

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230653

· 论 著 ·

黄芪甲苷通过抑制 p38 MAPK 信号通路改善 SD 大鼠的肺动脉高压

刘 羽, 唐柏林, 鲁美丽, 王洪新, 杨育红*

锦州医科大学辽宁省心脑血管药物重点实验室, 锦州 121000

[摘要] **目的** 研究黄芪甲苷(AS-IV)对野百合碱(MCT)/野百合碱吡咯(MCTP)诱导SD大鼠/人肺动脉内皮细胞(HPAEC)肺动脉高压(PAH)模型的保护作用和机制。**方法** 体内实验中,取60只雄性SD大鼠随机分为对照组、PAH模型组、AS-IV低剂量(20 mg/kg)组、AS-IV中剂量(40 mg/kg)组、AS-IV高剂量(80 mg/kg)组、西地那非(Sil, 100 mg/kg)组,每组10只;除对照组外,其余各组均采用MCT(60 mg/kg)单次腹腔注射的方法建立PAH大鼠模型。体外实验中,将HPAEC随机分为对照组、PAH模型组、AS-IV低剂量(10 μ mol/L)组、AS-IV中剂量(20 μ mol/L)组、AS-IV高剂量(40 μ mol/L)组、p38 MAPK信号通路抑制剂(SB203580, 5 μ mol/L)组;除对照组外,其余各组均采用MCTP(60 μ g/mL)诱导24 h建立体外PAH细胞模型。体内实验中,药物干预4周后,采用血流动力学方法检测大鼠的右心室收缩压(RVSP)、平均肺动脉压(mPAP),采用称重法检测右心室肥厚指数,采用H-E染色观察肺小动脉管壁厚度占血管外径的百分比(WT%)和管壁面积占血管总面积的百分比(WA%),采用免疫组织化学(IHC)法观察肺组织中caspase 3蛋白表达情况,采用TUNEL法检测肺组织细胞凋亡情况。体外实验中,采用JC-1染色测定细胞中线粒体膜电位的变化情况,采用免疫荧光法检测caspase 3蛋白表达。体内、体外实验中,采用蛋白质印迹法检测肺组织、HPAEC中caspase 3、Bcl-2、Bax、p38 MAPK、磷酸化p38 MAPK蛋白的表达。**结果** 体内实验中,Sil组与AS-IV各剂量组RVSP、mPAP、右心室肥厚指数均降低(均 $P<0.01$);AS-IV各剂量组WA%、WT%均降低(均 $P<0.01$),肺组织中caspase 3蛋白表达降低(均 $P<0.01$),肺组织细胞凋亡降低(均 $P<0.01$)。体外实验中,各剂量AS-IV和SB203580干预后,HPAEC线粒体膜电位均增高(均 $P<0.01$),caspase 3表达均降低(均 $P<0.01$)。体内、体外实验中,各剂量AS-IV和SB203580均降低Bax、磷酸化p38 MAPK蛋白表达,增加Bcl-2蛋白表达(均 $P<0.01$)。**结论** AS-IV通过抑制p38 MAPK信号通路减少细胞凋亡,改善SD大鼠PAH。

[关键词] 黄芪甲苷;野百合碱;肺动脉高压;p38 丝裂原活化蛋白激酶;细胞凋亡;内皮细胞

[引用本文] 刘羽,唐柏林,鲁美丽,等. 黄芪甲苷通过抑制p38 MAPK信号通路改善SD大鼠的肺动脉高压[J]. 海军军医大学学报, 2025, 46(8): 1009-1017. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230653.

Astragaloside IV improves pulmonary arterial hypertension by inhibiting p38 MAPK signaling pathway in SD rats

LIU Yu, TANG Bailin, LU Meili, WANG Hongxin, YANG Yuhong*

Liaoning Key Laboratory of Cardiovascular and Cerebrovascular Drugs, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning, China

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect and mechanism of astragaloside IV (AS-IV) on the pulmonary arterial hypertension (PAH) model induced by monocrotaline (MCT)/monocrotaline pyrrole (MCTP) in SD rats/human pulmonary artery endothelial cell (HPAEC). **Methods** *In vivo* experiment, 60 male SD rats were randomly assigned to control group, PAH model group, AS-IV low-dose (20 mg/kg) group, AS-IV medium-dose (40 mg/kg) group, AS-IV high-dose (80 mg/kg) group, or sildenafil (Sil, 100 mg/kg) group, with 10 rats in each group; except for the control group, PAH rat models were established by single intraperitoneal injection of MCT (60 mg/kg) in other groups. *In vitro* experiment, HPAECs were randomly assigned to control group, PAH model group, AS-IV low-dose (10 μ mol/L) group, AS-IV medium-dose (20 μ mol/L) group, MCTP+AS-IV high-dose (40 μ mol/L) group, or p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway inhibitor (SB203580, 5 μ mol/L) group; except for the control group, *in vitro* PAH cell models were established by MCTP (60 μ g/mL) induction for 24 h in other groups. *In vivo* experiments, after 4 weeks of drug intervention, the right ventricular systolic pressure (RVSP) and mean pulmonary artery pressure (mPAP) of rats were measured by hemodynamic methods, the right ventricle hypertrophy index was measured by weighing methods, the percentage of pulmonary arteriole wall thickness to outer diameter (WT%) and percentage of the wall area to total vascular area (WA%) were observed by

[收稿日期] 2023-11-12 **[接受日期]** 2024-05-07

[基金项目] 国家自然科学基金(81973553). Supported by National Natural Science Foundation of China (81973553).

