

· 基础研究 ·

益气温阳活血化痰方对大鼠低氧高二氧化碳性肺动脉高压的干预作用

赵美平^{1△} 张聪聪¹ 张晶晶¹ 应磊¹ 钱小英² 王万铁¹

摘要 **目的** 研究益气温阳活血化痰方(Yiqi Wenyang Huoxue Huatan Formula, YWHHF)对大鼠低氧高二氧化碳性肺动脉高压的干预作用及机制研究。**方法** 将 50 只 SD 大鼠随机分为 5 组:常氧对照(N)组、低氧高二氧化碳(HH)组、YWHHF 高剂量(YH)组、YWHHF 中剂量(YM)组、YWHHF 低剂量(YL)组,每组 10 只。除 N 组置于仓外,其余各组均置于常压低氧高二氧化碳氧仓中,每天 8 h,每周 6 天,持续 4 周。YH、YM 及 YL 组在进仓前 0.5 h 分别予益气温阳活血化痰方 0.6、0.3、0.15 g/kg 灌胃,其余各组大鼠分别用等量生理盐水灌胃,每天 1 次,连续灌胃 4 周。采用右心导管法测量大鼠的肺动脉平均压(mPAP)、颈动脉平均压(mCAP)及右心室肥大指数(RVHI);光镜、电镜观察大鼠肺动脉形态学变化,测定肺动脉管壁面积/管总面积(WA/TA)和管腔面积/管总面积(LA/TA)的比值;采用 RT-PCR、Western blot 分别检测大鼠内质网应激相关蛋白及 mRNA(GRP78、CHOP、JNK、Caspase-12)的表达;原位末端标记法(TUNEL)检测各组肺动脉平滑肌细胞的凋亡指数(AI)。**结果** 与 N 组比较,HH 组 mPAP、RVHI 和 WA/TA 值增大,LA/TA 减小(均 $P < 0.01$),ERS 相关蛋白及 mRNA(GRP78、JNK、Caspase-12、CHOP)表达量均升高($P < 0.01$),肺动脉平滑肌细胞 AI 减少($P < 0.01$);与 HH 组比较,YH、YM、YL 组 mPAP、RVHI 及 WA/TA 值减小,LA/TA 增大($P < 0.05$, $P < 0.01$),ERS 相关蛋白及 mRNA 表达量降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),YH 组及 YM 组肺动脉平滑肌细胞 AI 增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)RVHI;与 YL 组比较,YH、YM 组上述各项指标均有明显改善($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** YWHHF 可通过抑制 JNK、Caspase-12、CHOP 降低大鼠低氧高二氧化碳性肺动脉高压,综合考虑以中剂量(0.3 g/kg)效果最适宜。

关键词 益气温阳活血化痰方;低氧高二氧化碳;内质网应激;肺动脉高压

Effect of Yiqi Wenyang Huoxue Huatan Formula on Pulmonary Hypertension Induced by Hypoxia and Hypercapnia in Rats ZHAO Mei-ping¹, ZHANG Cong-cong¹, ZHANG Jing-jing¹, YING Lei¹, QIAN Xiao-ying², and WANG Wan-tie¹ 1 Department of Pathophysiology, Wenzhou Medical University, Zhejiang (325035); 2 Respiratory Medicine, Wenzhou People's Hospital, Zhejiang (325035)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects and mechanism of Yiqi Wenyang Huoxue Huatan Formula(YWHHF) on hypoxia-hypercapnia pulmonary hypertension rats. **Methods** Totally 55 SD rats were randomly divided into five groups, i.e., the normoxia control(N) group, the hypoxia-hypercapnia(HH) group, the high-dose YWHHF(YH) group, the middle-dose YWHHF(YM) group, the low-dose YWHHF(YL) group, 10 in each group. Rats in N group were raised outside the chamber, rats in the rest groups were raised in the oxygen chamber with low oxygen concentration and high CO₂ concentration for 8 h daily, 6 days a week for 4 weeks. Rats in YH, YM and YL groups were fed with YWHHF at the daily dose of 0.6, 0.3 and 0.15 g/kg respectively by gastrogavage 0.5 h before entering chamber, equal volume of normal saline were administered to rats in the N group and HH group by gastrogavage. All treat-

