

S1P 对慢性阻塞性肺疾病大鼠 caspase-3、ERK 及肺动脉平滑肌细胞的影响

李点 郑正 江叶舟

(湖南省胸科医院综合科, 湖南 长沙 410003)

【摘要】 目的 探讨 S1P 对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠 caspase-3、ERK 及肺动脉平滑肌细胞的影响。方法 建立 COPD 大鼠模型,12 周的清洁级健康雄性 SD 大鼠 60 只平均分为对照组、COPD 组和 S1P 组。比较 3 组大鼠右心室收缩压(PVSP)和右心室肥大指数(RVMI),HE 染色比较大鼠肺组织病理改变,TUNEL 检测肺动脉平滑肌细胞的凋亡情况,蛋白质印记检测 COPD 大鼠 caspase-3 蛋白和 ERK 蛋白的表达。**结果** COPD 组大鼠肺功能 $FEV_{0.3}/FVC$ 、 $Cdyn$ 值明显低于对照组,RI 值高于对照组(均 $P < 0.05$),干预后的 S1P 组 $FEV_{0.3}/FVC$ 、 $Cdyn$ 值显著升高,RI 值明显降低(均 $P < 0.05$)。与对照组相比,COPD 组大鼠 RVSP 值和 RVMI 显著升高(均 $P < 0.05$);干预后的 S1P 组大鼠 RVSP 值和 RVMI 明显低于 COPD 组(均 $P < 0.05$)。与对照组相比,COPD 组大鼠肺组织形态明显恶化,且肺动脉平滑肌细胞发生大量的凋亡;干预后的 S1P 组大鼠肺组织得到了明显的改善,且肺动脉平滑肌细胞凋亡指数较 COPD 组得到了明显抑制($P < 0.05$)。蛋白比较显示,与对照组大鼠相比,COPD 组大鼠 caspase-3 蛋白表达显著升高,p-ERK 蛋白表达显著降低($P < 0.05$);与 COPD 组相比,S1P 组大鼠 caspase-3 蛋白得到了显著抑制,且 p-ERK 蛋白表达明显升高($P < 0.05$)。**结论** S1P 可抑制 COPD 大鼠 caspase-3 蛋白的表达,激活 ERK 蛋白的表达,并且对肺动脉平滑肌细胞的凋亡有一定的促进作用。

【关键词】 S1P;慢性阻塞性肺疾病;caspase-3;ERK;肺动脉平滑肌细胞

【中图分类号】 R543.2 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 01. 006

Effects of S1P on Caspase-3, ERK and pulmonary artery smooth muscle cells in COPD rats

LI Dian, ZHENG Zheng, JIANG Yezhou

(General Department, Chest Hospital of Hunan, Changsha 410003, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of S1P on Caspase-3, ERK and pulmonary artery smooth muscle cells in COPD rats. **Methods** Sixty COPD rats were divided into control group, COPD group and S1P group. Right ventricular systolic pressure and right ventricular hypertrophy index were compared among the three groups. Pathological changes of lung tissue were compared by HE staining. Apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells was detected by TUNEL. The expression of Caspase-3 and ERK protein in COPD rats was detected by protein imprinting. **Results** The values of $fev_{0.3}/fvc$ and $cdyn$ in COPD group were significantly lower than those in sham group, and the values of RI were higher than those in sham group ($P < 0.05$). After intervention, the values of $fev_{0.3}/fvc$ and $cdyn$ in S1P group were significantly increased, and the values of RI were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the RVSP value and RVMI of COPD group were significantly increased ($P < 0.05$). After intervention, the RVSP value and RVMI of S1P group were significantly lower than those of COPD group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the morphology of lung tissue in COPD group was significantly deteriorated, and a large number of apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells occurred; after intervention, the lung tissue of S1P group was significantly improved, and the apoptosis index of pulmonary artery smooth muscle cells was significantly inhibited compared with COPD group ($P < 0.05$). Protein comparison showed that compared with the control group, the expression of caspase-3

protein in COPD group was significantly increased, and the expression of p-ERK protein was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with COPD group, the expression of caspase-3 protein in S1P group was significantly inhibited, and the expression of p-ERK protein was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** S1P can inhibit the expression of Caspase-3, activate the expression of ERK, and promote the apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells.

