

温阳利水方对肺动脉高压致右心室衰竭大鼠心室重构的影响^Δ

冯思建^{1,2*}, 黄 燕^{2,3}, 邢爱民^{2,4}, 袁 玫^{2,5}, 刘亚芳^{2,4}, 王伟明^{2,4#}(1. 牡丹江医科大学附属红旗医院心血管内一科, 黑龙江 牡丹江 157000; 2. 牡丹江医科大学第一临床医学院, 黑龙江 牡丹江 157000; 3. 牡丹江医科大学附属红旗医院风湿免疫科, 黑龙江 牡丹江 157000; 4. 牡丹江医科大学附属红旗医院呼吸与危重症医学科, 黑龙江 牡丹江 157000; 5. 牡丹江医科大学附属红旗医院呼吸内科, 黑龙江 牡丹江 157000)

中图分类号 R965;R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)20-2531-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.20.08



摘要 目的 基于Hippo/Yes相关蛋白(YAP)信号通路探讨温阳利水方对肺动脉高压致右心室衰竭(RHF)大鼠心室重构的影响。方法 随机选取10只大鼠,作为对照组;其余63只大鼠通过单次腹腔内注射野百合碱建立肺动脉高压致RHF大鼠模型,并将造模成功的50大鼠随机分为RHF组、温阳利水方低剂量组(4.25 g/kg)、温阳利水方高剂量组(17.00 g/kg)、呋塞米组(20 mg/kg)、温阳利水方高剂量+Hippo/YAP信号通路激活剂组(17.00 g/kg的温阳利水方+16 mg/kg的PY-60),每组10只。各组大鼠均灌胃或/和尾静脉注射相应药液或生理盐水,每天1次,连续4周。实验期间,观察各组大鼠的一般状况;末次给药后,检测各组大鼠的右室内径、右房内径、舒张末期容积、肺动脉血流加速时间(PAAT)及其与射血时间(ET)的比值(PAAT/ET)、肺动脉压及其与肺动脉血流速度比值(肺动脉压/速度),检测其血浆中脑钠肽、血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)水平,观察其右心室组织的病理学变化,并检测胶原容积分数、大肿瘤抑制因子1/2(LATS1/2)和YAP蛋白的磷酸化水平以及PDZ结合基序的转录共激活因子(TAZ)蛋白的表达水平。结果 与RHF组比较,温阳利水方低、高剂量组大鼠的毛色、运动及饮食、精神状态等均有所改善,右心室心肌细胞萎缩、炎症细胞增多、胶原沉积、心肌纤维增生等有所减轻;其右室内径、右房内径、舒张末期容积、肺动脉压、肺动脉压/速度、血浆脑钠肽和AngⅡ水平、胶原容积分数、YAP蛋白的磷酸化水平和TAZ蛋白的表达水平均显著降低,PAAT、PAAT/ET、LATS1/2蛋白的磷酸化水平均显著升高($P<0.05$);PY-60可显著逆转高剂量温阳利水方对上述定量指标的改善作用($P<0.05$)。结论 温阳利水方可恢复肺动脉高压致RHF大鼠右心功能,降低其肺动脉压,减轻其心脏组织病理改变,上述作用可能与激活Hippo表达、抑制YAP磷酸化有关。

关键词 温阳利水方;肺动脉高压;右心室衰竭;心室重构;Hippo/YAP信号通路

Impact of Wenyang lishui formula on ventricular remodeling in rats with pulmonary hypertension-induced right heart failure

FENG Sijian^{1,2}, HUANG Yan^{2,3}, XING Aimin^{2,4}, YUAN Mei^{2,5}, LIU Yafang^{2,4}, WANG Weiming^{2,4}(1. Dept. One of Cardiovascular Medicine, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157000, China; 2. The First Clinical Medical College, Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157000, China; 3. Dept. of Rheumatic Immunology, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157000, China; 4. Dept. of Respiratory and Critical Care Medicine, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157000, China; 5. Dept. of Respiratory Medicine, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To discuss the impact of Wenyang lishui formula on ventricular remodeling in rats with pulmonary hypertension-induced right heart failure (RHF) based on the Hippo/Yes-associated protein (YAP) signaling pathway. **METHODS** Ten rats were randomly selected as the control group. The remaining 63 rats were given a single intraperitoneal injection of monocrortaline to establish the pulmonary hypertension-induced RHF model. The 50 rats that successfully underwent the model establishment were randomly divided into the RHF group, low-dose group of Wenyang lishui formula (4.25 g/kg), high-dose group of the Wenyang lishui formula (17.00 g/kg), furosemide group (20 mg/kg), and high-dose group of Wenyang lishui formula+Hippo/YAP signaling pathway activator group (17.00 g/kg of Wenyang lishui formula+16 mg/kg of PY-60), with 10 rats in each group. The rats in each group were given the corresponding drug solution or normal saline by gavage or/and tail vein injection, once a day, for 4 consecutive weeks. During the experiment, the general conditions of the rats in

