

p38MAPK在低氧高二氧化碳肺动脉平滑肌中的表达及三七皂苷单体Rb₁的干预

郑梦晓^{1#} 宋张娟^{1#} 马迎春¹ 宋冬¹ 黄林静¹ 唐兰兰² 王万铁^{1*}

(¹温州医科大学病理生理学教研室, 温州 325035; ²浙江省新华医院病理科, 杭州 310005)

摘要 该实验旨在探讨三七皂苷单体Rb₁对低氧高二氧化碳性肺动脉收缩的作用及其与p38MAPK信号通路的关系。原代培养雄性SD大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMCs), 取第2~5代细胞, 随机分为五组: 常氧组(N组)、低氧高二氧化碳(1% O₂, 6% CO₂)组(H组)、低氧高二氧化碳+8 mg/mL Rb₁组(Rb_L组)、低氧高二氧化碳+40 mg/mL Rb₁组(Rb_M组)、低氧高二氧化碳+100 mg/mL Rb₁组(Rb_H组)。孵育24 h后收集细胞, 分别采用免疫印迹法测定p38MAPK磷酸化蛋白的表达水平, 半定量逆转录-聚合酶链反应技术检测p38MAPK基因的表达水平。p-p38MAPK蛋白在N组表达弱阳性; 较之H组, Rb₁干预组(Rb_L、Rb_M、Rb_H组)表达均不同程度减弱, 以Rb_M组最为显著, 差异有统计学意义($P < 0.01$); p38MAPK mRNA在N组表达较弱; 与H组相比, Rb_L、Rb_M和Rb_H组中p38MAPK mRNA表达均不同程度下降, 以Rb_M组最为显著($P < 0.01$)。上述结果表明, p38MAPK信号通路可能介导大鼠低氧高二氧化碳性肺动脉收缩; 三七皂苷单体Rb₁可能通过抑制p38MAPK信号通路的表达而减轻低氧高二氧化碳性肺动脉收缩。

关键词 低氧高二氧化碳; 肺动脉高压; p38MAPK信号通路; 三七皂苷单体Rb₁

The Expression of p38MAPK in Hypoxia Hypercapnic Pulmonary Arterial Smooth Muscle and the Intervention of Notoginsenoside Rb₁

Zheng Mengxiao^{1#}, Song Zhangjuan^{1#}, Ma Yingchun¹, Song Dong¹, Huang Linjing¹, Tang Lanlan², Wang Wantie^{1*}

(¹Department of Pathophysiology, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;

²Department of Pathology, Xinhua Hospital, Hangzhou 310005, China)

Abstract This research will explore the mechanism of notoginsenoside Rb₁ to alleviate the hypoxia hypercapnia-induced pulmonary vasoconstriction and the role of p38MAPK (extracellular signal-regulated kinase) signal pathway playing in it. The pulmonary artery smooth muscle cells were primary cultured and the second to fifth subcultured cells were incubated with 8, 40 and 100 mg/mL notoginsenoside Rb₁ respectively under the hypoxia-hypercapnia condition (1% O₂, 6% CO₂). The cells were harvested in 24 h. The phosphorylated p38MAPK of the cells was detected by Western blot and p38MAPK mRNA was examined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of phosphorylated p38MAPK of control group was significant lower than that of other groups. Compared to hypoxia-hypercapnia group, the expression of phosphorylated p38MAPK in notogin-

收稿日期: 2014-06-03 接受日期: 2014-07-30

浙江省中医药科技计划重点项目(批准号: 2008ZA017、2013ZZ011)和浙江省中医药重点学科建设计划项目(批准号: 2012-XK-A28)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel/Fax: 0577-86689817, E-mail: wwt@wzmc.edu.cn

Received: June 3, 2014 Accepted: July 30, 2014

This work was supported by the Traditional Chinese Medical Science and Technology Project of Zhejiang Province (Grant No.2008ZA017, 2013ZZ011) and the Key Construction Academic Subject (Traditional Chinese Medicine) of Zhejiang Province (Grant No.2012-XK-A28)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author: Tel/Fax: +86-577-86689817, E-mail: wwt@wzmc.edu.cn