【Key words】 S1P; COPD; Caspase-3; ERK; Pulmonary artery smooth muscle cells

慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是呼吸系统疾病中的常见病和多发病,具有较高的患病率和病死率,对社会造成了巨大的经济负担,已成为重要的公共卫生问题^[1-2]。COPD 又称为慢阻肺,是一种可以预防和治疗的疾病,主要特征为持续性气流受到限制,在肺部主要表现为进行性发展的不完全性气流受限,并且和香烟烟雾等有害气体的吸入有密切关系,其中吸入香烟烟雾也是导致 COPD 最重要的发病因素^[3]。肺动脉平滑肌细胞(Pulmonary vascular smooth muscle cells, PASMCS)是肺血管的重要组成部分,增加肺动脉平滑肌细胞凋亡可以逆转肺动脉高压肺血管重建^[4]。有研究表明, COPD 的全身、局部炎症及缺氧等因素均可导致 PASMCS 的增殖和凋亡^[5]。细胞外信号调控激酶(Extracellular signal-regulated kinase, ERK)介导着细胞增殖、分化和凋亡等多种生物学过程,在凋亡过程中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)是最关键的蛋白酶,增加 caspase-3 蛋白的表达可促进细胞的凋亡^[6]。1-磷酸鞘氨醇(Sphingosine-1-phosphate, S1P)是一类真核生物体内天然存在的具有生物活性的细胞膜鞘类脂质代谢中间产物^[7]。有研究证实 S1P 介导着多种生物学过程,其不仅可以和细胞表面特定的受体相互结合,进而影响细胞的增殖、血管再生和免疫细胞迁移等,另外,其也可以作为细胞的第二信使调节 Ca^{2+} 稳态、抑制细胞凋亡、促进细胞增殖等作用^[8]。有研究发现 S1P 可通过促进下游 ERK 信号传导而引起细胞增殖反应^[9]。FTY720 为 S1P 受体激动剂芬戈莫德,其广泛应用于临床,在结构上与 S1P 具有相似性,且本身并不能被 S1P 受体识别,可以变相的增强 S1P 的生物学功能^[10]。本研究通过应用 FTY720 对 COPD 大鼠进行处理,观察 S1P 信号对肺动脉平滑肌细胞及 caspase-3 和 ERK 蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用 12 周的清洁级健康雄性 SD 大鼠 60 只,购自辽宁长生生物技术有限公司,体重 200~220 g,所有大鼠无特定病原体,均饲养在同温度、同湿度的环境中,自由饮水,普通饲料饲养 16 周。本研究遵守动物伦理要求,并经湖南省胸科医院伦理委员会

审核批准。

1.2 试剂和仪器 芬戈莫德(FTY720)购自美国 Selleck 公司;黄果树香烟购自贵州中烟工业公司;兔抗大鼠 ERK 和 caspase-3 抗体购自美国 CST 公司;Tunel 试剂盒购自 Roche 公司; β -actin 单抗购自武汉谷歌生物科技有限公司;电热恒温培养箱购自天津泰斯特公司;图像分析软件购于宁波江丰生物信息技术有限公司。

1.3 动物分组和模型建立 将大鼠随机分为对照组、COPD 组和 S1P 组。采用烟雾暴露联合脂多糖气管内滴注的方法建立 COPD 大鼠模型,把模型组和 S1P 组大鼠均置于动物烟熏箱进行烟熏(烟熏箱中烟雾浓度保持在 450~500 bpm,持续 30 min,间隔 3 h 烟熏 1 次,每 12 h 更换烟盒 1 次),并气管内滴注脂多糖 0.2 mg/kg,每日 1 次,持续 12 周。分别于第 1 天和第 84 天,称取 COPD 组和 S1P 组大鼠体质量,采用 Wistar 大鼠肺功能检测仪检测呼吸峰流速、呼气峰流量和每分钟通气量,当以上指标下降程度超过 30% 时即为 COPD 模型成功。

建模成功后, S1P 组大鼠每天给予 10 mg/kg FTY720 灌胃给药,隔天 1 次,每周 3 次。对照组和 COPD 组大鼠每天给予等量的生理盐水灌胃,每周 3 次。在给药前对大鼠进行乙醚气道麻醉,操作时动作轻柔,避免对大鼠造成损伤,增加大鼠感染及病死率。

