



抑制NKCC1/AQP4通路对改善高原脑水肿大鼠神经损伤的作用*

耿华丽^{1,2}, 李百川^{1,2}, 宋旭³, 夏逸林^{1,2}, 周向阳^{1,2}, 高静^{1,2}, 陈蕾^{1,2△}

1. 四川大学华西医院高原医学研究院(成都610041); 2. 四川大学华西医院神经和共病研究室(成都610041);

3. 四川大学生命科学学院(成都610065)

【摘要】目的 探究高原脑水肿(high-altitude cerebral edema, HACE)的发病机制,开发新型治疗策略。**方法** 选取6周龄SD雄性大鼠,置于低压舱内,并选定7 000 m海拔处理3 d为造模条件,通过测量脑含水量、血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)破坏程度、脑组织尼式染色,评估高原脑水肿大鼠模型的建立是否成功。将实验动物分为4组,每组28只。空白对照组于常压常氧模拟500 m海拔3 d;模型组(HACE组)、布美他尼组(阳性对照组)、XH-6003药物组置于7 000 m海拔,于尾静脉分别注射生理盐水、布美他尼和新型钠钾氯协同转运蛋白-1(Na-K-2Cl cotransporter 1, NKCC1)抑制剂XH-6003,每日2次,共3 d。3 d后出舱检测。主要结局指标为脑含水量、血脑屏障通透性、脑组织形态学变化、水通道蛋白4(aquaporin-4, AQP4)和NKCC1表达量;次要结局指标为行为学、凋亡和氧化应激指标。**结果** 成功建立HACE大鼠模型。与对照组相比,模型组脑含水量增加($P<0.0001$),血脑屏障破坏($P<0.0001$),出现学习记忆下降($P<0.001$)和焦虑抑郁情绪($P<0.01$);qPCR结果显示模型组大鼠脑组织NKCC1和AQP4表达明显增加($P<0.01$),病理结果显示模型组大鼠海马出现神经元和神经胶质细胞损伤($P<0.01$)。予以NKCC1抑制剂XH-6003后,脑含水量、BBB损伤、神经元和胶质细胞损伤均有逆转($P<0.05$),大鼠脑组织NKCC1和AQP4表达下降($P<0.01$),凋亡相关蛋白被抑制,氧化应激指标中仅还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)有改善($P<0.001$)。XH-6003治疗后的大鼠仅在新物体探索时间上有一定的功能改善,其他行为学结果均呈现阴性。**结论** HACE伴有NKCC1/AQP4通路的激活,抑制该通路可减轻脑水肿和BBB破坏,改善神经元和神经胶质细胞损伤。XH-6003在细胞分子层面具有治疗脑水肿的潜力,但其对HACE相关行为障碍的改善效果尚需进一步探究。

【关键词】 高原脑水肿 神经损伤 XH-6003 NKCC1

Effects of Inhibiting the NKCC1/AQP4 Pathway on Neurological Injury Improvement in a Rat Model of High-Altitude Cerebral Edema GENG Huali^{1,2}, LI Baichuan^{1,2}, SONG Xu³, XIA Yilin^{1,2}, ZHOU Xiangyang^{1,2}, GAO Jing^{1,2}, CHEN Lei^{1,2△}. 1. High Altitude Medicine Key Laboratory of Sichuan Province, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Laboratory of Neurology and Comorbidities, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China

△ Corresponding author, E-mail: leilei_25@126.com

[Abstract] Objective To investigate the pathogenesis of high-altitude cerebral edema (HACE) and develop new therapeutic strategies. **Methods** Male Sprague-Dawley (SD) rats of 6 weeks old were selected and placed in a hypobaric chamber. The rats were exposed to the high-altitude environment of 7 000 m above sea level for 3 days for HACE modeling. Whether the HACE model was successfully established in the rats was evaluated by measuring brain water content, the degree of disruption to the blood-brain barrier (BBB), and brain tissue Nissl staining. The experimental animals were divided into four groups, with 28 rats in each group. The blank control group was exposed to a normobaric and normoxic environment simulating the conditions at 500 m above sea level for 3 d. The other groups, including a model group (the HACE group), a bumetanide group (the positive control group), and a XH-6003 treatment group, were placed at an altitude of 7 000 m above sea level and were injected with normal saline, bumetanide, and XH-6003, a new type of Na-K-2Cl cotransporter 1 (NKCC1) inhibitor, via the tail vein, respectively, twice daily for 3 d. The experimental animals were taken out of the hypobaric chamber for testing after 3 d. The primary outcome measures included brain water content, BBB permeability, changes in brain tissue morphology, and the expression levels of aquaporin-4 (AQP4) and NKCC1. The secondary outcome measures included behavioral changes, apoptosis, and oxidative stress markers. **Results** The HACE rat model was successfully established. The model group exhibited increased brain water content ($P < 0.0001$), BBB disruption ($P < 0.0001$), impairment in learning skills and memory ($P < 0.001$), and anxiety/depression-like behaviors ($P < 0.01$). qPCR results showed significantly increased expression of NKCC1 and AQP4 in the

* 四川省科技厅四川省中央引导地方科技发展专项(No. 2023ZYD0075)和四川大学华西医院横向合作项目(No. HX-H2307204)资助

△ 通信作者, E-mail: leilei_25@126.com

brain tissue of the model group ($P < 0.01$). Pathology examination revealed neuronal and glial cell damage in the hippocampus of the model group ($P < 0.01$). Treatment with XH-6003, the NKCC1 inhibitor, reversed brain water content, BBB disruption, and neuronal and glial cell damage to a certain degree ($P < 0.05$), decreased the expression of NKCC1 and AQP4 in the brain tissue ($P < 0.01$), and inhibited apoptosis-related proteins. Among the oxidative stress indices, only glutathione (GSH) showed improvement ($P < 0.001$). Rats treated with XH-6003 showed functional improvement only in the time spent exploring novel objects, while other behavioral outcomes remained unchanged.

Conclusion HACE is associated with the activation of the NKCC1/AQP4 pathway. Inhibition of this pathway alleviates brain edema, BBB disruption, and neuronal and glial cell damage. These findings suggest that XH-6003 holds potential as a therapeutic strategy for HACE at the cellular and molecular levels, but its effects in improving HACE-related behavioral disorders warrant further investigation.

