

- [27] Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu I I, et al. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer: from molecular landscape to clinical aspects[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 173.
- [28] Qiao L, Dong C, Ma B. UBE2T promotes proliferation, invasion and glycolysis of breast cancer cells by regulating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2022, 42(2): 151-159.
- [29] Li H, Prever L, Hirsch E, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(14): 3517.
- [30] Fontana F, Giannitti G, Marchesi S, et al. The PI3K/Akt pathway and glucose metabolism: a dangerous liaison in cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(8): 3113-3125.
- [31] Shao M, Pan Q, Tan H, et al. CYP3A5 unexpectedly regulates glucose metabolism through the Akt-TXNIP-GLUT1 axis in pancreatic cancer[J]. *Genes Dis*, 2024, 11(4): 101079.
- [32] Zhang T, Zhu X, Wu H, et al. Targeting the ROS/PI3K/Akt/HIF-1 $\alpha$ /HK2 axis of breast cancer cells: combined administration of polydatin and 2-deoxy-D-glucose[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(5): 3711-3723.
- [33] Cheng S C, Quintin J, Cramer R A, et al. mTOR- and HIF-1 $\alpha$ -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity[J]. *Science*, 2014, 345(6204): 1250684.
- [34] Shin N, Lee H J, Sim D Y, et al. Apoptotic effect of compound K in hepatocellular carcinoma cells via inhibition of glycolysis and Akt/mTOR/c-Myc signaling[J]. *Phytother Res*, 2021, 35(7): 3812-3820.
- [35] Zhang Y, Liu L, Qi Y, et al. Lactic acid promotes nucleus pulposus cell senescence and corresponding intervertebral disc degeneration via interacting with Akt[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2024, 81(1): 24.
- [36] Qian J, Gong Z C, Zhang Y N, et al. Lactic acid promotes metastatic niche formation in bone metastasis of colorectal cancer[J]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19(1): 9.
- [37] Wang S, Cheng Z, Cui Y, et al. PTPRH promotes the progression of non-small cell lung cancer via glycolysis mediated by the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 819.

## 基于 eNOS/NO/c-Src 信号通路探讨山柰酚对缺氧诱导大鼠视网膜微血管内皮细胞损伤的影响

李 娜<sup>1</sup>, 李占强<sup>2</sup>, 刘焯炳<sup>1</sup>, 刘 旭<sup>1</sup>, 谭大勇<sup>3\*</sup>

(1. 青海大学附属医院眼科, 青海 西宁 810001; 2. 青海大学高原医学研究中心, 青海 西宁 810001; 3. 青海大学附属医院普通外科一科, 青海 西宁 810001)

**摘要:** 目的 探讨山柰酚对低氧所致大鼠视网膜微血管内皮细胞 (rRMECs) 损伤的保护作用。方法 采用 CCK-8 法筛选山柰酚保护 rRMECs 的有效浓度, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, DCFH-DA 法检测 ROS 水平, ELISA 法检测 SOD 活性和 MDA 水平, Western blot 法检测 eNOS、p-eNOS、c-Src、p-c-Src、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达, 并测定 NO 水平。采用 eNOS 抑制剂 L-NAME (10  $\mu$ mol/L) 验证阻断 eNOS/NO/c-Src 信号后山柰酚对视网膜内皮细胞的作用。结果 在常氧条件下, 山柰酚在小于 32  $\mu$ mol/L 的浓度下对 rRMECs 无毒性; 与常氧组比较, 低氧组 (1% O<sub>2</sub>, 12 h) rRMECs 活力降低 ( $P < 0.01$ ), p-eNOS 蛋白表达升高 ( $P < 0.01$ )。与低氧组比较, 山柰酚组细胞增殖增加 ( $P < 0.01$ ), 细胞凋亡减少 ( $P < 0.01$ ), NO 水平、SOD 活性及 Bcl-2、p-eNOS 蛋白表达升高 ( $P < 0.01$ ), ROS、MDA 水平及 Bax 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), p-eNOS 和 p-c-Src 蛋白表达升高 ( $P < 0.01$ ), 而 eNOS 抑制剂 L-NAME 逆转了山柰酚对低氧致 rRMECs 氧化应激损伤的保护作用 ( $P < 0.01$ )。结论 山柰酚在低氧条件下通过活化 eNOS/NO/c-Src 信号通路对 rRMECs 发挥保护作用, 抑制细胞凋亡, 减少氧化应激, 在治疗低氧相关视网膜血管损伤中具有潜在应用价值。

**关键词:** 山柰酚; rRMECs; 低氧损伤; 氧化应激; eNOS/NO/c-Src 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)03-1002-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2026.03.042

收稿日期: 2025-10-11

基金项目: 青海省科技计划项目 (2023-ZJ-768); 2024 年青海省“昆仑英才·高端创新创业人才”项目 (2024 年)

作者简介: 李 娜 (1982—), 女, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 从事抗缺氧中藏药防治缺血缺氧性视网膜病变的研究。E-mail: cq\_na\_li@yeah.net

\* 通信作者: 谭大勇 (1981—), 男 (蒙古族), 硕士, 副主任医师, 硕士生导师, 从事抗缺氧中藏药研究。E-mail: 513191840@qq.com

视网膜病变与缺氧之间存在密切的关联,如视网膜静脉阻塞、糖尿病视网膜病变、高海拔引起的视网膜病变等<sup>[1]</sup>。缺氧会导致血管稳态失衡和内皮功能障碍,是引发高海拔视网膜病变的主要原因之一<sup>[2]</sup>。研究表明,氧化应激和NO生物利用度降低是解释急性和慢性缺氧对内皮功能造成有害影响的关键机制<sup>[3]</sup>。内皮细胞中NO的生成依赖于eNOS<sup>[4]</sup>。eNOS功能障碍或导致NO生物利用度降低,损害内皮依赖性血管舒张<sup>[4]</sup>。另外,氧化应激诱导的ROS直接与NO反应形成过氧亚硝酸盐,降低NO的生物利用度<sup>[5]</sup>。NO能通过S-亚硝基化修饰细胞Src酪氨酸激酶(cellular Src tyrosine kinase, c-Src)的半胱氨酸残基改变活性,从而激活s-Src<sup>[6]</sup>。既往研究也报道了视网膜病变中eNOS通过调节下游c-Src信号从而改变血管通透性,并且可以通过阻断NO的生成来选择性地抑制该途径<sup>[7]</sup>。

