论著·军事医学

塞来昔布通过提高12,13-diHOME水平改善急性高原缺氧小鼠右心功能

张 炜[1],包鑫余[1],赖晓玥[2,3],万小勤[1],谭 燕[2],尹鸿钧[1],蔡筱诗[1],田丁元[1],汪紫阳[1],郑 攀[1],邓 芳[2],张志辉[1]
陆军军医大学(第三军医大学):[1]第一附属医院心血管内科,代谢生物钟与心血管疾病中心,老年心脑血管病教育部重点实验室;[2]高原军事医学系病理生理学教研室;[3]第二附属医院超声医学科,重庆

[**摘要**] **目的** 评估塞来昔布(Celecoxib)对急性高原缺氧小鼠右心功能的影响并探究其作用机制。**方法** 将7周龄C57BL/6J雄性小鼠置于模拟5 800 m海拔低压氧仓饲养2 d以构建急性高原缺氧动物模型。①将18只小鼠按随机数字表法分为平原组(P+S)、高原组(H+S)和高原给塞来昔布组(H+Cel),检测体质量和血常规,小动物超声心动图测量心率(heart rate, HR)、肺动脉加速时间与射血时间比(pulmonary artery acceleration time/ejection time ,AT/ET)、三尖瓣环收缩期位移(tricuspid annular plane systolic excursion,TAPSE)、三尖瓣环收缩期峰值速度(tricuspid annular systolic velocity, S')、左室射血分数(left ventricular ejection fraction, EF)和左室缩短分数(left ventricular fractional shortening, FS),靶向代谢组测序检测小鼠心脏花生四烯酸代谢,ELISA检测小鼠心脏、肝脏、棕色脂肪和血浆的12,13-二羟基-9-氧杂十八碳二烯酸(12,13-Dihydroxy-9Z-octadecenoic acid,12,13-diHOME)水平。②将18只小鼠随机分为平原组(P+S)、高原组(H+S)和高原给12,13-diHOME组(H+di),同前检测小鼠体质量、血常规和心脏超声。③将32只小鼠随机分为高原组(H+S)、高原给塞来昔布组(H+Cel)、高原给可溶性环氧化物水解酶抑制剂(soluble epoxide hydrolase inhibitor, sEHI)组(H+sEHI)和高原同时给sEHI和塞来昔布组(H+sEHI+Cel),同前检测体质量、血常规和心脏超声,ELISA检测小鼠心脏和血浆的12,13-diHOME和环氧二十碳三烯酸(epoxyeicosatrienoic acids, EETs)水平。**结果** ①与P+S组比较,H+S组心脏中的12,13-diHOME水平显著下降($P<0.001$),白细胞(white blood cell ,WBC)和中性粒细胞(neutrophil, NEUT)数量显著上升($P<0.01$),TAPSE、S'和AT/ET的静息水平和负荷水平均显著降低($P<0.01$, $P<0.001$);与H+S组比较,H+Cel组心脏中的12,13-diHOME水平显著提高($P<0.05$)、白细胞和淋巴细胞(Lymphocyte, LYM)数量显著下降($P<0.01$,$P<0.05$),TAPSE和S'的负荷水平和储备均显著提高($P<0.01$, $P<0.001$)。②与H+S组比较,H+di组TAPSE的静息水平和负荷水平均显著提高($P<0.001$),其储备也有提高趋势($P=0.0532$),白细胞和中性粒细胞水平没有改变。③与H+Cel组比较,H+sEHI和H+sEHI+Cel组心脏中的12,13-diHOME水平显著下降($P<0.01$,$P<0.05$),心功能无显著改变;与H+S组比较,H+Cel组,H+sEHI组和H+sEHI+Cel组小鼠白细胞和淋巴细胞数量均显著下降($P<0.01$,$P<0.001$),血清中的EETs水平显著提高($P<0.01$,$P<0.001$)。**结论** 塞来昔布通过CYP450-sEH代谢途径提升急性高原缺氧小鼠心脏中12,13-diHOME水平并显著改善了急性高原缺氧小鼠的右心功能。

[**关键词**] 塞来昔布;高原;缺氧;右心功能;12,13-diHOME
[**中图法分类号**] R331.31;R594.3;R976 [**文献标志码**] A

[**基金项目**] 极端环境医学教育部重点实验室预研基金(KL2022GY004)

[**通信作者**] 张志辉,E-mail:xyzpj@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2025, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:张炜,包鑫余,赖晓玥,等. 塞来昔布通过提高12,13-diHOME水平改善急性高原缺氧小鼠右心功能[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(19):2289-2301. DOI:10.16016/j.2097-0927.202507098.

Citation:ZHANG W, BAO X Y, LAI X Y, *et al*. Celecoxib improves right heart function in mice after acute high-altitude hypoxia exposure by increasing 12,13-diHOME level[J]. J Army Med Univ,2025,47(19):2289-2301. DOI:10.16016/j.2097-0927.202507098.

Celecoxib improves right heart function in mice after acute high-altitude hypoxia exposure by increasing 12,13-diHOME level

ZHANG Wei[1], BAO Xinyu[1], LAI Xiaoyue[2,3], WAN Xiaoqin[1], TAN Yan[2], YIN Hongjun[1], CAI Xiaoshi[1], TIAN Dingyuan[1], WANG Ziyang[1], ZHENG Pan[1], DENG Fang[2], ZHANG Zhihui[1] [1]Department of Cardiovascular Medicine, First Affiliated Hospital; [2]Department of Pathophysiology, Faculty of High Altitude Military Medicine; [3]Department of Ultrasonography, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

[**Abstract**] Objective To investigate the effect and mechanisms of celecoxib on right heart function in mice with acute high-altitude hypoxia exposure. Methods Male C57BL/6J mice (7 weeks old) were housed in a hypobaric chamber simulating an altitude of 5 800 m for 2 d to establish an animal model of acute hypobaric hypoxia. ① Eighteen mice were randomly assigned to plain+saline (P+S), high-altitude hypoxia exposure+saline (H+S), and high-altitude hypoxia exposure+celecoxib (H+Cel). Body weight and routine blood indicators were measured, and cardiac ultrasound examination were performed for heart rate (HR), pulmonary artery acceleration time to ejection time ratio (AT/ET), tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE), tricuspid annular systolic velocity (S'), and left ventricular ejection fraction (LVEF) and fractional shortening (FS). Targeted metabolomic profiling was applied to detect the cardiac arachidonic acid (AA) metabolite levels. The contents of 12,13-dihydroxy-9Z-octadecenoic acid (12,13-diHOME) in the heart, liver, brown adipose tissue, and plasma were quantified by ELISA. ② Eighteen mice were randomly assigned into plain+saline (P+S), high-altitude hypoxia exposure+saline (H+S) and high-altitude hypoxia exposure+12,13-diHOME (H+di) groups. Body weight, routine blood tests, and echocardiography were performed as above. ③ Thirty-two mice were randomly divided into high-altitude hypoxia exposure+saline (H+S), high-altitude hypoxia exposure+celecoxib (H+Cel), high-altitude hypoxia exposure+soluble epoxide hydrolase inhibitor (sEHI) (H+sEHI), and high-altitude hypoxia exposure+sEHI+celecoxib (H+sEHI+Cel) groups. Body weight, routine blood tests, and echocardiography were performed as above. Cardiac and plasma contents of 12,13-diHOME and epoxyeicosatrienoic acids (EETs) were measured by ELISA. Results ① Compared to the P+S group, the H+S group exhibited significantly reduction of cardiac 12,13-diHOME level (P<0.001), increased counts of white blood cells (WBC) and neutrophils (P<0.01) and decreased TAPSE, S' and AT/ET both at resting state and under stress (P<0.01, P<0.001). Compared to the H+S group, the H+Cel group exhibited significantly increase of cardiac 12,13-diHOME level (P<0.05), reduced WBC and lymphocyte counts (P<0.01, P<0.05) and improved TAPSE and S′ levels at resting state and under stress (P<0.01, P<0.001). ② Compared to the H+S group, the H+di group demonstrated significantly improvement of TAPSE at basal and under stress (P<0.001) and a trend towards improved TAPSE at resting state (P=0.0532), but no obvious differences was observed in WBC and neutrophil counts between the H+di group and the H+S group. ③ Compared to the H+Cel group, both the H+sEHI and H+sEHI+Cel groups exhibited significantly reduction of cardiac 12, 13-diHOME level (P<0.01, P<0.05) though no statistical changes in cardiac function indicators. Compared to the H+S group, WBC counts and lymphocyte were decreased, and serum EETs level was incrased in the H+Cel group, H+sEHI group and H+sEHI+Cel group (P<0.01, P<0.001). Conclusion Celecoxib can elevate cardiac level of 12,13-diHOME and improves right heart function in mice after acute high-altitude hypoxia exposure through the CYP450-sEH metabolic pathway.

