

基于解表扩络法探讨小青龙汤对肺动脉高压中内皮-间质转化影响的机制

张金波¹ 张雯鑫² 范冰冰³ 杨志勇³ 田正坤³ 王淳禾³

¹ 烟台市中医医院治未病中心, 山东烟台 264001; ² 烟台文化旅游职业学院, 山东烟台 264003; ³ 山东中医药大学第一临床医学院, 山东济南 250014

通信作者: 张金波, Email: zhangjinbo126@126.com

【摘要】 目的 分析小青龙汤在缓解肺动脉高压(PAH)病理进程中的作用及其机制, 观察小青龙汤对人肺动脉内皮细胞(HPAEC)内皮-间质转化(EMT)的影响并探讨 Toll 样受体/核转录因子- κ B/低氧诱导因子-1 α (TLR/NF- κ B/HIF-1 α) 通路在其中的作用机制。**方法** 选择 36 只雄性 SD 大鼠和 HPAEC 按随机数字表法分为对照组、模型组、小青龙汤加地龙组、波生坦片组、二甲亚砜(DMSO)组和单磷酸脂质 A(MPL)组。通过缺氧诱导 PAH 大鼠模型及肺动脉上皮细胞模型。小青龙汤加地龙组给予小青龙汤加地龙($5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)灌胃或含 10% 相应药物血清培养, 波生坦片组给予波生坦($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)灌胃或含 10% 相应药物血清培养, MPL 组给予 MPL, DMSO 组则给予等量的 DMSO 和玉米油混合溶剂作为 MPL 组的阴性对照。通过右心导管测量血流动力学参数平均肺动脉压(mPAP)、右心室收缩压(RVSP)和右心室内压最大上升速率(+dp/dt max)。处死大鼠后, 收集肺和心脏组织, 评估右心室肥厚指数(RVHI); 采用苏木素-伊红(HE)染色观察右心室心肌细胞肥大程度, 并计算肺动脉小管平均中层厚度(IMT); 采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测增殖细胞核抗原(PCNA)、CD68、TLR4、NF- κ B、HIF-1 α 、血管内皮钙黏蛋白和波形蛋白的蛋白表达水平; 采用细胞增殖与毒性检测试剂盒 8(CCK-8)、Transwell 和划痕实验观察细胞增殖与迁移情况; 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测白细胞介素(IL-8、IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、内皮素-1(ET-1)和一氧化氮(NO)的含量。**结果** 与模型组比较, 小青龙汤加地龙组 PAH 大鼠的 mPAP、RVSP、RVHI 和 IMT 均显著降低[mPAP (mmHg, $1\text{ mmHg}\approx 0.133\text{ kPa}$): 22.17 ± 1.94 比 42.00 ± 4.90 , RVSP (mmHg): 34.67 ± 3.20 比 52.83 ± 3.76 , RVHI: 0.402 ± 0.057 比 0.822 ± 0.101 , IMT: (37.85 ± 2.49)% 比 (62.06 ± 4.52)%, 均 $P<0.05$], +dp/dt max 明显升高 (mmHg/s: $2\ 730.83\pm 137.89$ 比 $1\ 718.33\pm 148.36$, $P<0.05$)。Western blotting 和 ELISA 结果显示, 与模型组比较, 小青龙汤加地龙组大鼠肺组织 PCNA、CD68 蛋白表达及大鼠血清中 IL-6、IL-8、TNF- α 等炎症因子水平均明显降低[肺组织: PCNA 蛋白表达(PCNA/GAPDH)为 1.56 ± 0.08 比 2.20 ± 0.26 , CD68 蛋白表达(CD68/GAPDH)为 1.46 ± 0.09 比 2.60 ± 0.23 ; 血清: IL-8 (ng/L)为 39.67 ± 6.28 比 149.17 ± 7.49 , IL-6 (ng/L)为 81.00 ± 6.63 比 211.00 ± 25.31 , TNF- α (ng/L)为 213.17 ± 24.86 比 799.50 ± 43.51 , 均 $P<0.05$]。体外实验中, 与模型组比较, 小青龙汤加地龙可抑制肺动脉内皮细胞的异常增殖(48 h A 值: 2.052 ± 0.087 比 2.242 ± 0.057 , $P<0.05$)和迁移[穿膜细胞数(个/视野): 101.33 ± 12.01 比 226.67 ± 17.56 , $P<0.05$], 逆转 EMT 过程, 表现为上调血管内皮钙黏蛋白的蛋白表达水平(血管内皮钙黏蛋白/GAPDH: 0.39 ± 0.06 比 0.12 ± 0.03 , $P<0.05$), 下调波形蛋白的蛋白表达(波形蛋白/GAPDH: 4.96 ± 0.33 比 7.89 ± 0.44 , $P<0.05$)。Western blotting 结果表明, 与模型组比较, 小青龙汤加地龙组大鼠肺组织和 HPAEC 中 TLR4、p-p65/p65 比值和 HIF-1 α 的蛋白表达水平均显著降低[肺组织: TLR4 蛋白表达(TLR4/GAPDH)为 3.13 ± 0.20 比 4.38 ± 0.30 , p-p65/p65 比值为 7.11 ± 0.81 比 12.73 ± 1.80 , HIF-1 α 蛋白表达(HIF-1 α /GAPDH)为 2.37 ± 0.32 比 4.45 ± 0.34 ; HPAEC: TLR4 蛋白表达(TLR4/GAPDH)为 1.42 ± 0.03 比 2.43 ± 0.05 , p-p65/p65 比值为 6.01 ± 1.84 比 11.28 ± 1.06 ; HIF-1 α 蛋白表达(HIF-1 α /GAPDH)为 3.24 ± 0.17 比 5.50 ± 0.44 , 均 $P<0.05$], 同时血管内皮钙黏蛋白表达水平明显上调(血管内皮钙黏蛋白/GAPDH: 0.66 ± 0.03 比 0.49 ± 0.03 , $P<0.05$), 波形蛋白表达水平明显下调(波形蛋白/GAPDH: 1.81 ± 0.12 比 2.47 ± 0.10 , $P<0.05$), 表明小青龙汤加地龙通过抑制 TLR/NF- κ B/HIF-1 α 通路的激活, 进而抑制了内皮细胞的 EMT 过程。TLR 激动剂的实验进一步证实, TLR 通路的激活可逆转小青龙汤加地龙的保护作用, 表现为与 DMSO 组比较, MLP 组 p-p65/p65 比值和 HIF-1 α 的蛋白表达水平显著升高[p-p65/p65 比值: 2.17 ± 0.35 比 1.08 ± 0.14 , HIF-1 α /GAPDH: 3.96 ± 0.25 比 1.03 ± 0.10 , 均 $P<0.05$], 同时血管内皮钙黏蛋白的蛋白表达水平进一步降低(血管内皮钙黏蛋白/GAPDH: 0.66 ± 0.04 比 0.99 ± 0.02 , $P<0.05$), 波形蛋白的蛋白表达水平进一步升高(波形蛋白/GAPDH: 1.53 ± 0.12 比 0.93 ± 0.07 , $P<0.05$), 并伴随细胞迁移能力的增强[穿膜细胞数(个/视野): 176.67 ± 17.50 比 107.00 ± 11.14 ; 细胞迁移率: (34.32 ± 2.82)% 比 (22.71 ± 2.49)%, 均 $P<0.05$]和增殖活性升高(48 h A 值: 2.156 ± 0.044 比 1.810 ± 0.088 , $P<0.05$)。**结论** 小青龙汤加地龙不仅能显著降低 PAH 大鼠的肺动脉压力, 改善心功能和肺血管纤维化, 还能通过抑制炎症反应和 EMT 减轻肺血管重塑, 并且能降低 ET-1 含量, 升高 NO 水平, 改善动脉狭窄。这一结果进一步表明了解表药对狭窄的经脉络道有显著扩阔的支架作用。

【关键词】 小青龙汤; 肺动脉高压; 解表扩络, 解表药; 经脉络道支架

基金项目：国家中医药管理局科技司共建科技项目（GZY-KJS-SD-2023-015）

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2025.04.009

Exploring the mechanism of Xiaoqinglong decoction on endothelial-mesenchymal transition in pulmonary arterial hypertension based on the principle of resolving the exterior and expanding the collaterals' principle

Zhang Jinbo¹, Zhang Wenxin², Fan Bingbing³, Yang Zhiyong³, Tian Zhengkun³, Wang Chunhe³

¹Center for Preventive Treatment of Disease, Yantai Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yantai 264001, Shandong, China; ²Yantai Vocational College of Culture and Tourism, Yantai 264003, Shandong, China; ³The First Clinical Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong, China

