



利舒康胶囊干预模型大鼠高原肺水肿的分子机制*

张冬梅^{id}, 杨陈煜, 李晓琳, 邵杰, 李文斌, 王荣^{id}[△]

联勤保障部队第九四〇医院药剂科 全军高原医学实验室(兰州 730050)

【摘要】 目的 应用蛋白质组学方法探讨利舒康胶囊(Lishukang capsule, LSK)治疗大鼠高原肺水肿模型的作用靶点及信号通路。方法 60只雄性Wistar大鼠随机分为空白对照(Control)组、高原肺水肿模型(HAPE)组、利舒康胶囊处理低、中、高剂量组和红景天组。模型建立后通过HE染色、炎症因子检测、肺含水量和肺泡灌洗液中蛋白含量评价药效,并确定最佳给药剂量,运用非标记定量蛋白质组学技术检测并筛选利舒康最佳给药剂量组差异表达蛋白质,筛选标准为表达倍数变化1.5倍以上且 $P < 0.05$ 。采用蛋白质印迹法对差异表达蛋白质进行验证,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。结果 利舒康中剂量组具有良好的抗HAPE作用,进一步进行蛋白质组学分析结果表明,与Control组相比,HAPE组共有差异表达蛋白267个,与HAPE组相比,LSK中剂量组共有225个差异表达蛋白,112个在Control组中差异表达的蛋白质在LSK中剂量组干预后得到纠正。对HAPE组与LSK组差异表达的蛋白质进行GO富集分析显示,这些差异表达蛋白质共涉及12个生物学过程、2个细胞组分和5个分子功能;KEGG富集分析表明,LSK能激活细胞黏附分子、糖胺聚糖生物合成、DNA复制/核苷酸切除修复、癌症中的转录调控异常、单纯疱疹病毒1型感染通路,能抑制甘油磷脂代谢通路。采用Western blot方法对一些潜在功能的差异蛋白进行验证,包括AGPAT5、NCAM1、SRSF3、PLA2这些差异蛋白在正常组、HAPE组及LSK组均出现显著表达且验证结果与蛋白质组学一致,表明蛋白质组学结果可信度较高。结论 LSK具有良好的抗高原肺水肿作用,通过蛋白质组学研究提示,LSK可能通过激活细胞黏附分子、糖胺聚糖生物合成、DNA复制/核苷酸切除修复、癌症中的转录调控异常、单纯疱疹病毒1型感染通路,抑制甘油磷脂代谢通路起到抗高原肺水肿作用,通路中关键差异蛋白可能在LSK防治高原肺水肿中起重要作用。

【关键词】 高原肺水肿 利舒康胶囊 高原缺氧 蛋白质组学 液相色谱-串联质谱

Molecular Mechanisms of Intervention With Lishukang Capsule in a Rat Model of High-Altitude Pulmonary Edema

ZHANG Dongmei^{id}, YANG Chenyu, LI Xiaolin, SHAO Jie, LI Wenbin, WANG Rong^{id}[△]. Key Laboratory of High-Altitude Medicine, Department of Pharmacy, The 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050, China

△ Corresponding author, E-mail: wangrong-69@163.com

[Abstract] Objective To investigate the molecular targets and signaling pathways involved in the therapeutic effects of Lishukang Capsule (LSK) in a rat model of high-altitude pulmonary edema (HAPE) using a proteomics-based approach. **Methods** A total of 60 male Wistar rats were randomly assigned to a control group, a HAPE model group, 3 LSK treatment groups receiving low-, medium-, and high-dose LSK, respectively, and a *Rhodiola rosea* (also known as Hongjitian [HJT] in pinyin, a Chinese Romanization system) control group. After HAPE modeling, the pharmacodynamic effects were assessed and the optimal LSK dose was determined using HE stains, inflammatory cytokine quantification, lung tissue water content, and the protein concentration in bronchoalveolar lavage. Label free quantitative proteomic profiling was then applied to identify differentially expressed proteins (DEPs) in the optimal dose group, using a screening threshold of over 1.5-fold change and $P < 0.05$. The selected DEPs were validated with Western blotting, followed by Gene Ontology (GO) enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. **Results** The medium-dose LSK group exhibited significant anti-HAPE effects. Findings from the proteomic analysis revealed, in the comparison with the control group, 267 DEPs were identified in the HAPE group. In the comparison with the HAPE group, 225 DEPs were identified in the medium-dose LSK group. A total of 112 DEPs in the control group were normalized following LSK treatment in the medium-dose LSK group. In addition, GO enrichment analysis of proteins differentially expressed between the HAPE and LSK group showed that these DEPs were mainly enriched in 12 biological processes, 2 cellular components, and 5 molecular functions. KEGG pathway analysis showed that LSK activated pathways associated with cell adhesion molecules, glycosaminoglycan biosynthesis, DNA replication/nucleotide excision repair, transcriptional dysregulation in cancer, and Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)

* 甘肃省科技计划资助项目(No. 22JR11RA014), 甘肃省卫生健康行业科研计划项目(No. GSWSKY2022-46)和第九四〇医院院内科研项目(No. 2021yxky046, No. 2022yxky004, No. 2023YXKY028)资助

△ 通信作者, E-mail: wangrong-69@163.com

出版日期: 2025-09-20

infection, while inhibiting pathways associated with glycerophospholipid metabolism. Some differentially expressed proteins with potential functions were verified by Western blotting, including AGPAT5, NCAM1, SRSF3, and PLA2. These differentially expressed proteins were significantly expressed in the normal group, HAPE group, and LSK group, and the validation results were consistent with proteomic findings, indicating the high reliability of the proteomic results.

Conclusion LSK exerts a significant protective effect against HAPE. Proteomic analysis suggests that its therapeutic action may be mediated through activating pathways involved in cell adhesion molecules, glycosaminoglycan biosynthesis, DNA replication/nucleotide excision repair, transcriptional dysregulation in cancer, and HSV-1 infection, alongside inhibition of pathways associated with glycerophospholipid metabolism. The key DEPs identified in these pathways may play crucial roles in the preventive and therapeutic effects of LSK on HAPE.

[Key words] High altitude pulmonary edema Lishukang capsule Hypobaric hypoxia Proteomics LC-MS/MS

高原肺水肿(high altitude pulmonary edema, HAPE)是一种急性重症高原病,发病急、进展快,临床表现多为头痛、呼吸困难、咳嗽伴泡沫痰等^[1]。其发病机制涉及低氧性肺动脉高压、肺泡-毛细血管膜通透性增高等^[2]。目前用于HAPE的药物防治包括碳酸酐酶抑制、糖皮质激素、磷酸二酯酶抑制剂以及Ca²⁺受体阻滞剂等,上述药物防治HAPE的同时也存在一定的不良反应^[3]。近年来研究发现藏药活性成分具有良好的抗缺氧活性^[4],本研究组前期实验发现,利舒康胶囊(Lishukang capsule, LSK)(含手掌参、甘青青兰、烈香杜鹃、红景天、黄柏、甘草)对高原缺氧引起的肺组织损伤有很好疗效^[5]。本研究建立HAPE大鼠模型,通过动物实验和蛋白质组学分析探究利舒康胶囊对HAPE的防治作用及可能的信号通路和分子靶标,为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂及仪器

