

本文引用: 张超, 易健, 丁蓉珍, 万佳婧, 谭骏岚, 王飞英, 周灵灵, 宋岚, 戴爱国. 肺心汤通过调控 AMPK/mTOR 信号通路抑制自噬对低氧性肺动脉高压大鼠的保护作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(5): 744-753.

## 肺心汤通过调控 AMPK/mTOR 信号通路抑制自噬 对低氧性肺动脉高压大鼠的保护作用

张超<sup>1,2</sup>, 易健<sup>2,3</sup>, 丁蓉珍<sup>1,2</sup>, 万佳婧<sup>1,2</sup>, 谭骏岚<sup>1,2</sup>, 王飞英<sup>1,2</sup>, 周灵灵<sup>1,2</sup>,  
宋岚<sup>2,5</sup>, 戴爱国<sup>1,2,4\*</sup>

1.湖南中医药大学医学院呼吸疾病研究室,湖南长沙 410208;2.血管生物学与转化医学湖南省重点实验室/湖南省  
高校重点实验室,湖南长沙 410208;3.湖南中医药大学第一附属医院医学创新实验中心,湖南长沙 410007;  
4.湖南中医药大学第一附属医院呼吸内科,湖南长沙 410007;5.湖南中医药大学医学院,湖南长沙 410208

**[摘要]** 目的 探究肺心汤通过调控腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路对低氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPH)大鼠的治疗作用及机制。方法 36只SD雄性大鼠随机分为正常组、模型组、西地那非组以及肺心汤低、中、高剂量组。除正常组外,将其余5组置于氧气浓度为10.0%±0.5%的低氧舱内造模28d,每天8h,造模同时灌胃给药。4周后检测大鼠心肺血流动力学指标[右心室收缩压(right ventricular systolic pressure, RVSP),右心室肥厚指数(right ventricular hypertrophy index, RVHI),肺动脉加速时间/肺动脉射血时间(pulmonary acceleration time/pulmonary ejection time, PAT/PET)、三尖瓣环收缩期位移(tricuspid annulus plane systolic excursion, TAPSE)、右心室前壁厚度(right ventricular anterior wall thickness, RVAWT)];HE染色法检测肺动脉重塑;免疫荧光法检测α平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)蛋白共定位表达;透射电镜观察自噬溶酶体的数量;免疫组织化学法检测肺组织中p-AMPK、p-mTOR、微管相关蛋白1轻链3B(microtubule-associated protein light chain 3B, LC3B)、Beclin1和p62蛋白阳性表达。结果 与正常组相比,模型组大鼠RVSP、RVHI及RVAWT显著升高( $P<0.01$ ),PAT/PET和TAPSE显著降低( $P<0.01$ );肺小动脉壁明显增厚,管腔狭窄,肺小动脉管壁厚度占血管直径的百分比(the percentage of wall thickness of pulmonary arterioles to vascular diameter, WT%)显著升高( $P<0.01$ );α-SMA和PCNA共定位表达显著增加;自噬溶酶体数量增加;肺组织中p-AMPK、LC3B和Beclin1蛋白阳性表达上调( $P<0.01$ ),p-mTOR及p62蛋白阳性表达下调( $P<0.01$ )。与模型组相比,各给药组大鼠RVSP、RVHI及RVAWT显著下降( $P<0.01$ ),PAT/PET、TAPSE显著升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );肺小动脉壁增厚程度减轻,WT%显著降低( $P<0.01$ );α-SMA和PCNA共定位表达减少;自噬溶酶体数量减少;肺组织中p-AMPK、LC3B和Beclin1蛋白阳性表达显著下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),p-mTOR及p62蛋白阳性表达显著上调( $P<0.01$ )。与西地那非组相比,肺心汤低、中剂量组TAPSE降低( $P<0.01$ );肺心汤低、中剂量组肺动脉中膜增厚程度增加,WT%增加( $P<0.01$ );肺心汤低、中剂量组p-AMPK蛋白阳性表达升高( $P<0.01$ ),肺心汤高剂量组p-AMPK蛋白阳性表达降低( $P<0.05$ );肺心汤低剂量组p-mTOR蛋白阳性表达降低( $P<0.01$ )。结论 肺心汤可能通过下调AMPK/mTOR信号通路抑制自噬,发挥改善HPH的作用。

**[关键词]** 肺心汤;低氧性肺动脉高压;腺苷酸活化蛋白激酶;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;自噬

**[中图分类号]**R285.5

**[文献标志码]**A

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.05.005

## Protective effects of Feixin Decoction on rats with hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting autophagy through regulating AMPK/mTOR signaling pathway

ZHANG Chao<sup>1,2</sup>, YI Jian<sup>2,3</sup>, DING Rongzhen<sup>1,2</sup>, WAN Jiajing<sup>1,2</sup>, TAN Junlan<sup>1,2</sup>, WANG Feiying<sup>1,2</sup>,  
ZHOU Lingling<sup>1,2</sup>, SONG Lan<sup>2,5</sup>, DAI Aiguo<sup>1,2,4\*</sup>

**[收稿日期]**2023-12-21

**[基金项目]**国家自然科学基金面上项目(82370069, 82200066);国家自然科学基金青年项目(82305214);湖南省自然科学基金项目(2021JJ30017, 2022JJ40308);中国博士后科学基金面上项目(2021M690982);湖南省中医药科研计划重点项目(C2022001);湖南省研究生科研创新项目(2022CX196)。

**[通信作者]**\*戴爱国,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:daiaguo@hnu.cm.edu.cn。

1. Respiratory Disease Laboratory, School of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;
2. Key Laboratory of Vascular Biology and Translational Medicine, Education Department of Hunan Province, Changsha, Hunan 410208, China;
3. Medical Innovation Experiment Center, The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410021, China;
4. Department of Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410021, China;
5. School of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

