

当归补血汤通过 PI3K/Akt 通路对 Ang II 诱导肥大心肌细胞的保护作用

徐厚谦*, 颜春鲁, 张永花, 金华, 何建新
(甘肃中医药大学 中医临床学院, 兰州 730000)

[摘要] **目的:**研究当归补血汤对肥大心肌细胞的保护作用及其与磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/丝氨酸苏氨酸激酶(Akt)/内皮型一氧化氮合酶(eNOS)/一氧化氮(NO)信号转导通路的关系。**方法:**体外培养 H9C2 心肌细胞,采用 α -肌动蛋白(α -actin)抗体进行免疫组化法鉴定心肌细胞;用血管紧张素 II(Ang II)诱导 H9C2 心肌细胞肥大模型,通过 BCA 蛋白测定法测定心肌细胞总蛋白含量,比较空白组和模型组蛋白含量的不同,以验证 Ang II 诱导 H9C2 心肌细胞肥大的模型;取同代生长状态良好的细胞分为空白组,模型组,LY294002 阻断剂组和 10% 含药血清组,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组心肌细胞 p-Akt, Akt, p-eNOS, eNOS 等信号通路的相关蛋白表达,硝酸还原酶法检测各组细胞培养液中 NO 浓度。**结果:**免疫组化法鉴定细胞,棕黄色细密颗粒位于细胞浆,其鉴定结果符合心肌细胞特征;BCA 测定细胞蛋白,模型组较空白组蛋白表达增加($P < 0.05$),Ang II 诱导 H9C2 心肌细胞肥大的模型建立;Western blot 结果显示模型组较空白组 p-Akt, Akt, eNOS 蛋白表达减少($P < 0.05$);含药血清组较模型组 p-Akt, Akt, eNOS 蛋白表达增加($P < 0.05$),LY294002 阻断剂组可消减含药血清的作用。**结论:**当归补血汤含药血清对 Ang II 诱导心肌细胞肥大起保护作用,其机制之一可能是通过调控心肌细胞 PI3K/Akt 信号通路实现的。

[关键词] 当归补血汤; 血管紧张素 II; LY294002 阻断剂; 心肌细胞肥大; 磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/丝氨酸苏氨酸激酶(Akt) 信号通路

[中图分类号] R22; R2-03; R259; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)02-0135-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018020135

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171011.1436.058.html>

[网络出版时间] 2017-10-11 14:36

Protective Effect of Danggui Buxuetang on Hypertrophic Cardiomyocytes Induced by Angiotensin II in Patients with Hypertrophy by PI3K /Akt Pathway

XU Hou-qian*, YAN Chun-lu, ZHANG Yong-hua, JIN Hua, HE Jian-xin

(College of Traditional Chinese Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of Danggui Buxuetang on hypertrophic cardiomyocytes and its relationship with phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) /serine threonine kinase (Akt) /endothelial nitric oxide synthase (eNOS) -nitric oxide (NO) signal transduction pathway. **Method:** H9C2 cardiomyocytes were cultured *in vitro*, α -actin antibody was used to identify cardiomyocytes by immunohistochemistry. Angiotensin II (Ang II) was used to induce the H9C2 cardiomyocyte hypertrophy model. The total protein content of cardiomyocytes was measured by BCA protein assay. The protein contents of blank group and model group were compared to verify the model of Angiotensin-induced H9C2 cardiomyocyte hypertrophy. The cells were divided into blank group, cell model group, LY294002 blockade group and 10% serum group. Western blot was used to detect relevant protein expressions of p-Akt, Akt, p-eNOS, eNOS and other

[收稿日期] 20170509(008)

[基金项目] 甘肃省自然科学基金项目(145RJZA170)

[通信作者] * 徐厚谦,教授,硕士生导师,从事中医药心血管病防治研究, Tel:13919358582, E-mail:962529965@qq.com

signaling pathways. Nitric acid reductase assay was used to detect the NO concentration in each cell culture medium. **Result:** The immunohistochemical method was used to identify that cells and brownish yellow fine particles were located in the cytoplasm. The results were consistent with the characteristics of cardiomyocytes. BCA was used to determine cell protein. Compared with blank group, the content of the histone group was increased ($P < 0.05$). Western blot analysis showed that p-Akt, Akt and eNOS protein expressions in model group were lower than those in blank group ($P < 0.05$), p-Akt, Akt and eNOS protein expressions in the serum-containing group were higher than those in model group ($P < 0.05$), LY294002 blockade group removed the effect of the drug-containing serum. **Conclusion:** Danggui Buxuetang-containing serum has a protective effect on Ang II-induced cardiomyocyte hypertrophy. One of its mechanisms may be the regulation of cardiomyocyte PI3K /Akt signaling pathway.