SPF级Wistar雄性大鼠(180~220 g)购自西安诺优生物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2019-0013;利舒康胶囊,青海益欣药业有限责任公司生产,红景天胶囊,西藏军区总医院生产。抗体 β -actin(批号:GB15003)、AGPAT5(批号:GB112468)、NCAM1(批号:GB112671)、SRSF3(批号:GB113280)、PLA2(批号:GB112773)、HRP-山羊抗兔(批号:GB23303)、HRP-山羊抗兔(批号:GB23303)、HRP-山羊抗小鼠(批号:GB23301)、HRP-山羊抗兔(批号:GB23303)、BCA蛋白定量检测试剂盒(批号:G2026-200T)、Rat IL-1 beta ELISA Kit(批号:GER0002)、Rat IL-6 ELISA Kit(批号:GER0004)、Rat TNF-alpha ELISA Kit(批号:GER0004)购自赛维尔生物科技有限公司, IAM 碘乙酰胺、三乙基碳酸氢铵缓冲液(TEAB)购自Sigma公司;丙酮购自国药集团上海有限公司;质谱级Modified Trypsin蛋白酶购自Promega公司;其它化学试剂均购自Thermo公司。

实验仪器FLYDWC50-II A型低压低氧动物实验舱,中航工业贵州风雷航空军械有限责任公司;BP210S电子天平,荷兰赛多利斯有限公司。TimsTOFpro 2质谱仪, Bruker公司;EASY-nLC 1200色谱系统Thermo公司;ICES-70型制冰机,苏州雪尼电器设备有限公司;Centrifuge 5430R型冷冻离心机, Eppendorf公司;Spectra Max plus384型酶标仪softmax pro, Molecular Devices公司。

1.2 动物模型分组及给药

将LSK胶囊内容物分别加入灭菌注射用水充分研磨至溶解制成低剂量22.4 mg/mL、中剂量42.0 mg/mL、高剂量56.0 mg/mL的药液,红景天胶囊内容物以同样方法制成14.0 mg/mL的药液。HAPE大鼠模型建立参考文献方法^[6],将SPF级健康雄性Wistar大鼠60只随机分为常氧对照组、HAPE组、红景天胶囊(HJT)组、利舒康胶囊(LSK)低、中、高剂量组,每组10只,适应饲养3 d后造模。造模过程如下:第1~5天进行动物跑台适应性训练(跑台速度:12 m/min;电击强度:0.4 mA;跑动时间:20 min);第6~8天按不同组条件设定对各组大鼠分别进行处理,其中低氧处理组(包括HAPE组和药物干预组)海拔上升及下降速度均为10 m/s,最高海拔高度设为7 000 m,昼夜温差20 °C(8:00-20:00 -4 °C, 20:00-8:00 16 °C),低氧处理组跑台速度设定为12 m/min,电刺激强度为0.4 mA;药物干预组于造模前3 d开始灌胃,连续给药7 d,每日1次,按体质量计算剂量为1 mL/100 g,对照组和模型组灌胃给予等量灭菌注射用水。给药后第7天对照组在当地(海拔约1 500 m)、HAPE组和药物干预组在模拟高原环境下(海拔4 000 m),麻醉后迅速解剖取材。

1.3 大鼠肺含水量测定

采用干湿比重法进行肺组织含水量检测。将分离出的左肺上叶组织放入55 °C电热恒温鼓风干燥箱中,直至干重称量误差在0.03 g内,根据如下公式计算大鼠肺含水量:含水量(%)=(湿重-干重)/湿重 \times 100%。

1.4 右肺灌洗液的收集

钝性分离大鼠左侧支气管并用丝线结扎。在右侧气管分叉处缓慢插入16G套管针,丝线固定后连接三通接头,将2 mL冰上预冷的0.9% NaCl溶液缓慢沿右主支气管注入右肺中,回抽即得到肺灌洗液,将其转移至无菌EP管中,以上步骤重复3次。将盥洗液置于离心机中,4 ℃离心(1500 r/min)15 min,吸取灌洗液上清,放置于-80 ℃冰箱冻存待用。

1.5 大鼠肺组织病理学观察

取大鼠完整右肺组织用4%多聚甲醛溶液室温充分展开固定。固定好后,通过常规脱水,石蜡包埋,切片,采用HE染色,并于正置显微镜下放大200倍观察肺组织病理学变化。

1.6 炎症因子含量测定

采用ELISA试剂盒。测定肺泡灌洗液样品中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平。分别向预先包被了TNF- α 、IL-1 β 和IL-6抗原的酶标孔中,加入标准品和样本,温育后,加入生物素标记的抗TNF- α 、IL-1 β 、IL-6抗体。再与HRP标记的链霉亲和素结合,形成免疫复合物,再经过温育和洗涤,去除未结合的酶,然后加入显色底物TMB,产生蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。最后,在450 nm处测定反应孔样品吸光度(OD)值,样本中的5-羟基吲哚乙酸浓度与OD值呈反比,通过绘制标准曲线计算出样本中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的浓度。

1.7 大鼠肺组织蛋白质组学检测

1.7.1 样品制备

冷冻状态下取出适量样品,转移至震荡管中;加入适量的蛋白裂解液(8 mol/L尿素+1%SDS,含蛋白酶抑制剂);使用组织研磨仪震荡3次,每次40 s;冰上裂解30 min,其间每隔5 min涡旋混匀5~10 s;4 ℃,12 000 \times g离心30 min,收集上清;之后通过BCA法测定蛋白含量。

取蛋白样品100 μ g,加入终浓度为100 mmol/L三乙基碳酸氢铵缓冲液(TEAB);加入终浓度10 mmol/L TCEP,在37 ℃下反应60 min;加入终浓度40 mmol/L碘乙酰胺室温下避光反应40 min;每管各加入预冷的丙酮(丙酮:样品体积比6:1),-20 ℃沉淀4 h;10 000 \times g离心20 min,取沉淀;用100 μ L 100 mmol/L TEAB充分溶解样品,加入胰蛋白酶1:50(酶:蛋白)于37 ℃酶解12 h;肽段脱盐、定量、干燥后用0.1%三氟乙酸(TFA)复溶肽段;通过脱盐、抽干待用。

1.7.2 LC-MS/MS分析

采用EASY-nLC 1200液相系统耦合timsTOF Pro2质谱仪进行LC-MS/MS分析。应用质谱上样缓冲液溶解前

处理得到的肽段,经EASY-nLC 1200液相系统进行分离,色谱柱为C₁₈ column(75 μ m \times 25 cm, Ionopticks, USA)。流动相A:含20%乙腈和0.1%甲酸的水溶液,流动相B:含80%乙腈和0.1%甲酸的水溶液。洗脱时间为60 min,梯度洗脱,流动相B比率如下:0~45 min:3%~28%;45~50 min:28%~44%;50~55 min:44%~90%;55~60 min:90%。流速为250 nL/min。纳升级高效液相色谱分离后的样品采用timsTOF Pro2质谱仪(布鲁克,德国)进行质谱分析,电喷雾电压为1.5 kV。用高分辨率TOF法检测和分析了肽母离子及其二级片段。二次质谱扫描范围为100~1700 *m/z*。

1.7.3 数据分析

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3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 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用*t*检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义(双尾)。使用搜库软件Proteome Discoverer 2.2(PD2.2, Thermo)鉴定蛋白,之后将鉴定结果导入Spectronaut(version 14.0, Biognosys)软件生成谱图库。用*T*-test检验对蛋白质定量结果进行统计分析,实验组和对照组相比 $P<0.05$ 且Fold change ≥ 1.5 为上调差异表达, $P<0.05$ 且Fold change ≤ 0.67 为下调差异表达。