^Δ 基金项目 黑龙江省中医医药科研项目(No.ZHY2024-119)
* 第一作者 讲师。研究方向:心血管疾病教学与科研。电话: 0453-6602075。E-mail: fkk298@163.com
通信作者 主治医师。研究方向:呼吸与危重症医学。电话: 0453-6602030。E-mail: ndieccc@163.com

each group were observed; after the last administration, the right ventricular diameter, right atrial diameter, end-diastolic volume, pulmonary artery blood flow acceleration time (PAAT) and its ratio to ejection time (ET) (PAAT/ET), pulmonary artery pressure and its ratio to pulmonary arterial flow velocity (pulmonary artery pressure/velocity) were measured. The plasma levels of brain natriuretic peptide and angiotensin II (Ang II) were detected. The pathological changes of the right ventricular tissue were observed, and the collagen volume fraction, the phosphorylation levels of the large tumor suppressor 1/2 (LATS1/2) and YAP, and the protein expression of the transcriptional coactivator of PDZ-binding motif (TAZ) were also detected. **RESULTS** Compared with the RHF group, the rats in Wenyang lishui formula low-dose and high-dose groups showed improved hair color, movement, diet, and mental state. The atrophy of right ventricular myocardial cells, the increase of inflammatory cells, collagen deposition, and hypertrophy of myocardial fibers were significantly alleviated. The right ventricular internal diameter, right atrial internal diameter, end-diastolic volume, pulmonary artery pressure, pulmonary artery pressure/velocity, the plasma levels of brain natriuretic peptide and Ang II, collagen volume fraction, the phosphorylation level of YAP and protein expression of TAZ were significantly decreased, while the PAAT, PAAT/ET and the phosphorylation level of LATS1/2 were significantly increased ($P < 0.05$). PY-60 could significantly reverse the improvement effects of high-dose Wenyang lishui formula on the above quantitative indicators ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS** Wenyang lishui formula can restore the right heart function of pulmonary hypertension-induced RHF rats, reduce their pulmonary artery pressure, alleviate the pathological changes in their cardiac tissues, and the above effects may be related to the activation of Hippo expression and the inhibition of YAP phosphorylation.

KEYWORDS Wenyang lishui formula; pulmonary hypertension; right heart failure; ventricular remodeling; Hippo/YAP signaling pathway

肺动脉高压是一种进行性且危及生命的心肺血管疾病,以不可逆的肺血管重塑和持续的肺血管收缩为主要特征。内皮素受体拮抗剂、钙离子通道阻滞剂等临床常用药物虽可扩张患者肺血管、改善其血流动力学,但无法逆转已经形成的肺血管重塑;而持续的后负荷驱动可使右心室发生几何重构,最终演变为右心室衰竭(right heart failure, RHF)——这是肺动脉高压的常见并发症之一,也是患者死亡的主要原因之一^[1-2]。研究指出,由肺血管重塑引发的心室重构是心室衰竭的基本病理过程,包括血管病变、间质纤维化、心律失常等改变,上述改变可进一步形成“重构-衰竭”恶性循环^[3-4]。可见,抑制心室重构可能是改善心室衰竭的有效途径之一。

温阳利水方由炙鳖甲、川芎、白术、附子、白芍、脐带、鹿角片、补骨脂、淫羊藿、茯苓、猪苓组方而成,是国医大师严世芸教授治疗心力衰竭的经验方,具有温阳利水、活血化瘀、补肾健脾等功效,用于阳虚水泛、血瘀内阻等所致多种病症的治疗,在心功能保护及内皮功能改善中具有重要作用^[5]。由此本课题组推测,温阳利水方可能对心室重构所致RHF具有积极作用。Hippo/Yes相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)作为调控器官生长、组织修复及纤维化发生的关键信号通路,其异常激活与心脏疾病的进展密切相关;YAP在心力衰竭患者心脏组织中的表达明显上调,并可诱导心肌细胞增殖、肥大和纤维化等病理改变的发生;此外,活化的YAP可进一步加速心肌纤维化及心室重构,在心力衰竭的发生发展中具有重要作用^[6-7]。由此本课题组推测,温阳利水方或可通过调节阳虚、血瘀等病理状态,影响Hippo/YAP信号通路上下游信号分子,从而抑制该信号通路的异常激活,进而减轻心肌细胞的病理改变。基于此,本研究拟建立肺动脉高压致RHF大鼠模型,初步探讨温阳利水

方对大鼠心室重构的影响及潜在机制,以期对相关新药的研发提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括BX53型显微镜(日本Olympus公司)、Vivid E9型彩色多普勒超声诊断仪(美国GE公司)、Thermo Multiskan MK3型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)等。

