

麻杏苧苧合剂干预肺心病急性发作模型小鼠肺组织重构和肺血管重塑相关因子的表达

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.2952>

李松桃, 李欣奕, 宋云峰, 宁加银, 任强, 杨仁旭, 彭波

2095-4344.2952

投稿日期: 2020-01-09

送审日期: 2020-01-14

采用日期: 2020-03-07

在线日期: 2020-07-31

中图分类号:

R446; R496; R318

文章编号:

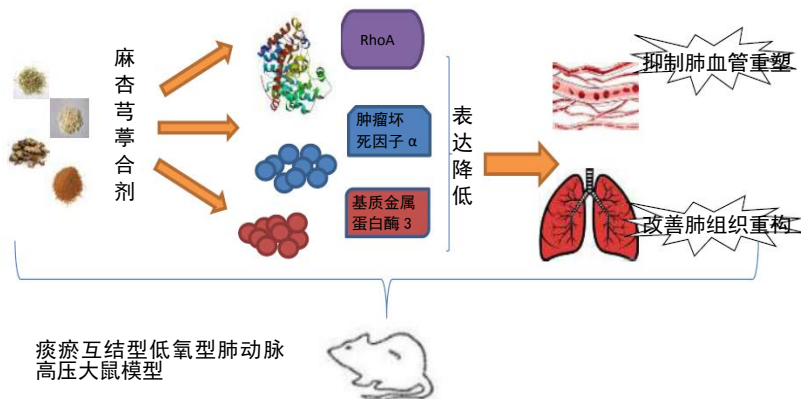
2095-4344(2021)02-00274-07

文献标识码: B

文章快速阅读:

文章创新性一

采用野百合碱溶液腹腔注射、烟熏、游泳的复合因素模拟痰瘀互结型低氧性肺动脉高压大鼠是可行的。



文题释义:

麻杏苧苧合剂: 为四川省名老中医杨仁旭主任医师40多年临证经验总结, 依据《伤寒论》中“葶苈大枣泻肺汤”结合《太平惠民和剂局方》中“麻杏汤”加减化裁, 由麻黄、川芎、葶苈子、杏仁四药组成, 针对低氧性肺动脉高压的基本病机: 痰瘀互结、肺失宣降, 具有良好的临床效果。

低氧性肺动脉高压: 由缺氧引起的以肺血管结构重建与肺动脉压升高为特征的疾病, 主要病理表现为肺动脉内皮细胞功能紊乱、中膜平滑肌细胞增殖和细胞外基质沉积, 使得肺动脉血管壁病理性增厚, 肺动脉血管压力上升, 最终致使右心室肥厚, 是慢性阻塞性肺疾病向肺心病发展的关键环节。

摘要

背景: 低氧性肺动脉高压是慢性阻塞性肺疾病向肺心病发展的关键环节, 其严重程度与疾病发展及预后密切相关, 目前的治疗不能预防或逆转疾病进展, 而在临床应用麻杏苧苧合剂对痰瘀互结型低氧性肺动脉高压疗效显著。

目的: 探究麻杏苧苧合剂对痰瘀互结型低氧性肺动脉高压大鼠肺组织重构和肺血管重塑相关因子的调节作用。

方法: 将70只5周龄SD大鼠随机分为空白对照组10只, 其余60只大鼠诱发建立大鼠肺心病急性发作期动物模型(1%野百合碱溶液50 mg/kg腹腔注射)后, 先后将大鼠置于烟熏箱模拟吸烟环境、强迫游泳装置建立大鼠痰瘀互结模型, 每周6 d, 连续4周。造模结束后, 剩余46只大鼠根据体重正态分布情况, 挑选40只随机分为模型组10只, 麻杏苧苧高剂量组10只, 阳性药物法舒地尔组10只, 麻杏苧苧低剂量组10只。麻杏苧苧高剂量、低剂量组分别予以麻杏苧苧合剂20, 5 g/(kg·d), 法舒地尔组予以法舒地尔10 mg/(kg·d), 空白对照组和模型组用等量生理盐水, 均采用灌胃、腹腔注射联合给药, 每天1次, 连续14 d。采用RT-PCR检测肺组织重构和肺血管重塑相关因子RhoA、间质溶素1及肿瘤坏死因子 α mRNA表达。实验方案经成都中医药大学伦理委员会批准(伦理编号: 2017-03)。

结果与结论: ①与模型组相比, 麻杏苧苧高剂量组RhoA、间质溶素1及肿瘤坏死因子 α 的基因表达均降低(均 $P < 0.05$), 法舒地尔组RhoA及肿瘤坏死因子 α 基因表达降低(均 $P < 0.05$), 间质溶素1基因表达明显降低($P < 0.01$), 麻杏苧苧低剂量组RhoA、间质溶素1及肿瘤坏死因子 α 基因表达差异均无显著性意义; 麻杏苧苧高剂量组与法舒地尔组RhoA、间质溶素1及肿瘤坏死因子 α 的基因表达差异无显著性意义($P > 0.05$); ②结果说明, 麻杏苧苧合剂可通过抑制RhoA、间质溶素1、肿瘤坏死因子 α 的mRNA表达干预痰瘀互结型低氧性肺动脉高压大鼠模型的肺组织重构和肺血管重塑, 与法舒地尔效果相似。

关键词: 麻杏苧苧合剂; 低氧性肺动脉高压; RhoA; 肿瘤坏死因子 α ; 间质溶素1; 肺组织重构; 肺血管重塑

Maxing Xiongtong Mixture regulates factors relevant to lung reshaping and vascular remodeling of hypoxic pulmonary hypertension rats

Li Songtao, Li Xinyi, Song Yunfeng, Ning Jiayin, Ren Qiang, Yang Renxu, Peng Bo

Affiliated Hospital / Clinical Medical College of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China

Li Songtao, Affiliated Hospital / Clinical Medical College of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China

Corresponding author: Peng Bo, MD, Associate professor, Affiliated Hospital / Clinical Medical College of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China

成都中医药大学附属医院 / 临床医学院, 四川省成都市 610075

第一作者: 李松桃, 男, 1996年生, 四川省绵阳市人, 汉族, 成都中医药大学七年制中西医临床医学专业在读, 主要从事中西医防治内科疾病研究。

通讯作者: 彭波, 博士, 副教授, 成都中医药大学附属医院 / 临床医学院, 四川省成都市 610075

<https://orcid.org/0000-0002-6297-5351> (李松桃)

基金资助: 四川省科技厅苗子工程(2018RZ0126), 项目负责人: 彭波; 成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划

(QNXX2019042), 项目负责人: 彭波; 成都中医药大学附属医院基金(18PY15), 项目负责人: 彭波

引用本文: 李松桃, 李欣奕, 宋云峰, 宁加银, 任强, 杨仁旭, 彭波. 麻杏苧苧合剂干预肺心病急性发作模型小鼠肺组织重构和肺血管重塑相关因子的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(2):274-280.