网络出版时间: 2014-12-01 19:51 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.12.0189.html>

senoside Rb₁-treated groups (Rb_L, Rb_M and Rb_H groups), especially in Rb_M group, was significantly lower ($P < 0.01$). The expression of p38MAPK mRNA of control group was significant lower than that of other groups. Compared to hypoxia-hypercapnia group, the expression of mRNA in notoginsenoside Rb₁-treated groups (Rb_L, Rb_M and Rb_H groups), especially in Rb_M group, was significantly lower ($P < 0.01$). These results indicate that p38MAPK can induce hypoxia hypercapnia-induced pulmonary vasoconstriction in rats and notoginsenoside Rb₁ can alleviate hypoxia hypercapnia-induced pulmonary vasoconstriction by inhibiting the p38MAPK signal pathway.

Key words hypoxia hypercapnia-induced pulmonary vasoconstriction; pulmonary hypertension; p38MAPK signal pathway; notoginsenoside Rb₁

缺氧性肺动脉收缩反应(hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction, HPV)是形成肺动脉高压的始动因素^[1-2], 而关于慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary diseases, COPD)等的研究表明, 肺循环在缺氧的同时常伴有二氧化碳潴留, 因此研究低氧高二氧化碳性肺动脉收缩(hypoxia hypercapnia-induced pulmonary vasoconstriction, HHPV)的发生机制对此类疾病的临床防治更具理论及实践意义。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)存在于大多数细胞内, 在将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内并引起细胞生物学反应的过程中起着至关重要的作用。p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)是MAPK家族中的一个亚族, 亦有研究表明, p38MAPK通路的激活与血管平滑肌细胞的增殖、迁移^[3]、钙离子的调控^[4]及肺动脉高压的发生有关^[5]。

三七的主要有效成分三七总皂苷(panax notoginseng saponin, PNS)具有阻滞钙内流^[6-7]、降压^[8]等作用, 人参皂苷Rb₁(ginsenoside Rb₁, Rb₁)是PNS的主要单体之一。近年来, 诸多学者对三七总皂苷及其单体进行了大量心脑血管系统的研究, 但其对肺血管的作用尚未见报道。本课题组前期研究证实, 三七总皂苷可通过抑制MAPK通路减轻大鼠低氧高二氧化碳性肺动脉高压的形成^[9]。本实验旨在研究Rb₁单体在低氧高二氧化碳性肺血管收缩和肺动脉高压形成过程中发挥的作用以及其作用与p38MAPK的关系, 从而探讨Rb₁可能的作用机制, 为临床上因低氧高二氧化碳引起的肺动脉收缩和肺动脉高压的治疗提供一定的实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂与药品

SPF级雄性健康SD大鼠10只, 体重200~220 g

[由温州医学院实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK(浙)2008-0156号]。胎牛血清、DMEM高糖培养基(美国Gibco公司); 三七皂苷单体Rb₁(吉林大学基础医学院有机化学教研室提供), 纯度>98%, 溶于超纯水, 10 mg/mL, 4 °C冰箱保存; RT-PCR试剂盒(日本TaKaRa公司); 台盼蓝(美国Sigma公司); SABC-FITC(POD)双标试剂盒、SM- α -actin单克隆抗体、浓缩型DAB试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司); 增强化学发光试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒(美国Pierce公司、上海吉泰新绎生物科技有限公司代理); 兔抗鼠p38MAPK、单克隆抗体、兔抗鼠磷酸化p38MAPK单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(美国Cell Signal Technology公司)。

1.2 肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PSMCs)的分离、培养及鉴定

10%水合氯醛, 按0.33 mL/(100 g体重)腹腔注射法麻醉大鼠, 于75%酒精中浸泡后迅速取出心肺, 超净工作台内解剖显微镜直视下取2~4级肺动脉, 剥离外膜, 用无菌棉签去除内皮细胞, 剪成1 mm×1 mm×1 mm大小的组织块。37 °C下, 0.2%胶原酶I消化30 min, 加入血清终止消化, 离心后弃上清, 用20%胎牛血清DMEM悬浮细胞, 接种至100 mm培养皿中, 将此培养皿置于37 °C、5% CO₂培养箱中继续培养, 次日观察到细胞贴壁, 7 d后传代。倒置相差显微镜下观察细胞形态并拍摄。参照SABC-POD试剂盒操作说明对PSMCs进行鉴定。以光镜下观察到细胞核染成棕黄色为阳性, 每张玻片在显微镜下放大200倍, 随机选取3个视野计数, 用阳性细胞数占细胞总数的百分比即阳性率表示细胞纯度。经鉴定血管平滑肌细胞纯度达95%以上时, 可用于实验^[10]。