Corresponding author: Zhang Jinbo, Email: zhangjinbo126@126.com

[Abstract] Objective To analyze the role and mechanism of Xiaoqinglong decoction in alleviating the pathological process of pulmonary arterial hypertension (PAH), and to observe the effect of Xiaoqinglong decoction on endothelial-mesenchymal transition (EMT) in human pulmonary arterial endothelial cell (HPAEC) and the involvement of the Toll-like receptor/nuclear factor- κ B/hypoxia-inducible factor-1 α (TLR/NF- κ B/HIF-1 α) pathway in this mechanism. **Methods** Thirty-six male Sprague Dawley (SD) rats and HPAEC were randomly divided into control group, model group, Xiaoqinglong decoction plus Earthworm group, Bosentan tablet group, dimethyl sulfoxide (DMSO) group, and monophosphoryl lipid A (MPL) group. PAH rat models and HPAEC models were established by hypoxic exposure. The Xiaoqinglong decoction plus Earthworm group received intragastric administration Xiaoqinglong decoction plus Earthworm (5 g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹) or cultured with 10% corresponding drug serum, the Bosentan group received Bosentan (100 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹) by gavage or cultured with 10% corresponding drug serum, the MPL group received 1 μ g MPL, and the DMSO group received an equivalent volume of the DMSO and corn oil mixed solvent as a negative control for the MPL group. The hemodynamic parameters, including mean pulmonary arterial pressure (mPAP), right ventricular systolic pressure (RVSP), and the maximum rate of right ventricular pressure (+dp/dt max), were measured via right heart catheterization. After euthanasia, lung and heart tissues were collected to assess the right ventricular hypertrophy index (RVHI); hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the degree of right ventricular cardiomyocyte hypertrophy and to calculate the average intima-media thickness (IMT) in small pulmonary arteries; Western blotting was used to detect the protein expression levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), CD68, TLR4, NF- κ B, HIF-1 α , vascular endothelial cadherin, and vimentin; cell counting kit-8 (CCK-8), Transwell, and scratch assays were used to observe cell proliferation and migration; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the levels of interleukins (IL-8, IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), endothelin-1 (ET-1), and nitric oxide (NO). **Results** Compared with the model group, the Xiaoqinglong decoction plus Earthworm group showed significant reductions in mPAP, RVSP, RVHI, and IMT in PAH rats [mPAP (mmHg, 1 mmHg \approx 0.133 kPa): 22.17 \pm 1.94 vs. 42.00 \pm 4.90, RVSP (mmHg): 34.67 \pm 3.20 vs. 52.83 \pm 3.76, RVHI: 0.402 \pm 0.057 vs. 0.822 \pm 0.101, IMT: (37.85 \pm 2.49)% vs. (62.06 \pm 4.52)%, all P < 0.05], and a significant increase in +dp/dt max (mmHg/s: 2 730.83 \pm 137.89 vs. 1 718.33 \pm 148.36, P < 0.05). Western blotting and ELISA results showed that compared with the model group, the Xiaoqinglong decoction plus Earthworm group had significantly lower protein expression of PCNA and CD68 in lung tissue, and levels of inflammatory factors (IL-6, IL-8, TNF- α) in rat serum [lung tissue: PCNA protein expression (PCNA/GAPDH) was 1.56 \pm 0.08 vs. 2.20 \pm 0.26, CD68 protein expression (CD68/GAPDH): 1.46 \pm 0.09 vs. 2.60 \pm 0.23; serum: IL-8 (ng/L) was 39.67 \pm 6.28 vs. 149.17 \pm 7.49, IL-6 (ng/L): 81.00 \pm 6.63 vs. 211.00 \pm 25.31, TNF- α (ng/L): 213.17 \pm 24.86 vs. 799.50 \pm 43.51, all P < 0.05]. *In vitro* experiments, compared with the model group, Xiaoqinglong decoction plus Earthworm inhibited abnormal proliferation (A value: 2.052 \pm 0.087 vs. 2.242 \pm 0.057, P < 0.05) and migration [number of migrating cells (per field): 101.33 \pm 12.01 vs. 226.67 \pm 17.56, P < 0.05] of HPAEC, and reversed the EMT process, manifested as upregulation of vascular endothelial cadherin protein expression levels (vascular endothelial cadherin/GAPDH: 0.39 \pm 0.06 vs. 0.12 \pm 0.03, P < 0.05) and downregulation of vimentin protein expression (vimentin/GAPDH: 4.96 \pm 0.33 vs. 7.89 \pm 0.44, P < 0.05). Western blotting results indicated that compared with the model group, the protein expression levels of TLR4, the ratio of phosphorylated p65 to total p65, and HIF-1 α in both lung tissue and HPAEC were significantly reduced in the Xiaoqinglong decoction plus Earthworm group [lung tissue: TLR4 protein expression (TLR4/GAPDH) was 3.13 \pm 0.20 vs. 4.38 \pm 0.30, p-p65/p65 ratio: 7.11 \pm 0.81 vs. 12.73 \pm 1.80, HIF-1 α protein expression (HIF-1 α /GAPDH): 2.37 \pm 0.32 vs. 4.45 \pm 0.34; HPAEC: TLR4 protein expression (TLR4/GAPDH) was 1.42 \pm 0.03 vs. 2.43 \pm 0.05, p-p65/p65 ratio: 6.01 \pm 1.84 vs. 11.28 \pm 1.06, HIF-1 α protein expression (HIF-1 α /GAPDH) was 3.24 \pm 0.17 vs. 5.50 \pm 0.44, all P < 0.05], accompanied by upregulated vascular endothelial cadherin protein expression (vascular endothelial cadherin/GAPDH: 0.66 \pm 0.03 vs. 0.49 \pm 0.03, P < 0.05) and downregulated vimentin protein expression (vimentin/GAPDH: 1.81 \pm 0.12 vs. 2.47 \pm 0.10, P < 0.05), indicating that Xiaoqinglong decoction plus Earthworm inhibits the EMT process in endothelial cells by suppressing the activation of the TLR/NF- κ B/HIF-1 α pathway. Experiments with a TLR agonist further confirmed that activation of the TLR pathway reverses the protective effects of Xiaoqinglong decoction plus Earthworm, as shown by the MPL group compared to the DMSO group having significantly increased protein expression of the p-p65/p65 ratio and HIF-1 α [p-p65/p65 ratio: 2.17 \pm 0.35 vs. 1.08 \pm 0.14, HIF-1 α /GAPDH: 3.96 \pm 0.25 vs. 1.03 \pm 0.10, both P < 0.05], further decreased vascular endothelial cadherin protein expression (vascular endothelial cadherin/GAPDH: 0.66 \pm 0.04 vs. 0.99 \pm 0.02, P < 0.05), further increased vimentin protein expression (vimentin/GAPDH: 1.53 \pm 0.12 vs. 0.93 \pm 0.07, P < 0.05), along with enhanced cell migration capacity [number of migrating cells (per field): 176.67 \pm 17.50 vs. 107.00 \pm 11.14; cell migration rate

in scratch assay: $(34.32 \pm 2.82)\%$ vs. $(22.71 \pm 2.49)\%$, both $P < 0.05$] and increased proliferation activity (48 hours A value: 2.156 ± 0.044 vs. 1.810 ± 0.088 , $P < 0.05$). **Conclusions** Xiaqinglong decoction combined with Pheretima not only significantly reduces pulmonary artery pressure, improves cardiac function and mitigates pulmonary vascular fibrosis in PAH rats, but also alleviates pulmonary vascular remodeling by inhibiting inflammatory responses and EMT. It can further decrease the content of ET-1, increase the level of NO, and ameliorate vascular stenosis. This result further indicates that exterior-relieving medicines exert a significant dilating and supporting effect on the narrowed meridians and collaterals.

[Key words] Xiaqinglong decoction; Pulmonary arterial hypertension; Exterior-relieving and collateral-dilating; Exterior-relieving medicines; Meridian and collateral stent

Fund program: Co-Construction Science and Technology Project of the State Administration of Traditional Chinese Medicine (GZY-KIS-SD-2023-015)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2025.04.009

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是一种复杂且进展迅速的致命性疾病,其特征为肺动脉压力持续升高,最终导致右心室肥大、心力衰竭和死亡^[1-2]。PAH的发病机制涉及肺血管重塑、内皮细胞功能障碍、血管平滑肌细胞增殖、炎症反应以及促血管收缩因子与血管舒张因子之间的不平衡^[3-5]。肺血管重塑是PAH的主要病理特征之一,并伴随血管壁增厚、内皮细胞的异常增殖和迁移、外膜纤维化等改变^[6-7]。尽管目前已有包括内皮素受体拮抗剂、磷酸二酯酶-5抑制剂及前列环素类似物等药物用于PAH的治疗,但这些药物仅能延缓疾病进展,无法根治^[8-9]。因此,迫切需要进一步探讨PAH的发病机制及潜在的治疗靶点,开发更加有效的治疗策略。近年来,内皮-间质转化(endothelial-mesenchymal transition, EMT)在PAH中的作用逐渐受到关注^[10]。EMT是内皮细胞丧失其表型特征,逐渐转化为具有成纤维细胞或平滑肌细胞特征的一种过程^[11]。EMT被认为是血管重塑和纤维化的重要驱动力之一,能加速PAH的进展^[12]。研究表明,EMT不仅直接参与血管壁的增厚和纤维化,还通过加重局部炎症反应促进疾病的恶化^[13]。因此,抑制EMT可能成为阻止PAH进展的重要途径。

中医药以其多靶点、多层次的治疗优势,在应对复杂疾病方面展现了巨大的潜力^[14]。现代药理学研究显示,小青龙汤作为一种解表扩络类中药复方有显著的抗炎、抗纤维化及调节免疫功能的作用,被广泛用于治疗呼吸系统疾病^[15-16]。小青龙汤属于经典配方,由麻黄、桂枝、芍药、细辛、干姜等多种中药组成,有宣发经脉络道腠理之表,舒解血管痉挛,扩张经脉络道腠理的功效^[17]。而地龙作为一种传统中药材,因其具有促进血液循环、改善微循环及抗凝血方面的作用,在许多血管疾病的治疗中得到广泛应用^[18]。然而,目前关于小青龙汤联合地