中国组织工程研究, 2021, 25(2):274-280.



Abstract

BACKGROUND: Hypoxic pulmonary hypertension is a key link in the progression from chronic obstructive pulmonary disease to cor pulmonale. Its severity is closely related to disease development and prognosis. Current treatments cannot prevent or reverse disease progression. *Maxing Xiongting* Mixture has significant effect on hypoxic pulmonary hypertension with the syndrome of intermingled phlegm and blood stasis.

OBJECTIVE: To study how the *Maxing Xiongting* Mixture regulates relevant factors of lung reshaping and vascular remodeling of hypoxic pulmonary hypertension rats with the syndrome of intermingled phlegm and blood stasis.

METHODS: Seventy Sprague-Dawley rats, 5 weeks old, were randomly divided into normal group ($n=10$) and model group ($n=60$), where acute cor pulmonale model was prepared by injecting 50 mg/kg monocrotaline solution (1%) intraperitoneally, followed by forced smoking and swimming 6 days a week lasting for 4 weeks. Except for 10 rats in the normal group, there were 46 model rats in the model group. According to the normal distribution of body mass, 40 rats were selected and randomly divided into 4 groups: model group, high-dose *Maxing Xiongting* Mixture group (MH), low-dose *Maxing Xiongting* Mixture group (ML) and fasudil group, with 10 rats in each group. Rats in MH and ML groups were respectively given *Maxing Xiongting* Mixture at 20 g/(kg·d) and 5 g/(kg·d), respectively and those in the fasudil group were given fasudil at a dose of 10 mg/(kg·d). Other groups were given equal amount of saline. Administration was given intraperitoneally and intragastrically, once a day for 14 days in total. RT-PCR was used to test the expression of factors related to lung reshaping and vascular remodeling, including RhoA, stromelysin 1 and tumor necrosis factor- α mRNAs. An approval for the study was obtained from the Ethics Committee of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (approval No. 2017-03).

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the model group, the expressions of RhoA, stromelysin 1, and tumor necrosis factor- α mRNAs were significantly lowered in the MH group (all $P < 0.05$); the mRNA expressions of RhoA ($P < 0.05$), stromelysin 1 ($P < 0.01$) and tumor necrosis factor- α ($P < 0.05$) were significantly reduced in the fasudil group; and no significant changes in the above expressions of relevant factors were found in the ML group ($P > 0.05$). To conclude, *Maxing Xiongting* Mixture, which is similar to fasudil, intervenes lung reshaping and vascular remodeling of hypoxic pulmonary hypertension rats with the syndrome of intermingled phlegm and blood stasis by inhibiting the expressions of RhoA, stromelysin 1, and tumor necrosis factor- α mRNAs.

Key words: *Maxing Xiongting* Mixture; hypoxic pulmonary hypertension; RhoA; tumor necrosis factor- α ; stromelysin 1; lung reshaping; vascular remodeling

Funding: the Seed Engineering Plan of Sichuan Provincial Science and Technology Department, No. 2018RZ0126 (to PB); "Xinglin Scholar" Discipline Talent Culture Program of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, No. QNXZ2019042 (to PB); the Fund of the Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, No. 18PY15 (to PB)

How to cite this article: LI ST, LI XY, SONG YF, NING JY, REN Q, YANG RX, PENG B. *Maxing Xiongting* Mixture regulates factors relevant to lung reshaping and vascular remodeling of hypoxic pulmonary hypertension rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(2):274-280.

0 引言 Introduction

低氧性肺动脉高压以肺组织相对缺氧为关键因素导致肺血管重塑、肺动脉压力增高，最终引起右心室肥厚、右心衰竭为特征，呈进行性地发展，是慢性肺心病发病机制中的中心环节^[1]。低氧性肺动脉高压发生发展机制涉及细胞因子、体液介质与分子遗传等多个层次的路径因素相关^[1]。

中医的角度认为低氧性肺动脉高压的基本病机为^[2]：痰瘀互结、肺气壅滞，敛降失司，其病理因素主要为痰浊、水饮、血瘀，三者之间互结转化，痰瘀交阻是慢性阻塞性肺疾病发展为肺心病的基本病理改变之一，其治法为“宣肺逐瘀、化痰行水”，方拟麻杏苈葶合剂。该方为四川省名老中医杨仁旭主任医师 40 多年临证经验总结，依据“葶苈大枣泻肺汤”（《金匱要略》）结合“麻杏汤”（《太平惠民和剂局方》）中加减化裁，由麻黄、川芎、葶苈子、杏仁组成，在临床上对痰瘀互结型低氧性肺动脉高压有着明显的疗效。因此，此次实验以麻杏川苈合剂来探究对于痰瘀互结证低氧性肺动脉高压大鼠肺组织重构和肺血管重塑的相关因子的调节作用，为麻杏苈葶合剂防治低氧性肺动脉高压提供科学依据和实验基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 2018 年 9 月至 12 月在成都中医药大学中医脏腑病证实验室地点完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 70 只 SPF 级 5 周龄雄性 SD 大鼠，体质量 (145±5) g，购自成都达硕实验动物有限公司，合格证号：SCXK(川)2015-030，在成都中医药大学中医脏腑病证实验室分笼饲养，实验动物使用许可证号：SYXK(川)2015-179。研究按照成都中医药大学实验动物中心的指导原则进行动物饲

养、护理和所有实验。全程 SPF 级环境喂养，自由饮食、饮水，饲养温度 (25±1)℃，湿度 (55±5)%，12 h/12 h 昼夜循环交替，按照国际相关实验动物法规实施动物福利。动物饲料（合格证号：SCXK(川)2015-030）由成都达硕实验动物有限公司提供。实验期间每只大鼠给予普通饲料 15 g/d。

1.3.2 实验药物

中药组：麻杏苈葶合剂由炙麻黄 10 g、杏仁 15 g、川芎 15 g、葶苈子 30 g 组成。实验使用的麻杏苈葶合剂（四川新绿制药公司免煎制剂）由成都中医药大学临床医学院（附属医院）免煎药房提供。药物批号如下炙麻黄：17050110，苦杏仁：17110086，川芎：170500113，炒葶苈子：17110192。