[作者简介] 刘 羽, 博士生. E-mail: liuyu_1109@163.com

*通信作者(Corresponding author). E-mail: jzwangpeixun@163.com

hematoxylin-eosin staining, the expression of cysteine aspartic acid specific protease 3 (caspase 3) protein in lung tissue was observed by immunohistochemistry (IHC), and the apoptosis of lung tissue cells was detected by TUNEL assay. *In vitro* experiments, JC-1 staining was used to detect the mitochondrial membrane potential in cells, and immunofluorescence was used to detect caspase 3 protein expression. *In vitro* and *in vivo* experiments, Western blotting was used to detect the expression of caspase 3, B-cell lymphoma gene 2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), p38 MAPK, and phosphorylated p38 MAPK proteins in lung tissue and HPAECs. **Results** *In vivo* experiments, the RVSP, mPAP, and right ventricle hypertrophy index were decreased in the Sil group and each dose group of AS-IV (all $P<0.01$); the WA% and WT% of each dose group of AS-IV were decreased (all $P<0.01$), the expression of caspase 3 protein in lung tissue was decreased (all $P<0.01$), and the apoptosis of lung tissue cells was decreased (all $P<0.01$). *In vitro* experiments showed that after intervention with each dose of AS-IV and SB203580, the mitochondrial membrane potential of HPAEC was increased (all $P<0.01$) and the expression of caspase 3 was decreased (all $P<0.01$). *In vivo* and *in vitro* experiments, each dose of AS-IV and SB203580 reduced the expression of Bax and phosphorylated p38 MAPK proteins, and increased the expression of Bcl-2 protein (all $P<0.01$). **Conclusion** AS-IV reduces apoptosis by inhibiting p38 MAPK signaling pathway, improving PAH in SD rats.

[**Key words**] astragaloside IV; monocrotaline; pulmonary arterial hypertension; p38 mitogen-activated protein kinase; apoptosis; endothelial cells

[**Citation**] LIU Y, TANG B, LU M, et al. Astragaloside IV improves pulmonary arterial hypertension by inhibiting p38 MAPK signaling pathway in SD rats[J]. Acad J Naval Med Univ, 2025, 46(8): 1009-1017. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230653.

肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 是由多种原因引起的肺血管阻力增加和肺动脉压力增高的慢性肺疾病, 血流动力学诊断标准为海平面静息状态下右心导管检测平均肺动脉压 (mean pulmonary artery pressure, mPAP) ≥ 25 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa)^[1-2]。PAH 是一种常见的多发病, 致残率和病死率均很高^[3], 但其发病机制复杂, 难以治愈, 迫切需要开发能够减缓病情的药物。

p38 MAPK 参与不同的细胞过程, 在细胞凋亡中起重要作用^[4-5], 其信号通路的激活通过磷酸化级联反应实现^[6]。磷酸化的 p38 MAPK 可通过调节自噬和凋亡关键蛋白导致细胞死亡, 参与细胞凋亡过程^[7]。

黄芪甲苷 (astragaloside IV, AS-IV) 是黄芪的主要活性成分之一, 研究表明, AS-IV 具有多种药理活性, 包括抗凋亡、抗炎、抗氧化、免疫调节等^[8-11]。本实验室以往研究发现 AS-IV 可以改善 PAH^[12], 但该作用是否与激活 p38 MAPK 信号通路抑制细胞凋亡有关尚未明确。本研究以野百合碱 (monocrotaline, MCT) / 野百合碱吡咯 (monocrotaline pyrrole, MCTP) 诱导 SD 大鼠 / 人肺动脉内皮细胞 (human pulmonary artery endothelial cell, HPAEC) 建立体内 / 外模型, 探讨 AS-IV 是否通过抑制 p38 MAPK 信号通路改善 PAH。

1 材料和方法

1.1 药物、试剂与仪器 AS-IV (纯度 95%, 货号: S1101-01019) 购自南京景竹生物科技有限公司, 分子量为 784.970。将 AS-IV 用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液溶解成所需浓度, 体内实验每次灌胃量为 2.2~2.5 mL。

蛋白质提取试剂购于南京建成生物工程研究所。Bax、Bcl-2、caspase 3、p38 MAPK、磷酸化 p38 MAPK、 β 肌动蛋白一抗, 以及 HRP 标记的二抗均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。MCT、MCTP 购自美国 Sigma 公司。TUNEL 凋亡检测试剂盒、免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。H-E 染色试剂盒、免疫荧光二抗、DAPI、JC-1 试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所。

BL-420S 生物机能实验系统 (成都泰盟科技有限公司); 低温高速离心机 (美国 ThermoFisher 公司); Leica DMI 3000B 倒置显微镜 (德国 Leica 公司); 凝胶成像仪、半干转印仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 实验对象 本实验通过锦州医科大学实验动物伦理委员会审核批准 (2021018)。在锦州医科大学动物实验中心取 4~6 周体重 180~200 g 的健康雄性 SD 大鼠 60 只 [动物使用许可证号为 SYXK

(辽)2022-007]。HPAEC购自青旗(上海)生物科技发展有限公司。

1.3 分组及给药 从60只SD大鼠中随机取10只作为对照组;余50只单次腹腔注射MCT(60 mg/kg)建立PAH大鼠模型,后随机分为5组:PAH模型组(MCT组)、AS-IV低剂量(20 mg/kg)组、AS-IV中剂量(40 mg/kg)组、AS-IV高剂量(80 mg/kg)组、西地那非(sildenafil, Sil; 100 mg/kg)组。AS-IV低中高剂量组和Sil组大鼠每天依据体重分别灌胃相应剂量的AS-IV和Sil,对照组和MCT组每天灌胃相同体积的生理盐水,共持续4周。喂养期间每日查看大鼠健康状况。喂养4周后,对照组、MCT组、AS-IV低中高剂量组、Sil组分别存活10、8、9、8、8、9只。

将HPAEC置于37℃、5% CO₂、95% N₂的细胞培养箱中用含10% FBS的完全培养基进行传代培养。用MCTP(60 μg/mL)诱导24 h建立体外PAH细胞模型,然后采用p38 MAPK信号通路抑制剂SB203580(5 μmol/L)或不同剂量AS-IV(10、20、40 μmol/L)处理HPAEC 30 min,收集HPAEC和上清液用于后续体外实验。

1.4 右心室导管插管 SD大鼠喂养4周后,用20%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,分离右颈静脉,将导管插入SD大鼠右心室,采用血流动力学方法检测肺动脉各压力指标,包括右心室收缩压(right ventricular systolic pressure, RVSP)、mPAP,并采用称重法测量右心室肥厚指数[右心室质量/(左心室质量+室间隔质量)]。数据均通过Power Lab软件记录。

