

· 基础研究 ·

血府逐瘀汤含药血清对低氧诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖及 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响

李敏静¹ 郭莉¹ 陈晔¹ 严洁萍² 董雷¹ 蔡宛如¹

摘要 目的 研究血府逐瘀汤含药血清对低氧诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)增殖的影响及其机制。方法 低氧诱导大鼠 PASMCs 增殖,设置正常对照组、低氧模型组、血府逐瘀低剂量组、血府逐瘀高剂量组和 NVP-BE2235 组,血府逐瘀低、高剂量组含药血清浓度分别为 5% 和 20%。运用 CCK-8 法检测不同低氧时间和药物干预对于 PASMCs 增殖的影响,Western Blot 检测细胞 p-Akt、p-mTOR 和 PCNA 表达。结果 低氧培养 36 h 时 PASMCs OD 值最高,且高于常氧培养($P<0.01$);与正常对照组比较,低氧模型组 OD 值明显升高($P<0.01$),p-AKT、p-mTOR、PCNA 表达增加($P<0.05$);与低氧模型组比较,血府逐瘀高剂量组和 NVP-BE2235 组 OD 值不同程度降低($P<0.01$),各药物组 p-AKT、p-mTOR、PCNA 表达减少($P<0.05$);与血府逐瘀低剂量组比较,NVP-BE2235 组 p-AKT、p-mTOR、PCNA 表达减少($P<0.05$)。结论 血府逐瘀汤含药血清可以抑制低氧诱导的大鼠 PASMCs 增殖,可能通过阻断 PI3K/Akt/mTOR 信号通路活化并下调 PCNA 表达而发挥作用。

关键词 血府逐瘀汤含药血清;肺动脉平滑肌细胞;增殖;PI3K/Akt/mTOR 信号通路;增殖细胞核抗原

Effect of Xuefu Zhuyu Decoction Containing Serum on Hypoxia-induced Proliferation of Rat Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells and PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway LI Min-jing¹, GUO Li¹, CHEN Ye¹, YAN Jie-ping², DONG Lei¹, and CAI Wan-ru¹ 1 Department of Respiratory Medicine, Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310005); 2 Department of Pharmacy, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou (310014)

ABSTRACT Objective To investigate the effect of Xuefu Zhuyu Decoction containing serum on proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) induced by hypoxia and its related mechanism. **Methods** Hypoxia was used to induce PASMCs proliferation. Normal group, hypoxic model group, Xuefu Zhuyu low-dose group, Xuefu Zhuyu high-dose group and NVP-BE2235 group were set up, with the serum concentrations of Xuefu Zhuyu high-dose group and low-dose group at 5% and 20%, respectively. The effects of different hypoxia time and drug intervention on PASMCs proliferation were determined by CCK-8 assay. The expressions of p-Akt, p-mTOR and PCNA were detected by Western Blot. **Results** The optical density (OD) of PASMCs was highest after hypoxia culture for 36 h, which was significantly higher than that under normoxia culture ($P<0.01$). Compared with the normal group, OD and the expressions of p-AKT, p-mTOR and PCNA increased in the hypoxic model group ($P<0.01$, $P<0.05$). Compared with the hypoxic model group, OD decreased in the Xuefu Zhuyu high-dose group and the NVP-BE2235 group ($P<0.01$), and the expressions of p-AKT, p-mTOR and PCNA decreased in all drug groups ($P<0.05$). Compared with the Xuefu Zhuyu low-dose group, the expressions of p-AKT, p-mTOR, and PCNA decreased in NVP-BE2235 group ($P<0.05$). **Conclusion** Xuefu Zhuyu Decoction containing serum can inhibit hypoxia-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81503521);浙江省自然科学基金资助项目(No. LQ16H310003)

作者单位:1. 浙江中医药大学附属第二医院呼吸内科(杭州 310005);2. 浙江省人民医院药学部(杭州 310014)

通讯作者:蔡宛如, Tel: 0571-85268239, E-mail: caiwanru@aliyun.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200420. 228

induced proliferation of PSMCs, and the effect is mediated by suppressing the activation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and down-regulating the expression of PCNA.

