

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.01.002

Stanford A 型主动脉夹层血管壁及外周血中 热休克蛋白 90 的表达及意义 *

袁瑞军 赵志敏 唐杨烽 王国坤 韩 林 徐志云[△]

(海军军医大学第一附属医院心血管外科 上海 200433)

摘要 目的:探索热休克蛋白 90(Heat shock protein 90, HSP90)在 Stanford A 型主动脉夹层(Aortic dissection, AD)血管壁组织中的表达及其与平滑肌细胞(Smooth muscle cells, SMCs)表型标志物的相关性。**方法:**收集本院急性 Stanford A 型主动脉夹层患者病变主动脉壁组织和外周血标本(AD 组, 20 例), 心脏移植供体等来源的正常主动脉壁组织和外周血标本(正常组, 10 例); ELISA 法检测血浆 HSP90 含量; 免疫组化染色检测 HSP90 的表达差异及定位; Western blot 检测组织标本中蛋白的表达差异; 应用 Spearman 分析 HSP90 和 SMCs 表型标志物表达的相关性。**结果:**AD 患者血浆中 HSP90 的含量显著高于正常组 (142.38 ± 40.16 ng/mL vs. 54.99 ± 24.46 ng/mL, $P < 0.01$)。相对于正常主动脉壁组织, 主动脉夹层血管壁组织中 HSP90 表达明显升高, 且主要分布在血管壁中层细胞的胞浆中, 分泌型 SMCs 标志物 OPN 的表达明显增多, 而收缩型标志物 α -SMA 表达则显著减少。HSP90 和 α -SMA 的蛋白表达呈负相关 ($R^2 = 0.677$, $P < 0.01$), 和 OPN 呈正相关 ($R^2 = 0.572$, $P < 0.01$)。**结论:**主动脉夹层患者的血管壁组织及外周血中的 HSP90 含量明显升高, 参与了主动脉夹层的发生发展。

关键词:热休克蛋白 90; 表型转化; 平滑肌细胞; 主动脉夹层

中图分类号:R-33; R543.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)01-08-05

Expression and Significance of Heat Shock Protein 90 in the Aortic Wall and Peripheral Blood of Stanford Type A Aortic Dissection*

YUAN Rui-jun, ZHAO Zhi-min, TANG Yang-feng, WANG Guo-kun, HAN Lin, XU Zhi-yun[△]

(Department of Cardiovascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai, 200433, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of heat shock protein 90 (HSP90) in the aortic wall of Stanford type A aortic dissection (AD) and its relationship with the expressions of phenotype markers of smooth muscle cells (SMCs). **Methods:** The aortic wall tissue and peripheral blood samples from patients with Stanford Type A aortic dissection (AD group, 20) and donors for heart transplant (normal group, 10) were collected. Plasma HSP90 was detected by Elisa; Immunohistochemical staining was used to detect the difference of HSP90 expression in paraffin sections of the above tissue specimens. The protein expression levels were detected by Western blot. Spearman analysis was used to analyze the correlation between HSP90 expression and SMCs phenotype makers. **Results:** The plasma level of HSP90 in patients with AD was significantly higher than that in the normal group (142.38 ± 40.16 ng/mL vs 54.99 ± 24.46 ng/mL, $P < 0.01$). Compared with normal aortic walls, the protein expression level of HSP90 in the aortic wall tissue of AD was significantly increased and mainly concentrated in the cytoplasm of SMCs in the medial wall. OPN, marker of synthetic SMCs, was also increased, whereas α -SMA, marker of contractile SMCs, was significantly decreased. There was a negative correlation between the protein expressions of HSP90 and α -SMA ($R^2 = 0.677$, $P < 0.01$), and positive correlation between HSP90 and OPN ($R^2 = 0.572$, $P < 0.01$). **Conclusions:** The expression of HSP90 in the aortic wall of AD and the level of HSP90 in the patient's blood were significantly increased, and was involved in the occurrence and development of AD.