1.2 主要药品与试剂

炙鳖甲、川芎、白术、附子、白芍、脐带、鹿角片、补骨脂、淫羊藿、茯苓、猪苓饮片(批号分别为240114、231122、231006、231113、231121、240816、231105、240321、230903、240424、231109)均购自哈尔滨普方药业饮片有限公司,由牡丹江医科大学附属红旗医院药学部王加良副主任药师鉴定,均为真品。

呋塞米对照品(阳性对照,纯度98%,批号KM11136725)购自温州科森生物科技有限公司;PY-60对照品(Hippo/YAP信号通路激活剂,纯度98%,批号HY-141644)购自美国MedChemExpress公司;野百合碱对照品(纯度98%,批号JS3172)购自湖北巨胜科技有限公司;血管紧张素II(angiotensin II, Ang II)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号FY-A014534)购自上海富雨生物科技有限公司;脑钠肽ELISA试剂盒(批号KL15150)购自上海康朗生物科技有限公司;兔抗大肿瘤抑制因子1/2(large tumor suppressor 1/2, LATS1/2)抗体、兔抗磷酸化LATS1/2(phosphorylated LATS1/2, p-LATS1/2)抗体、兔抗磷酸化YAP(phosphorylated YAP, p-YAP)抗体、兔抗YAP抗体、兔抗PDZ结合基序的转录共激活因子(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ)抗体、鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体及辣根

过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗(H&L)(批号分别为ab264475、ab305029、ab76252、ab52771、ab307440、ab8226、ab205719)均购自英国Abcam公司;HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(批号GB23303)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;Masson染液(批号JK-182)购自上海经科化学科技有限公司;苏木精-伊红(HE)染液(批号G1120)购自北京索宝莱科技有限公司;RIPA裂解缓冲液(批号P0013)购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠(7周龄,体重250~280 g)购自哈尔滨医科大学实验动物学部,动物生产许可证号为SCXK(黑)2024-002。所有大鼠均在温度20~25℃、相对湿度50%~60%、每12 h光照/黑暗循环的动物房内饲养,自由摄食、饮水。所有实验程序均遵循动物护理和使用的相关指南,并通过牡丹江医科大学附属红旗医院伦理委员会批准(伦理编号20240129)。

2 方法

2.1 药液制备

取炙鳖甲、川芎、白术、附子、白芍、脐带、鹿角片饮片各10 g,补骨脂、淫羊藿、茯苓、猪苓饮片各15 g,混合,加8倍量水浸泡30 min,以武火煮沸后转文火煎煮1.5 h,过滤;药渣再加6倍量水,煎煮1 h,过滤;合并两次滤液,减压浓缩,制得温阳利水方浸膏(每1 mL浸膏约含生药量3 g)。

2.2 造模、分组与给药

所有大鼠均适应性喂养1周。随机选取10只大鼠,作为对照组。其余63只大鼠按下法构建肺动脉高压致RHF模型^[8]:大鼠单次腹腔内注射野百合碱(60 mg/kg,以无水乙醇为溶剂)诱导肺动脉高压;6周后,大鼠经多普勒超声诊断仪检查,若出现心功能不全(右室内径、右房内径、舒张末期容积明显升高),则表明肺动脉高压致RHF模型构建成功。在此过程中,有8只大鼠死亡、5只不符合造模标准。将造模成功的50只大鼠随机分为RHF组、温阳利水方低剂量组(温阳利水方-低组)、温阳利水方高剂量组(温阳利水方-高组)、呋塞米组和温阳利水方高剂量+Hippo/YAP信号通路激活剂组(温阳利水方-高+PY-60组),每组10只。参考预实验及相关文献^[9],温阳利水方-低、高组大鼠分别灌胃4.25、17.00 g/kg的温阳利水方(以生药量计,以水为溶剂)并同时尾静脉注射等体积生理盐水,每天1次,连续4周;参考预实验及相关文献^[10],呋塞米组大鼠灌胃20 mg/kg的呋塞米(以二甲基亚砜为溶剂)并同时尾静脉注射等体积生理盐水,每天1次,连续4周;参考预实验及相关文献^[11],温阳利水方-高+PY-60组大鼠灌胃17.00 g/kg的温阳利水方并同时尾静脉注射16 mg/kg的PY-60(以二甲基亚砜为溶剂),每天1次,连续4周;对照组和RHF组大鼠灌胃并同时尾静脉注射等体积生理盐水,每天1次,连续4周。

2.3 大鼠一般状况观察

实验期间,观察各组大鼠的皮毛状况、精神状态、饮食及活动情况。

2.4 大鼠右心功能指标检测

末次给药后,将各组大鼠麻醉,置于加热垫上,维持其体温为37℃,以多普勒超声诊断仪检测其右室内径、右房内径、舒张末期容积。连续收集3个心动周期的数据,结果取平均值。

