 真空离心浓缩后备用。

离心浓缩后的样品使用质谱上样缓冲液溶解, 通过纳升流速的 EASY-nLC™ 1200 系统分离后用 Q Exactive™ 组合型四极杆 Orbitrap™ 质谱仪分析, 应用 Thermo Xcalibur 4.0 数据采集软件进行数据采集。纳升级液相色谱条件如下。色谱柱为 Thermo C18 (粒径 2.0 μm , 规格 75 μm ×25 cm)。流动相: A 相系体积分数为 0.1% 甲酸的水溶液, B 相系体积分数为 0.1% 甲酸的乙腈溶液。样品由自动进样器上样到上样柱, 经分析柱分离, 流速为 300 nL/min。梯度洗脱: 0~1 min, 0%~5% 流动相 B; 1~63 min, 5%~23% 流动相 B; 63~86 min, 23%~38% 流动相 B; 86~88 min, 38%~48% 流动相 B; 88~95 min, 48%~100% 流动相 B; 95~96 min, 100%~0% 流动相 B; 96~120 min, 0% 流动相 B。总洗脱时间为 120 min。经色谱分离后的样品采用正离子检测模式, 基于数据依赖采集策略: 母离子扫描范围为 350~1300 m/z , 一级质谱分辨率为 70 000, 碎裂方式为高能碰撞解离, 二级质谱分辨率为 35 000, 动态排除时间为 18 s。

1.7 生物信息学分析差异表达蛋白及相关信号通路

将液相色谱-串联质谱法采集的蛋白数据 raw 文件提交至 Proteome Discoverer 软件 (版本 2.1, 美国 ThermoFisher Scientific 公司), 在从 UniProt 数据库下载的 uniprot-proteome-UP000002494-Rattusnorvegicus-29978s-20170808.fasta 中进行搜索, 可变修饰设置为甲硫氨酸氧化 [Oxidation (M)]、蛋白质氨基端乙酰化 [Acetyl (Protein N-Terminus)], 固定修饰设置为烷基化 (C)、TMT10plex (K)、TMT10plex (N 端), 最大错误切割位点设置值为 2, 碎片质量容差为 0.02 Da, 以至少有 1 个独有肽段且错误发现率小于 0.01 为可靠鉴定的蛋白质。将上述鉴定所得的蛋白质数据上传到美吉云平台 (cloud.majorbio.com), 在平台“多元统计分析”模块中选择“PCA”工具, 采用 R 语言 (4.0.3 版) 的 FactoMineR 和 factoextra 包进行 PCA 分析, 默认采用 Z-score 标准化, 展示各组样品在主成分空间的分布。采用 R 语言中的 t.test 函数计

算组间差异显著性 (P 值) 和差异倍数, $P < 0.05$ 同时差异倍数大于 1.2 倍为差异表达蛋白, 并对筛选出的差异表达蛋白进行火山图和热图可视化分析。选择 GO 数据库 (<http://geneontology.org/>), 从生物学过程、细胞组分和分子功能三个方面对 7-HEC 组与模型对照组的差异表达蛋白进行 GO 注释及功能聚类分析; 同时采用 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) 数据库对这些蛋白质涉及的环境信息处理、新陈代谢、生物体系统、人类疾病、细胞过程、遗传信息处理六个条目的信号通路进行分析。通过 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 进行 PPI 分析, 设置中等置信度阈值 (相互作用得分 ≥ 0.4), 使用 Cytoscape 软件进行可视化。

1.8 蛋白质印迹法验证差异表达蛋白的表达量

从 1.3 冻存于液氮中的右侧脑组织中, 每组各取 3 只大鼠的脑组织, 将脑组织加入裂解液匀浆后提取细胞总蛋白, 采用 BCA 法进行蛋白质定量分析。将蛋白质煮沸变性, 取变性蛋白质样品 50 μg , 以 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转至聚偏二氟乙烯膜上, 用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液封闭 1 h, 加入一抗 SERT、POLR3A、HACL1、HSPA4、Arhgap20、CCDC43、PCBD1 和 β -肌动蛋白 (稀释比例均为 1:3000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜; 用 TBST 缓冲液反复洗膜三次, 室温下加入二抗 (稀释比例为 1:5000) 孵育 1 h; 用 TBST 缓冲液反复洗膜三次, 显影、扫描图像, 将胶片拍照后用凝胶图像处理系统分析, 实验重复三次。用 ImageJ 软件分析各条带灰度值, 以 β -肌动蛋白作为内参, 计算各组蛋白质的相对表达量。