阳性药物对照组：盐酸法舒地尔注射液（四川美大康佳乐药业有限公司，批准号：H20123424，生产批号：17010771，规格：2 mL/30 mg）由成都中医药大学临床医学院（附属医院）提供。

1.3.3 主要试剂及仪器 TRIZOL(美国 Invitrogen 公司，批号：17596-026)；反转录试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司，批号：RR047A)；宝生物染料法荧光定量试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司，批号：RR820A)；无水乙醇(AR 级，成都科龙化工试剂有限公司，批号：170515)；异丙醇(上海生物工程技术有限公司，批号：20170901)；氯仿(成都科龙化工试剂有限公司，批号：170922)；移液枪(大龙兴创实验仪器(北京)有限公司)；电泳仪(DYY-6C，美国 Bio-RAD 公司)；实时荧光定量仪(RT-PCR)(PIKORed 96，美国 ThermoFisher 仪器有限公司)；Thermo 多功能酶标仪(MK3，美国 ThermoFisher 仪器有限公司)；低温离心机(C2500，湖南湘仪实验仪器厂)；超低温冰箱(MDF-U50V，日本 Sanyo 公司)；热循环仪(TCA0096，美国 ThermoFisher 仪器有限公司)；高速低温离心机(TGL-16G-A，上海安亭科仪器厂)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物模型的制备及干预方法 采用复合因素建立病理结合的低氧性肺动脉高压动物模型^[3]。除空白对照组(10只,给予体积分数95%乙醇和生理盐水按2:8配成混合液,50 mL/kg腹腔注射)外,其余大鼠建立大鼠肺源性心脏病急性发作期动物模型(1%野百合碱溶液50 mg/kg,腹腔注射)后^[4],将大鼠置于自制体积为55.5 cm×37.0 cm×22.5 cm的熏烟箱内,每天30 min,每次8支香烟(每支含焦油14 mg、烟碱1.1 mg、CO 14 mg),再将大鼠放入深度为35 cm的动物强迫游泳装置强迫游泳,每日30 min,迫使大鼠劳累而耗伤肺气,每周6 d,连续4周,每日观察大鼠进食、活动、饮水、大便等一般情况。

造模结束后,模型组因为操作失误和病情加重,大鼠死亡14只,剩余46只。根据大鼠体质量正态分布情况,随机分为4组,每组10只:模型组、麻杏苧萆高剂量组、麻杏苧萆低剂量组、法舒地尔组;空白组继续喂养。采用双模拟方式(灌胃+腹腔注射)给药,第14天开始用药,每天1次,连续14 d。中药等效剂量:依据大鼠的体表面积,计算出麻杏苧萆合剂的等效剂量为10 g/(kg·d),将之视为药物中剂量,分别设置中药高剂量组[20 g/(kg·d)]和低剂量组[5 g/(kg·d)]。法舒地尔等效剂量:根据临床常用的使用剂量60 mg/d计算,大鼠的等效剂量为10 mg/(kg·d)。空白组及模型组注射10 mL/(kg·d)生理盐水灌胃+腹腔注射,法舒地尔组给予10 mg/(kg·d)法舒地尔腹腔注射+生理盐水灌胃,麻杏苧萆高剂量组及麻杏苧萆低剂量分别给予20 g/(kg·d)、5 g/(kg·d)麻杏苧萆合剂灌胃+生理盐水腹腔注射。

1.4.2 取材 在最后一次给药后24 h,用2%的戊巴比妥钠溶液,按2.5 mL/kg腹腔注射麻醉大鼠成功后,从股动脉放血致死。剖开大鼠胸腔,使用穿刺针以恒定速度注入40-50 mL冰灭菌生理盐水进行灌洗肺部组织,以止血钳分别封闭左、右两侧肺门,剪切左、右肺叶。左肺置入冻存管后,即刻放入超低温的液氮,等待实验结束,将冻存管从液氮之中捞出,再将其放置于超低温冰箱,-80℃以下保存,待用。使用40 g/L多聚甲醛溶液固定右肺中叶,制作石蜡切片。

1.4.3 苏木精-伊红染色 ①脱蜡、水化:先后使用二甲苯5 min×3次,体积分数100%,95%,80%的乙醇各5 min,0.85%氯化钠溶液中浸泡5 min,PBS清洗洗5 min;②染核:切片入苏木素染3-8 min,自来水洗后,用1%的盐酸乙醇分化数秒,自来水冲洗,0.6%氨水返蓝,流水冲洗;③染质:切片入伊红染液中染色1-3 min。④脱水封固:将切片依次放入体积分数70%,80%,90%,95%和100%乙醇各5 min、二甲苯I 5 min,二甲苯II 5 min。稍晾干后用中性树胶封固;⑤在明场下进行拍摄、光学显微镜400倍镜下观察:每只大鼠需选择其相通的肺组织进行横向苏木精-伊红染色及制作弹力纤维染色切片,使用光镜观察肺小动脉的形态学变化。每张切片选取随机6条伴行呼吸性细支气管且横截面较完整的肺小动脉,观察血管外层、中层、内层的组成结构变化。

实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	探究麻杏苧萆合剂对痰瘀互结型低氧性肺动脉高压大鼠肺组织重构和肺血管重塑相关因子的调节作用
借鉴已有标准:	参考文献[3]采用复合因素建立病理结合的低氧性肺动脉高压
施动物造模:	动物模型
动物来源及品系:	SD雄性大鼠购自成都达硕实验动物有限公司
模型与所研究疾病的关系:	按照病理结合造模,先后建立肺心病急性发作期模型、低氧性肺动脉高压模型,建成痰瘀互结型低氧性肺动脉高压大鼠模型,符合临床低氧性肺动脉高压痰瘀互结证的特点
造模技术描述:	痰瘀互结型低氧性肺动脉高压模型大鼠的建立:①腹腔注射1%野百合碱溶液50 mg/kg诱发建立大鼠肺心病急性发作期动物模型;②将大鼠置于烟熏箱模拟吸烟环境、强迫游泳装置建立大鼠痰瘀互结模型
造模主要诱导用药:	1%野百合碱溶液;香烟(焦油含量14 mg、烟碱含量1.1 mg、CO含量14 mg/支)
动物数量及分组方法:	大鼠随机分为5组:模型组n=10;麻杏苧萆高剂量组n=10;麻杏苧萆低剂量组n=10;法舒地尔组n=10;空白组n=10
造模成功评价指标:	从病理学和形态学角度进一步证实了此次痰瘀互结证的低氧性肺动脉高压大鼠病理结合模型造模成功
造模后实验观察指标:	①苏木精-伊红染色和PAS染色组织学观察;②各组大鼠肺组织RhoA、间质溶素1及肿瘤坏死因子α mRNA的表达
造模过程中动物死亡原因:	模型组因为操作失误和病情加重,大鼠死亡12只
造模后动物处理:	各组最后一次给药后24 h,麻醉大鼠,剪切左、右肺叶,待检测
伦理委员会批准:	实验方案经成都中医药大学伦理委员会批准(伦理编号:2017-03)