2.5 大鼠右心-肺循环血流动力学指标检测

心脏超声检查结束后,继续以多普勒超声诊断仪检测各组大鼠的肺动脉血流加速时间(pulmonary artery blood flow acceleration time, PAAT)及其与射血时间(ejection time, ET)的比值(PAAT/ET)、肺动脉压及其与肺动脉血流速度的比值(肺动脉压/速度)。连续收集3个心动周期的数据,结果取平均值。

2.6 大鼠血浆脑钠肽、Ang II水平检测

肺动脉超声检查结束后,采集各组大鼠尾静脉血,将血样置于含乙二胺四乙酸的抗凝管中,于4℃下以1 200×g离心15 min,分离上层血浆,按照相应试剂盒说明书方法操作,以酶标仪检测其脑钠肽、Ang II水平。

2.7 大鼠心脏组织病理学变化观察

2.7.1 HE染色

采血后,将各组大鼠处死,迅速打开胸腔,剖取心脏,分离右心室,剥离脂肪及结缔组织后,取部分冻存,备用;取另一部分经4%甲醛溶液固定后,行常规石蜡包埋、切片(厚度5 μm)。取上述切片,经脱蜡、复水、苏木精染色(3 min)、分化、伊红染色(5 s)、脱水、封片后,使用显微镜观察其心脏组织病理改变。

2.7.2 Masson染色

取“2.7.1”项下各组大鼠的右心室组织切片,经脱蜡、复水、Masson染色、风干、透明、封片后,使用显微镜观察其心脏组织纤维化改变(其中,红细胞、纤维素、肌纤维呈红色,胶原纤维、软骨呈蓝色),并采用Image J软件计算胶原原容积分数,即染色阳性面积(蓝色)占总面积的百分比。

2.8 大鼠心脏组织中Hippo/YAP信号通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.7.1”项下各组大鼠冻存的心脏组织,加入裂解缓冲液提取其总蛋白,以BCA法检测蛋白浓度后作变性处理。取变性蛋白,进行8%~12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,然后转移到聚偏二氟乙烯膜上,以脱脂牛奶封闭;洗膜后,加入p-LATS1/2、LATS1/2、p-YAP、YAP、TAZ、β-actin(稀释度均为1:500)一抗,于4℃下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释度均为1:1 000),于室温下孵育60 min;洗膜后,以增强化学发光溶液曝光、显影、成像。使用Image J软件,以各目的蛋白与内参蛋白(β-actin)的灰度值比值表示各目的蛋白的表达水平,以p-LATS1/2与

LATS1/2、p-YAP与YAP蛋白的灰度值比值表示LATS1/2、YAP蛋白的磷酸化水平。

2.9 统计学方法

采用SPSS 27.0软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK-*q*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 温阳利水方对大鼠一般情况的影响

对照组大鼠一切正常;RHF组大鼠毛色灰暗,运动及饮食均减少,精神状态差,反应迟钝;温阳利水方-低、高组和呋塞米组大鼠的毛色、运动及饮食、精神状态等均有所改善,其中温阳利水方-高组、呋塞米组的改善更明显;而温阳利水方-高+PY-60组大鼠的一般情况接近于温阳利水方-低组。

3.2 温阳利水方对大鼠右心功能指标的影响

与对照组比较,RHF组大鼠的右室内径、右房内径、舒张末期容积均显著升高($P<0.05$);与RHF组比较,温阳利水方-低、高组和呋塞米组大鼠的右室内径、右房内径、舒张末期容积均显著降低,且温阳利水方-高组、呋塞米组大鼠上述指标的改善均较温阳利水方-低组明显($P<0.05$);与温阳利水方-高组比较,温阳利水方-高+PY-60组大鼠的右室内径、右房内径、舒张末期容积均显著升高($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组大鼠右心功能指标比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	右室内径/mm	右房内径/mm	舒张末期容积/mL
对照组	4.05±0.42	3.55±0.36	0.42±0.05
RHF组	6.96±0.71 ^a	6.02±0.61 ^a	1.06±0.11 ^a
温阳利水方-低组	5.42±0.56 ^b	4.55±0.47 ^b	0.75±0.08 ^b
温阳利水方-高组	4.22±0.43 ^{bc}	3.61±0.38 ^{bc}	0.51±0.06 ^{bc}
呋塞米组	4.19±0.42 ^{bc}	3.59±0.36 ^{bc}	0.49±0.05 ^{bc}
温阳利水方-高+PY-60组	5.48±0.51 ^d	4.49±0.46 ^d	0.72±0.08 ^d

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与RHF组比较, $P<0.05$;c:与温阳利水方-低组比较, $P<0.05$;d:与温阳利水方-高组比较, $P<0.05$ 。