[**Key words**] celecoxib; high altitude plateau; hypoxia; right heart function; 12,13-diHOME

Supported by the Pre-research Fund of Key Laboratory of Extreme Environment Medicine of Ministry of Education (KL2022GY004). Corresponding author: ZHANG Zhihui, E-mail: xyzpj@tmmu.edu.cn

医学上将海拔大于2 500 m以上的地区定义为高原[1-2]。随着海拔升高,大气中氧分压的持续降低导致人体动脉氧分压下降伴随血氧饱和度显著下降,在海拔3 000 m处时,大气氧分压较海平面下降约30.8%(从159 mmHg降至110 mmHg),人体动脉氧分压下降约15%(从100 mmHg降至85~90 mmHg)[3]。高原缺氧环境迫使机体通过调动储备心功能对抗缺氧,主要表现为刺激肾上腺素能系统,增加心率和心输出量,同时兴奋呼吸系统,使肺血管收缩,肺动脉压升高,进而加重心肺负荷,促进机体短期适应的同时,过高的肺动脉压力和持续动用的心率储备让右心室处于超负荷状态,在短期(≤1个月)内就会导致肺小动脉的重塑[4]和心功能的损害[5]并逐渐使心血管系统发生不可逆重塑,继而造成右心室肥厚扩张,甚至右心衰竭,损害高原人群的健康寿命[6]。因此亟待对相关机制的拓展研究和对新的治疗靶点进行探索,寻找更加安全直接有效的治疗措施。

缺氧还刺激包括巨噬细胞和心血管系统在内的多个组织器官中的环氧化酶-2(cyclooxygenase-2,COX-2)反应性表达增强,促进花生四烯酸转化为下游炎性代谢产物[7],是高原缺氧环境影响机体炎症反应的重要机制。已有研究证明了阿司匹林和对乙酰氨基酚等其他非特异性COX抑制剂对急性高原反应的治疗效果和机制[8-10],作为同样能降低花生四烯酸代谢水平并抑制炎症反应的特异性COX-2抑制剂的塞来昔布,虽然具有更好的药物靶向性并作为临床常用的非甾体类解热镇痛药,但还尚无其应用于高原环境和缓解急性高原心脏损害相关研究,对其是否能改善心脏功能也无相关证据。因此,本研究聚焦塞来昔布对于急性高原缺氧小鼠心脏的作用并探究其具体机制。

12,13-二羟基-9-氧杂十八碳二烯酸(12,13-Dihydroxy-9Z-octadecenoic acid,12,13-diHOME)是亚油酸(linoleic acid,LA)通过细胞色素P450(cytochrome P450,CYP450)代谢途径生成的重要氧化脂代谢产物[11-12]。近年来的研究表明,12,13-diHOME是一种对心脏有益的脂因子[13-15],能通过直接影响心肌细胞的线粒体呼吸进而改善心脏血流动力学[16]。在小鼠棕色脂肪组织(brown adipose tissue,BAT)移植模型的研究中观察到小鼠循环中12,13-diHOME水平的增加和心脏功能的改善[17]。研究表明12,13-diHOME能降低循环中促炎脂质介质的水平,进而减轻心脏组织的慢性炎症[11],人群数据也表明12,13-diHOME在人类心脏病患者中减少[16]。上述研究提示12,13-diHOME对心功能的保持是关键的,同时其作为新型脂类信号分子通过调控线粒体能量代谢,可以发挥抗炎、抗氧化作用,为心肌病和心血管疾病的干预提供潜在的靶点。但12,13-diHOME如何调节急性高原缺氧下的心脏功能仍有待研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

68只雄性C57BL/6J小鼠(7周龄,体质量21.1~25.0 g)购自北京维通利华公司,饲养于陆军军医大学无特定病原体无特定病原体(specific pathogen-free barrier facility,SPF)动物房中,动物房开关灯时间为8:00至20:00,12 h光/暗循环,温度22 ℃。在SPF级环境下饲养1周后采用完全随机分组法进行分组,称量小鼠体质量后根据分组进行腹腔注射塞来昔布(20 mg/kg)和12,13-diHOME(10 μg/kg)、灌胃给药trans-AUCB(1 mg/kg)的干预措施,对照干预为生理盐水(100 μL)腹腔注射或灌胃给药,连续干预3 d后进入低压动物实验舱群(贵州风雷,DYC-2824T),低压氧舱内设置模拟海拔高度5 800 m,大气压约为48.9 kPa,氧分压约为10.26 kPa。低压氧舱内饲养2 d后小鼠经异氟烷(上海瑞沃德)麻醉后进行心脏超声检测,随后摘除眼球取血并取材。动物实验均通过陆军军医大学实验动物福利与伦理委员会批准(AMUWEC20223610)。

1.2 液相质谱测量

委托中科脂典生物技术有限责任公司进行液相质谱测量的技术服务,在约200 mg小鼠心脏样品中加入含有0.1%(w/v)丁羟甲苯和叔丁基羟基茴香醚的提取液、甲酸和混合内标。将样品涡旋,使其充分混合。然后加入一定量的用甲醇清洗过的陶瓷珠,心脏样品于4 ℃,239×*g*孵育12 h,以确保从组织中有效提取类花生酸。孵育结束后于4 ℃,15 294×*g*离心10 min,取上清。重复提取2次。如上所述,使用Oasis Prime HLB色谱柱(30 mg,Waters,USA),通过固相萃取(solid-phase extraction,SPE)对合并的上清液进行类花生酸富集提取。将SPE洗脱液转入含有20 μL乙醇:甘油1:1(v/v)的管中以防完全干燥,在氮气流下进行干燥。干燥后的提取物立即重悬于50 μL的水:乙腈:甲酸63:37:0.02(v/v/v)溶液中,用于质谱分析。类花生酸分析在Exion AD30-UPLC-Sciex 7500 Plus Qtrap(Sciex,USA)上进行。色谱条件为:色谱柱:Phenomenex Kinetex-C18(i.d.100×2.1 mm,1.7 μm);流动相A:水乙腈:甲酸63:37:0.02(v/v/v);流动相B:乙腈:异丙醇1:1(v/v)。

1.3 心脏超声测量

使用飞依诺VINNOLAB7超高分辨率小动物超声成系统和瑞沃德动物麻醉机进行小鼠心脏超声测量。小鼠经胸腹部脱毛膏脱毛后,以3%异氟烷诱导麻醉,以1%异氟烷维持面罩麻醉并固定,测量期间加垫加热毯以保持小鼠体温。探查右室流出道切面,以肺动脉血流频谱测量肺动脉加速时间(pulmonary artery acceleration time, AT)、射血时间(right ventricular ejection time, ET)和心率(heart rate, HR);左室长轴切面M-mode测量左室射血分数(left ventricular ejection fraction, EF)和缩短分数(left ventricular fractional shortening, FS);心尖四腔心切面测量三尖瓣环收缩期位移(right ventricular ejection time, TAPSE)和三尖瓣环收缩期运动速度(tricuspid annular systolic velocity, S'),测量时选择2个时间点,小鼠维持麻醉时的测量数据代表心功能静息水平,随后对小鼠腹腔注射多巴酚丁胺(2.5 mg/mL, 0.9%NaCl)5 mg/kg,等待5 min后重复测量上述指标,其变化值代表心功能储备能力。

1.4 12,13-diHOME/EETs的含量检测

小鼠麻醉后取血液、心脏、肝脏、背部棕色脂肪,取少量各类组织分别在500 μL生理盐水中充分研磨后以3 000 r/min离心10 min,取上清;BCA法测定上清总蛋白浓度,并按照ELISA试剂盒(北京华博德亿,HBDY-47269M1/HBDY-46054M1)说明书步骤检测12,13-diHOME/EETs脂因子含量,组织结果以总蛋白浓度校准,血清结果不校准。

1.5 血常规检测

将EDTA抗凝管(YA1461,索莱宝)采集血样使用IDEXX ProCyte血常规分析仪进行血常规测定并自动生成检测数据。

1.6 统计学分析

所有统计分析和图像生成使用均GraphPad Prism 8.0软件进行处理,$\bar{x}\pm s$表示符合正态分布及方差齐性的定量资料,多组间连续变量比较采用单因素方差分析,随后采用Tukey's HSD test校正进行组间两两比较,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

