

亚硝酸钠对大鼠高肺血流肺动脉高压的治疗作用及可能机制

曹海燕^{1*}, 吕学东², 顾俊³

(1. 如皋市人民医院呼吸内科, 江苏 如皋 226500; 2. 南通市第一人民医院呼吸内科, 江苏 南通 226000; 3. 南通大学附属医院呼吸内科, 江苏 南通 226000)

摘要: 探讨亚硝酸钠(NaNO_2)对肺动脉高压大鼠的血流动力学改善效果及其作用机制。采用清洁级成年SD雄性大鼠通过腹主动脉-下腔静脉分流手术,建立高肺血流肺动脉高压大鼠模型,对照组(仅采取假手术)。治疗组给予 NaNO_2 灌胃(3 mg/kg, 1次/天,连续3周),模型组和对照组仅给予等量生理盐水灌胃;对比各组的心肺功能及血浆、肺组织中NO水平和肺组织中NF- κ B、TGF- β 1、VEGF蛋白的表达。结果显示,与模型组和对照组相比, NaNO_2 干预3周后,治疗组大鼠的肺血流、肺动脉压具有显著的降低作用,并可减轻肺动脉血管及右心脏重构,其作用机制可能与降低肺组织中NF- κ B、TGF- β 1、VEGF及增高NO水平有关。

关键词: 亚硝酸钠; 肺动脉高压; 肺血流; 大鼠

中图分类号:R563

文献标识码:A

Therapeutic effect of NaNO_2 on rat pulmonary hypertension induced by high pulmonary blood flow and the underlying experimental mechanism

CAO Haiyan^{1*}, LU Xuedong², GU Jun³

(1. Department of Respiratory Medicine, Rugao People's Hospital, Rugao 226500, Jiangsu, China; 2. Department of Respiratory Medicine, Nantong First People's Hospital, Nantong 226000, Jiangsu, China; 3. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226000, Jiangsu, China)

Abstract: To investigate the therapeutic effect of NaNO_2 on pulmonary hypertension rats (PHA) and the underlying mechanism. PHA rats were established by abdominal aorta-inferior vena cava shunt surgery. The control rats were subjected to sham operation. The PHA rats (treatment group) was given by gavage of NaNO_2 for 3 weeks (3mg/kg, q. d), the rats in the model group and the control group were given the same amount of normal saline. The function of heart and pulmonary were improved, the level of NO, and the expression of NF- κ B, TGF- β 1 and VEGF in the lung tissues were compared between the three groups. The results showed that 3 weeks of treatment with NaNO_2 had a significant alleviated dynamics of pulmonary blood, blood pressure in rats, and the pulmonary vascular and right ventricular remodeling, the underlying mechanism may be related to the down-regulation the levels of NF- κ B, TGF- β 1, VEGF and increase of NO in lung tissue.

Key words: sodium nitrite; pulmonary hypertension; high pulmonary blood flow; rat

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是一种预后较差的血管疾病^[1]。高肺血流肺动脉高压是先天性心脏病最常见的并发症,又称为先心病肺动脉高压,表现为肺血管床结构和/或功能改变,导致肺血管阻力和肺动脉压力进行性增

高^[2]。高肺血流肺动脉高压会导致右室扩张,引起心力衰竭,甚至患者死亡^[3]。对于NO信号通路的干预已被用于肺动脉高压的治疗,持续吸入NO是目前肺动脉高压的重要治疗方法。亚硝酸盐(nitrite)以前被认为是NO的一种无活性代谢产物。随着研究进展,越来越多的学者认为亚硝酸盐具有重要的生理及病理生理功能^[4]。本研究探讨亚硝酸钠(NaNO_2)治疗高肺血流肺动脉高压大鼠的效果及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取 SPF 级成年 SD 雄性大鼠 36 只, 体重 (215.4 ± 9.0) g, 喂养于室温 $23\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $45\% \sim 60\%$ 、光照 12h 的环境中。

1.2 实验药品

食品级亚硝酸钠(批号:20121013), 购自上海科昌精细化学品公司; 一氧化氮试剂盒(酶法), 购自北京奥维亚生物技术有限公司。兔抗大鼠 NF- κ B 抗体购自美国 Abcam 公司; 兔抗大鼠 TGF- β 1 抗体、兔抗大鼠 VEGF 抗体购自美国 Bioworld 公司, 驴抗兔 IgG 工作液购自上海沪峰化工有限公司; 总蛋白提取试剂盒购自上海碧云天生物技术研究。

1.3 实验方法

1.3.1 分组及建模 选取清洁级成年 SD 雄性大鼠 36 只, 采用随机数字表法分为对照组、模型组和治疗组, 每组各 12 只, 模型组和治疗组参照文献方法建立大鼠高肺血流肺动脉高压模型^[5], 对照组仅采取假手术。具体方法如下: 实验大鼠术前禁食 12h, 使用 10% 水合氯醛腹腔注射进行麻醉, 大鼠仰卧固定于鼠板上。大鼠腹部旁正中切口, 打开腹腔, 暴露腹主动脉和下腔静脉。采用腹主动脉-下腔静脉分流手术建立高肺血流肺动脉高压大鼠模型, 在该段腹主动脉中下 1/3 处, 使用静脉穿刺针穿入腹主动脉以及腹主动脉-下腔静脉联合壁, 形成瘘口。使用粘合剂封住穿刺口。分流模型建立成功后, 复位腹腔内脏器, 关闭腹腔。

1.3.2 干预方法 治疗组给予 NaNO_2 3mg/kg 灌胃, 1 次/天, 连续 3 周。模型组和对照组仅给予等量生理盐水灌胃, 末次给药结束 24 h 后进行以下指标检测。

1.4 观察指标及检测方法

1.4.1 大鼠肺动脉 HE 染色 取大鼠右肺上 2 叶肺组织, 给生理盐水及 4% 多聚甲醛灌注固定。经石蜡包埋, 切片做 HE 染色。

1.4.2 血流动力学指标测定 大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛进行麻醉, 固定于小动物手术台上。经颈正中切口行气管切开, 接 TKR-200C 型小动物呼吸机(江西特力麻醉呼吸机设备公司), 潮气量 2 mL/100 g、呼吸频率 40 次/min。暴露左颈总动脉, 连接压力传感器及 PM-9000 多导生理记录仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司), 稳定后记录平均肺动脉压力(MPAP)、平均右心室内压(MRVP)、

右室收缩压(RVSP)。记录完毕后, 处死大鼠, 采集肺动脉血样 3~4 mL, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测; 取出大鼠心脏, 用小手术剪剪去心房组织, 分离右心室、室间隔+左心室。冲洗, 吸干水分, 称重。计算右心室肥厚指数(right ventricular hypertrophy index, RVHI)。公式如下: 右心室质量/(左心室+室间隔)质量=右心室肥厚指数。

1.4.3 血清及肺匀浆组织中 NO 含量测定 血流动力学指标记录完毕后, 处死大鼠, 采集肺动脉血样 3~4 mL, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测; 称取右肺上叶肺组织, 制备 10% 肺匀浆。根据一氧化氮试剂盒(酶法)的说明书测定血清及肺匀浆组织中 NO 水平。

1.4.4 肺组织中的 NF- κ B、TGF- β 1、VEGF 蛋白表达测定 免疫组化方法检测肺组织中核转录因子(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、转化生长因子 β 1(transforming growth factor beta, TGF- β)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白的表达。将切片置入二甲苯中脱蜡(10 min $\times$ 3 次)、梯度乙醇水化处理(10 min $\times$ 3 次), S-P 法检测, 使用 3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶, 室温留置 15 分钟以封闭内源性过氧化物酶。3% 牛血清清蛋白封闭 1h 处理, 然后分别滴加 1:100 兔抗大鼠 NF- κ B 抗体、兔抗大鼠 TGF- β 1 抗体、兔抗大鼠 VEGF 抗体, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS 