引用:朱俊米,伍新诚,刘敏. 基于氧化应激探讨复方葶苈子汤降低 COPD-PAH 大鼠肺动脉压的作用机制[J]. 湖南中医杂志,2023,39(8):182-186.

基于氧化应激探讨复方葶苈子汤降低 COPD-PAH 大鼠肺动脉压的作用机制

朱俊米[1],伍新诚[1],刘　敏[2]
(1. 湖南中医药大学,湖南　长沙,410208;
2. 湖南省中医药研究院附属医院,湖南　长沙,410006)

[**摘要**]　目的:观察复方葶苈子汤对慢性阻塞性肺疾病(COPD)相关性肺动脉高压(PAH)大鼠模型氧化应激的影响,探讨其可能的作用机制。方法:采用随机数字表法将 50 只 SD 大鼠分为正常组、模型组及中药低、中、高剂量组。除正常组以外,其余各组大鼠均采用烟熏加气管滴注脂多糖构建 COPD-PAH 模型。造模后第 2 天开始灌胃干预,每天 2 次,连续 2 周,中药低、中、高剂量组灌胃剂量分别为 2.50 g/kg、5.00 g/kg、10.00 g/kg,模型组灌胃 0.9%氯化钠注射液 10 ml/kg。观察大鼠的一般情况;测量大鼠的肺功能、平均肺动脉压力(mPAP);HE 染色观察其肺组织肺血管病理形态变化;检测大鼠血清中超氧化物歧化酶(SOD)活力值、环磷酸腺苷(MDA)含量、cAMP 含量,肺组织中泛素连接酶 2(Siah2)mRNA 的相对表达量;检测肺组织细胞中 Siah2、A 激酶锚定蛋白(Akap121)的蛋白表达水平。结果:与模型组比较,中药各剂量组肺血管损伤重构减轻,mPAP 下降($P<0.05$);大鼠血清中 SOD 活力值、MDA 含量、cAMP 含量、Siah2-RNA 相对表达量,正常组与模型组、模型组与中药各剂量组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,中药各剂量组肺组织 Siah2 蛋白表达降低,AKAP-121 蛋白表达上调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:复方葶苈子汤可通过调控 cAMP-Siah2-AKAP121 通路来减少氧化应激对 COPD-PAH 大鼠的肺血管壁的损伤,降低肺动脉压。

[**关键词**]　慢性阻塞性肺疾病;肺动脉高压;复方葶苈子汤;氧化应激
[**中图分类号**]R285.5　[**文献标识码**]A　DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2023.08.041

Mechanism of action of compound Semen Lepidii decoction in reducing pulmonary artery pressure in rats with chronic obstructive pulmonary disease-related pulmonary arterial hypertension: A study based on oxidative stress

ZHU Junmi[1], WU Xincheng[1], LIU Min[2]
(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;
2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan, China)

[**Abstract**]　Objective: To investigate the effect of compound Semen Lepidii decoction on oxidative stress in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD)-related pulmonary arterial hypertension (PAH) and its possible mechanism of action. Methods: A total of 50 Sprague-Dawley rats were divided into normal group, model group, and low-, middle-, high-dose traditional Chinese medicine (TCM) groups using a random number table. All rats except those in the normal group were given smudging and intratracheal instillation of lipopolysaccharide to establish a model of COPD-PAH. Intragastric administration was started on day 2 after modeling, twice a day for 2

基金项目:湖南省中医药科研计划项目(E2022018)
第一作者:朱俊米,男,2019 级硕士研究生,研究方向:中医内科学(呼吸系统疾病方向)
通信作者:刘敏,女,主治医师,研究方向:中医内科学(呼吸系统疾病方向),E-mail:494134768@qq.com