KEYWORDS Xuefu Zhuyu Decoction containing serum; pulmonary artery smooth muscle cells; proliferation; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; proliferating cell nuclear antigen

低氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPH)是由长期低氧血症引起的渐进性、复杂性病变,是临床常见的病理生理过程^[1,2],也是慢性缺氧性肺病(如慢性阻塞性肺疾病等)的公认并发症,而慢性缺氧性肺病是全世界死亡和致残的常见原因之一^[3]。肺血管壁重构是 HPH 持续进展及最终形成肺心病的重要原因,肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PSMCs)的增殖、迁移和凋亡抗性是导致肺血管壁重构的关键调控因素^[4]。其中 PSMCs 过度增殖引起的血管壁中膜增厚是 HPH 病理改变的核心环节,研究发现 PI3K/Akt、RhoA/ROCK、BMP/TGF- β 等多种信号通路参与 PSMCs 增殖^[5,6]。

近 10 年来,治疗肺动脉高压的药物在全球范围内陆续上市,如贝前列素、安生立坦、他达拉非等,但目前尚缺乏这些药物治疗 HPH 的疗效和预后数据,西医治疗 HPH 目前主要仍在于控制原发病和舒张血管改善部分症状^[7]。中医治疗肺动脉高压以活血化瘀通络法为主,血府逐瘀汤是活血化瘀通络方药的代表方,研究发现血府逐瘀汤能有效改善肺动脉高压大鼠的内皮细胞功能,减轻肺血管重构,降低肺动脉压力^[8-10],但其细胞和分子机制目前暂不明确。本研究以大鼠 PSMCs 为靶细胞,观察血府逐瘀汤含药血清对低氧诱导 PSMCs 增殖以及 PI3K/AKT/mTOR 信号传导通路的影响。

材料与方法

1 动物 健康雄性清洁级 SD 大鼠,体重(200±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2012-0001。实验大鼠 5 只一笼群养,室内每日 12 h 光照和 12 h 黑暗交替照明,保持室温 22~24 °C,相对湿度 45%~55%,常规饲料喂养,自由进食饮水,适应性饲养 1 周后用于实验。本研究动物实验遵循《关于善待实验动物的指导性意见》施行。

2 药物 血府逐瘀汤(当归 9 g 生地黄 9 g 桃仁 12 g 红花 9 g 枳壳 6 g 赤芍 6 g 川芎 4.5 g 柴胡 3 g 桔梗 4.5 g 牛膝 9 g 甘草 6 g);上述药物由浙江中医药大学附属第二医院中药

制剂室制成流浸膏,生药含量 2.2 g/mL,4 °C 储备。NVP-BEZ235(美国 Selleck 公司,货号:S1009)。

3 主要试剂及仪器 DMEM 高糖培养液(美国 HyClone 公司,货号:SH30022.01B);胎牛血清(Gibco 公司,货号:A3160802);CCK-8 试剂盒(上海生工生物工程有限公司,货号:E606335);p-AKT 抗体(货号:4060S)、p-mTOR 抗体(货号:5536S)、PCNA 抗体(货号:13110S)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司,型号:ECLIPSE Ts2);多功能酶标仪(美国 Thermo 公司,型号:Multiskan FC);垂直电泳仪和电转移仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:1658033);化学发光荧光影像分析仪(日本富士胶片公司,型号:LAS-4000);低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司,型号:5810R);二氧化碳培养箱(德国 Heraeus 公司,型号:BB15);三气培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司,型号:HF100)。

4 原代 PSMCs 的提取、培养及传代 首先麻醉、解剖实验大鼠,无菌操作取出心肺,快速分离血管,保留 2~3 级肺小动脉血管剪开后刮去内膜与外膜,剪成约 2 mm 组织块后平铺于培养瓶中,加入 3 mL 含 20% 胎牛血清 DMEM 培养液(组织块不飘起),放置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养,静置培养 4 天后显微镜下观察,待细胞密度约达 70% 时进行传代培养。灭菌的 PBS 冲洗细胞两次,吸除 PBS,加入 0.25% 胰蛋白酶,37 °C 消化约 2 min 后在倒置显微镜下观察,当细胞皱缩变圆时加入新鲜培养液终止消化,用滴管轻轻吹打使细胞脱壁并分散,移入 15 mL 离心管中,800 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入适量含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液制成细胞悬液,分装到新培养瓶中,置于培养箱内静置培养,每 2 天更换培养液,取 4~6 代细胞用于后续实验。