1.4.4 PAS染色 ①石蜡切片脱蜡至水:依次将切片放入二甲苯I 20 min-二甲苯II 20 min-无水乙醇I 5 min-无水乙醇II 5 min-体积分数75%乙醇5 min,然后用自来水洗涤;②高碘酸染色:切片入高碘酸染液中染色15 min,自来水洗、蒸馏水洗2遍;③雪弗染色:切片入雪弗染液30 min,避光,流水冲洗5 min;④苏木素染色:切片入苏木素染液染3-5 min,自来水洗,分化液分化,自来水洗,返蓝液返蓝,流水冲洗;⑤脱水封固:切片依次放入无水乙醇I 5 min-无水乙醇II 5 min-无水乙醇III 5 min-二甲苯5 min-二甲苯II 5 min透明,中性树胶封固;⑥显微镜镜检,图像采集分析。

1.4.5 反转录-聚合酶链反应检测 各组大鼠肺组织RhoA、间质溶素1、肿瘤坏死因子α mRNA的表达

(1)RNA的提取、DNA除去反应、反转录反应:用Trizol法提取肺组织总RNA后,依次加入5×gDNA Eraser Buffer(2 μL)、gDNA Eraser(1 μL)、Total RNA(1 μL)、RNase Free dH₂O(6 μL)在42℃进行基因组DNA的除去反应2 min。后在PCR仪上进行反转录反应:依次加入5×PrimeScript Buffer 2(4 μL)、PrimeScript RT Enzyme Mix I(1 μL)、RT Primer Mix(1 μL)、RNA(10 μL)、RNase Free dH₂O(4 μL)。

(2)引物设计:用Primer Premier软件根据NCBI数据库选择所需特异性引物,设计合成(上海生工生物工程技术有限公司)并以ULTRAPAGE纯化。引物序列见表1。

表 1 | 引物及碱基序列

Table 1 | Primer and base sequences

基因	上游	下游	长度 (bp)
间质溶素 1	GCC TCC CTG AAA CCG TCC AGA AGA T	ACT CCA ACT GTG AAG ATC CGC TGA AG	234
RHOA	CCA GAG GTT TAT GTG CCC ACG GTG TT	CTC CCG CCT TGT GTG CTC ATC ATT CC	300
肿瘤坏死因子 α	CCA GCC AGG AGG GAG AAC AGC AAC T	CCG CCA CGA GCA GGA ATG AGA AGA G	261

(3) 实时荧光定量 PCR 反应: 反应体系: SYBR Primix Ex Taq II (2×)(10 μL)、PCR Forward Primer(0.4 μmol/L, 0.8 μL)、PCR Reverse Primer(0.4 μmol/L, 0.8 μL)、cDNA (2.0 μL)ddH₂O (6.4 μL); PCR 反应程序: 经过预变性 (95 °C 30 s)、变性 (95 °C 5 s)、退火 (55 °C 30 s)、延伸 (72 °C 30 s) 共进行 40 个循环。

(4)mRNA 表达: 在 Thermo Scientific PikoReal 软件下 (Thermo 公司) 计算出 RT-PCR 过程中各样本的 Cycle Threshold(CT) 值。实验室通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 X 相对 mRNA 表达水平:

$$\Delta CT_i = CT_{i \text{ 目的}} - CT_{i \text{ 内参}},$$

$$\Delta CT_b = CT_{b \text{ 目的}} - CT_{b \text{ 内参}},$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_i - \Delta CT_b,$$

XmRNA 表达差异倍数以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示

注: CT_i : $CT_{\text{intervention}}$; CT_b : CT_{blank}

1.5 主要观察指标 各组大鼠肺组织 RhoA、间质溶素 1 及肿瘤坏死因子 α 的基因表达。

1.6 统计学分析 使用 SPSS 23.0 软件统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 其随机独立样本数据需进行正态性检验以及方差齐性检验。如果结果符合正态分布, 总体方差齐性, 比较多组样本均数采用单因素方差分析; 对于总体非正态分布, 方差明显不齐的资料采用秩和分析, 多组独立样本比较采用 Kruskal-Wallis 单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义, $P < 0.01$ 表示差异有非常显著性意义。

2 结果 Results

2.1 大鼠死亡情况 实验用药期间, 除空白组外, 每组大鼠均有大鼠死亡, 死亡数量共计 12 只。死亡阶段主要在实验前 4 d 和后 3 d。通过对死亡大鼠的尸体解剖, 发现 3 只大鼠由于灌胃操作意外死亡, 9 只大鼠由于实验后期病情加重引起的肺损伤 (表 2)。剩余大鼠数量为: 空白组 ($n=10$)、模型组 ($n=6$)、麻杏苧苳低剂量组 ($n=7$)、麻杏苧苳高剂量组 ($n=7$)、法舒地尔组 ($n=8$)。根据各组剩余大鼠数量, 每组随机挑选 6 只大鼠送检及分析结果。

2.2 模型评价

2.2.1 苏木精-伊红染色病理学观察 观察各组大鼠肺组织发现: ①空白组: 各级支气管和结构正常、支气管纤毛上皮排列整齐, 肺泡腔内未见渗出物质、肺泡间隔均匀, 肺间质无明显炎症细胞浸润 (见图 1A, B)。②低氧性肺动脉高压模型组: 各级支气管的结构正常, 支气管纤毛上皮排列齐整, 血管周围存在少量炎症细胞浸润, 大量肺动脉变性、增厚甚至坏

表 2 | 给药期间大鼠死亡情况统计

(n)

Table 2 | Death of rats during administration

组别	初始大鼠数量	灌胃操作意外	实验中病情加重	剩余大鼠数量
空白组	10	0	0	10
模型组	10	1	3	6
麻杏苧苳低剂量组	10	0	3	7
麻杏苧苳高剂量组	10	1	2	7
法舒地尔组	10	1	1	8

死, 肺部实质化, 气管、支气管堵塞, 肺毛细血管扩张充血、出血明显, 组织间质嗜酸性物质增多, 肺泡上皮坏死、脱落, 坏死区域可见脱落的肺上皮细胞、粉染的纤维样物质和溢出的红细胞 (见图 1C, D)。