1.4 标本采集 测定大鼠收缩压后,麻醉所有大鼠并处死,取出右肺组织,保存在 -80°C 的冰箱中备用。一部分用于 HE 染色,另一部分用于蛋白质印迹检测。

1.5 肺功能检测 每千克大鼠腹腔注射 40 mg 的戊巴比妥钠麻醉,连接小动物呼吸机,维持平静呼吸 3 min 并连接 Maclab 数据分析系统,3 min 后给予一定气量充气模仿深呼吸,利用危机处理计算大鼠肺功能指标。

1.6 右心室收缩压(RVSP)的测定 每千克大鼠腹腔注射 40 mg 的戊巴比妥钠麻醉,在大鼠右侧颈外静脉插入聚乙烯导管直到肺动脉干,稳定 10 min 后,采用 YP101 型压力转换传感器及 YSD4-G 型生理记录仪检测大鼠平均肺动脉压力,以 mmHg 来表示 ($1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$)。

1.7 右心室肥大指数(RVMI)测定 测定右心室 RVSP 值后,将大鼠放血处死,迅速开胸取出心脏及肺组织。沿房室交界处除去左右心房以及周围大血管,留取右心室(RV)以及左心室和室间隔(LV+S),采用滤纸吸干组织中多余的水分并经电子天平分别称取质量,计算 RV 质量与 LV+S 质量的比值,即为 RVMI 值。

1.8 HE 染色检测肺组织病理形态 将处死的大鼠左肺组织采用大头针固定在泡沫板上,并用手术刀在距离肺的尖部 0~5 cm 处切取肺组织,并将组织固定在中性甲醛中 24 h,取出后,经乙醇脱水、石蜡包埋、切片后,再进行 HE 染色,光学显微镜下观察各组肺血管形态。另取直径为 100 μm 左右的肺动脉,采用 ICM-102 细胞图像分析软件对其形态进行定量统计,以血管壁横断面积占血管横断面积的比值(WA,%)作为衡量低氧肺血管重构的指标。

1.9 TUNEL 检测肺动脉平滑肌细胞的凋亡 按照罗氏公司提供的 TUNEL 试剂盒说明书操作,将大鼠左侧肺组织进行石蜡包埋、切片后加入 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶 K,0.3% 双氧水及 0.1% TritonX-100,而后加入 TUNEL 反应液,加入标记荧光素抗体的 HRP 封闭以及 DAB 显色试剂盒进行显色,在光学显微镜下进行镜检。在显微镜下随机选取直径在 100 μm 左右的肺动脉,统计 500 个肺动脉平滑肌细胞中凋亡细胞数,得出细胞凋亡指数(AI),AI=凋亡细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.10 蛋白质印迹法检测 COPD 大鼠 caspase-3 和 p-ERK 蛋白表达 将 3 组大鼠的肺组织分别提取 100 mg,将细胞进行裂解并提取核蛋白,并对核蛋白的浓度进行测量,分装后,保存在零下 20 摄氏度的环境中。将提取出的蛋白溶液和缓冲溶液进行混均,按照 4:1 比例进行,然后将蛋白液煮沸使其变性。在电泳板内分别注入 50 μm 的蛋白样品,把电泳后的样品转移到 PVDF 膜上,加入脱脂奶粉,并进行封闭,时常为 1 h。加入 1 抗后进行 TTBS 漂洗,每次漂洗 10 min,一共进行 3 次漂洗,最后加入 2 抗对溶液进行稀释,再在常温的环境中封闭 1 h。取出 PVDF 膜,TTBS 漂洗 10 min $\times 3$,DAB 显色后数码相机照相。

1.11 统计学分析 数据采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析,3 组大鼠 RVSP 和 RVM、肺动脉平滑肌细胞凋亡指数、caspase-3 和 p-ERK 蛋白的表达结果用($\bar{x}\pm s$)表示,用 t 检验分析两组间比较结果,用单因素方差分析 3 组比较结果, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 COPD 大鼠肺功能 对照组大鼠肺功能 FEV_{0.3}/FVC、Cdyn 值高于 COPD 组,RI 值低于 COPD 组($P<0.05$);与 COPD 组相比,S1P 组 FEV_{0.3}/FVC、Cdyn 值显著升高,RI 值明显降低($P<0.05$),见表 1。

表 1 3 组大鼠肺功能比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of lung function among the three groups