[Key words] High-altitude cerebral edema Nerve damage XH-6003 NKCC1

高原脑水肿(high-altitude cerebral edema, HACE)是一种由于高原低压低氧环境引起的严重脑功能障碍^[1],目前发病机制尚未阐明。我国作为世界上高原面积最辽阔的国家,由于经济发展和国防建设的需求,进入高原的人数越来越多,因而急性高原病(acute mountain sickness, AMS)和HACE的发病率逐年上升。建立有效稳定的HACE动物模型并进行研究,是降低HACE发病率和死亡率的关键基础^[2]。HACE是一种因高原低压低氧环境导致脑细胞水肿和血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)通透性改变为主要原因的急性脑病^[3-4],发病急、病程发展迅速、死亡率高^[5],是急进高原者最大隐患和最严重疾病之一^[6]。其主要症状包括躯干共济失调^[7]、头痛、恶心、呕吐、意识模糊^[8],若不及时治疗,可能在发病24 h内死亡^[9]。尽管HACE非常危急,但国内外关注有限,其发病机制目前尚未完全阐明,缺乏安全有效的治疗药物,因此,深入研究HACE的发病机制,对开发新型有效的治疗策略具有重要意义。

在脑水肿的发病机制中,离子通道的异常调节已被证实为关键因素^[10-11]。但在HACE中涉及的具体离子通道成员及其作用机制仍有待深入探究,现有研究已初步揭示了钠钾氯协同转运蛋白-1(Na-K-2Cl cotransporter 1, NKCC1)在HACE中的可能作用。作为NKCC1下游靶点,水通道蛋白4(aquaporin-4, AQP4)在HACE的形成中发挥着关键作用^[12]。XH-6003为一种新型NKCC抑制剂,对NKCC的两种亚型NKCC1和NKCC2均有较强的抑制活性,进而抑制AQP4表达。其主要以托拉塞米在人体内的活性代谢产物M3为先导结构,在活性位点引入亲水性基团磷酸酯,改善其水溶性和透脑率,通过中枢治疗和外围利尿的协同作用,实现对脑水肿的治疗,但其对高原脑水肿的治疗作用及治疗机制还有待探索。

基于此,本研究通过建立一种新型的高原脑水肿大鼠模型,探究新型NKCC抑制剂XH-6003对HACE保护作用,并初步探索其作用机制,为疾病的治疗提供实验室依

据和更有效的治疗方案。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

XH-6003(成都金瑞基业生物科技有限公司,中国)、布美他尼(普善实业有限公司,中国)、异氟烷(深圳瑞沃德生命科技有限公司,中国)、2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)粉末(北京索莱宝科技有限公司,中国)、尼式染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,中国)、伊文思蓝染液(艾美捷科技有限公司,中国)、甲酰胺(Sigma公司,美国)、Trizol裂解液(Invitrogen公司,美国);逆转录和实时荧光定量PCR(qPCR)试剂盒(兰博利德公司,中国);引物(生工生物有限公司,中国);兔源胶质纤维酸性蛋白(GFAP)蛋白抗体、兔源离子钙结合衔接分子1(Iba1)蛋白抗体、兔源NKCC1蛋白抗体、兔源AQP4蛋白抗体、兔源半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白抗体(均购自Abcam公司,美国)、DAB显色液(北京索莱宝科技有限公司,中国)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(均购自南京建成生物工程研究所)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(Proteintech公司,美国)。

动物实验高低压氧舱(中国上海塔望公司,型号:ProOx-850)、MATRX VIP3000小动物专用麻醉机(美国Midmark公司)、动物电子秤。

1.2 实验动物

大鼠的雌激素具有一定的神经保护作用^[13],雄性大鼠出生后6周可达性成熟,容易饲养且抗病能力强,故本次研究选用雄性SD大鼠作为研究对象。6周龄的SPF级雄性SD大鼠(180~220 g,北京华阜康生物科技股份有限公司,北京,中国)。所有动物可自由进食进水,环境温度湿度适宜。实验开始前,所有大鼠在上述环境中适应至

少3 d, 以确保其适应新的环境并降低应激反应。动物实验均依据国家实验室动物护理和使用指南学会的文件开展, 且实验方案通过四川大学实验动物福利与伦理委员会批准(伦理备案号: 20230727004)。

1.3 高原脑水肿大鼠模型的建立和验证

为探究XH-6003注射液对高原脑水肿的治疗效果, 首先需建立稳定的动物模型。低压低氧是高原地区最显著的气候特点, 使用低压低氧舱建立动物模型是目前最常用的研究方法^[14-15]。多数学者模拟的海拔高度在6000~8000 m^[16-17], 故本研究模拟海拔最高限值定为8000 m。由于5000 m以下HACE发病率较低^[18], 且本研究主要建立急性模型, 故研究下限海拔设定为6000 m, 从而设置3个海拔梯度(6000 m、7000 m、8000 m)。将实验动物置于专门设计的低压环境实验舱内(上海塔望, ProOx850), 以模拟高原环境。以5 m/s上升速度将所述实验舱的模拟海拔设置至6000 m、7000 m和8000 m, 实验动物保持在所述低压环境下4 d(记录大鼠死亡率)或3 d(记录大鼠脑含水量, 具体方法见1.5.1小节), 以寻找最佳造模条件。记录大鼠死亡率的实验分为两个部分。第一部分, 在筛选海拔条件时, 为每个海拔条件(6000 m、7000 m、8000 m)分别检测了暴露1、2、3、4 d的数据: 共选择48只大鼠, 每个海拔组16只, 平均分配到4个时段, 即每组每时段4只。第二部分, 在选定的海拔条件(7000 m)下检测不同暴露时间(1、2、3、4 d)对大鼠存活率的影响, 目的是确定最适合的造模时间: 另选择48只大鼠, 按不同暴露时间(1、2、3、4 d)平均分配, 每时段12只, 分3批次进行实验, 即每时段每批次4只。实验舱内的低压环境通过精确控制进气速率和出气速率来实现。本实验使用常氧(氧气体积分数维持在约20%)而非低氧条件, 每只实验动物的进气速率约为1~1.5 L/min, 出气速率约为2 L/min, 以确保氧气供应充足。最终舱内压力约为40 kPa, 与大气压的压差约为60 kPa。同时, 该实验舱中的二氧化碳浓度严格控制在体积分数不超过1.5%范围内。通过评估造模3 d内的脑含水量、BBB破坏程度、脑组织尼式染色, 验证高原脑水肿大鼠模型的建立是否成功, 具体方法见1.5.1~1.5.3。

1.4 药物干预分组

为探究药物对高原脑水肿的治疗效果, 本研究选择NKCC1抑制剂XH-6003, 并以布美他尼为阳性对照。选定海拔条件和天数后, 将实验动物分为空白对照组(28只, 常压常氧模拟500 m海拔)、模型组(HACE组, 28只)、布美他尼组(阳性对照组, 28只)、XH-6003药物组(28只)。模型组、布美他尼组和XH-6003药物组均于

7000 m海拔造模3 d, 于尾静脉分别注射生理盐水、布美他尼和新型NKCC1抑制剂XH-6003, 每日2次, 共3 d, 布美他尼和XH-6003的剂量均为0.125 mg/kg。实验过程中, 记录HACE组、XH-6003组和布美他尼组大鼠体质量, 死亡动物数量、死亡时间和死亡原因。将大鼠分为两部分: 每组16只大鼠[6只用于脑含水量检测, 6只用于尼式染色、免疫组织化学(immunocytochemistry, IHC)染色、免疫荧光(immunofluorescence, IF)染色、qPCR, 剩余4只用于TTC染色]在造模结束后2 h内麻醉处死取材, 用于1.5.1~1.5.5检测, 其中每组6只用于病理染色的大鼠在处死前收集血浆用于1.5.6检测; 每组12只大鼠从造模结束即刻(出舱即刻)进行行为学观察(详见1.5.7)。