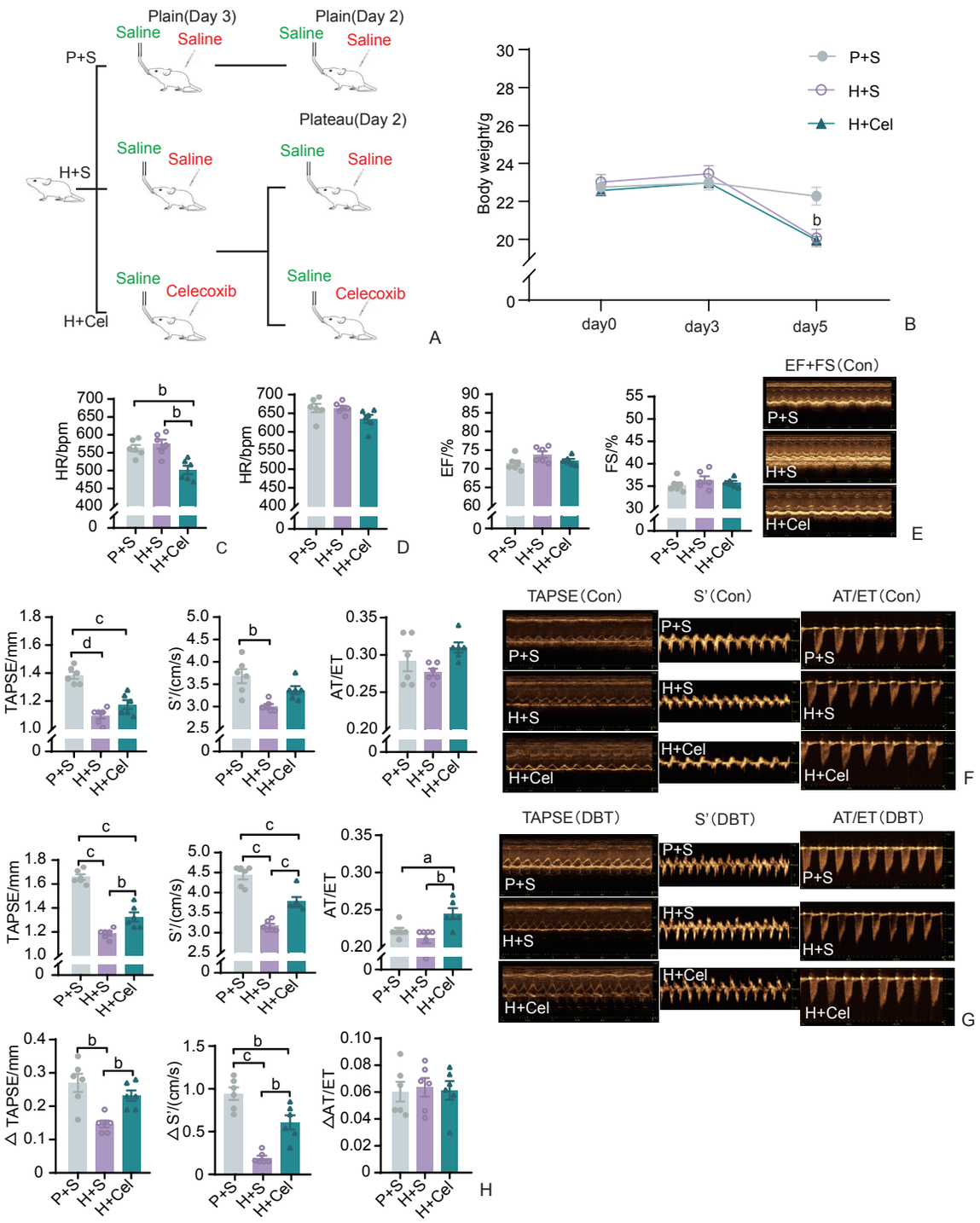
2 结果

2.1 塞来昔布可以显著改善急性高原缺氧小鼠的右心功能

首先探究塞来昔布是否能够改善急进高原小鼠心脏功能。将小鼠分为平原组(P+S)、高原组(H+S)和高原给塞来昔布组(H+Cel),见图1A。在平原给药前、进入高原前和进入高原2 d后监测体质量,进入高原后,H+S小鼠和H+Cel小鼠相较于P+S小鼠的体质量显著下降,塞来昔布给药不影响小鼠体质量(图1B)。小鼠进入高原2 d后检测心脏功能,静息水平下H+S组小鼠心率相较于P+S组小鼠无显著差异,而H+Cel组小鼠的心率相较于H+S组小鼠显著降低了12.6%($P=0.001\ 1$),同时相较于P+S组小鼠心率也显著降低了10.8%($P=0.004\ 8$,图1C)。使用盐酸多巴酚丁胺负荷小鼠心脏功能后再次检测小鼠心率提示负荷后3组小鼠心率无显著差异(图1D)。左心收缩功能检测提示,静息水平下3组小鼠左心EF和FS均无显著差异(图1E)。检测小鼠右心功能,静息水平下H+S组小鼠的TAPSE和S'相较于P+S组小鼠显著降低了27.0%($P<0.000\ 1$)和18.2%($P=0.001\ 4$),H+Cel组小鼠的TAPSE和S'相较于H+S组小鼠呈升高趋势,而3组间AT/ET无显著差异(图1F)。为了进一步检测塞来昔布对急性高原缺氧小鼠右心功能的影响,使用盐酸多巴酚丁胺负荷小鼠心脏功能后再次检测小鼠心脏超声,右心功能检测提示负荷状态下H+Cel小鼠的右心TAPSE、S'和AT/ET相较于H+S组小鼠分别显著升高了11.0%($P=0.008\ 4$)、19.6%($P=0.000\ 6$)和15.7%($P=0.004\ 0$,图1G)。计算心脏储备功能提示:尽管H+Cel组小鼠AT/ET的储备值相较于H+S组小鼠无显著差异,但TAPSE和S'的储备值分别显著提高了58.0%($P=0.017\ 2$)和217.4%($P=0.001\ 2$,图1H)。

2.2 塞来昔布可以显著提高急性高原缺氧小鼠心脏中的12,13-diHOME水平

为了探究塞来昔布改善小鼠右心储备功能的具体机制,对小鼠心脏组织进行代谢组测序。小鼠心脏花生四烯酸代谢产物主成分分析图提示,H+Cel组小鼠相较于H+S组小鼠的心脏花生四烯酸代谢出现显著差异(图2A),共计检测了14个类别的花生四烯酸次级代谢产物(图2B),包含共计41个花生四烯酸代谢终产物。小鼠心脏代谢组学分析提示,H+S组小鼠相较于P+S组小鼠的8-羟基二十碳四烯酸(8-hydroxyeicosatetraenoic Acid,8-HETE)、9,10-二羟基十八碳十二烯酸(9,10-dihydroxy-12-octadecenoic acid,9,10-diHOME)和12,13-diHOME水平显著降低($P<0.05$,图2C);H+Cel组小鼠相较于H+S组小鼠的血栓素B_3(thromboxane B_3,TXB_3)水平显著降低,前列腺素F2α(prostaglandin F2α, PGF2α)、9,10-diHOME和12,13-diHOME水平显著升高($P<0.05$,图2D)。进一步对小鼠血清、肝脏、棕色脂肪和心脏的12,13-diHOME进行ELISA检测提示,H+S组小鼠血清、肝脏、棕色脂



A: Schematic diagram of experimental mouse grouping (Green: oral gavage, Red: intraperitoneal injection); B: Detection of mouse body weight (n=8); C: Detection of heart rate in mice by echocardiography under resting state (n=6); D: Detection of heart rate in mice by echocardiography under dobutamine hydrochloride stress state (n=6); E: Detection of EF and FS in mice by echocardiography under resting state and dobutamine hydrochloride stress state (n=6); F: Detection of TAPSE, S', and AT/ET in mice by echocardiography under resting state (n=6); G: Detection of TAPSE, S', and AT/ET in mice by echocardiography under dobutamine hydrochloride stress state (n=6); H: Reserve values of TAPSE, S', and AT/ET in the right ventricle of mice (n=6). HR: Heart rate; AT/ET: Acceleration time/ejection time; TAPSE: Tricuspid annular plane systolic excursion; S': Tricuspid annular systolic velocity. a: P<0.05, b: P<0.01, c: P<0.001