1.7.4 生物信息学分析差异表达蛋白质及相关信号通路

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、蛋白质N端乙酰化,固定修饰设置为烷基化,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计算,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*函数计算组间差异性(*P*值)和差异倍数, $P<0.05$ 同时差异倍数大于1.5倍为差异表达蛋白质,并对筛选出的差异表达蛋白质进行散点图可视化分析。选择GO数据库(<http://geneontology.org/>)对LSK组与模型对照组的差异表达蛋白质从生物学过程、细胞组分和分子功能3个方面进行GO注释分析功能聚类分析,同时采用KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>)数据库对这些蛋白质进行信号通路进

行分析。

1.8 Western blot验证差异蛋白表达量

将肺组织匀浆后用提取细胞总蛋白,采用BCA法进行蛋白定量,将蛋白样品变性后经凝胶电泳分离、转膜、封闭后,加入一抗 β -actin、AGPAT5、NCAM1、SRSF3、PLA2(稀释比例分别为1:3000、1:1000、1:2000、1:1000、1:2000),4℃孵育过夜洗膜3次后室温下加入二抗(稀释比例为1:5000)孵育1h;洗膜后显影、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3次。用Image J软件分析各条带灰度值,以 β -actin作为内参,检测各组蛋白的相对表达量(蛋白相对表达量=目的蛋白条带灰度值/内参条带灰度值)。

2 结果

2.1 肺组织含水量和灌洗液中蛋白和炎症因子含量测定

由图1可见,与对照组相比,HAPE模型组左肺含水量升高($P < 0.01$)。与HAPE组比较,LSK各组的左肺含水量

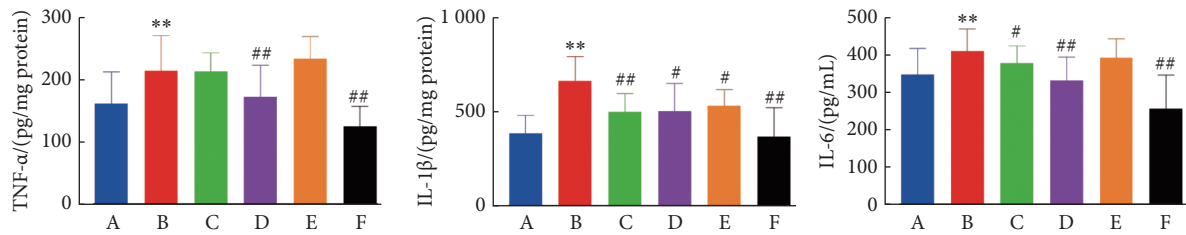


图1 各组大鼠的肺组织含水量和肺泡灌洗液中蛋白含量
Fig 1 Lung tissue water content and protein content in bronchoalveolar lavage fluid of rats in each group

A, Control group; B, HAPE group; C, HJT group; D, 22.4 mg/mL LSK group; E, 42.0 mg/mL LSK group; F, 56.0 mg/mL LSK group. ** $P < 0.01$, vs. control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, vs. HAPE group. $n = 10$.

图2 各组大鼠的肺泡灌洗液中炎症因子含量

Fig 2 The concentration of inflammatory factors in the bronchoalveolar lavage fluid of rats in each group

A, Control group; B, HAPE group; C, HJT group; D, 22.4 mg/mL LSK group; E, 42.0 mg/mL LSK group; F, 56.0 mg/mL LSK group. ** $P < 0.01$, vs. control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, vs. HAPE group. $n = 10$.

2.2 肺组织HE染色结果

图3中可见:对照组的肺泡结构较清晰,肺泡间隙无增宽、肺泡腔内未见明显红细胞及白细胞浸润。经模拟海拔7000 m结合跑台运动48 h处理后,HAPE组的肺组织镜下结构已发生了明显的变化,已形成了肺间质水肿;肺泡上皮细胞略肿胀,肺泡间隙亦有不同程度的增宽,肺泡腔内无明显的液体渗出。与HAPE组比,LSK低中高剂量组和红景天组的上皮细胞肿胀及肺间质水肿均有所减轻,其中LSK高剂量组水肿减轻效果最佳。

2.3 大鼠肺组织蛋白数据质量评价

综合分析肺组织含水量和肺泡灌洗液中蛋白含量以及炎症因子和HE染色数据,LSK高剂量组干预效果最佳,因此后续实验中LSK剂量均采用56.0 mg/mL,通过DIA采集各组样品中的蛋白信息所有匹配到的肽段的相对分子量的真实值与理论值之间的误差分布质量偏差范围

降低($P < 0.05$),其中LSK高剂量组效果最佳。与对照组比较HAPE组右肺组织肺泡灌洗液中蛋白含量明显升高,LSK各组 and HJT组均有所改善,LSK各剂量组中LSK高剂量组含量最低,HJT组低于LSK组,说明肺泡液中蛋白渗出量最少。与对照组相比HAPE组肺泡灌洗液中炎症因子IL-1 β 、TNF- α 、IL-6显著增加,红景天组和利舒康组均有所下降,其中高剂量组下降最为明显,见图2。

在 ± 10 ppm(图4A)。鉴定到的肽段长度在7~25个氨基酸残基之间(图4B、4C),说明质谱检测灵敏度、准确性和通量均达到最佳水平。有超过50%的蛋白覆盖度超过20%(图4D),说明本次检测定量的准确性和可重复性较高。通过以上质控分析,表明此次实验鉴定的蛋白结果具有较好的准确性,数据可信度高。

2.4 组样本蛋白定量重复性检验结果

主成分分析(PCA)结果表明:对照组与HAPE组和LSK组比较,分布区域具有明显差异,平均分布距离较远。说明组内重复性好,组间有可比性。而HAPE组和LSK组比较,该组数据点有重叠,说明在应用相同造模条件下蛋白的表达模式具有一定程度的相似性。

2.5 差异蛋白分析

共鉴定到5250个蛋白,将检测蛋白的丰度值取 \log_{10} 绘制差异蛋白散点图,图中横纵坐标分别表示两个

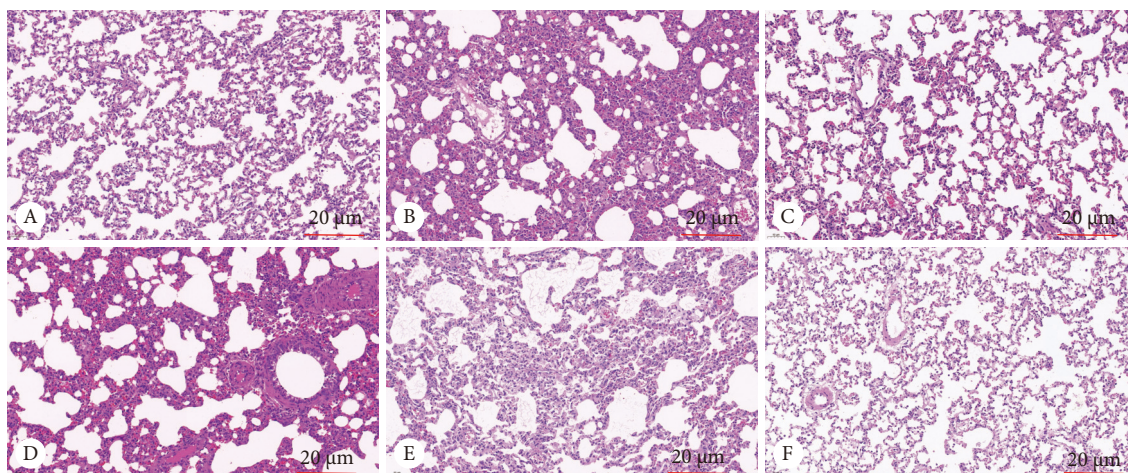


图 3 各组大鼠肺组织 HE 染色的形态学观察

Fig 3 Morphological observation of HE stained lung tissue of rats in each group

A, Control group; B, HAPE group; C, HJT group; D, 22.4 mg/mL LSK group; E, 42.0 mg/mL LSK group; F, 56.0 mg/mL LSK group.