ment lasted for 4 successive weeks. The mean pulmonary artery pressure (mPAP), mean carotid artery pressure (mCAP) and right ventricular hypertrophy index (RVHI) were measured by right heart catheterization. The morphological changes of pulmonary arteries were observed with light microscope and electron microscope. The ratio of pulmonary vascular wall area and total area (WA/TA), the ratio of vascular lumen area and total area (LA/TA) were determined. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to detect the expression of ERS related protein and mRNA (GRP78, CHOP, JNK, Caspase-12). The apoptotic index of pulmonary artery smooth muscle cells was detected by TUNEL. Results Compared with the N group, mPAP, RVHI and WA/TA were increased in the HH group, LA/TA were decreased ($P < 0.01$), expression of ERS related protein and mRNA (GRP78, JNK, Caspase-12, CHOP) were increased in the HH group ($P < 0.01$), and pulmonary artery smooth muscle cells apoptosis rate were decreased ($P < 0.01$). Compared with the HH group, mPAP, RVHI and WA/TA in YH, YM and YL groups were decreased, LA/TA were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and expression of ERS related protein and mRNA were decreased in the YH, YM and YL groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The apoptotic rates of pulmonary artery smooth muscle cells in the YH and YM group were significantly higher than those of in the HH group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the YL group, the above indexes of YH and YM groups were significantly improved ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusions YWHHF can inhibit JNK, Caspase-12 and CHOP to reduce the hypoxia-hypercapnia pulmonary hypertension in rats. Comprehensive consideration, the effect of medium dose (0.3 g/kg) is the most appropriate.

KEYWORDS Yiqi Wenyang Huoxue Huatan Formula; hypoxia-hypercapnia; endoplasmic reticulum stress; pulmonary artery hypertension

肺动脉高压 (pulmonary artery hypertension, PAH) 是一种罕见的破坏性疾病, 以肺小动脉阻力不断增加为特征^[1,2], 预后极差, 可导致右心功能衰竭而死亡。PAH 发病机制复杂, 许多已知的触发或促进 PAH 过程的一个共同特征是内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS)^[3,4]。未折叠蛋白质反应 (unfolded protein response, UPR) 是 ERS 的重要组成部分, 主要由蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)、肌醇需要酶 1 α (inositol - requiring enzyme 1 α , IRE1 α) 和转录激活因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6) 3 种内质网跨膜蛋白介导^[5]。在严重急性或慢性应激条件下, 内质网 UPR 从存活到细胞死亡信号通路, 直接由线粒体驱动细胞凋亡^[6]。GRP78 的急速上调被认为是 ERS 最敏感的标志^[7], 而 CHOP、JNK、Caspase-12 是 ERS 通路相关的 3 个主要凋亡基因。

目前, 许多防治 PAH 的中医药治疗方法已应用到临床, 但是既能立足中医学 PAH 病机本质认识, 又能从细胞分子水平进行深度研究的中医药复方较少。因此, 本实验以此为切入点, 选择临床疗效较佳的益气温阳活血化痰方 (Yiqi Wenyang Huoxue Huatan Formula, YWHHF)^[8], 来验证中医药对 PAH 血管重塑病机的理论认识, 为 YWHHF 防治 PAH 提供科学

理论和实验依据。

材料与方法

1 动物 50 只 SD 雄性大鼠, 清洁级, 体重为 (200 $\pm$ 20) g, 由温州医科大学实验动物中心提供, 动物使用许可证号: SCXK (浙) 2015 - 0009。本研究是按照温州医科大学实验动物中心的指导原则进行动物饲养、护理和所有实验, 并且在温州医科大学实验动物伦理委员会的批准下进行。

2 药物 YWHHF 组方由北京中医药大学提供, 由黄芪 30 g、人参 20 g、附片 9 g、川芎 10 g、丹参 10 g、法半夏 9 g、薤白 12 g、白芥子 15 g 组成。

3 主要试剂及仪器 胎牛血清 (美国 Gibco, 批号: 1848502), 逆转录试剂盒 (美国 Thermo, 批号: 00312749), 兔抗大鼠 GRP78 一抗 (英国 Abcam, 批号: GR219286 - 1), JNK 一抗 (英国 Abcam, 批号: GR244162 - 3), Caspase-12 一抗 (英国 Abcam, 批号: GR269139 - 1), p-JNK 一抗 (英国 Abcam), 小鼠抗大鼠 CHOP 一抗 (美国 CST, 批号: 2895), 辣根酶标记山羊抗兔二抗 (博蕴, 中国), Powerlab 8/30 生物信息采集系统 (AD Instruments, 澳大利亚), 普通显微镜 (Nikon Ci-L, 日本), 紫外分光光度计 (Ultrospec 2100pro Amersham BioSciences, 美国), PCR 热循环仪 (LifePro, 杭州博日科技有限公司),

