doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2021.08.001

·论著·

丹参酮ⅡA在低氧诱导肺动脉高压中的保护作用

刘礼姣,邱庆竹,郑均敏,谢利剑(上海交通大学附属儿童医院,上海市儿童医院,上海 200062)

[摘要]**目的**:通过低氧诱导肺动脉高压(PAH)小鼠及细胞模型,探讨丹参酮ⅡA(TanⅡA)对PAH的疗效及可能的作用机制。**方法**:选取15只C57BL6雄性小鼠随机分为常氧组、低氧组及低氧+TanⅡA组各5只。4周后采用右心导管法检测小鼠右心室压力,行肺组织氧化苏木精伊红染色法(HE)染色,采用硫代巴比妥酸(TBA)法和WST-8法检测肺组织中丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)水平。取肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)随机分为常氧组、低氧组和低氧+TanⅡA组,24 h后采用蛋白免疫印迹(WB)实验检测Bax、P62、Akt及P-Akt蛋白表达水平。**结果**:与常氧组小鼠比较,低氧组右心室收缩压升高($P<0.05$);与低氧组小鼠比较,低氧+TanⅡA组右心室收缩压降低($P<0.05$)。低氧组较常氧组肺血管明显重构,与低氧组比较,低氧+TanⅡA组肺血管重构程度减轻;与常氧组比较,低氧组肺组织中SOD活性下降,MDA含量增加($P<0.05$);与低氧组比较,低氧+TanⅡA组小鼠肺组织中SOD活性增加,MDA含量降低($P<0.05$)。与常氧组比较,低氧组PASMCs中Bax蛋白表达降低,P62蛋白表达增加($P<0.05$);与低氧组比较,低氧+TanⅡA组PASMCs中Bax蛋白表达增加,P62蛋白表达降低($P<0.05$)。与常氧组比较,低氧组PASMCs中P-Akt/Akt值增加($P<0.05$);与低氧组比较,低氧+TanⅡA组PASMCs中P-Akt/Akt值降低($P<0.05$)。**结论**:TanⅡA具有保护低氧诱导PAH的作用,可能与TanⅡA可降低低氧PAH中氧化应激水平及抑制低氧PASMCs中磷脂酰肌醇-3激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(PI3K/Akt)信号通路的激活,部分逆转低氧状态下PASMCs凋亡的减少,改善PAH中肺血管重构有关。

[关键词]低氧肺动脉高压;丹参酮ⅡA;细胞凋亡与自噬;磷脂酰肌醇-3激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶;氧化应激
[中图分类号]R544.1 [文献标识码]A [文章编号]1672-108X(2021)08-0001-06

Protective Effects of Tanshinone ⅡA in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension

Liu Lijiao, Qiu Qingzhu, Zheng Junmin, Xie Lijian (*Children's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Children's Hospital of Shanghai, Shanghai* 200062, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To probe into the efficacy and possible mechanism of tanshinone ⅡA (TanⅡA) on pulmonary hypertension (PAH) through hypoxia-induced PAH mice and cell model. **Methods**: Totally 15 cases of C57BL6 male mice were randomly divided into the normoxia group, the hypoxia group, and the hypoxia+TanⅡA group, with 5 cases in each group. After 4 weeks, right ventricular pressure was detected by right cardiac catheter. Hematoxylin-Eosin (HE) staining of lung tissue was performed. Levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in lung tissue were detected by the thiobarbituric acid (TBA) method and WST-8 method. Pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) were randomly divided into the normoxia group, hypoxia group and hypoxia+TanⅡA group. After 24 h, Western blotting (WB) was used to detect the protein expression levels of Bax, P62, Akt and P-Akt. **Results**: Compared with the normoxia group, the right ventricular systolic blood pressure in the hypoxia group increased ($P<0.05$). Compared with the hypoxia group, the right ventricular systolic blood pressure in the hypoxia+TanⅡA group decreased ($P<0.05$). Compared with the hypoxia group, the pulmonary vascular remodeling in the hypoxia group was significantly remodeled. Compared with the hypoxia group, the degree of pulmonary vascular remodeling in the hypoxia+TanⅡA group decreased. Compared with the normoxia group, SOD activity in lung tissue of the hypoxia group decreased, and MDA levels increased ($P<0.05$). Compared with the hypoxia group, SOD activity in lung tissue of the hypoxia+TanⅡA group increased, while MDA levels decreased ($P<0.05$). Compared with the normoxia group, the expression of Bax protein in PASMCs of the hypoxia group decreased, and the expression of P62 protein increased ($P<0.05$). Compared with the hypoxia group, the expression of Bax protein in PASMCs of the hypoxia+TanⅡA group increased, and the expression of P62 protein decreased ($P<0.05$). Compared with the normoxia group, P-Akt/Akt of PASMCs in the hypoxia group increased ($P<0.05$). Compared with the hypoxia group, P-Akt/Akt of PASMCs in the hypoxia+TanⅡA group decreased ($P<0.05$). **Conclusion**: The protective effects of TanⅡA in hypoxia-induced PAH may be related to the fact that TanⅡA can decrease the level of oxidative stress in hypoxia-induced PAH and inhibit the activation of phosphatidylinositol-3 kinase/serine/threonine protein kinase (PI3K/Akt) signaling pathway in PASMCs, partially reverse the reduction of apoptosis in PASMCs under hypoxia and improve the pulmonary vascular remodeling in PAH.

