

益肺通络方对低氧性肺血管重建大鼠肌型肺小动脉中膜增殖的影响

刘旻¹, 刘贵颖¹, 胡仁杰², 冯文茹², 李翀¹, 朱振刚¹, 沈洪昇²

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193; 2. 天津医药科技研究所, 天津 300020)

[摘要] 目的:观察益肺通络方对低氧性肺血管构型重建(PVR)大鼠肌型肺小动脉中膜增殖的影响。方法:60只Wistar大鼠随机分成空白、模型、益肺通络方高、中、低剂量5组,每组12只,采用气管注入0.2 mL脂多糖($1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)联合烟熏(每次5支,30 min/次)4周建立慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠模型,叠加每天吸入18%低氧2周建立肺血管构型重建(PVR)大鼠模型。空白、模型组生理盐水 $5\text{ mL}\cdot\text{d}^{-1}$ 天灌胃,实验组按生药浓度分高剂量($30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),中剂量($20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),低剂量($10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)益肺通络方煎剂浓缩液 $5\text{ mL}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃。4,5,6周3个时点取材,测量中膜厚度、血管管径和中膜面积、血管面积,计算相对中膜厚度/面积。结果:相对中膜厚度/面积比较,4周时,模型组>实验低剂量组>实验中剂量组>实验高剂量>空白组,组间差异均有统计学意义($P<0.05$)。5周时,模型组>实验低剂量组>实验中剂量组>实验高剂量>空白组,组间差异均有统计学意义($P<0.05$)。6周时,模型组>实验低剂量组>实验中剂量组>实验高剂量>空白组,组间差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:益肺通络方能抑制慢性低氧PVR大鼠肌型肺小动脉中膜增殖,且存在量效关系。

[关键词] 肺血管构型重建; 血管平滑肌增殖; 益肺通络方

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0140-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015010140

Effect of Yifei Tongluo Formula on Muscular Arteries Medial Smooth Muscle Cell Proliferation of Hypoxia-induced Pulmonary Vascular Remodeling in Rats LIU Min¹, LIU Gui-ying¹, HU Ren-jie², FENG Wen-ru², LI Chong¹, ZHU Zhen-gang¹, SHEN Hong-shen² (1. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Yifei Tongluo formula on muscular arteries medial smooth muscle cell proliferation of hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling in rat. **Method:** Sixty Wistar rats were divided into 5 groups: blank group, model group, experimental group (high-does, middle-does, low-does), 12 rats in each group. The trachea injection of 0.2 mL lipopolysaccharide ($1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) combined smoke method for four weeks was adopted to establish the model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and superposition of low oxygen (18%) two weeks establish pulmonary vascular remodeling (PVR) models in rats. The blank and model groups were perfused with saline, experimental group was perfused with Yifei Tongluo formula ($30, 20, 10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Samples were collected in 4, 5, 6 weeks respectively. The middle membrane thickness, vascular diameter and middle membrane area, vascular area were measured, then calculated the ratio of relative middle membrane thickness and area. **Result:** The ratio of relative middle membrane thickness and area in each point-in-time between the groups showed t as follows: model group > low-does group > middle-does > high-does > blank group, with significant difference. **Conclusion:** Yifei Tongluo formula can inhibit the muscular arteries medial smooth muscle cell proliferation of hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling in rats.

[Key words] pulmonary vascular remodeling; vascular smooth muscle cell proliferation; Yifei Tongluo formula

[收稿日期] 20140323(002)

[基金项目] 天津市卫生局中医、中西医结合科研专项资金课题(07066)

[第一作者] 刘旻, 硕士, 副主任医师, 从事呼吸病学间质性肺病研究, Tel:022-27432459, E-mail:liumintcm@163.com

低氧性肺动脉高压 (hypoxic pulmonary hypertension, HPH) 是慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 向肺心病发展的中心环节, 肺血管构型重建 (pulmonary vascular remodeling, PVR) 是 HPH 持续发展的重要结构改变和病理基础, 肌型肺小动脉中膜增殖是 PVR 的主要病理改变之一。临床研究显示益肺通络方可延缓低氧性肺动脉高压增高^[1], 本实验拟观察其对肌型肺小动脉中膜增殖的影响。