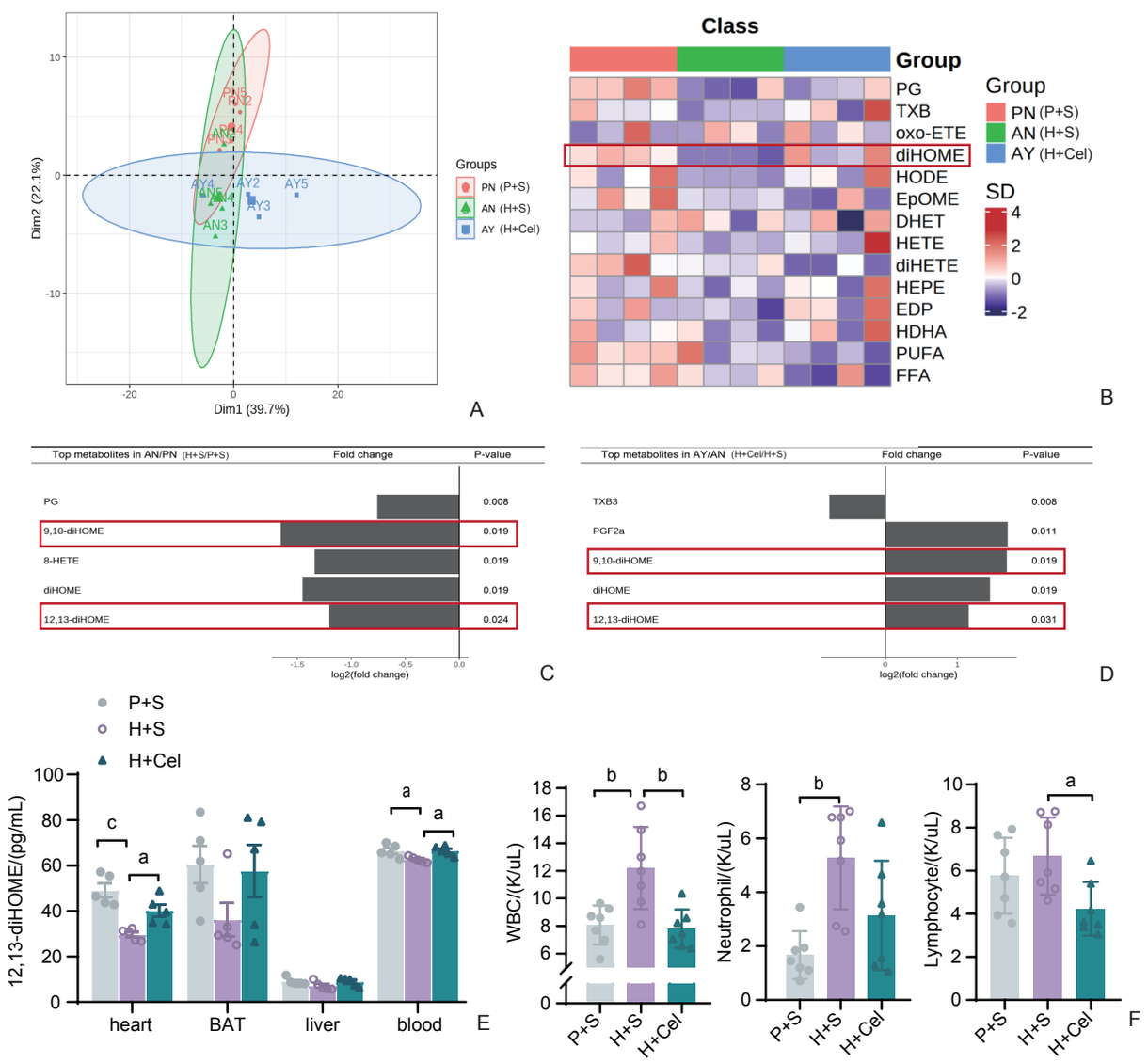
图1 塞来昔布可以显著改善急性高原缺氧小鼠的右心功能

Figure 1 Celecoxib significantly improves right heart function in mice with acute high-altitude hypoxia exposure

肪中12，13-diHOME的含量相较于P+S组小鼠均呈降低趋势，给予塞来昔布后可以增加上述组织中12，13-diHOME的含量，其中H+S组小鼠心脏的12，13-diHOME含量相较于P+S组小鼠显著下降了39.6%，而给予塞来昔布后急性高原缺氧小鼠心脏12，13-diHOME含量显著上升了35.5%（P<0.05，图2E）。对小鼠进行血常规检测提示，H+S组小鼠相较于P+S组小鼠的淋巴细胞数量呈升高趋势，白细胞和中性粒细胞数量显著升高（P<0.01，图2F））；而H+Cel组小鼠相较于H+S组小鼠其白细胞和淋巴细胞数量显著降低（P<0.01，P<0.05，图2F），中性粒细胞数量呈降低趋势（图2F），提示塞来昔布抑制了急性高原缺氧导致的白细胞、中性粒细胞和淋巴细胞数量的上升。

2.3　12，13-diHOME可以显著改善急性高原缺氧小鼠的右心功能

为了验证12，13-diHOME是塞来昔布改善急性高原缺氧小鼠右心功能的主要因素。将小鼠分为平原组（P+S）、高原组（H+S）和高原给12，13-diHOME组（H+di），见图3A。按之前的实验流程监测小鼠体质量，给予12，13-diHOME不影响急性高原缺氧小鼠的



A：PCA plot of cardiac arachidonic acid metabolome in mice；B：Heatmap of cardiac arachidonic acid secondary metabolites in mice；C：Box plots of differential arachidonic acid metabolites in cardiac tissue of P+S *vs* H+S mice（n=4）；D：Box plots of differential arachidonic acid metabolites in cardiac tissue of H+Cel *vs* H+S mice（n=4）；E：ELISA detection of cardiac 12，13-diHOME level in mice（n=5）；F：Counts of white blood cell（WBC），neutrophil，and lymphocyte in mice（n=7）. a：P<0.05，b：P<0.01，c：P<0.001

图2　塞来昔布可以显著提高急性高原缺氧小鼠心脏中的12，13-diHOME水平

Figure 2　Celecoxib significantly elevates cardiac 12，13-diHOME levels in mice with acute high-altitude hypoxia exposure

体质量(图3B)。小鼠进入高原2 d后检测心脏功能,静息水平下3组小鼠的心率无显著差异,在使用盐酸多巴酚丁胺负荷小鼠心脏功能后,3组小鼠的心率仍无显著差异(图3C)。左心收缩功能检测提示静息水平下3组小鼠的EF和FS均无显著差异(图3D),使用盐酸多巴酚丁胺负荷小鼠心脏功能后,H+di小鼠相较于H+S组小鼠左心EF和FS显著上升了5.8%(P=0.006 7)和11.5%(P=0.007 6),其EF和FS的储备显著提高了49.8%(P=0.028 2)和57.6%(P=0.017 8,图3E)。进一步检测小鼠右心功能,静息水平下H+di组小鼠的TAPSE相较于H+S组小鼠显著升高了22.3%(P<0.000 1,图3F),使用盐酸多巴酚丁胺负荷小鼠心脏功能后发现H+di小鼠相较于H+S小鼠的TAPSE显著升高了29.6%(P=0.000 1,图3G)。计算小鼠右心储备功能结果提示H+di组小鼠的S'储备和TAPSE储备(P=0.053 2)相较于H+S组小鼠均呈高趋势(图3 H)。小鼠血常规结果提示,尽管H+di组小鼠的白细胞和中性粒细胞相较于H+S组小鼠呈降低趋势,但无显著差异(图3I)。上述结果提示12,13-diHOME不影响白细胞和中性粒细胞的水平。