3.3 温阳利水方对大鼠右心-肺循环血流动力学指标的影响

与对照组比较,RHF组大鼠的PAAT、PAAT/ET均显著降低,肺动脉压、肺动脉压/速度均显著升高($P<0.05$);与RHF组比较,温阳利水方-低、高组和呋塞米组大鼠的PAAT、PAAT/ET均显著升高,肺动脉压、肺动脉压/速度均显著降低,且温阳利水方-高组、呋塞米组大鼠上述指标的改善均较温阳利水方-低组明显($P<0.05$);与温阳利水方-高组比较,温阳利水方-高+PY-60组大鼠的PAAT、PAAT/ET均显著降低,肺动脉压、肺动脉压/速度均显著升高($P<0.05$)。结果见表2。

3.4 温阳利水方对大鼠血浆脑钠肽、Ang II水平的影响

与对照组比较,RHF组大鼠血浆脑钠肽、Ang II水平均显著升高($P<0.05$);与RHF组比较,温阳利水方-低、高组和呋塞米组大鼠血浆脑钠肽、Ang II水平均显著降

表2 各组大鼠右心-肺循环血流动力学指标比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	PAAT/ms	PAAT/ET	肺动脉压/mmHg	(肺动脉压/速度)/(mmHg·s/m)
对照组	28.86±2.95	0.48±0.06	2.65±0.28	3.21±0.33
RHF组	15.22±1.64 ^a	0.19±0.02 ^a	6.22±0.64 ^a	5.42±0.53 ^a
温阳利水方-低组	20.31±2.06 ^b	0.28±0.03 ^b	4.52±0.48 ^b	4.34±0.44 ^b
温阳利水方-高组	27.56±2.81 ^{bc}	0.45±0.05 ^{bc}	3.02±0.33 ^{bc}	3.29±0.30 ^{bc}
呋塞米组	28.05±2.86 ^{bc}	0.43±0.05 ^{bc}	2.95±0.32 ^{bc}	3.31±0.34 ^{bc}
温阳利水方-高+PY-60组	19.86±2.05 ^d	0.31±0.03 ^d	4.49±0.46 ^d	4.29±0.43 ^d

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与RHF组比较, $P<0.05$;c:与温阳利水方-低组比较, $P<0.05$;d:与温阳利水方-高组比较, $P<0.05$;1 mmHg=0.133 kPa。

低,且温阳利水方-高组、呋塞米组大鼠上述指标的改善均较温阳利水方-低组明显($P<0.05$);与温阳利水方-高组比较,温阳利水方-高+PY-60组大鼠血浆脑钠肽、Ang II水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表3。

表3 各组大鼠血浆脑钠肽、Ang II水平比较($\bar{x} \pm s, n=10, \text{ng/mL}$)

组别	脑钠肽	Ang II
对照组	31.20±3.22	0.85±0.09
RHF组	62.05±6.31 ^a	2.06±0.22 ^a
温阳利水方-低组	45.62±4.67 ^b	1.44±0.15 ^b
温阳利水方-高组	34.62±3.51 ^{bc}	0.98±0.11 ^{bc}
呋塞米组	33.52±3.44 ^{bc}	0.92±0.10 ^{bc}
温阳利水方-高+PY-60组	46.05±4.69 ^d	1.39±0.15 ^d

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与RHF组比较, $P<0.05$;c:与温阳利水方-低组比较, $P<0.05$;d:与温阳利水方-高组比较, $P<0.05$ 。

3.5 温阳利水方对大鼠心脏组织病理学变化的影响

HE染色结果显示,对照组大鼠右心室组织结构正常;RHF组大鼠右心室可见心肌细胞萎缩、炎症细胞增多、心肌结构紊乱,且肌纤维排列紊乱;温阳利水方-低、高组和呋塞米组大鼠右心室组织肌纤维排列逐渐有序,心肌细胞萎缩减少,其中温阳利水方-高组和呋塞米组的改善更明显;而温阳利水方-高+PY-60组大鼠右心室组织损伤程度接近于温阳利水方-低组。结果见图1。

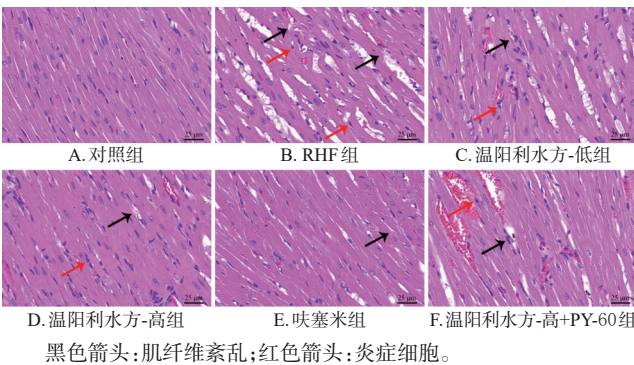


图1 各组大鼠心脏组织病理改变的显微图(HE染色)