1 材料

1.1 动物 3月龄 SPF级同系健康 Wistar 大鼠 60只, 雄性、体重(260 ± 20)g, 购自北京大学医学部实验动物科学部, 合格证号 SCXK(京)2006-003。

1.2 试剂和仪器 香烟(大前门牌, 上海卷烟厂。焦油含量 12 mg, 烟气烟碱量 0.9 mg, 烟气一氧化碳含量 14 mg), 脂多糖(批号 20080315, 天津市鼎天生物技术有限责任公司), 甲醛(批号 20080305, 天津市赢达稀贵化学试剂厂), 乙醚(分析纯, 批号 20080502, 天津化学试剂有限公司), 乌拉坦(批号 20080407, solarbio, 北京索莱宝科技有限公司)。低氧舱(30 cm × 40 cm × 50 cm 带盖有机玻璃箱), CY7-2B型测氧仪(建德市梅城电化分析仪器厂), BX40型光学显微镜(日本, Olympus), HMIAS-2000型全自动图像分析仪(武汉清平影像技术有限责任公司)。

1.3 药物制备 益肺通络方(人参 10 g, 胡桃肉 10 g, 川芎 10 g, 虎杖 10 g, 鸡血藤 30 g, 地龙 10 g)。上述中药等比例加入 200 mL 蒸馏水浸泡 30 min, 100 °C 水浴 30 min, 收集上清滤液。提取 2 次, 混合提取液, 1 000 r·min⁻¹ 离心 20 min。再次 100 °C 水浴蒸发浓缩其生药浓度分别为 1.5, 1.0, 0.5 g·mL⁻¹, 并标识为 C₁, C₂, C₃ 号药物, 4 °C 保存备用(天津石天药业集团有限公司提供)。

2 方法

2.1 动物分组 大鼠随机分为 5 组: 空白组(A组)、模型组(B组)、实验高、中、低剂量组(C₁ ~ C₃组), 每组 12 只, 适应性饲养 1 周。

2.2 低氧性 PVR 大鼠模型建立

2.2.1 造模方法 参照文献[2]的方法, 实验第 1, 14 天, 乙醚麻醉大鼠, 以耳镜插入喉口, 静脉套管针注入 0.2 mL 含 200 μg 脂多糖(生理盐水配制成 1 g·L⁻¹溶液); 每日(第 1, 14 天除外)舱内烟熏 2 h (5 支/次, 30 min/次), 连续 6 周; 从第 5 周开始舱内烟熏同时叠加每天吸入 18% 低氧(低氧舱充氮, 测氧仪监测) 2 h, 每周 6 d, 连续 2 周结束。

实验开始第 4, 5, 6 周末, 随机抽取大鼠, 12% 乌拉坦(10 mL·kg⁻¹) ip 麻醉, 颈椎脱臼法处死, 仰卧固定, 从剑突向头部作正中切口, 充分暴露肺脏和心脏, 无菌条件取肺组织, 以冷生理盐水通过左心室灌注肺组织, 得到无血肺组织, 沿肺门处剪取完整右下肺, 滤纸拭干, 10% 中性福尔马林固定, 梯度乙醇顺序脱水, 二甲苯透明后石蜡包埋, 5 μm 连续切片, 行 HE, Weigert 弹性纤维染色, 制备肺组织病理标本。

2.2.2 模型鉴定 HE 染色 100 倍光镜下观察, 肺泡腔显著扩大, 肺泡壁断裂, 肺泡融合, 呈明显肺气肿, 肺小动脉(15 μm < 外径 ≤ 50 μm, 肌型动脉有完整的内、外层弹力膜, 部分肌型动脉有完整的外弹力膜, 但内弹力膜不完整, 无肌型动脉仅有一层弹力膜)计数, 无肌型动脉明显减少, 部分肌型动脉明显增多, 呈肌化效应; Weigert 弹性纤维染色 400 倍光镜下观察, 模型组肌型动脉中膜明显增厚, 呈平滑肌增殖效应, 与文献报道一致^[2], 低氧性 PVR 大鼠模型建立成功。