5 血府逐瘀汤含药血清制备 SD 大鼠随机分为血府逐瘀汤组与空白对照组,每组 4 只。血府逐瘀汤组予血府逐瘀汤灌胃 8.75 g/(kg·d)^[8],空白对照组给予等体积生理盐水灌胃,每天给药 2 次,连续灌饲 3 天。末次给药后 1 h 下腔静脉取血,静置 30 min 待血清析出后 3 000 r/min 低温离心 10 min,无菌分离血清后 56 °C 水浴 30 min 灭活补体,-70 °C 冰箱保

存备用。

6 检测指标及方法

6.1 CCK-8 法检测不同时间低氧对 PSMCs 增殖的影响 收集 4~6 代细胞,胰酶消化,以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板,设立常氧组和低氧组,常氧组培养于含有 21% O₂、5% CO₂、74% N₂ 的 37 °C 恒温细胞培养箱中,低氧组培养于含有 3% O₂、5% CO₂、92% N₂ 的 37 °C 恒温细胞培养箱中,每组设 5 个复孔,按照时间梯度(6、12、24、36、48 h)处理细胞。弃去原有培养基,加入 100 μL 新鲜培养基,并加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,37 °C 孵育 4 h,用酶标仪在 450 nm 处测定各孔吸光度值(OD 值),空白孔调零,该 OD 值代表不同时间下 PSMCs 的增殖程度。

6.2 CCK-8 法检测血府逐瘀汤对低氧诱导 PSMCs 增殖的影响 收集 4~6 代细胞,胰酶消化,以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板,设立正常对照组、低氧模型组、空白血清组、血府逐瘀低剂量组、血府逐瘀高剂量组、NVP-BE235 组,每组设 5 个复孔。正常对照组在常氧条件下培养,其余各组在低氧条件下培养,空白血清组加入空白对照组大鼠血清,血府逐瘀低、高剂量组分别加入血府逐瘀汤含药血清使其终体积浓度分别为 5%、20%,NVP-BE235 组加入 NVP-BE235 使其终浓度为 5 μmol/L,继续培养 36 h。弃去原有培养基,加入 100 μL 新鲜培养基,并加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,37 °C 孵育 4 h,用酶标仪在 450 nm 处检测各孔吸光度值(OD 值),空白孔调零,该 OD 值代表不同条件下 PSMCs 的增殖程度。

6.3 Western Blot 测定 p-Akt、p-mTOR 和 PCNA 表达 收集 4~6 代细胞,胰酶消化,以 2×10^5 /孔接种于 6 孔板,设立正常对照组、低氧模型组、血府逐瘀低剂量组、血府逐瘀高剂量组、NVP-BE235 组,按前述条件处理各组细胞培养 36 h。每支标本中加入裂解液混合物(含增强型 RIPA、蛋白酶抑制剂、PMSF)100 μL,冰上裂解 30 min,每 10 min 震荡器上震荡 1 次,共 3 次;4 °C 条件下 13 000 r/min 离心 12 min,取上清 150 μL,BCA 法进行蛋白定量;总蛋白加入上样缓冲液,100 °C 水浴 7 min。上样量约 60 μg,SDS-PAGE 电泳,转移到 PVDF 膜上,室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 洗 1 遍加入相应一抗

4 °C 孵育过夜;第二天 TBST 洗膜 10 min×3 次,加入二抗室温下孵育 2 h, TBST 摇床上洗膜 10 min×3 次。ECL 化学发光显影,放入 LAS-4000 化学发光荧光影像分析仪曝光后保存图像,采用 Quantity One 软件测定各蛋白条带的平均灰度值。

7 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析。计量数据进行正态性检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,重复测量数据采用重复测量的多因素方差分析,其余数据组间比较,采用单因素方差分析检验,方差齐时采用 LSD 法检验,并用 SNK 法验证显著差异的结论,方差不齐时则采用 Dunnett-t 法检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组 PSMCs 不同时间点 OD 值比较(表 1) 随着时间推移,两组 OD 值逐渐升高,36 h 时低氧组 OD 值最高,且明显高于常氧组($P < 0.01$),48 h 时低氧组 OD 值下降,说明 36 h 时低氧诱导 PSMCs 增殖活力最强,故后续选取 36 h 作为低氧刺激时间。