Masson染色结果显示,对照组大鼠右心室无明显纤维组织增生,其胶原容积分数为(2.24±0.28)%;RHF组大鼠右心室胶原沉积和心肌纤维增生明显,胶原容积分数[(16.81±1.73)%]较对照组显著升高($P<0.05$);温阳利水方-低、高组和呋塞米组大鼠右心室心肌纤维增生、

胶原沉积明显减少,胶原容积分数 $[(10.02 \pm 1.14)\%$ 、 $(5.21 \pm 0.66)\%$ 、 $(5.13 \pm 0.62)\%$]均较RHF组显著降低,且温阳利水方-高组、呋塞米组大鼠上述指标的改善均较温阳利水方-低组明显($P < 0.05$);而温阳利水方-高+PY-60组大鼠右心室纤维化程度接近于温阳利水方-低组,其胶原容积分数 $[(10.54 \pm 1.17)\%]$ 较温阳利水方-高组显著升高($P < 0.05$)。结果见图2。

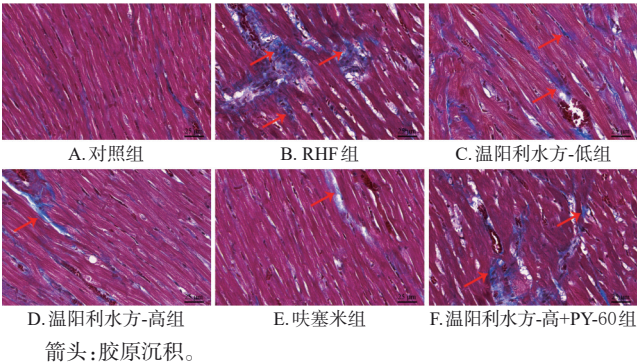
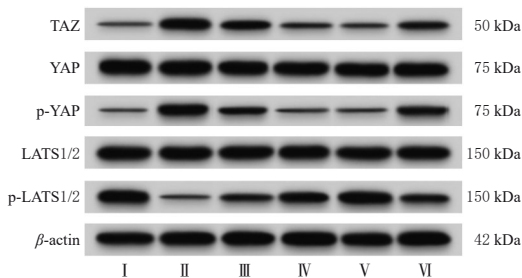


图2 各组大鼠心脏组织纤维化变化的显微图(Masson染色)

3.6 温阳利水方对大鼠 Hippo/YAP 通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较,RHF组大鼠心脏组织中LATS1/2蛋白的磷酸化水平显著降低,YAP蛋白的磷酸化水平和TAZ蛋白的表达均显著升高或上调($P < 0.05$);与RHF组比较,温阳利水方-低、高组和呋塞米组大鼠心脏组织中LATS1/2蛋白的磷酸化水平显著升高,YAP蛋白的磷酸化水平和TAZ蛋白的表达均显著降低或下调,且温阳利水方-高组、呋塞米组大鼠上述指标的改善均较温阳利水方-低组明显($P < 0.05$);与温阳利水方-高组比较,温阳利水方-高+PY-60组大鼠心脏组织中LATS1/2蛋白的磷酸化水平显著降低,YAP蛋白的磷酸化水平和TAZ蛋白的表达均显著升高或上调($P < 0.05$)。结果见图3、表4。



I: 对照组; II: RHF组; III: 温阳利水方-低组; IV: 温阳利水方-高组; V: 呋塞米组; VI: 温阳利水方-高+PY-60组。

图3 各组大鼠心脏组织中 p-LATS1/2、LATS1/2、p-YAP、YAP、TAZ 蛋白表达的电泳图

4 讨论

肺动脉高压是起病隐匿且进展迅速的致命疾病。随着病情的发展,该病会进展为右心室病变,进而引发

表4 各组大鼠心脏组织中 LATS1/2、YAP 蛋白磷酸化和 TAZ 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	(p-LATS1/2)/(LATS1/2)	p-YAP/YAP	TAZ/ β -actin
对照组	0.88 $\pm$ 0.09	0.15 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.03
RHF组	0.26 $\pm$ 0.03 ^a	0.75 $\pm$ 0.09 ^a	0.86 $\pm$ 0.09 ^a
温阳利水方-低组	0.49 $\pm$ 0.05 ^b	0.48 $\pm$ 0.05 ^b	0.59 $\pm$ 0.07 ^b
温阳利水方-高组	0.76 $\pm$ 0.08 ^{bc}	0.22 $\pm$ 0.03 ^{bc}	0.34 $\pm$ 0.04 ^{bc}
呋塞米组	0.84 $\pm$ 0.09 ^{bc}	0.19 $\pm$ 0.02 ^{bc}	0.29 $\pm$ 0.03 ^{bc}
温阳利水方-高+PY-60组	0.51 $\pm$ 0.06 ^d	0.53 $\pm$ 0.06 ^d	0.52 $\pm$ 0.06 ^d

