

甘草素对肺动脉高压大鼠肺血管重塑及右心重构的影响

郑欢¹, 郑珍珍², 杨怡恬², 张媛³, 陈鸣娣², 姚卫民², 成俊芬^{2*}, 陈日垦^{2*} (广东医科大学附属第二医院 1. 内分泌科; 2. 呼吸内科, 广东湛江 524003; 3. 广东医科大学第一临床医学院, 广东湛江 524023)

摘要: **目的** 探讨甘草素对肺动脉高压(PAH)大鼠肺血管重塑及右心重构的影响。**方法** 采用腹腔注射野百合碱(MCT)诱导法建立PAH大鼠模型。MCT建模2周后分别给予60和20 mg/kg甘草素干预2周, 观察大鼠右心室收缩压(RVSP)、右心室肥厚指数(RVHI)、大鼠肺动脉组织和右心室心肌组织HE染色结果, 以及检测大鼠血浆环磷酸鸟苷(cGMP)和肺动脉组织蛋白激酶G(PKG)水平。**结果** 60和20 mg/kg甘草素均能降低MCT诱导的PAH大鼠RVSP及RVHI, 增加cGMP和PKG蛋白表达($P<0.01$ 或 0.05)。**结论** 甘草素对PAH大鼠肺血管重塑及右心重构有一定的效果。

关键词: 甘草素; 肺动脉高压; 右心重构; cGMP; PKG

中图分类号: R 543.2

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2024) 03-0251-05

Glycyrrhizin ameliorates right ventricular remodeling in pulmonary hypertension

ZHENG Huan¹, ZHENG Zhen-zhen², YANG Yi-tian², ZHANG Yuan³, CHEN Ming-di², YAO Wei-min², CHENG Jun-fen^{2*}, CHEN Ri-ken^{2*} (1. Department of Endocrinology; 2. Department of Respiratory Medicine; Second Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524003, China; 3. First school of clinical medicine, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: **Objective** The aim of this study is to investigate the effect and the underlying mechanisms of glycyrrhizin on pulmonary vascular remodeling and right heart remodeling in rats with pulmonary arterial hypertension (PAH). **Methods** The PAH rat model was established by intraperitoneal injection of monocrotaline (MCT). After 2 weeks of MCT modeling, the rats were given 60 mg/kg and 20 mg/kg glycyrrhizin for 2 weeks. Right ventricular systolic pressure (RVSP), pulmonary vascular remodeling and right heart remodeling were observed. The plasma levels of cyclic guanosine phosphate (cGMP) and pulmonary tissue protein kinase G (PKG) were measured. **Results** The results showed that both 60 and 20 mg/kg glycyrrhizin decreased RVSP and RVHI in MCT-induced PAH rats, and increased the protein expression levels of cGMP and PKG ($P<0.01$ or 0.05). **Conclusion** Glycyrrhizin has certain effect on pulmonary vascular remodeling and right heart remodeling in PAH rats.

Key words: glycyrrhizin; pulmonary arterial hypertension; right ventricular remodeling; cGMP; PKG

肺动脉高压(PAH)是由各种原因导致的以肺血管重塑为特点的致死性疾病, 可致右心功能衰竭甚至死亡。全球60岁以上人群PAH发病率高达10%^[1]。PAH的基本病理过程包括持续的肺动脉收缩以及肺血管重构^[2]。目前, 临床PAH的治疗多以靶向药物为主, 如5型磷酸二酯酶(PDE5)抑制剂等^[3]。近年研究发现, 中医药来源的单体化合物可以有效抑制肺血管

重塑以及肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)的增殖和迁移^[4-6]。由于中药来源的单体药物具有价廉、来源广、研发风险小等优点, 因此探讨中医药治疗PAH的作用具有重要的意义。研究发现甘草素(Glycyrrhizin)对心血管系统具有广泛的药理作用, 其实用价值和开发潜力巨大^[7]。本研究通过探讨甘草素是否可以发挥抗PAH作用, 改善PAH右心重构, 初步探讨其作用机制,

收稿日期: 2023-12-05

基金项目: 广东省自然科学基金(2022A1515012375), 广东省医学科研基金项目(A2024728, A2024723), 湛江市科技发展专项基金竞争配置项目(2021A05086)