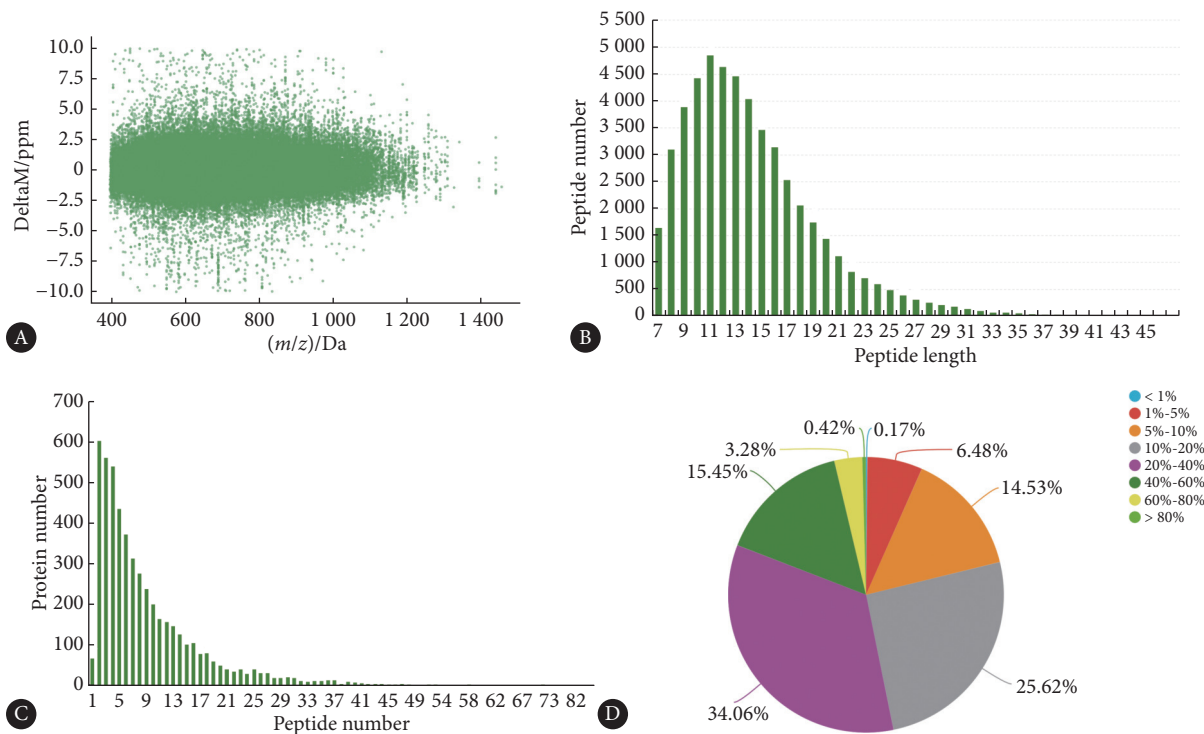


图 4 数据质控情况

Fig 4 Data quality control chart

A, The error distribution between the true and theoretical values of the relative molecular weight of the matched peptide segments; B, length distribution of identified peptide segments; C, the distribution of the number of peptide segments contained in the identified protein; D, the coverage distribution of identified proteins.

样本中蛋白的表达量, 每个点代表一个特定的蛋白质, 越接近0的点, 说明表达量越低; 偏离了对角线程度越大的点表明该蛋白在两个样本间表达差异越大。结果显示: HAPE组与对照组相比, 共有160个蛋白表达上调和228个蛋白表达下调(图5A); 利舒康胶囊高剂量组(LSK)与HAPE组相比, 共有129个蛋白表达上调和126个蛋白表达下调(图5B)。同时, 在 HAPE 组和LSK组中都有表达差

异的蛋白共有112个(图6)。其中差异蛋白在HAPE组中升高, 利舒康胶囊干预后下调的蛋白共有31个; 在HAPE组中降低, 利舒康胶囊干预后上调的蛋白共有81个。

2.6 差异蛋白的功能分析

将图6分析出的表达趋势相反的差异蛋白从细胞组、生物学过程、分子功能、细胞组成3个层次进行Gene Ontology注释。结果显示: 在生物过程中, 差异蛋白主要富

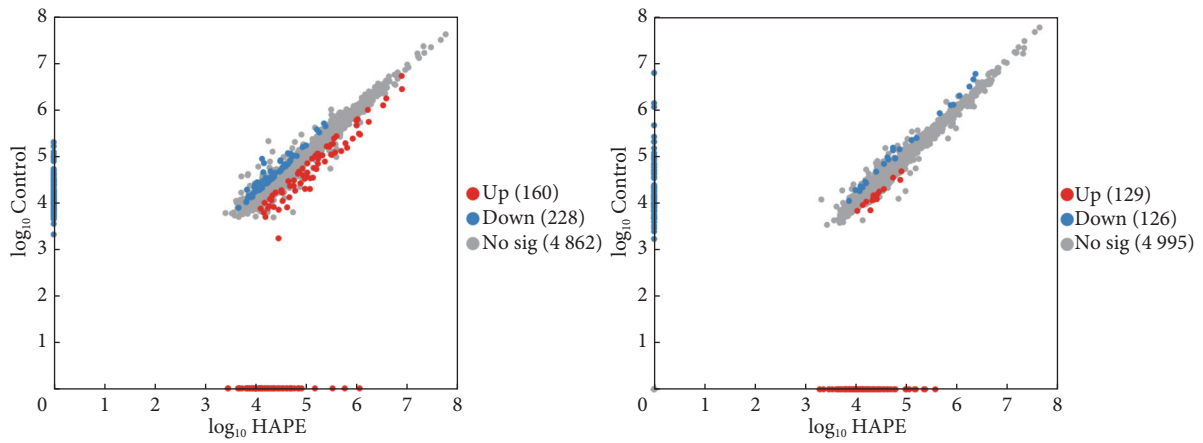


图 5 差异蛋白散点图

Fig 5 Scatter plots of differentially-expressed proteins

A, Between the control group and the HAPE group; B, between the LSK group and the HAPE group.