山柰酚由于其抗氧化、抗炎、抗癌、心血管保护等作用受到了广泛关注<sup>[8-10]</sup>。研究表明,山柰酚可减少视网膜神经节细胞死亡<sup>[11]</sup>,对多种内皮细胞损伤具有保护作用<sup>[12-13]</sup>,但其对缺氧诱导内皮细胞损伤的具体作用尚待进一步探索。

本研究旨在筛选山柰酚对低氧损伤血管内皮细胞的有效保护浓度,探讨其在低氧条件下是否通过介导eNOS/NO/c-Src信号通路影响细胞凋亡与氧化应激,以期为进一步研究山柰酚在治疗缺氧相关视网膜病变中的潜在应用提供科学依据。

## 1 材料

1.1 细胞及培养基 大鼠视网膜微血管内皮细胞(rRMECs,货号RAT-iCell-m009)、原代内皮细胞培养体系(培养基,货号PriMed-iCell-002),购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司。

1.2 试剂与仪器 山柰酚(货号HY-14590)购自美国MedChemExpress公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒(货号A001-3-1)、NO测定试剂盒(货号A013-2-1)、丙二醛(MDA)测定试剂盒(货号A003-1-1)购自南京建成生物工程研究所;CCK-8试剂盒(货号BS350B)、增强化学发光(ECL)试剂盒(特超敏,货号BL520B)购自北京兰杰柯科技有限公司;Annexin V-APC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(货号KGA1030)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;ROS检测试剂盒(货号S0033S)、eNOS一抗(货号AF3247)购自上海碧云天生物技术有限

公司;Bax一抗(货号A19684)、 $\beta$ -actin一抗(货号AC026)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;Bcl-2一抗(货号68103-1-Ig)和c-Src一抗(货号11097-1-AP)购自美国Proteintech公司;p-eNOS一抗(货号BS-3426R)、二抗山羊抗兔IgG(H+L)HRP(货号S0001)购自美国Affinity公司;p-Src一抗(Tyr418)(货号BS-3426R)购自北京博奥森生物技术有限公司。Cytoflex流式分析仪购自美国贝克曼库尔特公司;ELx800酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司。

## 2 方法

2.1 细胞培养 取冻存细胞,置于37℃水浴锅中轻轻晃动,直至冻存液完全融化,转移至1.5 mL离心管中,加入3倍体积的新鲜培养基,250 ×g离心5 min,去除上清后再加入新鲜培养基,将细胞转移至培养瓶中,置于孵箱中培养。细胞传代过程中,加入预热的培养液、胰酶和磷酸盐缓冲液(PBS),消化细胞并终止消化,离心,去除上清后加入新鲜培养基,以1:3比例传代培养,确保细胞活性与生长,取传代的细胞用于实验。

2.2 细胞分组及缺氧模型构建 分组一:常氧组和低氧组,培养12、24、36、48 h。分组二:常氧条件下0、0.1、0.32、1、3.2、10、32、100、320、1 000  $\mu\text{mol/L}$ 山柰酚;低氧条件下0、0.1、0.32、1、3.2、10、32、100、320、1 000  $\mu\text{mol/L}$ 山柰酚;分组三:常氧组、低氧组、山柰酚组;分组四:常氧组、低氧组、山柰酚组、L-NAME组(eNOS抑制剂)。低氧组造模时间为12 h,低氧条件的氧气体积分数为1%,分组三和四的山柰酚浓度均为1  $\mu\text{mol/L}$ ,L-NAME浓度均为10  $\mu\text{mol/L}$ ,山柰酚组处理条件为低氧+山柰酚,L-NAME组处理条件为低氧+山柰酚+L-NAME。

2.3 CCK-8法检测rRMECs活力 取对数生长期的rRMECs,经PBS洗涤、胰酶消化后离心收集,调整细胞密度为 $5 \times 10^4$ 个/mL,接种于96孔板中,使用无菌PBS填充边缘孔,放入37℃、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱中培养。按“2.2”项下分组一、分组二、分组三对细胞进行处理,每组设置3个重复。首先观察12、24、36、48 h低氧处理对内皮细胞活力的影响,筛选最佳处理时间。药物作用12 h后,吸弃上清,按1:10比例稀释CCK-8试剂,并将稀释后的工作液加入各孔,晃动培养板后继续培养2 h,使用酶标仪在450 nm波长处测定各孔的光密度。

2.4 Western blot 法检测 Bax、Bcl-2、eNOS、p-eNOS、c-Src、p-c-Src 蛋白表达 按“2.2”项下分组三和分组四进行处理,收集细胞,使用 RIPA (RIPA lysis buffer) 裂解液提取总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度,通过 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,并将其转移到 PVDF 膜上。将 PVDF 膜浸泡在 5% 脱脂牛奶中,室温封闭 1 h,加入 eNOS (1 : 1 000)、p-eNOS (1 : 1 000)、c-Src (1 : 1 000)、p-c-Src (1 : 2 000)、Bax (1 : 2 000)、Bcl-2 (1 : 5 000)、 $\beta$ -actin (1 : 50 000) 一抗,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,随后加入生物素化的 IgG (H+L) 二抗 (1 : 8 000),室温孵育 1 h。最后使用 ECL 试剂显影,采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值,以  $\beta$ -actin 为内参,计算目的蛋白相对表达量。