1.9 统计学方法

除蛋白质组学数据, 其余数据使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。每组设三个独立重复样本, 通过直方图检验数据正态性, 正态分布的计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义 (双侧)。

2 结果

2.1 7-HEC 改善模型大鼠脑水肿并修复血脑屏障

大鼠脑含水量测定结果显示, 与正常对照组 [(78.70 $\pm$ 0.47)%] 比较, 模型对照组脑含水量增加 [(80.15 $\pm$ 0.16)%, $t=9.84$, $P < 0.05$]; 与模型对照组比较, 7-HEC 组脑含水量减少 [(78.99 $\pm$ 0.58)%],

$t=4.78, P<0.01$]。HE 染色结果显示,正常对照组脑组织结构正常,血管清晰可见,细胞结构完整,神经细胞排列规则有序,未发现病变;模型对照组脑组织血管周、细胞周间隙明显增多,毛细血管和细胞水肿明显,神经细胞排列散乱无序并可见大量核固缩的神经细胞;7-HEC 组脑组织偶见细胞水肿及散在的血管周围轻度水肿,水肿相比模型对照组减轻(图1)。EB 染色结果显示,与正常对照组[(165.75±12.25) $\mu\text{g/g}$]比较,模型对照组血脑屏障通透性显著升高[(205.67±19.66) $\mu\text{g/g}$, $t=8.90, P<0.01$];与模型对照组比较,7-HEC 组血脑屏障通透性明显降低[(167±11.61) $\mu\text{g/g}$, $t=8.55, P<0.01$]。结果提示,7-HEC 可以降低高原脑水肿模型大鼠脑含水量,缓解脑组织水肿程度,降低血脑屏障通透性,减轻血脑屏障损伤。

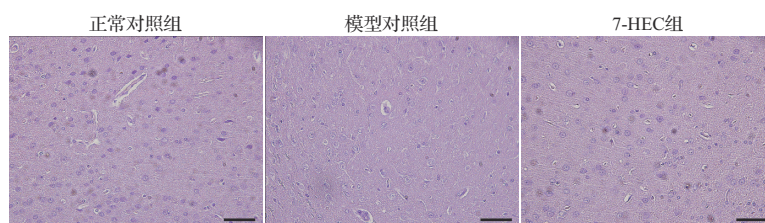
2.2 差异表达蛋白的筛选及验证

共检测含肽段碎片离子的质谱图 106 374 张,鉴定得到肽段 44 111 个、蛋白质 5900 个。PCA 结果表明,正常对照组、模型对照组和 7-HEC 组差异表达蛋白在三维空间内分别集中分布在不同区域,数据点无重叠,说明组内重复性好,组间有可比性,见图2。与正常对照组比较,模型对照组有 256 个差异表达蛋白,其中 194 个蛋白质表达上调,62 个蛋白质表达下调;与模型对照组比较,7-HEC 组有 87 个差异表达蛋白,其中 25 个蛋白质表达上调,62 个蛋白质表达下调(附图1)。19 个在模型对照组中差异表达的蛋白质在 7-HEC 干预后得到纠正,其中 15 个在模型对照组中上调的蛋白质在 7-HEC 干预后表达下调,4 个在模型对照组中下调的蛋白质在 7-HEC 干预后表达上调。这 19 个差异表达蛋白中,7 个经蛋白质印迹法得到验证,其中 Arhgap20、SERT、HACL1、CCDC43、POLR3A 和 PCBD1 的表达水平在模型对照组中上调,经 7-HEC 干预后表达下调;HSPA4 的表达水平在模型对照组中下调,经 7-HEC 干预后表达上调,与蛋白质组学分析结果一致。见图3和表1。结果提示,Arhgap20、SERT、HACL1、CCDC43、POLR3A、PCBD1 和 HSPA4 可