[**Keywords**] hypoxia-induced pulmonary hypertension; tanshinone ⅡA; cell apoptosis and autophagy; phosphatidylinositol-3 kinase/serine/threonine protein kinase; oxidative stress

肺动脉高压(PAH)是一种病因复杂、高致死性进行性的心血管疾病,主要表现为逐渐升高的肺动脉压力,最终可导致肺血管重构、右心室肥大和功能衰竭,甚至死亡[1]。肺动脉细胞尤其是肺动脉平滑肌细胞(pulmo-

基金项目:上海市卫计委中医药事业发展三年行动计划项目,编号ZY(2018-2020)-FWTX-3023。
作者简介:刘礼姣(1992.01-),女,硕士,主要从事儿童心血管疾病研究,E-mail:409396564@qq.com。
通讯作者:谢利剑(1977.06-),男,博士,主任医师,主要从事儿童心血管疾病研究,E-mail:naijileix@aliyun.com。

nary aterial smooth muscle cells, PASMCs)无序增殖增加和凋亡减少引起的肺血管重塑是 PAH 发生发展的重要病理基础[2]。目前,临床上广泛应用的靶向药物治疗,如前列环素类、内皮素受体拮抗剂、磷酸二酯酶抑制剂等不能从根本上逆转肺血管重构,对 PAH 的疗效并不理想,因此,关于 PAH 的临床诊治依然极具挑战性。

丹参酮ⅡA(tanshinone ⅡA, TanⅡA)是丹参中含量丰富的脂溶性活性药理成分,具有扩张冠状动脉血管、改善微循环、保护心脏、减少和清除血小板聚集、增强机体抗缺氧能力、拮抗脂质过氧化和清除自由基等重要作用。研究[3-5]发现,TanⅡA 通过促进肿瘤细胞凋亡及影响其自噬与增殖发挥良好的抗肿瘤活性。TanⅡA 通过降低细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 P27 蛋白降解,使细胞周期停止在 G0/G1 期,抑制 PASMCs 增殖,但 TanⅡA 对 PASMCs 自噬与凋亡的影响目前尚不明确[6]。研究[7]显示,经典的抗凋亡通路磷脂酰肌醇-3 激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(phosphatidylinositol-3-kinase/Akt, PI3K/Akt)在自噬中也发挥着重要调控作用。因此,本研究通过建立低氧诱导 PAH 小鼠及细胞模型,分析 TanⅡA 对 PAH 的治疗作用,并初步探讨 TanⅡA 对低氧诱导的 PAH 中 PI3K/Akt 信号通路及自噬和凋亡的影响。

1　材料和方法

1.1　试剂和仪器

C57BL6 雄性小鼠 15 只(8 周龄,体质量 22 ~ 25 g,上海 SLAC 实验动物有限公司),TanⅡA(10 mg,纯度≥97%,美国 Sigma,加入 1 mL 二甲基亚砜将其充分溶解,配制成浓度为 10 mg/mL 的原液),二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma),BCA 蛋白浓度检测试剂盒(北京 BLKW Biotechnology),RIPA 裂解液、总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒、脂质氧化(MDA)检测试剂盒(上海碧云天生物技术公司),常压低氧实验箱(长沙长锦科技有限公司),测氧仪(浙江建德电化学仪器厂),PowerLab Systerm 电生理信号采集仪、聚乙烯导管(AD Instruments 公司),人肺动脉平滑肌细胞(hPASMCs,美国 Sciencell),平滑肌细胞培养基、平滑肌细胞生长因子、青霉素/链霉素溶液(双抗,美国 Sciencell),胎牛血清(北京 Solarbio),无酚红细胞培养基(DMEM,美国 Gibco),胰蛋白酶消化液(北京 Solarbio),聚丙烯酰胺凝胶预混液(上海碧云天生物技术公司),预染蛋白 Marker(美国 Thermo Fisher),Loading Buffer 及 ECL 化学发光试剂盒(新赛美生物科技公司),兔抗鼠磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(英国 CST),兔抗鼠 Bax 多克隆抗体(一抗,美国 Proteintech Group),兔抗鼠 P62 抗体(一抗,美国 CST 公司),兔抗鼠 Akt 抗体(一抗)及兔抗鼠磷酸化 Akt(Phosphorylated-Akt, P-Akt)抗体(一抗,美国 CST 公司),辣根过氧化酶标记二抗(山羊抗兔,英国 CST 公司),二氧化碳培养箱(日本 SANYO),三气培养箱(美国 Thermo Scientific)。