1.5 H-E染色 取大鼠肺组织在4%多聚甲醛溶液中浸泡固定48 h,浸蜡包埋后切成3~5 μm厚的切片并进行H-E染色。通过Image Pro Plus软件进行图像分析,计算肺小动脉管壁面积比(WA%,管壁面积占血管总面积的百分比)和管壁厚度比(WT%,管壁厚度占血管外径的百分比)。

1.6 IHC法检测肺组织caspase 3蛋白表达 将肺组织石蜡切片进行乙醇梯度脱水、二甲苯脱蜡透明后,用caspase 3一抗(稀释比例为1:100)4℃过夜染色。次日滴加二抗,然后进行DAB显色、苏木精染色。最后在显微镜下观察,用Image Pro Plus软件进行图像分析。

1.7 TUNEL法检测肺组织细胞凋亡 石蜡切片经

乙醇梯度脱水、二甲苯脱蜡透明后,滴加TUNEL试剂,于显微镜下观察,用Image Pro Plus软件进行图像分析。

1.8 JC-1染色检测线粒体膜电位 收集不同处理组的HPAEC,加入100 μL JC-1试剂在室温下孵育30 min,然后用JC-1缓冲液洗涤细胞2次,在荧光显微镜下观察。用Image Pro Plus软件进行结果分析。

1.9 免疫荧光法 用含0.5% Triton X-100的PBS渗透HPAEC 30 min,用5%牛血清白蛋白溶液封闭30 min,加入caspase 3一抗(稀释比例为1:100)4℃孵育过夜。次日用FITC标记的二抗和DAPI染色。在荧光显微镜下观察,并用Image Pro Plus软件分析结果。

1.10 蛋白质印迹法 用裂解缓冲液提取肺组织和HPAEC蛋白质,通过BCA蛋白测定试剂盒检测蛋白质浓度。用10% SDS-PAGE分离样品蛋白质,然后转移至PVDF膜上。再用1%牛血清白蛋白溶液封闭1.5 h,加Bcl-2、Bax、caspase 3、p38 MAPK、磷酸化p38 MAPK、β肌动蛋白一抗(稀释比例除β肌动蛋白一抗为1:10 000外,其余均为1:1 000)4℃孵育过夜。次日加入二抗室温孵育1 h,最后用Image Pro Plus软件进行结果分析。

1.11 统计学处理 应用SPSS 25软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,并采用最小显著性差异法进行多重比较。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 Sil和AS-IV对MCT诱导PAH大鼠的保护作用 与对照组相比,MCT组SD大鼠的RVSP、mPAP、右心室肥厚指数升高(均 $P < 0.01$),表明PAH模型成立。经Sil治疗后,RVSP、mPAP和右心室肥厚指数较MCT组降低(均 $P < 0.01$),表明Sil对PAH具有治疗作用。不同剂量的AS-IV对PAH大鼠的治疗作用与Sil相似,均可以降低SD大鼠的RVSP、mPAP、右心室肥厚指数,表明AS-IV与Sil对PAH大鼠具有相同的保护作用。见图1。

2.2 AS-IV改善MCT诱导的PAH大鼠肺小动脉血管重构 H-E染色结果(图2)表明,与对照组相比,MCT组大鼠肺小动脉管壁面积增大(WA%,

$P<0.01$)、管壁增厚(WT%, $P<0.01$); 经不同剂量的AS-IV治疗后,大鼠肺小动脉管壁增生程度改善(均 $P<0.01$),其中AS-IV中、高剂量组

改善大鼠肺小动脉重构的作用更为明显。结果表明AS-IV对MCT诱导的PAH大鼠肺小动脉血管重构有明显的改善作用。

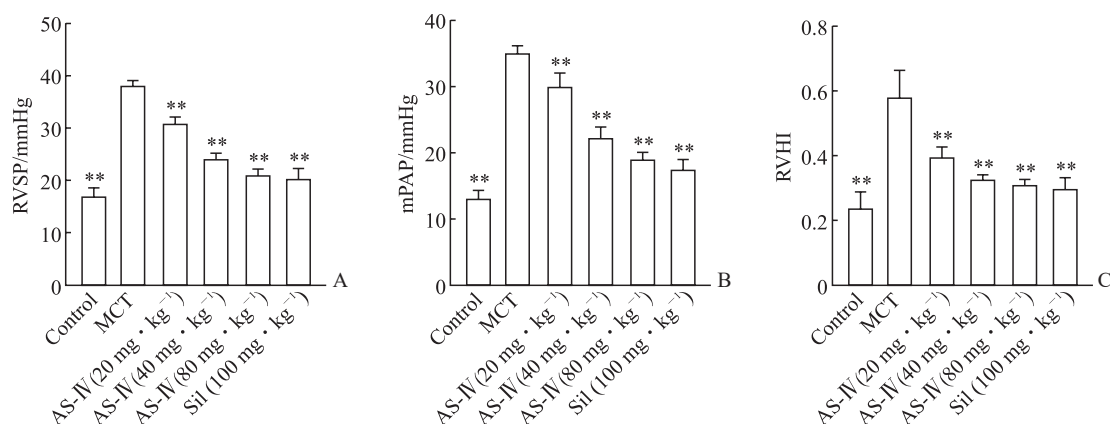


图1 Sil和AS-IV对MCT诱导PAH大鼠血流动力学和RVHI的作用

Fig 1 Effects of Sil and AS-IV on hemodynamics and RVHI of MCT-induced PAH rats

A, B: The RVSP and mPAP were detected by hemodynamic method; C: RVHI was detected by weighing method. 1 mmHg = 0.133 kPa. ** $P<0.01$ vs MCT group. $n=8$, $\bar{x}\pm s$. Sil: Sildenafil; AS-IV: Astragaloside IV; MCT: Monocrotaline; PAH: Pulmonary arterial hypertension; RVSP: Right ventricular systolic pressure; mPAP: Mean pulmonary artery pressure; RVHI: Right ventricle hypertrophy index (ratio of the weight of right ventricle to the total weight of left ventricle and interventricular septum).