UV-800 全自动凝胶成像分析系统(温州奥利生物医学仪器厂),蛋白电泳/转膜仪(Bio-Rad powerpac basic,美国)。

4 动物模型的制备及干预方法 参考文献[9]中方法制备大鼠模型。将 50 只清洁级 SD 大鼠随机分为 5 组:常氧对照(N)组、低氧高二氧化碳(HH)组、YWHHF 高剂量(YH)组、YWHHF 中剂量(YM)组、YWHHF 低剂量(YL)组,每组 10 只。除 N 组置于仓外,其余各组均置于常压低氧高二氧化碳氧仓中,仓内氧浓度维持在 9%~11%,二氧化碳浓度维持在 5%~6%(仓内水蒸汽用无水 CaCl_2 吸收,多余的二氧化碳用氢氧化钙吸收),每天 8 h,每周 6 天,持续 4 周。YH、YM 及 YL 组 3 组在进仓前 0.5 h 分别用益气温阳活血化痰方灌胃,其余各组大鼠分别用等量生理盐水灌胃,均每天 1 次,每周 6 天,连续灌胃 4 周。YWHHF 的给药剂量根据正常成人与大鼠体表面积折算率(换算公式:成人的常用剂量 $\times$ 大鼠的换算系数 0.018/大鼠的体重)^[10]折算为大鼠的等效剂量,结合本实验室前期研究结果,YH、YM、YL 组按照临床等效剂量的 8、4、2 倍的剂量比例设置^[11],药物含量分别为 0.6、0.3、0.15 g/kg。大鼠在造模过程中未出现死亡现象,但是在取材过程中,因手术操作不当而死亡 3 只,予以补充后,使每组大鼠数量为 10 只。

5 检测指标及方法

5.1 大鼠肺动脉平均压、颈动脉平均压和右心室肥大指数的测定 动物饲养到规定时间后,用 10% 的水合氯醛以 0.35 mL/100 g 的用量麻醉大鼠,利用 Powerlab 生物信息采集系统,右心导管法检测大鼠肺动脉平均压(mean pulmonary artery pressure, mPAP)和颈动脉平均压(mean carotid artery pressure, mCAP)。将测定完压力的活的大鼠用生理盐水充分灌洗,剪下大鼠的心脏及各肺叶,沿房室沟剪去心房及大血管根部,分离右心室游离壁,室间隔保留在左心室,沿后室壁间沟将右心室游离壁分离;分别称取右心室游离壁重量(RV)及左心室加心室间隔重量(LV+S),按公式算出右心室肥大指数(right ventricular hypertrophy index, RVHI): $\text{RVHI} = \text{RV}/(\text{LV} + \text{S})$,以此作为判断右心室肥厚程度。

5.2 光镜、电镜观察大鼠肺动脉形态学变化 留取大鼠右中肺叶,用 4% 的多聚甲醛浸泡 48 h 至 1 周,脱水后常规石蜡切片(厚度约为 4~6 μm),HE 染色,选取外径为 30~150 μm 的肺中小动脉在光镜下观察。用 IPP5.0(Image-Pro Plus)彩色图像分析系统测定肺中小动脉管壁面积/管总面积(artery wall

area/total area, WA/TA)、管腔面积/管总面积(artery lumen area/total area, LA/TA)。每只大鼠随机留取右上肺靠近肺门周围 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 大小的肺组织 4~6 片浸泡在电镜液中做电镜标本,制样,在电镜下观察并拍照。

5.3 RT-PCR 检测各组大鼠 ERS 相关 mRNA (GRP78、CHOP、JNK、Caspase-12)表达 将各组肺组织充分匀浆,加入 1 mL Trizol,研磨均匀后转移至 EP 管,加氯仿颠倒混匀后静置,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min,吸取含 RNA 的上层水相转移至另一 EP 管中,加等体积异丙醇,颠倒混匀后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。取出 EP 管,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min,弃上清,加入 75% 乙醇(用 DEPC 水配),温和颠倒,4 $^{\circ}\text{C}$ 、7 500 r/min,离心 5 min,弃上清;4 $^{\circ}\text{C}$ 7 500 r/min 再次离心 30 s,小心去除上清;室温干燥后加入 DEPC 水,于核酸浓度检测仪测定 RNA 浓度,逆转录合成 cDNA,PCR 扩增反应:(1) GRP78:上游 5'-GGCGTGAGGTAGAAAAGG-3',下游 5'-ATGGTAGAGCGGAACAGG-3'(产物为 151 bp);(2) JNK:上游 5'-GATTCTTGATTTTGGACTGG-3',下游 5'-TGACCTCTGGTGCTCTGT-3'(产物为 92 bp);(3) Caspase-12:上游 5'-CCACAAGCAAAGG-GATAG-3',下游 5'-GGAAATGAAGAGAGAGCCA-3'(产物为 173 bp);(4) CHOP:上游 5'-AGCAGAG-GTCACAAGCACCT-3',下游 5'-CTCCTTCAT-GCGCTGTTTCC-3'(产物为 157 bp);(5) β -actin:上游 5'-CGTTGACATCCGTAAAGAC-3',下游 5'-TGGAAGGTGGACAGTGAG-3'(产物为 201 bp)。扩增后电泳,用 UV-800 全自动凝胶成像分析系统曝光成像,Quantity One 软件分析电泳条带灰度值,用目的基因与 β -actin 基因灰度值之比表示目的基因的表达水平。

5.4 Western blot 检测各组大鼠 ERS 相关蛋白(GRP78、CHOP、JNK、Caspase-12)表达 将各组肺组织充分匀浆,加入裂解液,混匀,移至 EP 管中冰上静置,12 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,吸取上清,BCA 法测定蛋白浓度。以 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,湿式电转移法转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h。用一抗稀释液稀释一抗(GRP78、Caspase-12、P-JNK、CHOP 为 1:1 000, JNK 为 1:2 000,内参 GAPDH 为 1:5 000),反铺法 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置孵育过夜。GRP78、Caspase-12、P-JNK、JNK 和 GAPDH 用山羊抗兔二抗,CHOP 用山羊抗小鼠二抗室温孵育 1 h,所用二抗比例均为 1:10 000,