consecutive weeks, at a dose of 2.50 g/kg for the low-dose group, 5.00 g/kg for the middle-dose group, and 10.00 g/kg for the high-dose group, and the rats in the model group were given 0.9% sodium chloride injection by gavage at a dose of 10 ml/kg. The general status of rats was observed; pulmonary function and mean pulmonary artery pressure (mPAP) were measured; HE staining was used to observe the pathomorphological changes of lung tissue and vessels; the activity of superoxide dismutase (SOD) in serum was measured, as well as the content of malondialdehyde (MDA) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in serum and the relative mRNA expression level of the ubiquitin ligase seven-in-absentia homolog 2 (Siah2) in lung tissue; the protein expression levels of Siah2 and A-kinase anchor protein (AKAP121) in lung tissue were also measured. Results: Compared with the model group, all TCM groups had alleviation of pulmonary vascular injury and remodeling and a significant reduction in mPAP ($P<0.05$), and there were significant differences in SOD activity, MDA content, cAMP content, and the relative mRNA expression level of Siah2 between the normal group and the model group and between the model group and the TCM groups ($P<0.05$). Compared with the model group, the TCM groups had a significant reduction in the protein expression level of Siah2 and a significant increase in the protein expression level of AKAP121 in lung tissue ($P<0.05$). Conclusion: Compound Semen Lepidii decoction can alleviate the injury of pulmonary vascular wall due to oxidative stress and reduce pulmonary artery pressure in COPD-PAH rats by regulating the cAMP-Siah2-AKAP121 pathway.

[**Keywords**] chronic obstructive pulmonary disease; pulmonary hypertension; compound Semen Lepidii decoction; oxidative stress

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)以气道改变位特征,限制气流导致人体缺氧。长期处于低氧状态可刺激多种信号分子及相关通路对肺血管产生影响,改变肺血管的结构和功能,发展成 COPD 相关性肺动脉高压(COPD related Pulmonary Arterial Hypertension, COPD-PAH)。本研究以 COPD-PAH 模型大鼠为研究对象,探究复方亭苈子汤的治疗作用及可能的作用机制,现报告如下。

1　实验材料

1.1　*动物*　清洁级雄性 SD 大鼠 50 只,鼠龄 10~12 周,体质量(230±20)g,由湖南省中医药研究院动物房统一向湖南莱斯克实验动物中心采购[SYXK(湘)2019-0017]。本研究经湖南中医药大学动物伦理委员会批准(2021-0057)。

1.2　*药物*　复方葶苈子汤处方组成:葶苈子 15 g,黄芩 10 g,桃仁 10 g,红花 10 g,水蛭 6 g,川芎 15 g,茯苓 15 g,桂枝 15 g,白术 15 g,矮地茶 15 g,甘草 6 g。中药采用四川新绿色药业科技发展有限公司颗粒制剂,购买于湖南省中医药研究院附属医院。按以上比例配制等效生药质量分数为 1 g/ml 的药液留用,灌胃时按需抽取。给药剂量参考人和动物体表面积折算的等效剂量比率表,大鼠等效剂量相当于人的 6.3 倍。每只动物每千克按临床人(70 kg)的等效剂量为中剂量,0.5 倍等效剂量为低剂量,2 倍等效剂量为高剂量,低剂量组为 2.5 g/kg,中剂量组为 5.0 g/kg,高剂量组为 10 g/kg。

1.3　*主要试剂*　脂多糖(Sigma 公司);环磷酸腺苷(cAMP)ELISA 试剂盒(abcam 公司);丙二醛(MDA)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所);mRNA 逆转录试剂盒、miRNA 逆转录试剂盒(北京康为世纪);HRP goatanti-mouse IgG、HRP goatanti-rabbit IgG、泛素连接酶-2(Siah-2) Rabbit、β-actin Mouse(美国 protein tech);A 激酶锚定蛋白(AKAP121) Rabbit(博奥森);R-actin、R-Siah2 引物(北京擎科)。

1.4　*主要仪器*　荧光定量 RCP 仪(美国 Thermo, PIKOREAL96);荧光 PCR 板(美国 Thermo, SPL0960);水平琼脂糖电泳槽(北京六一, DYCP-31DN);生物样品均质仪(杭州奥盛, BioPrep-24);多功能酶标分析仪(汇松, MB-530);自动平衡离心机(湘仪, L530);紫外可见分光光度计(天普, 752);小动物肺功能检测仪(广源达, SCIREQ)。

2　实验方法

2.1　*分组、造模及给药*　将实验大鼠分为正常组、模型组及中药高、中、低剂量组,每组各 10 只。采取熏烟、气管暴露滴入脂多糖诱发气道炎症反应制作 COPD-PAH 模型,造模时间共 60 d,每天熏烟 4 h。