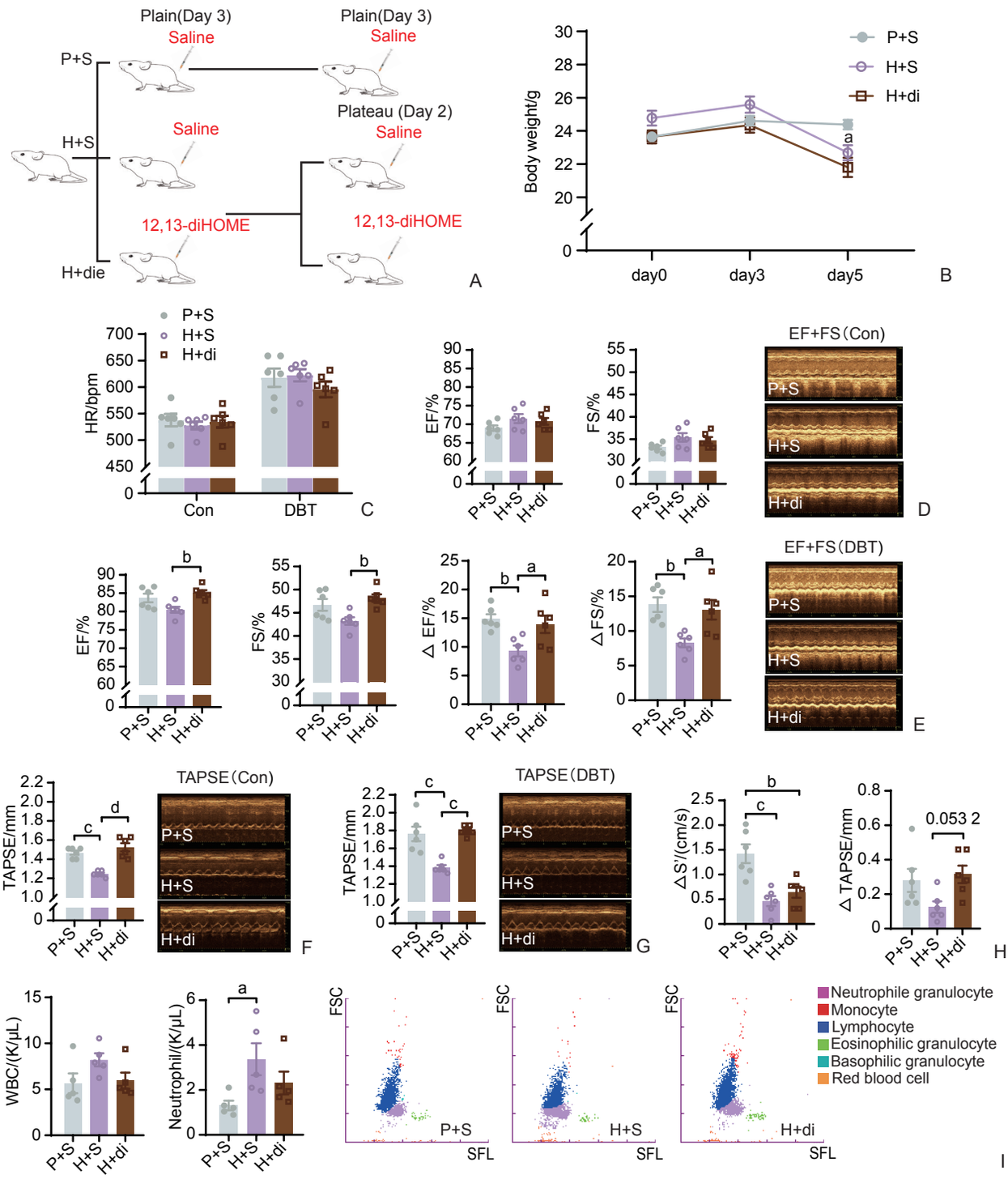
2.4 急性高原缺氧条件下,sEH抑制剂trans-AUCB可显著降低由塞来昔布导致的小鼠心脏12,13-diHOME水平的升高

鉴于CYP450-sEH是12,13-diHOME的经典合成途径,使用sEH抑制剂trans-AUCB(sEHI)抑制sEH酶的活性探究塞来昔布是否通过该途径影响12,13-diHOME的合成。将小鼠分为高原组(H+S)、高原给塞来昔布组(H+Cel)、高原给sEHI组(H+sEHI)以及高原同时给sEHI和塞来昔布组(H+sEHI+Cel)(图4A)。按之前实验流程监测小鼠体质量,研究发现单纯给予sEHI不影响小鼠的体质量,但H+sEHI+Cel小鼠体质量相较于H+S小鼠在平原时出现显著降低,同时4组小鼠进入高原后体质量无显著差异(图4B)。对小鼠的心脏和血液进行ELISA检测,检测结果提示H+sEHI小鼠的心脏和血液12,13-diHOME相较于H+S小鼠呈降低趋势,H+sEHI小鼠和H+sEHI+Cel小鼠的心脏12,13-diHOME水平相较于H+Cel小鼠显著降低了39.7%和23.0%,血清12,13-diHOME水平显著降低了8.6%和5.3%(P<0.05,图4C)。采用ELISA对小鼠心脏和血液EETs的含量进行检测发现,尽管上述药物的使用对小鼠心脏EETs的含量无显著影响(图4D),但H+Cel和H+sEHI组的血浆EETs水平与H+S组比较显著上升了12.6%和15.2%且2种药物联合使用进一步使小鼠血浆中EETs的含量升高了18.9%(P<0.01,图4D)。对小鼠血液常规进行分析提示相较于H+S组小鼠,H+Cel组和H+sEHI组小鼠的白细胞和淋巴细胞数量均显著下降,H+Cel小鼠中性粒细胞数量显著降低,而H+sEHI小鼠中性粒细胞数量仅呈降低趋势;但H+sEHI+Cel小鼠的白细胞和中性粒细胞数量相较于H+Cel小鼠和H+sEHI小鼠未能进一步降低,反而有增加趋势(图4E)。

2.5 sEHI对急性高原缺氧小鼠的心脏功能无明显影响,也未对塞来昔布改善心脏功能的作用产生影响

为了验证降低心脏12,13-diHOME水平是否能够显著影响急进高原小鼠的右心功能,使用sEHI减少12,13-EpHOME向12,13-diHOME的转化并监测小鼠心功能。在小鼠进入高原2 d后检测心脏功能,H+Cel小鼠和H+sEHI小鼠的基础心率相较于H+S小鼠均显著下降了18.4%(P<0.000 1)和9.8%(P=0.016 2,图5A)。且H+Cel和H+sEHI小鼠的心率储备相较于H+S小鼠显著上升了146.1%(P=0.000 7)和105.4%(P=0.013 3),但H+sEHI+Cel基础心率和心率储备相较于H+S小鼠无显著差异(图5A),提示塞来昔布和sEHI在代谢通路上存在共同靶点。测量小鼠左心功能,静息水平下4组小鼠的EF和FS均无显著差异(图5B),使用盐酸多巴酚丁胺负荷后4组小鼠的EF和FS无显著差异,同时左心功能储备值也无显著差异(图5B),提示sEHI和塞来昔布相同,2者的使用对左心室功能均无显著影响。

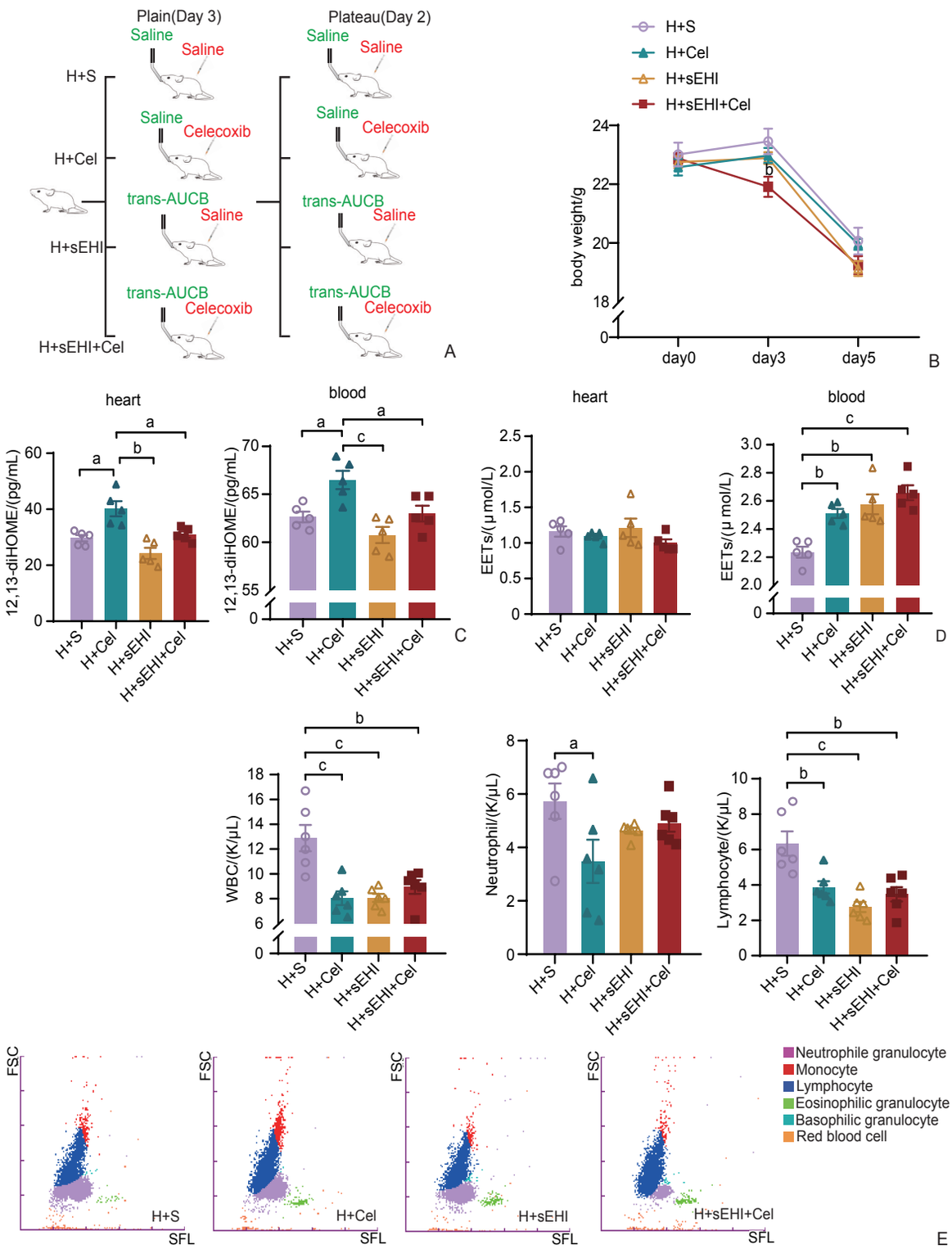
进一步测量小鼠右心功能,同前期使用塞来昔布可以使急性高原缺氧小鼠右心TAPSE、S'和AT/ET均有改善的结果一致,静息水平下H+Cel小鼠相较H+S小鼠的TAPSE、S'和AT/ET均有改善趋势,但仅有S'出现显著差异(P=0.0317,图5C)。同时,在静息水平下,H+sEHI小鼠和H+sEHI+Cel小鼠的右心TAPSE、S'和AT/ET相较于H+Cel小鼠无显著差异,仅S'和AT/ET呈降低趋势(图5C)。使用盐酸多巴酚丁胺负荷后H+Cel小鼠和H+sEHI+Cel小鼠的TAPSE相较于H+S显著升高了14.8%(P=0.003 3)和13.7%(P=0.006 5);尽管H+sEHI+Cel小鼠的S'相较于H+S无显著差异,但所有给药组和H+S小鼠对比,S'和AT/ET均呈上升趋势(图5D)。进一步对比右心储备值发现,H+Cel小鼠和H+sEHI+Cel小鼠的右心TAPSE储备值相较于H+S小鼠显著升高了59.7%(P=0.041 1)和61.0%(P=0.036 0),且两个给药组之间无显著差异,S'储备值也呈上述趋势(图5E)。上述结果提示sEHI不影响塞来昔布对急性高原缺氧小鼠心脏的改善作用。