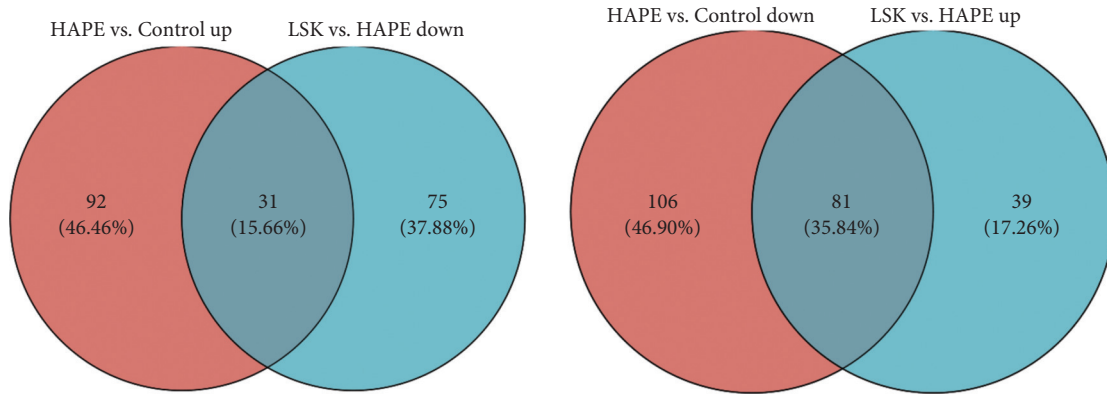


图 6 表达趋势相反的差异蛋白韦恩图

Fig 6 Venn diagrams of differentially-expressed proteins with opposite trends

集在细胞过程、生物调节、代谢过程、对刺激的反应、免疫系统过程、生物黏附行为、结合等, 在细胞组分中, 差异蛋白主要富集在细胞解剖实体、含蛋白复合物等, 在分子功能中, 差异蛋白主要催化活性、转录调节活性、转运活性、分子功能调节剂、ATP依赖性活性、结合活性(图7)。

2.7 KEGG富集分析

通过将筛选的差异蛋白进行KEGG富集(图8), 发现有22个差异蛋白显著富集于自身免疫性甲状腺疾病、移植抗宿主病、细胞黏附分子、同种异体移植排斥反应、糖胺聚糖生物合成、气喘、利什曼病、抗原处理和呈递、核苷酸切除修复、甘油磷脂代谢、单纯疱疹病毒1型感染、癌症中的转录调控异常、1型糖尿病、IgA产生的肠道免疫网络、DNA复制15条通路。其中细胞黏附分子、糖胺聚糖生物合成、核苷酸切除修复/DNA复制、单纯疱疹病毒1型感染、癌症中的转录调控异常5条通路被激活, 而甘油磷脂代谢通路被抑制。RT1.Cg、RT1.Db、RT1-Da、RT1-Uav1、NCAM1、Gypc、Fut8、Rfc5、Nfyc、

Dgkd、AGNPT5、PLA2、Tab1、Irf5、SRSF3、Zbtb16、Igfbp4、Ncor2、Fli1和Ets1参与上述通路, 蛋白对应的信号通路和信号通路中包含的蛋白见表1。

2.8 差异蛋白验证分析

采用Western blot方法对一些潜在功能的差异蛋白进行验证, 结果发现, HAPE模型组大鼠肺组织的AGPAT5和PLA2表达水平相对于正常组均显著升高, 而LSK干预可明显降低这些蛋白的表达水平, 而NCAM1和SRSF3表达降低, 而LSK干预可明显升高这些蛋白的表达水平, Western blot验证的结果与蛋白质组学结果一致(图9)。

3 讨论

本研究通过低压低氧动物实验舱结合跑台训练成功构建HAPE大鼠模型, 通过检测肺组织含水量、病理切片、肺灌洗液中蛋白和炎症因子含量等指标验证了HAPE模型有效性。并在此基础上, 通过剂量筛选实验发现高剂量(560 mg/kg)的利舒康胶囊对HAPE的防治作用