第 1 天水合氯醛腹腔注射麻醉后,固定大鼠,备皮,切开颈部皮肤,钝性分离出气管,肉眼下用眼科剪以 45°剪开气管小口,用 1 ml 注射器滴入浓度 1 mg/ml 脂多糖 0.2 ml,竖起固定夹板轻摇,使其充分进入肺部,缝合颈部皮肤。第 14 天重复第 1 天操作,手术当天不予熏烟处理。造模后次日开始灌胃,连续 14 d。正常组、模型组灌胃 0.9%氯化钠注射液 10 ml,中药各剂量组灌胃相应剂量复方葶苈子汤。

2.2 观察指标

2.2.1 大鼠一般情况 观察并记录实验过程中各组大鼠的一般情况(如精神、毛色、活动度、呼吸等),检查有无口鼻分泌物,记录大鼠的死亡情况及相关处理。

2.2.2 大鼠肺功能检查 末次给药后 24 h 采用小动物肺功能仪行肺功能检测。取仰卧位气管插管放置小动物肺功能检测仪内,记录相关肺功能指标,包括肺活量(FVC)、0.3 s 用力呼气量($FEV_{0.3}$)和 $FEV_{0.3}$/FVC、平均肺功能压力(mPAP)。

2.2.3 氧化应激水平测定 真空采血管腹主动脉采血,离心后取上清液检测血清 SOD 活力值,检测血清 MDA 含量;ELISA 检测血清中 cAMP 的含量。

2.2.4 肺组织 Siah2-RNA 相对表达量 器具灭菌无酶化处理,使用紫外分光光度计在 260 nm 与 280 nm 处测定 RNA 浓度,表示 RNA 样本的纯度值 OD260/OD280 在 1.8~2.0 之间。反应体系见表 1,引物序列见表 2。NCBI 上搜索目的基因序列,运用 primer5 软件设计引物,由北京擎科合成引物。数据处理:ΔCt=目的基因 Ct-内参基因 Ct ;-$\Delta\Delta Ct$=(对照组)ΔCt-各样品 ΔCt。$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 反映各样品相对于对照组样品目的基因表达水平的比值(以正常组样品为对照样品)。

表 1 PCR 反应体系

样本	体积
Template	2
Primer R	1
Primer F	1
ddH2O	11
2X SYBGREEN PCR Master Mix	15

表 2 RT-PCR 引物序列

Gene	Forword	Reverse	Poduct length
R-SiAh2	TCCTCATTGGCACCCGCAAG	CAGGTCAGTCTCCTCCGGTTC	79bp
R-actin	ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	223bp

2.2.5 HE 染色 10%水合氯醛(0.4 ml/100 g)麻醉大鼠,腹部备皮钝性分离出腹主动脉采血后处死。取右肺,多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片行 HE 染色观察病理形态;左肺组织迅速放入液氮罐中-80℃速冻保存待测。

将肺组织切片脱蜡至水,然后按照 HE 染色试剂盒说明书操作,在显微镜下观察拍照。选择视野主要观察非毛细血管、细支气管、肺泡等结构的形态等。

2.2.6 AKAP121 蛋白表达水平 剪取组织样品,RIPA 提取肺组织蛋白,Western Blot 检测蛋白表达水平。经 SDS-PAGE 和转膜后,用封闭液(含 5%脱脂奶粉的 TBST)封闭 90 min,加入一抗 AKAP121(1∶1000)、SIAH2(1∶500)、β-actin(1∶5000),4℃孵育过夜;孵育后经 TBST 洗涤,并用稀释的 HRP 标记的二抗室温孵育 90 min:山羊抗小鼠 IgG(1∶5000)及山羊抗兔 IgG(1∶6000)。洗涤后用 ECL 化学发光法显示蛋白条带用 quantity one 专业灰度分析软件分析各条带的灰度值。

2.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件处理数据,各分组所得计量数据采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,成对样本比较采用 t 检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 大鼠一般情况 正常组毛发光泽,精力旺,活动度高,进食正常,反应敏捷,无大鼠死亡。模型组毛发杂乱,呼吸急促,喉中哮鸣,精神萎靡,食少活动度差。与模型组比较,中药各剂量组喉中哮鸣减轻,呼吸更平顺,进食活动度更好,组间活动度、呼吸、进食状况见无明显区别。