ECL 化学发光法显色,于曝光仪曝光并保存。用 Quantity One 软件分析条带灰度值,GRP78、Caspase-12、CHOP 用目的蛋白与 GAPDH 蛋白灰度值之比表示目的蛋白的表达水平,JNK 用目的蛋白与 p-JNK 蛋白灰度值之比表示目的蛋白的表达水平。

5.5 TUNEL 法检测各组肺动脉平滑肌细胞的凋亡情况 肺动脉组织切片脱蜡入水,滴加蛋白酶 K (20 μg/mL),37 ℃ 孵育 15 min。PBS 洗涤后滴加 20%胎牛血清和 3% 小牛血清白蛋白,37 ℃ 孵育 20 min。PBS 漂洗后滴加 TUNEL 反应液,避光,37 ℃ 水浴 45 min。PBS 漂洗后滴加 3% H₂O₂ 甲醇溶液,室温放置 10 min。PBS 漂洗后滴加 20% 羊血清,37 ℃ 水浴 30 min。PBS 漂洗后滴加 1:2 稀释的 POD,于湿盒内 37 ℃ 水浴 30 min。PBS 漂洗后,滴加新鲜配制的 DAB H₂O₂ 显色液,流水冲洗终止反应。苏木素复染,逆浓度梯度乙醇脱水,干燥后封片,光镜下随机选择肺动脉区域拍片。结果判定:细胞核被染成棕褐色者为阳性细胞,即凋亡细胞;细胞核被染成蓝色为阴性细胞,即正常活细胞。随机选出 5 个视野,计数阳性细胞和阴性细胞。凋亡指数 (apoptotic index, AI) = 肺动脉中的阳性细胞数/总细胞数 × 100%。

6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,计量资料进行正态性检验,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组样本均数比较进行方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析(one way ANOVA),方差齐则两两比较采用LSD 法,方差不齐者进行Dunnett' t3 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠 mPAP、mCAP 及 RVHI 值比较(表 1) 与 N 组比较,HH 组 mPAP 和 RVHI 值增大($P < 0.01$)。与 HH 组比较,YH、YM 及 YL 组 mPAP 和

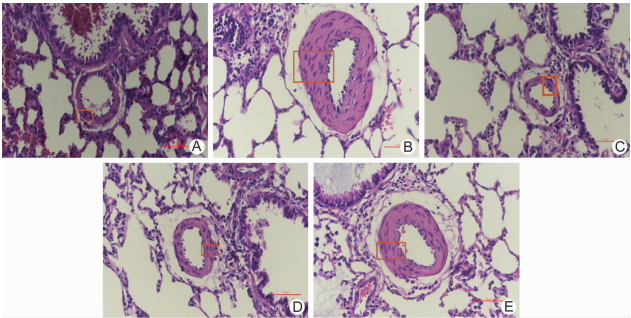
表 1 各组大鼠 mPAP、mCAP 及 RVHI 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	mPAP(mmHg)	mCAP(mmHg)	RVHI (%)
N	10	15.37 ± 1.65	112.58 ± 3.94	24.09 ± 1.89
HH	10	29.16 ± 2.78 *	109.63 ± 4.88	33.23 ± 2.41 *
YH	10	21.92 ± 2.83 $\Delta\Delta\Delta$	110.99 ± 4.02	28.51 ± 1.88 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
YM	10	21.70 ± 3.66 $\Delta\Delta\Delta$	112.18 ± 4.85	28.86 ± 1.79 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
YL	10	24.58 ± 3.38 $\Delta\Delta$	110.35 ± 4.24	30.93 ± 1.71 Δ

注:与 N 组比较, * $P < 0.01$;与 HH 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 YL 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

RVHI 值减小($P < 0.05$, $P < 0.01$),且 YH、YM 组降低更明显($P < 0.05$, $P < 0.01$)。YH 组与 YM 组 mPAP 和 RVHI 值差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2 各组大鼠肺组织形态学结果比较(图 1,表 2) 与 N 组比较,HH 组肺动脉平滑肌细胞增殖,WA/TA 增大,LA/TA 降低($P < 0.01$)。与 HH 组比较,YH、YM 和 YL 组大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖被不同程度抑制,WA/TA 均降低,LA/TA 增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 YL 组比较,YH 和 YM 组肺动脉平滑肌细胞增殖不如 YL 组明显,WA/TA 均减小,LA/TA 均增加($P < 0.01$)。与 YM 组比较,YH 组 WA/TA 和 LA/TA 值差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:A 为 N 组;B 为 HH 组;C 为 YH 组;D 为 YM 组;E 为 YL 组;红色框内标注的是肺动脉平滑肌层