**[Abstract] Objective** To investigate the therapeutic efficacy and mechanism of Feixin Decoction (FXD) on hypoxic pulmonary hypertension (HPH) rats through regulating adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. **Methods** Thirty-six SD rats were randomized into control group, model group, sildenafil group and low-, medium-, high-dose FXD groups. Except control group, the remaining five groups were placed in a hypoxic chamber with an oxygen concentration of  $10\% \pm 0.5\%$  for modeling, 8 hours per day for 28 d, with simultaneous intragastric administration. After 4 weeks, the rat cardiopulmonary hemodynamic indexes [right ventricular systolic pressure (RVSP), right ventricular hypertrophy index (RVHI), the ratio of pulmonary acceleration time to pulmonary ejection time (PAT/PET), tricuspid annulus plane systolic excursion (TAPSE), right ventricular anterior wall thickness (RVAWT)] were determined. Pulmonary artery remodeling was checked by HE staining; the co-localization of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was examined by immunofluorescence assay; the number of autolysosomes was observed by transmission electron microscope (TEM); the positive expressions of p-AMPK, p-mTOR, microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B), Beclin1, and p62 in the lung tissue were measured by immunohistochemical assay. **Results** Compared with the control group, in the model group, RVSP, RVHI, and RVAWT were significantly increased ( $P < 0.01$ ), while PAT/PET and TAPSE were significantly decreased ( $P < 0.01$ ); the wall of the pulmonary arterioles was markedly thickened and the lumina narrowed, with a significant increase in the percentage of wall thickness of pulmonary arterioles to vascular diameter, WT% ( $P < 0.01$ ); the co-localization of  $\alpha$ -SMA and PCNA was significantly enhanced ( $P < 0.01$ ); the number of autolysosomes was increased; the protein positive expressions of p-AMPK, LC3B, and Beclin1 in the lung tissue were up-regulated ( $P < 0.01$ ), while those of p-mTOR and p62 were down-regulated ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, in all medication groups, RVSP, RVHI, and RVAWT were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), while PAT/PET and TAPSE were significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); the thickness of the pulmonary arterioles was reduced with a significant reduction in WT% ( $P < 0.01$ ); the co-localization of  $\alpha$ -SMA and PCNA was significantly reduced; the number of autolysosomes decreased; the protein positive expressions of p-AMPK, LC3B, and Beclin1 in the lung tissue were significantly down-regulated ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), while those of p-mTOR and p62 were significantly up-regulated ( $P < 0.01$ ). Compared with the sildenafil group, TAPSE decreased in the low- and medium-dose FXD groups ( $P < 0.01$ ); the degree of pulmonary arterial intima-media thickening was increased and the WT% was higher in the low- and medium-dose FXD groups ( $P < 0.01$ ); the protein positive expression of p-AMPK was elevated in the low- and medium-dose FXD groups ( $P < 0.01$ ), while that was reduced in the high-dose FXD group ( $P < 0.05$ ); the protein positive expression of p-mTOR was decreased in the low-dose FXD group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** FXD may play a role in ameliorating hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting autophagy through down-regulation of the AMPK/mTOR signaling pathway.

**[Keywords]** Feixin Decoction; hypoxic pulmonary hypertension; adenosine monophosphate-activated protein kinase; mammalian target of rapamycin; autophagy

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是一种严重的肺血管疾病,以肺动脉压力和肺血管阻力逐渐升高为主要特征,引起肺血管持续性收缩、血管重塑以及右心室肥厚,最终导致右心衰竭和死亡<sup>[1]</sup>。低氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPH)以肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth

muscle cell, PASMC)异常增殖所致的肺血管重塑为主要病理特征。肺血管重塑的特点是血管内膜/中膜层增厚,主要是由于PASMC的过度增殖、迁移和抗凋亡,造成动脉功能性僵化,导致肺血管血流动力学改变。HPH属于第三类PH,即低氧或肺部疾病引起的PH<sup>[2]</sup>。临床上,HPH尚缺乏有效治疗手段,亟待开

发新的药物及靶点。自噬是细胞内受损细胞器和蛋白质降解的生物学过程,主要由溶酶体依赖途径介导<sup>[3]</sup>。新近研究表明,肺血管细胞自噬增加可促进肺血管重塑,引起 HPH 病程演变<sup>[4]</sup>。腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路是介导自噬的经典信号通路,该通路在 HPH 啮齿类动物模型肺组织中显著激活,并促进 PSMC 增殖<sup>[5]</sup>。因此,通过靶向调控 AMPK/mTOR 信号通路抑制自噬有望成为 HPH 的有效治疗手段。

肺心汤是针对 HPH“宗气亏虚导致的水、痰、瘀互结”这一核心病机所创立的经验方,且本课题组前期临床研究已经证实,肺心汤可改善肺心病患者咳嗽、咯痰、气喘、心悸、气短、水肿等症状<sup>[6]</sup>。此外,肺心汤能有效改善 HPH 大鼠肺血管重塑及右心肥厚<sup>[7]</sup>。因此,结合前期研究基础,本实验以慢性低氧复制 HPH 大鼠模型,探讨肺心汤通过调控 AMPK/mTOR 信号通路对 HPH 大鼠的治疗作用及机制,旨在为肺心汤的临床应用提供理论与实验依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

36 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,6~8 周龄,体质量(200±20) g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物质量合格证号:430727221102935243,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004。饲养于湖南中医药大学动物中心,室温 18~22 ℃,湿度 40%~60%,通风,照明昼夜规律,适应性饲养 1 周,大鼠自由饮水进食。本实验已通过湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准,伦理审批号:ZYFY2021-1008-57。

### 1.2 药液制备

肺心汤由生黄芪(18 g)、白参(6 g)、制附子(4 g)、葶苈子(10 g)、茯苓(15 g)、白术(12 g)、桃仁(10 g)、红花(10 g)、赤芍(10 g)、车前子(15 g)、麦冬(12 g)、知母(9 g)组成,均符合 2020 年版《中华人民共和国药典》规定,购自湖南中医药大学第一附属医院,由湖南中医药大学第一附属医院龙红萍副研究员鉴定合

格。按传统水提法浓缩成生药含量分别为 0.585、1.17、2.34 g·mL<sup>-1</sup> 的药液,置于 4 ℃冰箱冷藏备用。

### 1.3 药品与试剂

枸橼酸西地那非片(辉瑞制药有限公司,批号:EW4378); $\alpha$ -SMA 抗体、p62 抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号依次为 BM0002、BA2849);LC3B 抗体、PCNA 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号依次为 18725-1-AP、10205-2-AP);p-AMPK 抗体、p-mTOR 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号依次为 bs-12972R、bs-3495R);山羊抗小鼠 IgG H&L(HRP)、山羊抗兔 IgG H&L(HRP)(英国 Abcam 公司,批号依次为 Ab6789、Ab205718);电镜固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:G1102)。

### 1.4 主要仪器

YCP-160D 型动物实验箱(长沙华晓电子科技有限公司);V702001 型小动物麻醉机(美国 MIDMARK 公司);MP160 型生理信号采集系统(美国 Biopac 公司);FTH-1918 B-E118 型压力传感器(美国 Transonic 公司);VINNO 6 LAB 型 B 超机(飞依诺科技股份有限公司);JT-12J 型脱水机、JB-L5 型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2016 型病理切片机(上海徠卡仪器有限公司);HT7700 型透射电子显微镜(日本日立公司);正置荧光显微镜(奥林巴斯有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物分组、造模及给药