Key words: Heat shock protein 90; Phenotype switch; Smooth muscle cells; Aortic dissection

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R543.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)01-08-05

前言

Stanford A 型主动脉夹层(aortic dissection, AD)是破口位于升主动脉的 AD, 具有超高的致死率^[1]。深入研究主动脉夹层

的发病机制, 探索疾病的预防、早期诊断和药物治疗手段, 可有效提高疾病整体的治疗效率。热休克蛋白 90 (Heat shock protein 90, HSP90)是热休克蛋白家族的重要成员, 高度保守, 在正常组织中通常处于相对静默状态, 而在肿瘤组织中高度活化,

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81870344)

作者简介: 袁瑞军(1984-), 男, 硕士研究生, 医师, 主要研究方向: 心脏及大血管疾病, 电话: 15921169029, E-mail: dr_yuanrj@163.com

[△] 通讯作者: 徐志云(1961-), 男, 博士生导师, 主任医师、教授, 主要研究方向: 心脏及大血管疾病,

电话: 13916317529, E-mail: zhiyunx@hotmail.com

(收稿日期: 2020-08-23 接受日期: 2020-09-18)

以分子伴侣的形式参与多种蛋白的调节^[3],其中很多是原癌基因的表达产物或肿瘤发病通路中的重要信号因子。目前多种 HSP90 抑制剂已进入临床研究阶段^[3,4],有望作为抗肿瘤药物投入使用。近来研究表明,HSP90 在冠心病等多种心血管疾病中表达增多^[5,6],且有研究认为,HSP90 通过调控血管 SMCs 的生长周期参与调节细胞增殖过程^[7]。研究表明平滑肌细胞 (Smooth muscle cells, SMCs) 由收缩表型向分泌表型转化,使得细胞的分泌、增殖和迁移能力增高,而收缩功能下降,导致动脉壁中层结构薄弱,是 AD 发生发展的重要病理基础^[8]。分化成熟的收缩型 SMCs 高表达 α 平滑肌肌动蛋白(α -Smooth muscle actin, α -SMA),而去分化的分泌型 SMCs 高表达骨桥蛋白 (Osteopontin, OPN)^[9,10]。然而 HSP90、SMCs 表型标志物于主动脉夹层中的表达及发生作用的具体机制尚未阐明。本研究通过对 HSP90 与 SMCs 表型标志物表达变化的研究,探索 HSP90 与 SMCs 表型转化的关系,以及在主动脉夹层中可能发挥作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、仪器

BCA 蛋白浓度测定试剂、快速高敏显影液盒购自上海碧云天公司。HSP90 抗体购自武汉 Boster 公司, α -SMA 抗体、OPN 抗体购自英国 Abcam 公司,羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗购自美国 Earthox 公司。PVDF 膜购自英国 Whatman 公司。免疫组化染色试剂盒购自福州迈新公司。人 HSP90 的 Elisa 试剂盒购自美国 Sigma 公司。实时荧光定量 PCR 扩增系统购自瑞士 Roche 公司。酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司。

1.2 血管壁组织和外周血标本的获取和处理

取用 2018-2019 年于长海医院心血管外科行手术治疗的急性 Stanford A 型主动脉夹层患者的主动脉夹层血管壁组织和外周血,排除马凡氏综合征、大动脉炎等疾患,对照组选取同期心脏移植供体主动脉壁组织和外周血,标本的收集使用均经患者知情同意并签字。血管壁标本取下并清理留取中层组织,一部分液氮内冻存备用,余下部分多聚甲醛固定,脱水后常规石蜡包埋,5 μ m 切片后备用;外周血标本于术前采集至 EDTA 管内,2000 $\times$ g 速度离心 10 min,吸取上清液装入 1.5 mL 无菌 EP 管中,超低温冰箱保存备用。