作者简介: 郑欢(1988-), 女, 学士, 主管护师, E-mail: 1075458070@qq.com

通信作者: 成俊芬(1963-), 女, 学士, 主任医师, E-mail: 13729063939@139.com

陈日垦(1991-), 男, 博士, 主治医师, E-mail: chenriken@126.com

以期PAH的治疗提供参考。

1 材料和方法

1.1 动物与材料

12只无特定病原体(SPF)级雄性斯普拉格-杜勒(SD)大鼠购自广东省医学实验动物中心, 身体质量200~250 g。本实验经广东医科大学实验动物伦理委员会同意批准(GDY2202708)。血浆环磷酸鸟苷(cGMP) ELISA试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。肺动脉组织蛋白激酶G(PKG)抗体(多克隆兔抗)、GAPDH(多克隆兔抗)购自广州满睿生物科技有限公司。电泳仪购自美国BIO-Rad公司。甘草素(CSA号: 578-86-9)购自成都麦德生科技有限公司。

1.2 方法

野百合碱(MCT)诱导PAH模型: SD大鼠50 mg/kg腹腔注射MCT(上海皓元生物医药科技有限公司)建立PAH模型。实验分为空白对照组(Control组)、MCT组、MCT+低剂量甘草素(L-Glycyrrhizin)组、MCT+高剂量甘草素(H-Glycyrrhizin)组, 每组3只。造模2周后Control组和MCT组大鼠灌胃0.5%羧甲基纤维素钠, 甘草素组大鼠每天定时灌胃甘草素(MCT+H-Glycyrrhizin组60 mg/kg, MCT+L-Glycyrrhizin组20 mg/kg, 0.5%羧甲基纤维素钠促进甘草素溶解)。2周后取材: 将大鼠置于手术台, 3%异氟烷持续麻醉, 分离颈外静脉, 剪开, 插入右心导管, 记录右室收缩压(RVSP); 称取全心重量(THW)和右室游离壁重(RVW), 右室肥厚指数(RVHI)以右室游离壁/全心重(RVW/THW)表示。

肺动脉剥离: 3%戊巴比妥腹腔麻醉SD大鼠后, 打开胸腔取大鼠肺部和心脏, 迅速放入HBSS溶液中, 洗去残血, 然后在体式显微镜下分离远端肺动脉血管, 去除外层结缔组织, 避免过度牵拉。该过程一定要保持好血管完整性, 避免剪破血管。

肺动脉及心肌组织HE染色: 打开大鼠胸腔后结扎大鼠右主支气管, 沿左主支气管缓慢向左肺注入4%多聚甲醛, 结扎大鼠左主支气管后再将肺部和心脏组织浸入4%多聚甲醛固定24 h; 用刀片完整切取不同处理组大鼠左下肺同一部位肺组织和右心室, 置于75%乙醇溶液, 然后依次进行梯度脱水、抽气, 制成石蜡块, 用切片机将包埋好的石蜡块切成厚度约为4 μ m薄片, 置于切片盒内, 最后将石蜡切片脱蜡, 苏木精、伊红染色, 脱水, 封片, 镜下观察。

cGMP检测: 动物测压后, 碘伏常规消毒, 麻醉状态下打开胸腔, 采用开放性气胸法处死大鼠, 心脏取

血约6 mL, 置于EDTA抗凝采血管中。大鼠全血4 $^{\circ}$ C 986 r/min 10 min离心, 提取上层血浆, 按照cGMP试剂盒说明书步骤检测大鼠血浆cGMP水平。

PKG检测: Western-blot检测各组剥离出的大鼠肺动脉组织PKG蛋白水平。

1.3 统计学处理

采用SPSS 26.0统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析和LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甘草素对大鼠RVSP的影响

与Control组相比, MCT组的RVSP显著增高($P < 0.01$)。MCT+H-Glycyrrhizin组和MCT+L-Glycyrrhizin组的RVSP与MCT组比较明显降低, 且MCT+H-Glycyrrhizin组的效果更显著($P < 0.01$), 见图1。

2.2 甘草素对大鼠RVHI的影响

与Control组比较, MCT组的RVHI显著增加($P < 0.01$)。MCT+H-Glycyrrhizin组和MCT+L-Glycyrrhizin组的RVHI与MCT组比较明显降低, 且MCT+H-Glycyrrhizin组的效果更显著($P < 0.01$ 或0.05), 见图2。