A: Schematic diagram of experimental mouse grouping (Red: Intraperitoneal injection); B: Body mass measurement in mice (n=8); C: Heart rate detection by echocardiography (n=6); D: Resting-state echocardiographic measurement of EF and FS in mice (n=6); E: Dobutamine hydrochloride stress echocardiography measuring EF, FS, and their reserve values in mice (n=6); F: Resting-state echocardiographic measurement of TAPSE in mice (n=6); G: Dobutamine hydrochloride stress echocardiography measuring TAPSE in mice (n=6); H: Reserve values of S' and AT/ET measured by echocardiography in mice (n=6); I: Routine blood test of white blood cells (WBC) and neutrophils in mice (n=5). HR: Heart rate; AT/ET: Acceleration time/ejection time; TAPSE: Tricuspid annular plane systolic excursion; S': Tricuspid annular systolic velocity. a: P<0.05, b: P<0.01, c: P<0.001, d: P<0.000 1

图3 12,13-diHOME可以显著改善急性高原缺氧小鼠的右心功能

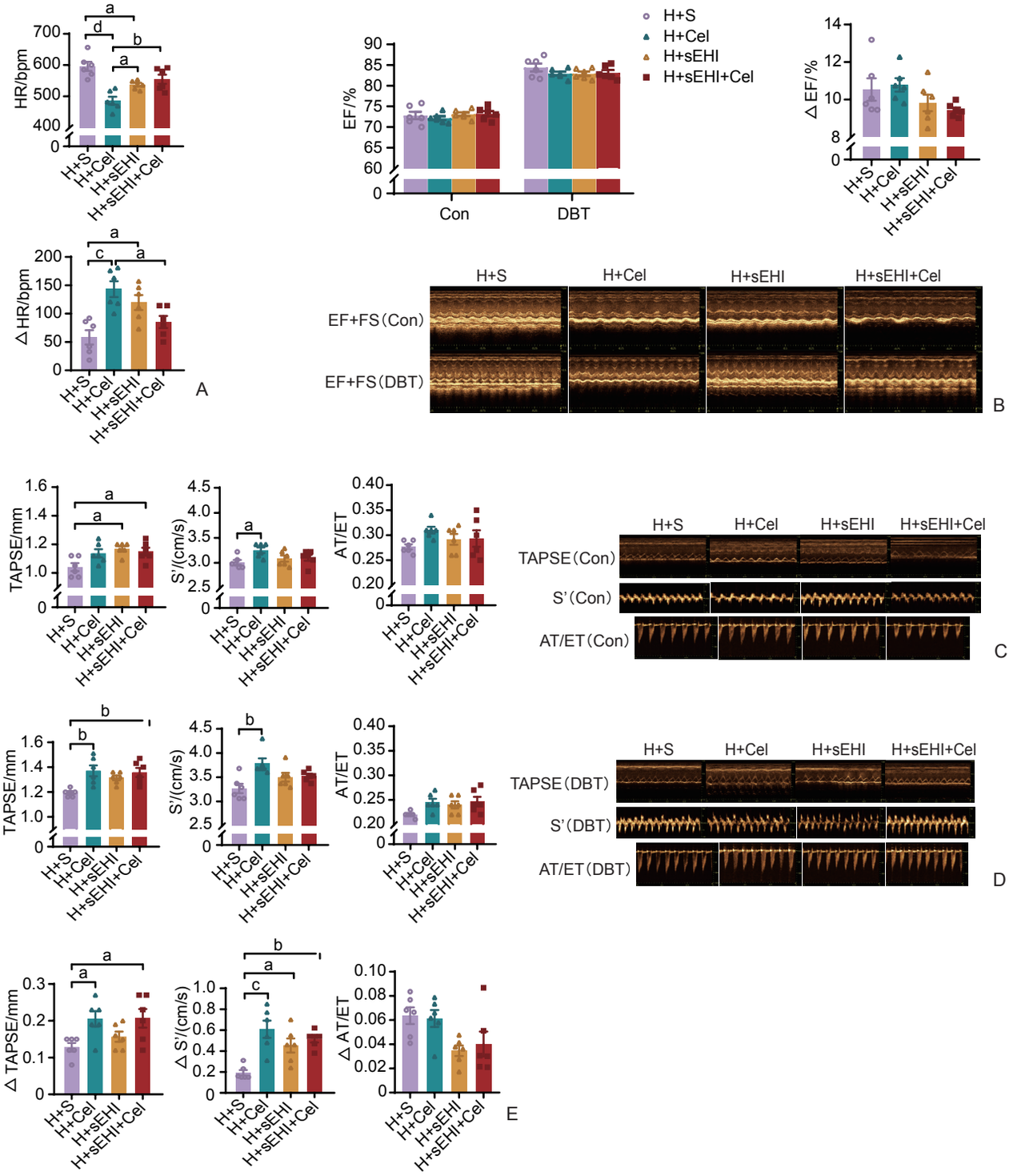
Figure 3 12,13-diHOME significantly ameliorates right ventricular function in mice with acute high-altitude hypoxia exposure



A: Schematic diagram of experimental mouse grouping (Green: Oral gavage; Red : Intraperitoneal injection); B: Body mass measurements in mice (n=8); C: ELISA quantification of 12,13-diHOME levels in cardiac tissue and blood (n=5); D: ELISA quantification of EETs levels in cardiac tissue and blood (n=5); E: Routine blood tests of white blood cells (WBC), neutrophil, and lymphocyte counts (n=6). EET: Epoxyeicosatrienoic acids. a: P<0.05, b: P<0.01, c: P<0.001, d: P<0.000 1

图4 急性高原缺氧条件下,sEH抑制剂trans-AUCB可显著降低由塞来昔布导致的小鼠心脏12,13-diHOME水平的升高

Figure 4 Under acute high-altitude hypoxia exposure, the sEH inhibitor trans-AUCB significantly attenuates celecoxib-induced elevation of cardiac 12,13-diHOME levels in mice



A: Heart rate measurement by echocardiography in mice under resting state and the reserve values of heart rate (n=6); B: Echocardiographic assessment of EF and FS in mice (n=6); C: Resting-state echocardiographic measurement of TAPSE, S', and AT/ET in mice (n=6); D: Dobutamine hydrochloride stress echocardiography measuring TAPSE, S', and AT/ET in mice (n=6); E: Right ventricular reserve values of TAPSE, S', and AT/ET in mice (n=6). HR: Heart rate; AT/ET: Acceleration time/ejection time; TAPSE: Tricuspid annular plane systolic excursion; S': Tricuspid annular systolic velocity. a: P<0.05, b: P<0.01, c: P<0.001, d: P<0.000 1