2 各组 PSMCs 增殖 OD 值比较(表 2) 与正常对照组比较,低氧模型组 OD 值明显升高($P < 0.01$);与低氧模型组比较,血府逐瘀高剂量组和 NVP-BE235 组 OD 值有不同程度降低($P < 0.01$),血府逐瘀低剂量组和空白血清组 OD 值无明显下降($P > 0.05$);与血府逐瘀高剂量组比较,NVP-BE235 组 OD 值下降更明显($P < 0.01$)。

表 2 各组 PSMCs 增殖 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OD 值
正常对照	5	0.910±0.107
低氧模型	5	1.514±0.133*
空白血清	5	1.502±0.086
血府逐瘀低剂量	5	1.424±0.078
血府逐瘀高剂量	5	1.186±0.093 [△]
NVP-BE235	5	0.970±0.151 ^{△▲}

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与低氧模型组比较,[△] $P < 0.01$;与血府逐瘀高剂量组比较,[▲] $P < 0.01$

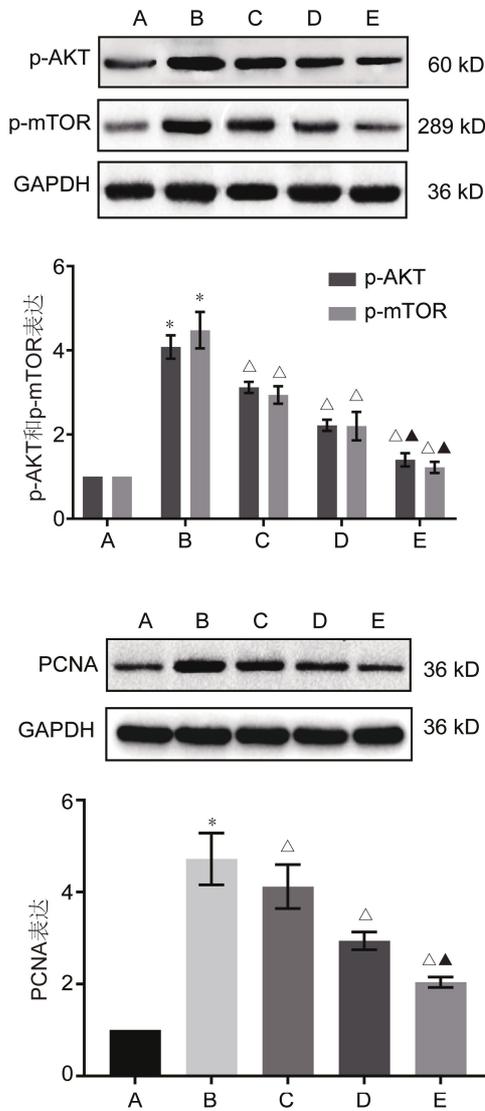
3 各组 PSMCs 中 p-AKT、p-mTOR 和 PCNA 表达比较(图 1) 与正常对照组比较,低氧模型组 p-AKT、p-mTOR、PCNA 表达增加($P < 0.05$);与低氧模型组比较,各药物组 p-AKT、p-mTOR、PCNA 表达减

表 1 两组 PSMCs 不同时间点 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	0 h	6 h	12 h	24 h	36 h	48 h
常氧	5	0.344±0.007	0.360±0.012	0.560±0.045	0.701±0.111	0.956±0.144	1.188±0.132
低氧	5	0.343±0.027	0.363±0.036	0.633±0.072	0.895±0.080	1.472±0.174*	1.386±0.079

注:与常氧组比较,* $P < 0.01$

少 ($P < 0.05$)；与血府逐瘀低剂量组比较, NVP-BEZ235 组 p-AKT、p-mTOR、PCNA 表达减少 ($P < 0.05$)；其余各药物组间比较, p-AKT、p-mTOR、PCNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注:A 为正常对照组;B 为低氧模型组;C 为血府逐瘀低剂量组;D 为血府逐瘀高剂量组;E 为 NVP-BEZ235 组;与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与低氧模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与血府逐瘀低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