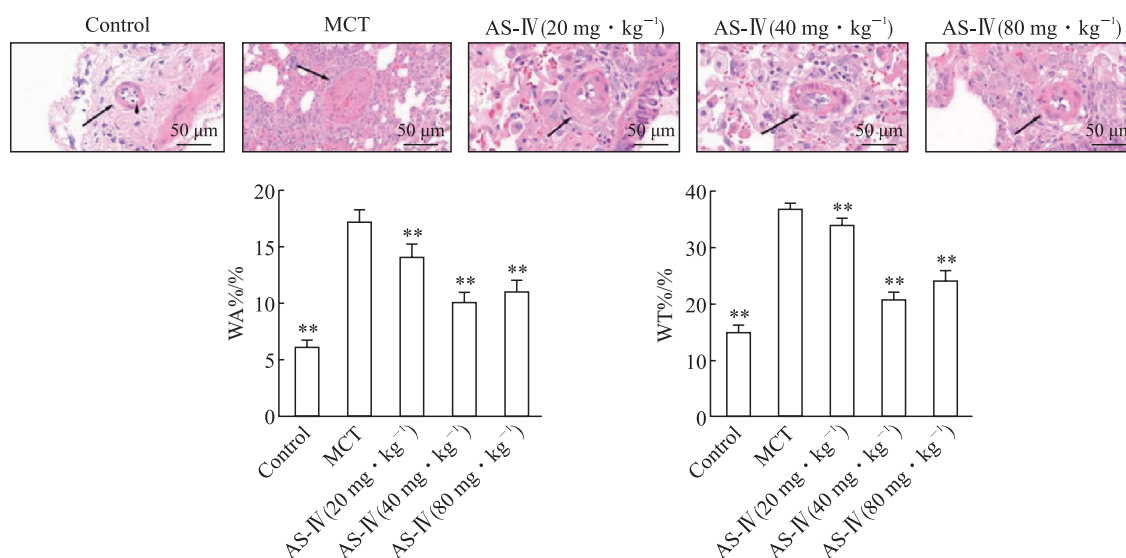


图2 H-E染色检测大鼠的肺小动脉重构情况

Fig 2 Pulmonary arteriole remodeling in rats detected by H-E staining

The arrows showed pulmonary arterioles. ** $P<0.01$ vs MCT group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$. H-E: Hematoxylin-eosin; MCT: Monocrotaline; AS-IV: Astragaloside IV; WA%: Percentage of pulmonary arteriole wall area to total vascular area; WT%: Percentage of pulmonary arteriole wall thickness to outer diameter.

2.3 AS-IV改善MCT诱导的PAH大鼠肺组织细胞凋亡 TUNEL法检测结果(图3)表明,与对照组相比,MCT组大鼠肺组织中细胞凋亡增加($P<0.01$); 经不同剂量AS-IV治疗后,大鼠肺组织细胞凋亡情况改善(均 $P<0.01$)。

2.4 AS-IV抑制MCT诱导的PAH大鼠肺组织

caspase 3蛋白表达 IHC染色结果(图4A、4B)表明,与对照组相比,MCT组大鼠肺组织中caspase 3表达升高($P<0.01$); 经不同剂量AS-IV治疗后caspase 3蛋白表达降低(均 $P<0.01$)。蛋白质印迹法检测结果(图4C、4D)显示,与对照组相比,MCT组大鼠肺组织中caspase 3蛋白表

达增加 ($P<0.01$) ; 经不同剂量 AS- IV 治疗后, caspase 3 蛋白表达降低 (均 $P<0.01$) 。结果表明

AS- IV 可以不同程度地抑制 MCT 诱导的 PAH 大鼠肺组织中 caspase 3 蛋白的表达。

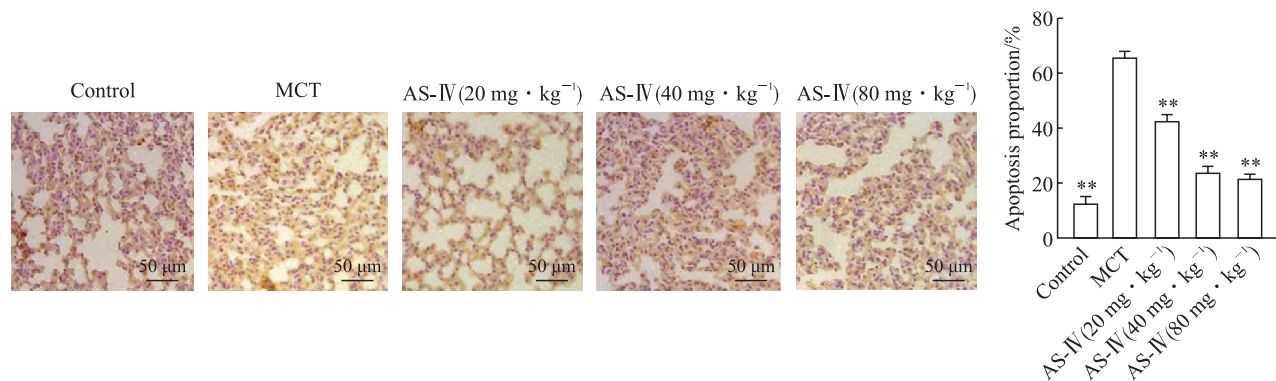


图 3 TUNEL 法检测大鼠肺组织细胞凋亡情况

Fig 3 Apoptosis of lung tissue cells in rats detected by TUNEL assay

** $P<0.01$ vs MCT group. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. MCT: Monocrotaline; AS- IV: Astragaloside IV.