将 36 只 SD 大鼠采用随机数字法分为 6 组:正常组、模型组、阳性药物(西地那非)组(0.025 g·kg<sup>-1</sup>)以及肺心汤低、中、高剂量组(5.85、11.7、23.4 g·kg<sup>-1</sup>),每组 6 只。采用常压间断缺氧法,构建 HPH 大鼠模型<sup>[8]</sup>。通过动态充入 N<sub>2</sub> 使舱内氧气浓度维持在(10%±0.5%),舱内放入钠石灰和无水氯化钙吸收舱内二氧化碳和水蒸气,每天缺氧 8 h,持续 28 d。以 70 kg 成人的临床等效剂量,确定肺心汤低、中、高剂量组大鼠每天给药剂量依次为 5.85、11.7、23.4 g·kg<sup>-1</sup>(相当于临床等效剂量的 0.5、1、2 倍),灌胃体积为 10 mL/kg,肺心汤灌胃浓度依次为 0.585、1.17、2.34 g·mL<sup>-1</sup>,其余各组采用灌胃方式给予等体积蒸馏水,在缺氧的

同时给予大鼠灌胃,连续干预 28 d。

## 2.2 超声心动图

超声心动图是临床上常用的评估和临床前诊断 PH 的工具,肺动脉加速时间/肺动脉射血时间(pulmonary acceleration time/pulmonary ejection time, PAT/PET)主要反映右心室后负荷大小,三尖瓣环收缩期位移(tricuspid annulus plane systolic excursion, TAPSE)反映右心室收缩功能,右心室前壁厚度(right ventricular anterior wall thickness, RVAWT)增厚表示慢性右心功能障碍。造模 28 d 结束后,将大鼠固定后使用 3%异氟烷吸入麻醉。麻醉后,用脱毛膏褪去大鼠胸部的毛,使用经胸超声心动图系统测量 PAT、PAT/PET、TAPSE、RVAWT。

## 2.3 大鼠右心室压力和右心室肥厚指数测定

右心室收缩压(right ventricular systolic pressure, RVSP)是检测 PH 金指标<sup>[9]</sup>,右心室肥厚指数(right ventricular hypertrophy index, RVHI)是评价右心室重构的重要指标<sup>[10]</sup>,与 HPH 的严重程度呈正相关。超声心动图检测结束后继续采用异氟烷维持麻醉,将大鼠固定后用剪刀剪开大鼠的右侧颈部皮肤,钝性分离右侧颈外静脉使血管充分暴露,用缝合线结扎远心端,近心端用显微剪小心剪一“V”形切口,导管与压力传感器连接,经右侧颈外静脉到达上腔静脉再到右心房,缓慢进入右心室,可见导管有节律的抖动,依据波形调整导管,直至出现典型的右心室波形并稳定后,16 导联生理信号采集系统记录 RVSP 并分析。在冷冻台上迅速解剖肺和心脏,滤纸吸干多余的血液,分别称量右心室、左心室与室间隔的重量,代入公式:RVHI=右心室/(左心室+室间隔)重量比(RV/LV+S;富尔顿指数),以此作为评估右心室肥厚程度的指标。每组收集 3 个样本,放入 4%多聚甲醛中固定,其余样本保存在-80 °C 冰箱中,以备进一步检测。

## 2.4 HE 染色法检测肺动脉重塑

经预冷 PBS 灌流后,分离大鼠肺组织,取左下肺叶,置于 4%多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋并连续切片、HE 染色,在显微镜下,选择同一光强度,每张切片随机选取 3 个视野,取 3 条直径为 50~100  $\mu\text{m}$

的肺小动脉,用 Image J 软件分析,测量并计算肺小动脉管壁厚度占血管直径的百分比(the percentage of wall thickness of pulmonary arterioles to vascular diameter, WT%), $WT\%=(\text{血管外径}-\text{血管内径})/\text{血管外径}\times 100\%$ ,以评估肺血管重塑程度<sup>[10]</sup>。

## 2.5 免疫荧光法检测肺组织中 $\alpha$ -SMA、PCNA 蛋白共表达情况

蜡块切片,厚度约 4  $\mu\text{m}$ ,依次脱蜡水化,抗原修复,加入自发荧光淬灭剂 5 min,流水冲洗 10 min,然后滴加 BSA 封闭 30 min。用抗  $\alpha$ -SMA(1:200)和抗 PCNA(1:500)抗体的混合物在 4 °C 下染色过夜。孵育后,用 PBS 冲洗切片,并与用于  $\alpha$ -SMA 的山羊抗小鼠 IgG H&L(HRP)和用于 PCNA 的山羊抗兔 IgG H&L(HRP)避光室温下孵育 50 min。冲洗后,DAPI 复染细胞核,最后使用抗荧光淬灭封片剂封片,并在显微镜下观察。

## 2.6 透射电镜检测肺动脉平滑肌细胞中自噬溶酶体的数量

取新鲜肺组织剪成大小约 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 组织块,迅速投入电镜固定液,4 °C 固定 2~4 h,0.1 mol $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液 PBS(pH=7.4)漂洗 3 次,1%锇酸中室温固定 2 h,然后依次进行脱水、渗透、包埋、切片、染色后,透射电镜下观察自噬溶酶体形态和数量,采集图像并分析。

## 2.7 免疫组织化学法检测肺组织中 p-AMPK、p-mTOR、LC3B、Beclin1 和 p62 蛋白阳性表达情况

蜡块切片,厚度约 4  $\mu\text{m}$ ,依次脱蜡水化,抗原修复,3%过氧化氢去离子水灭活,3% BSA 封闭液封闭 30 min,加入适量 p-AMPK(1:800)、p-mTOR(1:800)、LC3B(1:200)、Beclin1(1:200)、p62(1:200)一抗 4 °C 冰箱孵育过夜,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。二抗室温孵育 50 min,再次 PBS 冲洗,滴加 DAB 显色液,苏木素复染细胞核,最后进行梯度脱水,透明,封片。每只大鼠取 3 张切片,显微镜下观察,使用 Image J 软件分析积分光密度值(IOD)并计算面积(Area),以 IOD/Area 表示阳性信号表达情况。

## 2.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.0 统计软件对实验数据进行分析。数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,两组间均数比较采用