1.3 实验分组

将第2~5代对数生长期PSMCs制成细胞悬液, 按 5×10^5 /mL的密度接种于6孔板中, 加入10% FBS+

高糖 DMEM 培养液, 同时加入青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 U/mL), 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱进行培养, 待观察到融合成单层细胞时(约 80% 铺满)换成无血清培养基饥饿处理 24 h, 然后进行药物干预(于 30 min 内完成加药操作)。实验分组: (1) 常氧组(N): 不给予任何处理因素, 5% CO₂、21% O₂ 气体条件, 37 °C 孵育 24 h; (2) 低氧高二氧化碳组(H): 低氧高二氧化碳(1% O₂、6% CO₂) 处理^[1]; (3) Rb₁ 干预组(Rb_L、Rb_M、Rb_H): 分别加入 8, 40, 100 mg/mL Rb₁。H 组及 Rb_L、Rb_M、Rb_H 干预组于 1% O₂、6% CO₂ 气体条件, 37 °C 孵育 24 h。

1.4 检测 PSMCs 磷酸化 p38MAPK 蛋白的含量

弃除培养液, 用预冷的 PBS 清洗 3 次, 加入细胞裂解液 100 μL/孔, 于冰上裂解 30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, BCA 法蛋白定量。以 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 湿式电转移法转移至 PVDF 膜, 室温下封闭液封闭 2 h, 加兔抗鼠 p38MAPK 一抗、磷酸化 p38MAPK 多克隆抗体(1: 1 000 稀释), 4 °C 反铺法孵育过夜, 抗兔 IgG 二抗(1: 4 000 稀释)反应 2 h, 行 ECL 化学发光法显色, X 射线底片曝光。上述实验重复 8 次, Quantity One 凝胶软件分析系统分析磷酸化 p38MAPK(phosphorylated p38MAPK, p-p38MAPK)和总 p38MAPK 蛋白(T-p38MAPK)灰度值, 以 p-p38MAPK 条带灰度值和 T-p38MAPK 灰度值比值相对 A 值(relative A value)代表 p-p38MAPK 的含量。

1.5 检测 p38MAPK 基因的表达水平

弃培养液, 预冷 PBS 缓冲液清洗 3 次。每孔加 700 μL Trizol, 吹至液体澄清后转至 EP 管静置。加氯仿, 剧烈颠倒混匀后静置, 4 °C、12 000 r/min 离心, 将含 RNA 的上层水相转移至另一 EP 管。加入预冷的异丙醇, 适度颠倒混匀后静置, 12 000 r/min, 4 °C 低温离心。弃上清, 加预冷的 75% 乙醇, 7 500 r/min、4 °C 低温离心, 弃上清, 置于空气中干燥, 溶于 DEPC 水。于核酸浓度检测仪测定 RNA 浓度, 逆转录合成 cDNA。PCR 扩增反应: *β-actin* 上游序列: 5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC-3', 下游序列: 5'-TCG GGG GAT CGG AAC CGC TCA-3'。反应条件为: 94 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s, 53 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 °C 再延伸 10 min。扩增片段大小为 400 bp。*p38MAPK* 上游序列: 5'-TCC AAG GGC TAC ACC AAA TC-3', 下游序列: 5'-TGT TCC AGG TAA GGG TGA GC-3'。反应条件为: 94 °C 预变性 2 min;

98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 °C 再延伸 10 min。扩增片段大小为 341 bp。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件, 以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)形式表示组间比较, 采用单因素方差分析, 方差齐者两两比较采用 LSD 法, 方差不齐者行 Dunnett' *t* 检验; 双变量相关性分析, 采用 Bivariate 过程的 Pearson 相关分析法, 均以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 大鼠 PSMCs 的原代培养和鉴定