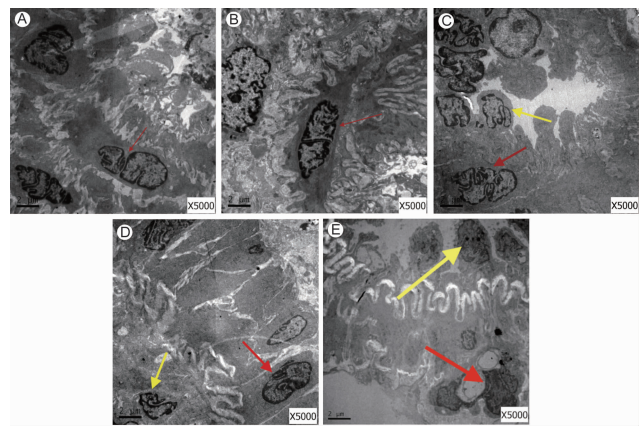
图 1 各组大鼠肺中小型动脉图 (HE, ×400)

表 2 各组大鼠 WA/TA、LA/TA 值比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	WA/TA	LA/TA
N	10	31.48 ± 6.83	68.52 ± 6.83
HH	10	61.51 ± 2.63 *	38.49 ± 2.63 *
YH	10	47.89 ± 3.08 $\Delta\Delta\Delta$	52.11 ± 3.08 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
YM	10	49.10 ± 2.76 $\Delta\Delta\Delta$	50.9 ± 2.76 $\Delta\Delta\Delta$
YL	10	57.80 ± 5.27 Δ	42.2 ± 5.27 Δ

注:与 N 组比较, * $P < 0.01$;与 HH 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 YL 组比较, $\Delta P < 0.01$

3 各组大鼠肺组织透射电镜观察结果(图 2) N 组肺动脉内皮细胞紧附于基底膜上,平滑肌细胞无肿胀,细胞器无异常。HH 组电镜下可见位于血管腔的肺动脉血管内皮细胞部分游离于基底膜,出现坏死脱落;平滑肌细胞肥厚,线粒体和内质网肿胀,胶原纤维增生。YH、YM 组肺动脉内皮细胞部分肿胀,附着于基底膜,部分脱落,向血管腔内突起,空泡减少,平滑肌细胞处于收缩表型;YL 组肺动脉血管内皮细胞脱落较明显,空泡较多,些许平滑肌细胞肿胀,可见胶原纤维增生。



注:A 为 N 组;B 为 HH 组;C 为 YH 组;D 为 YM 组;E 为 YL 组;红色箭头指向平滑肌细胞,黄色箭头指向内皮细胞

图 2 各组大鼠肺组织透射电镜观察图 (×5 000)

4 各组大鼠肺组织 GRP78、JNK、Caspase-12、CHOP mRNA 表达比较(表 3,图 3) 与 N 组比较,HH 组 GRP78、JNK、Caspase-12 及 CHOP mRNA 表达量均明显上升($P < 0.01$)。与 HH 组比较,YH 组、YM 组 GRP78、JNK、Caspase-12、CHOP mRNA 表达量均下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),YL 组 GRP78、CHOP mRNA 表达量亦降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 YL 组比较,YH 组及 YM 组 GRP78、Caspase-12 及 CHOP mRNA 表达量均下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 YM 组比较,YH 组 GRP78、JNK、Caspase-12 及 CHOP mRNA 表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。

5 各组大鼠肺组织 GRP78、JNK、Caspase-12、CHOP 蛋白表达比较(表 4,图 4) 与 N 组比较,HH 组 GRP78、JNK、Caspase-12 及 CHOP 蛋白表达

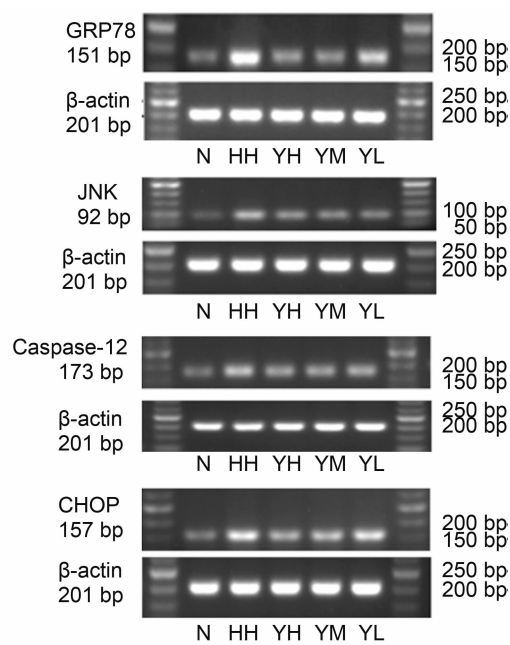


图 3 各组大鼠肺组织 GRP78、JNK、Caspase-12、CHOP mRNA 表达

量均上升($P < 0.01$)。与 HH 组比较,YH 组、YM 组 GRP78、JNK、Caspase-12 及 CHOP 蛋白表达量下降($P < 0.05$),与 YL 组比较,YH 组和 YM 组 GRP78、JNK、Caspase-12 及 CHOP 蛋白表达水平均降低($P < 0.05$)。与 YM 组比较,YH 组各蛋白表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。