1.3 Western Blot 检测蛋白的表达

从血管壁组织中提取总蛋白,BCA 法测定各样本蛋白浓度,调整上样量,加入上样缓冲液,沸水浴 10 min。凝胶电泳分离蛋白,湿转法将蛋白转到 PVDF 膜上,5 %脱脂奶粉封闭 1 h, HSP90 抗体 (1:500)、 α -SMA 抗体 (1:2000)、OPN 抗体 (1:1000) 及 GAPDH 抗体 (1:5000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,充分清洗后相应二抗室温下孵育 1 h,显影。利用 Image J 软件测定所得蛋白印记灰度值,以目的蛋白与对应内参蛋白灰度值的比值,作为目的蛋白相对表达量进行分析。

1.4 血管壁组织的免疫组织化学染色

切片脱蜡至水,0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲溶液中,95 $^{\circ}$ C 左右水浴抗原修复,自然冷却后阻断内源性过氧化物酶,非免疫性动物血清封闭后,滴加用 PBS 稀释的 HSP90 抗体 (1:100) 覆盖组织,湿盒内 4 $^{\circ}$ C 过夜,生物素标记的二抗、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶先后孵育,DAB 溶液着色,镜下观察控制反应时间,苏木精溶液中复染、盐酸分化、稀碳酸锂反蓝;脱水并封片后,镜下观察、拍照。

1.5 Elisa 检测血浆中 HSP90 的含量

按试剂盒说明获得标准曲线(检测范围为 0.5-40 ng/mL)。各样本用样品稀释液稀释 5 倍,加入待测孔,空白对照孔只加入等量显色液和终止液,读取 450 nm 波长处各孔的吸光度 (OD) 值,按标准曲线计算各样本的检测浓度,再分别乘以稀释倍数得出各标本 HSP90 的实际浓度;对于检测结果超出范围的样本,稀释合适倍数后再次检测。

1.6 统计学分析

采用 SPSS22.0 软件进行统计学分析,计量资料以均值 $\pm$ 标准差表示,分组间比较采用 one-way ANOVA 分析,两组独立数据的相关性采用 Spearman 分析法, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 入选病例的一般资料

AD 组及对照组 (Normal) 患者的一般资料统计如表 1,可以看出,两组间的各项指标中,仅收缩压的差别具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 1 AD 组及对照组一般资料统计

Table 1 Data of AD Patients and Normal Groups

	AD (n=20)	Normal (n=10)	P Value
Age (Year)	52.8 $\pm$ 11.4	46.9 $\pm$ 8.1	0.618
Gender (Male (%))	17 (85.0%)	6 (60.0%)	0.367
Smoking History (%)	12 (60.0%)	5 (50.0%)	0.952
Systolic Arterial Pressure (mmHg)	147.7 $\pm$ 22.2	121.1 $\pm$ 5.2	0.001**
Diastolic Arterial Pressure (mmHg)	89.1 $\pm$ 13.6	79.0 $\pm$ 4.6	0.591
Fasting Blood Glucose (mmol/L)	6.98 $\pm$ 1.96	7.01 $\pm$ 1.21	0.645
White Blood Cells ($\times 10^9$ /L)	10.75 $\pm$ 3.43	7.34 $\pm$ 2.01	0.109
Neutrophilic Granulocyte Percentage (%)	75.3 $\pm$ 11.3	69.1 $\pm$ 7.7	0.593
Low Density Lipoprotein (mmol/L)	4.21 $\pm$ 1.57	3.07 $\pm$ 0.74	0.055

2.2 血浆 HSP90 变化

AD 患者血浆中 HSP90 含量为 142.38 ± 40.16 ng/mL, 显著高于对照组 (54.99 ± 24.46 ng/mL), 差别具有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 1)。