[**Key words**] Danggui Buxuetang; angiotensin II; LY294002 blocker; cardiomyocyte hypertrophy; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) /serine threonine kinase (Akt) signaling pathway

病理性心脏肥大可进展为心力衰竭(心衰),是临床死亡的危险因素,其在细胞水平的特征有心肌细胞体积增大,蛋白质合成增加^[1]。心衰为各种心脏疾病的严重和终末阶段,发病率高,是当今最重要的心血管之一^[2]。可见研究心脏保护机制预防或减少心肌肥大有重要意义。心肌细胞体外培养实验有利于揭开细胞内信号通路和初期药物干预作用,研究信号通路有利于分析心肌肥大特异性信号传导机制^[3]。当归补血汤配伍比例已得到了科学的验证,药理作用有了广泛研究^[4]。有研究发现当归补血汤具有促进心肌梗死大鼠冠状动脉侧支血管生成的作用,其机制可能与提高一氧化氮(NO)水平有关^[5]。本课题组研究亦发现当归补血汤能提高心衰西药常规治疗的疗效,达到增强防治 CHF 的目的^[6]。有研究发现磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)信号通路在控制心肌肥大和保持心脏功能的过程中起重要作用^[7]。虽然当归补血汤在临床广泛应用,而当归补血汤在细胞分子水平对心衰的保护作用及其保护机制研究不多,尤其是当归补血汤是否通过 PI3K/Akt 信号通路对心肌细胞起保护机制研究尚少。有研究发现血管紧张素 II (Ang II) 刺激可引起心肌肥大^[8]。本研究应用 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II 诱导 H9C2 心肌细胞肥大,取当归补血汤含药血清进行对其干预,观察当归补血汤对心肌细胞肥大的影响,以及与 PI3K/丝氨酸苏氨酸激酶(Akt)/内皮型一氧化氮合酶(eNOS)/NO 信号通路的关系。

1 材料

1.1 细胞和动物 H9C2 心肌细胞,购自和元生物技术股份有限公司,SPF 级 Wistar 大鼠 32 只,雌雄各半,体重 $(180 \pm 20) \text{ g}$;购自甘肃中医药大学实验

动物中心,许可证号 SYXK(甘)2015-0005,由甘肃中医药大学实验动物伦理委员会审核通过,编号 2015-0005,适应性喂养 3 d,按随机数字表随机分为空白组和给药组,各 16 只。

1.2 试剂 血管紧张素 II, $4 \times$ 蛋白质上样缓冲液,细胞裂解液 RIPA, Glycine, Tris(Solarbio 公司,批号分别为 20160612, 20160504, 20160428, 1203P069, 1217S075); LY294002(碧云天生物技术公司,批号 S1737);胰蛋白酶 Trypsin 0.25%,磷酸盐缓冲液(PBS);DMEM 培养基,胎牛血清(HyClone 公司,批号分别为 J160025, AAJ207798, AB217804, JC50166);二甲基亚砜(DMSO, ACS Grade 公司,批号 302A0334);NO 测试盒(南京建成生物工程研究所,批号 20161018);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 20160712); α -肌动蛋白(α -actin,北京博奥森生物技术有限公司,批号 AF06149358);山羊抗兔二抗,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),Akt, p-Akt 一抗(Immuno Way 公司,批号分别为 B0201, B4501, B8501, B0601);eNOS, p-eNOS 单克隆抗体(Abbkine 公司,批号均为 ATPN01101);免疫组化二抗, DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 16183A07, K166724B)。