2.1.1 细胞生长的形态学特点 原代培养 5~7 d 后, PSMCs 呈典型的“峰-谷”状生长, 显微镜镜下显示细胞呈梭形, 连续培养多代后仍可保持较好状态(图 1)。

2.1.2 免疫细胞化学抗体鉴定 PSMCs 经 SM- α -actin 免疫细胞化学染色后, 胞浆着色, 即高倍镜下可见胞浆内大量棕黄色、与细胞长轴平行的纤维细丝, 此为平滑肌 α -肌动蛋白, 约 98% 细胞呈阳性反应, 对照组细胞胞浆染色阴性(图 2)。

2.2 Western blot 测定各组细胞 p-p38MAPK 表达

Western blot 结果表明, N 组细胞 p-p38MAPK 蛋白为弱表达; H 组与 N 组相比, p-p38MAPK 蛋白表达明显增加($P < 0.05$); 与 H 对照组相比, Rb₁ 各剂量干预组 p-p38MAPK 表达均明显减弱($P < 0.01$)。各剂量组之间 p-p38MAPK 表达有差异, Rb_M 组 < Rb_H 组 < Rb_L 组, Rb_M 组和 Rb_L 组之间差异有统计学意义($P < 0.01$), Rb_H 组和 Rb_M 组之间差异有统计学意义($P < 0.01$)(图 3 和图 4)。

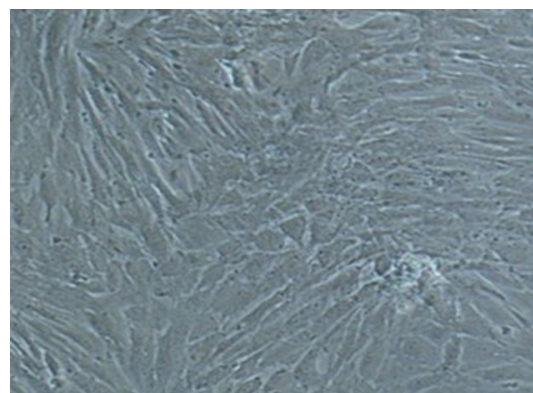
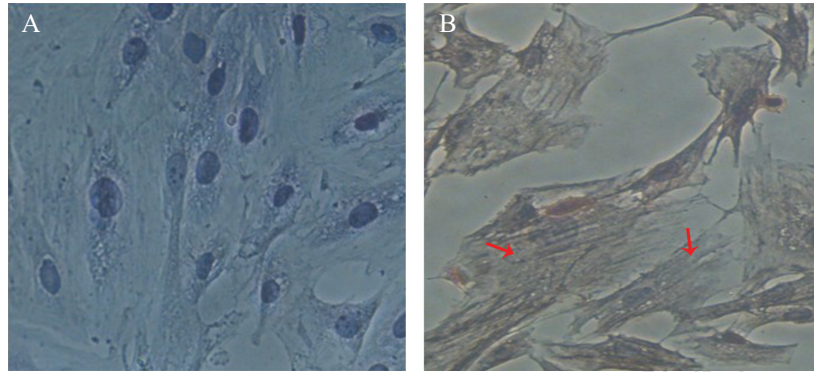


图 1 大鼠原代肺动脉平滑肌细胞(100×)

Fig.1 Identification of the primarily cultured rat pulmonary artery smooth muscle cells (100×)



A: 阴性对照; B: 阳性反应, 红色箭头所示处为平滑肌 α -肌动蛋白。
A: negative control; B: positive reaction, red arrowheads indicate α -smooth muscle actin.