图5 sEHI对急性高原缺氧小鼠的心脏功能无明显影响,也未对塞来昔布改善心脏功能的作用产生影响

Figure 5 The sEH inhibitor exerts no significant effect on cardiac function in mice under acute high-altitude hypoxia exposure, nor does it affect the ameliorative effects of celecoxib on cardiac function

3 讨论

高原缺氧环境使机体内肾上腺素能系统被激活,能够增强心肌收缩力和加快心率,与缺氧刺激下肺动脉反应性收缩导致的肺动脉压力上升同时作用,加重了右心后负荷,使心肺负荷显著上升,直接影响机体的一般健康情况和作业能力;高原缺氧条件下心肺负荷的加重在较短时间内即可使心血管系统发生不可逆重塑并逐渐进展为高原性心脏病,造成右心室肥厚扩张,甚至右心衰竭。提高缺氧环境下心肺系统负荷能力和心功能代偿水平对提高高原环境适应能力,延长高原旅居人群的健康寿命具有重要的现实意义。

不同于经典抗炎机制,本研究首次揭示塞来昔布通过脂质代谢重编程改善高原右心功能,既往研究表明亚油酸首先经CYP2J或CYP2C亚家族酶催化生成12,13-环氧基-9-十八碳二烯酸(12,13-Epoxy-9Z-octadecenoic acid,12,13-EpOME),随后再由组织器官内的可溶性环氧化物水解酶(soluble epoxide hydrolase,sEH)将12,13-EpOME转化为12,13-diHOME[11-13](图6)。塞来昔布调控花生四烯酸代谢通路的同时是否参与亚油酸向12,13-diHOME代谢的调节尚无研究。本课题组通过构筑急性高原缺氧小鼠模型并用塞来昔布、12,13-diHOME和sEHI三种药物干预,探究塞来昔布对急性高原缺氧小鼠心脏的作用机制,得到了塞来昔布通过提高小鼠心脏12,13-diHOME水平改善急性高原缺氧小鼠的右心功能的核心结果。

3.1 塞来昔布通过提高小鼠心脏中12,13-diHOME水平改善了急性高原缺氧小鼠的右心功能

塞来昔布显著降低了急性高原缺氧小鼠的炎症细胞数量、显著提高了小鼠心脏中的9,10-diHOME和12,13-diHOME水平且显著改善了小鼠的右心功能。由于既往研究表明9,10-diHOME可以诱导线粒体功能障碍[18],存在对心脏功能和心肌灌注的不良影响[19-20],所以我们将12,13-diHOME作为塞来昔布改善急性高原缺氧小鼠右心储备功能的潜在代谢物。为了证明12,13-diHOME与右心功能改善之间的关系,本课题组使用12,13-diHOME对急性高原缺氧小鼠进行干预,结果表明12,13-diHOME可以在不影响小鼠的炎症细胞数量的情况下显著改善心脏功能,这提示急性高原缺氧小鼠经塞来昔布干预后的右心功能改善主要源于心脏中12,13-diHOME水平的提高。

3.2 在急性高原缺氧环境下,塞来昔布促进亚油酸向CYP450-sEH途径的代谢重构提高了小鼠心脏中12,13-diHOME水平

塞来昔布作为COX-2抑制剂,可以阻断急性高原缺氧条件下花生四烯酸向下游炎性脂代谢产物的转化,使花生四烯酸蓄积,这一过程可能负反馈调节亚油酸向花生四烯酸的代谢,使亚油酸的代谢倾向于通过CYP450-sEH途径直接提高12,13-diHOME水平。基于上述假设分析,本课题组使用了trans-AUCB这一特异性的sEH抑制剂[21-22]对急性高原缺氧小鼠进行干预,结果表明,sEHI阻断了塞来昔布介导的小鼠心脏中12,13-diHOME水平的上升但并未影响右心功能,具体表现为H+Cel组小鼠相较于H+S组小鼠的心脏12,13-diHOME水平显著上升,但H+sEHI+Cel组小鼠相较于H+Cel组小鼠的心脏12,13-diHOME的水平显著下降至H+S组小鼠水平,提示sEHI可以有效阻断塞来昔布对小鼠心脏12,13-diHOME的提升作用。本

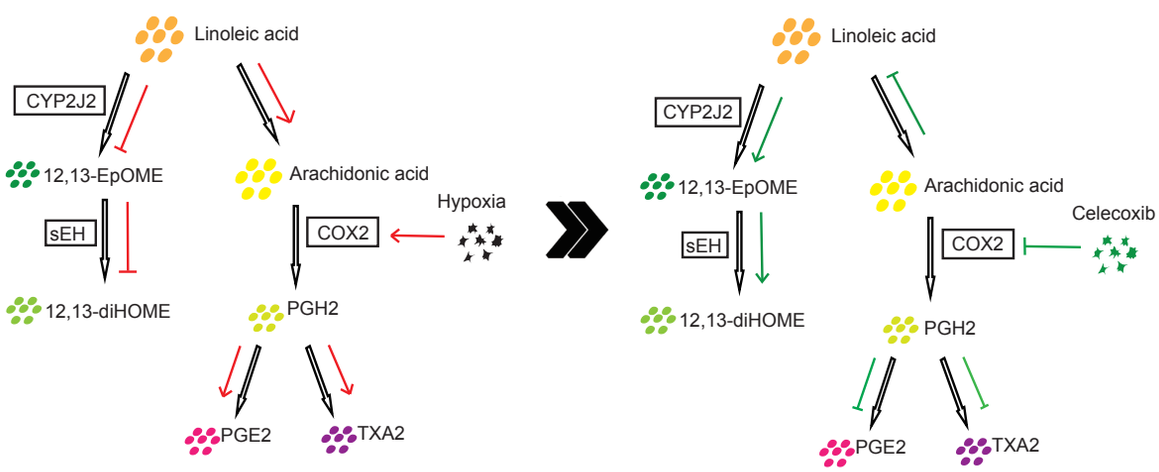


图6 塞来昔布调控12,13-diHOME机制图

Fig 6 Mechanism diagram of celecoxib regulating 12,13-diHOME

研究首次阐明,塞来昔布在影响花生四烯酸代谢途径的同时,还可调整亚油酸代谢通路,并优先经由CYP450-sEH轴,使心脏中12,13-diHOME的水平增加。

3.3 sEHI抑制12,13-diHOME的合成代谢和EETs的分解代谢使其对心功能的影响具有两面性

sEHI阻断了12,13-EpHOME向12,13-diHOME的转化,但并未使急性高原缺氧小鼠右心功能进一步恶化,这提示我们存在两种可能性:一是体内12,13-diHOME的水平并不影响急性高原缺氧下动物的心脏功能,二是在本课题组影响12,13-diHOME合成的过程中还产生了其他影响心功能的代谢物。鉴于我们的研究证明了12,13-diHOME可以独立改善急性高原缺氧小鼠的心功能,在进一步调研关于花生四烯酸代谢通路的相关文献后,本课题组聚焦于由花生四烯酸通过CYP450(主要是CYP2C2家族)代谢生成并由sEH水解代谢失活的另一种心脏保护脂因子环氧二十碳三烯酸(EETs)上,由于EETs已经被许多研究证明是一种具有抗炎效应的、可以缓解心肌纤维化、防止心肌重塑、预防缺血再灌注损伤的花生四烯酸代谢物[23-25],且sEH直接参与EETs的分解代谢[26]。故本课题组基于实验结果提出假设分析:塞来昔布抑制COX-2后导致的花生四烯酸蓄积,不仅负反馈调节了亚油酸向花生四烯酸的代谢,同时还刺激了花生四烯酸的旁路代谢,促进蓄积的花生四烯酸通过CYP2C2家族代谢为EETs,使组织中EETs含量上升;sEHI作为EETs水解酶的抑制剂能够减少EETs的代谢,使组织中EETs含量上升;同时使用塞来昔布和sEHI会在增强合成的同时减少代谢使体内EETs含量进一步上升。ELISA实验表明塞来昔布和sEHI的单药干预均显著提高了血浆中EETs的含量,两种药物联合使用更是进一步促进了血浆中EETs含量的升高,对EETs的测量结果支持了塞来昔布抑制COX-2导致脂质代谢重编程的设想,也提示这种围绕着sEH形成的不饱和脂肪酸代谢网络的再平衡是导致单一sEHI干预未能使心脏功能表现出显著差异的原因:H+sEHI组小鼠相较于H+S组小鼠白细胞和淋巴细胞的数量的显著降低,提示血清EETs水平的上升可能通过抗炎效应对冲了sEHI降低12,13-diHOME水平带来的心脏效应。负责将AA分解合成EETs的CYP2C2家族主要在血管内皮上的高表达,结合sEHI和Cel均没有显著影响急性高原缺氧小鼠心脏组织中的EETs水平的结果,提示心脏可能不是EETs的主要合成位置或作用靶点。上述研究结果提示在不饱和脂肪酸的三大代谢体系中存在着复杂的跨途径调控机制,单一抑制剂的使用除干预特定代谢通路外,对整个代谢体系均会产生影响。同时我们也不能排除塞来昔布直接或间接激活了CYP450途径或刺激棕色脂肪组织的增殖导致12,13-diHOME水平提高的可能性,因为塞来昔布可以激活PPAR-γ途径[22-23],而棕色脂肪的增殖也受到PPAR-γ途径的调控影响[24-25]。