2.2.2 PAS 染色形态学观察 模型组大鼠肺组织中可观察到阳性细胞, 存在于肺泡腔中, 同时能见到炎症细胞和巨噬细胞, 肺泡腔内充满红细胞和炎症细胞, 部分肺泡腔内充满大量的类蛋白质沉积。证明肺组织中存在炎症改变, 同时可见大量渗出和蛋白质沉积, 说明实验动物模型肺组织中存在大量痰液物质 (见图 2)。

2.3 RT-PCR 检测 各组大鼠肺组织中可见 Rho 激酶信号通路上关键蛋白 RhoA 的表达及间质溶素 1、肿瘤坏死因子 α 关键细胞因子的表达 见图 3。

2.3.1 各组大鼠肺组织中 RhoA 基因表达比较 与空白组相比, 模型组大鼠肺组织中 RhoA 基因表达明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 麻杏苧苳低剂量组大鼠肺组织中 RhoA 基因表达无明显差异; 与模型组相比, 麻杏苧苳高剂量组、法舒地尔组大鼠肺组织中 RhoA 基因表达降低 ($P < 0.05$); 麻杏苧苳高剂量组与法舒地尔组相比 RhoA mRNA 表达差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 | 各组大鼠肺组织中 RhoA、间质溶素 1、肿瘤坏死因子 α mRNA 表达比较 [$\bar{x} \pm s$, $n=6$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (基因表达值)]

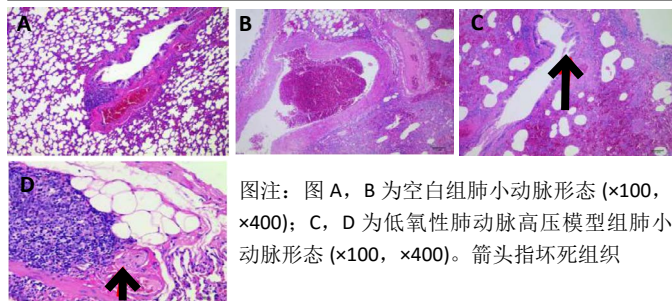
Table 3 | Comparison of RhoA, stromelysin 1 and tumor necrosis factor-α mRNA expression in lung tissue of rats

组别	RhoA mRNA	间质溶素 1 mRNA	肿瘤坏死因子 α mRNA
空白组	1.022±0.253	1.013±0.172	1.007±0.120
模型组	2.420±1.142 ^a	1.618±0.398 ^a	1.648±0.358 ^a
麻杏苧苳低剂量组	1.602±0.794	1.440±0.247	1.480±0.418
麻杏苧苳高剂量组	1.297±0.528 ^b	1.250±0.150 ^b	1.227±0.186 ^b
法舒地尔组	1.278±0.775 ^b	1.170±0.241 ^c	1.212±0.342 ^b

表注: 与空白组相比, ^a $P < 0.01$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。

2.3.2 各组大鼠肺组织中间质溶素 1 基因表达比较 与空白组相比, 模型组大鼠肺组织中间质溶素 1 基因表达明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 麻杏苧苳高剂量组大鼠肺组织中间质溶素 1 基因表达降低 ($P < 0.05$), 法舒地尔组大鼠肺组织中间质溶素 1 基因表达明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 麻杏苧苳低剂量组大鼠肺组织中间质溶素 1 基因表达无明显差异; 麻杏苧苳高剂量组与法舒地尔组相比, 间质溶素 1 基因表达差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

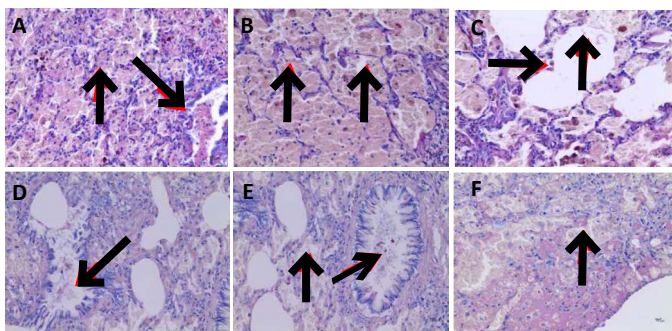
2.3.3 各组大鼠肺组织中肿瘤坏死因子 α 基因表达比较 与空白组相比, 模型组大鼠肺组织中肿瘤坏死因子 α 表达明显



图注：图 A, B 为空白组肺小动脉形态 ($\times 100$, $\times 400$)；C, D 为低氧性肺动脉高压模型组肺小动脉形态 ($\times 100$, $\times 400$)。箭头指坏死组织

图 1 | 大鼠肺小动脉病理学改变 (苏木精 - 伊红染色)

Figure 1 | Pathological changes of rat pulmonary arterioles (hematoxylin-eosin staining)



图注：图 A-F 可见阳性细胞、炎症细胞、巨噬细胞，肺泡腔内充满红细胞，部分肺泡腔内充满大量的类蛋白质沉积 (箭头指阳性细胞)

图 2 | 低氧性肺动脉高压模型组大鼠肺组织 PAS 染色形态学观察 ($\times 400$)

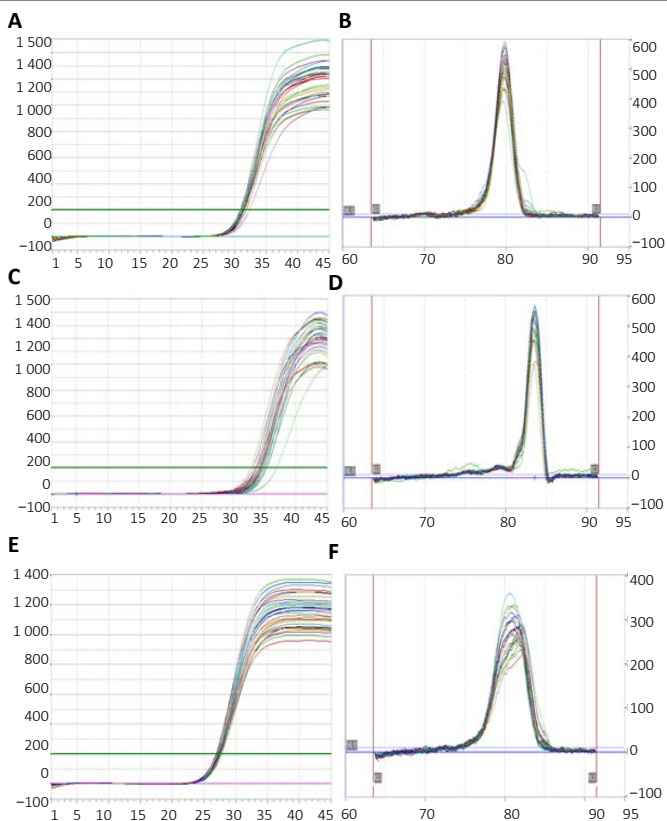
Figure 2 | Morphological observation of lung tissue in hypoxic pulmonary hypertension rat models (PAS staining, $\times 400$)