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与RHF组比较, $P < 0.05$; c: 与温阳利水方-低组比较, $P < 0.05$; d: 与温阳利水方-高组比较, $P < 0.05$ 。

RHF,故右心室功能是肺动脉高压患者预后的重要指标^[12]。呋塞米可改善患者体液滞留、减轻心脏负荷、缓解RHF症状^[10],遂本研究以呋塞米作为阳性对照药,以评价温阳利水方对肺动脉高压致RHF的作用。

中药在RHF、肺心病等疾病的治疗领域发挥了积极的作用,且相关临床经验丰富^[13]。《内经》曰“心痹者,脉不通”,应以化痰利水、活血化瘀、益气温阳等法治疗心力衰竭,改善患者生活质量^[14]。温阳利水方由炙鳖甲、川芎等11味中药组方而成,其中炙鳖甲滋阴潜阳、软坚散结;川芎行气活血,具有扩张血管、改善微循环、抗血小板聚集等作用;鹿角片、补骨脂、淫羊藿具有补肾壮阳、温脾止泻、纳气平喘等作用;茯苓、猪苓淡渗利水,可增强机体免疫力;白术温运脾,调节胃肠运动;附子温通心脉;脐带填精补肾;白芍养血调经、敛阴止汗、柔肝止痛;诸药合用,共奏温补阳气、利水消肿之功^[9,15]。本课题组前期对温阳利水方性状、鉴别、指标成分(阿魏酸、淫羊藿苷)含量及微生物限度等多项指标进行了质量控制,同时对所用饮片、提取方法进行了考察、优化,确保了温阳利水方提取工艺及质量的稳定性。同时,有研究初步证实了温阳利水方在治疗肺源性心脏病中的显著疗效^[5,16],故本课题组推测其可能对肺动脉高压引发的RHF心室重构也具有良好的改善效果。本研究结果显示,与对照组比较,RHF组大鼠毛色灰暗,运动及饮食均减少,精神状态差且反应迟钝;右心室可见心肌细胞萎缩、炎症细胞增多、胶原沉积、心肌纤维增生等改变,其右室内径、右房内径、舒张末期容积、肺动脉压、肺动脉压/速度、胶原容积分数均显著升高,PAAT、PAAT/ET均显著降低。经温阳利水方干预后,大鼠精神状态及饮食、运动等一般状况得到改善,心肌萎缩及胶原纤维减少,肌纤维排列逐渐有序;其右室内径、右房内径、舒张末期容积、肺动脉压、肺动脉压/速度、胶原容积分数均显著降低,PAAT、PAAT/ET均显著升高,提示该方可改善模型大鼠的右心功能和肺动脉高压。

脑钠肽是心力衰竭诊断和患者预后评估的生物标志物^[17],而Ang II则是重要的促血管生成因子^[18]。研究指出,RHF的主要特征包括反应性心脏纤维化和血管生成受阻,涉及促血管生成因子表达的改变,因此二者相互作用,共同推动RHF心室重构的病理演变^[18]。本研究

结果显示,与对照组比较,RHF组大鼠血浆脑钠肽、Ang II水平均显著升高;经温阳利水方干预后,大鼠血浆脑钠肽、Ang II水平均显著降低,提示温阳利水方可改善RHF大鼠的心室重构。

Hippo/YAP信号通路在心血管疾病的发生发展中具有至关重要的作用。研究指出,当Hippo信号通路被激活后,上游信号可促使该通路下游激酶LATS1/2发生磷酸化并活化,活化后的LATS1/2可通过磷酸化级联进一步调控YAP、TAZ的表达,从而调节细胞增殖、凋亡和组织稳态;同时,抑制YAP表达可打破上述稳态,从而导致心功能受损、心脏纤维化发生,进而影响心室重构^[9]。此外,研究指出,Hippo/YAP信号通路相关蛋白的表达与心肌细胞凋亡、炎症反应相关^[20]。本研究结果显示,与对照组比较,RHF组大鼠心脏组织中YAP蛋白的磷酸化和TAZ蛋白的表达均显著升高/上调,LATS1/2蛋白的磷酸化水平降低,提示激活YAP表达可促进RHF的发展。经温阳利水方干预后,大鼠心脏组织中YAP蛋白的磷酸化水平和TAZ蛋白的表达均显著降低/下调,LATS1/2蛋白的磷酸化水平显著升高,提示温阳利水方对RHF的改善作用可能与激活Hippo、抑制YAP表达有关。为验证上述假设,本研究参考相关研究^[20],使用Hippo/YAP通路激活剂PY-60进行反向验证,结果显示,PY-60可显著逆转温阳利水方对RHF大鼠上述各定量指标的改善作用,初步验证该方可通过调控Hippo/YAP信号通路来改善RHF大鼠的心室重构。需要注意的是,温阳利水方-高+PY-60组大鼠心脏组织的病理改变并未恢复至对照组水平,提示可能存在其他信号通路的协同作用。