1.3 仪器 3552-2 型二氧化碳培养箱(中国珠海造鑫企业有限公司);CJ-2S 型超净工作台(天津泰斯特仪器有限公司);IX71 型倒置相差光学显微镜(日本 Olympus 公司);D37520 型低温高速离心机(美国 Kendro 公司);CHEMI DOC XRS 型凝胶成像分析系统(美国伯乐公司);15769 型分光光度计,10025025 Rev A 型电泳转膜仪,041BR137745 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 鉴定心肌细胞 采用 α -actin抗体免疫组化法,将细胞传代至有盖玻片的6孔板内细胞爬片;培养48 h后,用4%多聚甲醛进行固定;用磷酸盐缓冲液(PBS)水平振荡器清洗2次,6 min/次,加0.01% triton-100,室温10 min;加5%胎牛血清,封闭20 min;一抗(1:300)孵育,放于湿盒,4℃过夜;二抗37℃孵育30 min;SABC标记37℃孵育30 min;DAB显色剂,显色5 min;蒸馏水清洗2次,每次6 min,苏木素复染1 min;梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树脂封片,显微镜观察并拍照。

2.2 心肌细胞肥大模型及验证模型建立 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II诱导心肌细胞48 h,模型组表面积及总蛋白质含量均明显高于正常组,成功建立细胞肥大模型^[9]。本实验亦用 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II诱导H9C2心肌细胞肥大,测定细胞蛋白含量验证模型。细胞于37℃ 5% CO₂细胞培养箱进行培养,镜下观察正常心肌细胞形态为成肌细胞样,贴壁生长,细胞状态良好;0.25% Trypsin消化,吹打混匀后传代至6孔培养板,培养24 h镜下观察细胞生长状态良好,随机分为空白组和模型组,并做标记标注,空白组正常换液培养,模型组换液为等体积 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II的DMEM培养基培养,培养48 h后用RIPA细胞裂解液提取细胞蛋白,按照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书进行细胞蛋白测定,用分光光度计测562 nm处吸光度A,根据标准曲线计算出蛋白浓度。

2.3 当归补血汤含药血清制备 以元代医家李东垣所创《内外伤辨惑论·暑伤胃气论》中当归补血汤处方,黄芪-当归5:1,药材购自甘肃中医药大学附属医院中药房,由甘肃中医药大学李硕副教授鉴定为正品,黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* 的干燥根,当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* 的干燥根。选取黄芪500 g,当归100 g,于冷水中浸泡30 min,用武火煮沸后改文火煎煮30 min,煎煮2次的药液混合过滤并浓缩至含生药0.5 g·mL⁻¹,分装4℃保存备用。大鼠32只,按随机数字表随机分为空白组和给药组,各组16只;按5 g·kg⁻¹灌胃^[10],连续灌胃3 d,2次/d;空白组给予等量生理盐水灌胃;于第4天晨给药后1 h股动脉取血,以1 000 r·min⁻¹离心10 min离心取血清,所取血清于56℃恒温水浴锅中灭活30 min,0.22 μm滤器过滤除菌,分装-20℃保存备用。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 p-Akt,

Akt, p-eNOS, eNOS 蛋白表达 取同代生长状态良好的细胞分为空白组, Ang II ($1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 模型组, LY294002 ($15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 阻断剂组, 含药血清组, 均进行对应处理后培养48 h; 提取细胞蛋白, BCA法测定细胞蛋白浓度, 加4×蛋白质上样缓冲液后沸水煮5 min, 使蛋白变性; 按照凝胶制备试剂盒说明配12%分离胶和5%浓缩胶; 蛋白电泳浓缩胶60 V电泳30 min; 分离胶120 V电泳90 min, 指示带电泳至分离胶底部停止电泳; 转膜2 h至PVDF膜上, 于5%的脱脂奶粉封闭2 h; 一抗(GAPDH, 1:5 000; p-Akt, Akt, p-eNOS, eNOS, 1:500), 一抗孵育放在摇床孵育过夜; 二抗孵育用TBST清洗3次, 每次5 min, 山羊抗兔二抗用5%脱脂奶粉以稀释(1:1 000), 放置摇床2 h; TBST清洗后, 发光液滴加至PVDF膜上, 进行曝光, Image J软件获得灰度值进行统计处理。

2.5 硝酸还原酶法检测细胞培养液中NO浓度 取镜下观察生长状态良好的细胞, 吹打混匀后传代至6孔培养板, 培养48 h后分为空白组, Ang II模型组, LY294002阻断剂组, 10%含药血清组, 进行相应干预后继续培养48 h, 对各组细胞培养液NO检测; 检测步骤按照NO试剂盒说明书进行操作, 于550 nm处测定各管吸光度A, 计算NO浓度。