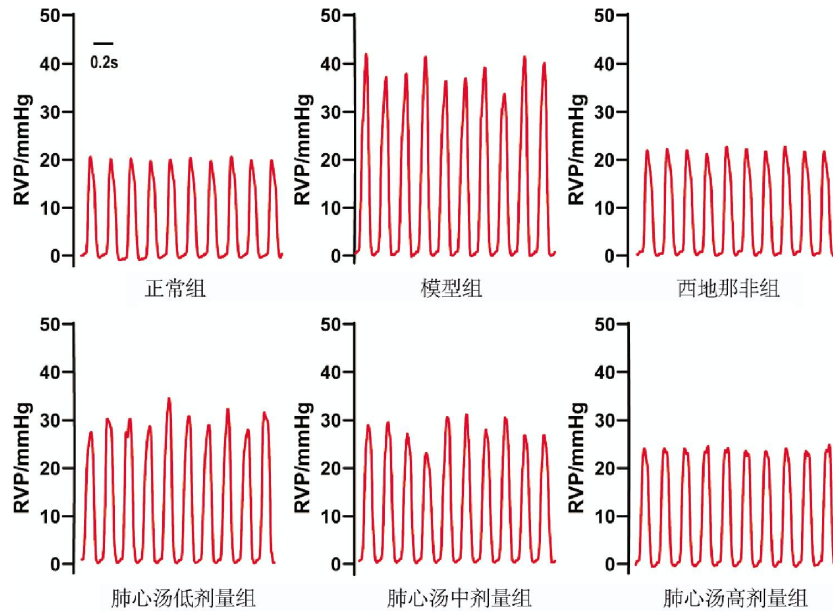


图1 肺心汤对 HPH 大鼠 RVSP 的影响

独立样本  $t$  检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用  $LSD-t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 肺心汤对 HPH 大鼠右心室收缩压和右心室壁厚指数的影响

与正常组比较, 模型组大鼠的 RVSP 及 RVHI 升高 ( $P < 0.01$ ), 表明 HPH 模型复制成功; 与模型组比较, 各给药组大鼠的 RVSP 均降低 ( $P < 0.01$ ), 肺心汤高剂量组 RVHI 显著降低 ( $P < 0.01$ )。详见图 1、表 1。

表1 肺心汤对各组大鼠 RVSP 和 RVHI 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	RVSP/mmHg	RVHI
正常组	—	22.40±3.68	0.18±0.02
模型组	—	42.56±6.00 <sup>#</sup>	0.24±0.01 <sup>#</sup>
西地那非组	0.025	26.01±2.55 <sup>**</sup>	0.20±0.03
肺心汤低剂量组	5.85	32.26±1.83 <sup>**</sup>	0.22±0.02
肺心汤中剂量组	11.7	28.49±0.54 <sup>**</sup>	0.21±0.01
肺心汤高剂量组	23.4	24.91±2.09 <sup>**</sup>	0.19±0.01 <sup>**</sup>

注: 与正常组相比, <sup>#</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组相比, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

#### 3.2 肺心汤对 HPH 大鼠右心功能的影响

与正常组比较, 模型组大鼠的 PAT/PET、TAPSE 降低 ( $P < 0.01$ ), RVAWT 升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组 PAT/PET、TAPSE 升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),

RVAWT 降低 ( $P < 0.01$ ); 与西地那非组比较, 肺心汤低、中剂量组 TAPSE 降低 ( $P < 0.01$ ); 与肺心汤低剂量组比较, 肺心汤高剂量组 PAT/PET、TAPSE 升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。结果表明, 对于改善 HPH 大鼠右心功能, 各给药组均有效, 其中肺心汤高剂量组效果最为明显。详见图 2、表 2。

#### 3.3 肺心汤对 HPH 大鼠肺动脉 $\alpha$ -SMA 和 PCNA 蛋白共定位的影响

与正常组比较, 模型组大鼠肺动脉平滑肌细胞层 PCNA 染色增强,  $\alpha$ -SMA (绿色) 和 PCNA (红色) 共定位增强; 与模型组比较, 各给药组大鼠肺动脉平滑肌细胞层 PCNA 染色减少,  $\alpha$ -SMA (绿色) 和 PCNA (红色) 共定位减少。表明肺心汤能够抑制 PASMC 增殖。详见图 3。

#### 3.4 肺心汤对 HPH 大鼠肺血管结构的影响

与正常组比较, 模型组大鼠的肺组织病理变化明显, 肺动脉中膜增厚及管腔狭窄, WT% 显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组大鼠肺动脉中膜增厚程度减轻, WT% 显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与西地那非组比较, 肺心汤低、中剂量组肺动脉中膜增厚程度增加, WT% 增加 ( $P < 0.01$ ); 与肺心汤低剂量组比较, 肺心汤高剂量组肺动脉中膜增厚程度减轻, WT% 显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与肺心汤中剂量组比较, 肺心汤高剂量组肺动脉中膜增厚程度减轻, WT% 降低 ( $P < 0.05$ )。结果表明, 肺心汤能明显抑制 HPH 大鼠肺动脉中膜增厚, 显著改善大鼠肺血管重构, 并呈剂量依赖性。详见表 3、图 4。

表2 肺心汤对 HPH 大鼠右心功能的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	PAT/PET	TAPSE/mm	RVAWT/mm
正常组	—	0.46±0.02	2.07±0.09	0.57±0.08
模型组	—	0.37±0.01 <sup>#</sup>	1.39±0.07 <sup>#</sup>	0.90±0.09 <sup>#</sup>
西地那非组	0.025	0.43±0.02 <sup>**</sup>	1.99±0.16 <sup>**</sup>	0.63±0.08 <sup>**</sup>
肺心汤低剂量组	5.85	0.40±0.01 <sup>*</sup>	1.66±0.11 <sup>**△△</sup>	0.72±0.08 <sup>**</sup>
肺心汤中剂量组	11.7	0.41±0.01 <sup>**</sup>	1.75±0.07 <sup>**△△</sup>	0.65±0.10 <sup>**</sup>
肺心汤高剂量组	23.4	0.43±0.02 <sup>**§</sup>	1.90±0.08 <sup>**§§</sup>	0.58±0.08 <sup>**</sup>

注:与正常组相比,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与模型组相比,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ;与西地那非组相比,<sup>△△</sup> $P<0.01$ ;与肺心汤低剂量组相比,<sup>§</sup> $P<0.05$ ,<sup>§§</sup> $P<0.01$ 。