2.3 给药方法 造模开始第 1 天, A, B 组大鼠生理盐水灌胃, 5 mL·d⁻¹; C 组大鼠给予益肺通络方煎剂, 将已制备好的益肺通络方煎剂浓缩液按高、中、低剂量(30, 20, 10 g·kg⁻¹)调整至 20 mL·kg⁻¹灌胃, 共 6 周。

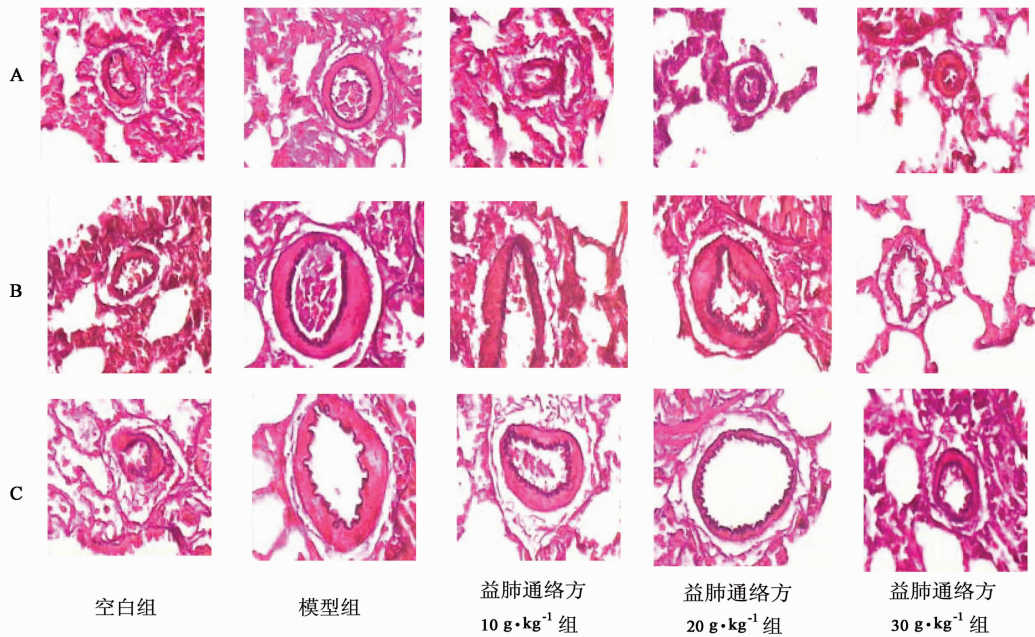
2.4 检验指标 肌型肺小动脉相对中膜厚度/面积: Weigert 弹性纤维染色 400 倍光镜下观察, 每只大鼠随机选取 5 根肌型肺小动脉。取血管最长径, 以内、外层弹力膜距离和血管内、外层距离, 采用全自动图像分析仪分别测量两侧中膜厚度和血管管径, 相对中膜厚度 = (中膜厚度 1 + 中膜厚度 2) / (血管管径 1 + 血管管径 2) × 100%。取血管, 以光标分别勾勒出内、外层弹力膜轮廓和血管内、外层轮廓, 采用全自动图像分析仪测量中膜面积和血管面积, 相对中膜面积 = 中膜面积 / 血管面积 × 100%。

2.5 统计方法 采用 SPSS 11.5 统计软件统计, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 组内比较采用配对 *t* 检验, 两组间比较采用 *t* 检验, 使用双侧检验, *P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 病理观察 Weigert 弹性纤维染色 400 倍光镜下观察, 对比空白组, 模型组、实验高、中、低剂量组肌型肺小动脉中膜明显增厚。见图 1。

3.2 肌型肺小动脉相对中膜厚度/面积比较 相对中膜厚度/面积比较, 均表现为空白组各时点无明显



A. 给药 4 周; B. 给药 5 周; C. 给药 6 周

图 1 益肺通络方对 PVR 大鼠肌型肺小动脉弹性纤维的影响 (Weigert 弹性纤维染色, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of Yifei Tongluo formula on pulmonary muscular arteries elastic fibers of PVR rats (Weigert Elastic fibers staining, $\times 400$)