组别	<i>n</i>	FEV _{0.3} /FVC ($\times 10^{-2}$)	Cdyn (mL/cmH ₂ O)	RI (cmH ₂ O/mL \cdot s)
对照组	20	79.67 \pm 7.24 ^①	0.38 \pm 0.12 ^①	0.32 \pm 0.08 ^①
COPD 组	20	54.83 \pm 5.94	0.13 \pm 0.07	0.75 \pm 0.13
S1P 组	20	63.68 \pm 6.76 ^①	0.25 \pm 0.09 ^①	0.59 \pm 0.11 ^①
<i>F</i>		71.290	34.236	86.062
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与 COPD 组相比,① $P<0.05$

2.2 3 组大鼠 RVSP 与 RVMI 比较 与对照组大鼠相比,COPD 组大鼠 RVSP 值显著升高,干预后的 S1P 组大鼠 RVSP 值得到了明显的降低,且低于 COPD 组(均 $P<0.05$);与对照组相比,COPD 组大鼠 RVMI 值显著升高($P<0.05$);与 COPD 组相比,S1P 组大鼠 RVMI 明显降低($P<0.05$),见表 2。

表 2 3 组大鼠 RVSP 值测定结果比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of RVSP values among the three groups

组别	<i>n</i>	RVSP(mmHg)	RVMI($\times 10^{-2}$)
对照组	20	15.23 \pm 2.34	20.18 \pm 2.97
COPD 组	20	33.67 \pm 3.92 ^①	28.58 \pm 3.03 ^①
S1P 组	20	24.18 \pm 3.08 ^②	22.76 \pm 2.51 ^②
<i>F</i>		168.2	45.71
<i>P</i>		<0.0001	<0.0001

注:与对照组相比,① $P<0.05$;与 COPD 组相比,② $P<0.05$

2.3 3 组大鼠肺组织病理形态学比较 与对照组相比,COPD 组大鼠肺动脉组织中膜明显变厚,肺血管生成明显,内皮细胞出现损伤甚至脱落;干预后的 S1P 组大鼠肺组织得到了明显的改善,见图 1。

2.4 3 组大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡比较 与对照组相比,COPD 组肺动脉平滑肌细胞形体完整,基本无固缩;与 COPD 组相比,S1P 组肺动脉平滑肌细胞出现大量的固缩,细胞内出现空泡,见图 2。对照组、COPD 组及 S1P 组大鼠的 AI 指数分别为(12.7 \pm 0.58)%,(1.23 \pm 0.22)%和(32.4 \pm 0.76)%,COPD 组大鼠的 AI 指数明显低于对照组,S1P 组 AI 指数显著高于 S1P 组(均 $P<0.05$)。

2.5 3 组大鼠 caspase-3 和 p-ERK 蛋白表达 与对照组大鼠相比,COPD 组大鼠肺组织中 caspase-3 蛋白表达显著升高,p-ERK 蛋白表达显著降低($P<0.05$);

与 COPD 组相比, S1P 组大鼠肺组织中 caspase-3 蛋白得到了显著的抑制, 且 p-ERK 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$), 见图 3。

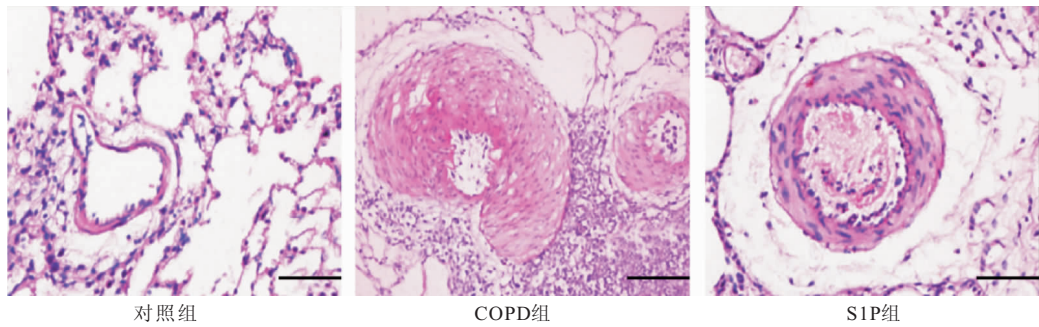


图 1 肺组织 HE 染色(200×)