1.5 检测方法

1.5.1 大鼠脑含水量评估

根据文献报道的脑含水量评估方法^[19], 造模结束后2 h内异氟烷麻醉处死大鼠(每组6只), 快速取出脑组织, 采用电子天平称取湿重和干重, 计算脑含水量(brain water content, BWC), $BWC = \frac{\text{干重}}{(\text{湿重} + \text{干重})}$ 。

1.5.2 大鼠脑组织BBB通透性评估

根据文献报道的方法^[20], 造模结束后2 h内异氟烷麻醉大鼠(每组4只), 2%伊文思蓝(Evans blue, EB)染液尾静脉注射循环1 h以上, 再次采用异氟烷麻醉大鼠, 取下脑组织, 将其放入甲酰胺溶液(100 mg/mL)60 ℃恒温孵育24 h。孵育完成后, 取上清液200 μ L, 使用分光光度计于620 nm波长下测定其吸光值。

1.5.3 大鼠脑组织尼式染色、IHC染色及IF染色

在造模结束后2 h内, 每组4只大鼠经异氟烷麻醉后, 左心室灌注4 ℃生理盐水, 后灌注体积分数为4%多聚甲醛溶液。快速取出全脑, 置于体积分数为4%多聚甲醛溶液固定, 乙醇梯度脱水, 石蜡包埋切片(5 μ m), 进行染色和形态学观察。然后进行大鼠脑组织尼式染色、IHC染色及IF染色。

尼式染色: 于56 ℃恒温烘箱中采用焦油紫染色液浸染切片, 蒸馏水洗净染料, 置于尼式分化液中, 无水乙醇快速脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。光学显微镜采图后使用Image J软件进行灰度值分析。

IHC染色及IF染色: 切片脱蜡后, 过氧化氢溶液浸泡, PBS洗涤。柠檬酸缓冲液(pH9.0)微波抗原修复, 羊血清封闭液(50 μ L)封闭。一抗GFAP(1:10000)、IBA1(1:1000)、NKCC1(1:1000)、AQP4(1:500)、Caspase-3(1:1000)4 ℃孵育过夜。IF染色加入荧光二抗(1:500), 室温避光孵育1 h, DAPI(1:1000)染色5 min, 封片, 荧光显微镜观察; IHC染色加入组化二抗(1:250),

DAB显色,苏木素复染,脱水,封片,光学显微镜观察。GFAP和IBA1均使用免疫组织化学染色,阳性染色均为棕黄色;NKCC1、AQP4和Caspase-3均使用免疫荧光染色,阳性染色均为绿色荧光。Image J软件分析GFAP和IBA1阳性细胞数量以评估其活化情况;Image J软件分析NKCC1、AQP4和Caspase-3荧光强度评估其表达量。

1.5.4 大鼠脑组织TTC染色

在造模结束后2 h内,每组4大鼠经异氟烷麻醉后,不进行心脏灌注,正常取出脑组织切片。将脑片置于装有TTC的平皿中,37℃烘箱孵育,拍照。

1.5.5 实时荧光定量PCR (RT-qPCR)

采用TRIzol法从造模结束后2 h内大鼠脑组织(每组6只)中提取总RNA并进行RNA浓度及纯度测定,并立即置于-80℃冰箱中保存。测定RNA浓度,逆转录后,进行实时荧光定量PCR(qPCR)。反应条件为95℃预变性30 s;95℃10 s,65℃30 s,循环40次扩增;95℃10 s,65℃60 s,97℃1 s熔解;37℃冷却30 s。以GAPDH为内参,采用2^{-ΔΔCt}法计算相关基因mRNA相对表达量,引物序列详见表1。

表 1 RT-qPCR引物信息
Table 1 RT-qPCR primer information

Gene	Primer sequence (5'-3')	Produce length/bp
GAPDH	R:ATGTATCCGTTGTGGATCTGAC	22
	F: CCTGCTTCACCACCTTCTTG	20
AQP4	R: GAATCCAGCTCGATCCTTTG	20
	F: CTTCTTTTAGCGGACGTTTG	20
NKCC1	R: CAAGGTCAAACCTCCATCATCA	22
	F: CTGGAAGATGGTGATGGGATT	21
BAL-1	R: TCATGAGTGTCAACTACCTG	20
	F: TTGAGGAAGAGTAGGCTGTG	20
Cas-3	R: GGATTGAGACGGACAGTG	18
	F: TTCGCCAGGAATAGTAACC	19
BAX	R: GAAGTTGAGCGAGTGTCT	18
	F: AGTTGAAGTTGCCGTCAG	18

AQP4: aquaporin-4; NKCC1: Na-K-2Cl cotransporter 1; BAL-1: *Bacillus anthracis* lethal factor 1; Cas-3: *Caspase-3*; BAX: BCL-2 associated X protein gene.

1.5.6 各组大鼠脑组织氧化应激指标

造模成功后2 h内收集各组血浆(每组6只大鼠),按市售试剂盒说明书检测氧化应激相关的生化标志物,包括MDA、GSH和SOD。MDA作为氧化应激的重要指标,可反映细胞膜内脂质过氧化程度。GSH含量和SOD活性均可反映机体自由基清除能力,也可作为氧化应激的另一

重要指标。

1.5.7 大鼠行为学评估

大鼠出舱后即刻,另取对照组、模型组和药物组大鼠共12只,其中Y迷宫和强迫游泳,转棒和旷场分别使用相同4只大鼠,新物体识别为剩余4只大鼠,分别进行以下行为学评估:观察大鼠在Y迷宫中的探索行为、路径选择和目标识别能力,评估其空间记忆的形成和提取能力;将大鼠置于熟悉环境中,并引入新的物体,观察其对新物体的探索时间和探索次数,评估其对新物体的记忆能力;通过观察大鼠在旷场中的活动轨迹、探索行为、中心区域停留时间等指标,评估其焦虑水平;通过对大鼠在强迫游泳中的行为的观察,包括静止时间、挣扎时间等,评估其是否存在抑郁行为;观察大鼠在转棒上的平衡时间和平衡次数,评估其平衡能力和运动协调能力。

1.6 统计学方法

使用Prism10软件进行统计学分析,采用Image J v1.8.0进行图片分析。所有定量数据的正态性均在分析前通过统计测试进行了评估。对于符合正态分布的数据以均数±标准误表示,两组间比较采用双独立样本t检验,多组比较使用单因素方差分析(one-way ANOVA),进一步两两比较采用Dunnett's T3检验。对于不符合正态分布的数据,采用了非参数的秩和检验(Mann-Whitney U test)进行分析。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功建立高原脑水肿大鼠模型

先选定海拔条件(图1A、1B):8000 m海拔在造模第1天时,各组脑含水量无明显变化,在造模第2天时,大鼠死亡率过高,而6000 m海拔时,不同时间大鼠脑含水量均无明显变化,故选用7000 m作为造模海拔。再选定造模天数(图1C):7000 m海拔模型显示,造模第1~2天时,大鼠的死亡率无明显变化,但造模第4天相较造模第3天的死亡率明显增加,故选用3 d作为造模时间。