改变(4 周 \approx 5 周 \approx 6 周), 模型组随时间延长呈增高趋势(4 周 $<$ 5 周 $<$ 6 周), 0 ~ 4 周增高快, 4 ~ 6 周增高缓慢。益肺通络方高、中、低剂量组各时点变化趋势均同模型组, 组内分析, 各时点比较, 差异均有统

计学意义 ($P < 0.05$); 各时点组间比较, 均表现为模型组 $>$ 益肺通络方低剂量组 $>$ 益肺通络方中剂量组 $>$ 益肺通络方高剂量组 $>$ 空白组, 各实验组与模型组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1 ~ 2。

表 1 益肺通络方对 PVR 大鼠肌型肺小动脉相对中膜厚度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of Yifei Tongluo formula on pulmonary muscular arteries relative middle membrane thickness of PVR rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

分组	剂量 /g·kg ⁻¹	肺小动脉相对中膜厚度/%		
		4 周	5 周	6 周
模型	-	27.90 \pm 4.22	32.33 \pm 4.15	41.25 \pm 3.11
空白	-	10.57 \pm 2.43 ¹⁾	10.79 \pm 2.56 ¹⁾	10.83 \pm 2.84 ¹⁾
益肺通络方	30	14.06 \pm 2.68 ^{1,2,3)}	17.06 \pm 3.95 ^{1,2,3)}	20.77 \pm 3.31 ^{1,2,3)}
	20	18.06 \pm 3.10 ^{1,2)}	21.48 \pm 3.56 ^{1,2)}	28.37 \pm 4.47 ^{1,2)}
	10	21.99 \pm 3.51 ^{1,3)}	25.76 \pm 3.23 ^{1,3)}	36.62 \pm 4.60 ^{1,3)}

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与益肺通络方低剂量组比较²⁾ $P < 0.05$; 与益肺通络方中剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

表 2 益肺通络方对 PVR 大鼠肌型肺小动脉相对中膜面积的影响比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect of Yifei Tongluo formula on pulmonary muscular arteries relative middle membrane area of PVR rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

分组	剂量 /g·kg ⁻¹	肌型肺小动脉相对中膜面积/%		
		4 周	5 周	6 周
模型	-	72.06 \pm 3.28	75.09 \pm 4.43	83.27 \pm 3.60
空白	-	45.07 \pm 5.98 ¹⁾	45.07 \pm 4.36 ¹⁾	44.94 \pm 2.83 ¹⁾
益肺通络方	30	52.07 \pm 2.50 ^{1,2,3)}	53.96 \pm 3.37 ^{1,2,3)}	58.07 \pm 4.07 ^{1,2,3)}
	20	57.12 \pm 4.00 ^{1,2)}	61.08 \pm 3.52 ^{1,2)}	65.66 \pm 2.95 ^{1,2)}
	10	63.91 \pm 2.14 ^{1,3)}	66.02 \pm 3.44 ^{1,3)}	73.73 \pm 4.00 ^{1,3)}

4 讨论

肌型肺小动脉中膜增殖是PVR的重要病理改变,我们对形成PVR的临床和病理改变采用中医学方法进行了细致分析^[3],提出形成PVR的病因病机为“气虚→血瘀、痰阻→局部肺络不通,气虚贯穿了整个病程,是由肺气虚→肺肾气虚的演变”,治疗当以“补益肺肾、活血消痰、疏通肺络”立法,设益肺通络方(人参、胡桃肉、川芎、虎杖、鸡血藤、地龙),以人参、胡桃肉为君,补益肺肾,川芎、虎杖为臣,活血消痰,佐以鸡血藤、地龙疏通肺络,以硝苯地平作为对照,治疗60例低氧性肺动脉高压患者,本方有延缓低氧性肺动脉高压增高趋势,改善患者呼吸困难症状,提高运动耐量作用^[1]。