3.2 正常组与模型组大鼠肺功能指标比较 模型组大鼠的肺功能指标 $FEV_{0.3}$、FVC、$FEV_{0.3}$/FVC 较正常组明显下降,差异具有统计学意义($P<0.05$)。(见表 3)

表 3 正常组与模型组大鼠肺功能指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	$FEV_{0.3}$/ml·s^{-1}	FVC/ml·s^{-1}	$FEV_{0.3}$/FVC/%
正常组	6	1.87±0.36	1.99±0.03	93.73±1.3
模型组	6	1.19±0.24[a]	1.61±0.02[a]	73.95±1.4[a]

注:与正常组比较,[a]$P<0.05$。

3.3 各组大鼠血清氧化应激水平比较 与正常组比较,模型组血清 SOD 活力值、cAMP 下降,MDA 含量升高;与模型组比较,中药各剂量组血清 SOD 活

力值、cAMP 升高,MDA 含量下降;与低剂量组比较,中剂量组血清中 SOD 活力值、cAMP 升高,MDA 含量下降;与中剂量组比较,高剂量组 SOD 活力值、cAMP 升高,MDA 含量下降,差异均有统计学意义($P<0.05$)。(见表 4)

表 4　各组大鼠血清氧化应激水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	MDA/nmol·ml^{-1}	SOD 活力值/U·ml^{-1}	cAMP/ng·ml^{-1}
正常组	6	6.78±0.21	20.65±0.65	4.53±0.06
模型组	6	12.48±0.65^{a}	9.62±0.74^{a}	3.98±0.48^{a}
中药低剂量组	6	9.78±0.75^{b}	16.77±0.43^{b}	5.17±0.11^{b}
中药中剂量组	6	8.83±0.52^{bc}	17.01±0.33^{bc}	5.50±0.08^{bc}
中药高剂量组	6	8.33±0.75^{bd}	18.08±0.40^{bd}	5.99±0.44^{bd}

注:与正常组比较,$^{a}P<0.05$;与模型组比较,$^{b}P<0.05$;与中药低剂量组比较,$^{c}P<0.05$;与中药中剂量组比较,$^{d}P<0.05$。

3.4　各组大鼠 mPAP、肺组织 Siah2-mRNA 相对表达量比较　与正常组比较,模型组 mPAP 及 Siah2-mRNA 相对表达量升高;与模型组比较,中药各剂量组 mPAP 及 Siah2-mRNA 相对表达量下降;与低剂量组比较,中剂量组 mPAP 及 Siah2-mRNA 相对表达量下降;与中剂量组比较,高剂量组 mPAP 及 Siah2-mRNA 相对表达量下降,差异均有统计学意义($P<0.05$)。(见表 5)

表 5　各组大鼠 mPAP、肺组织 Siah2-mRNA 相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	mPAP/mmHg	Siah-2mRNA 相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
正常组	6	19.96±2.71	0.744±0.33
模型组	6	30.17±3.21^{a}	3.104±0.35^{a}
中药低剂量组	6	24.07±1.65^{b}	2.348±0.36^{b}
中药中剂量组	6	23.79±2.62^{bc}	1.278±0.15^{bc}
中药高剂量组	6	23.24±2.48^{bd}	0.848±0.18^{bd}

注:与正常组比较,$^{a}P<0.05$;与模型组比较,$^{b}P<0.05$;与中药低剂量组比较,$^{c}P<0.05$;与中药中剂量组比较,$^{d}P<0.05$。

3.5　各组大鼠肺血管组织学改变　HE 染色后,于 200 倍光学显微镜下观察可见,正常组的肺血管内皮连续、管壁薄而均匀、管腔较大且通畅。模型组大鼠肺血管的内皮不连续,管壁增厚、管腔狭窄血管重构较明显。与模型组比较,中药各干预组血管内皮较连续,血管壁变薄及官腔变大,大鼠的肺组织中血管壁变薄、官腔变大。(见图 1)