2.6 统计数据处理 数据统计分析应用SPSS 21.0软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组之间比较用ANOVA单因素方差分析, 两组之间比较采用LSD法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 α -actin抗体鉴定心肌细胞 倒置显微镜下观察其棕黄色细密颗粒, 位于细胞浆, 心肌细胞呈阳性表达, 鉴定符合心肌细胞特征, 用于本实验。见图1。

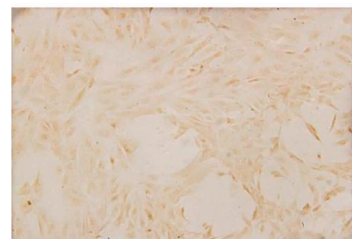


图1 α -actin抗体鉴定心肌细胞(免疫组化, ×200)

Fig. 1 Identification of cardiomyocytes with α -actin antibody (IHC, ×200)

3.2 Ang II对心肌细胞蛋白总含量的影响 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II干预心肌细胞48 h后, Ang II模型组心肌细胞总蛋白含量较空白组明显增加($P < 0.05$), 心肌细胞肥大模型建立。见表1。

表 1 Ang II 对 H9C2 心肌细胞蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

Table 1 Effect of Ang II on H9C2 cardiomyocyte protein content ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

组别	浓度/mol·L ⁻¹	心肌细胞总蛋白/mg·L ⁻¹
空白	-	0.392 ± 0.158
Ang II 模型	10 ⁻⁷	0.610 ± 0.136 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾P < 0.05。

3.3 对各组细胞形态的影响 经不同干预措施作用 48 h 后,正常心肌细胞心态为成肌细胞样,贴壁生长,肥大心肌细胞形态和密度增大,漂浮细胞增多。见图 2。

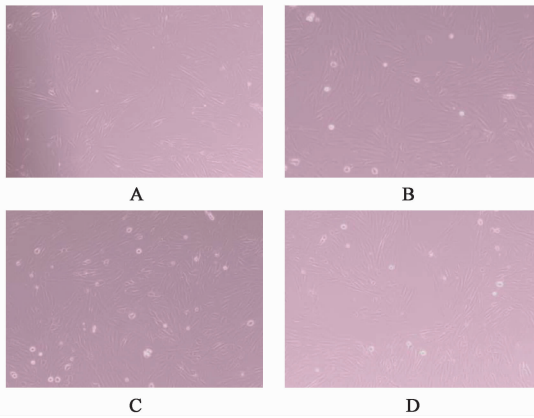


图 2 Ang II 对心肌细胞形态的影响(倒置显微镜, × 200)
A. 空白组; B. 1 × 10⁻⁷ mol·L⁻¹ Ang II 模型组; C. 阻断剂组; D. 含药血清组(图 3 同)

Fig. 2 Effect of Ang II on morphology of cardiomyocytes (inverted microscope, × 200)
A. blank control; B. 1 × 10⁻⁷ mol·L⁻¹ Ang II model group; C. blocker group; D. drug serum group (same as Fig. 3)

表 2 当归补血汤对心肌细胞 p-Akt, Akt, p-eNOS, eNOS 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Danggui Buxuetang on p-Akt, Akt, p-eNOS and eNOS protein expressions in cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	Akt/GAPDH	p-Akt/GAPDH	eNOS/GAPDH	p-eNOS/GAPDH
空白	-	1.041 ± 0.037	0.988 ± 0.016	0.603 ± 0.031	0.425 ± 0.044
Ang II 模型	1 × 10 ⁻⁷ mol·L ⁻¹	0.725 ± 0.082 ¹⁾	0.573 ± 0.038 ¹⁾	0.428 ± 0.034 ¹⁾	0.389 ± 0.029
LY294002 阻断剂	15 μmol·L ⁻¹	0.404 ± 0.054 ²⁾	0.563 ± 0.071 ²⁾	0.369 ± 0.015 ²⁾	0.363 ± 0.015
含药血清	10%	0.957 ± 0.054 ³⁾	0.809 ± 0.045 ³⁾	0.527 ± 0.018 ³⁾	0.369 ± 0.033