综上所述,温阳利水方可恢复RHF大鼠心功能,降低其肺动脉压,减轻其心脏组织病理改变,上述作用可能与激活Hippo、抑制YAP表达有关。但由于中药涉及诸多靶点,肺动脉高压致RHF的机制也十分复杂,故具体机制仍有待进一步验证。

参考文献

[1] TANG Y, HUO X W, LIU J Y, et al. MicroRNA-325-3p targets human epididymis protein 4 to relieve right ventricular fibrosis in rats with pulmonary arterial hypertension[J]. *Cardiovasc Ther*, 2022, 2022:4382999.

[2] KRSTIC A M, JONES T L M, POWER A S, et al. The monocrotaline rat model of right heart disease induced by pulmonary artery hypertension[J]. *Biomedicines*, 2024, 12(9):1944.

[3] 袁中杰,郝轩轩,李彬,等. 葶苈大枣泻肺汤通过ACE2-Ang-(1-7)-Mas轴对心梗后心衰模型大鼠心室重构的影响[J]. *中国药房*, 2023, 34(2):161-167.

[4] JIANG D M, WANG J, WANG R, et al. Comprehensive insights into mechanisms for ventricular remodeling in right heart failure[J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2024, 25(12):426.

[5] 范照亮,宋海玖,赵云平,等. 温阳利水方对慢性心力衰竭患者血小板活化及血管内皮损伤的影响[J]. *中国医学*

创新, 2024, 21(4):33-36.

[6] DEL RE D P. Hippo-Yap signaling in cardiac and fibrotic remodeling[J]. *Curr Opin Physiol*, 2022, 26:100492.

[7] 杜清,岳彤彤,王贺. Hippo-YAP信号通路在心室重构中作用的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(9):2269-2273.

[8] 吴金春,刘韬,崔博,等. 达格列净对肺动脉高压致右心衰竭大鼠房性心律失常的影响及机制[J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(1):29-35.

[9] 蔡娟,郑晓丹,姜卫东,等. 温阳利水方对心力衰竭大鼠心功能及炎症、氧化应激反应的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16(23):3434-3437.

[10] 李白雪,吴文军,黎桂玉,等. 木防己汤对野百合碱诱导肺动脉高压致右心衰竭模型大鼠的改善作用及基于核受体LXR调控的作用机制研究[J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(6):1324-1327.

[11] 李伟,江陶,鄢玲,等. 虎杖苷调节Hippo/YAP信号通路对冠心病大鼠心肌损伤的影响[J]. *西部医学*, 2024, 36(10):1444-1448,1455.

[12] CHAI Y Q, GU X, ZHANG H J, et al. Phoenixin 20 ameliorates pulmonary arterial hypertension via inhibiting inflammation and oxidative stress[J]. *Aging (Albany NY)*, 2024, 16(6):5027-5037.

[13] 吴文俊,张赤道,孙阳,等. 中成药治疗慢性肺源性心脏病临床研究证据图分析[J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(19):5354-5364.

[14] 蒋承利,曾建斌,万蝉俊. 伍炳彩治疗心力衰竭经验[J]. *江西中医药*, 2014, 45(10):17-18.

[15] 李庆楼,潘拓方,张桂贞. 针刺联合温阳利水方对慢性心力衰竭患者血流动力学及心功能的影响[J]. *当代医学*, 2023, 29(11):72-75.

[16] 陈楚佳,鲁盈,钟瑜. 鲁盈运用温阳利水法治疗慢性肾衰竭合并心力衰竭经验浅析[J]. *浙江中医杂志*, 2024, 59(2):118-119.

[17] SAMAD M, MALEMPATI S, RESTINI C B A. Natriuretic peptides as biomarkers: narrative review and considerations in cardiovascular and respiratory dysfunctions[J]. *Yale J Biol Med*, 2023, 96(1):137-149.

[18] KOMICI K, GNEMMI I, SANGIORGI C, et al. Indexes of angiogenic activation in myocardial samples of patients with advanced chronic heart failure[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2019, 55(12):766.

[19] REN Y, WU Y, HE W S, et al. Exosomes secreted from bone marrow mesenchymal stem cells suppress cardiomyocyte hypertrophy through Hippo-YAP pathway in heart failure[J]. *Genet Mol Biol*, 2023, 46(1):e20220221.

[20] ZHOU J N, WU C Q, ZHAO M H. TAOK1-mediated regulation of the YAP/TEAD pathway as a potential therapeutic target in heart failure[J]. *PLoS One*, 2024, 19(8):e0308619.

(收稿日期:2025-04-01 修回日期:2025-07-08)

(编辑:张元媛)