龙在PAH治疗中的研究仍较为有限,特别是在抑制EMT方面的研究鲜有报告。本研究旨在观察小青龙汤加地龙对PAH大鼠模型病理进程的影响,并分析其抑制EMT的潜在机制,为PAH的中药治疗提供理论依据,并为基于解表扩络法中药复方在血管疾病中的应用拓宽思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及处理:选择36只8周龄雄性SD大鼠(体质量290~340 g)购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(湘)2024-0009。实验开始前,大鼠在适宜环境(温度18~26℃,相对湿度40%~70%,12 h昼夜交替,自由饮水进食)中适应7 d。将大鼠按随机数字表法分为正常对照组、模型组、小青龙汤加地龙组、波生坦片组、二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)组、单磷酸脂质A(monophosphoryl lipid A, MPL)组,每组6只。正常对照组大鼠不进行任何处理;模型组于第1天、第14天经气管内注入脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)每次200 μL,第2~30天(第14天除外)置于烟熏箱内每天进行2次烟熏,期间间隔4 h,每次14支香烟,烟熏30 min构建PAH大鼠模型;小青龙汤加地龙组每日给予小青龙汤加地龙(组成:麻黄6 g、桂枝15 g、干姜6 g、赤芍15 g、细辛3 g、半夏9 g、五味子6 g、甘草6 g、地龙15 g,再按物料比1:12的比例加水煎煮,将提取液浓缩至200 mL,终浓度为365 g/L的水提液以 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃,持续30 d;波生坦片组大鼠每日以 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 波生坦灌胃,持续30 d^[19];MPL组在小青龙汤加地龙给药基础上于制模前24 h腹腔注射 $1 \mu\text{g}$ MPL^[20],DMSO组在小青龙汤加地龙给药基础上给予等量的DMSO和玉米油作为MPL组的阴性对照。所有大鼠在相同的适宜环境中饲养。于第30天最后一次给药1 h后测量各组大鼠的血流动力学参数,

然后腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (150 mg/kg) 处死大鼠取心脏,使用精密电子天平称量大鼠右心室、左心室和室间隔质量,并计算右心室肥厚指数 (right ventricular hypertrophy index, RVHI) = 右心室质量 / (左心室质量 + 室间隔质量)。

1.2 伦理学: 本研究严格遵循 3 R 原则,对动物的处置方法符合动物伦理学标准,并获得烟台市中医医院动物委员会的批准 (审批号: 2022-KY-033)。

1.3 含药血清制备: 选择 30 只 SD 大鼠按随机数字表法分为对照组、小青龙汤加地龙组、波生坦片组,每组 10 只。小青龙汤加地龙组将小青龙汤加地龙煎煮至浓度为 365 g/L 以每次 5 g/kg 灌胃,波生坦片组用波生坦片灌胃 (每次 100 mg/kg),对照组给予等量生理盐水灌胃。每日定时 (08:00、16:00) 操作,连续 5 d,于第 5 天最后一次灌胃 1 h 后取大鼠含药血清备用^[21]。

1.4 细胞分组及处理: 人肺动脉内皮细胞 (human pulmonary artery endothelial cell, HPAEC) 购于德国 Cytion 公司,在含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS), 100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37 ℃、5% 二氧化碳的恒温培养箱中培养。将细胞按随机原则分为空白对照组、模型组、小青龙汤加地龙组、波生坦片组、DMSO 组和 MPL 组。除空白对照组于常氧条件下培养外,其余各组均在缺氧条件下 (2% 氧气和 5% 二氧化碳) 培养 24 h 复制 PAH 模型^[22]。小青龙汤加地龙组与波生坦片组于制模同时,分别更换为含 10% 相应药物血清的培养基继续于缺氧条件下培养。MPL 组在小青龙汤含药血清干预的基础上,加入 10 mg/L MPL 共同培养 18 h^[23]; DMSO 组则加入等体积 DMSO 作为溶剂对照。所有含药血清干预组的培养基均维持含有 100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素,并每 24 h 更换一次新鲜培养基。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 血流动力学参数测定: 麻醉大鼠,气管插管后连接肺动脉压力测量仪,将 BL-420F 生物机能系统一通道连接的软管推入肝素后插入右心室,观察波形并标注;找到肺动脉后插入二通道连接的 7 号弯针头并固定,观察波形并标注,保存数据。用 PowerLab 数据采集系统记录各组大鼠平均肺动脉压 (mean pulmonary artery pressure, mPAP)、右心室收缩压 (right ventricle systolic pressure, RVSP) 和右心室内压最大上升速率 (maximum rate of rising of

right ventricular pressure, +dp/dt max) 等指标。

1.5.2 苏木素 - 伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色 评估右心室心肌细胞肥大程度和肺动脉血管重塑: 用 10% 中性甲醛水溶液固定大鼠心脏或肺组织,通过梯度乙醇脱水后,再用二甲苯透明后包埋在石蜡中,进行切片 (厚度 4 μm)。将大鼠心脏或肺组织的石蜡切片经二甲苯脱蜡并用梯度乙醇脱水。根据试剂盒进行染色,然后在二甲苯中透明和梯度乙醇中依次脱水,最后用中性树脂封片。对心肌组织切片在光镜下观察并采集图像,用于评估右心室心肌细胞的肥大程度;在肺组织切片中,于光镜下观察并拍摄肺动脉小管。通过图像分析软件测量血管外径与内径,并计算肺动脉小管平均中层厚度 (intima-media thickness, IMT),计算公式为: $IMT = (\text{外径} - \text{内径}) / \text{外径} \times 100\%$ 。

1.5.3 采用细胞增殖与毒性检测试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 测定细胞增殖情况: 将各组 HPAEC 以 1×10^4 / 孔接种于 96 孔板中,在 37 ℃、5% 二氧化碳的恒温培养箱中培养,分别于 0、12、24、48 h 加入 10 μL CCK-8 试剂,孵育 2 h 后用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度 (absorbance, A) 值以评估细胞的增殖情况。

1.5.4 细胞迁移能力检测: ① 划痕实验: HPAEC 以 5×10^5 / 孔接种在 6 孔板,培养至 100% 汇合,然后吸出培养基,用 10 μL 的移液枪枪头刮擦细胞,然后加入各组培养基孵育 24 h。于处理前和处理后 24 h 用光学显微镜观察并拍摄划痕,使用 Image J 软件分析细胞迁移距离。② Transwell 试验: 将各组 HPAEC 用无血清培养基重悬并接种在转孔室中,下腔室中含有 10% FBS 的培养基,处理 24 h 后用棉签除去残留在插入物上腔的未迁移细胞,用 4% 多聚甲醛固定粘附在膜下侧的细胞并用结晶紫染色,于光镜下观察细胞迁移情况。

1.5.5 各组细胞培养上清液和大鼠血清中白细胞介素 (interleukins, IL-8、IL-6)、肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、内皮素 -1 (endothelin-1, ET-1) 和一氧化氮 (nitric oxide, NO) 含量测定: 收集细胞培养上清液和大鼠血清,用酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测各组 IL-8、IL-6、TNF-α、ET-1 和 NO 含量。操作严格按试剂说明书进行。

1.5.6 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 测定相关蛋白表达: 采用放射免疫沉淀法裂解

缓冲液(radio immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA)获取细胞和大鼠肺动脉组织匀浆总蛋白裂解物,并用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白质定量试剂盒测定蛋白质浓度。将等量蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离后,转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭,并与抗 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)、核转录因子- κ B p65(nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65)、磷酸化 p65(phosphorylated p65, p-p65)、低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)、血管内皮钙黏蛋白、波形蛋白、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、CD68 及 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的一抗在 4℃ 环境下孵育过夜,接着与辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)耦联的二抗在室温下孵育 2 h,用电化学发光(electrochemiluminescent immunoassay, ECL)法显影,采用 Image J 软件分析条带灰度值,以 GAPDH 为内参照进行定量分析。

1.6 统计学分析:使用 Prism 9 软件进行统计分析,符合正态分布的计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验。3 组及以上数据采用单因素或双因素方差分析,使用 Tukey's 进行事后检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小青龙汤加地龙能有效缓解 PAH 模型大鼠的病理进程:与正常对照组比较,模型组大鼠 mPAP 和 RVSP 明显升高, +dp/dt max 明显降低。采用小青龙汤加地龙处理后显著降低了模型组 mPAP 和

PVSP 水平,并升高了 +dp/dt max,明显抑制了模型组大鼠 RVHI 的升高(表 1)。HE 染色结果显示,模型组大鼠出现明显的右心室心肌细胞肥大和肺动脉血管重塑,表现为平均 IMT 显著增加,小青龙汤加地龙治疗能有效缓解心肌细胞肥大,降低 IMT 水平(图 1;表 1)。Western blotting 检测结果显示,模型组肺组织中 PCNA 的蛋白表达水平明显上调,而小青龙汤加地龙能明显抑制 PCNA 的蛋白表达水平(图 2)。此外,模型组肺组织中 CD68 表达及血清炎症因子 IL-8、IL-6 和 TNF- α 水平均明显升高,小青龙汤加地龙能降低上述指标水平(表 2)。模型组肺组织中表现出血管内皮钙黏蛋白表达下调,而波形蛋白表达上调的特征性变化,小青龙汤加地龙治疗则有效逆转了这一趋势(图 2;表 2)。综上所述,小青龙汤加地龙能有效缓解 PAH 大鼠的病理进程,这可能与减少内皮细胞的 EMT 有关。此外,小青龙汤加地龙组与波生坦片组间比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),进一步证明了这一猜想。