1.2　实验方法

1.2.1　低氧动物模型建立及分组　取 15 只 8 周龄 C57BL6 雄性小鼠,体质量 22 ~ 25 g,适应性饲养 1 周后,随机分为 3 组:常氧组($n=5$)、低氧组($n=5$)和低氧+TanⅡA 组($n=5$)。常氧组呼吸正常空气,低氧组和低氧+TanⅡA 组置于常压低氧箱内,采用测氧仪监测使箱内氧浓度维持在 10.0% ±0.5%,石灰钠和无水氯化钙吸收箱内过量的 CO_2 及水蒸气,将 CO_2 浓度控制在 0.5% 以内,每天低氧 24 h,连续 2 周。2 周后低氧+TanⅡA 组每天腹腔注射 TanⅡA 10 mg/(kg·d),其他两组小鼠腹腔注射磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS),连续 2 周,2 周中低氧组和低氧+TanⅡA 组继续置于低氧环境中,在 4 周造模过程中 3 组小鼠均置于同一房间内,饲养条件相同,每天均自由进食及饮水。

1.2.2　小鼠右心室压力测定、取材及肺组织病理学观察　4 周造模结束后称量小鼠质量,腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(10 μL/g)使小鼠麻醉,待其进入麻醉状态后,取仰卧位用细线固定四肢及门牙在解剖台上,颈部皮肤消毒后进行颈部正中切口,逐层钝性分离肌肉、结缔组织,游离右侧颈外静脉,结扎远心端,动脉夹夹闭近心端,用聚乙烯导管(导管内充满 0.5% 肝素溶液,抗凝血)行右侧颈外静脉插管术,固定导管,导管另一端经压力换能器与 Power Lab 电生理信号采集仪相连,记录右心室收缩压(RVSP)。测压结束后,对小鼠胸腹部皮肤消毒,迅速打开胸腔,充分暴露心、肺等脏器,取装有适量磷酸盐缓冲溶液(PBS)的 5 mL 注射器,用针头迅速刺入右心室,缓慢注入 PBS 进行灌流,然后小心分离心、肺。其中右肺放置于无酶冻存管中后立即置于液氮罐内快速冷却,随后置于 -80 ℃ 低温冰箱内保存,用于后续检测实验,左肺以 4% 甲醛溶液固定 24 h 后,行病理切片及苏木精伊红染色法(HE)染色。

1.2.3　小鼠肺组织中氧化应激相关产物检测　取 -80 ℃ 低温冰箱中冷冻备用的肺组织适量,采用预冷生理盐水冲洗除去血液,吸水纸吸干称质量后迅速置于 1.5 mL 无菌 EP 管中,加入适量 RIPA 裂解液(肺组织质量占裂解液比例为 10%),采用超声波细胞破碎仪充分磨碎后再静置裂解 10 min(以上操作均在冰上进行),10 min 后 10% 肺组织匀浆于 4 ℃ 离心,12 000 r/min,离心 10 min,然后取上清液并转移至新标记好的 1.5 mL EP 管内,采用 BCA 蛋白检测试剂盒测定上清液蛋白浓度。参照试剂盒说明书,分别采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定小鼠肺组织 MDA 水平,WST-8 法测定小鼠肺组织中总 SOD 活性。

1.2.4　PASMCs 培养　PASMCs 采用配制好的 hPASMCs 培养基(由基础平滑肌培养液、2.0% 胎牛血清、0.5% 平滑肌细胞生长因子和 0.5% 青霉素/链霉素双抗混合制成)培养,每 2 天换液 1 次,待细胞生长达 80% ~ 90%,以 0.25% 胰蛋白酶消化分散细胞,离心后重悬,并进行传代培养,传代培养至第 2 ~ 5 代细胞即可用于后续实验。将实验细胞接种于培养皿中,采用不含胎牛血清的无酚红 DMEM 培养基培养 24 h,待细胞同步化后随机分成常氧组($n=3$)、低氧组($n=3$)、低氧+TanⅡA 组($n=3$),TanⅡA 浓度参照文献[8]设定为 5 μg/mL,每组设置 3 个复孔,其中常氧组置于 37 ℃、5% CO_2、95% 空气的培养

箱内培养 24 h；低氧组和低氧+TanⅡA 组放置于 3% O_2、5% CO_2、95% N_2 低氧培养箱内培养 24 h。

1.2.5 免疫印迹法(WB)检测 Bax、P62 及 P-Akt 及 Akt 表达 24 h 培养结束后，将预冷好的 PBS 溶液适量加入“1.2.4”项下 3 组细胞培养皿中，轻轻摇动培养皿后弃去 PBS，以上过程重复 3 次。洗净培养皿内原培养液后，每个培养皿中加入适量含苯甲基磺酰氟(PMSF)的 RIPA 裂解液(1 mL 裂解液中加入 10 μL PMSF)，摇匀后置于冰上裂解 30 min，采用洁净的细胞刮轻轻将细胞完全收刮于培养皿一侧，并用移液枪转移至已标记好的 1.5 mL EP 管内，整个过程在冰上操作。将含有细胞裂解蛋白的 EP 管放入预冷好的离心机内离心 15 min，4 ℃，12 000 r/min，取上清液转移至新的 1.5 mL EP 管内做好标记置于冰上。取上述上清液适量，采用蒸馏水稀释 12.5 倍后进行蛋白浓度测定。取 50 μg 蛋白样品，10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳，200 mA 恒流转膜适当时间，将目的蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上，裁膜后在常温摇床上 5% BSA 封闭缓冲液中封闭 1 h，后将条带分别浸于 Bax(1∶2 000)、P62(1∶1 000)、Akt(1∶1 000)、P-Akt(1∶2 000)的一抗稀释液中 4 ℃冰箱内孵育过夜。洗膜 3 次，每次 10 min，常温下辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗稀释液中孵育 1 h，再洗膜 3 次，每次 10 min。显色液显色后转至暗箱内进行化学发光显影，应用 Image J 软件分析各目的蛋白及内参 GAPDH 的灰度值，两者灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