能是 7-HEC 发挥防治高原脑水肿作用的关键蛋白质。

2.3 差异表达蛋白富集分析结果

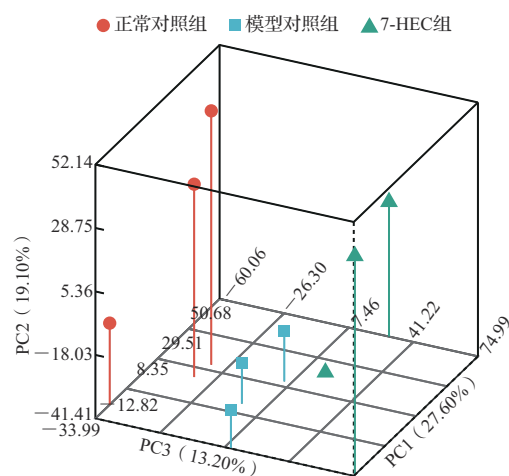
GO 富集分析结果显示,排名前二十的条目包括 13 个生物学过程、5 个细胞组分和 2 个分子功能。其中,生物学过程包括纤毛组织化、中间丝束组装、毛囊形态发生、参与背/腹侧调控的平滑信号通路调节、非运动纤毛组件、胚胎形态发生、神经上皮细胞分化、胰岛素分泌的负调控参与细胞对葡萄糖刺激的应答、平滑信号通路的正向调控、转录因子的胞质隔离、纤毛组装、上皮细胞分化、脉管系统发育;细胞组分包括角蛋白丝、神经元特异性 BRG1/BRM 相关因子复合物、质子转运 V 型 ATP 酶 V0 结构域、纤毛基体蛋白复合



正常对照组脑组织细胞结构完整,神经细胞排列规则有序;模型对照组血管周、细胞周间隙明显增多,水肿明显;7-HEC 组水肿明显减轻。标尺=20 μm 。7-HEC:7-羟乙基白杨素。

图1 各组大鼠脑组织病理学变化(苏木精-伊红染色)

Figure 1 Histopathological changes of rat brain tissue in each group (Hematoxylin and eosin staining)



正常对照组、模型对照组和 7-HEC 组差异表达蛋白在三维空间内分别集中分布在不同区域,数据点无重叠,可见组内重复性好,组间有可比性。7-HEC:7-羟乙基白杨素;PC:主成分。

图2 各组蛋白质定量重复性主成分分析图($n=3$)

Figure 2 Quantitative repeatability principal component analysis of proteins in each group ($n=3$)

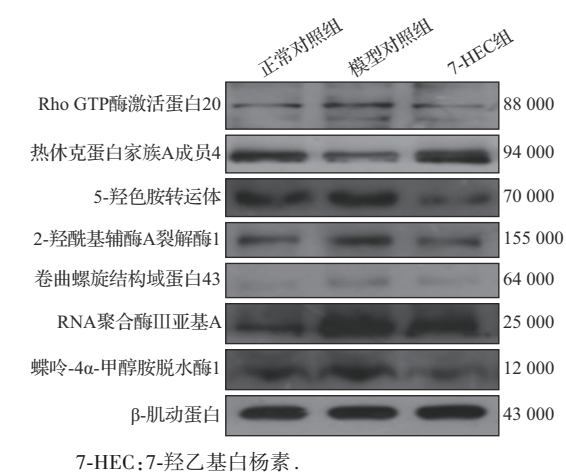


图3 7-HEC干预后纠正的差异表达蛋白电泳图
Figure 3 Electrophoretic diagram of differentially expressed proteins restored after 7-HEC intervention

物、I-κB/NF-κB 复合物;分子功能包括角蛋白丝结合、赖氨酸 *N*-乙酰转移酶活性(以乙酰磷酸作为供体),见附图2。

KEGG 富集分析结果表明,排名前二十的信号通路包括mRNA 监测信号通路、Th17 细胞分化、Th1 和 Th2 细胞分化、剪接体、5-羟色胺能突触、RNA 聚合酶、内质网中的蛋白质加工、过氧化物酶体、神经活性配体-受体相互作用、代谢途径、造血细胞谱系、叶酸合成、多巴胺能突触、细胞质 DNA 传感途径、细胞因子-细胞因子受体相互作用、辅因子的生物合成、细胞黏附分子、γ-氨基丁酸能突触、丝裂原激活的蛋白激酶信号通路、神经退行性变的途径(附图3)。