Figure 1 HE staining of lung tissue

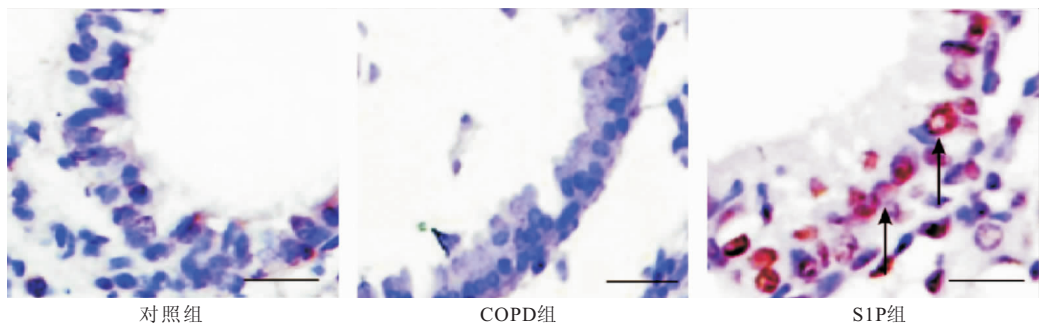


图 2 肺动脉平滑肌细胞凋亡(200×)

Figure 2 Apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells

注: 箭头指示平滑肌细胞出现固缩、空泡

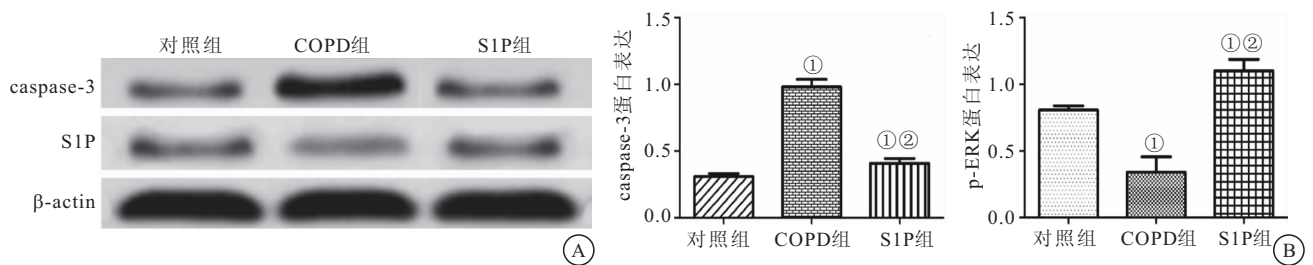


图 3 3 组大鼠 caspase-3 和 p-ERK 蛋白表达比较

Figure 3 Comparison of Caspase-3 and p-ERK protein expression among three groups

注: A. 蛋白印迹图; B. 3 组大鼠 caspase-3 蛋白、p-ERK 蛋白表达比较。与对照组相比, ① $P < 0.05$; 与 COPD 组相比, ② $P < 0.05$

3 讨论

COPD 主要是由长期气道阻塞导致患者肺泡缺氧和二氧化碳潴留, 进而引起肺血管收缩、肺血管重构等临床症状, 严重的可导致肺动脉高血压症、右心衰竭甚至死亡^[11]。慢性炎症、低氧或缺氧等症状均可导致肺血管重塑, 且肺血管重塑是导致 COPD 进一步恶化的关键因素^[12]。低氧导致肺内高血压, 从而促进肺动脉纤维母细胞和内皮细胞的促有丝分裂因子、生长因子的释放, 而这些因子的释放进一步促进平滑肌细胞、成纤维细胞的增殖并进一步刺激细胞外基质的产生, 导致肺动脉血管壁增厚, 加重气道阻塞^[13]。

肺动脉高压是以肺动脉压力以及肺部血管阻力升高为特点的病理生理综合征, 其主要病理机制为血管收缩、血管重塑, 导致右心室负荷增加, 右心衰竭^[14]。RVSP、RVMI 是反映肺动脉及血管重塑的指标。本研究结果显示, COPD 组大鼠肺功能 $FEV_{0.3}/FVC$ 、 C_{dyn} 值明显降低, RI 值明显升高; 且 RVSP 和 RVMI 明显较对照组也明显升高; 干预后的 S1P 组 $FEV_{0.3}/FVC$ 、 C_{dyn} 值显著升高, RI 值明显降低; 且 RVSP 和 RVMI 明显均得到了显著的抑制, 这也印证了以往的研究^[15]。COPD 患者肺动脉管增厚明显, 管腔明显变窄, 本研究结果也证实了这一病理变化。