应用 GraphPad 进行统计学分析，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较采用方差分析，两两比较采用成组 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TanⅡA 对 3 组小鼠 RVSP 的影响

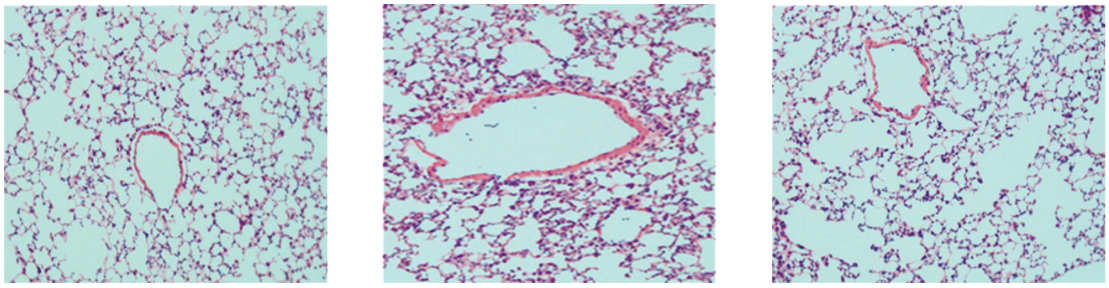
4 周造模结束后，低氧组小鼠意外死亡 1 只，常氧组及低氧+TanⅡA 组小鼠均成功存活。右心导管测压结果显示，与常氧组比较，低氧组小鼠 RVSP 增加($t=9.149$，$P<0.05$)；与低氧组比较，低氧+TanⅡA 组 RVSP 降低($t=2.963$，$P<0.05$)。见表 1。

表 1 TanⅡA 对 3 组小鼠 RVSP 的影响

组别	例数	RVSP/mm Hg
常氧组	5	17.26±0.73
低氧组	4	22.90±1.11
低氧+TanⅡA 组	5	20.86±0.95
F		42.950
P		<0.05

2.2 HE 染色下 3 组小鼠肺组织病理学改变比较

常氧组小鼠肺组织结构正常，肺小动脉具有完整内膜及正常平滑肌肌层组织，管壁周围几乎无炎症细胞浸润。与常氧组比较，低氧组可见肺小动脉内膜不光滑，管壁和平滑肌肌层组织增厚，血管腔减小，管壁周围可见大量炎细胞浸润。与低氧组比较，低氧+TanⅡA 组病理改变减轻，肺小动脉内膜不光滑，管壁和平滑肌肌层组织有一定程度增厚，血管腔减小，管壁周围炎细胞浸润减少，见图 1。



常氧组　　低氧组　　低氧+TanⅡA 组

图 1 HE 染色下 3 组小鼠肺组织病理学改变(×20)

2.3 3 组小鼠肺组织中 MDA 含量及 SOD 活性变化比较

与常氧组比较，低氧组小鼠肺组织中 MDA 含量增加，SOD 活性下降(t 分别为 3.164 及 4.446，P 均<0.05)。与低氧组比较，低氧+TanⅡA 组小鼠肺组织中 MDA 含量减少，SOD 活性增加(t 分别为 2.306 及 3.058，P 均<0.05)。见表 2。

表 2 3 组小鼠肺组织中 MDA 含量及 SOD 活性变化比较

mg/prot

组别	例数	MDA 含量	SOD 活性
常氧组	5	1.00±0.25	1.00±0.25
低氧组	4	1.43±0.20	0.52±0.09
低氧+TanⅡA 组	5	1.12±0.27	0.77±0.18
F		4.647	9.965
P		<0.05	<0.05

2.4 3 组 PASMCs 中 Bax、P62 及 PI3K/Akt 信号通路中 P-Akt 蛋白表达水平比较

与常氧组比较，低氧组 PASMCs 中 Bax 蛋白表达降低，P62 蛋白表达增加(t 分别为 47.930、19.110，P 均<0.05)；与低氧组比较，低氧+TanⅡA 组 PASMCs 中 Bax 蛋白表达增加，P62 蛋白表达降低(t 分别为 4.218、8.700，P 均<0.05)。与常氧组比较，低氧组 PASMCs 中 P-Akt/Akt 值增加($t=7.463$，$P<0.05$)。常氧组与低氧+TanⅡA 组 P-Akt/Akt 值比较差异无统计学意义($t=0.266$，$P>0.05$)。与低氧组比较，低氧+TanⅡA 组 PASMCs 中 P-Akt/Akt 值降低($t=6.906$，$P<0.05$)。见表 3。

3 讨论

PAH 是一个发病机制复杂、起病隐匿的全球性健康

问题,在任何年龄段均可发生,流行病学显示,全球 PAH 发病率约 1%[8]。异常增高的肺血管阻力和肺动脉压力为 PAH 的主要特征,这种压力的持续增高与血管周围炎症反应、PASMCs 增殖异常、肺血管重塑以及血管异常收缩等多种因素相关[9-10]。PAH 的定义为平均肺动脉压>25 mm Hg,正常肺毛细血管楔压<15 mm Hg,且肺血管阻力>3 WU,目前诊断肺动脉高压金标准是右心导管检查[11]。