模型验证:如图1D、1E所示,随着造模时间延长,脑含水量和BBB破坏程度不断升高,对照组和造模3天组差异有统计学意义(*P*<0.001)。此外,海马尼式染色结果显示,同对照组相比,造模1 d、2 d、3 d海马齿状回区域均出现不同程度的神经元细胞损伤(图1F),对其进行灰度值统计发现造模3 d时与对照组差异有统计学意义(图1G)。纹状体区域也显示出同样的结果(图1H),随着暴露时间延长,齿状回区域肿胀细胞越多,对其肿胀细胞数量统计,如图1I所示,造模各时点与对照相比,差异均有统计学意义。由此可见,高原脑水肿大鼠模型成功建立。

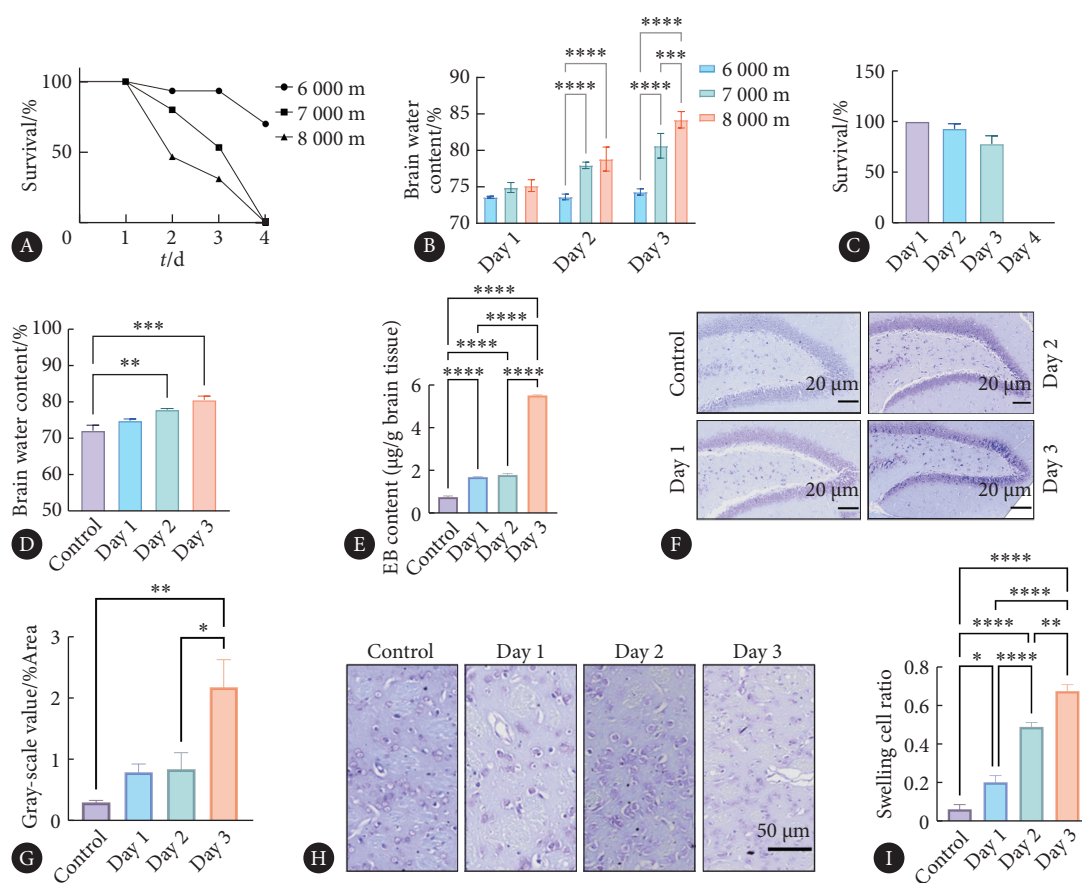


图1 高原脑水肿大鼠模型评估指标

Fig 1 Evaluation indices of a rat model of HACE

A, Survival curves of rats exposed to conditions at different altitude ($n = 16$ per group); B, statistical chart of brain water content of rats at different altitudes ($n = 3$ per group); C, survival rates of rats at different times at 7000 m ($n = 4$ per group); D, statistical chart of brain water content of rats at different times at 7000 m ($n = 3$ per group); E, statistical chart of BBB permeability assessed by EB staining in rats at different times ($n = 4$ per group); F, schematic diagram of Nissl staining in the dentate gyrus of the hippocampus; G, statistical diagram of neuronal cell damage in the dentate gyrus region of the hippocampus ($n = 4$ per group); H, schematic diagram of swollen cells in the striatum region; I, statistical graph of the proportion of swollen cells in the striatum region ($n = 4$ per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

2.2 XH-6003对HACE大鼠脑水肿的影响

与对照组相比, HACE组大鼠脑含水量增加, 脑通透性增加; 与HACE组相比, XH-6003干预后大鼠脑含水量有明显下降, 且脑水肿减轻效果与布美他尼效果相当, 但都未恢复至正常水平(图2A)。2个药物组大鼠体质量下降情况与HACE组相比, 有明显逆转(图2B), 大鼠BBB破坏程度大大减轻, 脑通透性得到逆转(图2C)。此外, qPCR和免疫荧光染色均显示与对照组相比, HACE组NKCC1、AQP4基因和蛋白表达增加, 布美他尼和XH-6003处理后, 二者表达下降(图2D~2G)。TTC染色也得到相似结果(图2H), 与对照组相比, HACE组脑组织有明显出血点, XH-6003处理后, 可观察到脑出血减轻, 无较为明显出血点。

2.3 XH-6003改善HACE大鼠神经元及胶质细胞损伤状态的影响

与对照组相比, 尼式染色可观察到HACE组明显的神经

元细胞损伤, 布美他尼和XH-6003处理后深染减少(图3A), 统计表明XH-6003干预后神经元细胞损伤情况得到明显改善, 与对照组相比差异无统计学意义(图3B)。纹状体区域改善效果并不明显(图3C、3D), 肿胀细胞数量相较HACE组有下降, 但依旧与对照差异明显。免疫组织化学染色显示HACE组星形胶质细胞和小胶质细胞明显活化(图3E), XH-6003干预后, 活化情况明显好转(图3F)。HACE组小胶质细胞显著减少, XH-6003干预后, 该情况得以改善(图3G)。

2.4 XH-6003对HACE大鼠脑组织细胞凋亡的影响

通过qPCR对各组凋亡相关基因mRNA水平进行检测, 结果表明, 与对照组相比, HACE组中Caspase-3 ($P < 0.01$)、BAL-1 ($P < 0.01$)和BAX ($P < 0.001$)表达上调, XH-6003处理后, BAX ($P < 0.05$)和BAL-1 ($P < 0.001$)表达明显下降, 但Caspase-3表达量与HACE组和对对照组差异无统计学意义(图4A~4C)。Caspase-3免疫荧光染色也显示