表 1 各组大鼠血流动力学、右心室肥厚及血管重塑指标的比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	动物数(只)	mPAP(mmHg)	RVSP(mmHg)	+dp/dt max(mmHg/s)
正常对照组	6	15.67 \pm 2.66	25.00 \pm 2.90	3 635.50 \pm 270.41
模型组	6	42.00 \pm 4.90 ^a	52.83 \pm 3.76 ^a	1 718.33 \pm 148.36 ^a
小青龙汤加地龙组	6	22.17 \pm 1.94 ^b	34.67 \pm 3.20 ^b	2 730.83 \pm 137.89 ^b
波生坦片组	6	22.17 \pm 2.14 ^b	35.00 \pm 3.35 ^b	2 675.50 \pm 78.13 ^b

组别	动物数(只)	RVHI	IMT(%)
正常对照组	6	0.255 \pm 0.027	28.74 \pm 2.94
模型组	6	0.822 \pm 0.101 ^a	62.06 \pm 4.52 ^a
小青龙汤加地龙组	6	0.402 \pm 0.057 ^b	37.85 \pm 2.49 ^b
波生坦片组	6	0.402 \pm 0.064 ^b	38.98 \pm 2.21 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;1 mmHg \approx 0.133 kPa

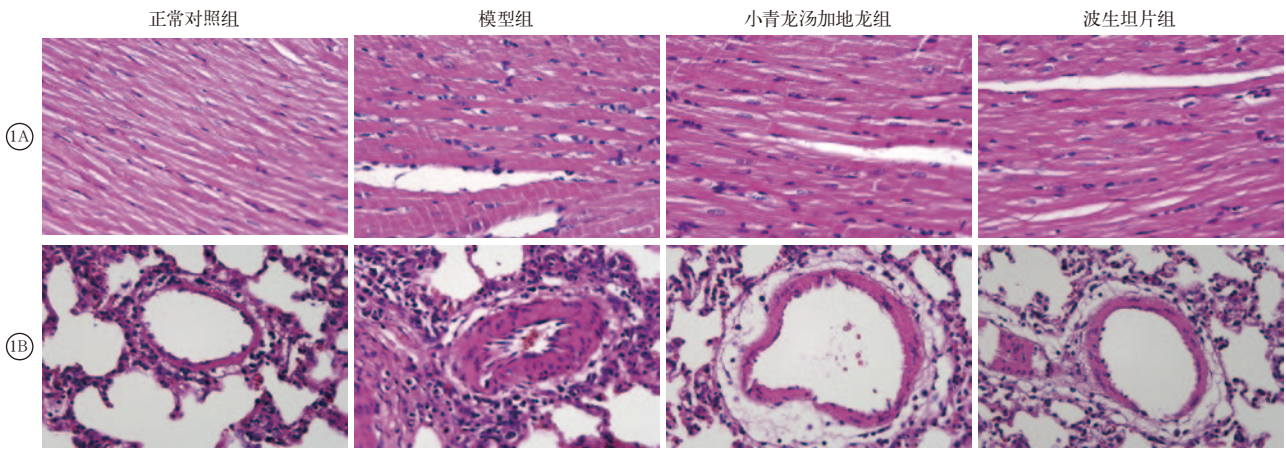


图 1 光镜下观察各组大鼠右心室心肌细胞的肥大程度(A)和肺动脉小管 IMT 增加程度(B) HE 染色 高倍放大

2.2 小青龙汤加地龙能有效改善 HPAEC 的 EMT: 与空白对照组比较,模型组细胞异常增殖,提示模型复制成功,小青龙汤加地龙给药后,模型组细胞的异常增殖被显著抑制(表 3)。此外,划痕实验和 Transwell 结果显示,与空白对照组比较,模型组细胞表现出较高的迁移性,而小青龙汤加地龙处理显著抑制了模型 HPAEC 的迁移(图 3;表 3)。ELISA 结果显示,与模型组比较,小青龙汤加地龙降低了模型组细胞中炎症因子和 ET-1,升高了 NO 水平(表 4)。Western blotting 检测结果显示,与空白对照组比较,模型组细胞中血管内皮钙黏蛋白的蛋白表达水平显著减少,而波形蛋白的蛋白表达水平显著增加,给予小青龙汤加地龙后,模型组细胞中血管内皮钙黏蛋白的蛋白表达水平明显升高,而波形蛋白的蛋白表达水平明显降低(图 4;表 4)。综上所述,小青龙汤加地龙能有效改善 HPAEC 的 EMT。此外,小青龙汤加

地龙组与作为阳性对照的波生坦片组间比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$),进一步证实了这一结论。

2.3 小青龙汤加地龙可抑制 TLR/NF- κ B/HIF-1 α 通路的激活: 在 PAH 的体内和体外模型中,TLR4、p-p65/p65 比值和 HIF-1 α 的蛋白表达水平均显著升高。给予小青龙汤加地龙后,PAH 的体内和体外模型中 TLR4、p-p65/p65 比值和 HIF-1 α 蛋白表达水平均显著降低(表 5~6;图 5)。综上所述,小青龙汤加地龙能有效抑制 TLR/NF- κ B/HIF-1 α 通路的激活。

2.4 小青龙汤加地龙通过抑制 TLR/NF- κ B/HIF-1 α 通路的激活改善 HPAEC 的 EMT: Western blotting 结果显示,与 DMSO 组比较,MLP 组 p-p65/p65 比值和 HIF-1 α 的蛋白表达水平均显著增加(图 6;表 7);CCK-8 显示,与 DMSO 组比较,MLP 组细胞再次出现异常增殖(表 7)。ELISA 结果显示,激活 TLR 进一步增加了小青龙汤加地龙处理后 HPAEC

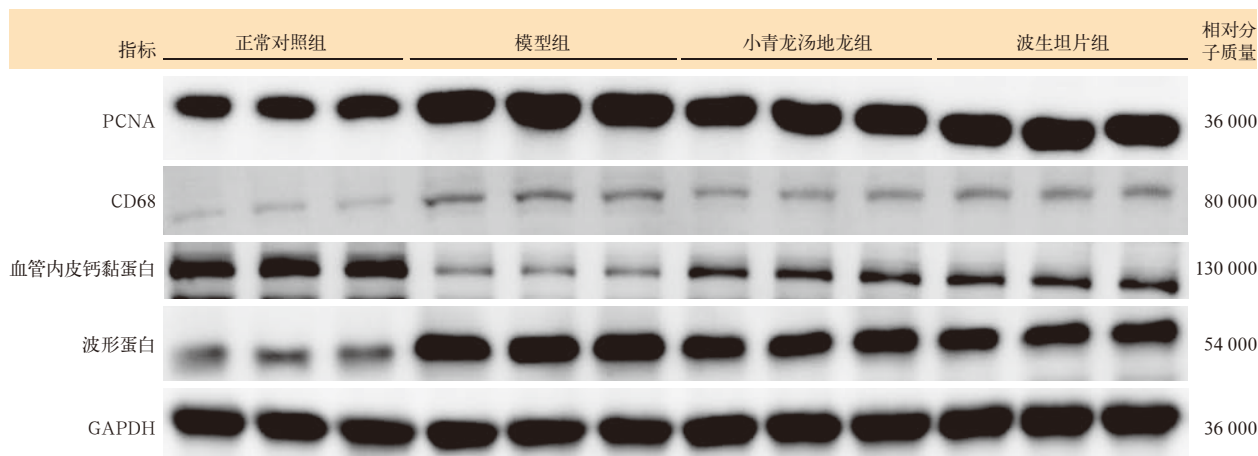


图 2 Western blotting 检测各组大鼠肺组织中 PCNA、CD68、血管内皮钙黏蛋白和波形蛋白的蛋白表达水平

表 2 各组大鼠血清炎症因子、肺组织和 HPAEC 中的蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	血清			肺组织		HPAEC	
		IL-8 (ng/L)	IL-6 (ng/L)	TNF- α (ng/L)	PCNA 蛋白表达 (PCNA/GAPDH)	CD68 蛋白表达 (CD68/GAPDH)	血管内皮钙黏蛋白蛋白表达 (血管内皮钙黏蛋白/GAPDH)	波形蛋白的蛋白表达 (波形蛋白/GAPDH)
正常对照组	6	18.17 \pm 3.43	31.00 \pm 4.15	41.00 \pm 4.60	1.01 \pm 0.11	0.98 \pm 0.14	0.99 \pm 0.09	1.01 \pm 0.10
模型组	6	149.17 \pm 7.49 ^a	211.00 \pm 25.31 ^a	799.50 \pm 43.51 ^a	2.20 \pm 0.26 ^a	2.60 \pm 0.23 ^a	0.12 \pm 0.03 ^a	7.89 \pm 0.44 ^a
小青龙汤加地龙组	6	39.67 \pm 6.28 ^b	81.00 \pm 6.63 ^b	213.17 \pm 24.86 ^b	1.56 \pm 0.08 ^b	1.46 \pm 0.09 ^b	0.39 \pm 0.06 ^b	4.96 \pm 0.33 ^b
波生坦片组	6	40.33 \pm 4.72 ^b	79.33 \pm 4.84 ^b	206.00 \pm 20.55 ^b	1.65 \pm 0.08 ^b	1.44 \pm 0.11 ^b	0.41 \pm 0.05 ^b	4.84 \pm 0.52 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$