表 3　3 组 PASMCs 中 Bax、P62 及 PI3K/Akt 信号通路中 P-Akt 蛋白表达水平比较

组别	例数	Bax	P62	P-Akt/Akt
常氧组	3	1.08±0.01	1.32±0.04	0.94±0.05
低氧组	3	0.75±0.01	2.36±0.08	1.17±0.03
低氧+TanⅡA 组	3	0.75±0.01	1.88±0.05	0.95±0.05
F		118.200	215.600	28.740
P		<0.05	<0.05	<0.05

本研究采用慢性低氧性 PAH 模型,选用体型较小,遗传稳定性较高的 C57BL6 小鼠,这种模型是基于薛全福等[12]的研究方法加以改造。低氧性 PAH 主要病理生理特征是肺血管收缩和肺血管重构[13]。本研究结果显示,随着低氧时间延长,低氧组小鼠进食量、进水量、活动量减少,精神状态逐渐变差,但低氧组体质量较常氧组改变不明显;肺组织切片 HE 染色结果提示,与常氧组比较,低氧组肺血管壁和平滑肌肌层组织增厚、血管腔减小、管壁周围大量炎性细胞浸润,提示低氧导致肺血管重构,与国外低氧建立小鼠 PAH 模型结果相似[14]。基于本课题组前期造模方法[15]及右心导管测压、肺组织 HE 染色结果,本研究低氧诱导的小鼠 PAH 模型成功建立。同时,肺组织切片 HE 染色结果提示,与低氧组比较,低氧+TanⅡA 组管壁和平滑肌肌层组织增厚程度减轻、管壁周围炎细胞浸润减少。右心导管测压结果显示,与常氧组比较,低氧组小鼠 RVSP 增加;与低氧组比较,低氧+TanⅡA 组 RVSP 降低,表明 TanⅡA 可改善低氧状态下的肺血管重塑,减轻低氧 PAH 中右心室收缩压。本研究结果显示,低氧组小鼠肺组织中 SOD 活性较常氧组下降,而 MDA 含量增加,低氧+TanⅡA 组小鼠肺组织中 SOD 活性较低氧组增加,MDA 含量降低,提示 TanⅡA 减少低氧 PAH 中氧化应激水平,与既往研究[16]结果一致。有研究[17]显示,氧化应激在 PAH 发生发展中发挥着十分重要的作用。在 PAH 中,SOD 活性下降,氧自由基清除能力下降,MDA 含量增加,并与氧自由基等物质结合,促进 PASMCs 异常增殖,加重肺动脉内皮损伤,同时通过激活基质金属蛋白酶(MMP)参与细胞外基质沉积,促进肺血管重构。因此,本研究中 TanⅡA 通过降低 PAH 中氧化应激水平,减轻低氧 PAH 中肺血管重构,达到治疗 PAH 的作用。

早在 1891 年,Romberg E 等[18]提出 PAH 患者肺部血管存在闭塞性病变和中层增厚现象,ARCHER S L 等[19-21]先后使用来源于 PAH 患者的原代细胞模型或动物模型的数据证明,PAH 中 PASMCs、肺动脉内皮细胞(PAECs)和成纤维细胞中均存在一种增殖失衡,凋亡抵抗的类癌现象。He Y 等[22]通过体外低氧条件下原代 PASMCs 培养发现低氧组 PASMCs 中 Bax 表达低于常氧组。Yang C 等[23]在低氧诱导 PAH 大鼠实验中发现,与对照组比较,低氧组肺组织中细胞凋亡指数下降,通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 mRNA 表达水平发现低氧组肺组织中 Bcl-2 表达高于对照组,而 Bax 表达低于对照组。Lu J Y 等[24]在研究 Na^+/H^+ 交换器-1(NHE-1)抑制剂时发现,NHE-1 抑制通过阻止低氧时 PASMCs 的 Ca^{2+} 增加,导致 Bcl-2 表达降低及 Bax 表达增加从而诱导和促进低氧培养下的 PASMCs 凋亡,表明低氧抑制 Bax/Bcl-2 值增加的促凋亡作用。本研究结果显示,低氧组 PASMCs 中 Bax 表达低于常氧组,与 Lu J Y 等[24]研究一致,低氧环境下 PASMCs 凋亡减少。本研究结果表明,与低氧组比较,低氧+TanⅡA 组 PASMCs 中 Bax 表达增加,提示 TanⅡA 通过改善低氧诱导下 Bax/Bcl-2 值的降低,部分逆转低氧诱导的 PAH 中 PASMCs 凋亡的减少,从而发挥减少低氧 PAH 中肺血管重构的作用。