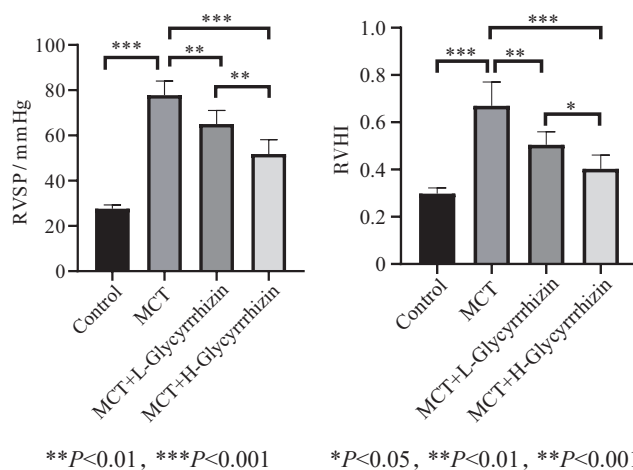


图1 各组大鼠RVSP的比较 图2 各组大鼠RVHI的比较

2.3 大鼠肺动脉组织HE染色情况

与Control组比较, MCT组肺动脉血管壁明显增厚, 管腔变窄; MCT+H-Glycyrrhizin组和MCT+L-Glycyrrhizin组经甘草素干预后大鼠肺动脉血管壁增厚、管腔变窄较MCT组明显缓解, 见图3。

2.4 大鼠心肌组织HE染色情况

Control组右心室心肌纤维排列较齐整, 胞浆均匀, 细胞核处于中央, 呈卵圆形, 细胞核与细胞膜边界清楚; MCT组心肌纤维排列紊乱, 心肌细胞肥大, 部

分胞核宽大畸形;MCT+H-Glycyrrhizin组和MCT+L-Glycyrrhizin组心肌形态学改变较MCT组有所改善。见图4。

2.5 大鼠血浆cGMP和肺动脉组织PKG的表达情况

与Control组比较,MCT组大鼠血浆cGMP和肺动脉组织PKG水平显著降低($P<0.01$);MCT+H-Glycyrrhizin组和MCT+L-Glycyrrhizin组经甘草素干