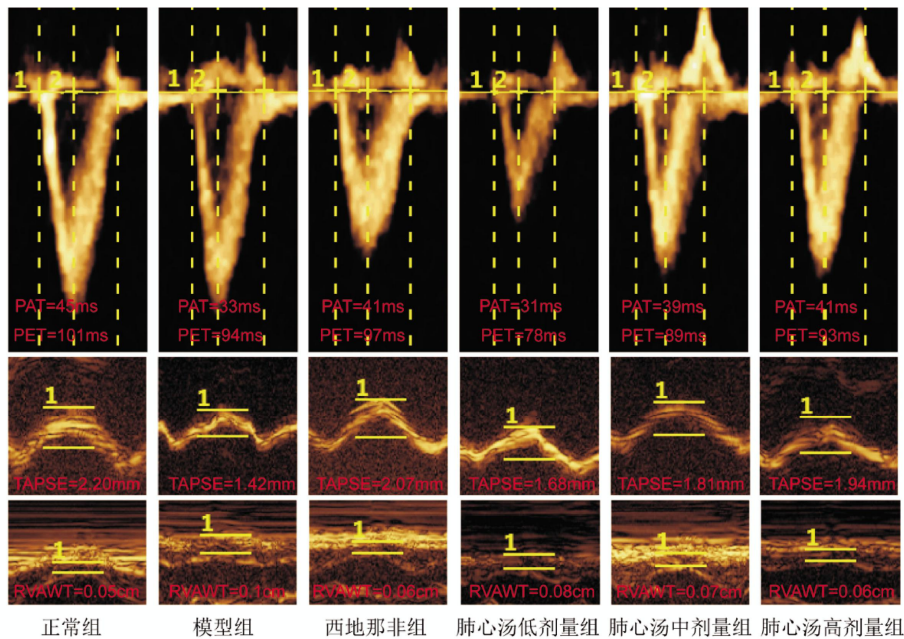


图2 肺心汤对 HPH 大鼠右心功能的影响

表3 肺心汤对 HPH 大鼠肺小动脉壁厚度的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	WT%
正常组	—	23.12±1.21
模型组	—	47.05±1.64 <sup>#</sup>
西地那非组	0.025	25.30±0.90 <sup>**</sup>
肺心汤低剂量组	5.85	30.54±2.42 <sup>**△△</sup>
肺心汤中剂量组	11.7	29.76±3.57 <sup>**△△</sup>
肺心汤高剂量组	23.4	25.94±1.00 <sup>**§§</sup>

注:与正常组相比,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与模型组相比,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ;与西地那非组相比,<sup>△△</sup> $P<0.01$ ;与肺心汤低剂量组相比,<sup>§</sup> $P<0.01$ ;与肺心汤中剂量组比较,<sup>§</sup> $P<0.05$ 。

### 3.5 肺心汤对 HPH 大鼠PASMCM 中自噬溶酶体数量的影响

与正常组比较,模型组大鼠 PASMCM 中自噬溶酶体数量明显增加;与模型组比较,各给药组大鼠 PASMCM 中自噬溶酶体数量明显减少。表明各给药组可抑制 PASMCM 自噬。详见图 5。

### 3.6 肺心汤对 HPH 大鼠肺组织中 p-AMPK、p-mTOR、LC3B、Beclin1 和 p62 蛋白阳性表达水平的影响

p-AMPK 阳性表达主要定位于细胞核和细胞浆,p-mTOR 阳性表达主要定位于细胞浆,LC3B 阳性表达主要定位于细胞浆和部分胞核,Beclin1 阳性表达主要定位于细胞膜和细胞浆,p62 阳性表达主要定位于细胞浆。与正常组比较,模型组大鼠肺组织中 p-AMPK、LC3B、Beclin1 蛋白阳性表达均升高( $P<0.01$ ),p-mTOR、p62 蛋白阳性表达降低( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组大鼠肺组织中 p-AMPK、LC3B、Beclin-1 蛋白阳性表达均降低( $P<0.05, P<0.01$ ),p-mTOR、p62 蛋白阳性表达升高( $P<0.01$ );与西地那非组比较,肺心汤低、中剂量组 p-AMPK 蛋白阳性表达升高( $P<0.01$ ),肺心汤高剂量组 p-AMPK 蛋白阳性表达降低( $P<0.05$ );肺心汤低剂量组 p-mTOR

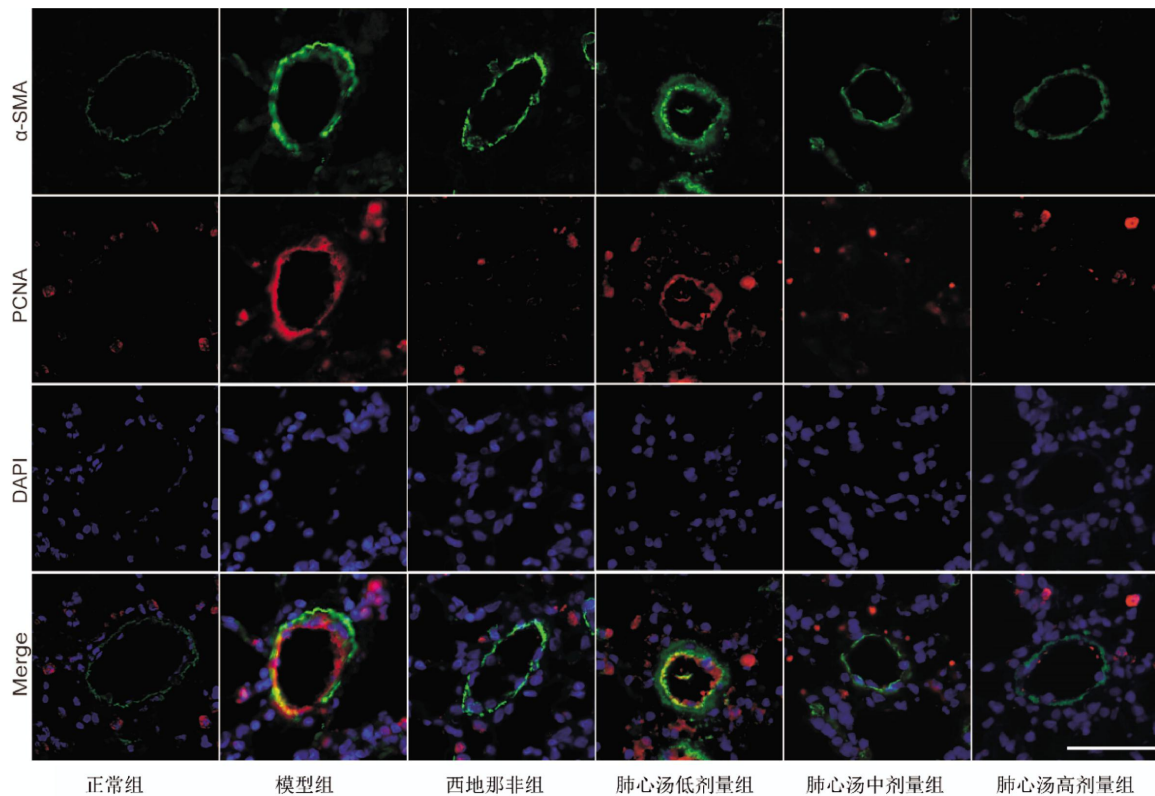


图3 肺心汤对 HPH 大鼠肺动脉  $\alpha$ -SMA 和 PCNA 蛋白表达水平的影响(免疫荧光,  $\times 200$ )