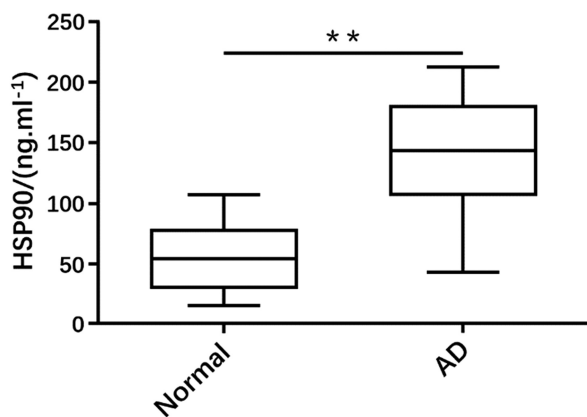


图 1 AD 患者与对照组血浆 HSP90 水平

Fig. 1 Plasma HSP90 levels in AD patients and normal group

注: ** $P < 0.01$ vs 对照组。

Note: ** $P < 0.01$ vs normal group.

2.3 HSP90 的组织表达及定位

主动脉壁 HSP90 免疫组织化学染色结果如图 2 所示。HSP90 在正常主动脉壁中层组织中几乎不表达,而在 AD 血管壁组织中的表达显著增多,且主要定位于中层细胞的胞浆。

2.4 血管壁组织中 HSP90 及 SMCs 表型标志物的表达差异

相对正常主动脉壁组织,AD 血管壁组织中,HSP90 和

OPN 蛋白表达明显增多,而 α -SMA 的表达则减少,如图 3A。经 Image J 软件进行灰度分析表明,AD 组 HSP90 (0.74 ± 0.10 vs 0.25 ± 0.13 , $P < 0.01$) 及 OPN (0.62 ± 0.14 vs 0.22 ± 0.11 , $P < 0.01$) 显著高于正常组;而 α -SMA 低于正常组 (0.77 ± 0.23 vs 0.20 ± 0.11 , $P < 0.01$),如图 3B。

2.5 HSP90 与 SMCs 表型标志物的相关性

Spearman 相关性分析表明,HSP90 和 OPN 在蛋白表达水平上呈正相关, $R^2 = 0.677$, $P < 0.01$,如图 4A;而和 α -SMA 呈负相关, $R^2 = 0.572$, $P < 0.01$,如图 4B。

3 讨论

HSP90 作为热休克蛋白家族的重要成员,参与细胞的增殖、分化、凋亡等重要细胞活动以及信号转导、免疫反应等多种生理活动,当出现物理、化学、生物以及疾病状态等各种刺激时,HSP90 表达显著升高,而当 HSP90 过度表达时,与某些疾病的发生密切相关,如恶性肿瘤、炎症性疾病、神经退行性疾病等^[1]。HSP90 主要通过分子伴侣功能参与上述过程,其底物蛋白种类繁多,当与底物蛋白分子结合后,通过改变底物蛋白稳定性,调节该蛋白的合成、折叠运输及降解等,进而调控细胞的功能状态^[11,12]。在心血管系统中,既往研究发现在动脉粥样硬化、动脉瘤及肺动脉高压等疾病的病变组织中,HSP90 表达显著增多^[5,6,13-15]。另有研究发现,HSP90 与高血压关系密切^[16],妊娠期高血压患者的血浆及胎盘组织中 HSP90 显著增高^[17],门静脉高压大鼠的肠系膜动脉的血管平滑肌细胞中 HSP90 的表达显著增高^[18]。而高血压被认为是 AD 的一个重要危险因素,约有 70-80% 的 AD 患者同时患有高血压^[19]。以上提示 HSP90 可能通过多种机制参与了 AD 的发生发展。本研究中我们发现