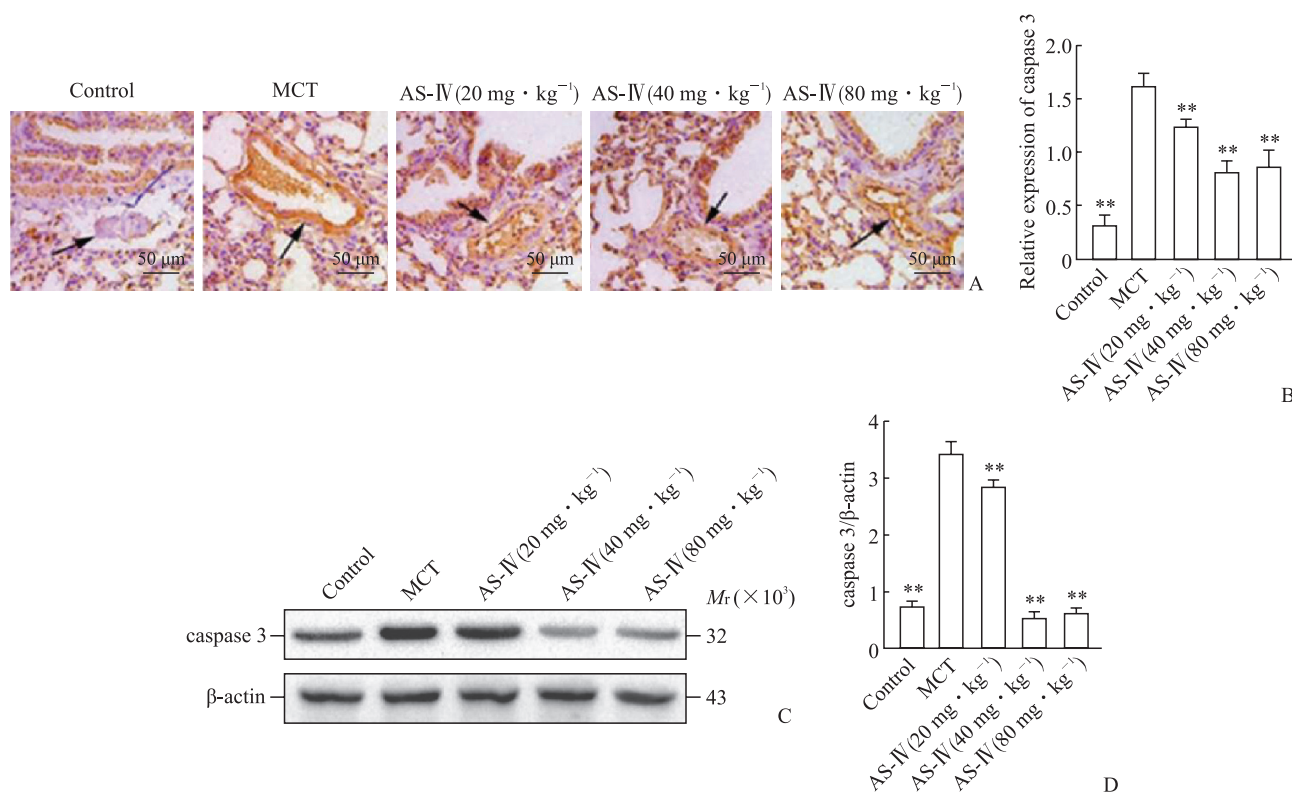


图 4 IHC 染色 (A、B) 和蛋白质印迹法 (C、D) 检测大鼠肺组织中 caspase 3 蛋白表达

Fig 4 Expression of caspase 3 protein in rat lung tissue detected by IHC staining (A, B) and Western blotting (C, D)

The arrows showed expression of caspase 3 protein in lung tissue. ** $P<0.01$ vs MCT group. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. IHC: Immunohistochemistry; caspase 3: Cysteine aspartic acid specific protease 3; MCT: Monocrotaline; AS- IV: Astragaloside IV.

2.5 AS- IV 调控 MCT 诱导 PAH 大鼠肺组织中 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达 蛋白质印迹法检测结果 (图 5) 表明, 与对照组相比, MCT 组大鼠肺组织中促凋亡蛋白 Bax 表达增多 ($P<0.01$) , 抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低 ($P<0.01$) ; 经不同剂量的 AS- IV 治疗后, 上述凋亡相关蛋白的表达情况逆转 (均 $P<0.01$) 。

2.6 AS- IV 和 SB203580 降低 MCTP 诱导的 HPAEC

中 caspase 3 蛋白表达 免疫荧光和蛋白质印迹法检测结果 (图 6) 均表明, 与对照组相比, MCTP 组 HPAEC 中 caspase 3 蛋白表达增加 ($P<0.01$) , 经不同剂量的 AS- IV 处理后 caspase 3 蛋白表达降低 (均 $P<0.01$) , 而 p38 MAPK 信号通路抑制剂 SB203580 的干预效果与 AS- IV 相似, 也降低了 caspase 3 蛋白的表达 ($P<0.01$) 。

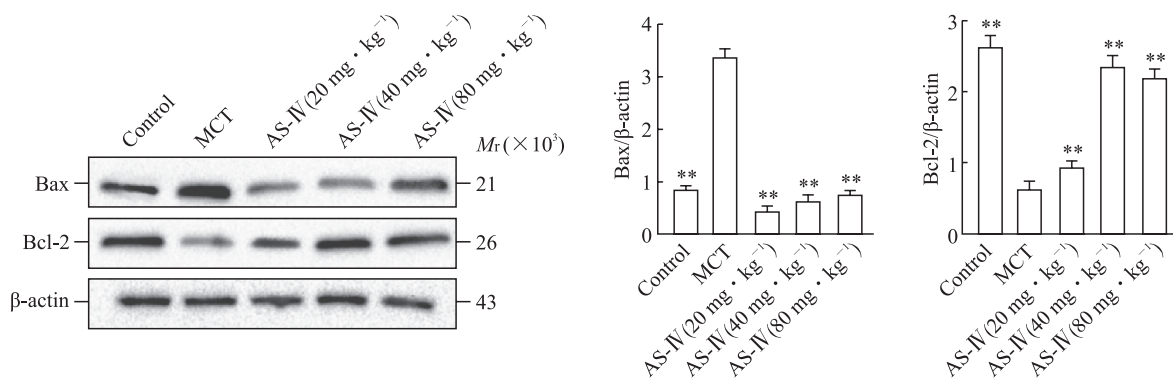


图 5 蛋白质印迹法检测大鼠肺组织中 Bax、Bcl-2 蛋白表达

Fig 5 Expression of Bax and Bcl-2 proteins in rat lung tissue detected by Western blotting

** $P < 0.01$ vs MCT group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. Bax: Bcl-2 associated X protein; Bcl-2: B-cell lymphoma gene 2; MCT: Monocrotaline; AS-IV: Astragaloside IV.