6 各组大鼠肺中小动脉平滑肌细胞 AI 比较(表 5,图 5) 与 N 组比较,HH 组肺动脉平滑肌细胞 AI 下降($P < 0.01$)。与 HH 组比较,YH 组和 YM 组 AI 升高($P < 0.05$);与 YL 组比较,YH 组和 YM 组肺动

表 3 各组大鼠肺组织 GRP78、JNK、Caspase-12、CHOP mRNA 表达变化 ($\bar{x} \pm s$)					
组别	n	GRP78 mRNA	JNK mRNA	Caspase-12 mRNA	CHOP mRNA
N	10	0.34 ± 0.10	0.24 ± 0.06	0.23 ± 0.07	0.30 ± 0.08
HH	10	1.21 ± 0.15 [*]	0.41 ± 0.08 [*]	0.38 ± 0.06 [*]	0.62 ± 0.05 [*]
YH	10	0.65 ± 0.10 ^{△△△}	0.34 ± 0.06 [△]	0.29 ± 0.04 ^{△△△}	0.45 ± 0.05 ^{△△△}
YM	10	0.65 ± 0.12 ^{△△△}	0.35 ± 0.05 [△]	0.30 ± 0.03 ^{△△△}	0.48 ± 0.05 ^{△△△}
YL	10	0.97 ± 0.11 ^{△△}	0.37 ± 0.05	0.35 ± 0.05	0.57 ± 0.04 [△]

注:与 N 组比较, ^{*} $P < 0.01$;与 HH 组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$;与 YL 组比较, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$

表 4 各组大鼠肺组织 GRP78、JNK、Caspase-12、CHOP 蛋白表达变化 ($\bar{x} \pm s$)					
组别	n	GRP78	JNK	Caspase-12	CHOP
N	10	0.52 ± 0.11	0.26 ± 0.10	0.28 ± 0.07	0.13 ± 0.06
HH	10	0.84 ± 0.24 [*]	0.54 ± 0.29 [*]	0.49 ± 0.15 [*]	0.25 ± 0.06 [*]
YH	10	0.63 ± 0.15 ^{△▲}	0.36 ± 0.09 ^{△▲}	0.37 ± 0.12 ^{△▲}	0.19 ± 0.06 ^{△▲}
YM	10	0.65 ± 0.16 ^{△▲}	0.37 ± 0.10 ^{△▲}	0.37 ± 0.10 ^{△▲}	0.19 ± 0.06 ^{△▲}
YL	10	0.78 ± 0.16	0.50 ± 0.22	0.48 ± 0.15	0.24 ± 0.06

注:与 N 组比较, ^{*} $P < 0.01$;与 HH 组比较, [△] $P < 0.05$;与 YL 组比较, [▲] $P < 0.05$

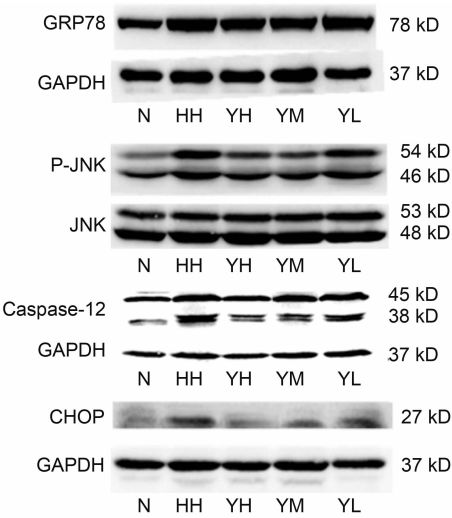
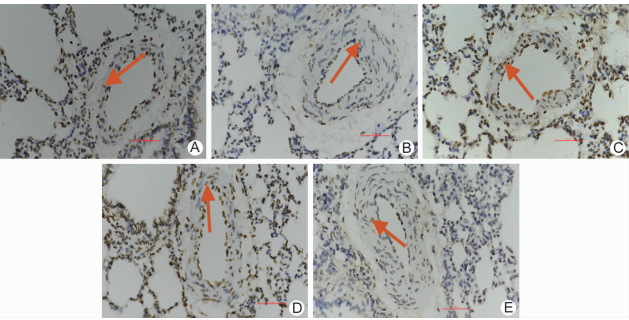


图 4 各组大鼠肺组织 GRP78、JNK、Caspase-12、CHOP 蛋白表达比较

表 5 各组大鼠肺中小动脉平滑肌细胞 AI 比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	AI
N	10	61.75 ± 6.17
HH	10	51.04 ± 5.05 *
YH	10	56.95 ± 5.39 $\Delta\Delta$
YM	10	56.76 ± 6.42 $\Delta\Delta$
YL	10	52.77 ± 3.09