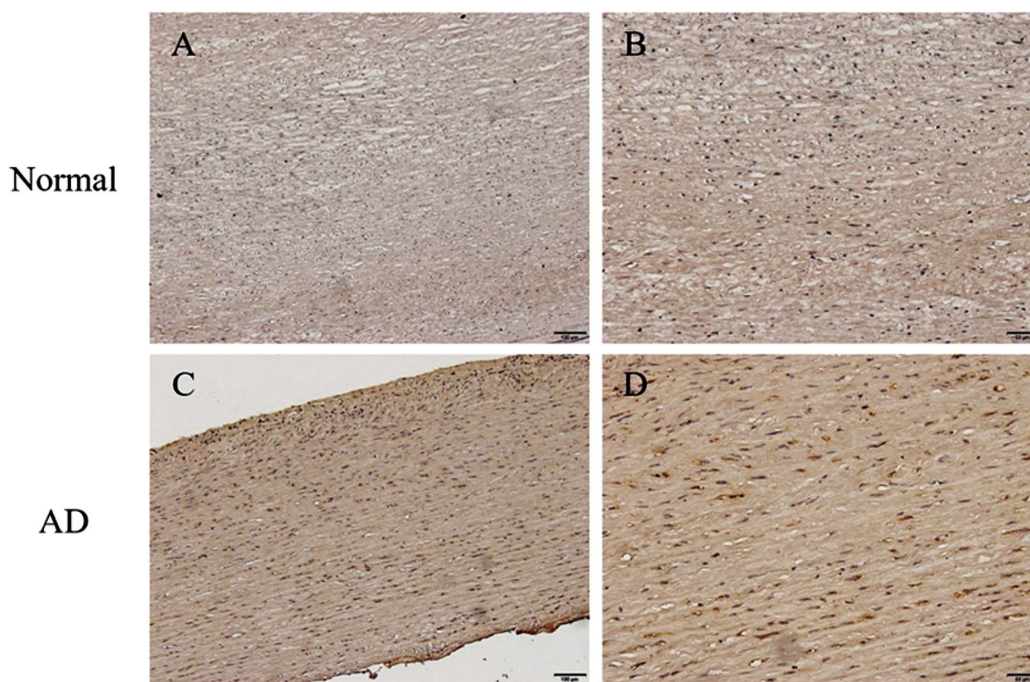


图 2 主动脉壁组织石蜡切片 HSP90 免疫组织化学染色

正常血管壁中层组织中(A×100,B×200)几乎没有阳性染色,而 AD 血管壁中层组织中(C×100,D×200)可见胞浆内大量阳性染色

Fig.2 Immunohistochemical of HSP90 staining in paraffin sections of aortic wall tissue

Almost no positive staining was observed in the medial wall of normal aorta (A×100, B×200), while plenty of positive staining could be seen in the cytoplasm in AD (C×100, D×200)

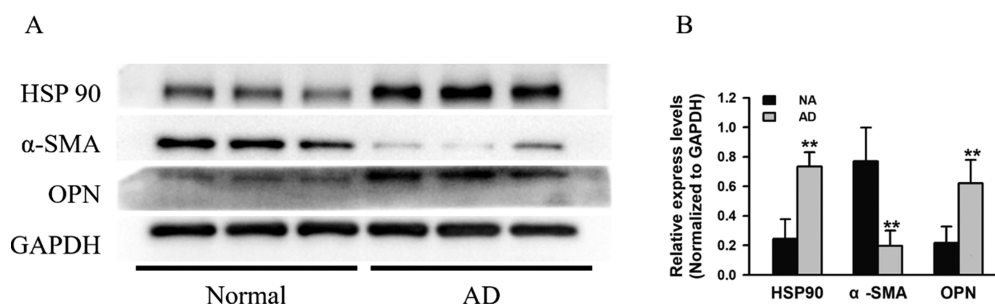


图3 主动脉壁组织中,HSP90、α-SMA 和 OPN 的相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of HSP90, α-SMA and OPN in aortic wall tissue