升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比，麻杏苧苧低剂量组大鼠肺组织中肿瘤坏死因子 α 基因表达差异无显著性意义；与模型组相比，麻杏苧苧高剂量组、法舒地尔组大鼠肺组织中肿瘤坏死因子 α 基因表达降低 ($P < 0.05$)；麻杏苧苧高剂量组与法舒地尔组相比肿瘤坏死因子 α 基因表达无明显差异 ($P > 0.05$)。见表 3。

3 讨论 Discussion

3.1 造模结果 模型组在肺部病理改变的基础上，苏木精 - 伊红染色结果符合低氧性导致的肺部病理改变和肺小动脉变化的标志性特征，即出现肌型小动脉中膜肥厚，内膜下出现纵行肌束，无肌型细动脉肌化；肺小动脉炎，弹力，胶原纤维增生，血栓形成机化；肺泡壁毛细血管数量显著减少。PAS 染色证明肺组织中存在炎症改变，同时可见大量渗出和蛋白质沉积，说明实验动物模型肺组织中存在大量痰液物质。同时按照中医辨证理论，该模型有痰和瘀的病理因素，符合痰瘀互结的证型模型。以上结果从病理学和形态学角度进一步证实了此次痰瘀互结证的低氧性肺动脉高压大鼠病证结合模型造模成功。

3.2 麻杏苧苧合剂对肺组织 RhoA mRNA 的调控 Rho/ROCK 信号转导通路可以提高血管肌层的平滑肌细胞的收缩能力^[5]，促进肺血管收缩，对肺动脉高压期间肺血管结构起关键作用^[6-10]。由于内环境慢性缺氧，组织细胞迁移和增殖造成其远端肌肉化，最终重塑肺部血管组织结构。而 Rho/ROCK 通路在调节肺动脉



图注：图 A, B 分别为间质溶素 1 扩增曲线和熔解曲线；C, D 分别为 RHOA 扩增曲线和熔解曲线；E, F 分别为肿瘤坏死因子 α 扩增曲线和熔解曲线

图 3 | 各组大鼠肺组织 RT-PCR 检测结果图

Figure 3 | RT-PCR results of rat lung tissue

平滑肌细胞增殖和凋亡促进肺血管结构重建、参与右心结构和功能改变^[11-12]。Rho/ROCK 信号传导通路在低氧性肺动脉高压的发生、形成、发展中有明确的调控作用^[13]。近期有研究发现，RhoA / ROCK 信号通路的抑制可通过依赖缺氧诱导因子 1 的功能性规范瞬时受体电位离子通道改善低氧性肺动脉高压^[14]。

法舒地尔作为一种新型异喹啉磺胺衍生物，是一种有效的 Rho 激酶抑制剂，能抑制细胞内游离钙离子的活动，同时能扩张肺部血管，阻断低氧性肺动脉高压进程^[15]，也可显著减少大鼠内皮素 1 水平，提高低氧性肺动脉高压大鼠一氧化氮水平，抑制肺动脉高血压发展^[16]。

此次研究发现，与模型组相比，麻杏苧苧高剂量组、法舒地尔组大鼠肺组织中 RhoA 基因表达降低 ($P < 0.05$)，且 2 组大鼠肺组织中 RhoA 基因表达无明显差异性 ($P > 0.05$)。说明高剂量麻杏苧苧合剂和阳性药法舒地尔对低氧性肺动脉高压大鼠肺组织 Rho/ROCK 信号通路具有调节作用，且二者作用无明显差异。麻杏苧苧合剂可能通过抑制低氧性肺动脉高压大鼠肺组织中的 RhoA mRNA 的表达抑制血管平滑肌细胞过度分裂增殖、阻止肺血管重建的作用^[17-18]。

3.3 麻杏苧苧合剂对低氧性肺动脉高压肺组织重构细胞因子的调节

3.3.1 肿瘤坏死因子 α 的调控 肿瘤坏死因子 α 具有加速炎

症细胞黏附、浸润及游走,促使气道重构和气流阻塞,甚至引起肺损伤的作用,其水平的变化与慢性阻塞性肺疾病发生发展有密切联系,对于病情评估、治疗效果和预后判断有重要意义^[19]。此次研究发现,麻杏苈葶高剂量组、法舒地尔组大鼠肺组织中肿瘤坏死因子 α 基因表达降低($P < 0.05$),且2组相比,肿瘤坏死因子 α 基因表达无明显差异($P > 0.05$)。说明2种药物都能通过抑制肿瘤坏死因子 α 分泌达到阻止继续发生气道炎症及其发展,重塑气道结构和改善气流阻塞、改善肺损伤、最终抑制低氧性肺动脉高压的作用^[20-21]。

3.3.2 对间质溶素1的调控 基质金属蛋白酶是近年被提出参与慢性阻塞性肺疾病发病的候选基因,它在肺组织重构、维持蛋白酶和抗蛋白酶的平衡中发挥着重要作用^[22-23],基质金属蛋白酶3(间质溶素1)可能参与了肺组织和肺血管的重构,能介导急性肺损伤的发生^[24-25],与肺癌、肺气肿及其他肺部疾病的介导关系密切^[26]。

实验结果表明,与模型组相比,麻杏苈葶高剂量组大鼠肺组织中间质溶素1表达降低($P < 0.05$),法舒地尔组大鼠肺组织中间质溶素1基因表达明显降低($P < 0.01$);麻杏苈葶高剂量组与法舒地尔组相比,间质溶素1基因表达无明显差异($P > 0.05$)。说明麻杏苈葶合剂高剂量和法舒地尔可以通过抑制间质溶素1在肺组织的表达,防治细胞外基质的过度降解,改善降解与合成过程,抑制气道重塑^[27],从而达到阻断低氧性肺动脉高压模型大鼠气道重塑和肺血管重构的作用。