肺动脉平滑肌细胞在胚胎血管发育期为合成表型,处于增殖状态;而出身后该细胞由合成表型转为收缩型,处于静止状态,主要维持肺部血管的张力和正常血管构型。当机体出现低氧等刺激时,该细胞则又转化为合成表型,从而进入增殖状态。有研究表明,COPD 患者平滑肌细胞增加数量高于非 COPD 患者^[16-17]。本研究结果也证实,COPD 大鼠血管壁增厚、TUNEL 染色阳性细胞数少于正常对照组,COPD 大鼠 AI 明显低于对照组,这些结果均证实 COPD 鼠存在明显的血管壁增厚、平滑肌细胞增殖现象。S1P 脂质具有一定的多效性,参与多种生理、病理过程,包括血管生成、细胞的增殖和迁移,炎症细胞的运输,细胞因子的产生、细胞骨架重组、内皮屏障调节血管张力控制等^[18-19]。本研究证实,S1P 可有效抑制 COPD 大鼠平滑肌细胞增殖,改善 RVSP、RVMI 和肺功能,进而改善肺血管重塑;同时,其还能有效的促进肺动脉平滑肌细胞的凋亡,由此推测 S1P 改善 COPD 大鼠肺动脉高压的作用可能与其促进平滑肌细胞凋亡的作用有关。蔡学定等^[20]研究证实,姜黄素可能通过抑制 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 轴,改善低氧诱导的 PSMCs 异常增殖,HPH 大鼠肺血管重塑和右心肥大,降低肺动脉压力。陈廷伟等^[21]通过对 COPD 大鼠研究发现,S1P 可能参与 COPD 大鼠肺部炎症的进程。

ERK 介导细胞的增殖、分化和凋亡等生物学过程,阻断 ERK 通路的激活,可促进细胞的凋亡^[22]。ERK 上游的蛋白会磷酸化 ERK,活化后 P-ERK 会作用于细胞浆内多种信号分子,P-ERK 也会直接进入到细胞核内,进而作用于转录因子,对基因的表达进行调控^[23]。本研究结果显示,COPD 组大鼠 p-ERK 蛋白的表达明显降低,其活性被明显抑制。Caspase-3 是 caspase 家族中级联反应最关键的一种蛋白酶,caspase-3 正常情况下在细胞质中没有活性,当其被凋亡信号激活后,caspase-3 被分裂为两个亚基,进而结合为四聚体成为有活性的酶,活化后的 caspase-3 会对不同的底物进行切割,让 DNA 发生裂解,进而导致细胞死亡^[24]。本研究结果显示,COPD 组大鼠的 caspase-3 蛋白表达显著高于对照组,给予 COPD 大鼠 1-磷酸鞘氨醇受体激活剂芬戈莫德灌胃处理后,大鼠的 caspase-3 表达得到抑制,同时 ERK 蛋白的表达被激活,提示 S1P 可有效的抑制 COPD 大鼠 caspase-3 表达,激活 ERK 蛋白活性。赵龙等^[25]研究发现,1-磷酸鞘氨醇可通过抑制肺组织细胞凋亡进而影响肺气肿的形成,进一步改善 COPD 患者的症状及病理改变,其机制可能与 S1P 信号激活 S1P/Akt/ERK 信号通路有关。

4 结论

S1P 可抑制 COPD 大鼠 caspase-3 蛋白表达,激活 ERK 蛋白,对肺动脉平滑肌细胞的凋亡有一定的促进作用。但本研究也有一定局限性,COPD 是多方面作用的结果,涉及多条信号通路,而其对信号通路是否有作用,有什么样的作用仍需要后续深入研究。