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡情况 取对数生长期的 rMECs,调节细胞密度为  $2 \times 10^5$  个/孔,接种于 6 孔板中,每孔 2 mL,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下恒温培养。根据“2.2”项下分组四进行处理,吸取上清液于对应编号的离心管中备用,PBS 洗涤细胞 1 次,吸弃上清。用胰酶 [不含乙二胺四乙酸 (EDTA)] 消化,待细胞质回缩、细胞之间不再连接成片时,加入已收集的细胞上清液终止消化并收集于对应离心管中,250  $\times g$  离心 5 min,吸弃上清,加入适量 PBS 洗涤,并将悬液转移至 1.5 mL 尖底 EP 管中,250  $\times g$  离心 5 min,吸弃上清,获得细胞沉淀。用 500  $\mu\text{L}$  的 Binding Buffer 重悬细胞后,加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-APC 轻轻吹匀,再加入 5  $\mu\text{L}$  的 PI 混匀,室温避光反应 15 min,上机检测各组细胞的凋亡情况。

2.6 DCFH-DA 法检测 ROS 水平 将对数生长期的 rMECs 接种于 6 孔板,每孔  $2 \times 10^5$  个细胞。待细胞贴壁后,按“2.2”项下分组四给药,每组设置 3 个重复。细胞给药完成后,收集细胞,PBS 清洗 2 次。将探针加入细胞中,制成 500  $\mu\text{L}$  含 5 mol/L DCFH-DA 的细胞悬液,37  $^{\circ}\text{C}$  避光反应 30 min,离心后用 PBS 清洗 2 次。选择 FITC 通道检测 ROS 水平。

2.7 ELISA 法检测 SOD 活性和 MDA 水平 按“2.2”项下分组四进行处理,收集细胞,并进行匀浆,离心,收集上清液,并根据试剂盒说明书操作,检测 SOD 活性和 MDA 水平。

2.8 NO 含量测定 按“2.2”项下分组四进行处理,收集细胞,并进行匀浆,离心后取上清液。将 200  $\mu\text{L}$  稀释好的标准品溶液和待测细胞上清液分

别加入 1.5 mL 离心管中,每管加入 200  $\mu\text{L}$  硫酸盐溶液并涡旋混匀,再加入 100  $\mu\text{L}$  碱溶液涡旋混匀。室温静置 15 min 后,离心 10 min,取 160  $\mu\text{L}$  上清液并加入酶标板孔内,最后每孔加入 80  $\mu\text{L}$  显色剂工作液。振荡混匀 2 min,室温静置 15 min,用酶标仪测定 550 nm 波长处的吸光度,计算 NO 含量。

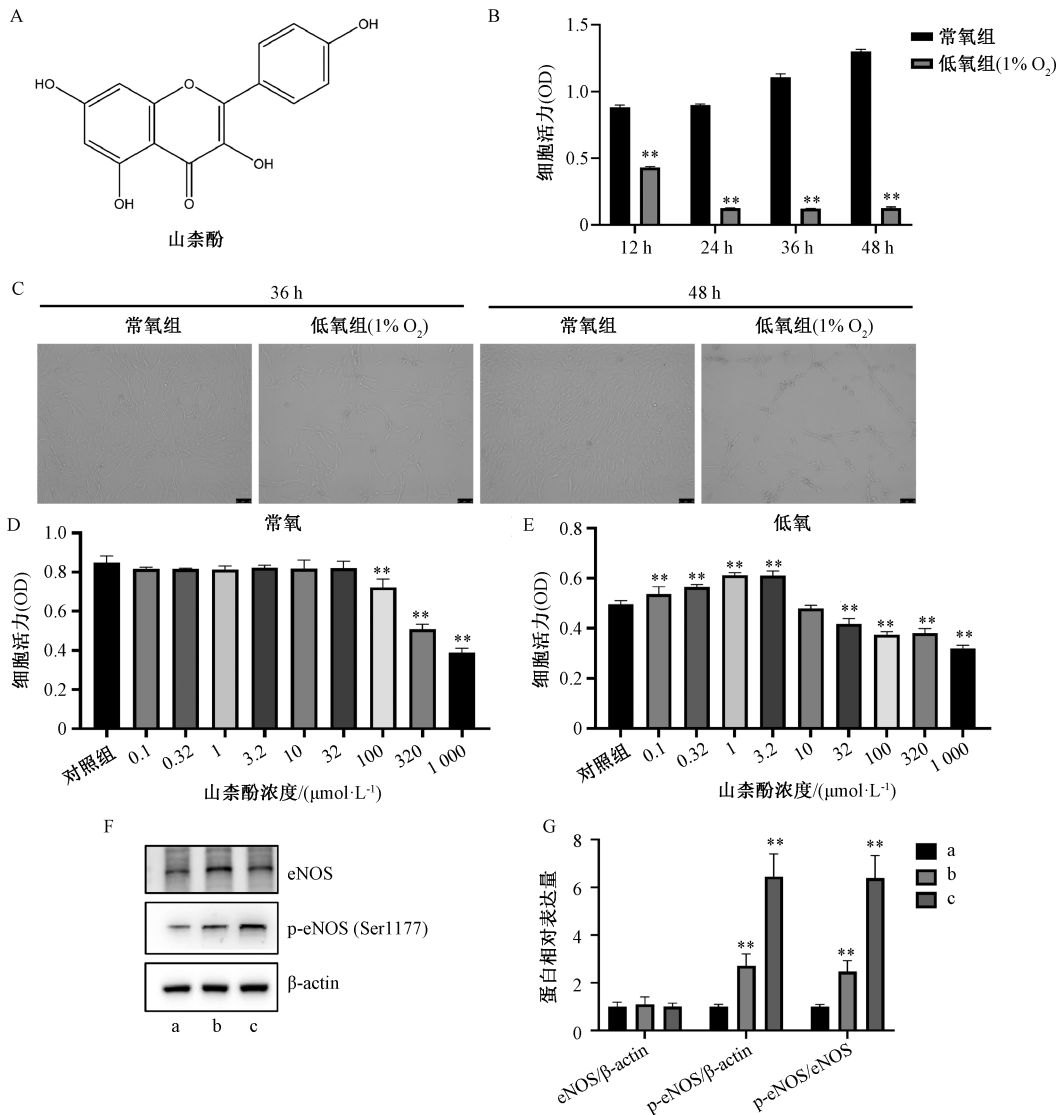
2.9 统计学分析 数据以平均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用 One-way 单因素方差分析,事后多重检验采用 Tukey 法。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