图2 大鼠肺动脉平滑肌细胞免疫细胞化学抗体鉴定(200 \times)

Fig.2 Immunohistochemistry identification of rat pulmonary artery smooth muscle cell (200 \times)

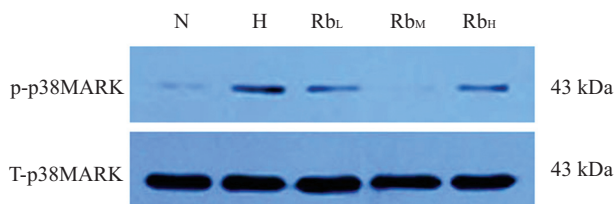
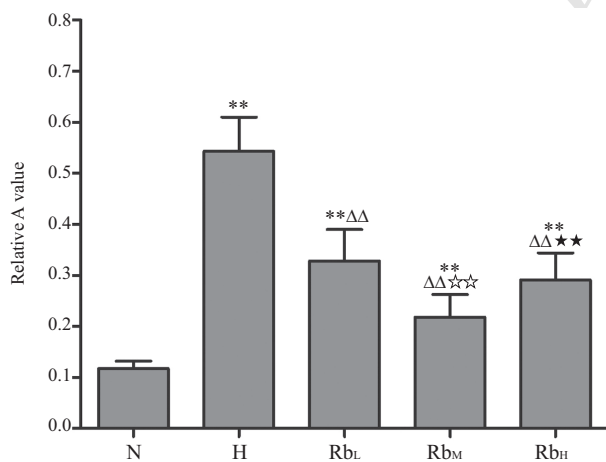


图3 各组大鼠PSMCs p-p38MAPK蛋白表达

Fig.3 Expression of p-p38MAPK protein in rat PSMCs from different groups



** $P < 0.01$, 与N组比较; $\Delta\Delta P < 0.01$, 与H组比较; $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$, 与RbL组比较; $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$, 与RbM组比较。

** $P < 0.01$ vs N group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs H group; $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ vs RbL group; $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ vs RbM group.

图4 各组p-p38MAPK蛋白表达结果比较

Fig.4 Expression of p-p38MAPK protein in different groups

2.3 各组细胞p38MAPK mRNA相对表达量比较

N组细胞可见p38MAPK mRNA表达较弱, H组p38MAPK mRNA表达量明显高于N组; 较之H组, Rb₁各剂量组p38MAPK mRNA表达均有明显下调趋势, 但仍高于N组水平($P < 0.05$), 差异有统计学意义

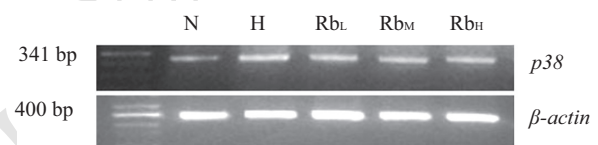
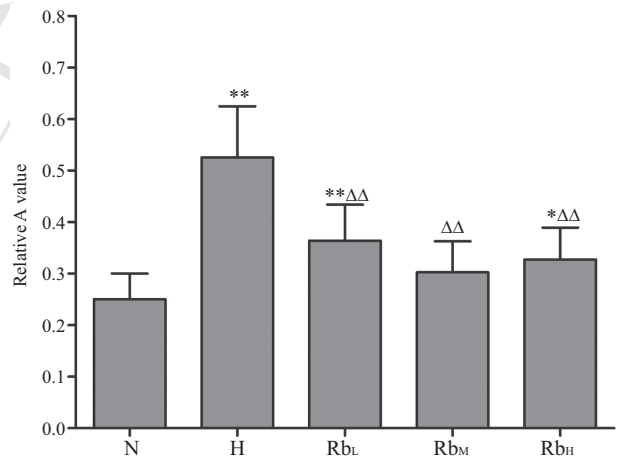


图5 各组大鼠PSMCs p38MAPK mRNA表达

Fig.5 Expression of p38MAPK mRNA in rat PSMCs from different groups



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与N组比较; $\Delta\Delta P < 0.01$, 与H组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs N group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs H group.