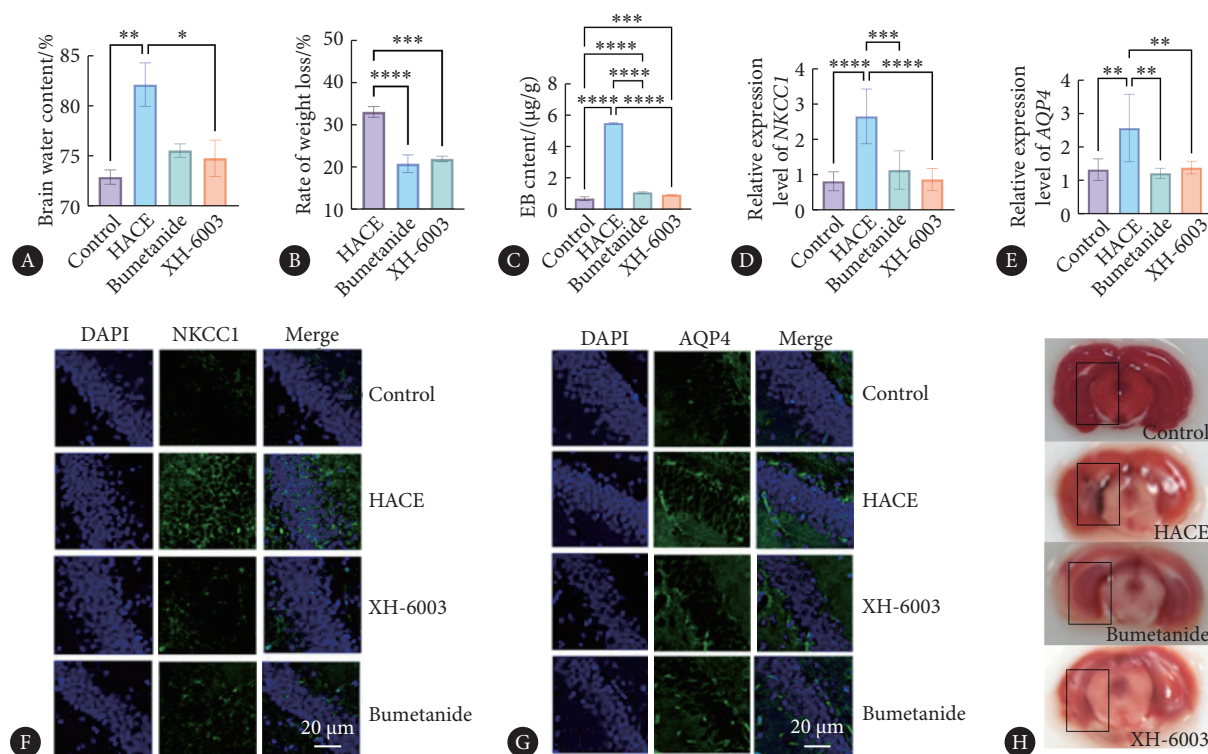


图2 XH-6003对HACE大鼠脑水肿影响

Fig 2 Effect of XH-6003 on cerebral edema in HACE rats

A, Effect of XH-6003 on brain water content in HACE rats ($n = 6$ per group); B, effect of XH-6003 on the weight loss rate of HACE rats ($n = 6$ per group); C, XH-6003 improves the BBB permeability of HACE rats ($n = 4$ per group); D, qPCR was used to determine the expression of *NKCC1* in different groups ($n = 6$ per group); E, qPCR was used to determine the expression of *AQP4* in different groups ($n = 6$ per group); F, immunofluorescence assessment of *NKCC1* expression; G, immunofluorescence assessment of *AQP4* expression; H, TTC staining schematic diagram of intracerebral hemorrhage in different groups (original magnification $\times 10$).
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

同样的结果(图4D~4E)。

2.5 XH-6003对HACE大鼠氧化应激的影响

表2为大鼠海马组织中氧化应激水平的变化情况。与对照组比较, HACE组SOD活力、GSH含量降低, MDA表达升高, 差异有统计学意义。XH-6003组和布美他尼组SOD活力、MDA和GSH含量相较于HACE组差异均无统计学意义, 但GSH含量低于HACE组, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。

2.6 XH-6003对HACE大鼠行为学的影响

结果显示, Y迷宫中HACE组大鼠同对照组相比, 探索新臂次数有明显降低, 但2种药物干预后并未出现改善(图5A), 同时, 在新物体识别试验中, 模型组大鼠对新物体的探索次数和时间均低于对照组, 但药物组和HACE组差异均无统计学意义(图5B)。此外, 旷场试验表明HACE大鼠相较于对照组在旷场中的总路程和总时间均有明显下降(图5C), 但2个药物组同HACE组比较均无明显变化(图5D~5E), 强迫游泳发现HACE组大鼠在水中的静止时间比率明显高于对照组, 2个药物组同样无明显改善(图5F)。在转棒实验中发现HACE组大鼠两次测试

的停留时间都要明显低于对照组, 且布美他尼组较HACE组均有明显改善, 但XH-6003组与HACE组相比, 差异无统计学意义(图5G)。

3 讨论

多项文献报道, *NKCC1*的表达与脑水肿的发生密切相关。在高原低氧环境下, 细胞内 Na^+ 浓度升高, *NKCC1*会将更多的 Na^+ 转运入细胞, 引起胞内渗透压升高, 水分子入被摄入细胞中, 导致细胞肿胀^[21]。此外, *NKCC1*的激活还会触发下游信号通路, 促进炎症反应和氧化应激损伤^[22], 加剧脑水肿, 尤其是细胞毒性水肿的发生^[23]。目前, 尚未有关于*NKCC1*在高原脑水肿中确切作用机制的具体研究报道, 以及*NKCC1*在高原脑水肿中的表达升高是否具有病理特异性, 仍需进一步地探究。本研究使用*NKCC1*抑制剂XH-6003, 探索其对HACE的治疗效果及潜在机制。研究结果表明, XH-6003可显著降低*NKCC1*及下游靶蛋白*AQP4*的表达, 降低脑组织含水量, 减轻脑水肿。HACE的病理生理机制复杂^[24], 涉及离子水肿、血管源性水肿和细胞毒性水肿等多种机制^[25]。BBB结构破坏