3.1 山柰酚保护 rMECs 的有效浓度筛选 山柰酚是一种天然的黄酮类化合物,结构见图 1A。如图 1B 所示,与常氧组比较,低氧条件下培养 12 h 后,rMECs 活力降低 ( $P < 0.01$ )。如图 1C 所示,缺氧状态下细胞大量死亡,存活者形态高度异质性。如图 1D 所示,常氧条件下,浓度小于 32  $\mu\text{mol/L}$  的山柰酚对细胞无毒性 ( $P > 0.05$ )。低氧条件下处理 12 h,1  $\mu\text{mol/L}$  山柰酚具有促进细胞增殖的作用 ( $P < 0.01$ ),见图 1E。故选择 1  $\mu\text{mol/L}$  山柰酚用于后续实验。由图 1F~1G 可知,与常氧组比较,低氧组及山柰酚组 p-eNOS、p-eNOS/eNOS 表达升高 ( $P < 0.01$ ),且以山柰酚组更明显。

3.2 山柰酚对 rMECs 凋亡的影响 由图 2A 可知,与常氧组比较,低氧组细胞活性降低 ( $P < 0.01$ );与低氧组比较,山柰酚组细胞活力升高 ( $P < 0.01$ );与山柰酚组比较,L-NAME 组细胞活力降低 ( $P < 0.01$ )。由图 2B~2C 可知,与常氧组比较,低氧组细胞凋亡率升高 ( $P < 0.01$ );与低氧组比较,山柰酚组细胞凋亡率降低 ( $P < 0.01$ );与山柰酚组比较,L-NAME 组细胞凋亡率升高 ( $P < 0.01$ )。由图 2D~2E 可知,与常氧组比较,低氧组 Bax、Bax/Bcl-2 表达升高 ( $P < 0.01$ ),Bcl-2 表达降低 ( $P < 0.01$ );与低氧组比较,山柰酚组 Bax、Bax/Bcl-2 表达降低 ( $P < 0.01$ ),Bcl-2 表达升高 ( $P < 0.01$ );与山柰酚组比较,L-NAME 组 Bax、Bax/Bcl-2 表达升高 ( $P < 0.01$ )。

3.3 山柰酚对 rMECs 氧化应激的影响 由图 3A~3B 可知,与常氧组比较,低氧组 ROS 水平升高 ( $P < 0.01$ );与低氧组比较,山柰酚组 ROS 水平降低 ( $P < 0.01$ );与山柰酚组比较,L-NAME 组 ROS 水平升高 ( $P < 0.01$ ),表明 L-NAME 抵消了山柰酚对 ROS 的抑制效果。由图 3C 可知,与常氧组



注：a 为常氧组，b 为低氧组，c 为山柰酚组。与常氧组比较，\*\*  $P < 0.01$ 。

图 1 山柰酚有效浓度筛选 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

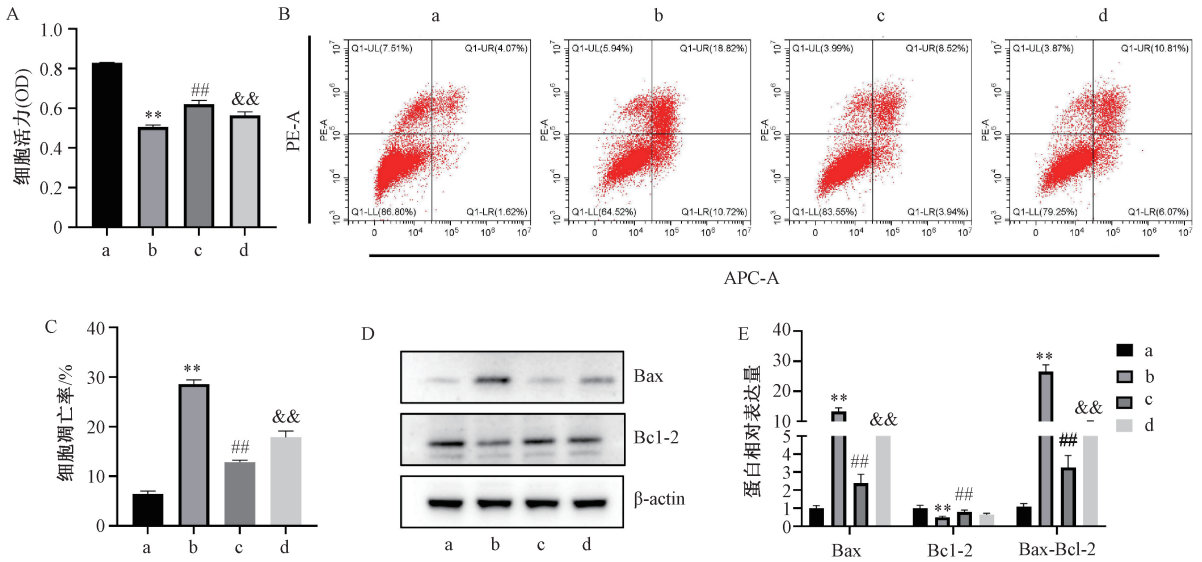
比较，低氧组 SOD 活力减弱 ( $P < 0.01$ )；与低氧组比较，山柰酚组 SOD 活性增强 ( $P < 0.01$ )；与山柰酚组比较，L-NAME 组 SOD 活性减弱 ( $P < 0.01$ )。由图 3D 可知，与常氧组比较，低氧组 MDA 水平升高 ( $P < 0.01$ )；与低氧组比较，山柰酚组 MDA 水平降低 ( $P < 0.01$ )；与山柰酚组比较，L-NAME 组 MDA 水平升高 ( $P < 0.05$ )。