图 1 各组 PSMCs 中 p-AKT、p-mTOR、PCNA 表达比较

讨 论

PASMCs 是肺血管壁重构的主要效应细胞之一, 它能通过各种信号通路及细胞因子与内膜的内皮细胞及外膜的成纤维细胞相互作用, 具有维持肺动脉结构和调节肺血管舒张和收缩功能, 在肺血管壁重构中起

至关重要的作用^[11]。PCNA 是 DNA 聚合酶的辅助因子, 在 DNA 复制中起重要作用, 是反应细胞增殖状态的良好指标^[12]。既往有关中药复方在体外实验中对 PASMCs 干预作用的研究较少, 近两年国内学者研究发现保肺定喘汤和补肺益肾方能有效抑制体外不同刺激诱导的 PASMCs 增殖, 以上两方都是研究者团队开发的经验方, 具有益气活血等作用^[13,14]。

PI3K/Akt/mTOR 信号传导通路的活化可诱导细胞生长、增殖、迁移, 加快细胞周期, 抑制细胞凋亡^[15], 调控细胞自噬^[16], 参与新生血管形成^[17]。研究发现 HPH 大鼠模型中 PASMC 的增殖和肺血管重构伴随 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活^[18,19]; 阻断 PI3K/Akt 信号通路或 mTOR 信号通路均可抑制低氧诱导的 PASMC 的增殖, 减轻肺血管重构^[20,21]。因此, 阻断 PI3K/Akt/mTOR 信号通路是干预 HPH 肺血管重构的有效靶点之一。有学者认为目前相关通路抑制剂的单一用药仍很难阻止肺动脉高压的进程, 联合用药有望成为治疗肺动脉高压的有效方案^[22]。中药复方制剂作用靶点多样, 可能可以抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路上多个分子的活性, 从而有望获得相当于通路抑制剂联合用药的效果, 但目前关于中药复方对于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路作用的相关研究鲜有报道。

HPH 根据其临床症状多属中医学“肺胀”“喘证”“痰饮”等疾病范畴。由于肺血管壁重构是 HPH 的主要病理改变, 因此也有学者认为本病属中医学肺络病范畴, 认为肺脏久病, 肺肾两虚, 病邪直接侵犯肺络, 或由气入血而病络, 导致络气亏虚, 无力行血及推动津液输布, 津聚为痰, 血停成瘀, 瘀血、痰浊有形之邪阻塞肺络, “痰”和“瘀”为主要病理因素^[23]。因主要病变在脉中, 故尤以血瘀为主要病理因素, 活血化瘀通络法应贯穿于各证型治疗之中。

血府逐瘀汤是清代王清任用以治疗“胸中血府血瘀”所致诸证的经验方。血府逐瘀汤的主要化学成分包括黄酮类、有机酸、萜类以及甾体皂苷, 现代药理学研究证明, 该方具有抑制血小板聚集, 改善血液流变学及微循环等作用^[24,25]。有研究显示血府逐瘀汤能使 PCNA 增殖度下降, 减轻肺心病大鼠肺血管重构^[26]; 20% 血府逐瘀汤含药血清通过升高一氧化氮的水平发挥抑制大鼠血管平滑肌细胞增殖和迁移作用^[27]。NVP-BEZ235 是双重的 PI3K/mTOR 抑制剂, 具有靶向抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的高潜力^[28], 本研究将其作为阳性对照药物观察血府逐瘀汤含药血清对于低氧诱导 PASMCs 增殖的影响, 进一步阐释血府逐瘀汤抑制肺血管重构的分子机制。

本研究首先探索 3% 低氧诱导 PSMCs 增殖的最佳低氧处理时间, 研究结果显示低氧培养 36 h 时 PSMCs 增殖活力最强, 高于常氧培养, 但是超过 48 h 的低氧刺激 PSMCs 增殖活力反而下降。20% 血府逐瘀汤含药血清和 NVP-BEZ235 可以抑制低氧诱导的大鼠 PSMCs 增殖, 但 20% 血府逐瘀汤含药血清抑制作用不如 NVP-BEZ235 明显。5% 血府逐瘀汤含药血清和正常大鼠血清对于低氧诱导的 PSMCs 增殖无明显抑制作用, 尤其正常大鼠血清处理的 PSMCs 和低氧模型组增殖活力相当, 故后续实验未再设置空白血清组。