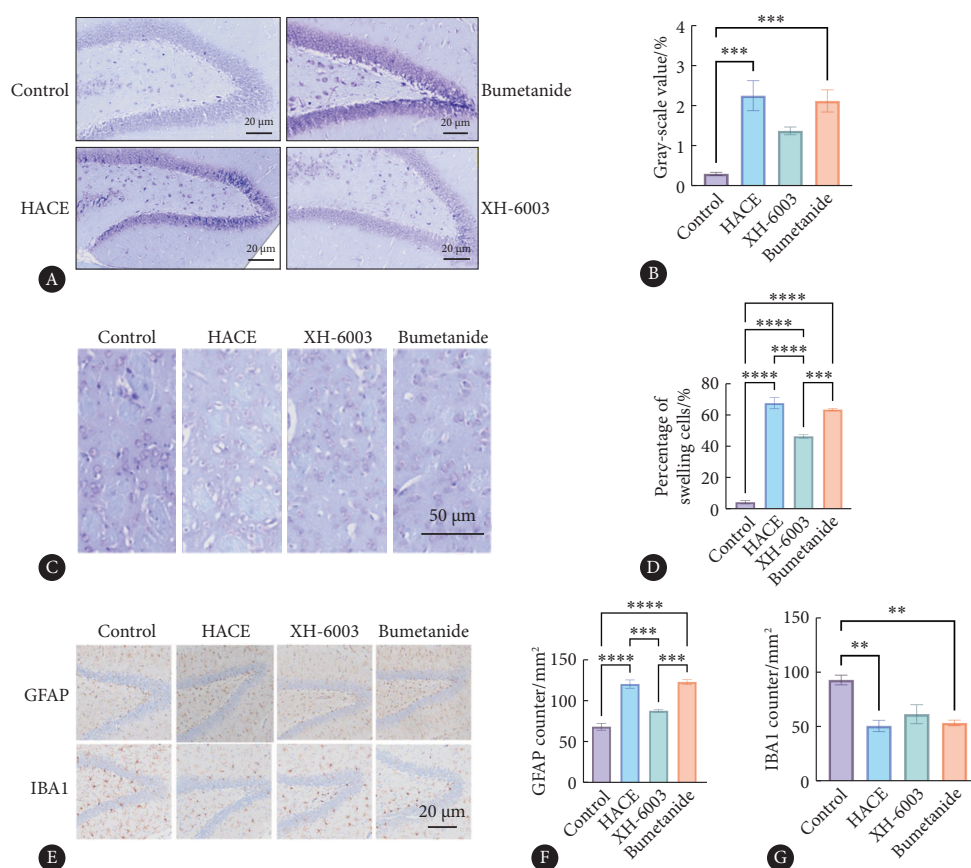


图 3 XH-6003对HACE大鼠脑部病理状态影响

Fig 3 Effect of XH-6003 on brain pathological state in HACE rats

A, Nissl staining in the dentate gyrus of the hippocampus in different groups; B, statistical diagram of dentate gray value of hippocampus in different groups; C, schematic diagram of swollen cells in the striatum region of different groups; D, statistical chart of the proportion of swollen cells in the striatum region; E, immunohistochemical staining of astrocytes and microglia in the dentate gyrus of the hippocampus; F, statistical plot of the number of astrocytes per square millimeter area; G, statistical plot of the number of microglia per square millimeter area. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. $n = 4$ per group.

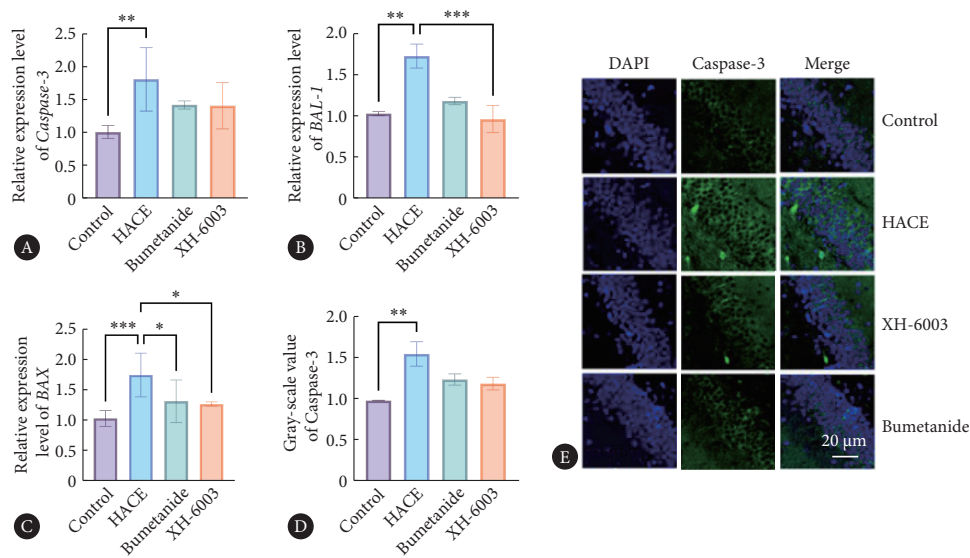


图 4 XH-6003对HACE大鼠相关分子凋亡指标影响

Fig 4 Effect of XH-6003 on molecular marks of apoptosis in rats with HACE

A, qPCR was used to determine the expression of *Caspase-3* in the hippocampus in different groups; B, qPCR was used to determine the expression of *BAL-1* in different groups of hippocampus; C, qPCR was used to determine the expression of *BAX* in different groups of hippocampus; D, statistical graph of *Caspase-3* immunofluorescence staining positive cell expression levels; E, immunofluorescence staining was used to determine the expression of *Caspase-3* in different groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. $n = 6$ per group.

表2 XH-6003对HACE大鼠氧化应激影响
Table 2 Effect of XH-6003 on oxidative stress in HACE rats

Index	Control group (n = 6)	HACE group (n = 6)	Bumetanide group (n = 6)	XH-6003 group (n = 6)
SOD/(U/mL)	183.3±7.520	124.4±10.752**	112.9±13.230**	131.7±8.315**
MDA/(mmol/mL)	1.667±0.414	5.888±1.441***	4.253±0.559*	4.337±1.122*
GSH/(mmol/mL)	22.35±1.519	15.16±1.078****	6.759±0.306****, #	8.811±0.553****, #

MDA: malondialdehyde; GSH: glutathione; SOD: superoxide dismutase. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, vs. control group; # $P < 0.0001$, vs. HACE group.