3.4 山柰酚对 rRMECs 中 eNOS/NO/c-Src 信号通路相关蛋白表达的影响 由图 4A 可知，与常氧组比较，低氧组 NO 水平稍升高，但差异不显著 ( $P > 0.05$ )；与低氧组比较，山柰酚组 NO 水平升高 ( $P < 0.01$ )；与山柰酚组比较，L-NAME 组 NO 水平降低。由图 4B~4D 可知，与常氧组比较，低氧组 p-eNOS、p-c-Src、p-cSrc/c-Src、p-eNOS/eNOS 表达升高 ( $P < 0.01$ )；与低氧组比较，山柰

酚组 p-eNOS、p-c-Src、p-cSrc/c-Sr、p-eNOS/eNOS 表达升高 ( $P < 0.01$ )；与山柰酚组比较，L-NAME 组 p-eNOS、p-c-Src、p-cSrc/c-Src 和 p-eNOS/eNOS 表达降低 ( $P < 0.01$ )。eNOS、c-Src 在常氧组和低氧组表达一致，且不受山柰酚和 L-NAME 的影响。

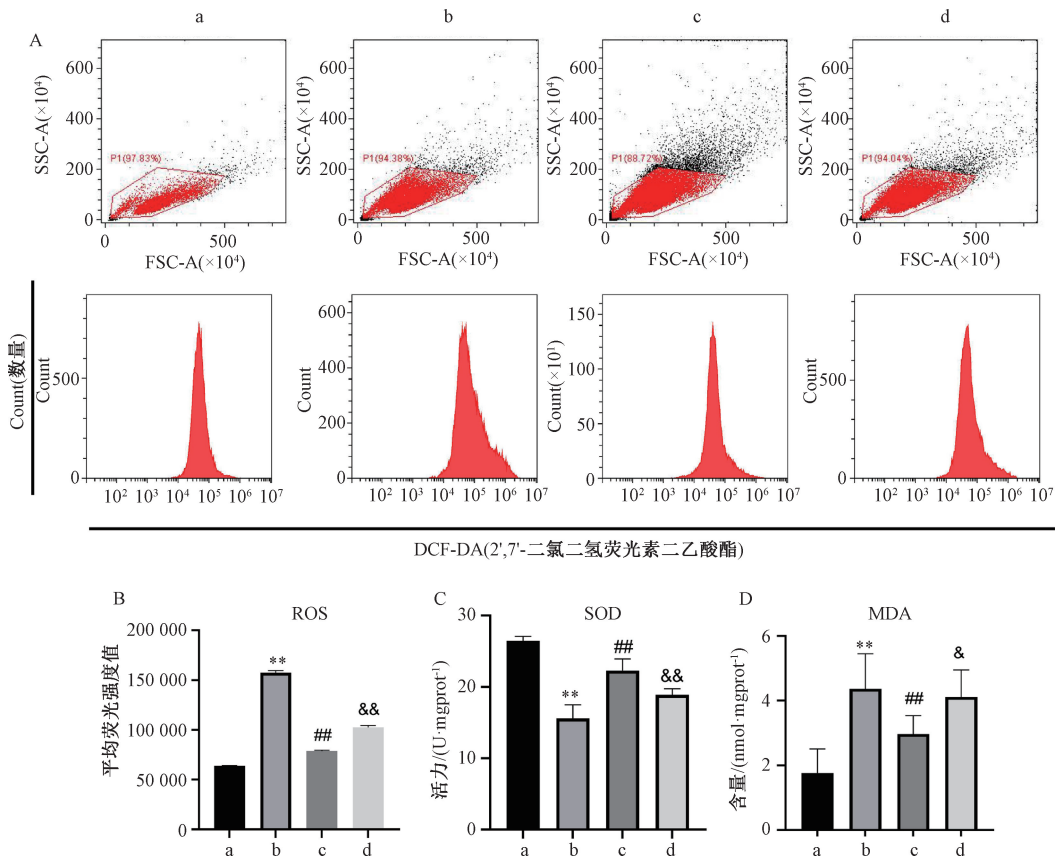
#### 4 讨论

视网膜内皮细胞在视网膜疾病研究具有重要作用，主要体现在维持血-视网膜屏障、调节炎症反应、参与血管生成和重塑、控制细胞凋亡和存活等方面<sup>[14]</sup>。这些细胞通过紧密连接和跨膜转运蛋白控制血液和视网膜之间的分子交换，防止有害物质进入视网膜组织，对保持视网膜稳态至关重要<sup>[15]</sup>。在缺氧条件下，细胞增殖通常受到抑制<sup>[16]</sup>。此外，缺氧还会激活一系列信号通路，如缺氧诱导因子通路，这些通路可以调控与细胞增殖



注: a 为常氧组, b 为低氧组, c 为山柰酚组, d 为 L-NAME 组。与常氧组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与低氧组比较, ##  $P < 0.01$ ; 与山柰酚组比较, &&  $P < 0.01$ 。