注:绿色表示  $\alpha$ -SMA;红色表示 PCNA。

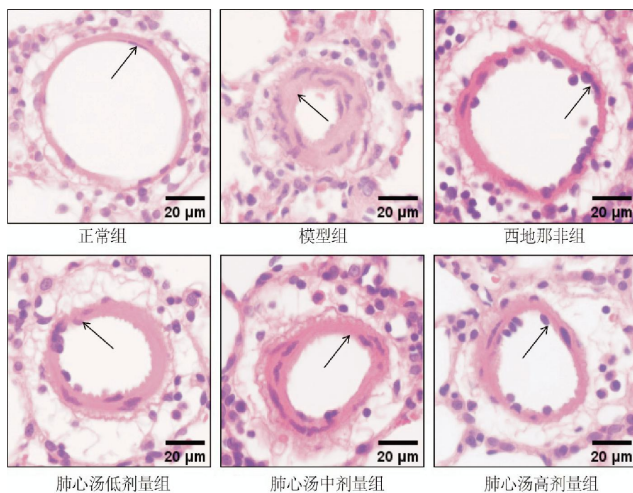


图4 肺心汤对 HPH 大鼠肺血管结构的影响(HE 染色,  $\times 400$ )

注:黑色箭头表示肺中小动脉。

蛋白阳性表达降低( $P < 0.01$ );与肺心汤低剂量组比较,肺心汤中剂量组 p-AMPK 蛋白阳性表达降低( $P < 0.01$ ),肺心汤中、高剂量组 p-mTOR 蛋白阳性表达升高( $P < 0.01$ ),肺心汤高剂量组 LC3B 蛋白阳性表达降低( $P < 0.01$ );与肺心汤中剂量组比较,肺心汤高剂量组 p-AMPK 蛋白阳性表达降低( $P < 0.01$ )。结果表明,肺心汤能下调 HPH 大鼠肺组织中 p-AMPK、LC3B、Beclin1 蛋白阳性表达,上调 p-mTOR、p62 蛋

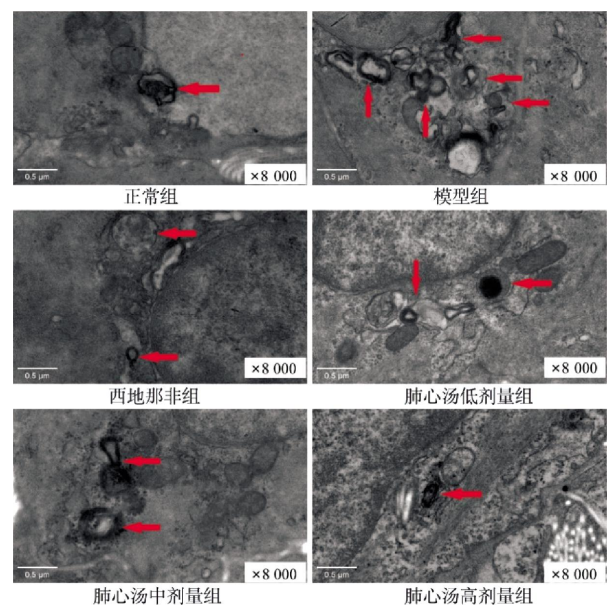


图5 肺心汤对 HPH 大鼠 PASMC 中自噬溶酶体数量的影响(TEM,  $\times 8\ 000$ )

白阳性表达,可能通过调控 AMPK/mTOR 信号通路,抑制自噬。详见图 6、表 4。

#### 4 讨论

中医药治疗 HPH 疗效确切,且具有多靶点和多途径等优势。PH 的病因复杂,涉及血管收缩/舒张失

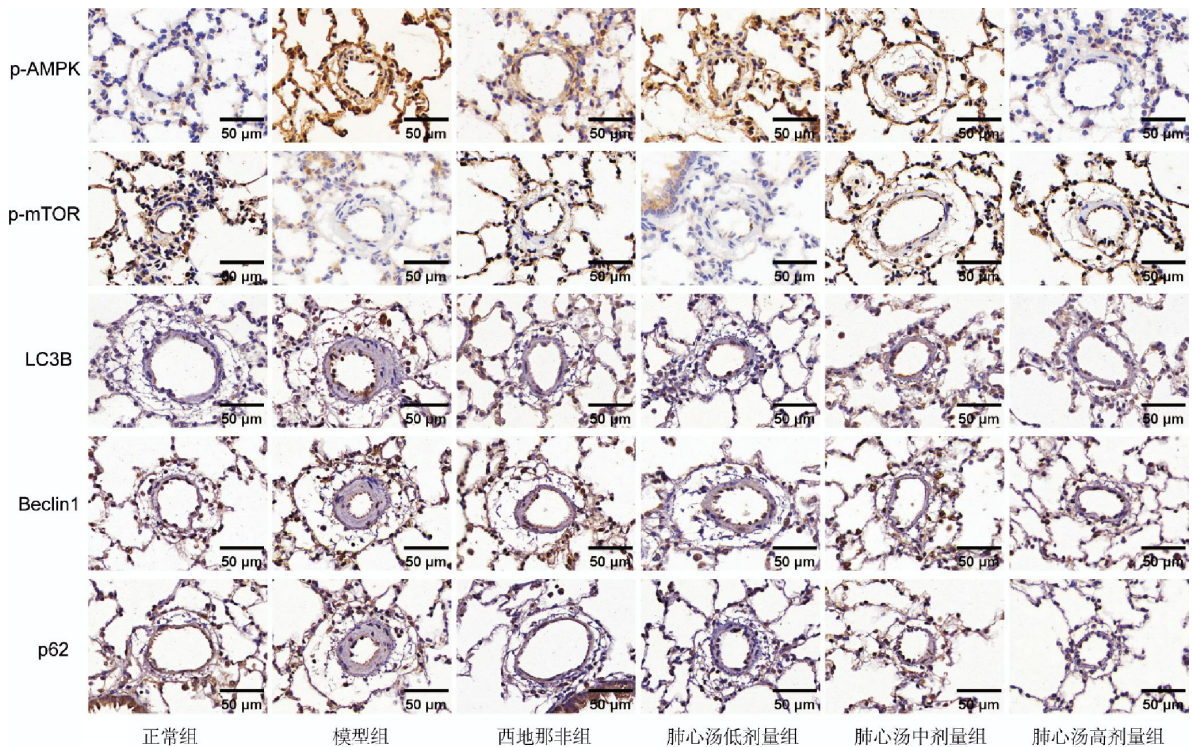


图6 各组 HPH 大鼠肺组织中 p-AMPK、p-mTOR、LC3B、Beclin1、p62 蛋白免疫组织化学图(免疫组织化学, ×200)