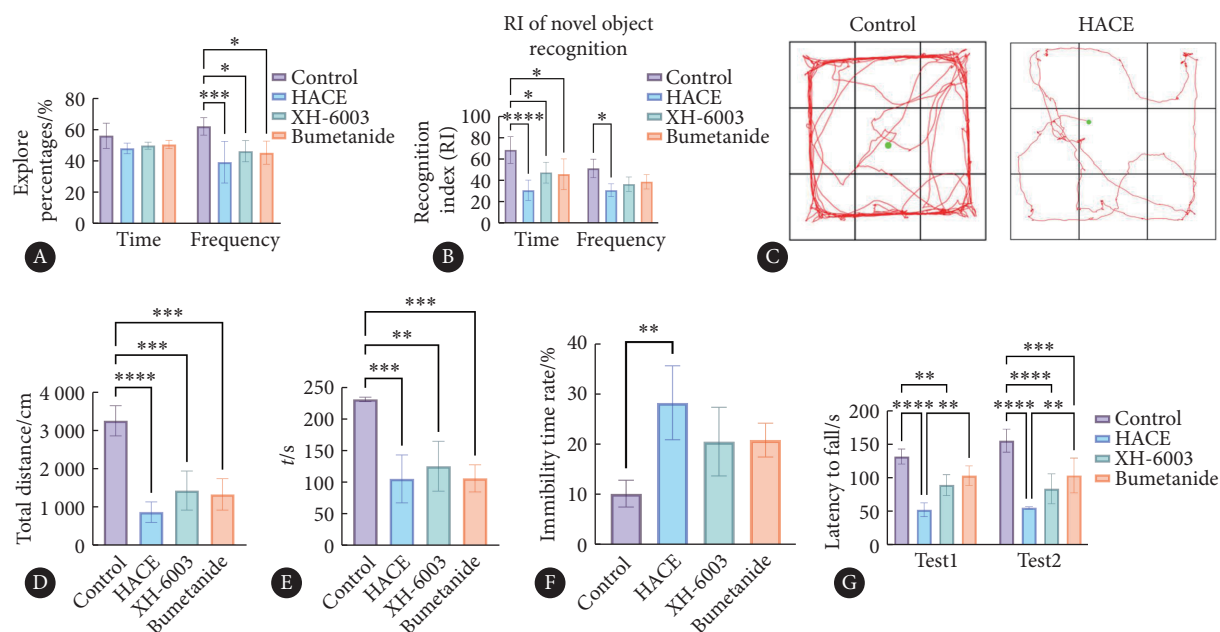


图5 XH-6003对HACE大鼠行为学影响

Fig 5 Behavioral effects of XH-6003 on HACE rats

A, Statistical plot of time and number of times the rats explored the new arm; B, statistical plot of time and number of rats exploring new objects; C, rat open field exploration trajectory diagram; D, statistical chart of total distance the rats covered in the open field of; E, diagram of forced swimming pattern in rats; F, statistical chart of the proportion of resting time in rats; G, statistical chart of rat drop time. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. $n = 4$ per group.

导致脑通透性增高,被认为是高原性脑水肿发生的主要机制之一^[26]。在HACE的病理过程中,BBB通透性增加会导致大量液体和细胞因子进入脑组织,进一步加剧脑水肿和神经损伤。XH-6003可显著修复BBB通透性损伤,减少脑组织中的液体积聚,从而减轻脑水肿。神经元和神经胶质细胞在HACE病理过程中受到损伤,XH-6003通过抑制NKCC1和AQP4的表达,减少脑组织中的水分积聚,从而保护神经元和神经胶质细胞免受损伤,改善神经功能。HACE脑组织中BAX和BAL-1表达显著升高,而XH-6003能够显著改善BAX和BAL-1表达水平。这表明,XH-6003可能通过抑制BAX和BAL-1参与NF- κ B信号通路间接影响细胞凋亡,从而发挥对脑组织的保护作用。

现有研究表明,HACE的发生与氧化应激密切相关^[27]。急性低氧暴露会导致活性氧的失衡,加速细胞膜中脂质过氧化物氧化,进而损伤细胞^[28]。本研究发现,72 h低氧

暴露会降低SOD活性,减少GSH含量,增加MDA含量,而XH-6003并没有逆转这些变化。这表明XH-6003的作用机制可能并不通过清除自由基、抑制脂质过氧化或修复抗氧化防御系统,从而减低氧化应激损伤。结果显示XH-6003对Caspase-3相关凋亡通路和氧化应激的治疗效果与布美他尼相比并未表现出显著优势,可能因为XH-6003的主要作用机制集中在NKCC1/AQP4信号通路上,而对其他凋亡相关途径如Caspase-3的调节作用有限;其次,药物的特异性、剂量以及给药方案的差异可能也影响了治疗效果的全面展现。此外,本研究对不同组大鼠进行行为学评估,旨在深入评估XH-6003与布美他尼在治疗HACE行为学方面的改善作用。结果表明,XH-6003治疗后的大鼠仅在新物体探索时间上有一定的功能改善,其他行为学结果均呈现阴性。这一发现表明,尽管XH-6003在细胞分子层面具有治疗潜力,但其对HACE相关行

为障碍的改善效果尚需进一步探究。未来的研究应综合考虑疾病模型的复杂性、药物剂量、治疗周期等多种因素,以期全面评估XH-6003的治疗潜力和机制,为HACE的临床治疗提供更为坚实的科学依据。

此外,本研究发现仅通过控制压力(20.9%的常氧浓度)来模拟高原环境,减少变量,可更精确探究低压对HACE病理过程的影响。本实验结果表明,在常氧条件下,仅通过低压环境的模拟也能有效地诱导出HACE的病理特征,这证实了在没有显著低氧条件下,低压环境本身也可引起大鼠的脑水肿反应。因此,本研究证实了利用常氧低压环境构建HACE大鼠模型的可行性。

综上,XH-6003通过影响脑内NKCC1和AQP4表达、减轻脑细胞水肿。修复血脑屏障,改善神经元和神经胶质细胞损伤,抑制BAX和BAL-1相关凋亡途径等作用,有望成为一种有效的HACE治疗药物。本研究结果表明,XH-6003作为一种NKCC1抑制剂,对HACE具有治疗潜力。其机制可能与抑制NKCC1表达、修复血脑屏障和抑制细胞凋亡有关,不通过清除自由基和抑制脂质过氧化发挥作用。未来需要更深入的研究来全面阐明XH-6003的作用机制,为HACE的临床治疗提供更有效的药物和策略。

* * *

作者贡献声明 耿华丽负责论文构思、数据审编、正式分析、调查研究、研究方法、研究项目管理、验证、可视化和初稿写作,李百川和夏逸林负责研究方法、研究项目管理和监督指导,宋旭负责审读与编辑写作,周向阳和高静负责调查研究和验证,陈蕾负责论文构思、经费获取、研究项目管理、提供资源和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表版本进行最终定稿并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution GENG Huali is responsible for conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, methodology, project administration, validation, visualization, and writing--original draft. LI Baichuan and XIA Yilin are responsible for methodology, project administration, and supervision. SONG Xu is responsible for writing--review and editing. ZHOU Xiangyang and GAO Jing are responsible for investigation and validation. CHEN Lei is responsible for conceptualization, funding acquisition, project administration, resources, 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 本文作者陈蕾是本刊编委会青年编委,该在编辑评审过程中所有流程严格按照期刊政策进行,且未经其本人经手处理。除此之外,所有作者均声明不存在利益冲突。