【参考文献】

- [1] FUQIANG W. Reinterpretation of 2017 Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease[J]. West China Medical Journal, 2018, 92(14):937.
- [2] LINDENAUER P K, DHARMARAJAN K, QIN L, *et al.* Risk Trajectories of Readmission and Death in the First Year after Hospitalization for Chronic Obstructive Pulmonary Disease[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2018, 197(8):1009-1017.
- [3] HIKICHI M, MIZUMURA K, MARUOKA S, *et al.* Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by cigarette smoke [J]. Journal of Thoracic Disease, 2019, 11(S17):S2129-2140.
- [4] CHEN J, GUO J, CUI X, *et al.* The Long Noncoding RNA LncRPT Is Regulated by PDGF-BB and Modulates the Proliferation of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells[J]. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2018, 58(2):181-193.
- [5] JIN H, WANG Y, ZHOU L, *et al.* Melatonin attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting the inflammation and the proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells[J]. Journal of Pineal Research, 2015, 57(4):442-450.
- [6] 刘芳,赵川,陈彻,等. 细胞外信号调节激酶与肿瘤的关系及其抑制剂的研究进展[J]. 肿瘤药学,2019,9(2):184-188.
- [7] 李仕燕,郑一宁,梅秋芳,等. 1-磷酸鞘氨醇及其受体在自身免疫病中的研究进展[J]. 中华内科杂志,2018,57(1):73-75.
- [8] 刘利娟,李傲. SphK1/S1P 信号通路在肺纤维化发生中的作用[J]. 济宁医学院学报,2019,42(6):424-427.
- [9] 郝玉琴. MAPK/ERK 信号传导通路在肿瘤治疗中作用机制的研究[J]. 中国麻风皮肤病杂志,2012,28(7):490-493.
- [10] 高一军,李松,郑志兵,等. 新型鞘氨醇-1-磷酸受体选择性激动剂的研究进展[J]. 国际药理学研究杂志,2013,40(2):28-33.
- [11] TANNER L, SINGLE A B. Animal Models Reflecting Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Related Respiratory Disorders: Translating Pre-Clinical Data into Clinical Relevance[J]. Journal of Innate Immunity, 2020, 12(3):487-492.
- [12] ALVAR AGUSTI A B C D, D R F C. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Pathogenesis - ScienceDirect [J]. Clinics in Chest Medicine, 2020, 41(3):307-314.
- [13] TSILIGIANNI I, KOCKS J W H. Daytime symptoms of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review[J]. npj Primary Care Respiratory Medicine, 2020, 30(1):56-61.
- [14] 王海宇,王胜. 中医药治疗慢性阻塞性肺疾病研究进展[J]. 中医临床杂志,2018,30(2):201-204.

- activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits[J]. *Eur J Clin Invest*, 2018, 48(2):e12951-12959.
- [4] KRAČUN D, KLOP M, KNIRSCH A, *et al*. NADPH oxidases and HIF1 promote cardiac dysfunction and pulmonary hypertension in response to glucocorticoid excess[J]. *Redox Biol*, 2020, 34(1):1015-1026.
- [5] 黄志华. KLF4 与炎症反应[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2019(1): 190-193.
- [6] SHEIKH AQ, SADDOUK FZ, NTOKOU A, *et al*. Cell Autonomous and Non-cell Autonomous Regulation of SMC Progenitors in Pulmonary Hypertension[J]. *Cell Rep*, 2018, 23(4): 1152-1165.
- [7] GALIÈ N, CHANNICK RN, FRANTZ RP, *et al*. Risk stratification and medical therapy of pulmonary arterial hypertension[J]. *Eur Respir J*, 2019, 53(1):1801-1808.
- [8] 曾闵, 易世江, 王野峰, 等. 硫化氢抑制缺氧诱导的肺动脉平滑肌细胞增殖及迁移和促进凋亡的实验研究[J]. *心肺血管病杂志*, 2020, 39(10):1258-1263.
- [9] 刘礼姣, 谢利剑. 丹参酮 II A 治疗肺动脉高压作用机制[J]. *儿科药理学杂志*, 2021, 27(6):60-63.
- [10] BUVELOT H, JAQUET V, KRAUSE KH. Mammalian NADPH Oxidases[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1982(3):17-36.
- [11] 刘玉玲, 汪煜华, 张秀芹, 等. 染料木素拮抗对氧磷诱导的大鼠胸主动脉组织 p22phox 表达上调[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(9):1292-1298.
- [12] PENA E, SIQUES P, BRITO J, *et al*. Nox2 Upregulation and p38 α MAPK Activation in Right Ventricular Hypertrophy of Rats Exposed to Long-Term Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22):8576-8588.
- [13] ZHANG Z, TRAUTZ B, KRAČUN D, *et al*. Stabilization of p22phox by Hypoxia Promotes Pulmonary Hypertension[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 30(1):56-73.
- [14] NAGARAJ C, TABELING C, NAGY BM, *et al*. Hypoxic vascular response and ventilation/perfusion matching in end-stage COPD may depend on p22phox[J]. *Eur Respir J*, 2017, 50(1): 1601-1614.
- [15] 杨清媛, 黄拓, 吴健, 等. KLF4 对内皮细胞功能影响及其机制研究的进展[J]. *心血管康复医学杂志*, 2021, 30(1):64-67.
- [16] 张杰, 陆文强, 孟立平. miR-449a 通过靶向 KLF4 蛋白导致血管平滑肌细胞表型转化[J]. *中华病理学杂志*, 2020(2):180-181-182.
- [17] 何丽, 黄梅, 杨彩琴, 等. 松油烯-4-醇干预 KLF4 信号改善高糖诱导 VSMCs 氧化应激损伤的实验研究[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(6):839-844.
- [18] 周静, 徐慧敏, 黄鑫涛, 等. 银杏叶提取物 (EGb761) 通过调控 AMPK/KLF4 途径抑制血管平滑肌细胞表型转化[J]. *中国药理学杂志*, 2020, 55(8):604-610.
- [19] 李宜桐, 李勇. 低氧性肺动脉高压肺血管重塑机制的研究[J]. *医学信息*, 2020, 33(15):26-29.
- [20] SHAN F, HUANG Z, XIONG R, *et al*. HIF1 α -induced upregulation of KLF4 promotes migration of human vascular smooth muscle cells under hypoxia[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(1): 141-150.
- [21] SUN D, DING D, LI Q, *et al*. The preventive and therapeutic effects of AAV1-KLF4-shRNA in cigarette smoke-induced pulmonary hypertension[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 25(2):1238-1251.
- [22] TANG Y, HUANG Q, LIU C, *et al*. p22phox promotes Ang-II-induced vascular smooth muscle cell phenotypic switch by regulating KLF4 expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 514(1):280-286.