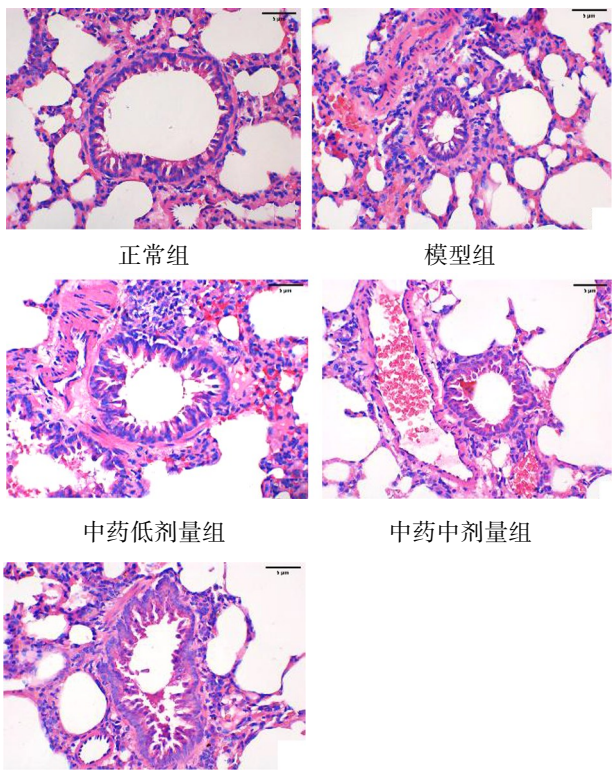

图 1　HE 染色(×200 光镜)

3.6　各组 Siah2、AKAP-121 蛋白表达水平比较　与正常组比较,模型组 Siah2 蛋白表达增多;中药各干预组 Siah2 蛋白表达均少于正常组及模型组;中药各干预组大鼠的肺组织中 AKAP-121 蛋白的表达均上调。(见图 2)

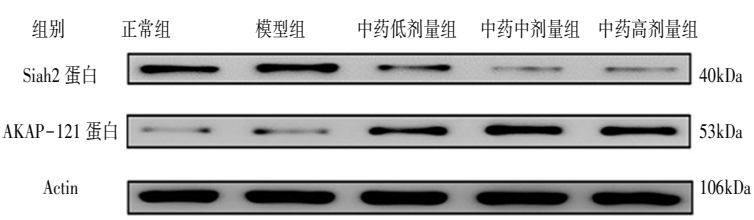

图 2　各组 Siah2 蛋白、AKAP-121 蛋白表达水平比较

4　讨　　论

COPD 是一种不完全可逆的持续性气流受限的慢性呼吸系统疾病,长期慢性缺氧可引发患者出现气道重塑及肺部血管收缩或重构,是后期出现肺动脉高压、肺源性心脏病的常见因素。氧化应激(OS)是指机体组织或细胞内的氧自由基生成增加或清

除能力降低,导致活性氧簇(ROS)在组织或细胞内蓄积而引起的氧化损伤过程。生物体内 cAMP 可促进相关氧化酶的活性,常用于改善心肌状态而治疗相关疾病[1]。细胞外 cAMP 通路的激活可以抑制肺血管细胞的增殖和肺血管重塑,缓解肺动脉高压的进展[2]。cAMP 通常需与下游信号分子相互作用调控相关疾病的进展。Siah2 与细胞缺氧下的线粒体功能密切相关,通过调节脯氨酰羟化酶的稳定性来激活缺氧诱导因子(HIF),从而间接调节线粒体的功能[3-5]。cAMP 可调控 AKAP-121 的表达,下调核内 cAMP 信号通路可以导致内源性 AKAP-121 的减少及 ROS 的产生增多[6]。AKAP-121 蛋白的表达下调可影响线粒体功能,削弱 cAMP 的保护作用[7]。