3.4 小结 此次实验,创新地采用野百合碱溶液腹腔注射、烟熏、游泳的复合因素模拟痰瘀互结型低氧性肺动脉高压大鼠是可行的,从气道重塑和肺血管重构调控因子入手,为麻杏苈葶合剂治疗痰瘀互结型低氧性肺动脉高压提供了科学依据。实验结果发现:低剂量的麻杏苈葶合剂对RhoA mRNA、间质溶素1基因、肿瘤坏死因子 α 表达无明显调节作用。而高剂量麻杏苈葶合剂和阳性对照药法舒地尔对低氧性肺动脉高压大鼠肺组织中的RhoA、间质溶素1 mRNA表达、肿瘤坏死因子 α 表达具有明显的调节作用。一方面说明高剂量麻杏苈葶合剂可能通过抑制低氧性肺动脉高压大鼠肺组织中的RhoA mRNA的表达抑制血管平滑肌细胞过度分裂增殖、阻止肺血管重建的作用^[17-18];另一方面能抑制肿瘤坏死因子 α 、间质溶素1等细胞因子的表达,达到降低炎症细胞黏附、浸润及游走,降低气道炎症的发生与发展,抑制降解间质蛋白,减轻气道结构重塑和减轻气流阻塞,减轻肺损伤的作用。且与西药组间对比,疗效无差异,但在临床使用中,法舒地尔存在很多不良反应,如:颅内、消化道的出血、低血压等^[28],麻杏苈葶合剂与法舒地尔有着相似的抑制肺气道重构和肺血管重塑的作用,而不良反应更小,为中西医结合治疗低氧性肺动脉高压提供思路和方法。

麻杏苈葶合剂,主以麻黄宣肃肺气,止咳平喘之功效;臣以苦杏仁止咳平喘,一宣一降,宣肺与肃肺并施,使得肺恢复“宣五谷味,熏肤、充身、泽毛,若雾露之溉”之功,

佐以葶苈子泻肺中痰饮浊邪,通利小便,津液得下,改善肺的水液代谢功能,使津行气化,以除病之“标实”。“久病入络、久病入血”,佐以川芎“上达头目,下行血海,中开郁结,旁通络脉,为血中之气药”,能行血中之气滞,行气与活血并行,气血同治,全方具有宣肺与肃肺同施,气血同治,气血津液兼顾的配伍特点,共奏“宣肺逐瘀、化痰行水”之功。

麻杏苈葶合剂有效成分是以麻黄碱、苦杏仁苷、川芎嗪、葶苈子总黄酮为主。现代药理学研究表明:麻黄碱通过促进肾上腺素和去甲肾上腺素释放来发挥肾上腺素作用^[29],直接兴奋 α -受体,收缩末梢血管改善气管黏膜水肿,同时兴奋 β -受体,松弛支气管平滑肌,一定程度上能够抑制肺部水肿的形成,改善肺动脉高压,在一定程度上能阻断向慢性阻塞性肺疾病发展。苦杏仁苷被分解后可产生微量的氢氰酸,抑制呼吸运动使其趋于平缓,实现镇咳平喘的作用^[30-33]。川芎嗪可通过调节 Ca^{2+} /钙调蛋白/钙调蛋白激酶II β 同时抑制 Ca^{2+} 内流并促进胞内 Ca^{2+} 的释放,减少胞内 Ca^{2+} 浓度使血管舒张^[34];另一方面经MAPK信号转导通路,使细胞外调节蛋白激酶(Extracellular Regulated Protein Kinases, ERPK)水平下调,改善气道平滑肌细胞的增生,抑制肺组织重构^[35]。体外实验证实,川芎嗪可显著上调蛋白激酶B和肉皮型一氧化氮合酶磷酸化水平,增加一氧化氮的浓度,舒张血管^[36]。葶苈子总黄酮对血小板活化因子诱导大鼠气道平滑肌增殖抑制作用明显。即南葶苈子有效部位总黄酮可通过抑制气道平滑肌细胞的增殖来阻止气道重塑^[37]。

综上所述,结合前期科研团队研究,在痰瘀互结型低氧性肺动脉高压大鼠模型中应用麻杏苈葶合剂可抑制血管平滑肌细胞过度分裂增殖、阻止肺血管重塑^[38],降低气道间炎症性反应,改善肺组织重构,可调节肺组织中的RhoA、肿瘤坏死因子 α 、间质溶素1 mRNA表达,效果与法舒地尔相似,而不良反应更小。

作者贡献: 实验设计为第一作者,实验实施为第二、三作者,实验评估为第四、五作者,资料收集为第一、二作者,第一作者成文,第六作者指导、通讯作者评估实验及审校。采用盲法评估:隐去组别、采用双人、背对背独立评估。