(收稿日期:2021-05-13;修回日期:2021-11-18;编辑:郭翠)

(上接第 32 页)

- [15] ZHU N, CHEN H, ZHAO XY, *et al*. Effects of monocrotaline induced pulmonary hypertension on the expression of Hippo signaling pathway related molecules in rats [J]. *Chinese Journal of pathophysiology*, 2019, 35(7):1333-1338.
- [16] 程大艳, 吴美平. 血管平滑肌细胞表型对动脉硬化类疾病的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(13):114-118.
- [17] 黎银焕, 张平, 陈卫民, 等. COPD 并发肺炎患者外周血内皮祖细胞数量和功能的变化及机制研究[J]. *广州医科大学学报*, 2020, 48(4):50-55.
- [18] 宋松松, 于复超, 张光昊, 等. 1-磷酸鞘氨醇在心血管疾病中的研究进展[J]. *实用老年医学*, 2017, 31(7):688-690, 700.
- [19] 任宇超, 张琳, 焦晓琪. 1-磷酸鞘氨醇通过 PI3K/Akt 信号通路对冠心病大鼠心肌细胞凋亡的调控作用研究[J]. *新中医*, 2020, 52(4):7-10.
- [20] 蔡学定, 陈马云, 李文雅, 等. 姜黄素通过 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 轴对低氧性肺动脉高压的干预作用[J]. *温州医科大学学报*, 2020, 50(2):16-19, 25.
- [21] 陈延伟, 艾文, 李一禄, 等. 1-磷酸鞘氨醇在慢性阻塞性肺疾病大鼠肺部炎症作用的研究[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2015(36):11-14.
- [22] 杨扬, 夏冬琴, 王维. 抑制剂 PD98059 阻断 MAPK/ERK 信号通路对结直肠癌细胞增殖抑制和凋亡促进作用的研究[J]. *结直肠肛门外科*, 2019, 25(6):657-661, 667.
- [23] 刘敏, 谢巍伟, 郑维, 等. 雌二醇与 ESR1 靶向结合通过 ERK 信号通路调控软骨细胞的增殖[J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(0):134-143.
- [24] 刘迪, 于子翔, 张寒雪, 等. 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷干预 Caspase 级联反应抑制 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡[J]. *营养学报*, 2020, 42(4):63-67.
- [25] 赵龙, 李勇, 夏书月. 1-磷酸鞘氨醇信号对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺泡扩大作用的影响[J]. *国际呼吸杂志*, 2019, 39(20): 1526-1531.

(投稿日期:2020-12-29;修回日期:2021-02-06;编辑:郭翠)