注:与空白组比较¹⁾P < 0.05; 与含药血清组比较²⁾P < 0.05; 与模型组比较³⁾P < 0.05。

表 3 当归补血汤对心肌细胞培养液中 NO 浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Danggui Buxuetang on NO in cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度	NO/μmol·L ⁻¹
空白	-	88.8 ± 14.7
Ang II 模型	1 × 10 ⁻⁷ mol·L ⁻¹	78.9 ± 14.2
阻断剂	15 μmol·L ⁻¹	73.7 ± 13.1
含药血清	10%	80.2 ± 15.0

配伍的组方为元代医家李东垣所创,始载于《内外伤辨惑论·暑伤胃气论》中,两者合用共同发挥补气、活血补血之功。《慢性心力衰竭中西医结合

3.4 对心肌细胞 p-Akt, Akt, p-eNOS, eNOS 蛋白表达的影响 各组细胞相应干预 48 h 后, Ang II 模型组较空白组 p-Akt, Akt, eNOS 蛋白表达减弱 (P < 0.05), 10% 含药血清组较模型组 p-Akt, Akt, eNOS 蛋白表达增加 (P < 0.05); 阻断剂组较 10% 含药血清组的作用 p-Akt, Akt, eNOS 蛋白表达降低 (P < 0.05)。见表 2。

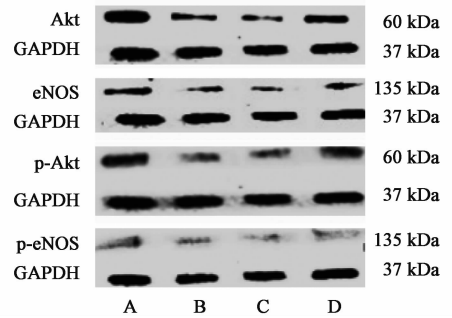


图 3 当归补血汤对心肌细胞 p-Akt, Akt, p-eNOS, eNOS 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of Danggui Buxuetang on p-Akt, Akt, p-eNOS and eNOS protein expressions in cardiomyocytes

3.5 对细胞培养液中 NO 浓度的影响 Ang II 模型组较空白组 NO 含量减少, 10% 含药血清组较 Ang II 模型组 NO 含量增加, 阻断剂组可消减 10% 含药血清组的作用, 但均无统计学差异。见表 3。

4 讨论

当归补血汤在临床广泛应用, 以黄芪-当归 5:1

诊疗专家共识^[11]指出, 慢性心衰为本虚标实之证, 心气亏虚为发病之本, 其病机主要概括为“虚”、“瘀”、“水”, 治疗大法主要是益气、活血、利水。但中药复方制剂的理化特点不宜直接进行体外细胞培养研究, 用含药血清进行体外药理实验, 可以排除由于中药粗制剂直接加入体外实验系统对实验造成的干扰^[12]。故本实验按照血清药理学方法制备当归补血汤含药血清干预体外心肌细胞, 探讨其对心肌细胞肥大的保护作用及机制。

心肌肥大发生的基础是心肌蛋白增多, 心肌细胞体积增大, 心肌细胞在细胞外肥大刺激信号的

作用下可诱发心肌细胞发生肥大变化^[13]。Ang II被公认为是促心肌肥大因子^[14]。有研究发现,Ang II可引起PI3K/Akt/eNOS信号通路损伤,导致心肌肥厚^[15]。PI3K激活促使其下游Akt发生磷酸化而参与信号转导,在心血管系统,PI3K/Akt信号通路对调节血管再生、心肌细胞凋亡、代谢等都有重要作用,这些生理过程和功能均与心衰有着密切的联系^[16]。有研究发现心肌受损大鼠给予高剂量人参皂苷Rg₁后,PI3K,Akt,p-Akt蛋白表达增强,说明人参皂苷Rg₁可能通过PI3K/Akt通路来促进eNOS mRNA表达,增加NO生成而保护心肌^[17]。近年来,NO已成为心脏重塑的重要调节剂^[18]。β₃-肾上腺素受体参与改变的糖尿病性心肌病中β-肾上腺素受体刺激的正性肌力反应,其作用是由NOS衍生的NO在糖尿病心肌细胞中介导^[19]。