综上所述,本研究为高原低氧相关右心功能障碍的治疗提供了新的干预靶点。但受限于客观条件,在本研究中未对使用抑制剂后亚油酸下游的各个代谢产物水平变化进行逐一分析,也缺少同级代谢网络中各个产物之间的相互作用关系的揭示,需进一步对12,13-diHOME改善心肌功能的分子机制进行相关探寻,以新的视角探究不饱和脂肪酸代谢网络中不同次级产物之间的调控关系。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] XU Z C, LI Q, SHEN X B. *AZU1* (*HBP*/CAP37) and *PRKCG* (*PKC*-gamma) may be candidate genes affecting the severity of acute mountain sickness[J]. BMC Med Genomics, 2023, 16(1): 28. DOI: 10.1186/s12920-023-01457-3.

[2] SHARMA S, SINGH Y, SANDHIR R, *et al*. Mitochondrial DNA mutations contribute to high altitude pulmonary edema *via* increased oxidative stress and metabolic reprogramming during hypobaric hypoxia [J]. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 2021, 1862(8): 148431. DOI: 10.1016/j.bbabio.2021.148431.

[3] SAVIOLI G, CERESA I F, GORI G, *et al*. Pathophysiology and therapy of high-altitude sickness: practical approach in emergency and critical care[J]. J Clin Med, 2022, 11(14): 3937. DOI: 10.3390/jcm11143937.

[4] RICHALET J P, HERMAND E, LHUISSIER F J. Cardiovascular physiology and pathophysiology at high altitude[J]. Nat Rev Cardiol, 2024, 21(2): 75-88. DOI: 10.1038/s41569-023-00924-9.

[5] DENG M D, ZHANG X J, FENG Q, *et al*. The impact of high-altitude migration on cardiac structure and function: a 1-year prospective study [J]. Front Physiol, 2024, 15: 1459031. DOI: 10.3389/fphys.2024.1459031.

[6] PEI T, LI X X, TAO F S, *et al*. Burden of disease resulting from chronic mountain sickness among young Chinese male immigrants in Tibet[J]. BMC Public Health, 2012, 12: 401. DOI: 10.1186/1471-2458-12-401.

[7] TIVE L. Celecoxib clinical profile[J]. Rheumatology, 2000, 39(suppl_2):21-28.DOI:10.1093/rheumatology/39.suppl_2.21.

[8] KANAAN N C, PETERSON A L, PUN M, *et al*.

Prophylactic acetaminophen or ibuprofen results in equivalent acute mountain sickness incidence at high altitude: a prospective randomized trial[J]. Wilderness Environ Med, 2017, 28(2): 72-78. DOI: 10.1016/j.wem.2016.12.011.

[9] CALVIN J E, DERVIN G. Intravenous ibuprofen blocks the hypoxemia of pulmonary glass bead embolism in the dog[J]. Crit Care Med, 1988, 16(9): 852-856. DOI: 10.1097/00003246-198809000-00007.

[10] SPRAGUE R S, STEPHENSON A H, DAHMS T E, *et al*. Effect of cyclooxygenase inhibition on ethchlorvynol-induced acute lung injury in dogs[J]. J Appl Physiol (1985), 1986, 61(3): 1058-1064. DOI: 10.1152/jappl.1986.61.3.1058.

[11] HILDRETH K, KODANI S D, HAMMOCK B D, *et al*. Cytochrome P450-derived linoleic acid metabolites EpOMEs and DiHOMEs: a review of recent studies[J]. J Nutr Biochem, 2020, 86: 108484. DOI: 10.1016/j. jnutbio.2020.108484.

[12] LYNES M D, KODANI S D, TSENG Y H. Lipokines and thermogenesis[J]. Endocrinology, 2019, 160(10): 2314-2325. DOI: 10.1210/en.2019-00337.

[13] MACÊDO A P A, MUÑOZ V R, CINTRA D E, *et al*. 12, 13-diHOME as a new therapeutic target for metabolic diseases[J]. Life Sci, 2022, 290: 120229. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.120229.

[14] LYNES M D, LEIRIA L O, LUNDH M, *et al*. The cold-induced lipokine 12, 13-diHOME promotes fatty acid transport into brown adipose tissue[J]. Nat Med, 2017, 23(5): 631-637. DOI: 10.1038/nm.4297.

[15] STANFORD K I, LYNES M D, TAKAHASHI H, *et al*. 12, 13-diHOME: an exercise-induced lipokine that increases skeletal muscle fatty acid uptake[J]. Cell Metab, 2018, 27(5): 1111-1120.e3. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.03.020.

[16] PINCKARD K M, SHETTIGAR V K, WRIGHT K R, *et al*. A novel endocrine role for the BAT-released lipokine 12, 13-diHOME to mediate cardiac function[J]. Circulation, 2021, 143(2): 145-159. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.049813.

[17] JAMIESON K L, ENDO T, DARWESH A M, *et al*. Cytochrome P450-derived eicosanoids and heart function[J]. Pharmacol Ther, 2017, 179: 47-83. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.05.005.

[18] SISEMORE M F, ZHENG J, YANG J C, *et al*. Cellular characterization of leukotoxin diol-induced mitochondrial dysfunction[J]. Arch Biochem Biophys, 2001, 392(1): 32-37. DOI: 10.1006/abbi.2001.2434.

[19] SUGIYAMA S, HAYAKAWA M, NAGAI S, *et al*. Leukotoxin, 9, 10-epoxy-12-octadecenoate, causes cardiac failure in dogs[J]. Life Sci, 1987, 40(3): 225-231. DOI: 10.1016/0024-3205(87)90336-5.

[20] FUKUSHIMA A, HAYAKAWA M, SUGIYAMA S, *et al*. Cardiovascular effects of leukotoxin (9, 10-epoxy-12-octadecenoate) and free fatty acids in dogs[J]. Cardiovasc Res, 1988, 22(3): 213-218. DOI: 10.1093/cvr/22.3.213.

[21] SUN C P, ZHANG X Y, MORISSEAU C, *et al*. Discovery of soluble epoxide hydrolase inhibitors from chemical synthesis and natural products[J]. J Med Chem, 2021, 64(1): 184-215. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c01507.

[22] LIU J Y, TSAI H J, HWANG S H, *et al*. Pharmacokinetic optimization of four soluble epoxide hydrolase inhibitors for use in a murine model of inflammation[J]. Br J Pharmacol, 2009, 156(2): 284-296. DOI: 10.1111/j. 1476-5381.2008.00009.x.

[23] ZHANG M, SHU H Y, CHEN C, *et al*. Epoxyeicosatrienoic acid: a potential therapeutic target of heart failure with preserved ejection fraction[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153: 113326. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113326.

[24] DING Y, TU P J, CHEN Y Y, *et al*. CYP2J2 and EETs protect against pulmonary arterial hypertension with lung ischemia-reperfusion injury *in vivo* and *in vitro*[J]. Respir Res, 2021, 22(1): 291. DOI: 10.1186/s12931-021-01891-w.

[25] HE Z W, ZHANG X, CHEN C, *et al*. Cardiomyocyte-specific expression of CYP2J2 prevents development of cardiac remodelling induced by angiotensin II[J]. Cardiovasc Res, 2015, 105(3): 304-317. DOI: 10.1093/cvr/cvv018.

[26] SPECTOR A A, FANG X, SNYDER G D, *et al*. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function[J]. Prog Lipid Res, 2004, 43(1): 55-90. DOI: 10.1016/s0163-7827(03)00049-3.

(收稿:2025-07-29;修回:2025-09-11)

(编辑 严 涵)