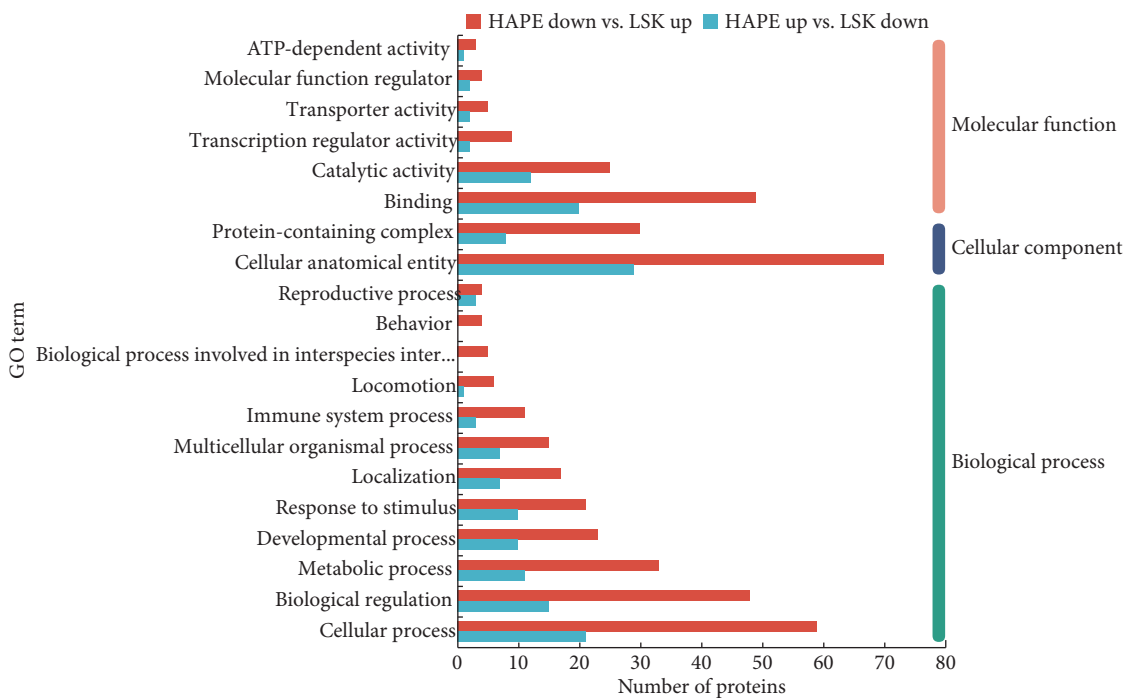


图 7 差异蛋白GO分析图

Fig 7 GO analysis map of differentially-expressed proteins

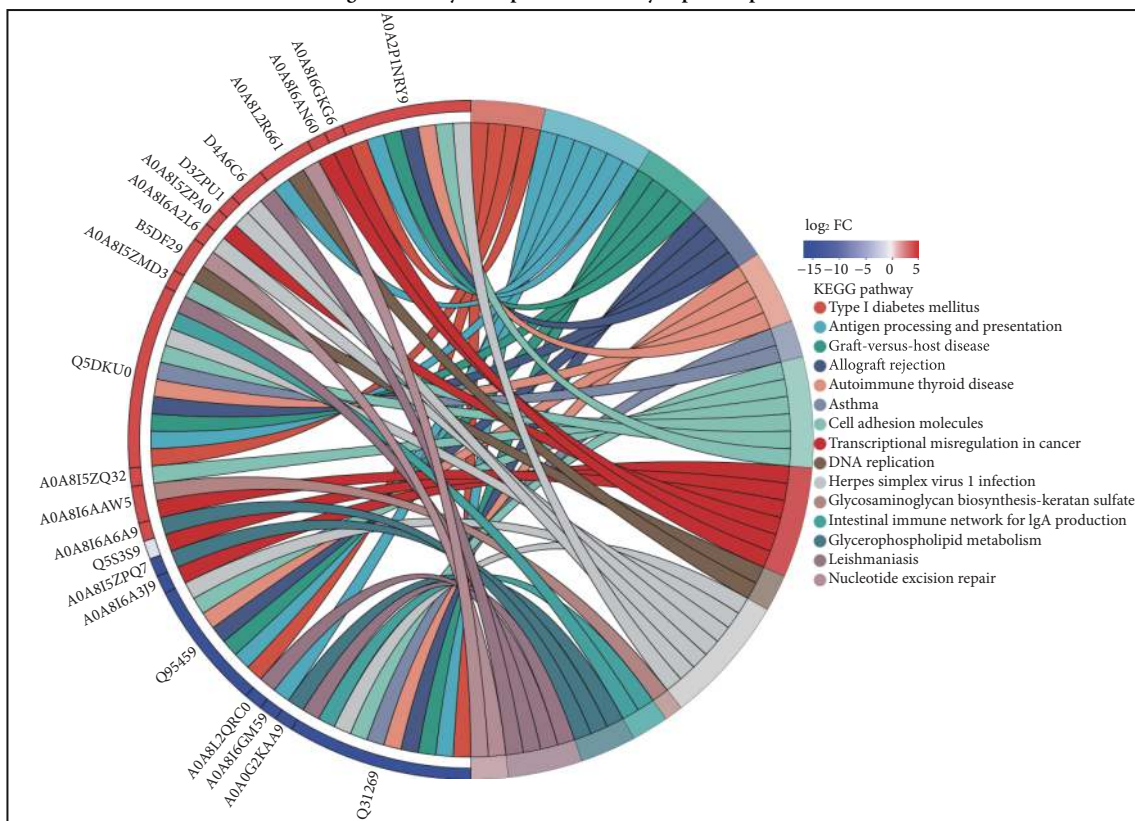


图 8 差异蛋白富集弦图KEGG富集弦图

Fig 8 Chordal graph for KEGG enrichment analysis of differentially-expressed proteins

最佳,且其药效优于阳性对照药物红景天。红景天对于防治高原缺氧肺损伤、改善高原HAPE,改善HAPE的血流动力学与血管通透性,抑制炎症反应、抗氧化应激等方

向均有良好的作用^[7-8]。蛋白质组学分析表明,利舒康胶囊干预后共鉴定出255个差异表达蛋白,其中112个为HAPE组与对照组、LSK组与HAPE组的共有差异表达蛋

表 1 关键差异蛋白及其所在的信号通路
Table 1 1. Key differentially-expressed proteins and the associated signaling pathways

Channel	Accession	Name	HAPE vs. Control			LSK vs. HAPE		
			FC	P	Up/down	FC	P	Up/down
Cell adhesion molecule	Q95459	RT1.Cg	3.04	< 0.001	Up	0.00	< 0.001	Down
	Q5DKU0	RT1.D b	0.00	< 0.001	Down	32.00	< 0.001	Up
	Q31269	RT1-Da	51.38	< 0.001	Up	0.00	< 0.001	Down
	A0A8I5ZQ32	NCAM1	0.00	< 0.001	Down	32.00	< 0.001	Up
	A0A8I5ZMD3	Gypc	0.00	< 0.001	Down	32.00	< 0.001	Up
	A0A2P1NRY9	RT1-Uav1	0.00	< 0.001	Down	32.00	< 0.001	Up
	A0A8I6AAW5	Fut8	0.00	< 0.001	Down	32.00	< 0.001	Up
Asthma	Q5DKU0	RT1.D b	0.00	< 0.001	Down	32.00	< 0.001	Up
	Q31269	RT1-Da	51.38	< 0.001	Up	0.00	< 0.001	Down
DNA replication/nucleotide excision repair	B5DF29	Rfc5	0.00	< 0.001	Down	32.00	< 0.001	Up
	A0A8L2R661	Nfyc	0.00	< 0.001	Down	32.00	< 0.001	Up
Glycerol phospholipid metabolism	A0A8I6A6A9	Dgkd	0.00	< 0.001	Down	32.00	< 0.001	Up
	A0A8I5ZPQ7	AGPAT5	51.38	< 0.001	Up	0.00	< 0.001	Down
	A0A0G2KAA9	PLA2	51.38	< 0.001	Up	0.00	< 0.001	Down
Herpes simplex virus type 1 infection	Q95459	RT1.Cg	3.04	< 0.001	Up	0.00	< 0.001	Down
	Q5DKU0	RT1.D b	0.00	< 0.001	Down	32.00	< 0.001	Up
	Q31269	RT1-Da	51.38	< 0.001	Up	0.00	< 0.001	Down
	D4A6C6	Tab1	0.00	< 0.001	Down	32.00	< 0.001	Up
	D3ZPU1	Irf5	0.00	< 0.001	Down	32.00	< 0.001	Up
	A0A8I6A2L6	SRSF3	0.00	< 0.001	Down	32.00	< 0.001	Up
	A0A2P1NRY9	RT1-Uav1	0.00	< 0.001	Down	32.00	< 0.001	Up
Abnormal transcriptional regulation in cancer	Q5S3S9	Zbtb16	2.90	< 0.001	Up	0.54	< 0.001	Down
	A0A8I6GKG6	Igfbp4	0.00	< 0.001	Down	32.00	< 0.001	Up
	A0A8I6AN60	Ncor2	0.00	< 0.001	Down	32.00	< 0.001	Up
	A0A8I6AAW5	Fut8	0.00	< 0.001	Down	32.00	< 0.001	Up
	A0A8I6A3J9	Fli1	51.38	< 0.001	Up	0.00	< 0.001	Down
	A0A8I5ZPA0	Ets1	0.00	< 0.001	Down	32.00	< 0.001	Up

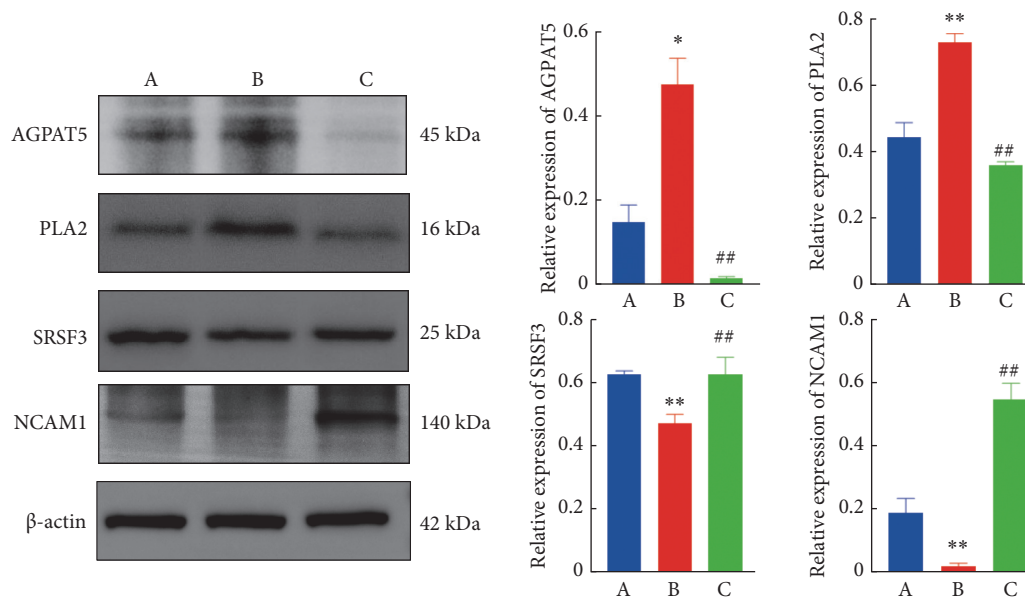


图 9 Western blot验证差异蛋白蛋白表达量

Fig 9 Western blot verification of the expression level of differentially-expressed proteins

A, Control group; B, HAPE group; C, LSK group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. control group; ## $P < 0.01$, vs. HAPE group. $n = 10$.