图2 山柰酚对 rRMECs 凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

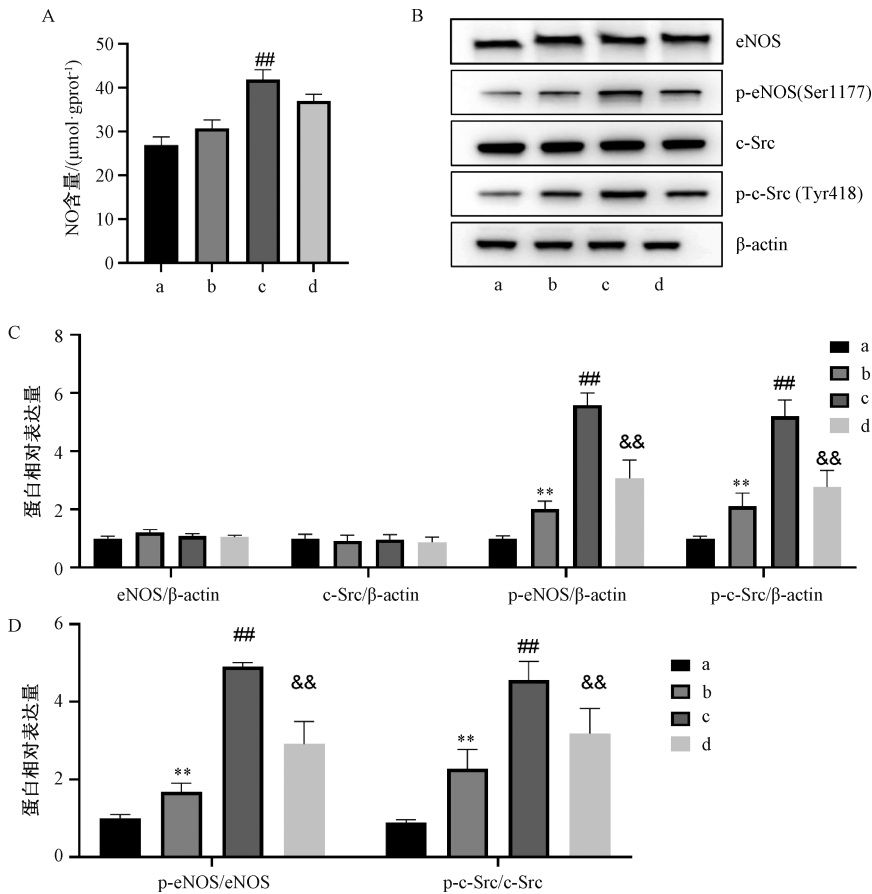


注: a 为常氧组, b 为低氧组, c 为山柰酚组, d 为 L-NAME 组。与常氧组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与低氧组比较, ##  $P < 0.01$ ; 与山柰酚组比较, &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$ 。

图3 山柰酚对 rRMECs 氧化应激的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

相关的基因表达,进一步抑制细胞增殖<sup>[17-18]</sup>。缺氧会导致细胞内 ROS 水平升高,进一步诱导细胞凋亡<sup>[19]</sup>。同时,缺氧还会影响 Bcl-2 家族蛋白的平衡,增加促凋亡蛋白(如 Bax)的表达,减少抗凋

亡蛋白(如 Bcl-2)的表达,从而促进细胞凋亡<sup>[19]</sup>。本研究中,低氧条件下,山柰酚表现出促进细胞增殖的作用,这说明低氧环境下山柰酚具有保护 rRMECs 的潜力。同时,低氧环境下凋亡细胞



注：a 为常氧组，b 为低氧组，c 为山柰酚组，d 为 L-NAME 组。与常氧组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与低氧组比较，<sup>##</sup>  $P < 0.01$ ；与山柰酚组比较，<sup>&&</sup>  $P < 0.01$ 。

图 4 山柰酚对 eNOS/NO/c-Src 通路的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

的比例增加，而山柰酚可以显著减少凋亡细胞数量，发挥抗细胞凋亡作用。凋亡相关蛋白表达检测结果支持了这一结论，即山柰酚能够下调 Bax 的表达并上调 Bcl-2，显示出其抗凋亡的作用。

ROS 可以作为凋亡的触发因子，激活 Bax、抑制 Bcl-2<sup>[20]</sup>。当 ROS 水平过高时，SOD 活性也会增加，以尽可能清除 ROS<sup>[21]</sup>。Li 等<sup>[22]</sup>报道了血管损伤部位过量产生的 ROS 会与 NO 发生反应，产生破坏性的过氧亚硝酸盐 (ONOO) 并限制 NO 的作用。Hsieh 等<sup>[23]</sup>研究表明，低水平 ROS 和较高的 NO 生物利用度可以抗动脉粥样硬化，具有血管保护作用。然而，ROS 的产生与氧化应激平衡破坏是内皮功能障碍的主要原因，导致视网膜疾病中的血管损伤<sup>[24-25]</sup>。内皮细胞中 ROS 激活后，首先观察到的是细胞凋亡，内皮细胞发生损伤<sup>[26]</sup>。本研究确定了山柰酚通过抑制 ROS 活性和诱导 NO 生成，发挥对视网膜内皮细胞的保护作用。

eNOS 是内皮细胞中负责合成 NO 的关键酶，NO 具有参与调节血管扩张、血流及抗炎作用。磷

酸化的 eNOS (p-eNOS) 通常指示其活性增加，能够更有效地合成 NO<sup>[27]</sup>。NO 的血管效应主要体现在其对血管张力调节、血管生成、血管细胞增殖与迁移、炎症和氧化应激的影响<sup>[4,28]</sup>。eNOS 的抑制剂 L-NAME 能够抑制 NO 的产生<sup>[29]</sup>。本研究中低氧组的 NO 含量较常氧组高，活化 eNOS，对血管内皮细胞起到保护作用。山柰酚处理后，NO 水平进一步升高，表明在血管内皮细胞中山柰酚对 eNOS 和 NO 发挥保护性增加的作用。L-NAME 处理后细胞增殖能力的进一步减弱，凋亡细胞增加，提示 eNOS 在山柰酚介导的细胞保护中的重要角色。NO 含量减少导致 ROS 消耗减少，ROS 诱导的凋亡细胞增加。