预后血浆cGMP和肺动脉组织PKG蛋白水平明显升高($P<0.01$ 或 0.05),但两组效果差异无统计学意义($P>0.05$),见图5。

3 讨论

PAH是致死性疾病,其主要病理改变是PASMCs的异常增殖、内膜下迁移及分泌功能增强导致的肺血

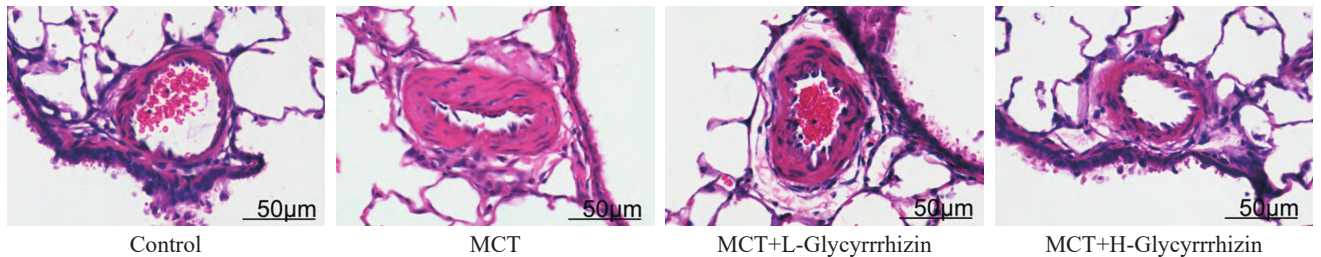
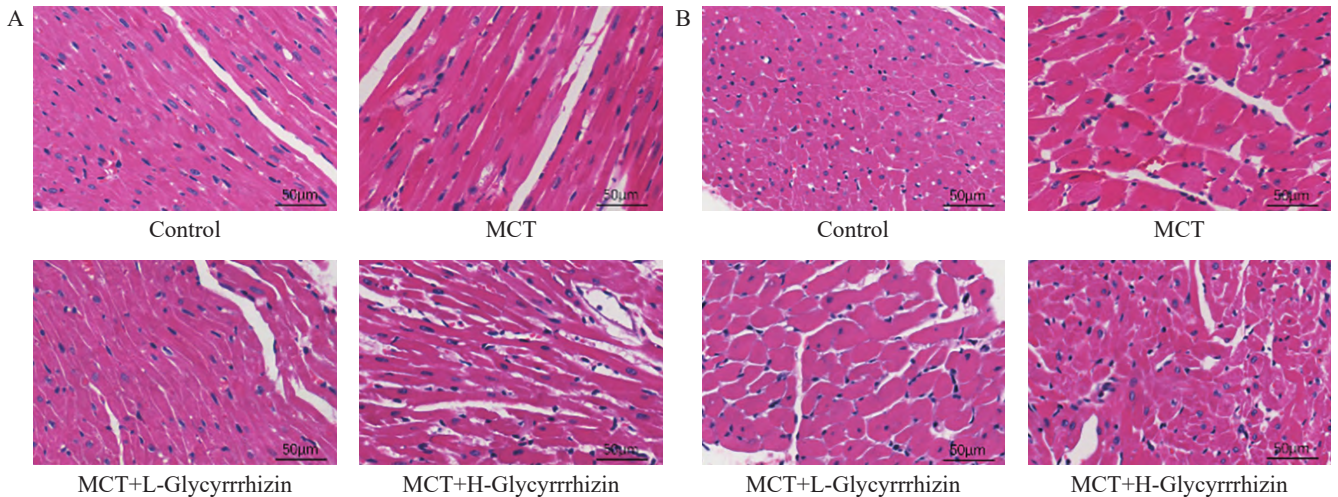
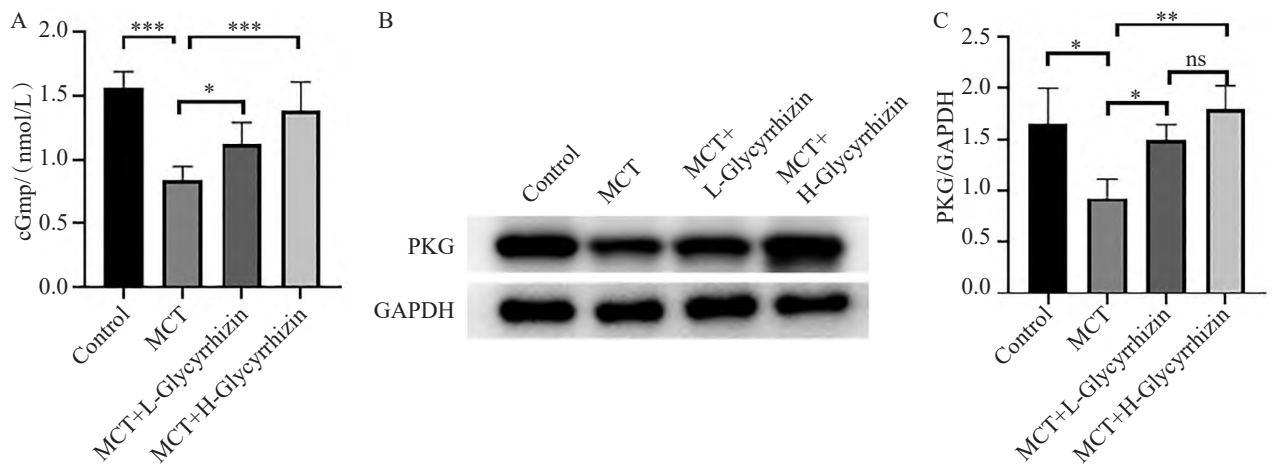


图3 大鼠肺动脉组织HE染色



A. 组织纵切; B. 组织横切

图4 大鼠心肌组织HE染色



A. 血浆cGMP表达水平; B. 肺动脉组织PKG Western-blot检测结果图; C. PKG蛋白表达水平; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns: $P>0.05$

图5 大鼠血浆cGMP和肺动脉组织PKG的表达

管重塑,进而引起血管腔狭窄,诱发PAH^[8]。研究发现,异甘草素可通过抑制低氧诱导的PASMCs 活性氧的产生而抑制PASMCs 增生^[9-10]。而抑制PASMCs 的增生则可以逆转肺血管重塑,从而改善肺动脉压力,降低右心负荷,改善右心重构。PAH现有治疗方法包括原发病治疗、对症支持治疗及靶向药物治疗等,这些方法只能控制病情进展或缓解症状^[9,11],而且存在价格昂贵、不良反应发生率和疾病复发率较高等诸多问题,因此从中药中寻找新药已成为全球的研究热点之一^[12]。甘草素是中药淫羊藿中的单体化合物成分之一,而淫羊藿在中医学中常用于壮阳等作用,这与现代医学中西地那非治疗PAH的原理相似。同时研究发现甘草素对高糖诱导的心肌细胞凋亡具有一定的影响^[7]。因此本研究探讨了甘草素对MCT诱导的PAH大鼠肺血管重塑及右心重构的影响,以期为PAH的治疗提供参考。