表 3 小青龙汤加地龙对 HPAEC 增殖、迁移的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	细胞增殖(A 值)				细胞迁移率 (%)	穿膜细胞数 (个/视野)
		制模前	制模后 12 h	制模后 24 h	制模后 48 h		
空白对照组	9	0.388 \pm 0.005	1.285 \pm 0.015	1.581 \pm 0.038	1.772 \pm 0.031	6.09 \pm 2.17	47.33 \pm 5.03
模型组	9	0.381 \pm 0.005	1.550 \pm 0.039 ^a	1.850 \pm 0.047 ^a	2.242 \pm 0.057 ^a	41.98 \pm 3.06 ^a	226.67 \pm 17.56 ^a
小青龙汤加地龙组	9	0.386 \pm 0.005	1.419 \pm 0.050 ^b	1.670 \pm 0.068 ^b	2.052 \pm 0.087 ^b	17.64 \pm 4.69 ^b	101.33 \pm 12.01 ^b
波生坦片组	9	0.382 \pm 0.005	1.370 \pm 0.015 ^b	1.701 \pm 0.022 ^b	1.986 \pm 0.057 ^b	24.37 \pm 5.39 ^b	96.67 \pm 7.51 ^b

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$

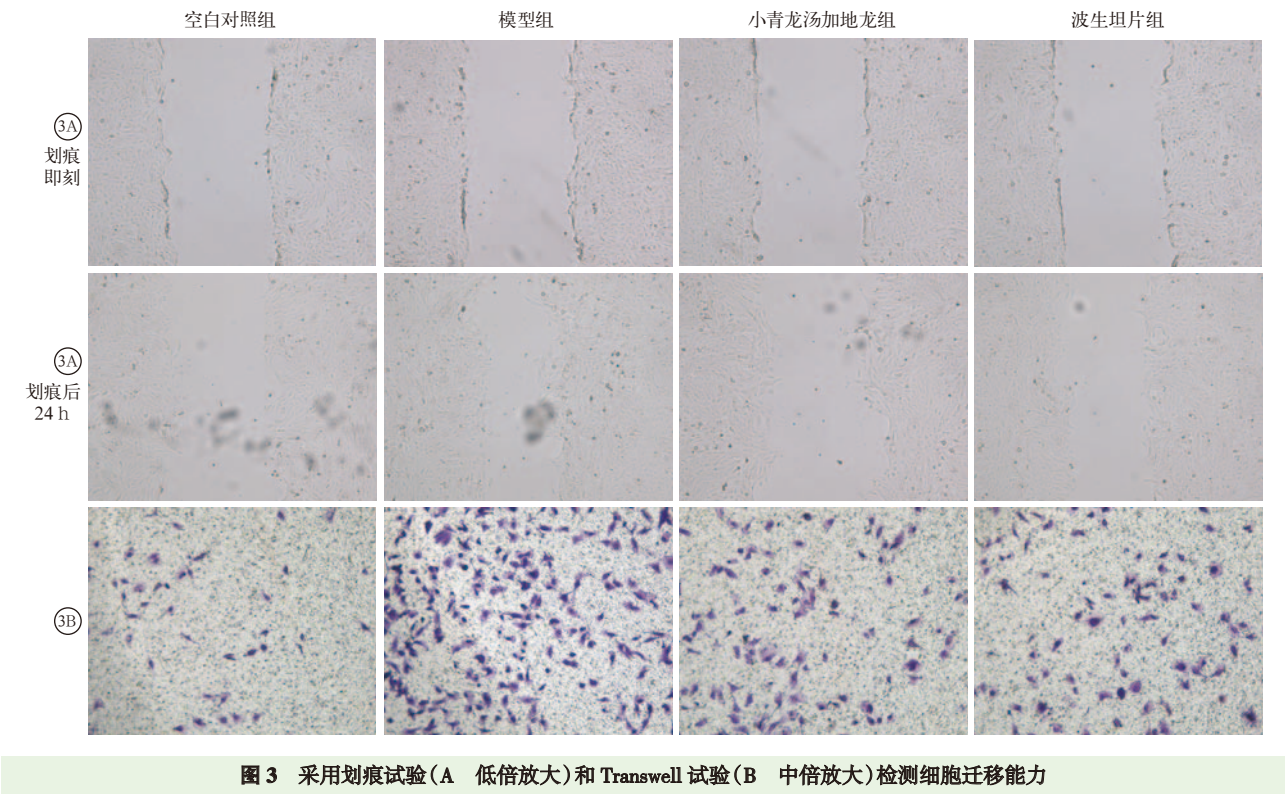


图 3 采用划痕试验(A 低倍放大)和 Transwell 试验(B 中倍放大)检测细胞迁移能力

表 4 小青龙汤加地龙对 HPAEC 炎症因子分泌及蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	炎症因子					蛋白表达	
		IL-8 (ng/L)	IL-6 (ng/L)	TNF- α (ng/L)	ET-1 (ng/L)	NO (μ mol/L)	血管内皮钙黏蛋白 (血管内皮钙黏蛋白/GAPDH)	波形蛋白 (波形蛋白/GAPDH)
空白对照组	9	16.00 \pm 1.00	29.33 \pm 0.58	37.33 \pm 8.39	1.67 \pm 0.58	41.33 \pm 3.51	1.04 \pm 0.05	1.05 \pm 0.05
模型组	9	149.33 \pm 3.51 ^a	218.33 \pm 18.50 ^a	808.33 \pm 3.21 ^a	19.67 \pm 2.52 ^a	8.67 \pm 2.08 ^a	0.49 \pm 0.03 ^a	2.47 \pm 0.10 ^a
小青龙汤加地龙组	9	38.67 \pm 1.53 ^b	77.33 \pm 7.57 ^b	209.00 \pm 2.65 ^b	5.33 \pm 1.15 ^b	21.67 \pm 2.52 ^b	0.66 \pm 0.03 ^b	1.81 \pm 0.12 ^b
波生坦片组	9	39.00 \pm 1.73 ^b	79.67 \pm 1.53 ^b	209.33 \pm 3.06 ^b	5.00 \pm 1.00 ^b	21.00 \pm 3.61 ^b	0.62 \pm 0.03 ^b	1.66 \pm 0.02 ^b

注：与空白对照组比较，^a $P<0.05$ ；与模型组比较，^b $P<0.05$

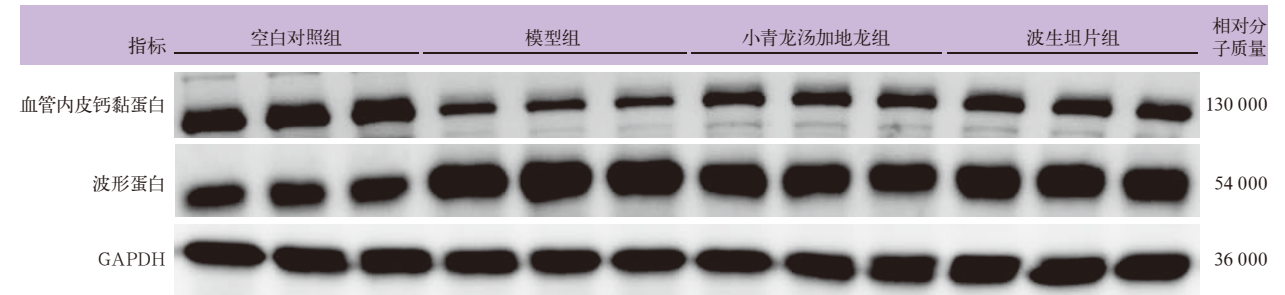


图 4 Western blotting 检测 EMT 相关蛋白血管内皮钙黏蛋白和波形蛋白的蛋白表达水平

表 5 Western blotting 检测各组大鼠肺组织 TLR4/NF- κ B/HIF-1 α 通路蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	TLR4 蛋白表达 (TLR4/GAPDH)	p-p65/p65 比值	HIF-1 α 蛋白表达 (HIF-1 α /GAPDH)
正常对照组	6	1.00 \pm 0.12	1.02 \pm 0.18	0.95 \pm 0.17
模型组	6	4.38 \pm 0.30 ^a	12.73 \pm 1.80 ^a	4.45 \pm 0.34 ^a
小青龙汤加地龙组	6	3.13 \pm 0.20 ^b	7.11 \pm 0.81 ^b	2.37 \pm 0.32 ^b

注：与正常对照组比较，^a $P<0.05$ ；与模型组比较，^b $P<0.05$

表 6 Western blotting 检测各组 HPAEC TLR4/NF- κ B/HIF-1 α 通路蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	TLR4 蛋白表达 (TLR4/GAPDH)	p-p65/p65 比值	HIF-1 α 蛋白表达 (HIF-1 α /GAPDH)
空白对照组	9	0.99 \pm 0.03	1.01 \pm 0.28	0.96 \pm 0.16
模型组	9	2.43 \pm 0.05 ^a	11.28 \pm 1.06 ^a	5.50 \pm 0.44 ^a
小青龙汤加地龙组	9	1.42 \pm 0.03 ^b	6.01 \pm 1.84 ^b	3.24 \pm 0.17 ^b