Declaration of Conflicting Interests CHEN Lei is a member of the Junior Editorial Board of the journal. All processes involved in the editing and reviewing of this article were carried out in strict compliance with the journal's policies and there was no inappropriate personal involvement by

the author. Other than this, all authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] LUO Y, WANG Y, LU H, *et al.* 'Ome' on the range: update on high-altitude acclimatization/adaptation and disease. *Mol Biosyst*, 2014, 10(11): 2748-2755. doi: 10.1039/c4mb00119b.
- [2] 春花,白玛康卓.高原脑水肿小鼠模型的建立与鉴定. *四川大学学报(医学版)*, 2023, 54(6): 1269-1275. doi: 10.12182/20231160604. CHUNHUA, BAIMAKANGZHUO. Establishment and evaluation of a mice model of high-altitude cerebral edema. *J Sichuan Univ (Med Sci)*, 2023, 54(6): 1269-1275. doi: 10.12182/20231160604.
- [3] CHEN X Y, LIU Z L, SUN Z L, *et al.* Exendin-4 inhibits high-altitude cerebral edema by protecting against neurobiological dysfunction. *Neural Regen Res*, 2018, 13(4): 653-663. doi: 10.4103/1673-5374.230291.
- [4] MACAULAY N, ZEUTHEN T. Water transport between CNS compartments: contributions of aquaporins and cotransporters. *Neuroscience*, 2010, 168(4): 941-956. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.09.016.
- [5] LUKS A M, SWENSON E R, BÄRTSCH P. Acute high-altitude sickness. *Eur Respir Rev*, 2017, 26(143): 160096. doi: 10.1183/16000617.0096-2016.
- [6] DAWADI S, BASNYAT B, ADHIKARI S. A review of medical problems in himalayan porters. *High Alt Med Biol*, 2020, 21(2): 109-113. doi: 10.1089/ham.2020.0004.
- [7] MALLETT R T, BURTSCHER J, PIALOUX V, *et al.* Molecular mechanisms of high-altitude acclimatization. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1698. doi: 10.3390/ijms24021698.
- [8] SIMKA M, LATACZ P, CZAJA J. Possible role of glymphatic system of the brain in the pathogenesis of high-altitude cerebral edema. *High Alt Med Biol*, 2018, 19(4): 394-397. doi: 10.1089/ham.2018.0066.
- [9] JOYCE K E, LUCAS S J E, IMRAY C H E, *et al.* Advances in the available non-biological pharmacotherapy prevention and treatment of acute mountain sickness and high altitude cerebral and pulmonary oedema. *Expert Opin Pharmacother*, 2018, 19(17): 1891-1902. doi: 10.1080/14656566.2018.1528228.
- [10] AGUILERA P, ALQUISIRAS-BURGOS I, FRANCO-PÉREZ J, *et al.* The short form of the SUR1 and its functional implications in the damaged brain. *Neural Regen Res*, 2022, 17(3): 488-496. doi: 10.4103/1673-5374.320967.
- [11] HALSTEAD M R, GEOCADIN R G. The medical management of cerebral edema: past, present, and future therapies. *Neurotherapeutics*, 2019, 16(4): 1133-1148. doi: 10.1007/s13311-019-00779-4.
- [12] SONG T T, BI Y H, GAO Y Q, *et al.* Systemic pro-inflammatory response facilitates the development of cerebral edema during short hypoxia. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 63. doi: 10.1186/s12974-016-0528-4.
- [13] MA Y L, QIN P, LI Y, *et al.* The effects of different doses of estradiol (E2) on cerebral ischemia in an in vitro model of oxygen and glucose deprivation and reperfusion and in a rat model of middle carotid artery occlusion. *BMC Neurosci*, 2013, 14: 118. doi: 10.1186/1471-2202-14-118.
- [14] JING L, WU N, HE L, *et al.* Establishment of an experimental rat model of high altitude cerebral edema by hypobaric hypoxia combined with

- temperature fluctuation. *Brain Res Bull*, 2020, 165: 253-262. doi: 10.1016/j.brainresbull.2020.10.017.
- [15] ZHOU Y, HUANG X, ZHAO T, *et al*. Hypoxia augments LPS-induced inflammation and triggers high altitude cerebral edema in mice. *Brain Behav Immun*, 2017, 64: 266-275. doi: 10.1016/j.bbi.2017.04.013.
- [16] HOU Y, WANG X, CHEN X, *et al*. Establishment and evaluation of a simulated high-altitude hypoxic brain injury model in SD rats. *Mol Med Rep*, 2019, 19(4): 2758-2766. doi: 10.3892/mmr.2019.9939.
- [17] MA B, LI Q, LI M, *et al*. Effect of butylphthalide on prevention and treatment of high altitude cerebral edema in rats. *Heliyon*, 2024, 10(6): e27833. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e27833.
- [18] GONG G, YIN L, YUAN L, *et al*. Ganglioside GM1 protects against high altitude cerebral edema in rats by suppressing the oxidative stress and inflammatory response via the PI3K/AKT-Nrf2 pathway. *Mol Immunol*, 2018, 95: 91-98. doi: 10.1016/j.molimm.2018.02.001.
- [19] PENG Y, YIN H, LI S, *et al*. Transcriptome of pituitary function changes in rat model of high altitude cerebral edema. *Genomics*, 2022, 114(6): 110519. doi: 10.1016/j.ygeno.2022.110519.
- [20] YANG G, CAO Y, WANG P, *et al*. Minocycline pretreatment prevents blood-brain barrier disruption in septic rats. *J Surg Res*, 2022, 273: 247-254. doi: 10.1016/j.jss.2022.01.021.
- [21] DENG Y Y, SHEN F C, XIE D, *et al*. Progress in drug treatment of cerebral edema. *Mini Rev Med Chem*, 2016, 16(11): 917-925. doi: 10.2174/1389557516666160304151233.
- [22] JAYAKUMAR A R, NORENBURG M D. The Na-K-Cl co-transporter in astrocyte swelling. *Metab Brain Dis*, 2010, 25(1): 31-38. doi: 10.1007/s11011-010-9180-3.
- [23] HERTZ L, PENG L, SONG D. Ammonia, like K(+), stimulates the Na(+), K(+), 2 Cl(-) cotransporter NKCC1 and the Na(+), K(+)-ATPase and interacts with endogenous ouabain in astrocytes. *Neurochem Res*, 2015, 40(2): 241-257. doi: 10.1007/s11064-014-1352-9.
- [24] DEKKER M C J, WILSON M H, HOWLETT W P. Mountain neurology. *Pract Neurol*, 2019, 19(5): 404-411. doi: 10.1136/practneurol-2017-001783.
- [25] XUE Y, WANG X, WAN B, *et al*. Caveolin-1 accelerates hypoxia-induced endothelial dysfunction in high-altitude cerebral edema. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 160. doi: 10.1186/s12964-022-00976-3.
- [26] HUANG L Q, ZHU G F, DENG Y Y, *et al*. Hypertonic saline alleviates cerebral edema by inhibiting microglia-derived TNF- α and IL-1 β -induced Na-K-Cl Cotransporter up-regulation. *J Neuroinflammation*, 2014, 11: 102. doi: 10.1186/1742-2094-11-102.
- [27] PENA E, EL ALAM S, SIQUES P, *et al*. Oxidative stress and diseases associated with high-altitude exposure. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(2): 267. doi: 10.3390/antiox11020267.
- [28] PATIR H, SARADA S K S, SINGH S, *et al*. Quercetin as a prophylactic measure against high altitude cerebral edema. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53(4): 659-668. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.010.
- (2024-06-20收稿, 2025-01-10修回)
- 编辑 吕 熙



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)*