自噬与凋亡是维持自身稳态的重要生理过程。自噬失调参与多种疾病的发生,近年来自噬在 PAH 中的作用也被广泛研究[25-27],但目前自噬在 PAH 的确切作用尚不明确。有研究[28]显示,激活自噬在 PASMCs 的作用是促增殖的促生存机制,促进肺血管重构。同时,有研究[29-31]发现,自噬在 PAH 患者和缺氧诱导的 PAH 大鼠及小鼠模型的 PASMCs 表达增加,自噬标记蛋白 LC3Ⅱ/Ⅰ值增加,P62 蛋白表达下调。本研究结果显示,低氧组 PASMCs 中 P62 蛋白表达较常氧组增加,与 Li L 等[30]研究结果不一致,可能的原因为:(1)P62 表达水平与细胞密度相关[32],因此,细胞培养初始接种的细胞密度可能影响 P62 的表达差异;(2)氧化损伤可激活红系衍生的核因子 2 相关因子(Nrf2)上调 P62 蛋白的表达保护血管平滑肌细胞[33];(3)可能与 PAH 中自噬呈现动态变化过程有关[34];(4)其他实验条件的不同也可能引起差异(如氧浓度等)。此外,本研究结果显示,低氧+TanⅡA 组 PASMCs 中 P62 蛋白表达较低氧组降低,表明 TanⅡA 显著抑制低氧条件下 PASMCs 中 P62 蛋白的表达。

PI3K/Akt 信号转导通路广泛存在于细胞中,参与细胞生长、增殖、分化等多种生理活动。有研究[35]表明,缺氧激活 PI3K/Akt 信号通路,活化的 PI3K 作用于膜上磷脂产生第二信使,然后使丝氨酸/苏氨酸激酶活化,活化后的 Akt 从细胞质转移到细胞膜上,通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白,包括 Bcl-2 家族蛋白、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9(Caspase 9)等,并通过这些蛋白调节细胞的增殖、凋亡及迁移等。如依赖 PI3K 的 Akt 激活后可使 Bax、丝氨酸(Ser)184 残基磷酸化从而导致 Bax 失活,同时使 Bad 的 Ser136/Serl12 残基磷酸化,导致 Bad 与 Bcl-2 解聚,解聚后的 Bad 与抗凋亡结合蛋白 14-3-3 结合,而解聚后的 Bcl-2 则发挥抗凋亡作用,从而抑制细胞凋亡[36]。

此外,PI3K/Akt 通路参与肺动脉高压中肺血管重构及其进展。Fan Z 等[37]指出 PI3K/Akt 通路参与肺动脉高压中 PASMCs 细胞骨架重排和表型转换,而 PASMCs

表型转换在肺动脉高压进展中发挥着重要作用[38]。Chai X 等[39]发现,低氧通过激活 PI3K/Akt 信号通路诱导 PAH 大鼠肺动脉成纤维细胞增殖、迁移和分化及低氧性肺血管重构。Xia X D 等[40]应用 PI3K 抑制剂及赖氨酸氧化酶抑制剂,可有效抑制低氧诱导的大鼠肺动脉压力升高及肺血管重构。本研究结果显示,低氧组 PASMCs 中 P-Akt/Akt 值高于常氧组,表明低氧激活 PAH 中 PI3K/Akt 信号通路,与既往研究结果一致[22,40]。低氧+TanⅡA 组 PASMCs 中 P-Akt/Akt 值较低氧组降低,提示 TanⅡA 抑制低氧诱导下 PAH 中 PI3K/Akt 信号通路的激活,同时本研究中低氧+TanⅡA 组 PASMCs 中 Bax 表达较低氧组增加,结合前文所述,缺氧激活 PI3K/Akt 信号通路调节细胞凋亡,因此考虑 TanⅡA 可能通过抑制低氧诱导下 PI3K/Akt 信号通路的激活,使促凋亡蛋白 Bax 失活减少,从而部分逆转低氧状态下 PASMCs 凋亡减少,改善低氧 PAH 中肺血管重构。

综上所述,TanⅡA 具有保护低氧 PAH 的作用,可能与 TanⅡA 减轻低氧 PAH 中氧化应激水平及抑制低氧 PASMCs 中 PI3K/Akt 信号通路的激活,部分逆转低氧状态下 PASMCs 凋亡的减少,改善 PAH 中肺血管重构有关。本研究可为临床应用 TanⅡA 治疗 PAH 提供参考。

参考文献:

[1] 蒋晓敏, 周陵, 陈绍良. 肺动脉高压肺血管丛状病变的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(8): 1519-1522.

[2] BOURGEOIS A, OMURA J, HABBOUT K, et al. Pulmonary arterial hypertension: new pathophysiological insights and emerging therapeutic targets [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2018 (104): 9-13. doi: 10.1016/j.biocel.2018.08.015.

[3] CHIU T L, SU C C. Tanshinone ⅡA induces apoptosis in human lung cancer A549 cells through the induction of reactive oxygen species and decreasing the mitochondrial membrane potential [J]. Int J Mol Med, 2010, 25(2): 231-236.

[4] SU C C, LIN Y H. Tanshinone ⅡA inhibits human breast cancer cells through increased Bax to Bcl-xL ratios [J]. Int J Mol Med, 2008, 22(3): 357-361.

[5] DAI Z K, QIN J K, HUANG J E, et al. Tanshinone ⅡA activates calcium-dependent apoptosis signaling pathway in human hepatoma cells [J]. J Nat Med, 2012, 66(1): 192-201.