图6 各组p38MAPK mRNA表达结果比较

Fig.6 Expression of p38MAPK mRNA in different groups

(图5和图6)。

2.4 肺动脉平滑肌细胞p-p38MAPK蛋白表达与p38MAPK mRNA表达相关性分析

Rb₁各干预组 p-p38MAPK蛋白与p38MAPK mRNA呈正相关($r = 0.884$, $P < 0.01$)(图7)。

3 讨论

目前关于低氧高二氧化碳引起HHPV的机制仍

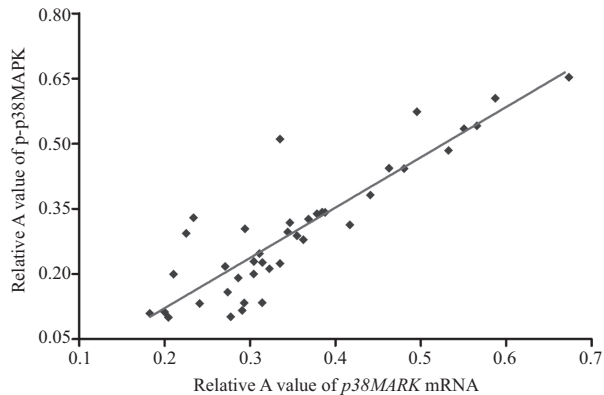


图7 各组p-p38MAPK蛋白与p38MAPK mRNA的相关性分析($r=0.884, P<0.01$)

Fig.7 The correlation analysis between p-p38MAPK protein and p38MAPK mRNA in all groups ($r=0.884, P<0.01$)

在研究当中。有观点认为,低氧可诱导肺动脉炎性细胞因子TNF- α 和IL-1 β 的表达并引起血管收缩反应^[12],而且这些炎性因子与COPD的发生有关^[13]。在COPD患者中,低氧诱导的肺动脉结构和功能的改变与肺动脉高压的发展有关^[14]。也有学说认为,低氧可直接作用于PASMCs,使其发生收缩而引起HPV。即在低氧情况下,钙通道、钾通道通过一系列复杂的作用机制,最终导致胞浆内钙离子浓度升高,触发细胞的兴奋-收缩偶联机制,从而使PASMCs收缩^[15-17]。另有研究证实,低氧是引起PASMCs增殖和凋亡减少的主要原因之一,因其可直接增加肺动脉平滑肌细胞代谢或通过增加胞浆内钙离子浓度^[18]等途径实现,而PASMCs增殖与凋亡的失衡参与了肺动脉高压的发生。

以往的研究表明,三七总皂苷为一种钙离子拮抗剂,能通过抑制p38MAPK和ERK1/2两条通路的活性而减轻肺动脉高压的程度。三七总皂苷的主要单体成分为人参皂苷Rb₁、人参皂苷Rg₁和三七皂苷R₁。其中,单体Rb₁具有钙拮抗^[19]、抗氧化、抗癌等作用。p38是MAPK家族成员之一,p38MAPK活化后,通过磷酸化活化转录因子调控特定基因的表达,将信号从细胞外传导到细胞核^[20]。有报道称,Rb₁可以通过抑制JNK/p38MAPK的活性来减轻A β 25-35诱导的tau蛋白过度磷酸化,提示Rb₁可通过MAPK通路发挥作用^[21]。本实验发现,在低氧高二氧化碳条件下,分别用低、中、高剂量Rb₁孵育肺动脉平滑肌细胞后,其p-p38MAPK蛋白表达均明显低于低氧高二氧化碳组,其中,中剂量(40 mg/mL)时作用最为明显;另

外,p38MAPK mRNA表达的变化与p-p38MAPK蛋白变化基本一致,二者之间呈显著正相关。以往研究表明,p38MAPK通路的活化可以使PASMCs中钙离子浓度增加,进而促进PASMCs的收缩、增殖和迁移,最终导致低氧性肺动脉高压的形成^[22]。

综上所述,三七总皂苷的主要单体成分Rb₁可以延缓p38MAPK通路的活化,从而抑制低氧高二氧化碳性PASMCs的收缩,继而起到缓解肺血管重建以及肺动脉高压形成的作用。

参考文献 (References)