2.4 差异表达蛋白的PPI网络

PPI 网络共包含 84 个节点(蛋白)和 176 条相互作用边,平均度值为 4.19。如图 4 所示。HSPA4、POLR3A、HACL1 在 PPI 网络中与多个信号通路相关,属于度值排名前二十的差异表达蛋

白,提示其可能为核心调控因子;Arhgap20、SERT (即Slc6a4)和PCBD1 在 PPI 网络中也与多个蛋白质发生相互作用,可能是参与调控的关键蛋白质;未发现CCDC43 与其他蛋白质的相互作用。

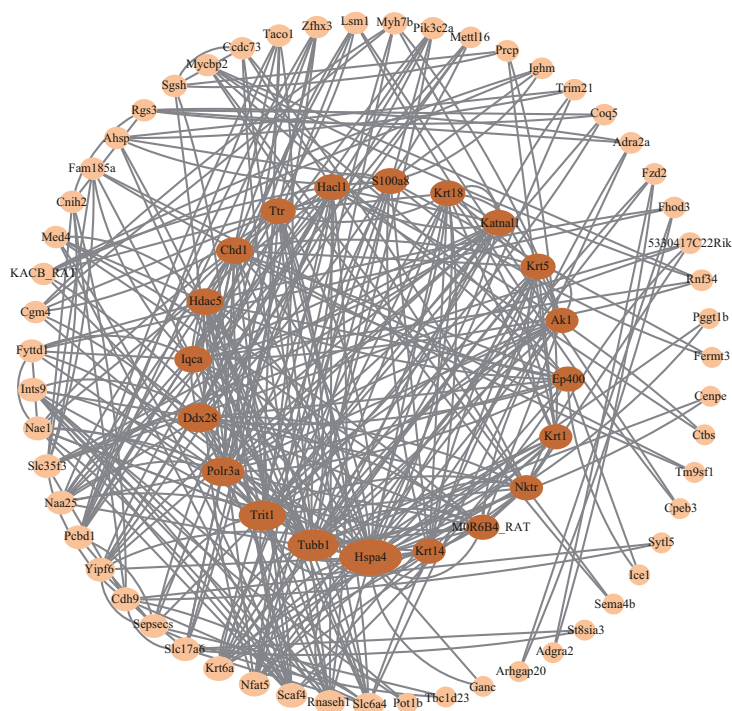
3 讨论

7-HEC 是对白杨素进行结构改造后的衍生物,具有良好的抗高原缺氧认知损伤、神经保护和抗高原脑水肿作用^[10]。本研究系统评估了 7-HEC 对高原脑水肿模型大鼠的治疗作用。结果显示,模型对照组脑组织脑含水量增加,EB 渗透率升高,并出现明显的血管周水肿和神经细胞核固缩,这些变化与临床高原脑水肿的病理特征高度一致,而 7-HEC 干预明显降低了脑含水量和 EB 渗透率,改善脑组织病理损伤。为了进一步探究 7-HEC 防治高原脑水肿的分子机制,拟借助蛋白质组学方法探寻 7-HEC 防治高原脑水肿的生物标志物,试图从系统生物学角度阐明其作用机制。本文资料共鉴定出 87 个 7-HEC 组与模型对照组间的差异表达蛋白,其中 19 个蛋白质的表达水平被 7-HEC 逆转,且有 7 个蛋白质的表达经蛋白质印迹法验证结果与蛋白质组学一致。结合 GO 富集分析、KEGG 通路富集分析结果,推测 7-HEC 防治高原脑水肿的机制可能与 mRNA 监测信号通路、Th17 细胞分化、5-羟色胺能突触、RNA 聚合酶、内质网中的蛋白质加工、过氧化物酶体、神经活性配体-受体相互作用、叶酸合成等信号通路有关。PPI 网络分析显示,HSPA4、POLR3A、HACL1 与多个信号通路相关,可能是 7-HEC 防治高原脑水肿的核心调控因子,PCBD1、SERT、Arhgap20 也参与多个信号通路,可能是 7-HEC 防治高原脑水肿的关键蛋白。上述结果为理解高原脑水肿的发病机制及 7-HEC 的干预靶点提供