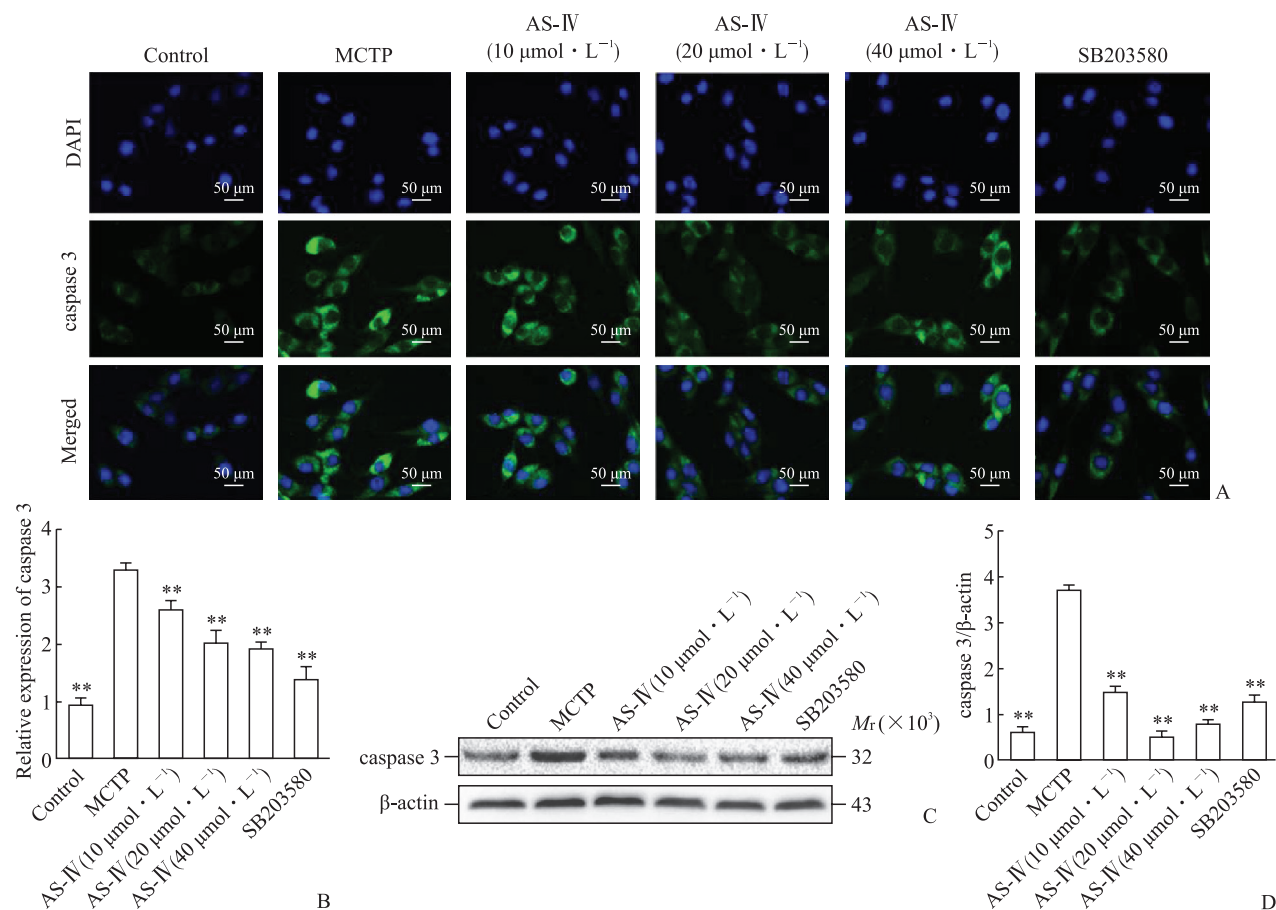


图 6 免疫荧光 (A、B) 和蛋白质印迹法 (C、D) 检测 HPAEC 中 caspase 3 蛋白表达

Fig 6 Expression of caspase 3 protein in HPAECs detected by immunofluorescence (A, B) and Western blotting (C, D)

SB203580 is a p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway inhibitor. ** $P < 0.01$ vs MCTP group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. HPAEC: Human pulmonary artery endothelial cell; caspase 3: Cysteine aspartic acid specific protease 3; MCTP: Monocrotaline pyrrole; AS-IV: Astragaloside IV; DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole.

2.7 AS-IV 和 SB203580 改善 MCTP 诱导 HPAEC 的线粒体膜电位变化 JC-1 染色结果 (图 7) 显示, 与对照组相比, MCTP 组 HPAEC 中 JC-1 单体表达减少、JC-1 多聚体表达增加 ($P < 0.01$); 经不同剂量的 AS-IV 处理后上述变化逆转 (均 $P < 0.01$);

p38 MAPK 信号通路抑制剂 SB203580 同样增加了 JC-1 单体表达、降低了 JC-1 多聚体表达, 改善了 HPAEC 的线粒体膜电位变化, 表现出与 AS-IV 相似的干预效果。