腹腔注射MCT是常用的研究PAH和右心重构的方法。本研究采用MCT成功建立大鼠PAH模型,结果发现MCT造模后大鼠肺动脉压力明显升高,肺动脉增厚,肺动脉管腔狭窄,而予甘草素治疗后给药组肺动脉压力显著下降,肺动脉管壁增厚较MCT组改善明显,管腔狭窄好转,提示甘草素可抑制MCT诱导的肺动脉重塑。甘草素不但能改善MCT大鼠血流动力学参数,还能抑制MCT诱导的肺动脉重塑,改善右心重构。本研究结果发现MCT组大鼠RVHI升高,心肌细胞肥大,而经甘草素治疗后的大鼠,其心肌形态学较MCT组有所改善。甘草素是一种具有多种药理作用的类黄酮化合物,来源于多种中草药,同时还存在于许多食物中,并可作为膳食补充剂,临床中已用作多种疾病的治疗。本研究推测甘草素可能发挥类似PDE5抑制剂的作用,或可通过cGMP / PKG通路改善PAH。因此我们在实验中检测了cGMP和PKG蛋白的表达,结果发现MCT组cGMP和PKG水平显著降低,予甘草素治疗后大鼠cGMP和PKG水平明显升高($P<0.01$ 或 0.05),但高剂量组与低剂量组效果差异无统计学意义($P>0.05$),提示甘草素可能发挥类似PDE5靶向治疗PAH的作用,但其具体作用机制还需后续实验进一步探讨。

综上,甘草素对PAH大鼠肺血管重塑及右心重构有一定的效果。后期我们将进一步研究上述具体作用机制及其药代动力学,以期为甘草素的临床应用提供新的策略。

参考文献:

- [1] HUBERT M, SITBON O, CHAOUAT A, et al. Pulmonary arterial hypertension in France: Results from a national registry[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 173(9): 1023-1030.
- [2] HASSOUM P M. Pulmonary arterial hypertension[J]. *N Engl J Med*, 2021, 385(25): 2361-2376.
- [3] GALIE N, CHANNICK R N, FRANTZ R P, et al. Risk stratification and medical therapy of pulmonary arterial hypertension[J]. *Eur Respir J*, 2019, 53(1): 1801889.
- [4] WANDE Y, JIE L, AIKAI Z, et al. Berberine alleviates pulmonary hypertension through Trx1 and beta-catenin signaling pathways in pulmonary artery smooth muscle cells[J]. *Exp Cell Res*, 2020, 390(1): 111910.
- [5] LUO S, KAN J, ZHANG J, et al. Bioactive compounds from coptidis rhizoma alleviate pulmonary arterial hypertension by inhibiting pulmonary artery smooth muscle cells' proliferation and migration[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2021, 78(2): 253-262.
- [6] RAJABI S, NAJAFIPOUR H, JAFARINEJAD-FARSANGI S, et al. Quercetin, perillyl alcohol, and berberine ameliorate right ventricular disorders in experimental pulmonary arterial hypertension: Effects on miR-204, miR-27a, fibrotic, apoptotic, and inflammatory factors[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2021, 77(6): 777-786.
- [7] 卓凤巧, 黄占红, 刘宇捷. 甘草素对高糖诱导心肌细胞凋亡的影响及机制[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2019, 24(2): 147-151.
- [8] 中华医学会呼吸病学分会肺栓塞与肺血管病学组, 中国医师协会呼吸医师分会肺栓塞与肺血管病工作委员会, 全国肺栓塞与肺血管病防治协作组, 等. 中国肺动脉高压诊断与治疗指南(2021版)[J]. *中华医学杂志*, 2021, 101(1): 11-51.
- [9] 孙宗秀, 罗昊. 异甘草素联合奥希替尼对肺癌患者血清脂肪因子水平的影响[J]. *中国处方药*, 2021, 19(12): 74-76.
- [10] 姚立杰, 王月飞, 李永涛, 等. 异甘草素对低氧诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞增生的抑制作用研究[J]. *系统医学*, 2017, 2(20): 10-13.
- [11] BEIK A, NAJAFIPOUR H, JOUKAR S, et al. Perillyl alcohol suppresses monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats via anti- remodeling, anti-oxidant, and anti-inflammatory effects[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2021, 43(3): 270-280.
- [12] ANAND G A, HARI P V, KUMARAN A. Medicinal plants as a potential source of Phosphodiesterase-5 inhibitors: A review[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 267: 113536.

(责任编辑:李 晓)