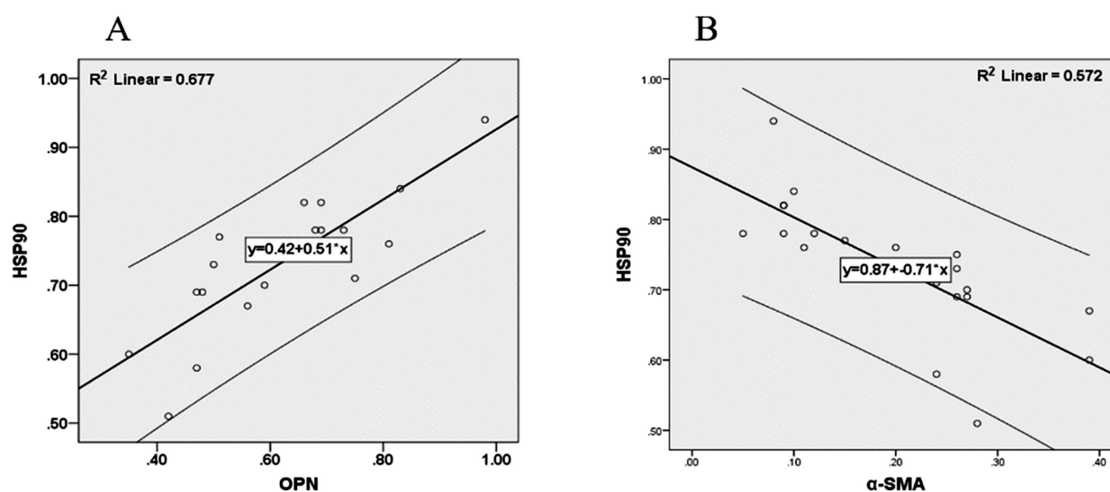
注:** $P < 0.01$ vs 对照组。Note: ** $P < 0.01$ vs normal group.

图4 HSP90 和 OPN(A)、α-SMA(B)蛋白表达的 Spearman 相关性分析

Fig.4 Spearman correlation analysis of protein expressions of HSP90 and OPN (A), α-SMA(B)

AD 病人的血浆及病变血管的平滑肌细胞中 HSP90 较对照组显著增多,说明 HSP90 可能参与了 AD 的病理过程。同时本研究还发现,主动脉夹层患者血浆 HSP90 的水平较对照组显著升高,在后续实验证实 HSP90 在主动脉夹层中的具体作用机制后,该蛋白有望为主动脉夹层的早期筛查和疾病预防提供切入点。

研究发现 SMCs 由收缩型向分泌型的转化是 AD 发生发展的重要机制^[20]。SMCs 来自中胚层,分化成熟的 SMCs 为收缩型,含大量肌丝,合成细胞器较少,几乎无增殖、迁移和合成基质的能力,正常人动脉中层以收缩型为主,具有维持血管弹性和收缩血管的功能;SMCs 的另一种表型是分泌型,主要存在于胚胎中期和病理性血管中,合成细胞器较多,具有较强的合成和分泌基质的能力以及增殖和迁移的能力^[20,21]。研究发现 HSP90 可以通过提高 SMCs 的增殖能力和炎症反应促进动脉粥样硬化的进程^[5,6],还可以通过增强 SMCs 的迁移能力来参与动脉瘤的病理过程^[13,14],而增殖和迁移能力是分泌型 SMCs 的特点。由此可见 HSP90 对 SMCs 表型转化起到重要作用。在本研究中,AD 病人的病变血管壁组织 HSP90 表达显著增高的同时,OPN 表达亦较对照组显著增多。因此,我们认为 HSP90 可能通过 SMCs 的表型转化,参与了 AD 的病变过程中。

既往研究发现 MAPK、PI3K、cAMP 等多条信号通路参与了 SMCs 的表型转化,而这些通路中的多种重要分子,如 EGF、

MAPK、P38、JNK、ERK、AKT、PKC、mTOR 等,都是 HSP90 的底物分子^[11],因此,我们推测,HSP90 很可能是通过调控这些信号通路中分子的功能状态进而参与 SMCs 的表型转化。另外,HSP90 还可以通过 AKT 等相关信号通路促进基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)的生成^[22],而后者能够促进细胞外基质的降解,利于 SMCs 的迁移,降低血管中膜的稳定性,在 AD 的形成过程中起到重要作用^[23]。