[6] LUO Y, XU D Q, DONG H Y, et al. Tanshinone ⅡA inhibits hypoxia-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation via Akt/Skp2/p27-associated pathway [J]. PLoS One, 2014, 9 (9): e56774.

[7] CODOGNO P, MEIJER A J. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death [J]. Cell Death Differ, 2005, 12 (Suppl 2): 1509-1518.

[8] HOEPER M M, HUMBERT M, SOUZA R, et al. A global view of pulmonary hypertension [J]. Lancet respiratory medicine, 2016, 4(4): 306-322.

[9] STENMARK K R, MECHAM R P. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling [J]. Annu Rev Physiol, 1997(59): 89-144. doi: 10.1146/annurev.physiol.59.1.89.

[10] SAHARA M, TAKAHASHI T, IMAI Y, et al. New insights in the treatment strategy for pulmonary arterial hypertension [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2006, 20(5): 377-386.

[11] SCHERMULY R T, GHOFRANI H A, WILKINS M R, et al. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension [J]. Nature reviews cardiology, 2011, 8(8): 443-455.

[12] 薛全福, 谢剑鸣, 邵茂刚. 常压缺氧性大鼠肺动脉高压模型的建立[J]. 中国医学科学院学报, 1988, 10(6): 415.

[13] 张凌云. 肺动脉平滑肌细胞与低氧性肺血管重塑形成机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 2(21): 177-181.

[14] AMBALAVANAN N, BULGER A, MURPHY-ULLRICH J, et al. Endothelin-a receptor blockade prevents and partially reverses neonatal hypoxic pulmonary vascular remodeling [J]. Pediatr Res, 2005, 57(5): 631-636.

[15] CHEN J, LI Y, LI Y, et al. Effect of miR-29b on the proliferation and apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells by targeting Mcl-1 and CCND2 [J]. Biomed Res Int, 2018 (2018): 1-10. doi: 10.1155/2018/6051407.

[16] FENG J, LI S, CHEN H. Tanshinone ⅡA inhibits myocardial remodeling induced by pressure overload via suppressing oxidative stress and inflammation: possible role of silent information regulator 1 [J]. Eur J Pharmacol, 2016 (791): 632-639. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.09.041.

[17] 刘斌. 氧化应激和肺动脉高压血管重构[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(6): 539-542.

[18] ROMBERG E. Ueber sklerose der lungen arterie [J]. Dtsch Arch Klin Med, 1891(48): 197-206.

[19] ARCHER S L, GOMBERG-MAITLAND M, MAITLAND M L, et al. Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1alpha-Kv1.5 O2-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 294(2): 570-578.

[20] CARUSO P, DUNMORE B J, SCHLOSSER K, et al. Identification of MicroRNA-124 as a major regulator of enhanced endothelial cell glycolysis in pulmonary arterial hypertension via PTBP1 (polypyrimidine tract binding protein) and pyruvate kinase M2 [J]. Circulation, 2017, 136(25): 2451-2467.

[21] ZHANG H, WANG D, LI M, et al. Metabolic and proliferative state of vascular adventitial fibroblasts in pulmonary hypertension is regulated through a MicroRNA-124/PTBP1 (polypyrimidine tract binding protein 1)/pyruvate kinase muscle axis [J]. Circulation, 2017, 136(25): 2468-2485.

[22] HE Y, CAO X, LIU X, et al. Quercetin reverses experimental pulmonary arterial hypertension by modulating the TrkA pathway [J]. Exp Cell Res, 2015, 339(1): 122-134.

[23] YANG C, WANG S, LIANG T, et al. The roles of bcl-2 gene family in the pulmonary artery remodeling of hypoxia pulmonary hypertension in rats [J]. Chin Med Sci J, 2001, 16(3): 182-184.

[24] LU J Y, YAO W, QIAN G S, et al. Role of bcl-2 and bax expression in apoptosis of hypoxic pulmonary artery smooth muscle cells of rats induced by Na^+/H^+ exchanger isoform-1 inhibition in vitro [J]. Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue, 2004, 16(7): 394-398.

[25] MIZUMURA K, CLOONAN S M, HASPEL J A, et al. The emerging importance of autophagy in pulmonary diseases [J]. Chest, 2012, 142(5): 1289-1299.

[26] PATEL A S, MORSE D, CHOI A M. Regulation and functional significance of autophagy in respiratory cell biology and disease