白。KEGG富集分析发现利舒康胶囊能激活细胞黏附分子/气喘、糖胺聚糖生物合成、DNA复制/核苷酸切除修复等通路,同时抑制甘油磷脂代谢通路。关键调控蛋白包括RT1.Cg、RT1.Db、RT1-Da等20个潜在靶标蛋白,其中Dgkd、AGPAT5和PLA2可能通过抑制甘油磷脂代谢通路发挥重要作用。

在DNA损伤修复方面,本研究发现复制因子C(Rfc5)和核转录因子Y亚单位 γ (NfYC)在HAPE组表达明显下降,经利舒康干预后表达明显回升。Zbtb16、Igfbp4、Ncor2、Fut8、Fli1、Ets1蛋白主要富集于癌症中的转录调控异常通路,是DNA复制与修复及细胞分裂增殖和抗逆生长中重要的功能蛋白^[9-13]。本研究发现HAPE组Zbtb16和Fli1表达升高,经利舒康干预后表达降低;Igfbp4、Ncor2、Fut8、Ets1在HAPE模型组表达降低,经利舒康调节后表达升高,提示利舒康可能通过激活DNA修复机制来对抗缺氧导致的细胞损伤。这可能是由于利舒康的成分中红景天可以帮助提高体内的谷胱甘肽过氧化物酶的活性,使细胞生长不断增值,使细胞死亡率不断降低;甘青青兰能够帮助提高缺氧红细胞超氧化物歧化酶活性,降低耗氧量,从而减轻长时间缺氧、缺血导致的组织损伤^[14]。

在免疫调节方面,细胞黏附分子/气喘通路是调控呼吸系统疾病的重要通路,在肺炎、慢性阻塞性肺疾病、哮喘、肺动脉高压等呼吸系统疾病中起到重要作用,本研究中该通路被激活,RT1.Cg、RT1.Db、RT1-Da、RT1-Uav1、Ncam1、Gypc和Fut8蛋白富集到该通路,神经细胞黏附分子1(neural cell adhesion molecule 1, NCAM1)是细胞黏附分子家族的一员,是一种免疫球蛋白超家族分子,参与影响细胞黏附、迁移、增殖、凋亡、分化,并进一步影响细胞存活及其他功能^[15],在本研究中该蛋白在HAPE模型组显著下降、经利舒康干预后明显上升。本研究中RT1-Uav1、RT1.Cg和RT1-Db1、RT1-Da分别是主要组织相容性复合体MHC-I、MHC-II的不同亚基,主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)在识别抗原、免疫应答及免疫调节等机体免疫中发挥关键作用^[16-17]。利舒康胶囊干预后RT1-Db1和RT1-Uav1蛋白HAPE组表达量较对照组降低,利舒康处理组表达较HAPE组升高,而RT1-Da、RT1.Cg HAPE组较对照组升高,利舒康处理组表达较HAPE组下降,提示利舒康胶囊可能通过促进RT1-Db1和RT1-Uav1的表达降低RT1-Da、RT1.Cg的表达,调节免疫应答反应,利舒康胶囊中甘草、红景天、黄柏、甘青青兰和烈香杜鹃的成分中均具有抗炎、抗菌和调节免疫的作用^[18-21],利舒康胶囊可能由于这些成分的存在进而起到防治高原肺水肿的作用。

在脂代谢调控方面,甘油磷脂(glycerophospholipids, GPLs)是含有磷酸的脂类,甘油磷脂代谢参与细胞的能量代谢和信号转导,是维持机体内稳态的重要途径之一。磷脂酶A2(phospholipase A2, PLA2, Pla2g4a)是调控脂类介质的产生、释放的关键物质,其异常表达及血循环中的过度释放可造成大量炎性介质的释放及膜功能变化^[21]。PLA2广泛参与人体炎症反应,通过催化细胞内膜磷脂水解,产生以花生四烯酸(arachidonic acid, AA)为主的游离脂肪酸,因此被认作是AA类产物生成及其所致后续炎症反应中最为重要的酶。二酰甘油激酶(diacylglycerol kinase, DGKs)是体内肌醇磷脂信号系统的重要调节因子,在细胞分化、增殖、凋亡和细胞骨架重组等生物过程中起到重要作用,Dgkd能将二酰甘油(diacyl glycerol, DAG)磷酸化为磷脂酸(phosphatidic acid, PA)^[22],在本研究中模型组表达升高,利舒康组表达量下降。而磷酸甘油酰基转移酶5(AGPAT5),是磷脂酸从头合成中的关键酶。利舒康胶囊主成分中甘青青兰能提高静止或运动状态下机体的缺氧耐力,明显提高血液中的氧含量,能显著降低低氧性肺动脉高压大鼠肺组织MDA的含量,改善肺小动脉管壁增厚和管腔狭窄,显著升高肺组织GSH-Px和SOD活性,具有很强的抗氧化功能,烈香杜鹃能够帮助降低体内的细胞血管的通透作用^[18-20],有人报道应用大珠红景天注射治疗急性脑梗死60例,血脂血流变异均改善^[23],在本研究中,利舒康胶囊可以通过抑制PLA2、AGPAT5的表达进而抑制甘油磷脂通路,可能是由于烈香杜鹃、甘青青兰的调节脂代谢和血流变作用而对高原缺氧导致的肺水肿具有防治作用。

综上所述,此次研究从蛋白质组学层面揭示了利舒康胶囊防治HAPE的多靶点作用机制,为藏药现代化研究提供了新的科学依据。我们后续将进一步利用多组学研究方式结合,并且验证筛选出的效应蛋白,多角度诠释利舒康胶囊抗高原肺水肿的作用机制。

* * *

作者贡献声明 张冬梅负责论文构思、正式分析、经费获取、研究方法、验证、可视化、初稿写作和审读与编辑写作,杨陈煜负责正式分析、验证和可视化,李晓琳负责研究方法、验证和可视化,邵杰负责经费获取、研究方法和验证,李文斌负责论文构思、数据审编、正式分析和审读与编辑写作,王荣负责论文构思、数据审编、经费获取、研究项目管理和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表的版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution ZHANG Dongmei is responsible for conceptualization, formal analysis, funding acquisition, methodology, validation, visualization, writing--original draft, and writing--review and editing. YANG Chenyu is responsible for formal analysis, validation, and