注:与 N 组比较, * $P < 0.01$;与 HH 组比较, $\Delta P < 0.05$;与 YL 组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$



注:A 为 N 组;B 为 HH 组;C 为 YH 组;D 为 YM 组;E 为 YL 组;红色箭头指向阳性细胞

图 5 各组肺动脉平滑肌细胞凋亡图 (×400)

脉平滑肌细胞调 AI 上升($P < 0.05$)。

讨 论

中医学将 PAH 归属于“肺胀”范畴^[12]。《丹溪心法·咳嗽篇》曰:“肺胀而咳,或左或右不得眠,此痰挟瘀血碍气而病”^[13]。痰瘀互结,日久成虚,提示肺胀的病机特点为痰、瘀、虚,并贯穿始终。治以祛痰、活血、补虚为首要;故而选择 YWHHF 为研究方药。YWH-

HF 已在临床参与使用,主要针对慢性 COPD 合并 PAH 的患者,且取得较好疗效^[8]。方中人参大补元气,补脾益肺,为补肺之要药。黄芪为补中益气之要药。二者合用达益气扶正固本之效,共为君药。川芎为“血中气药”,是治疗血瘀气滞之要药。丹参善能通行血脉,祛瘀止痛,广泛用于各种瘀血证。两者行气活血共为臣药,以达祛瘀导滞,使百脉畅通,痹阻消散,去除胸中烦满郁结;法半夏、白芥子温肺化痰,行水消肿;附片、薤白等温阳散结,行气导滞。上述四药共为佐药使痰得温则化,瘀得阳则活。诸药配合共奏益气温阳、活血化瘀、开胸除痹之功。

实验将 YWHHF 分为了低氧高二氧化碳高、中、低 3 个剂量组,另设常氧对照组和低氧高二氧化碳组。各实验结果表明 YWHHF 能有效降低肺动脉压力,逆转右心室肥大,有效减轻肺血管重塑。利用 Western blot 和 RT-PCR 来检测肺组织 ERS 通路相关蛋白及 mRNA (GRP78、JNK、Caspase-12 和 CHOP) 的表达,结合实验结果分析可知 YWHHF 可抑制 ERS 相关因子 (JNK、Caspase-12、CHOP) 的表达。实验中用 TUNEL 法检测肺动脉平滑肌细胞凋亡情况,结合实验结果分析, YWHHF 在低氧高二氧化碳环境下能有效增加肺动脉平滑肌细胞的 AI,以 YH、YM 组尤为明显 ($P < 0.05$)。有研究指出,内质网应激状态下,跨膜蛋白 ATF-6 含量显著升高,刺激神经轴突生长抑制剂 (NOGO) 大量释放,NOGO 可引起肺动脉平滑肌细胞线粒体功能中断,导致糖酵解表型的转变,促进肺动脉平滑肌细胞增殖和抑制其凋亡^[14]。说明 YWHHF 可通过抑制肺动脉平滑肌细胞的增殖、诱导肺动脉平滑肌细胞的凋亡以阻止 PAH 的进展。中药复方含有多种成分,作用靶点多,甚至部分中药可以双向调节、不同剂量产生不同作用。这意味着中药复方效应复杂,其量效关系不明确^[15]。依据实验结果, YWHHF 阻止 PAH 的发展与药物的剂量有关系,剂量过低时效果不明显,而剂量增加时肺动脉平滑肌细胞增殖明显减少、凋亡明显增多。但是 YWHHF 高剂量组和中剂量组治疗效果差别不大,表明当剂量增加到一定程度后,即使剂量再增加也不会相应地增加疗效。这与侯素春等^[16]研究结果类似,其发生机制有待进一步研究。本实验中, YH 组和 YM 组治疗效果差别不大,考虑到性价比,采取 YWHHF 中剂量 (0.3 g/kg) 治疗 PAH 最适宜。

现代药理学研究表明,人参具有扩张血管,增加心输出量和冠脉血流量,降低心肌耗氧量等功效,其主要化学成分人参皂苷 Rb1 可通过 IRE1 α 和 PERK 的脱

磷酸反应抑制 ERS 活性^[17];黄芪具有增强人体免疫,清除自由基,抑制脂质过氧化反应,改善全血黏度和抗肿瘤等功效,其化学成分黄芪多糖可通过增强细胞能力来抵抗 ERS^[18];川芎有清除氧自由基,抗血管炎症,抗血小板聚集,抗血栓形成,增加微循环血流,舒张平滑肌,提高机体免疫力等活性,可降低 ERS 相关因子 PERK、XBP-1、ATF-6 和 CHOP 蛋白表达^[19];丹参有消炎止痛、扩张冠状动脉、改善心肌缺血状况、降低血压等功效其主要化学成分丹参酮可抑制 ERS 介导的细胞凋亡^[20],余佐药附子、薤白、法半夏、白芥子等都具有一定的改善血流动力学、抗炎等功效^[21-23]。诸药配合减少病理产物的积聚,逆转肺血管重塑,降低肺动脉压力,改善血液循环等。