注：与空白对照组比较，^a $P<0.05$ ；与模型组比较，^b $P<0.05$

中炎症因子和 ET-1 的水平,并降低了 NO 水平(表 7)。划痕实验和 Transwell 结果显示,与 DMSO 组比较,给予 MLP 后 HPAEC 表现出更高的迁移能力(图 7;表 7)。Western blotting 结果显示,给予 MLP 后,HPAEC 血管内皮钙黏蛋白的蛋白表达进一步降低,而波形蛋白的蛋白表达水平进一步升高(表 7;图 8)。综上所述,小青龙汤加地龙可通过抑制 TLR/NF- κ B/HIF-1 α 通路改善 PAH 肺动脉内皮细胞的 EMT。

2.5 小青龙汤加地龙通过抑制 TLR/NF- κ B/HIF-1 α 通路的激活缓解 PAH 大鼠的病理进程:与 DMSO 组比较,MLP 组大鼠肺组织中 p-p65/p65 比值和 HIF-1 α 的蛋白表达水平明显升高(图 9;表 9)。血流动力学参数检测显示,MLP 组大鼠 mPAP、RVSP、RVHI 均显著升高,+dp/dt max 显著降低(表 8)。HE 染色结果显示,与 DMSO 组比较,TLR 激动剂 MLP 进一步促进了小青龙汤加地龙干预大鼠右心室心肌细胞的肥大,并有效降低了肺动脉小管的平均 IMT(图 10;表 8)。Western blotting 检测结果显示,与 DMSO 组比较,MPL 组肺组织中增殖标志物 PCNA 和巨噬细胞标志物 CD68 的表达水平均显著升高;同时,MPL 处理还逆转了 EMT 相关标志物的表达,导致内皮标志物血管内皮钙黏蛋白表达显著下降,而间质标志物波形蛋白表达显著升高(图 11;表 9)。ELISA 结果表明,与 DMSO 对照组比较,MPL 组血清中促炎因子 IL-8、IL-6 和 TNF- α 的水平明显升高(表 9)。综上所述,小青龙汤加地龙可通过抑制

TLR/NF- κ B/HIF-1 α 通路的激活改善 PAH 肺动脉内皮细胞 EMT,进而缓解 PAH 病理进程。

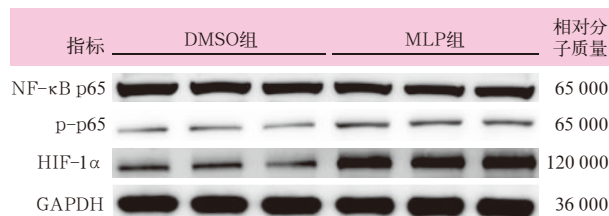


图 6 Western blotting 检测 HPAEC 中 NF- κ B p65、p-p65、HIF-1 α 的蛋白表达水平

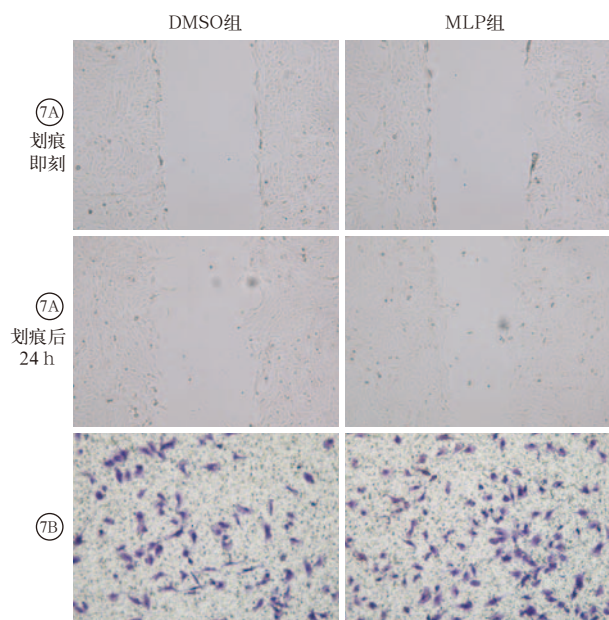


图 7 采用划痕试验(A 低倍放大)和 Transwell 试验(B 中倍放大)检测细胞迁移能力

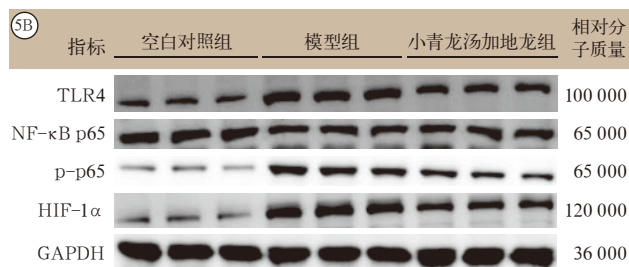
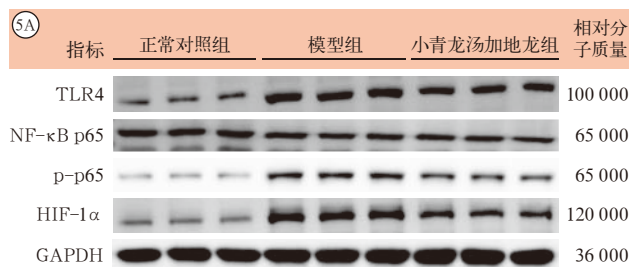


图 5 Western blotting 检测各组大鼠肺组织(A)和 HPAEC(B)中 TLR4、p65、p-p65、HIF-1 α 的蛋白表达水平

表 7 MLP 对细胞增殖、蛋白表达、细胞因子含量及细胞迁移的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	细胞增殖情况(A 值)				血管内皮钙黏蛋白蛋白表达 (血管内皮钙黏蛋白/GAPDH)		波形蛋白蛋白表达 (波形蛋白/GAPDH)	p-p65/p65 比值	HIF-1 α 蛋白表达 (HIF-1 α /GAPDH)
		制模前	制模后 12 h	制模后 24 h	制模后 48 h					
DMSO 组	9	0.374 \pm 0.002	1.273 \pm 0.047	1.598 \pm 0.045	1.810 \pm 0.088	0.99 \pm 0.02	0.93 \pm 0.07	1.08 \pm 0.14	1.03 \pm 0.10	
MLP 组	9	0.377 \pm 0.002	1.516 \pm 0.032 ^a	1.741 \pm 0.044 ^a	2.156 \pm 0.044 ^a	0.66 \pm 0.04 ^a	1.53 \pm 0.12 ^a	2.17 \pm 0.35 ^a	3.96 \pm 0.25 ^a	

组别	样本数(孔)	IL-8 (ng/L)	IL-6 (ng/L)	TNF- α (ng/L)	ET-1 (ng/L)	NO (μ mol/L)	细胞迁移率(%)	穿膜细胞数(个/视野)
DMSO 组	9	41.67 \pm 2.52	39.00 \pm 1.00	52.00 \pm 2.65	5.67 \pm 1.53	19.33 \pm 1.53	22.71 \pm 2.49	107.00 \pm 11.14
MLP 组	9	100.33 \pm 3.21 ^a	161.33 \pm 4.73 ^a	80.67 \pm 4.51 ^a	15.33 \pm 0.58 ^a	14.67 \pm 1.53 ^a	34.32 \pm 2.82 ^a	176.67 \pm 17.50 ^a

注:与 DMSO 组比较,^a $P < 0.05$

表 9 MLP 对大鼠血清炎症因子及肺组织中蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s$)												
指标	动物数 (只)	血清炎症因子			肺组织蛋白表达							
		IL-8 (ng/L)	IL-6 (ng/L)	TNF- α (ng/L)	PCNA (PCNA/ GAPDH)	CD68 (CD68/ GAPDH)	血管内皮钙黏蛋白(血管 内皮钙黏蛋白 /GAPDH)	波形蛋白(波形 蛋白 /GAPDH)	p-p65/p65 比值	HIF-1 α (HIF-1 α /GAPDH)		
DMSO 组	6	41.67 \pm 5.65	81.17 \pm 8.11	217.00 \pm 30.63	1.07 \pm 0.17	0.96 \pm 0.19	1.02 \pm 0.10	1.01 \pm 0.10	1.17 \pm 0.36	1.03 \pm 0.19		
MLP 组	6	103.33 \pm 10.52 ^a	350.83 \pm 25.17 ^a	526.17 \pm 30.29 ^a	1.37 \pm 0.06 ^a	2.51 \pm 0.33 ^a	0.69 \pm 0.06 ^a	1.95 \pm 0.20 ^a	16.31 \pm 2.84 ^a	6.79 \pm 0.62 ^a		