表1 7-HEC 干预后纠正的差异表达蛋白验证结果
Table 1 Validation results of differentially expressed proteins restored after 7-HEC intervention

(x̄±s, n=3)							
组 别	Arhgap20	HSPA4	SERT	HACL1	CCDC43	POLR3A	PCBD1
正常对照组	1.69±0.07	2.52±0.03	1.86±0.05	1.80±0.03	1.45±0.10	2.18±0.13	2.18±0.01
模型对照组	2.11±0.06**	2.47±0.01**	2.12±0.06**	2.17±0.04*	1.69±0.00*	4.17±0.51**	2.71±0.03**
7-HEC 组	1.64±0.10##	2.55±0.02##	1.78±0.06##	1.92±0.04##	1.47±0.00##	2.29±0.17##	2.37±0.03##

与正常对照组比较,**P*<0.05,***P*<0.01;与模型对照组比较,##*P*<0.05,###*P*<0.01。Arhgap:Rho GTP 酶激活蛋白;HSPA:热休克蛋白家族 A;SERT:5-羟色胺转运体;HACL:2-羟酰基辅酶 A 裂解酶;CCDC:卷曲螺旋结构域蛋白;POLR3A:RNA 聚合酶 III 亚基 A;PCBD:蝶呤-4α-甲醇胺脱水酶;7-HEC:7-羟乙基白杨素。



节点代表蛋白质,节点越大表示连接度越大,颜色越深反映相互作用置信度越高。7-HEC:7-羟乙基杨素。

图4 7-HEC组与模型对照组差异表达蛋白的相互作用网络

Figure 4 Protein-protein interaction network of differentially expressed proteins between the 7-HEC group and the model control group

了新的依据。

研究表明,高原脑水肿会引发炎症、氧化应激、脂质过氧化、细胞损伤等,而7-HEC可以减少上述损伤发生^[9-10]。作为7-HEC防治高原脑水肿的枢纽基因,*HSPA4*和*POLR3A*异常表达可引发内质网应激和错误折叠蛋白的积累,进而激活小胶质细胞和免疫系统,最终导致细胞凋亡和炎症反应^[11-13]。本文资料显示,模型对照组中*HSPA4*表达下调,而*POLR3A*表达水平升高,而7-HEC可以逆转这两个蛋白的表达使之趋于正常,且富集分析发现这两个蛋白质富集到内质网中的蛋白质加工、剪接体、mRNA监测信号通路,提示7-HEC可能通过调控*HSPA4*、*POLR3A*表达起到防治高原脑水肿的作用,这与我们前期研究发现7-HEC能改善低压缺氧导致的细胞周期阻滞、减少细胞凋亡、降低炎症和减少氧化应激等结果一致^[14]。*HACL1*是脂肪酸发生 α -氧化的关键酶,而 α -氧化主要发生在过氧化物酶体中^[15]。本文资料显示,模型对照组中*HACL1*表达增加,提示*HACL1*可能通过介导脂肪酸代谢异常引发脂质过氧化。这一过程一方面促进炎症因子产生,另一方面导致

氧化应激损伤,进而损害微血管内皮细胞和血脑屏障功能,最终促进高原脑水肿的发生和发展。7-HEC干预组*HACL1*表达下调,提示7-HEC可能通过调控炎症因子和氧化应激水平防治高原脑水肿。综上,在高原低氧环境中,7-HEC可能通过恢复*HSPA4*、*PLOR3A*、*HACL1*蛋白的表达,从不同途径减少氧化应激、炎症等细胞损伤,进而对高原脑水肿起到防治作用。

5-羟色胺是一种重要的神经递质和血管活性物质,参与调节脑血管张力、血脑屏障通透性及神经功能。在高原低氧环境下,5-羟色胺释放增加^[16],引起脑血管收缩或舒张,可能加剧脑血流动力学紊乱。5-羟色胺水平升高还可能通过增加氧化应激、炎症因子(如IL-6、TNF- α)或直接损伤内皮细胞,导致血脑屏障通透性