- 1 王建荣,周英,桑葵,李明霞. 缺氧性肺动脉高压新生大鼠肺血管重塑与肺血管HIF-1 α 、ET-1、iNOS表达的相关性研究. 中国当代儿科杂志(Wang Jianrong, Zhou Ying, Sang Kui, Li Mingxia. Association between pulmonary vascular remodeling and expression of hypoxia-inducible factor-1 α , endothelin-1 and inducible nitric oxide synthase in pulmonary vessels in neonatal rats with hypoxic pulmonary hypertension. Chin J Contemp Pediatr) 2013; 15(2): 138-44.
- 2 Xu DQ, Niu W, Luo Y, Zhang B, Liu M, Dong H, et al. Endogenous estrogen attenuates hypoxia-induced pulmonary hypertension by inhibiting pulmonary arterial vasoconstriction and pulmonary arterial smooth muscle cells proliferation. Int J Med Sci 2013; 10(6): 771-81.
- 3 Gan J, Li P, Wang Z, Chen J, Liang X, Liu M, et al. Rosuvastatin suppresses platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration via the MAPK signaling pathway. Exp Ther Med 2013; 6(4): 899-903.
- 4 Kandadi MR, Hua Y, Ma H, Li Q, Kuo SR, Frankel AE, et al. Anthrax lethal toxin suppresses murine cardiomyocyte contractile function and intracellular Ca²⁺ handling via a NADPH oxidase-dependent mechanism. PLoS One 2010; 5(10): e13335.
- 5 Myers JL, Domkowski PW, Wang Y, Hopkins RA. Sympathetic blockade blunts hypercapnic pulmonary arterial vasoconstriction in newborn piglets. Eur J Cardiothorac Surg 1998; 13(3): 298-305.
- 6 朱智勇,王晓晴,杨映宁,周定邦. 三七总皂苷对慢性低氧大鼠右心室心肌细胞钙电流的影响. 中国病理生理杂志(Zhu Zhiyong, Wang Xiaoqing, Yang Yingning, Zhou Dingbang. Effects of panax notoginseng saponins on L-type Ca²⁺ current of the right ventricle myocytes from chronic hypoxic rats. Chinese Journal of Pathophysiology) 2004; 20(3): 399-401.
- 7 Su HJ, Pan YJ, Pan HJ. Hemolytic activities and immunologic adjuvant effect of panax notoginseng saponine. Acta Pharmacol Sin 2003; 2(11): 1150-4.
- 8 梁瑛琦,贾旭广,石璐,吴成云,王万铁. 三七总皂苷对低氧大鼠肺动脉压和肺组织p38 MAPK表达的影响. 中国病理生理杂志(Liang Yingqi, Jia Xuguang, Shi Lu, Wu Chengyun, Wang Wantie. Effect of Panax notoginseng on pulmonary arterial pressure and expression of p38 MAPK in lung tissues of hypoxic rats. Chinese Journal of Pathophysiology) 2010; 26(12): 2438-41.
- 9 朱阿楠,王园园,王淑君,金可可,汪洋,王万铁. ERK通路和三七总皂苷干预在低氧高二氧化碳性肺动脉高压中的作用. 中国病理生理杂志(Zhu Anan, Wang Yuanyuan, Wang Shujun,