表4 肺心汤对 HPH 大鼠肺组织中 p-AMPK、p-mTOR、LC3B、Beclin1、p62 蛋白阳性表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	p-AMPK	p-mTOR	LC3B	Beclin1	p62
正常组	—	0.15±0.02	0.54±0.02	0.20±0.03	0.23±0.03	0.35±0.02
模型组	—	0.67±0.02 <sup>#</sup>	0.13±0.01 <sup>#</sup>	0.32±0.02 <sup>#</sup>	0.38±0.02 <sup>#</sup>	0.19±0.02 <sup>#</sup>
西地那非组	0.025	0.30±0.02 <sup>**</sup>	0.51±0.01 <sup>**</sup>	0.22±0.03 <sup>**</sup>	0.24±0.01 <sup>**</sup>	0.29±0.01 <sup>**</sup>
肺心汤低剂量组	5.85	0.54±0.05 <sup>**△△</sup>	0.31±0.01 <sup>**△△</sup>	0.26±0.03 <sup>*</sup>	0.28±0.02 <sup>**</sup>	0.29±0.01 <sup>**</sup>
肺心汤中剂量组	11.7	0.46±0.03 <sup>**△△§§</sup>	0.51±0.03 <sup>**§§</sup>	0.26±0.02 <sup>*</sup>	0.24±0.02 <sup>**</sup>	0.30±0.02 <sup>**</sup>
肺心汤高剂量组	23.4	0.21±0.03 <sup>**△△§§</sup>	0.53±0.02 <sup>**§§</sup>	0.24±0.02 <sup>**§§</sup>	0.23±0.03 <sup>**</sup>	0.33±0.03 <sup>**</sup>

注:与正常组相比,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与模型组相比,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ;与西地那非组相比,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ ;与肺心汤低剂量组相比,<sup>§</sup> $P<0.01$ ;与肺心汤中剂量组比较,<sup>§§</sup> $P<0.01$ 。

衡、基因突变、原位血栓形成、炎症反应和氧化应激<sup>[12]</sup>。然而,大多数药物都强调对一种细胞、一种细胞因子或一种基因的作用,而没有考虑 PH 的复杂过程<sup>[13]</sup>。在复杂疾病的长期治疗中,中医药其公认的疗效引起了越来越多的关注。麻杏苓葶合剂可通过抑制 Rho-kinase 信号通路,减轻低氧引起的 PH,改善右心室肥厚<sup>[14]</sup>。血府逐瘀汤可通过抑制 mTOR 信号通路和 NF- $\kappa$ B 激活相关机制减轻 HPH 大鼠肺血管重构和右心肥厚<sup>[15]</sup>。葛根芩连汤可通过多个靶点、多个信号通路,关键药效分子和核心靶点稳定结合来治疗 PH<sup>[16]</sup>。HPH 归属于中医学“肺胀”“胸痹”范畴,课题组认为 HPH 多病久体虚,易耗尽主之气,则肺气虚衰,致肺失治节,可致心阳虚衰,无力鼓动血运,血液不循常道成瘀,津液代谢失常则聚饮成痰,血瘀、

痰浊、水饮交错蕴结为患,致肺系经脉受阻,络脉失常,进而凌射心肺发为心肺两虚、痰瘀互结证。故痰浊和血瘀是贯穿病程始终的两个重要病理因素。肺心汤由生黄芪、白参、制附子、葶苈子、茯苓、白术、桃仁、红花、赤芍、车前子、麦冬、知母组成。方中黄芪、白参补元气、益脾肺,共用为君药,入脾经培土而生金,共奏健脾益肺之功。制附子温心阳、补肾阳以扶正;葶苈子泻肺平喘利水;茯苓、白术健脾化湿利水;桃仁、红花、赤芍活血祛瘀,均用以为臣。佐以车前子渗湿利水;麦冬甘寒,养阴生津,润肺止咳,可防温燥利水太过损伤肺阴;知母清热生津润燥,以防制附子温热化燥。诸药合用,共奏补肺化痰祛瘀之效。本实验结果发现,模型组大鼠 RVSP、RVHI、WT%明显升高,表明 HPH 模型复制成功。肺心汤给药治疗后,大



鼠 RVSP、RVHI、WT%明显降低,表明肺心汤对 HPH 大鼠有保护作用。

自噬通过自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解其所包裹的内容物,以实现某些细胞器的更新和细胞本身的代谢需要。自噬作为一种有助于细胞稳态的重要生物学过程,已经被认为是血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)存活的重要介质<sup>[17-18]</sup>。大量研究<sup>[19-21]</sup>发现,PH的发展过程中,抑制自噬可以减轻 PSMC 的增殖,最终改善PH的发展,进一步证实了 PSMC 的自噬在 PH 病理生理进展中具有重要作用。

AMPK/mTOR 信号通路是调控自噬的重要信号通路之一。AMPK 是一种关键能量传感器,是一种由  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  亚基组成的异源三聚体,并且完全激活需要苏氨酸(Thr-172)位点的磷酸化,AMPK $\alpha$ 1 的激活刺激细胞自噬,促进 PSMC 存活<sup>[22]</sup>。mTOR 是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,能受到氨基酸、能量变化、氧化应激、激素等多种因素的调节,是细胞生长、代谢和衰老的重要调控因子<sup>[23]</sup>。PCNA 在细胞核内形成,是 DNA 聚合酶  $\delta$  的辅助蛋白,作为细胞增殖标志物,检测 PCNA 的表达可以反应细胞的增殖状态; $\alpha$ -SMA 是 PSMC 的特异性标志物。本实验通过对 PCNA 和  $\alpha$ -SMA 免疫荧光共定位,结果证实肺心汤可改善 HPH 大鼠 PSMC 异常增殖。LC3B 作为自噬所必需的关键蛋白,可作为自噬的诊断性指标,其表达水平与自噬活性呈正相关<sup>[24]</sup>。p62 作为自噬降解底物,可结合待降解蛋白将其运输至自噬体中,并随蛋白一起降解,当自噬被抑制时,p62 会在细胞质中累积<sup>[25]</sup>,Beclin1 为自噬启动蛋白,也是自噬体形成的关键蛋白,其表达强度与自噬活性呈正相关<sup>[26]</sup>。研究表明,低氧可显著上调大鼠 PSMC 自噬水平,上调 PSMC 中 p-AMPK 和 LCB- II 蛋白表达水平,下调 p-mTOR 和 p62 蛋白表达水平<sup>[27]</sup>。本实验中,HPH 模型大鼠肺组织中 p-AMPK、LC3B 和 Beclin1 蛋白表达水平与正常组比较均明显上调,而 p-mTOR 和 p62 蛋白表达水平下调,表明模型组自噬激活,与研究报道结果相一致。与模型组比较,肺心汤可下调大鼠肺组织中 p-AMPK、LCB 和 Beclin1 蛋白表达水平,上调 p-mTOR 和 p62 蛋白表达水平,提示 AMPK/mTOR 信号通路上调 PSMC 自噬可能是 HPH 发生