增加,促进血管源性脑水肿^[17]。研究显示,*PCBD1*高表达可使苯丙氨酸羟化酶活性升高,导致脑内神经递质(多巴胺、5-羟色胺)的合成增加,同时可升高酪氨酸、色氨酸羟化酶活性^[18]。*SERT*分布于体内5-羟色胺能神经末梢、血小板、心肌细胞、血管内皮、胃肠道平滑肌等多种组织细胞中,是5-羟色胺的专属转运蛋白,通过调节5-羟色胺的摄取和释放参与各项生理活动^[19]。应用基因干扰敲低PC12细胞*SERT*可以改善低压缺氧诱导的细胞凋亡^[20],且*SERT*特异性抑制剂氟西汀可以减轻高原缺氧脑组织损伤^[21]。本文资料显示,*PCBD1*和*SERT*在模型对照组中表达显著增加,而7-HEC干预后两者的表达水平显著下降,提示7-HEC可有效抑制因高原缺氧导致的*PCBD1*和*SERT*表达增加,减轻因5-羟色胺递质释放过多而引起血管收缩,并可减少血脑屏障通透性、阻止5-羟色胺进入脑微血管内皮细胞,进而减轻高原脑水肿损伤。

研究发现,由微管、微丝和中间纤维组成的细胞骨架通过调控内皮细胞的形态、细胞间连接、囊泡运输及机械稳定性,在血脑屏障的维持和病

理过程中发挥关键作用^[22]。Arhgap20是Rho GTP酶激活蛋白家族的成员,参与促进Rho GTP酶转化为非活性的鸟苷二磷酸结合状态,并抑制多种细胞过程^[23]。已有研究表明,Arhgap可通过调节肌动蛋白细胞骨架重组影响血脑屏障通透性^[24]。本文资料显示,7-HEC可特异性下调Arhgap20表达,提示7-HEC可能通过修复脑微血管内皮细胞初级纤毛(由CCDC43等蛋白质参与构成)来维持血脑屏障的机械传感功能。虽然CCDC43本身未参与PPI网络中各蛋白质间的交互,但其作为卷曲螺旋结构域蛋白,可能通过物理支撑作用维持细胞骨架稳定性^[25]。

综上,7-HEC通过多靶点调控网络改善高原脑水肿模型大鼠脑水肿症状,其核心机制可能涉及维持细胞稳态、改善氧化应激、调节能量代谢和降低血管通透性。这些发现不仅为高原脑水肿提供了新的治疗策略,也为理解血脑屏障损伤的分子机制提供了理论依据。但本研究采用的是动物模型,未能完全模拟人高原脑水肿的慢性病程,相关靶点还需通过基因敲除等手段进一步验证,这些差异表达蛋白的作用机制也须进一步研究。

本文附加文件见电子版。



致谢 研究得到甘肃省科技计划(22JR11RA014)、军队卫勤保障能力创新与生成专项计划(21WQ045)、甘肃省卫生健康行业科研项目(GSWSKY2022-46)、第九四〇医院内科科研项目(2021yxky046, 2022yxky004, 2023yxky028)支持

Acknowledgements The study was supported by Gansu Provincial Science and Technology Program (22JR11RA014), Military Medical Support Capacity Innovation and Generation Project (21WQ045), Gansu Provincial Health Industry Research Project (GSWSKY2022-46), and Internal Scientific Research Projects of the 940th Hospital (2021yxky046, 2022yxky004, 2023yxky028)

作者贡献 张冬梅、李晓琳、杨陈煜、景临林、何蕾和马慧萍参与论文选题和设计或参与资料获取、分析或解释,起草研究论文或修改重要智力性内容。所有作者均已阅读并认可最终稿件,并对数据的完整性和安全性负责。具体见电子版

Author Contributions ZHANG Dongmei, LI Xiaolin,

YANG Chenyu, JING Linlin, HE Lei and MA Huiping participated in brewing and designing experiments, or acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; drafting the work, or revising it critically for important intellectual content. All authors have read and approved the final manuscript, and take responsibility for the integrity and security of the data. See the electronic version for details