总之,本研究结果表明 HSP90 在主动脉夹层疾病过程中的高表达,并与 SMCs 表型转化标志物的表达高度相关,推测可能 HSP90 通过调节 SMCs 的表型转化而参与到 AD 的疾病过程。后续研究我们将对这一过程的机制深入研究,以期找到可能的药物作用靶点,为 AD 的非手术治疗和疾病风险的控制提供依据。

参考文献(References)

- [1] FJ Criado. Aortic dissection: a 250-year perspective[J]. Tex Heart Inst J, 2011, 38(6): 694-700
- [2] RH Burdon. Heat shock proteins in relation to medicine [J]. Mol Aspects Med, 1993, 14(2): 83-165
- [3] MA Biamonte, R Van de Water, JW Arndt, et al. Heat shock protein 90: inhibitors in clinical trials[J]. J Med Chem, 2010, 53(1): 3-17
- [4] WJ Welch. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine

- and disease[J]. *Physiol Rev*, 1992, 72(4): 1063-1081
- [5] J Kim, SW Jang, E Park, et al. The role of heat shock protein 90 in migration and proliferation of vascular smooth muscle cells in the development of atherosclerosis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 72: 157-167
- [6] J Madrigal-Matute, CE Fernandez-Garcia, C Gomez-Guerrero, et al. HSP90 inhibition by 17-DMAG attenuates oxidative stress in experimental atherosclerosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 95(1): 116-123
- [7] 吴峰, 冯金忠, 李松华, 等. 热休克蛋白 90 对血小板源衍生因子诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞增殖的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, (31): 6062-6064
- [8] 唐杨峰, 张锡武, 谈梦伟, 等. 胸主动脉夹层血管平滑肌细胞的表型转化研究[J]. *中国血管外科杂志(电子版)*, 2013, (02): 116-118
- [9] EM Maguire, Q Xiao, Q Xu. Differentiation and Application of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Vascular Smooth Muscle Cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(11): 2026-2037
- [10] A Frisantiene, M Philippova, P Erne, et al. Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity[J]. *Cell Signal*, 2018, 52: 48-64
- [11] A Hoter, ME El-Sabban, HY Naim. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): 2560
- [12] FH Schopf, MM Biebl, J Buchner. The HSP90 chaperone machinery [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(6): 345-360
- [13] J Zhang, L Wang, W Fu, et al. Smooth muscle cell phenotypic diversity between dissected and unaffected thoracic aortic media[J]. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 2013, 54(4): 511-521
- [14] J Qi, P Yang, B Yi, et al. Heat shock protein 90 inhibition by 17-DMAG attenuates abdominal aortic aneurysm formation in mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(8): H841-852
- [15] O Boucherat, T Peterlini, A Bourgeois, et al. Mitochondrial HSP90 Accumulation Promotes Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 198(1): 90-103
- [16] 陶沙, 谭宁, 冯颖青. Molecular mechanisms and therapeutic perspectives of left ventricular hypertrophy in systemic hypertension [J]. *South China Journal of Cardiology*, 2015, (04): 256-261
- [17] 蒋静, 刘登辉, 吴晓丽. HSP90 基因表达情况与妊娠期高血压疾病中发生发展相关性分析及其临床意义 [J]. *中国妇幼保健*, 2018, (13): 3060-3063
- [18] 艾建华, 杨镇. 热休克蛋白 90 在门静脉高压大鼠肠系膜血管中的表达[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, (02): 97-98
- [19] 赵永波, 岳月红, 王彦芝, 等. 急性 Stanford A 型主动脉夹层患者的临床特征及术后院内死亡危险因素分析 [J]. *现代生物医学进展*, 2019, (07): 1362-1366
- [20] DM Milewicz, DC Guo, V Tran-Fadulu, et al. Genetic basis of thoracic aortic aneurysms and dissections: focus on smooth muscle cell contractile dysfunction[J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2008, 9: 283-302
- [21] H Hao, G Gabbiani, ML Bochaton-Piallat. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(9): 1510-1520
- [22] 万幼峰, 刘涛, 郭春华, 等. 抑制热休克蛋白 90 活性对 HepG2 细胞迁移的影响和相关机制[J]. *现代肿瘤医学*, 2018(19): 2999-3003
- [23] GJ Koullias, P Ravichandran, DP Korkolis, et al. Increased tissue microarray matrix metalloproteinase expression favors proteolysis in thoracic aortic aneurysms and dissections[J]. *Ann Thorac Surg*, 2004, 78(6): 2106-2110; discussion 2110-2101