COPD-PAH 属中医学“喘证”“肺胀”范畴,为本虚标实之证,多由慢性咳喘反复发作,迁延不愈而成。肺部疾患,日久不愈,病入于络,气虚亏虚而致瘀滞,气虚气化无力则津液停滞,成痰成瘀;痰瘀互结,阻滞肺络,累及于心,是本病的基本病机。柏正平教授认为痰为湿邪,得温则行,当以温药和之;瘀血内结,治当活血祛瘀。拟复方葶苈子汤乃以饮瘀同治为法而制,方中葶苈子通脉平喘为君药;桂枝、茯苓、白术、甘草取苓桂术甘汤之意,温化痰饮同为臣药;桃仁、红花、水蛭活血祛瘀,矮地茶止咳平喘,均为佐药;黄芩清热泄肺为使药。临床研究表明,该方在减少肺心病患者急性发病次数、缓解急性期临床症状等方面功效尤为显著[8-9]。动物实验证明,该方可降低肺动脉高压,改善血管重构[10-11]。

本研究采用长期烟熏联合脂多糖建立大鼠 COPD-PAH 模型,与正常组比较,模型组的肺通气功能下降且伴有肺动脉压升高;肺血管内皮不连续,管壁增厚、管腔狭窄。与模型组比较,中药各剂量组的肺通气功能部分逆转,肺动脉压下降;肺组织中的内皮损伤较轻,血管壁较薄、官腔较大。上述结果表明模型制备成功。实验结果提示,复方葶苈子汤可减轻氧化应激,降低肺动脉压力,其机制可能与 cAMP-Siah2-AKAP121 通路相关。

本研究从氧化应激入手初步探讨了复方葶苈子汤调控 cAMP-Siah2-APAK121 通路影响 COPD-PAH 的发生及发展,证实了复方葶苈子汤可通过提高血清中 cAMP 的含量抑制氧化应激,减少 Siah2 的表达,降低 AKAP121 蛋白的降解,进而减轻肺组织内肺动脉血管重构,降低肺动脉压,这为复方葶苈子汤运用于治疗 COPD-PAH、肺源性心脏病提供了理论依据。

参考文献

[1] PACINI ESA,SANDERS-SILVEIRA S,O GODINHO R. The Extracellular cAMP-Adenosine Pathway in Airway Smooth Muscle[J]. J Pharmacol Exp Ther,2018,366(1):75-83.

[2] JONES C,BISSERIER M,BUENO-BETI C,et al. A novel secreted-cAMP pathway inhibits pulmonary hypertension via a feed-forward mechanism[J]. Cardiovasc Res,2020,116(8):1500-1513.

[3] NAKAYAMA K,QI J,RONAI Z. The ubiquitin ligase Siah2 and the hypoxia response[J]. Mol Cancer Res,2009,7(4):443-51.

[4] SISALLI MJ,IANNIELLO G,SAVOIA C,et al. Knocking-out the Siah2 E3 ubiquitin ligase prevents mitochondrial NCX3 degradation,regulates mitochondrial fission and fusion,and restores mitochondrial function in hypoxic neurons[J]. Cell Commun Signal,2020,18(1):42.

[5] MA B,CHEN Y,CHEN L,et al. Hypoxia regulates Hippo signalling through the SIAH2 ubiquitin E3 ligase[J]. Nat Cell Biol,2015,17(1):95-103.

[6] SCHIATTARELLA GG,BOCCELLA N,PAOLILLO R,et al. Loss of akap1 exacerbates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and heart failure[J]. Front Physiol,2018,28(9):558.

[7] PERRINO C,FELICIELLO A,SCHIATTARELLA GG,et al. AKAP121 downregulation impairs protective cAMP signals,promotes mitochondrial dysfunction,and increases oxidative stress[J]. Cardiovasc Res,2010,88(1):101-110.

[8] 谢蕾,刘俊,柏正平. 复方葶苈子汤治疗肺源性心脏病经验[J]. 云南中医中药杂志,2018,39(11):16-18.

[9] 刘敏,柏正平. 柏正平辨治缓解期慢性肺源性心脏病经验[J]. 上海中医药杂志,2013,47(11):16-17.

[10] 柏正平,卜献春,谭光波,等. 复方葶苈子胶囊治疗肺心病心衰疗效评价及机理探讨[J]. 中国中医药信息杂志,2003,10(10):20-21.

[11] 柏正平,郑兵,卜献春,等. 复方葶苈子胶囊对肺动脉高压和心肌收缩力影响的实验研究[J]. 湖南中医杂志,2000,16(1):59-60.

(收稿日期:2023-01-08)

[编辑:徐琦]