数据可用性 本研究的相关数据可在iProX-integrated Proteome resources数据库公开获取:<https://www.iprox.cn/IPX0002460000>

Data Availability All relevant data supporting the findings of this study are available in the iProX-integrated Proteome resources, accessible via <https://www.iprox.cn/IPX0002460000>

医学伦理 本研究遵循国家和联勤保障部队第九四〇医院有关实验动物管理和使用的规定,通过联勤保障部队第九四〇医院伦理委员会审查(2023KYLL007)

Ethical Approval All applicable national guidelines and The 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army regulations for the care and use of animals were followed, and the research protocol of animal experiments was approved by the Ethics Committee of The 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army (2023KYLL007)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2025. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献(References)

- [1] LI Y, LI C, LUO T, et al. Progress in the treatment of high altitude cerebral edema: targeting REDOX homeostasis[J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 2645-2660.
- [2] LUKS A M, AUERBACH P S, FREER L, et al. Wilderness medical society clinical practice guidelines for the prevention and treatment of acute altitude illness: 2019 update[J]. *Wilderness Environ Med*, 2019, 30(4S): S3-S18.
- [3] BILLER A, BADDE S, HECKEL A, et al. Exposure to 16 h of normobaric hypoxia induces ionic edema in the healthy brain[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5987.
- [4] ZELMANOVICH R, PIERRE K, FELISMA P, et al. High altitude cerebral edema: improving treatment options[J]. *Biologics*, 2022, 2(1): 81-91.
- [5] HAO G S, FAN Q L, HU Q Z, et al. Research progress