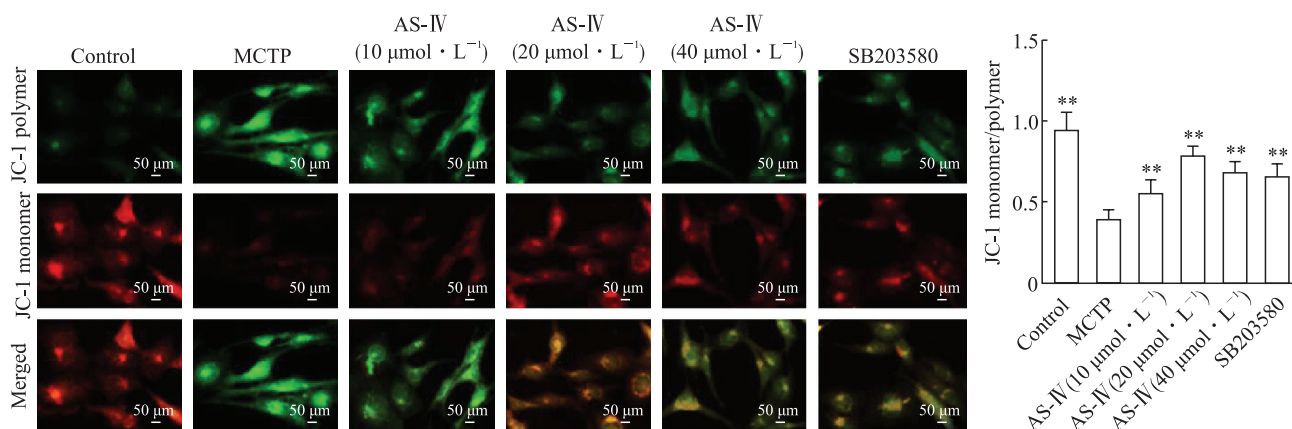


图 7 JC-1 染色检测 HPAEC 中线粒体膜电位

Fig 7 HPAEC mitochondrial membrane potential detected by JC-1 staining

SB203580 is a p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway inhibitor. ** $P < 0.01$ vs MCTP group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. HPAEC: Human pulmonary artery endothelial cell; MCTP: Monocrotaline pyrrole; AS-IV: Astragaloside IV.

2.8 AS-IV 和 SB203580 调控 MCTP 诱导 HPAEC 中 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达 蛋白质印迹法检测结果 (图 8) 显示, 与对照组相比, MCTP 组 HPAEC 中促凋亡蛋白 Bax 表达增多 ($P < 0.01$), 抑凋亡蛋白

Bcl-2 表达降低 ($P < 0.01$); 经不同剂量的 AS-IV 处理后上述蛋白的表达均逆转 (均 $P < 0.01$)。p38 MAPK 信号通路抑制剂 SB203580 对上述凋亡相关蛋白表达的干预效果与 AS-IV 相似。

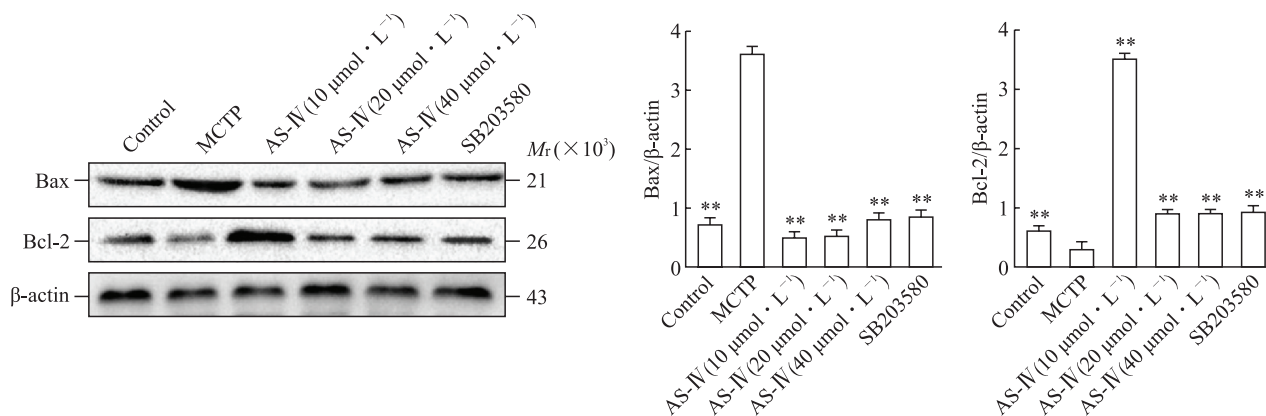


图 8 蛋白质印迹法检测 HPAEC 中 Bax、Bcl-2 蛋白表达

Fig 8 Expression of Bax and Bcl-2 proteins in HPAECs detected by Western blotting

SB203580 is a p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway inhibitor. ** $P < 0.01$ vs MCTP group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. HPAEC: Human pulmonary artery endothelial cell; Bax: Bcl-2 associated X protein; Bcl-2: B-cell lymphoma gene 2; MCTP: Monocrotaline pyrrole; AS-IV: Astragaloside IV.

2.9 AS-IV 和 SB203580 有效抑制 HPAEC 中 p38 MAPK 信号通路 蛋白质印迹法检测结果 (图 9) 显示, 与对照组相比, MCTP 组 HPAEC 中 p38 MAPK 信号通路激活, 磷酸化 p38 MAPK 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 经不同剂量的 AS-IV 处理后, p38 MAPK 信号通路激活被抑制, 磷酸化 p38 MAPK 蛋白表达降低 (均 $P < 0.01$), 且抑制效果与 p38 MAPK 信号通路抑制剂 SB203580 相似。

3 讨论

PAH 的主要组织病理学表现包括肺血管收缩、内皮细胞凋亡、平滑肌细胞增殖和肺小动脉血栓形成等^[13]。MCT 一直被广泛应用于 PAH 大鼠的动物模型制备, 作为一种大环吡咯烷核生物碱被吸收至肝脏中, 通过细胞色素 P450 代谢转化为 MCTP 入血, 从而破坏内皮细胞的内膜及膜蛋

白结构、减少一氧化氮合成,导致内皮屏障紊乱,加速了免疫细胞的聚集,促进了血管中的促炎反应^[14-15]。本研究结果显示,与MCT组大鼠相比,AS-IV组与Sil组大鼠RVSP、mPAP、右心室肥厚

指数均降低,H-E染色显示肺小动脉血管重构和增厚情况改善,结果表明AS-IV的治疗作用与Sil相似,可以改善MCT诱导PAH大鼠的相关症状。

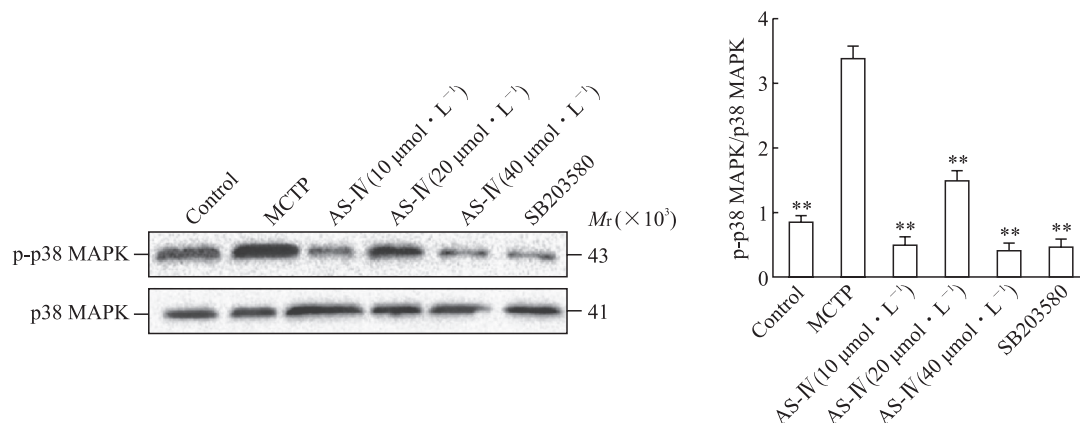


图9 蛋白质印迹法检测HPAEC中p-p38 MAPK、p38 MAPK蛋白表达

Fig 9 Expression of p-p38 MAPK and p38 MAPK proteins in HPAECs detected by Western blotting