实验结果显示,以空白组数据(相对中膜厚度约10.57%~10.83%、相对中膜面积约44.94%~45.07%)为模型组基线资料,肌型肺动脉相对中膜厚度0~4周增高(约17.33%)明显,4~6周增高(13.35%)缓慢,相对中膜面积0~4周增高(约26.99%)明显,4~6周增高(11.21%)缓慢,提示模型组肌型肺小动脉中膜增殖速度呈2个阶段,即0~4周增殖明显,4~6周增殖减慢;对比模型组,各实验组均能有效抑制PVR,且存在量效关系。

肌型肺小动脉中膜主要由平滑肌细胞组成,低氧刺激可导致平滑肌细胞增殖/凋亡失衡从而增加平滑肌细胞数量,故相对中膜厚度/面积持续增加,以0~4周最为明显,但因内、外层弹力膜结构的空腔效应,4~6周增高减慢。低氧导致平滑肌细胞增加的机制涉及多途径,包括促进增殖:①调控细胞周期,可上调周期蛋白(Cyclin)表达、激活细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)和降低其抑制因子活性(CKI)等^[4];②激活促分裂素原活化蛋白激酶(MAPK)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、Janus蛋白酪氨酸激酶(JAK)/转录激活因子(STAT)和黏着斑激酶(FAK)等细胞内信号通路^[5];③抑制一氧化氮(NO)、降钙素基因相关肽(CGRP)、钠尿肽(natriuretic peptide, NP)等内源性活性物质^[6];抑制凋亡:①调控基因表达,可上调Bcl-2, c-myc和下调Bax, Caspase-3表达^[3];②激活JNK等细胞内信号通路^[7];③分泌胰岛素样生长因子(IGF)、血小板源生长因子(PDGF)等活性物质^[8]。

益肺通络方可通过调节平滑肌细胞增殖/凋亡失衡抑制肌型肺小动脉中膜增殖,根据其组分及有效成分的药理学研究,抑制增殖途径涉及:①川芎嗪、人参总皂苷可通过下调平滑肌细胞 c-myc,

Cyclin 蛋白表达调控细胞周期抑制增殖^[9-10];②白藜芦醇、川芎嗪、人参皂苷 Rb₁ 可分别通过降低MAPK分泌表达、减少FGF, PDGF分泌表达调节细胞内信号通路抑制增殖^[11-12];③虎杖苷、川芎嗪可通过增加肺组织NO含量、降低NOS活性调节内源性活性物质抑制增殖^[13-14];促进凋亡途径涉及:①川芎嗪、阿魏酸可通过下调肺血管平滑肌细胞Caspase-3, FAK蛋白基因表达促进凋亡^[3,15];②川芎醇酯、人参皂苷、地龙提取物可通过减少脂质过氧化物生成、提高抗氧化酶活性剂及NO调节氧化/抗氧化失衡促进凋亡^[16-18];③虎杖苷、白藜芦醇、人参皂甙可分别通过降低肺动脉平滑肌乳酸脱氢酶(LDH)活性、降低血管内皮细胞生长因子(VEGF), TNF-α等活性物质分泌促进凋亡^[19-21]。

综上,益肺通络方能抑制低氧PVR大鼠肌型肺小动脉中膜增殖,减缓肺血管构型重建,且存在量效关系,为临床以“补益肺肾、活血消痰、疏通肺络”立法防治低氧性肺动脉高压提供了实验依据,其有效机制涉及调节平滑肌细胞增殖/凋亡失衡,值得深入研究。

[参考文献]

- [1] 刘旻,刘贵颖,刘兰萍,等. 益肺通络方治疗低氧性肺动脉高压临床观察[J]. 中医药临床杂志, 2006, 18(3):260-261.
- [2] 李晓芳,王伯章,韩纪昌,等. 复方茯苓甘草汤对低氧大鼠肺血管构型重建的影响[J]. 江西中医学院学报, 2004, 16(3):44-46.
- [3] 陈国柱,程德云,聂英. 阿魏酸钠对低氧性肺动脉高压大鼠肺血管平滑肌细胞Caspase-3, Bcl-2表达的影响[J]. 第四军医大学学报, 2009, (20):2105-2108.
- [4] 吴新丹,刘斌. 肺血管平滑肌增殖的研究进展[J]. 西南军医, 2013, (4):399-402.
- [5] Evisabel A Craig, Mark V Stevens, Richard R Vaillancourt, et al. MAP3Ks as central regulators of cell fate during development[J]. Developmental Dynamics, 2008, 237(11):3102-3114.
- [6] 申霖,高芬. 低氧性肺动脉高压肺血管重构中的细胞因子调控[J]. 社区医学杂志, 2011, 9(2):43-45.
- [7] 项文娟,张英杰,朱明伟,等. JNK介导的细胞凋亡在发育与疾病中的作用[J]. 细胞生物学杂志, 2009(1):21-27.
- [8] 张健,蔡生业,姚成芳,等. 川芎嗪对PDGF-BB诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖和骨桥蛋白mRNA表达的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2005, 29(3):230-232.