visualization. LI Xiaolin is responsible for methodology, validation, and visualization. SHAO Jie is responsible for funding acquisition, methodology, and validation. LI Wenbin is responsible for conceptualization, data curation, formal analysis, and writing--review and editing. WANG Rong is responsible for conceptualization, data curation, funding acquisition, project administration, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests All authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- EICHSTAEDT C A, BENJAMIN N, GRÜNIG E. Genetics of pulmonary hypertension and high-altitude pulmonary edema. *J Appl Physiol* (1985), 2020, 128(5): 1432-1438. doi: 10.1152/jappphysiol.00113.2020.
- TETZLAFF K, SWENSON E R, BÄRTSCH P. An update on environment-induced pulmonary edema--"when the lungs leak under water and in thin air". *Front Physiol*, 2022, 13: 1007316. doi: 10.3389/fphys.2022.1007316.
- EL ALAM S, PENA E, AGUILERA D, *et al.* Inflammation in pulmonary hypertension and edema induced by hypobaric hypoxia exposure. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12656. doi: 10.3390/ijms232012656.
- ZUBIETA-CALLEJA G, ZUBIETA-DEURIOSTE N. The oxygen transport triad in high-altitude pulmonary edema: a perspective from the high andes. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18(14): 7619. doi: 10.3390/ijerph18147619.
- 孟盼盼, 郭建魁, 王荣, 等. 利舒康胶囊对模拟高原缺氧大鼠肺组织损伤的保护作用. *解放军医药杂志*, 2020, 32(5): 9-13. doi: 10.3969/j.issn.2095-140X.2020.05.003.
- MENG P P, GUO J K, WANG R, *et al.* Protective effect of Lishukang capsule on lung tissue damage of rats exposed to simulated high-altitude hypoxia. *Med Pharm J Chin PLA*, 2020, 32(5): 9-13. doi: 10.3969/j.issn.2095-140X.2020.05.003.
- ZHANG S, WANG N, MA H, *et al.* A stable rat model of high altitude pulmonary edema established by hypobaric hypoxia combined diurnal temperature fluctuation and exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, 2025, 744: 151193. doi: 10.1016/j.bbrc.2024.151193.
- 田丹丹, 郝少君, 耿秀丽. 红景天胶囊抗高原肺水肿的研究进展. *中国药师*, 2015, 18(1): 133-136.
- TIAN D D, HAO S J, GENG X L. Research progress in the effect of anti-high altitude plateau pulmonary edema of rhodiola capsules. *Chin Pharm*, 2015, 18(1): 133-136.
- 孙月梅, 秦宁宁, 季前, 等. 红景天苷改善高原认知功能的靶点及分子机制研究. *四川大学学报(医学版)*, 2025, 56(1): 112-119. doi: 10.12182/20250160603.
- SUN Y M, QIN N N, JI Q, *et al.* Targets and molecular mechanisms of salidroside in improving high-altitude cognitive function. *J Sichuan Univ (Med Sci)*, 2025, 56(1): 112-119. doi: 10.12182/20250160603.
- WANG M, XIE T, WU Y, *et al.* Identification of RFC5 as a novel potential prognostic biomarker in lung cancer through bioinformatics analysis. *Oncol Lett*, 2018, 16(4): 4201-4210. doi: 10.3892/ol.2018.9221.
- ALAM H, LI N, DHAR S S, *et al.* HP1 γ promotes lung adenocarcinoma by downregulating the transcription-repressive regulators NCOR2 and ZBTB7A. *Cancer Res*, 2018, 78(14): 3834-3848. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3571.
- SHI M, NAN X R, LIU B Q. The multifaceted role of FUT8 in tumorigenesis: from pathways to potential clinical applications. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2): 1068. doi: 10.3390/ijms25021068.
- YANG J, GRIFFITHS M, NIES M K, *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-2: a new circulating indicator of pulmonary arterial hypertension severity and survival. *BMC Medicine*, 2020, 18(1): 268. doi: 10.1186/s12916-020-01734-3.
- SONG Y, DU J, LU P, *et al.* LncRNA NFYC-AS1 promotes the development of lung adenocarcinomas through autophagy, apoptosis, and MET/c-Myc oncogenic proteins. *Ann Transl Med*, 2021, 9(21): 1621. doi: 10.21037/atm-21-4995.
- 王倩, 杨建鑫, 刘贵琴, 等. 藏药治疗脑缺血性疾病的研究进展. *药学研究*, 202140 (2): 97-102. doi: 10.13506/j.cnki.jpr.2021.02.008.
- WANG Q, YANG J X, LIU G Q, *et al.* Research progress of Tibetan medicine on cerebral ischemic diseases. *J Pharm Res*, 202140 (2): 97-102. doi: 10.13506/j.cnki.jpr.2021.02.008.
- ULM C, SAFFARZADEH M, MAHAVADI P, *et al.* Soluble polysialylated NCAM: a novel player of the innate immune system in the lung. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(19): 3695-3708. doi: 10.1007/s00018-013-1342-0.
- MILILLO M A, TROTTA A, SERAFINO A, *et al.* Bacterial RNA contributes to the down-modulation of MHC-II expression on monocytes/macrophages diminishing CD4⁺ T cell responses. *Front Immunol*, 2019, 10: 2181. doi: 10.3389/fimmu.2019.02181.
- DAI K Z, RYAN J C, NAPER C, *et al.* Identification of MHC class I b ligands for stimulatory and inhibitory Ly49 receptors and induction of potent NK cell alloresponses in rats. *J Immunol*, 2018, 200(8): 2847-2859. doi: 10.4049/jimmunol.1701464.
- 罗建萍, 刘文星, 周敏, 等. 藏药唐古特青兰的化学成分和生物活性研究进展. *云南民族大学学报(自然科学版)*, 2021, 30(4): 305-310. doi: 10.3969/j.issn.1672-8513.2021.04.001.
- LUO J P, LIU W X, ZHOU M, *et al.* Research progress on chemical constituents and biological activities of traditional Tibetan herbal medicine *Dracocephalum tanguticum*. *J Yunnan Minzu Univ(Nat Sci Ed)*, 2021, 30(4): 305-310. doi: 10.3969/j.issn.1672-8513.2021.04.001.
- 尼珍, 格桑顿珠. 藏药甘青青兰的研究进展. *中国民族医药杂志*, 2021, 27(6): 67-70. doi: 10.3969/j.issn.1006-6810.2021.06.034.
- 杨琪, 明显均, 王秀娟, 等. 红景天苷通过miRNA-210-3p/E2F3抑制非小细胞肺癌细胞的增殖和迁移. *现代肿瘤医学*, 2023, 31(4): 625-631. doi: 10.3969/j.issn.1672-4992.2023.04.006.
- YANG Q, MING Y J, WANG X J, *et al.* Salidroside suppresses proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells via miRNA-210-sp/E2F3. *Modern Oncology*, 2023, 31(4): 625-631. doi: 10.3969/j.issn.1672-4992.2023.04.006.
- LINGELEM A B D, KAVALIAUSKIENE S, HALSNE R, *et al.* Diacylglycerol kinase and phospholipase D inhibitors alter the cellular lipidome and endosomal sorting towards the Golgi apparatus. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(3): 985-1009. doi: 10.1007/s00018-020-03551-6.
- KARAGIOTA A, CHACHAMI G, PARASKEVA E. Lipid metabolism in cancer: the role of acylglycerolphosphate acyltransferases (AGPATs). *Cancers (Basel)*, 2022, 14(1): 228. doi: 10.3390/cancers14010228.
- 刘沛, 蔡宏斌, 刘志艳, 等. 大珠红景天对高原急性脑梗死患者血清超氧化物歧化酶、丙二醛等指标水平的影响. *中华全科医学*, 2016, 14(2): 176-178. doi: 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.2016.02.003.
- LIU P, CAI H B, LIU Z Y, *et al.* Effect of rhodiola on serum SOD, MDA, OX-LDL and MMP-2 levels in patients with acute cerebral infarction in plateau areas. *Chin J Gen Prac*, 2016, 14(2): 176-178. doi: 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.2016.02.003.

(2024-06-17收稿, 2025-07-25修回)

编辑 汤洁



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

© 2025 《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*