本研究发现Ang II模型组较空白组蛋白量增多,心肌细胞肥大模型建立;Ang II模型组较空白组Akt,p-Akt,eNOS表达减少,当归补血汤含药血清组较Ang II模型组p-Akt,Akt,eNOS表达增加,PI3K通路的阻断剂LY294002可消减当归补血汤含药血清的作用,说明当归补血汤通过激活PI3K/Akt/eNOS途径减轻Ang II诱导的心肌细胞肥大,发挥保护心肌的作用。而p-eNOS蛋白表达各组间无统计学差异,其可能因实验误差或受细胞信号通路网络调节模式影响,有其他信号通路对p-eNOS有激活或抑制而抵消了当归补血汤含药血清的作用。本研究发现各组细胞培养液NO浓度比较无统计学意义,但就此不能证实NO在心肌细胞及肥大心肌细胞中无任何作用。有研究显示NO加重了缺氧心肌细胞的损害,一定浓度范围内NO可能具有直接的细胞保护效应^[20]。NO或许有双重特性,其很大程度上依赖于浓度的高低和所作用的细胞类型。当归补血汤通过调控PI3K/Akt信号通路对心肌细胞起保护作用,而NO在肥大心肌细胞中的作用和机制还需进一步研究。

[参考文献]

[1] LI Z, WANG J, YANG X. Functions of autophagy in pathological cardiac hypertrophy [J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(6): 672-678.
[2] 中华医学会心血管分会,《中华心血管病杂志》编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2014 [J]. *中华心血管病杂志*, 2014, 42(2): 98-122.
[3] Glennon P E, Sugden P H, Poole-Wilson P A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy [J]. *Br Heart J*, 1995, 73(3): 496-499.

[4] 曾宇,张三印,胡冠英. 当归补血汤的研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(2): 422-424.
[5] 王嫔,李丹,田昕. 当归补血汤对衰老心肌梗死大鼠冠状动脉侧枝血管生成的影响及其机制 [J]. *中药材*, 2016, 39(7): 1651-1653.
[6] 徐厚谦,高军太,颜春鲁. 当归补血汤对心衰大鼠血浆脑钠肽及左室射血分数的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(4): 123-125.
[7] Toshinori A, Takashi M. Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure [J]. *Curr Pha Des*, 2011, 17(18): 1818-1824.
[8] LING Y, XIANG W, QI Z T. Cardiac-specific mindin overexpression attenuates cardiac hypertrophy via blocking Akt/GSK3β and TGF-β₁-Smad signalling [J]. *Cardi Res*, 2011, 92(1): 85-94.
[9] 韩冬,朱凯,刘苗. 人参二醇组皂苷对血浆血管紧张素 II 诱导心肌细胞肥大的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(23): 5920-5922.
[10] 徐厚谦,孙艳,孙樱丹. 当归补血汤含药血清对 Ang II 诱导的心肌细胞凋亡的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(4): 16-18.
[11] 中国中西医结合学会心血管病专业委员会,中国医师协会中西医结合医师分会心血管病学专家委员会. 慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识 [J]. *心脑血管病防治*, 2016, 16(5): 340-347.
[12] 薛洁,谢梅林. 中药血清药理学的方法学研究近况 [J]. *中草药*, 2003, 34(6): 106-108.
[13] 雷升萍,王靓,龙子江. 原代心肌细胞肥大损伤模型的研究概述 [J]. *国际药学研究杂志*, 2016, 43(3): 441-444.
[14] 余良主,李敏才,余同辉. 川芎嗪对血管紧张素 II 诱导心肌细胞肥大的影响及其机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(20): 154-157.
[15] WEN Y, ZHANG X J, MA Y X, et al. Erythropoietin attenuates hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes induced by angiotensin- II *in vitro* [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2009, 69(4): 518-525.
[16] 范亮亮,马立宁,彭元亮. PI3K/Akt 信号通路与心力衰竭 [J]. *生命科学研究*, 2015, 19(1): 85-90.
[17] 冷雪,臧安缘,李其芳. 人参皂苷 Rg₁ 通过 PI3K/Akt/eNOS 信号通路调控异肾肾上腺素致急性心肌缺血大鼠心肌的抗氧化作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(11): 145-150.
[18] KAI C W, Drexler H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis [J]. *Heart Fail Rev*, 2002, 7(4): 317-325.
[19] Amour J, Loyer X, Guen M L. Altered contractile response due to increased β₃-adrenoceptor stimulation in diabetic cardiomyopathy the role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide [J]. *Anesthesiology*, 2007, 107(3): 452-460.
[20] 张铭,黄跃生,张琼. 不同浓度 NO 对缺氧心肌细胞损害的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(11): 1017-1019.

[责任编辑 张丰丰]