(上接第 7 页)

- [19] Li S, Jin S, Song C, et al. The strategy for establishment of the multiple reaction monitoring based characteristic chemical profile of triterpenes in *Alismatis rhizoma* using two combined tandem mass spectrometers [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1524: 121-134
- [20] Shu Z, Pu J, Chen L, et al. *Alisma orientale*: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine[J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(2): 227-251
- [21] Li Q, Qu H. Study on the hypoglycemic activities and metabolism of alcohol extract of *Alismatis Rhizoma*[J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(6): 1046-1053
- [22] Feng Y L, Chen H, Tian T, et al. Diuretic and anti-diuretic activities of the ethanol and aqueous extracts of *Alismatis rhizoma* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154(2): 386-390
- [23] Zhu B, Zhang Q L, Hua J W, et al. The traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Atractylodes macrocephala* Koidz: A review[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 226(226): 143-167
- [24] 曹宁宁, 杨文静, 林映仙, 等. 经典名方泽泻汤的 HPLC 指纹图谱及多指标含量测定研究[J]. *中草药*, 2020, 51(10): 2773-2780
- [25] 胡诚, 陈龙, 蒋元烨, 等. HPLC 法测定泽泻汤中泽泻醇 A、泽泻醇 B 和 23- 乙酰泽泻醇 B 含量 [J]. *上海中医药大学学报*, 2019, 33(05): 73-77
- [26] 伍蕊嗣, 姚运秀, 刘钱, 等. 不同干燥方式泽泻汤指纹图谱的建立及 2 种成分测定[J]. *中成药*, 2019, 41(08): 1905-1910
- [27] 黄晓飞, 周蕾, 彭晓辉, 等. 泽泻汤及其乙醇部位对高血症大鼠血脂及血脂代谢相关酶的影响 [J]. *湖北中医药大学学报*, 2013, 15(06): 3-6
- [28] 宋冬佳, 杨阳, 徐京育. 李廷应用泽泻汤合温胆汤治疗舒张压高的临床经验[J]. *世界中西医结合杂志*, 2020, 15(04): 624-626+657
- [29] 袁莉莉, 王倩. 基于网络药理学研究泽泻汤治疗脑水肿的作用机制[J]. *长春中医药大学学报*, 2019, 35(05): 912-915
- [30] 李爱珍. 泽泻汤治疗高脂血症的临床疗效 [J]. *临床合理用药杂志*, 2018, 11(36): 114-115
- [31] Zhu J Z, Zhou Q Y, Wang Y M, et al. Prevalence of fatty liver disease and the economy in China: A systematic review [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21: 5695-5706
- [32] Elhence A, Shalimar. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease- Current perspectives [J]. *Indian J Gastroenterol*, 2020, 39(1): 22-31
- [33] 赵红, 谢雯. 非酒精性脂肪性肝病的中西医结合治疗现状[J]. *中国临床医生杂志*, 2020, 48(01): 16-18