视网膜病变中，c-Src 能够被 eNOS 激活，NO 促进 c-Src Y418 磷酸化<sup>[7]</sup>。c-Src 和 p-c-Src 在血管内皮细胞中起着重要的调节作用，涉及多种生物过程，包括细胞增殖、迁移、血管生成以及维持内皮细胞的功能<sup>[30]</sup>。低氧组细胞 p-eNOS 和 p-c-Src 有增加的趋势，加入山柰酚后，低氧模型细胞 p-

eNOS 和 p-c-Src 进一步激活。这表明 eNOS/NO/c-Src 通路可能响应低氧而被激活,提示在短时间的低氧诱导使细胞发生了保护性调控。而山柰酚可能通过进一步激活 eNOS/NO/c-Src 通路改善低氧诱导的细胞损伤。然而,当加入 eNOS 抑制剂 L-NAME 后,NO 含量显著减少,c-Src 磷酸化水平降低,抗氧化作用受到抑制,这进一步证实了 eNOS/NO/c-Src 信号通路在山柰酚作用机制中的核心地位。

综上所述,在低氧条件下,山柰酚能通过激活 eNOS/NO/c-Src 信号通路并介导抗氧化机制对 rRMECs 起保护作用。本研究通过进一步探究山柰酚的作用机制,有望为 RMECs 相关疾病的治疗提供新的思路与方向。在未来的研究中,山柰酚在实际病理状态下的应用潜力及其临床转化的可能性值得深入探索。

#### 参考文献:

[ 1 ] Todorova V, Stauffacher M F, Ravotto L, et al. Deficits in mitochondrial TCA cycle and OXPHOS precede rod photoreceptor degeneration during chronic HIF activation[J]. *Mol Neurodegener*, 2023, 18(1): 15.

[ 2 ] Cao R, Jensen L D, Söll I, et al. Hypoxia-induced retinal angiogenesis in zebrafish as a model to study retinopathy[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2748.

[ 3 ] Janaszak-Jasiecka A, Płoska A, Wierońska J M, et al. Endothelial dysfunction due to eNOS uncoupling: molecular mechanisms as potential therapeutic targets[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2023, 28(1): 21.

[ 4 ] Carlström M, Weitzberg E, Lundberg J O. Nitric oxide signaling and regulation in the cardiovascular system: recent advances[J]. *Pharmacol Rev*, 2024, 76(6): 1038-1062.

[ 5 ] Kozina A, Opresnik S, Wong M S, et al. Oleoyl-lysophosphatidylcholine limits endothelial nitric oxide bioavailability by induction of reactive oxygen species[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113443.

[ 6 ] Rahman M A, Senga T, Ito S, et al. S-nitrosylation at cysteine 498 of c-Src tyrosine kinase regulates nitric oxide-mediated cell invasion[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(6): 3806-3814.

[ 7 ] Ninchoji T, Love D T, Smith R O, et al. eNOS-induced vascular barrier disruption in retinopathy by c-Src activation and tyrosine phosphorylation of VE-cadherin [J]. *Elife*, 2021, 10: e64944.

[ 8 ] Bangar S P, Chaudhary V, Sharma N, et al. Kaempferol: A flavonoid with wider biological activities and its applications[J]. 2022, 63: 9580-9604.

[ 9 ] Imran M, Rauf A, Shah Z A, et al. Chemo-preventive and therapeutic effect of the dietary flavonoid kaempferol: A comprehensive review[J]. *Phytother Res*, 2019, 33(2):

263-275.

[ 10 ] Li K, Yu X H, Maskey A R, et al. Cytochrome P450 3A4 suppression by epimedium and active compound kaempferol leads to synergistic anti-inflammatory effect with corticosteroid [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1042756.

[ 11 ] Lin C B, Wu F J, Zheng T M, et al. Kaempferol attenuates retinal ganglion cell death by suppressing NLRP1/NLRP3 inflammasomes and caspase-8 via JNK and NF-κB pathways in acute glaucoma[J]. *Eye*, 2019, 33(5): 777-784.

[ 12 ] Wu Y, Zhang Q M, Zhang R. Kaempferol targets estrogen-related receptor α and suppresses the angiogenesis of human retinal endothelial cells under high glucose conditions[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(6): 5576-5582.

[ 13 ] 徐 鑫, 范骁宇, 吴鑫杰, 等. 山柰酚对激素诱导的股骨头坏死中内皮细胞的保护作用研究[J]. 2022, 36(10): 1277-1287.

[ 14 ] Kong H, Zhao H G, Chen T R, et al. Targeted P2X7/NLRP3 signaling pathway against inflammation, apoptosis, and pyroptosis of retinal endothelial cells in diabetic retinopathy[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(4): 336.

[ 15 ] Balasubramanian S A, Mohan S, Pye D C, et al. Proteases, proteolysis and inflammatory molecules in the tears of people with keratoconus[J]. *Acta Ophthalmol*, 2012, 90(4): e303-e309.

[ 16 ] Rana N K, Singh P, Koch B. CoCl<sub>2</sub> simulated hypoxia induce cell proliferation and alter the expression pattern of hypoxia associated genes involved in angiogenesis and apoptosis[J]. *Biol Res*, 2019, 52(1): 12.

[ 17 ] Guan H L, Guan Y, Li W Y, et al. Regulatory role of miR-129 and miR-384-5p on apoptosis induced by oxygen and glucose deprivation in PC12 cell[J]. *Exp Brain Res*, 2022, 240(1): 97-111.

[ 18 ] Luo Z, Tian M F, Yang G, et al. Hypoxia signaling in human health and diseases: implications and prospects for therapeutics[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 218.

[ 19 ] Zhang L, Cao Y Y, Guo X X, et al. Hypoxia-induced ROS aggravate tumor progression through HIF-1α-SERPINE1 signaling in glioblastoma[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2023, 24(1): 32-49.

[ 20 ] Zhong Y J, Wang L, Jin R Y, et al. Diosgenin inhibits ROS generation by modulating NOX4 and mitochondrial respiratory chain and suppresses apoptosis in diabetic nephropathy[J]. *Nutrients*, 2023, 15(9): 2164.

[ 21 ] Gimbrone M A J, García-Cardena G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 620-636.