综上所述,在低氧高二氧化碳性 PAH 大鼠模型中应用 YWHF 可有效降低肺动脉平均压,逆转肺血管重塑,增加肺动脉平滑肌细胞的凋亡率,可通过抑制 ERS 相关因子(JNK、Caspase-12、CHOP)的表达水平降低 PAH,以中剂量(0.3 g/kg)效果最适宜。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Umar S, Iorga A, Matori H, et al. Estrogen rescues preexisting severe pulmonary hypertension in rats[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 184(6): 715-723.
- [2] Sahni S, Ojrzanowski M, Majewski S, et al. Pulmonary arterial hypertension: a current review of pharmacological management[J]. *Pneumonol Al-ergol Pol*, 2016, 84(1): 47-61.
- [3] O'Connell C, Montani D, Savale L, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension [J]. *Presse Med*, 2015, 44(12): e409-e416.
- [4] Hao Y, Thakkar V, Stevens W, et al. A comparison of the predictive accuracy of three screening models for pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17(1): 7.
- [5] Liu J, Xiao M, Li J, et al. Activation of UPR signaling pathway is associated with the malignant progression and poor prognosis in prostate cancer [J]. *Prostate*, 2017, 77(3): 274-281.
- [6] Poletto V, Dragoni S, Lim D, et al. Endoplasmic reticulum Ca²⁺ handling and apoptotic resistance in tumor-derived endothelial colony forming cells [J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(10): 2260-2271.
- [7] Xue Q, Li C, Chen J, et al. The protective effect of the endoplasmic reticulum stress-related factors BiP/GRP78 and CHOP/Gadd153 on noise-induced hearing loss in guinea pigs [J]. *Noise Health*, 2016, 18(84): 247-255.
- [8] 钟广伟, 王东生, 陈琼, 等. 益气温阳活血化痰方药治疗慢性阻塞性肺疾病合并肺动脉高压的临床疗效研究[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(10): 3771-3774.
- [9] 范小芳, 李文娟, 陈兆琴, 等. 慢性低氧性肺动脉高压大鼠肺组织内质网应激介导的凋亡的变化[J]. *中国应用生理学杂志*, 2011, 27(3): 270-274, 385.
- [10] 陈奇, 邓文龙, 孙瑞元, 等主编. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 624.
- [11] 刘蓉芳, 孙玲, 张抒惠, 等. 心康冲剂对慢性心力衰竭大鼠心室重构的影响[J]. *中医杂志*, 2017, 58(22): 1947-1952.
- [12] 陈韦, 侯平. 中西医结合关于肺动脉高压的研究概述[J]. *世界中西医结合杂志*, 2016, 11(2): 289-291.
- [13] 吴莹, 韦祎. 中西医结合治疗慢性肺源性心脏病急性加重期 56 例[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(23): 316-319.
- [14] Dromparis P, Paulin R, Stenson TH, et al. Attenuating endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic strategy in pulmonary hypertension [J]. *Circulation*, 2013, 127(1): 115-125.
- [15] 罗辉, 刘建平. 中药复方剂量效应关系临床研究的思考[J]. *中国中西医结合杂志*, 2011, 31(6): 832-836.
- [16] 侯素春, 刘晓明, 林熙然, 等. 不同剂量凉血活血复方对小鼠上皮细胞增殖、表皮细胞分化、血浆内皮素 1 及血清可溶性 E-选择素的影响[J]. *中国中西医结合皮肤性病医学杂志*, 2003, 2(2): 76-79.
- [17] Chen W, Wang J, Luo Y, et al. Ginsenoside Rb1 and compound K improve insulin signaling and inhibit ER stress-associated NLRP3 inflammasome activation in adipose tissue[J]. *J Ginseng Res*, 2016, 40(4): 351-358.
- [18] Xue H, Gan F, Qian G, et al. Astragalus polysaccharides attenuate PCV2 infection by inhibiting endoplasmic reticulum stress *in vivo* and *in vitro* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40440.
- [19] Junfei G, Juan C, Nan Y, et al. Combination of Ligusticum chuanxiong and Radix Paeoniae ameliorate focal cerebral ischemic in MCAO rats via endoplasmic reticulum stress-dependent apoptotic signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 187(1): 313-324.
- [20] Hung YC, Pan TL, Hu WL, et al. Roles of reactive oxygen species in anticancer therapy with *Salvia miltiorrhiza* bunge [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016: 5293284.
- [21] 熊秋韵, 李梦婷, 缪璐琳, 等. 附子不同炮制品抗炎、镇痛和提高免疫功能作用的比较研究[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(1): 123-127.
- [22] 张卿, 高尔. 薤白的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(2): 105-107.
- [23] 万军梅, 黄红. 白芥子不同提取部位抗炎镇痛作用研究[J]. *亚太传统医药*, 2014, 5(10): 39-40.

(收稿: 2017-04-15 在线: 2018-08-28)

责任编辑: 白霞