发展时肺血管重构的诱因之一,肺心汤可能通过抑制 AMPK/mTOR 信号通路下调 PSMC 自噬,从而抑制 PSMC 增殖,改善 HPH 的发生发展。目前,针对 PH 的药物治疗主要是联合应用靶向治疗血管内皮紊乱的特异性药物<sup>[1,28-29]</sup>。然而,这些疗法不能逆转疾病,并且有一些不良反应。因此,新的药物干预对于 HPH 患者的治疗非常重要。本研究表明,肺心汤可以改善血流动力学参数、肺血管重塑和右心室功能。因此,肺心汤有望成为新一代治疗 HPH 的药物。然而,本研究存在一定的不足,需要体外细胞实验进一步证实其作用机制。

综上所述,肺心汤可能通过调控 AMPK/mTOR 信号通路抑制 PSMC 自噬,从而改善肺血管重塑,延缓 HPH 疾病进程,其更深层次的机制仍有待阐明。

## 参考文献

- [1] LAU E M T, GIANNOULATOU E, CELERMAJER D S, et al. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2017, 14(10): 603-614.
- [2] SIMONNEAU G, MONTANI D, CELERMAJER D S, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension[J]. *The European Respiratory Journal*, 2019, 53(1): 1801913.
- [3] MIZUSHIMA N, KOMATSU M. Autophagy: Renovation of cells and tissues[J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741.
- [4] DALVI P, SHARMA H, CHINNAPPAN M, et al. Enhanced autophagy in pulmonary endothelial cells on exposure to HIV-Tat and morphine: Role in HIV-related pulmonary arterial hypertension[J]. *Autophagy*, 2016, 12(12): 2420-2438.
- [5] 李清月, 嘎 琴, 杨全余, 等. 红景天根水提液通过调节 AMPK-mTOR 信号通路对低氧性肺动脉高压的影响[J/OL]. *中国中西医结合杂志*: 1-6 [2023-09-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2787.r.20230504.0944.004.html>.
- [6] 黄 艳, 戴爱国, 刘 鑫. 肺心汤治疗肺心病急性发作期的临床观察[J]. *南华大学学报(医学版)*, 2006, 34(1): 54-56.
- [7] 贺洪军. 肺心汤对低氧性肺动脉高压大鼠模型 VEGF、HIF-1 $\alpha$  及 PHD1 表达的影响及作用机理的研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2012.
- [8] YAO M Z, GE X Y, LIU T, et al. MEIS1 regulated proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. *Life Sciences*, 2020, 255: 117822.
- [9] RICHTER M J, HSU S, YOGESWARAN A, et al. Right ventricular pressure-volume loop shape and systolic pressure change in pulmonary hypertension[J]. *American Journal of Physiology Lung*

- Cellular and Molecular Physiology, 2021, 320(5): L715-L725.
- [10] 李 佳, 陈婷婷, 杨占婷, 等. 低氧性肺动脉高压雄性大鼠肺组织中的 p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白的表达[J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2023, 44(1): 7-12.
- [11] HUANG L, LI H Y, HUANG S Q, et al. Notopterol attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rat[J]. Frontiers Cardiovascular Medicine, 2022, 9: 859422.
- [12] SOMMER N, GHOFRANI H A, PAK O, et al. Current and future treatments of pulmonary arterial hypertension[J]. British Journal of Pharmacology, 2021, 178(1): 6-30.
- [13] KEARNEY K, KOTLYAR E, LAU E M T. Pulmonary vascular disease as a systemic and multisystem disease[J]. Clinics in Chest Medicine, 2021, 42(1): 167-177.
- [14] AN X, LI S T, WENG X W, et al. Maxingxiongting mixture attenuates hypoxia pulmonary arterial hypertension to improve right ventricular hypertrophy by inhibiting the rho-kinase signaling pathway[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2020, 40(6): 992-998.
- [15] 陈 晔, 李敏静, 郭 莉, 等. 血府逐瘀汤对低氧性肺动脉高压大鼠肺血管重构及 mTOR 信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(12): 6006-6010.
- [16] 李松林, 韩 雪, 李文娣, 等. 葛根芩连汤治疗肺动脉高压的作用机制研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2021, 37(2): 131-138.
- [17] PHADWAL K, FENG D, ZHU D X, et al. Autophagy as a novel therapeutic target in vascular calcification[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2020, 206: 107430.
- [18] HUGHES W E, BEYER A M, GUTTERMAN D D. Vascular autophagy in health and disease[J]. Basic Research in Cardiology, 2020, 115(4): 41.
- [19] WU Y C, WANG W T, LEE S S, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist attenuates autophagy to ameliorate pulmonary arterial hypertension through Drp1/NOX- and atg-5/atg-7/beclin-1/LC3 $\beta$  pathways[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(14): 3435.
- [20] ZHANG H Y, GONG Y S, WANG Z G, et al. Apelin inhibits the proliferation and migration of rat PASMCs via the activation of PI3K/Akt/mTOR signal and the inhibition of autophagy under hypoxia[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2014, 18(3): 542-553.
- [21] YAMANAKA R, HOSHINO A, FUKAI K, et al. TIGAR reduces smooth muscle cell autophagy to prevent pulmonary hypertension[J]. American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology, 2020, 319(5): H1087-H1096.
- [22] CHEN Y B. Autophagy and its role in pulmonary hypertension[J]. Aging Clinical and Experimental Research, 2019, 31(8): 1027-1033.
- [23] SHI Y H, QUAN R F, LI C M, et al. The study of traditional Chinese medical elongated-needle therapy promoting neurological recovery mechanism after spinal cord injury in rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 187: 28-41.
- [24] HWANG H J, HA H, LEE B S, et al. LC3B is an RNA-binding protein to trigger rapid mRNA degradation during autophagy[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 1436.
- [25] ICHIMURA Y, KOMINAMI E, TANAKA K, et al. Selective turnover of p62/A170/SQSTM1 by autophagy[J]. Autophagy, 2008, 4(8): 1063-1066.
- [26] VEGA-RUBIN-DE-CELIS S, KINCH L, PEÑA-LLOPIS S. Regulation of beclin 1-mediated autophagy by oncogenic tyrosine kinases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(23): 9210.
- [27] 宋正阳, 施晓倩, 田云娜, 等. 基于 AMPK/mTOR 信号通路的细胞自噬对大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(8): 1416-1423.
- [28] HASSOUN P M. Pulmonary arterial hypertension[J]. The New England Journal of Medicine, 2021, 385(25): 2361-2376.
- [29] RUOPP N F, COCKRILL B A. Diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension: A review[J]. JAMA, 2022, 327(14): 1379-1391.

(本文编辑 苏 维)