[ 22 ] Li J, Zhang J H, Yu P C, et al. ROS-responsive & scavenging NO nanomedicine for vascular diseases treatment by inhibiting endoplasmic reticulum stress and improving NO bioavailability[J]. *Bioact Mater*, 2024, 37: 239-252.

[ 23 ] Hsieh H J, Liu C A, Huang B, et al. Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen

- species ( ROS ) and nitric oxide ( NO ) and the pathophysiological implications[J]. *J Biomed Sci*, 2014, 21(1): 3.
- [24] Xu S S, Han S S, Dai Y L, *et al.* A review of the mechanism of vascular endothelial injury in immunoglobulin A vasculitis[J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 833954.
- [25] Mosavi S S, Rabizadeh S, Yadegar A, *et al.* Therapeutic effects of resveratrol and Omega-3 in mice atherosclerosis; focus on histopathological changes[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2023, 23(1): 81.
- [26] Yang Y, Wang G, Wu W J, *et al.* Camalexin induces apoptosis via the ROS-ER stress-mitochondrial apoptosis pathway in AML cells[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 7426950.
- [27] Janaszak-Jasiecka A, Płoska A, Wierońska J M, *et al.* Endothelial dysfunction due to eNOS uncoupling: molecular mechanisms as potential therapeutic targets[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2023, 28(1): 21.
- [28] Kim D, Piao J, Park J S, *et al.* Substance P-mediated vascular protection ameliorates bone loss[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2023, 2023: 9903336.
- [29] Isenberg J S. Inhibition of nitric oxide synthase ( NOS ) conversion of *L*-arginine to nitric oxide ( NO ) decreases low density mononuclear cell ( LD MNC ) *trans*-endothelial migration and cytokine output[J]. *J Surg Res*, 2003, 114(1): 100-106.
- [30] Ha C H, Bennett A M, Jin Z G. A novel role of vascular endothelial cadherin in modulating c-Src activation and downstream signaling of vascular endothelial growth factor[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(11): 7261-7270.

## 芒柄花黄素调控 cGAS/STING 通路介导的自噬对过敏性鼻炎小鼠 Treg/Th17 细胞失衡的缓解作用

胡文杰<sup>1</sup>, 朱珊<sup>2\*</sup>, 田新磊<sup>1</sup>, 程静凯<sup>1</sup>, 史兴婵<sup>1</sup>, 乔淑楠<sup>1</sup>

[1. 河南省中医院 (河南中医药大学第二附属医院), 郑州 河南 450000; 2. 河南中医药大学第二临床医学院, 郑州 河南 450000]

**摘要:** 目的 探讨芒柄花黄素调控环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶 (cGAS) /干扰素基因刺激因子 (STING) 通路介导的自噬对过敏性鼻炎 (AR) 小鼠调节性 T 细胞 (Treg) /辅助性 T 细胞 17 (Th17) 细胞失衡的缓解作用。方法 小鼠随机分为正常组、模型组、芒柄花黄素低、高剂量 (20、40 mg/kg) 组、地塞米松 (1 mg/kg) 组、芒柄花黄素高剂量 (40 mg/kg) +cGAS/STING 通路激活剂 (RocA, 1 mg/kg) 组, 每组 12 只。除正常组外, 其余组小鼠均以卵清蛋白诱导 AR 模型。建模成功 24 h 后给药, 每天 1 次, 持续 14 d。检测小鼠 AR 评分, 血清免疫球蛋白 E (IgE)、白细胞介素 (IL) -10 及 IL-17 水平及外周血 Treg、Th17 细胞比例和 Treg/Th17 比值; HE 染色观察鼻黏膜损伤情况; Western blot 法检测鼻黏膜组织维甲酸相关孤儿受体  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t)、叉头蛋白 3 (Foxp3)、微管相关蛋白轻链 3 (LC3)、p62、cGAS、STING 蛋白表达。结果 与正常组比较, 模型组鼻黏膜组织水肿严重且炎性细胞浸润明显, AR 评分、血清 IgE、IL-17 水平、外周血 Th17 细胞比例及鼻黏膜组织 ROR $\gamma$ t、LC3-II/I、cGAS、STING 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ), 血清 IL-10 水平、外周血 Treg 细胞比例、Treg/Th17 比值、鼻黏膜组织 Foxp3、p62 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 芒柄花黄素各剂量组和地塞米松组鼻黏膜组织水肿减轻, 炎性细胞浸润改善, AR 评分、血清 IgE、IL-17 水平、外周血 Th17 细胞比例、鼻黏膜组织 ROR $\gamma$ t、LC3-II/I、cGAS、STING 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ), 血清 IL-10 水平、外周血 Treg 细胞比例、Treg/Th17 比值、鼻黏膜组织 Foxp3、p62 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ); RocA 逆转了高剂量芒柄花黄素对 AR 小鼠自噬及 Treg/Th17 细胞平衡的作用。结论 芒柄花黄素可能通过抑制 cGAS/STING 通路降低 AR 小鼠自噬, 进而促进 Treg/Th17 细胞平衡。

**关键词:** 芒柄花黄素; 过敏性鼻炎; 调节性 T 细胞; 辅助性 T 细胞 17; 自噬; cGAS/STING 通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)03-1009-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.03.043

收稿日期: 2025-06-20

基金项目: 第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目 (国中医药人教函 [2022] 76 号); 河南省自然科学基金面上项目 (232300421188); 河南省第二批中医药青苗人才培养项目 (豫卫中医函 [2021] 16 号)

作者简介: 胡文杰 (1993—), 女, 硕士, 主治医师, 从事中医药防治儿童呼吸系统、肾脏免疫系统疾病的研究。E-mail: hwjworkdr@163.com

\* 通信作者: 朱珊 (1965—), 女, 教授, 主任医师, 从事中医药防治小儿呼吸系统、消化系统疾病的研究。E-mail: zhshteacher@126.com