经费支持: 该文章接受了“四川省科技厅苗子工程(2018RZ0126);成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划(QNXZ2019042);成都中医药大学附属医院基金(18PY15)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经成都中医药大学伦理委员会批准(伦理编号:2017-03)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] SARODE R, BALLAS SK, GARCIA A, et al. Red blood cell exchange: 2015 American Society for Apheresis consensus conference on the management of patients with sickle cell disease. *J Clin Apher*. 2017; 32(5): 342-367.
- [2] 郑莉莉, 王婕琼, 李泽庚. “肺络微型瘤瘕”与慢性阻塞性肺疾病肺血管重构的相关性 [J]. *长春中医药大学学报*, 2017, 33(1): 7-9.
- [3] 李泽庚, 王传博, 彭波, 等. 慢性阻塞性肺疾病痰瘀阻肺证大鼠模型的建立 [J]. *天津中医药*, 2010, 27(1): 43-45.
- [4] 李俊山, 龙超良, 崔文玉, 等. 野百合碱诱导大鼠肺动脉高压及肺源性心脏病的病理生理特征 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2012, 28(3): 193-196.
- [5] IKEDA S, SATOH K, KIKUCHI N, et al. Crucial role of rho-kinase in pressure overload-induced right ventricular hypertrophy and dysfunction in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014; 34(6): 1260-1671.
- [6] LIU WH, XU XH, LUO Q, et al. Inhibition of the RhoA/Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase-1 pathway is involved in the therapeutic effects of simvastatin on pulmonary arterial hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2018; 40(3): 224-230.
- [7] WU F, YAO W, YANG J, et al. Protective effects of aloperin on monocroline-induced pulmonary hypertension via regulation of Rho A/Rho kinase pathway in rats. *Biomed Pharmacother*. 2017; 95: 1161-1168.
- [8] CHEN IC, TAN MS, WU BN, et al. Statins ameliorate pulmonary hypertension secondary to left ventricular dysfunction through the Rho-kinase pathway and NADPH oxidase. *Pediatr Pulmonol*. 2017; 52(4): 443-457.
- [9] GIEN J, TSENG N, SEEDORF G, et al. Endothelin-1-Rho kinase interactions impair lung structure and cause pulmonary hypertension after bleomycin exposure in neonatal rat pups. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016; 311(6): L1090-L1100.
- [10] WALKER J, UNDEM C, YUN X, et al. Role of Rho kinase and Na⁺/H⁺ exchange in hypoxia-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and migration. *Physiol Rep*. 2016; 4(6). pii: e12702.
- [11] FUKUMOTO Y, YAMADA N, MATSUBARA H, et al. Double-blind, placebo-controlled clinical trial with a rho-kinase inhibitor in pulmonary arterial hypertension. *Circ J*. 2013; 77(10): 2619-2625.
- [12] STORCK EM, WOJCIAK-STOTHARD B. Rho GTPases in pulmonary vascular dysfunction. *Vascul Pharmacol*. 2013; 58(3): 202-210.
- [13] CHEN XY, DUN JN, MIAO QF, et al. Fasudil hydrochloride hydrate, a Rho-kinase inhibitor, suppresses 5-hydroxytryptamine-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation via JNK and ERK1/2 pathway. *Pharmacology*. 2009; 83(2): 67-79.
- [14] WANG XY, MO D, TIAN W, et al. Inhibition of RhoA/ROCK signaling pathway ameliorates hypoxic pulmonary hypertension via HIF-1 α -dependent functional TRPC channels. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2019; 369: 60-72.
- [15] FEDIUJ J, GUTSOL A, NOLETTE N, DAKSHINAMURTI S. Thromboxane-induced actin polymerization in hypoxic pulmonary artery is independent of Rho. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012; 302(1): L13-26.
- [16] SUN XZ, LI SY, TIAN XY, et al. Effect of Rho kinase inhibitor fasudil on the expression ET-1 and NO in rats with hypoxic pulmonary hypertension. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2019; 71(1): 3-8.
- [17] WOJCIAK-STOTHARD B. New drug targets for pulmonary hypertension: Rho GTPases in pulmonary vascular remodelling. *Postgrad Med J*. 2008; 84(993): 348-353.
- [18] MAIR KM, MACLEAN MR, MORECROFT I, et al. Novel interactions between the 5-HT transporter, 5-HT_{1B} receptors and Rho kinase in vivo and in pulmonary fibroblasts. *Br J Pharmacol*. 2008; 155(4): 606-616.
- [19] 张俊志, 李涵葳, 张中军, 等. TNF- α 在先天性体-肺分流性肺动脉高压大鼠中的表达变化 [J]. *华中科技大学学报 (医学版)*, 2018, 47(4): 445-449.
- [20] FUJITA M, MASON RJ, COOL C, et al. Pulmonary hypertension in TNF-alpha-overexpressing mice is associated with decreased VEGF gene expression. *J Appl Physiol* (1985). 2002; 93(6): 2162-2170.
- [21] LEI Y, ZHEN J, MING XL, et al. Induction of higher expression of IL-beta and TNF-alpha, lower expression of IL-10 and cyclic guanosine monophosphate by pulmonary arterial hypertension following cardiopulmonary bypass. *Asian J Surg*. 2002; 25(3): 203-208.
- [22] WETZL V, TIEDE SL, FAERBER L, et al. Plasma MMP2/TIMP4 Ratio at Follow-up Assessment Predicts Disease Progression of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Lung*. 2017; 195(4): 489-496.
- [23] WANG JJ, ZUO XR, XU J, et al. Evaluation and Treatment of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in Right Ventricular Dysfunction during Monocrotaline-Induced Rat Pulmonary Arterial Hypertension. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2016; 30(6): 587-598.
- [24] HOFFMANN J, MARSH LM, PIEPER M, et al. Compartment-specific expression of collagens and their processing enzymes in intrapulmonary arteries of IPAH patients. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015; 308(10): L1002-1013.
- [25] KAUR G, SINGH N, LINGESHWAR P, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase-1: an emerging target in right ventricle dysfunction associated with pulmonary hypertension. *Pulm Pharmacol Ther*. 2015; 30: 66-79.
- [26] BIASIN V, MARSH LM, EGEMNAZAROV B, et al. Meprin β , a novel mediator of vascular remodelling underlying pulmonary hypertension. *J Pathol*. 2014; 233(1): 7-17.
- [27] TIEDE SL, WASSENBERG M, CHRIST K, et al. Biomarkers of tissue remodeling predict survival in patients with pulmonary hypertension. *Int J Cardiol*. 2016. 223: 821-826.
- [28] YASUDA T, TADA Y, TANABE N, et al. Rho-kinase inhibition alleviates pulmonary hypertension in transgenic mice expressing a dominant-negative type II bone morphogenetic protein receptor gene. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011. 301(5): L667-1674.
- [29] 王筠默. 中药药理学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 25-27.
- [30] 刘兴隆, 贾波, 黄绣深, 等. 苦杏仁药理研究概况 [J]. *江苏中医药*, 2005, 26(7): 59.
- [31] 丁东宁, 谭延华, 刘俊儒, 等. 镇原苦杏仁化学成分的研究 [J]. *西北药学杂志*, 1990, 5(3): 21-23.
- [32] 周英, 郗文. 苦杏仁的生理功能和保健饮料的研制 [J]. *食品工业科技*, 2000, 21(5): 19-50.
- [33] 甘露. 大鼠 pEGFP-N1-BK β 1 真核表达载体的构建及苦杏仁苷对支气管平滑肌细胞增殖的研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2007: 28-30.
- [34] 孙明月, 郭春雨, 王景尚, 等. 铁调素高表达与内皮损伤的相关性及川芎嗪的干预作用 [J]. *中草药*, 2015, 46(15): 2265-2269.
- [35] 李海刚, 胡晒平, 周意, 等. 川芎主要药理活性成分药理研究进展 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2018, 23(11): 1302-1308.
- [36] LV L, JIANG SS, XU J, et al. Protective effect of ligustrazine against myocardial ischaemia reperfusion in rats: the role of endothelial nitric oxide synthase. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012; 39(1): 20-27.
- [37] SONG S, ZHANG M, YI Z, et al. The role of PDGF-B/TGF- β 1/neprilysin network in regulating endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary artery remodeling. *Cell Signal*. 2016; 28(10): 1489-501.
- [38] 苏琛, 杨仁旭. 麻杏苈甘合剂对低氧性肺动脉高压大鼠的干预作用及分子机制研究 [J]. *四川中医*, 2015, 33(9): 37-39.