Western Blot 结果显示低氧诱导 PSMCs 中 p-Akt、p-mTOR 和 PCNA 表达增加, 血府逐瘀汤含药血清和 NVP-BEZ235 可以抑制低氧诱导的 p-Akt、p-mTOR 和 PCNA 表达, 其中 20% 血府逐瘀汤含药血清对于上述蛋白表达的抑制作用与 NVP-BEZ235 相当, 5% 血府逐瘀汤含药血清的抑制作用弱于 NVP-BEZ235。可见血府逐瘀汤含药血清对低氧诱导的 p-Akt、p-mTOR、PCNA 过度表达和 PSMCs 增殖的抑制作用呈剂量依赖性, 但未能探索 5%~20% 之间浓度的血府逐瘀汤含药血清的作用效果。

通过本实验证实低氧诱导的 PSMCs 增殖伴随 PI3K/Akt/mTOR 信号通路活化和 PCNA 过度表达, 推测低氧通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 上调 PCNA 的表达, 从而促进 PSMCs 增殖; 血府逐瘀汤含药血清可以通过阻断低氧诱导的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路活化, 下调 PCNA 表达, 这可能是其抑制 PSMCs 增殖的机制之一。

利益冲突: 不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Ghofrani HA, Voswinckel R, Reichenberger F, et al. Hypoxia-and non-hypoxia-related pulmonary hypertension-established and new therapies [J]. *Cardiovascular Res*, 2006, 72(1): 30-40.
- [2] 冯恩志, 戴胜归, 杨生岳. 低氧性肺动脉高压研究进展 [J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2014, 7(3): 333-336.
- [3] Rowan SC, Keane MP, Gaine S, et al. Hypoxic pulmonary hypertension in chronic lung diseases: novel vasoconstrictor pathways [J]. *Lancet Respir Med*, 2016, 4(3): 225-236.
- [4] Tuder RM. Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension [J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 367(3): 643-649.
- [5] 李明星, 王勇, 蒋德旗, 等. 参与肺动脉平滑肌细胞增殖信号转导机制及信号转导抑制剂的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(5): 605-610.
- [6] Cai Z, Li J, Zhuang Q, et al. MiR-125a-5p ameliorates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by targeting the TGF- β 1 and IL-6/STAT3 signaling pathways [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(4): 1-11.
- [7] 中华医学会心血管病学分会肺血管病学组, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国肺高血压诊断和治疗指南 2018 [J]. *中华心血管病杂志*, 2018, 48(12): 933-964.
- [8] 王辉, 何飞, 李守业, 等. 血府逐瘀汤对肺血管重构大鼠病理形态学的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(8): 2149-2151.
- [9] 何飞, 徐俭朴, 鲍志坚, 等. 血府逐瘀汤对肺心病大鼠肺血管重构干预作用的实验研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2013, 3(3): 632-634, X, XI.
- [10] 解鑫隆, 徐朝军, 杨进, 等. 血府逐瘀汤对野百合碱诱导肺动脉高压模型大鼠的作用研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2019, 28(34): 3782-3785.
- [11] Barnes EA, Lee L, Barnes SL, et al. β 1 subunit of the calcium sensitive potassium channel modulates the pulmonary vascular smooth muscle cell response to hypoxia [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 315(2): L265-275.
- [12] Qin Z, Bai Z, Sun Y, et al. PCNA-Ub polyubiquitination inhibits cell proliferation and induces cell-cycle checkpoints [J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(24): 3390-3401.
- [13] 何飞, 沈亚青, 徐俭朴, 等. 保肺定喘汤含药血清对烟草烟雾提取物诱导大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖作用的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(8): 3470-3473.
- [14] 任周新, 李建生, 沈俊岭, 等. 补肺益肾方对 TGF- β 1/BMP-4 诱导的肺血管平滑肌细胞 TGF- β 1/Smad 信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(11): 126-132.
- [15] Chen S, Fisher RC, Signs S, et al. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling in PI3KR2-overexpressing colon cancer stem cells reduces tumor growth due to apoptosis [J]. *Oncotarget*, 2016, 8(31): 50476-50488.
- [16] Zhang H, Gong Y, Wang Z, et al. Apelin inhibits the proliferation and migration of rat PSMCs via the activation of PI3K/Akt/mTOR signal and the inhibition of autophagy under hypoxia [J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(3): 542-553.
- [17] Peng N, Gao S, Guo X, et al. Silencing of VEGF inhibits human osteosarcoma angiogenesis and