- on the mechanism of cerebral blood flow regulation in hypoxia environment at plateau[J]. **Bioengineered**, 2022, 13(3): 6353-6358.
- [6] MURRAY A J, MONTGOMERY H E, FEELISCH M, et al. Metabolic adjustment to high-altitude hypoxia: from genetic signals to physiological implications[J]. **Biochem Soc Trans**, 2018, 46(3): 599-607.
- [7] 巩沅鑫, 程淑珍, 周其全. 银杏叶提取物对模拟高原低氧暴露下大鼠血脑屏障的保护作用[J]. **临床军医杂志**, 2010, 38(3): 327-329.
- GONG Yuanxin, CHENG Shuzhen, ZHOU Qiquan. Protection of Ginkgo biloba extract on blood-brain barrier under exposure to hypoxia[J]. **Clinical Journal of Medical Officers**, 2010, 38(3): 327-329. (in Chinese)
- [8] PATIR H, SARADA S K S, SINGH S, et al. Quercetin as a prophylactic measure against high altitude cerebral edema[J]. **Free Radic Biol Med**, 2012, 53(4): 659-668.
- [9] 石志群, 高迎春, 张冬梅, 等. 7-羟乙基白杨素对高原脑水肿的作用机制初探[J]. **药学实践与服务**, 2022, 40(5): 399-402, 415.
- SHI Zhiquan, GAO Yingchun, ZHANG Dongmei, et al. A preliminary study on the mechanism of 7-HEC on high altitude cerebral edema[J]. **Journal of Pharmaceutical Practice and Service**, 2022, 40(5): 399-402, 415. (in Chinese)
- [10] 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.
- JING Linlin, YANG Ying, SHAO Jin, et al. Protective effects and mechanism of 7-HEC against hypobaric hypoxia-induced cognitive impairments in rats[J]. **Chinese Journal of Hospital Pharmacy**, 2020, 40(15): 1622-1626. (in Chinese)
- [11] LATA E, CHOQUET K, SAGLIOCCO F, et al. RNA polymerase III subunit mutations in genetic diseases[J]. **Front Mol Biosci**, 2021, 8: 696438.
- [12] IWASAKI H. Activities of asymmetric dimethylarginine-related enzymes in white adipose tissue are associated with circulating lipid biomarkers[J]. **Diabetol Metab Syndr**, 2012, 4(1): 17.
- [13] ELKENANI M, BARAKAT A Z, HELD T, et al. Heat shock protein A4 ablation leads to skeletal muscle myopathy associated with dysregulated autophagy and induced apoptosis[J]. **J Transl Med**, 2022, 20(1): 229.
- [14] 张冬梅, 高迎春, 张洁, 等. 7-羟乙基白杨素对低压缺氧致PC12细胞损伤的改善作用及机制[J]. **中国药房**, 2023, 34(4): 402-406, 412.
- ZHANG Dongmei, GAO Yingchun, ZHANG Jie, et al. Investigation on improvement effects and mechanism of 7-hydroxyethyl chrysin on PC12 cell injury induced by hypobaric hypoxia[J]. **China Pharmacy**, 2023, 34(4): 402-406, 412. (in Chinese)
- [15] KHALIL Y, CARRINO S, LIN F, et al. Tissue proteome of 2-hydroxyacyl-CoA lyase deficient mice reveals peroxisome proliferation and activation of ω -oxidation[J]. **Int J Mol Sci**, 2022, 23(2): 987.
- [16] 陈华伟, 胡琳, 贾嫫, 等. 不同海拔高原筑路工人全血5-羟色胺的研究[J]. **高原医学杂志**, 2002, 12(2): 6-8.
- CHEN Huawei, HU Lin, JIA Ying, et al. Changes of level of blood 5-HT in constructors at various altitudes[J]. **Journal of High Altitude Medicine**, 2002, 12(2): 6-8. (in Chinese)
- [17] BADYAL P, KAUR J, KUHAD A. Role of 5-HT in cerebral edema after traumatic brain injury[J]. **Intech-Open**, 2022. DOI:10.5772/INTECHOPEN.96460.
- [18] HIMMELREICH N, BLAU N, THÖNY B. Molecular and metabolic bases of tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies[J]. **Mol Genet Metab**, 2021, 133(2): 123-136.
- [19] HANDE S H, KRISHNA S M, SAHOTE K K, et al. Population genetic variation of *SLC6A4* gene, associated with neurophysiological development[J]. **J Genet**, 2021, 100(1): 16.
- [20] 张冬梅, 高迎春, 何蕾, 等. PC12细胞SLC6A4基因沉默稳转细胞系的建立及SLC6A4基因沉默对缺氧PC12细胞凋亡的影响[J]. **药学实践与服务**, 2022, 40(5): 389-394, 463.
- ZHANG Dongmei, GAO Yingchun, HE Lei, et al. Establishment of SLC6A4 gene silencing stable cell line in PC12 cells and the effect of SLC6A4 gene silencing on apoptosis of hypoxia PC12 cells[J]. **Journal of Pharmaceutical Practice and Service**, 2022, 40(5): 389-394, 463. (in Chinese)
- [21] 邹蓓蕾, 潘菁, 吴庆丰, 等. 盐酸氟西汀对高原脑水肿大鼠脑组织的保护作用[J]. **中国药理学通报**, 2022, 38(9): 1382-1388.
- ZOU Beilei, PAN Jing, WU Qingfeng, et al. The protective effect of fluoxetine hydrochloride on brain tissues of rats with high altitude cerebral edema[J]. **Chinese Pharmacological Bulletin**, 2022, 38(9): 1382-1388. (in Chinese)
- [22] OBERMEIER B, DANEMAN R, RANSOHOFF R M. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier[J]. **Nat Med**, 2013, 19(12): 1584-1596.
- [23] TAO M, HAN D, WEI S, et al. CCDC43 as a potential therapeutic target of Tian Yang Wan for the treatment of hepatocellular carcinoma by activating the hippo pathway[J]. **Front Oncol**, 2023, 13: 1232190.
- [24] NACER A, MOVILA A, BAER K, et al. Neuroimmunological blood brain barrier opening in experimental cerebral malaria[J/OL]. **PLoS Pathog**, 2012, 8(10): e1002982.
- [25] BRYAN B A, DENNSTEDT E, MITCHELL D C, et al. RhoA/ROCK signaling is essential for multiple aspects of VEGF-mediated angiogenesis[J]. **FASEB J**, 2010, 24(9): 3186-3195.

[本文编辑 余方 刘丽娜]