注：与 DMSO 组比较，^a $P < 0.05$

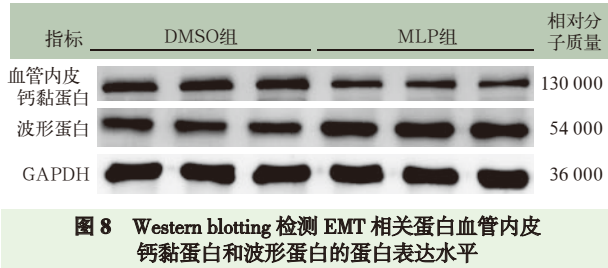


图 8 Western blotting 检测 EMT 相关蛋白血管内皮钙黏蛋白和波形蛋白的蛋白表达水平

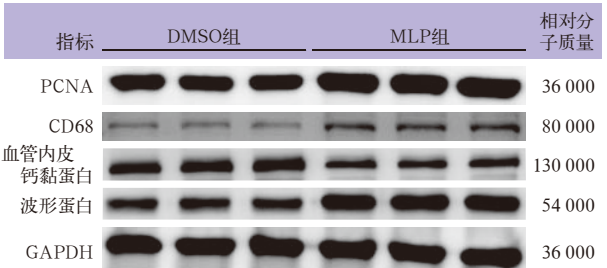


图 11 Western blotting 检测大鼠肺组织中 PCNA、CD68、血管内皮钙黏蛋白和波形蛋白的蛋白表达水平

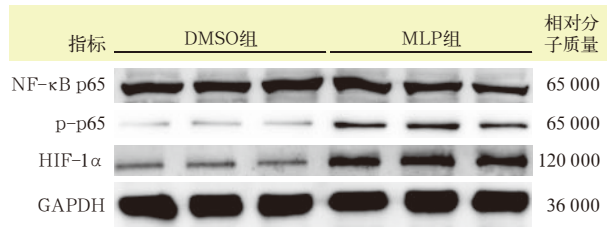


图 9 Western blotting 检测各组大鼠肺组织中 p65、p-p65、HIF-1 α 的蛋白表达水平

表 8 MLP 对大鼠血流动力学、右心室肥厚及血管重塑指标的影响($\bar{x} \pm s$)				
组别	动物数 (只)	mPAP (mmHg)	RVSP (mmHg)	+dp/dt max (mmHg/s)
DMSO 组	6	22.67 \pm 1.63	34.00 \pm 2.90	2 584 \pm 381
MLP 组	6	41.17 \pm 5.34 ^a	51.67 \pm 4.08 ^a	1 802 \pm 141 ^a
组别	动物数 (只)	RVHI		IMT (%)
DMSO 组	6	0.41 \pm 0.04		33.10 \pm 3.69
MLP 组	6	0.80 \pm 0.09 ^a		58.96 \pm 3.11 ^a

注：与 DMSO 组比较，^a $P < 0.05$ ；1 mmHg \approx 0.133 kPa

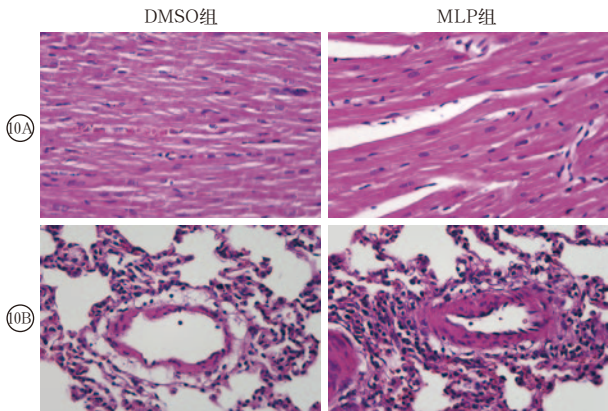


图 10 光镜下观察各组大鼠右心室心肌细胞的肥大程度(A)肺动脉小管 IMT 改变 HE 染色 高倍放大

3 讨论

PAH 是一种进展迅速的致命性疾病,主要表现为肺血管阻力增加、右心室压力过高,最终导致右心衰竭^[1]。张金波教授认为,PAH 的病机是“肺脉腠理密塞、经脉络道不畅”,在治疗 PAH 中强调通过解表疏腠扩络的思路进行干预,解表疏腠扩络旨在扩(阔)张脉络,通气血,增强经、脉、络的通畅性,从而改善气血流畅性,解除机体的血管痉挛和堵塞,起到舒张血管、改善血流的效果^[24]。本课题组前期选用有辛散解表功效的方药进行研究,结果显示,清燥润肺化浊行血汤可明显降低呼吸系统疾病小鼠肺组织 TNF- α 、IL-8 及 LTB4 水平,表明辛散解表法能改善呼吸系统疾病小鼠的气道炎症反应^[25],显著降低肺损伤小鼠支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、白蛋白(albumin, Alb)含量,且剂量越高,指标下降越明显;光镜下可见,肺组织病理学改变随干预剂量的增加而逐渐减轻,表明具有辛散解表功效的药物能减轻肺部炎症反应^[26]。解表疏腠扩络药可提高活血通脉药的疗效,特别是对血管痉挛、狭窄、闭塞、经脉络道密塞或闭塞具有扩(阔)张的作用^[17]。

在 PAH 的治疗中,血管内皮功能损害、肺血管重塑和纤维化是主要病理特征,而解表扩络通过改善血流动力学和缓解血管壁的增厚,能有效减缓这一过程。小青龙汤作为解表扩络的经典方剂之一,

可通过调节体内的气血运行,有助于减轻肺动脉压力,改善右心功能,这与其解表扩络的作用机制是相吻合的^[19]。因此,阐明小青龙汤在治疗 PAH 中的潜在机制至关重要。

本研究通过构建 PAH 大鼠模型和体外缺氧诱导的肺动脉内皮细胞模型,并基于解表扩络的中医学理论探讨了小青龙汤加地龙在缓解 PAH 病理进程中的作用及其潜在机制。结果显示,小青龙汤加地龙能显著降低 PAH 大鼠的肺动脉压力、改善右心功能,并减轻肺血管纤维化和右心室肥大。此外,小青龙汤加地龙还能抑制 PAH 大鼠和内皮细胞模型中的炎症反应及细胞异常增殖,同时有效抑制了 EMT,其机制可能是小青龙汤加地龙通过抑制 TLR/NF- κ B/HIF-1 α 通路的激活发挥抗 PAH 的作用。

PAH 的发生主要伴随着肺动脉压力的升高和右心室功能的损伤,最终导致右心衰竭,因此,血流动力学指标检测是评估 PAH 的重要途径^[27]。在本研究中,小青龙汤加地龙组大鼠 mPAP 和 RVSP 均显著降低, +dp/dt max 显著升高,表明小青龙汤加地龙能有效减轻 PAH 所致的心血管损伤。此外,小青龙汤加地龙组 RVHI 显著降低,提示小青龙汤加地龙不仅对 PAH 有明显的干预效果,还能抑制 PAH 引起的右心室结构重塑。

PAH 的病理特征之一是肺血管壁增厚和纤维化,这种变化主要由血管平滑肌细胞的异常增殖和细胞外基质的过度沉积引起^[28]。HE 染色结果显示,小青龙汤加地龙能显著减轻 PAH 大鼠右心室心肌细胞的肥大,特别是小青龙汤加地龙组大鼠肺动脉小管 IMT 显著低于模型组,表明小青龙汤加地龙能有效抑制肺血管壁的异常增厚,进而缓解 PAH 的进展。这一结果与临床上发现的 PAH 患者血管病变特征相符,提示小青龙汤加地龙在抗肺血管重塑中的潜在应用价值。

炎症在 PAH 的发生发展中起到了关键作用, PAH 患者常伴有大量炎症细胞浸润和炎症因子水平升高^[3]。本研究 Western blotting 和 ELISA 检测结果显示, PAH 模型大鼠肺组织中 CD68 阳性巨噬细胞浸润显著增加,同时血清 IL-6、IL-8 和 TNF- α 等炎症因子水平也显著升高;采用小青龙汤加地龙处理后,大鼠肺组织中 CD68 阳性细胞明显减少,血清中炎症因子水平显著下降,表明小青龙汤加地龙在抑制炎症细胞浸润和减少炎症因子释放方面有显著效果。炎症水平的有效抑制对减缓 PAH 的进展

至关重要,因为炎症反应不仅会加重肺血管损伤,还会促进内皮细胞和平滑肌细胞异常增殖,从而加速病理过程的恶化。

在细胞水平上,本研究通过构建体外 PAH 内皮细胞模型,进一步探讨了小青龙汤加地龙在抑制细胞异常增殖和 EMT 方面的作用。CCK-8 结果表明,模型组细胞增殖活性显著增强,而小青龙汤加地龙能有效抑制这种异常增殖。Transwell 和划痕实验的结果则显示, PAH 模型内皮细胞表现出更高的迁移性,而小青龙汤加地龙能显著抑制这些特性,提示其在抗细胞迁移方面有良好效果。这对于 PAH 的治疗有重要意义,因为内皮细胞的异常增殖和迁移是导致肺血管重塑和动脉狭窄的重要因素。

EMT 是 PAH 发展过程中的一个重要病理机制^[10]。EMT 过程中,内皮细胞丧失其上皮特性(如血管内皮钙黏蛋白的表达),并获得间质特性(如波形蛋白的表达),最终导致内皮细胞向平滑肌样细胞转化,参与血管壁的重塑和纤维化^[29]。本研究通过 Western blotting 结果显示,与正常对照组比较,模型组大鼠肺组织和内皮细胞中血管内皮钙黏蛋白的蛋白表达显著降低,而波形蛋白的蛋白表达显著升高,提示 PAH 诱导了明显的 EMT 过程;而给予小青龙汤加地龙后,血管内皮钙黏蛋白的蛋白表达显著升高,波形蛋白的表达则显著降低,表明小青龙汤加地龙通过抑制 EMT 有效改善了肺血管重塑。这一结果有重要的临床意义,因为 EMT 在许多心血管疾病的进展中都起着至关重要的作用,而小青龙汤加地龙通过干预这一过程可能有广泛的治疗潜力。