- promotes cell apoptosis via VEGF/PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(2): 1005-1015.
- [18] Zhang Q, Cao Y, Luo Q, et al. The transient receptor potential vanilloid-3 regulates hypoxia-mediated pulmonary artery smooth muscle cells proliferation via PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Cell Prolif*, 2018, 51(3): e12436.
- [19] Tang H, Chen J, Fraidenburg DR, et al. Deficiency of Akt1, but not Akt2, attenuates the development of pulmonary hypertension[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 308(2): L208-220.
- [20] Li GW, Xing WJ, Bai SZ, et al. The calcium-sensing receptor mediates hypoxia-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells through MEK1/ERK1, 2 and PI3K pathways[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2011, 108(3): 185-193.
- [21] Krymskaya VP, Snow J, Cesarone G, et al. mTOR is required for pulmonary arterial vascular smooth muscle cell proliferation under chronic hypoxia[J]. *FASEB J*, 2011, 25(6): 1922-1933.
- [22] Pena A, Kobir A, Goncharov D, et al. Pharmacological inhibition of mTOR kinase reverses right ventricle remodeling and improves right ventricle structure and function in rats[J]. *Am J Resp Cell Mol*, 2017, 57(5): 615-625.
- [23] 何飞. 运用肺络理论治疗肺系疾病刍议[J]. *浙江中医杂志*, 2011, 46(8): 549-550.
- [24] Fu C, Xia Z, Liu Y, et al. Qualitative analysis of major constituents from Xue Fu Zhu Yu Decoction using ultra high performance liquid chromatography with hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(17): 3457-3468.
- [25] Zhang L, Zhu L, Wang YF, et al. Characterization and quantification of major constituents of Xue Fu Zhu Yu by UPLC-DAD-MS/MS[J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2012, 62: 203-209.
- [26] 何飞, 徐俭朴, 周群, 等. 血府逐瘀汤对野百合碱诱导肺血管重构大鼠肺血管平滑肌细胞增殖与凋亡的影响[J]. *中国中医药科技*, 2012, 19(4): 308-309, 317.
- [27] 林薇, 曹洽云, 陈旭征, 等. 血府逐瘀汤对大鼠血管平滑肌细胞迁移的影响[J]. *福建中医学院学报*, 2009, 19(5): 23-25.
- [28] Alqurashi N, Hashimi SM, Alowaidi F, et al. Dual mTOR/PI3K inhibitor NVP-BE235 arrests colorectal cancer cell growth and displays differential inhibition of 4E-BP1[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(2): 1083-1092.

(收稿: 2019-05-17 在线: 2020-06-24)

责任编辑: 白霞

中华中医药学会外治分会 2020 年学术年会征文通知

为促进中医外治学科的发展,搭建中医外治学术交流平台,由中华中医药学会主办,中华中医药学会外治分会、河南省中医药研究院、中脊康(北京)国际医学研究院共同承办的“中华中医药学会外治分会 2020 年学术年会”拟定于 2020 年 9 月在郑州召开。现将征文有关事项通知如下。

征文内容 (1) 外治法理论探讨和临床应用研究,基础实验研究;(2) 外治法学科建设及标准化、规范化研究;(3) 预防及治疗新冠肺炎的中医外治法方案、经验总结;(4) 外治法在各科疾病及治未病中的运用;(5) 手术疗法在临床各科的应用;(6) 名老中医外治法经验总结;(7) 治法在内病外治、养生、保健、美容等领域的应用;(8) 中医外治新技术和新方法;(9) 民族医药外治法临床经验、总结及研究;(10) 中医外治法的文献研究;(11) 中医外治方法的成果转化、产业化和推广应用;(12) 外治医疗器械设备的临床应用。

征文要求 (1) 论文未公开发表,资料详实,数据准确,设计严谨,体现科学性、先进性、实用性和创造性原则;(2) 正文 5000 字以内,摘要 300 字以内,请注明作者姓名、单位、地址、邮编、职称、研究方向、电话、电子邮箱;(3) 稿件请以 Word 文档附件形式发至电子邮箱:wai zhi123@126.com,电话:010-52435023。

截稿日期 2020 年 8 月 10 日。