[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 48(1): 1-9.
[27] FRAIDENBURG D R, YUAN J X. Hungry for more: autophagy in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension [J]. Circ Res, 2013, 112(8): 1091-1093.
[28] CHEN R, JIANG M, LI B, et al. The role of autophagy in pulmonary hypertension: a double-edge sword [J]. Apoptosis, 2018, 23(9-10): 459-469.
[29] LEE S J, SMITH A, GUO L, et al. Autophagic protein LC3B confers resistance against hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(5): 649-658.
[30] LI L, WANG X, WANG L, et al. Mammalian target of rapamycin overexpression antagonizes chronic hypoxia-triggered pulmonary arterial hypertension via the autophagic pathway [J]. Int J Mol Med, 2015, 36(1): 316-322.
[31] MAO M, YU X, GE X, et al. Acetylated cyclophilin A is a major mediator in hypoxia-induced autophagy and pulmonary vascular angiogenesis [J]. J Hypertens, 2017, 35(4): 798-809.
[32] SUGIMOTO R, WARABI E, KATAYANAGI S, et al. Enhanced neointimal hyperplasia and carotid artery remodelling in sequestosome 1 deficient mice [J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(6b): 1546-1554.
[33] ISHII T, ITOH K, RUIZ E, et al. Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal [J]. Circ Res, 2004, 94(5): 609-616.
[34] KATO F, SAKAO S, TAKEUCHI T, et al. Endothelial cell-related autophagic pathways in Sugen/hypoxia-exposed pulmonary arterial hypertensive rats [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017, 313(5): 899-915.
[35] 牛国梁, 张树友. PI3K/Akt 信号传导通路与肿瘤[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(20): 3994-3996.
[36] 张春雨, 张捷. PI3K/Akt 信号通路与肿瘤细胞凋亡相关研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2011, 31(24): 1905-1909.
[37] FAN Z, LI C, QIN C, et al. Role of the PI3K/Akt pathway in modulating cytoskeleton rearrangements and phenotype switching in rat pulmonary arterial vascular smooth muscle cells [J]. DNA Cell Biol, 2014, 33(1): 12-19.
[38] SCHERMULY R T, GHOFRANI H A, WILKINS M R, et al. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension [J]. Nature reviews cardiology, 2011, 8(8): 443-455.
[39] CHAI X, SUN D, HAN Q, et al. Hypoxia induces pulmonary arterial fibroblast proliferation, migration, differentiation and vascular remodeling via the PI3K/Akt/p70S6K signaling pathway [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(5): 2461-2472.
[40] XIA X D, LEE J, KHAN S, et al. Suppression of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling attenuates hypoxia-induced pulmonary hypertension through the downregulation of lysyl oxidase [J]. DNA Cell Biol, 2016, 35(10): 599-606.

（编辑：邓境）
（收稿日期：2020-08-13　修回日期：2021-01-21）

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2021.08.002

·论著·

布洛芬治疗动脉导管未闭的疗效及并发症研究

孙玄，陈玲，周建华，高金枝，胡晓琳（华中科技大学同济医学院附属同济医院，湖北武汉　430030）

[摘要]**目的**：探讨症状性动脉导管未闭（sPDA）与非症状性动脉导管未闭（nsPDA）经药物干预后关闭率及相关并发症的发生率，以便进一步指导临床应用。**方法**：回顾性分析同济医院新生儿科2016年5月至2019年4月收治的胎龄<34周并于生后1周末行超声心动图诊断为动脉导管未闭（PDA）的早产儿252例，根据是否符合sPDA诊断标准，分为sPDA组（94例）和nsPDA组（158例），nsPDA组分为nsPDA-1组（92例）和nsPDA-2组（66例）。sPDA组所有患儿和nsPDA-1组患儿在住院期间均接受了口服布洛芬治疗；nsPDA-2组患儿在住院期间未接受布洛芬治疗。三组患儿于治疗结束后或出院前均复查超声心动图。收集患儿资料，分析三组早产儿动脉导管关闭率和PDA相关并发症的发生情况。**结果**：sPDA组患儿胎龄、出生体质量均小于nsPDA-1组和nsPDA-2组（$P<0.05$），而nsPDA-1组和nsPDA-2组胎龄和出生体质量比较差异均无统计学意义（$P>0.05$）。口服布洛芬治疗后sPDA组与nsPDA-1组分别有52例和81例患儿动脉导管关闭，关闭率为55.3%和88.0%，而nsPDA-2组有54例早产儿动脉导管自然关闭，关闭率为81.8%，sPDA组动脉导管关闭率低于nsPDA-1组和nsPDA-2组（$P<0.05$），而nsPDA-1组和nsPDA-2组关闭率比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。sPDA组肺炎、早产儿支气管肺发育不良（BPD）、喂养不耐受、坏死性小肠结肠炎（NEC）及颅内出血（IVH）的发生率高于nsPDA-1组和nsPDA-2组（$P<0.05$），而nsPDA-1组和nsPDA-2组上述并发症发生率比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。sPDA组和nsPDA-1组的肾损伤发生率比较差异无统计学意义（$P>0.05$），但均高于nsPDA-2（$P<0.05$）。**结论**：早产儿胎龄越小、出生体质量越低，出现sPDA可能性越大；sPDA早产儿1周后口服布洛芬关闭PDA的疗效较nsPDA早产儿差，并较后者更容易出现早产儿相关并发症（肺炎、BPD、喂养不耐受、NEC及IVH）。

[关键词]动脉导管未闭；布洛芬；早产儿；并发症
[中图分类号]R722.1　　[文献标识码]A　　[文章编号]1672-108X(2021)08-0006-05

基金项目：湖北省卫生计生科研项目，编号WJ2019M125。
作者简介：孙玄（1992.07-），女，博士，主要从事新生儿疾病研究，E-mail：514366627@qq.com。
通讯作者：陈玲（1964.01-），女，博士，教授，主要从事新生儿疾病研究，E-mail：chenling@tjh.tjmu.edu.cn。