为了进一步揭示小青龙汤加地龙的作用机制,本研究探讨了 TLR/NF- κ B/HIF-1 α 通路在 PAH 中的调控作用。TLR/NF- κ B 信号通路是 PAH 中炎症反应和 EMT 的关键调节通路,而 HIF-1 α 则在缺氧条件下促进内皮细胞的转化和增殖^[22, 30-32]。Western blotting 结果显示,模型组大鼠和 HPAEC 中 TLR4、p-p65/p65 比值和 HIF-1 α 的蛋白表达水平均显著升高,而给予小青龙汤加地龙后,这些蛋白的表达水平显著降低,表明小青龙汤加地龙通过抑制 TLR/NF- κ B/HIF-1 α 通路的激活发挥抗炎和抗 EMT 作用。TLR 激动剂 MLP 组 TLR 通路激活后, NF- κ B 和 HIF-1 α 的表达水平再次升高,细胞异常增殖和迁移特性也随之恢复,提示 TLR/NF- κ B/HIF-1 α 通路的抑制在小青龙汤加地龙抗 PAH 作用中起到了关键作用。

综上所述,本研究首次揭示了小青龙汤加地龙通过抑制 TLR/NF- κ B/HIF-1 α 通路的激活,在体内和体外有效改善 PAH 的病理进展。小青龙汤加地龙不仅能显著降低 PAH 大鼠的肺动脉压力,改善心功能和肺血管纤维化,还能通过抑制炎症反应和 EMT 减轻肺血管重塑,并且能降低 ET-1 含量,升高 NO 水平,改善脉管狭窄。这一结果进一步表明了解表药对狭窄的经脉络道有显著扩阔的支架作用,为临床运用解表药治疗狭窄的经脉络道提供了理论依据,提示其有潜在的临床应用价值。然而,未来仍需通过大规模的临床试验进一步验证小青龙汤加地龙在 PAH 患者中的安全性和有效性。此外,关于小青龙汤加地龙中具体成分的作用机制仍需深入探讨,以进一步优化其治疗效果并减少潜在的不良反应。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Beshay S, Sahay S, Humbert M. Evaluation and management of pulmonary arterial hypertension [J]. *Respir Med*, 2020, 171: 106099. DOI: 10.1016/j.rmed.2020.106099.
- [2] 孔深柯,张学军,马培尧,等.肺动脉高压病人血清 miR-221、miR-222 水平与预后的相关性[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2024, 22 (18): 3353-3356. DOI: 10.12102/j.issn.1672-1349.2024.18.016.
- [3] Hu YJ, Chi L, Kuebler WM, et al. Perivascular inflammation in pulmonary arterial hypertension [J]. *Cells*, 2020, 9 (11): 2338. DOI: 10.3390/cells9112338.
- [4] Johnson S, Sommer N, Cox-Flaherty K, et al. Pulmonary hypertension: a contemporary review [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2023, 208 (5): 528-548. DOI: 10.1164/rccm.202302-0327SO.
- [5] Evans CE, Cober ND, Dai ZY, et al. Endothelial cells in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension [J]. *Eur Respir J*, 2021, 58 (3): 2003957. DOI: 10.1183/13993003.03957-2020.
- [6] Dierick F, Solinc J, Bignard J, et al. Progenitor/stem cells in vascular remodeling during pulmonary arterial hypertension [J]. *Cells*, 2021, 10 (6): 1338. DOI: 10.3390/cells10061338.
- [7] Kovacs L, Cao YP, Han WH, et al. PFKFB3 in smooth muscle promotes vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 200 (5): 617-627. DOI: 10.1164/rccm.201812-2290OC.
- [8] Maron BA, Abman SH, Elliott CG, et al. Pulmonary arterial hypertension: diagnosis, treatment, and novel advances [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 203 (12): 1472-1487. DOI: 10.1164/rccm.202012-4317SO.
- [9] 方灵芝,邱学佳,段宝京,等.波生坦、安立生坦及马昔腾坦的药品遴选实践[J]. *中国新药与临床杂志*, 2022, 41 (11): 691-696. DOI: 10.14109/j.cnki.xyylc.2022.11.11.
- [10] Gorelova A, Berman M, Al Ghoulch I. Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary arterial hypertension [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2021, 34 (12): 891-914. DOI: 10.1089/ars.2020.8169.
- [11] Manfioletti G, Fedele M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) 2021 [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (10): 5848. DOI: 10.3390/ijms23105848.
- [12] Werlein C, Ackermann M, Stark H, et al. Inflammation and vascular remodeling in COVID-19 hearts [J]. *Angiogenesis*, 2023, 26 (2): 233-248. DOI: 10.1007/s10456-022-09860-7.
- [13] Manfioletti G, Fedele M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (14): 11386. DOI: 10.3390/ijms241411386.
- [14] 翟兴英,李洋,涂珺,等.基于多靶点协同作用中药药效物质评价指数构建及其在葛根治疗糖尿病药效物质基础分析中应用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2023, 37 (z1): 33. DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2023.z1.047.
- [15] 柴博蓓,高夏夏,赖永健,等.基于 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路探讨小青龙汤对慢性肾炎的抗炎机制[J]. *中药材*, 2024, 47 (8): 2067-2071. DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2024.08.033.
- [16] 王帅东.小青龙汤加减联合西药治疗慢性支气管炎及支气管哮喘随机平行对照研究[J]. *内蒙古中医药*, 2024, 43 (5): 61-63.
- [17] 徐小璐,张金波,王蕊,等.张金波教授“解肌扩脉”法治疗冠心病心绞痛经验总结[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2021, 28 (6): 738-741. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.06.022.
- [18] 于小钧,刘丛颖,宋华英,等.中药地龙抗凝血活性的谱效相关性研究[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33 (11): 2640-2643. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2022.11.21.
- [19] 徐小璐,张金波,王蕊,等.基于解表扩络法探讨小青龙汤对肺动脉高压模型大鼠血管内皮素的影响[J]. *中华危重病急救医学*, 2022, 34 (6): 597-601. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220309-00225.
- [20] Hosseinzadeh M, Pourbadie HG, Khodagholi F, et al. Preconditioning with Toll-like receptor agonists attenuates seizure activity and neuronal hyperexcitability in the pilocarpine rat model of epilepsy [J]. *Neuroscience*, 2019, 408: 388-399. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2019.04.020.
- [21] 薛汉荣,洪广祥,程光宇,等.小青龙汤含药血清对内皮素-1 诱导的气道平滑肌细胞增殖作用的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2006, 21 (10): 594-596. DOI: 10.3969/j.issn.1673-1727.2006.10.006.
- [22] Maimaitiali N, Zeng YX, Ju PN, et al. NLR3 deficiency promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension development via IKK/NF- κ B p65/HIF-1 α pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2023, 431 (2): 113755. DOI: 10.1016/j.yexcr.2023.113755.
- [23] Cabral JM, Grácio D, Soares-da-Silva P, et al. Short-and long-term regulation of intestinal Na⁺/H⁺ exchange by Toll-like receptors TLR4 and TLR5 [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 309 (8): G703-G715. DOI: 10.1152/ajpgi.00124.2015.
- [24] 赵璐,张金波.解表扩络法的辨证思路与临床应用[J]. *世界中西医结合杂志*, 2021, 16 (9): 1755-1759. DOI: 10.13935/j.cnki.sjzx.210941.
- [25] 张金波,孙丽,李史清,等.中药清燥润肺化痰行血汤对 PM2.5 致小鼠呼吸系统疾病的治疗作用[J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28 (10): 916-920. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.10.011.
- [26] 张金波,张雷,陈艳霞,等.中药清燥润肺化痰行血汤对 PM2.5 致肺损伤小鼠的干预作用[J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29 (5): 465-468. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.05.015.
- [27] 宋正阳,王新雨,田云娜,等.三七总皂苷对肺动脉高压大鼠肺血管重构的影响及其机制[J]. *中国应用生理学杂志*, 2022, 38 (6): 650-655. DOI: 10.12047/j.cjap.6358.2022.118.
- [28] Mathew R, Huang J, Iacobas S, et al. Pulmonary hypertension remodels the genomic fabrics of major functional pathways [J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11 (2): 126. DOI: 10.3390/genes11020126.
- [29] Cheng R, Wang B, Cai XR, et al. CD276 promotes vasculogenic mimicry formation in hepatocellular carcinoma via the PI3K/AKT/MMPs pathway [J]. *Oncotargets Ther*, 2020, 13: 11485-11498. DOI: 10.2147/OTT.S271891.
- [30] Yeh FC, Chen CN, Xie CY, et al. TLR7/8 activation induces autoimmune vasculopathy and causes severe pulmonary arterial hypertension [J]. *Eur Respir J*, 2023, 62 (1): 2300204. DOI: 10.1183/13993003.00204-2023.
- [31] Dawuti A, Sun SC, Wang RR, et al. Salvianolic acid alleviates heart failure with preserved ejection fraction via regulating TLR/Myd88/IRF3/NF- κ B and p38MAPK/CREB signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168: 115837. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115837.
- [32] Zheng YH, Ji HX, Yi WL, et al. PRMT5 facilitates angiogenesis and EMT via HIF-1 α /VEGFR/Akt signaling axis in lung cancer [J]. *Aging (Albany NY)*, 2023, 15 (13): 6163-6178. DOI: 10.18632/aging.204826.

(收稿日期: 2025-01-24)

(责任编辑: 邸美仙)