- Jin Keke, Wang Yang, Wang Wantie. Roles of ERK pathway and Panax notoginsenoside treatment in hypoxic hypercapnia pulmonary hypertension in rats. *Chinese Journal of Pathophysiology* 2011; 27(9): 1796-801.
- 10 Dempsey Y, MacRitchie NA, White K, Morecroft I, Wright AF, Nilsen M, *et al.* Dexfenfluramine and the oestrogen-metabolizing enzyme CYP1B1 in the development of pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res* 2013; 99(1): 24-34.
- 11 王淑君, 刘立宾, 黎关龙, 王园园, 周俊辉, 赵 珊, 等. 三七皂苷单体R_{b1}抑制低氧高二氧化碳诱导的肺动脉平滑肌细胞p38 MAPK信号通路的活化. *中国病理生理杂志* (Wang Shujun, Liu Libin, Li Guanlong, Wang Yuanyuan, Zhou Junhui, Zhao Shan, *et al.* Inhibitory effect of notoginsenoside monomer R_{b1} on activation of p38 MAPK signaling pathway induced by hypoxic hypercapnia in PSMCs. *Chinese Journal of Pathophysiology* 2012; 28(1): 105-8.
- 12 Tsai BM, Wang M, Pitcher JM, Meldrum KK, Meldrum DR. Hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary artery tissue cytokine expression are mediated by protein kinase C. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287(6): L1215-9.
- 13 Chaouat A, Savale L, Chouaid C, Tu L, Sztrymf B, Canuet M, *et al.* Role for interleukin-6 in COPD-related pulmonary hypertension. *Chest* 2009; 136(3): 678-87.
- 14 Wang J, Xu L, Yun X, Yang K, Liao D, Tian L, *et al.* Proteomic analysis reveals that proteasome subunit beta 6 is involved in hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling in rats. *PLoS One* 2013; 8(7): e67942.
- 15 Peng G, Ran P, Lu W, Zhong N, Wang J. Acute hypoxia activates store-operated Ca²⁺ entry and increases intracellular Ca²⁺ concentration in rat distal pulmonary venous smooth muscle cells. *J Thorac Dis* 2013; 5(5): 605-12.
- 16 Yoo HY, Kim SJ. Disappearance of hypoxic pulmonary vasoconstriction and O₂-sensitive nonselective cationic current in arterial myocytes of rats under ambient hypoxia. *Korean J Physiol Pharmacol* 2013; 17(5): 463-8.
- 17 胡 颖, 格日力. 离子通道在肺动脉的分布及在低氧肺血管收缩反应中的作用. *生理科学进展* (Hu Ying, Ge Rili. Distribution of channels in pulmonary arterial smooth muscle cells and their roles in hypoxia pulmonary vasoconstriction. *Progress in Physiological Sciences*) 2006; 37(2): 113-6.
- 18 周永兰, 陈清枝, 张延斌, 李冬野. 三七总皂苷对血管平滑肌细胞增殖及c-myc基因影响. *中国动脉硬化杂志* (Zhou Yonglan, Chen Qingzhi, Zhang Yanbin, Li Dongye. Effects of total saponins of *Panax notoginseng* on c-myc gene expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells. *Chinese Journal of Arteriosclerosis*) 2006; 14(8): 662-4.
- 19 李淑梅, 李景贺, 费 瑜, 刘 斌, 郑永晨, 单海燕. 三七皂苷对兔髂动脉再狭窄模型血管直径及c-jun基因表达的影响. *中国老年学杂志* (Li Shumei, Li Jinghe, Fei Yu, Liu Bin, Zheng Yongchen, Shan Haiyan. Effect of panax notoginseng saponins on vessel diameter and oncogene c-jun expression of rabbit restenosis. *Chinese Journal of Gerontology*) 2003; 6(24): 368-9.
- 20 李金莲, 严州萍, 陈雪红, 王跃军, 孙 谧, 石宇玺, 等. 扇贝多肽抑制紫外线A波诱导的HaCaT细胞凋亡依赖p38 MAPK通路和caspase-3. *中国药理学杂志* (Li Jinlian, Yan Zhouping, Chen Xuehong, Wang Yuejun, Sun Mi, Shi Yuxi, *et al.* Inhibition of polypeptide from *chlamys farreri* on UVA-induced apoptosis of HaCaT cells depending on p38 MAPK pathway and caspase-3. *Chinese Pharmaceutical Journal*) 2007; 42(2): 116-20.
- 21 宋锦秋, 陈晓春, 张 静, 黄天文, 曾育琦, 沈 杰, 等. 人参皂苷R_{b1}通过JNK/p38MAPK途径减轻Aβ₂₅₋₃₅诱导的胎鼠皮层神经元tau蛋白过度磷酸化. *药理学报* (Song Jinqiu, Chen Xiaochun, Zhang Jing, Huang Tianwen, Zeng Yuqi, Shen Jie, *et al.* JNK/p38 MAPK involves in ginsenoside R_{b1} attenuating beta-amyloid peptide (25-35)-induced tau protein hyperphosphorylation in embryo rat cortical neurons. *Acta Pharmaceutica Sinica*) 2008; 43(1): 29-34.
- 22 Li X, Lu W, Fu X, Zhang Y, Yang K, Zhong N, *et al.* BMP4 increases canonical transient receptor potential protein expression by activating p38 MAPK and ERK1/2 signaling pathways in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 49(2): 212-20.