- [9] 华军益,何煜舟,蒋旭宏,等. 川芎嗪抑制血管平滑肌细胞增殖及胶原合成的作用机制研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(9): 1226-1231.
- [10] Chen X. Cardiovascular protection by ginsenosides and their nitric oxide releasing action [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1996(23): 728-732.
- [11] 景涛,何国祥,刘建平,等. 大鼠血管平滑肌细胞迁移能力变化与血管紧张素Ⅱ的关系[J]. 高血压杂志, 2001, 9(3): 247-249.
- [12] 张健,蔡生业,姚成芳,等. 川芎嗪对PDGF-BB诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖和骨桥蛋白 mRNA 表达的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2005, 29(3): 230-232.
- [13] 马渝,史若飞,文玉明,等. 虎杖抗动脉粥样硬化作用的实验研究[J]. 中国中医急症, 2005, 14(6): 564-566.
- [14] 丁倩. 阿魏酸川芎醇酯对内皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. 山东医学高等专科学校学报, 2012, 34(5): 325-327.
- [15] 林春龙,张珍祥. 川芎嗪在抑制人肺血管平滑肌细胞黏着斑激酶中的表达[J]. 中国医师杂志, 2006, 8(10): 1321-1323.
- [16] 彭小春,马红莺,尹刚,等. 川芎嗪抗动脉粥样硬化机制的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(5): 1130-1131.
- [17] 潘维华. 人参提取物及其组分对小鼠免疫功能的影响[D]. 镇江:江苏科技大学, 2011.
- [18] 窦倩. 复方地龙胶囊对气虚血瘀证大鼠基础指标及血管内皮损伤研究[D]. 天津:天津医科大学, 2012.
- [19] 王萌,李志超,王剑波,等. 虎杖苷对低氧所致大鼠肺微血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 西北药学杂志, 2011, 26(3): 185-189.
- [20] 赵吉诺. 人参皂苷 Rb3 对压力负荷性心肌肥厚大鼠心室重构的影响及其机制[D]. 长春:吉林大学, 2013.
- [21] 刘轩,魏育林,李波,等. 人参皂甙对脂多糖诱导小鼠肺泡巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子的作用及机制探讨[J]. 中日友好医院学报, 2001, 15(2): 83-86.

[责任编辑 聂淑琴]

欢迎订阅《中国中医药图书情报杂志》

本刊为国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的科技学术期刊,为中国中西医结合学会信息专业委员会、中国中医药信息研究会中医药信息数字化专业委员会的会刊。

本刊全面报道中医药图书情报方面的最新研究进展、科研教学成果,以及新技术、新方法在中医药图书情报领域的应用,促进中医药信息学学科的学术交流及人才培养,为中医药图书情报研究人员提供学术交流的平台。本刊已被《中国核心期刊(遴选)数据库》《中国学术期刊网络出版总库》《中国中医药期刊文献数据库》收录。

《中国中医药图书情报杂志》为双月刊,16开,62页,每册定价20元,全年120元。国内邮发代号:2-633,各地邮局订阅;国外代号:BM299,中国国际图书贸易集团有限公司(北京399信箱)订阅。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。

地址:北京市东直门内南小街16号 中国中医科学院中医药信息研究所《中国中医药图书情报杂志》编辑部,邮政编码:100700。

电话:010-64014411-3212

投稿网址: <http://tsqb.cintcm.com>

E-mail: tsqb@mail.cintcm.ac.cn