SB203580 is a p38 MAPK signaling pathway inhibitor. ** $P < 0.01$ vs MCTP group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. HPAEC: Human pulmonary artery endothelial cell; p-p38 MAPK: Phosphorylated p38 MAPK; p38 MAPK: p38 mitogen-activated protein kinase; MCTP: Monocrotaline pyrrole; AS-IV: Astragaloside IV.

本研究结果提示,发生PAH时肺组织细胞凋亡增加,促凋亡蛋白caspase 3、Bax表达增加,抗凋亡蛋白Bcl-2表达降低,经AS-IV治疗之后促凋亡蛋白表达减少、抗凋亡蛋白表达增加。TUNEL法检测结果同样表明,MCT组肺组织细胞凋亡增加,经AS-IV治疗之后凋亡减少。IHC和免疫荧光染色结果均表明,MCT/MCTP使促凋亡蛋白caspase 3表达急剧增加,经不同浓度的AS-IV治疗之后caspase 3表达均有不同程度的降低。在细胞水平上,p38 MAPK信号通路抑制剂SB203580也降低了caspase 3、Bax蛋白表达,升高了Bcl-2蛋白表达。JC-1染色结果表明,MCTP诱导线粒体膜电位降低,经AS-IV治疗后线粒体膜电位增高,p38 MAPK信号通路抑制剂SB203580也升高了MCTP作用下的线粒体膜电位。以上结果均表明,AS-IV和SB203580均有助于改善PAH引起的细胞凋亡。

发生PAH时p38 MAPK信号通路激活,使磷酸化p38 MAPK表达增加,经AS-IV治疗或p38 MAPK信号通路抑制剂SB203580干预后,p38 MAPK信号通路被抑制,磷酸化p38 MAPK表达降低。

综上所述,AS-IV对MCT诱导的PAH大鼠具

有保护作用,具体机制可能是AS-IV通过抑制p38 MAPK信号通路减少肺组织细胞凋亡,从而改善PAH相关症状。

[参考文献]

- [1] LEOPOLD J A, MARON B A. Molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): 761. DOI: 10.3390/ijms17050761.
- [2] LUNA-LÓPEZ R, RUIZ MARTÍN A, ESCRIBANO SUBÍAS P. Pulmonary arterial hypertension[J]. *Med Clínica Engl Ed*, 2022, 158(12): 622-629. DOI: 10.1016/j.medcle.2022.05.010.
- [3] ROSENZWEIG E B, ABMAN S H, ADATIA I, et al. Paediatric pulmonary arterial hypertension: updates on definition, classification, diagnostics and management[J]. *Eur Respir J*, 2019, 53(1): 1801916. DOI: 10.1183/13993003.01916-2018.
- [4] JOHNSON G L, LAPADAT R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases[J]. *Science*, 2002, 298(5600): 1911-1912. DOI: 10.1126/science.1072682.
- [5] WAGNER E F, NEBRED A R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(8): 537-549. DOI: 10.1038/nrc2694.

- [6] ZARUBIN T, HAN J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway[J]. *Cell Res*, 2005, 15(1): 11-18. DOI: 10.1038/sj.cr.7290257.
- [7] YUAN F, LIU B, XU Y, et al. TIPE3 is a regulator of cell apoptosis in glioblastoma[J]. *Cancer Lett*, 2019, 446: 1-14. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.12.019.
- [8] JIN H, JIAO Y, GUO L, et al. Astragaloside IV blocks monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by improving inflammation and pulmonary artery remodeling[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(2): 595-606. DOI: 10.3892/ijmm.2020.4813.
- [9] CAO Y, ZHANG L, WANG Y, et al. Astragaloside IV attenuates renal fibrosis through repressing epithelial-to-mesenchymal transition by inhibiting microRNA-192 expression: *in vivo* and *in vitro* studies[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(8): 5029-5038.
- [10] ZHANG X, CHEN J, XU P, et al. Protective effects of astragaloside IV against hypoxic pulmonary hypertension[J]. *MedChemComm*, 2018, 9(10): 1715-1721. DOI: 10.1039/c8md00341f.
- [11] YAO J, FANG X, ZHANG C, et al. Astragaloside IV attenuates hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling via the Notch signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 23: 89. DOI: 10.3892/mmr.2020.11726.
- [12] SUN Y, LU M, SUN T, et al. Astragaloside IV attenuates inflammatory response mediated by NLRP-3/calpain-1 is involved in the development of pulmonary hypertension[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(1): 586-590. DOI: 10.1111/jcmm.15671.
- [13] ZHANG W, LI Y, XI X, et al. microRNA-15a-5p induces pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis in a pulmonary arterial hypertension model via the VEGF/p38/MMP-2 signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(2): 461-474. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4434.
- [14] XIAO R, ZHU L, SU Y, et al. Monocrotaline pyrrole induces pulmonary endothelial damage through binding to and release from erythrocytes in lung during venous blood reoxygenation[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 316(5): L798-L809. DOI: 10.1152/ajplung.00279.2018.
- [15] ZHANG D, WANG X, CHEN S, et al. Endogenous hydrogen sulfide sulfhydrates IKK β at cysteine 179 to control pulmonary artery endothelial cell inflammation[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(20): 2045-2059. DOI: 10.1042/CS20190514.

[本文编辑] 尹 茶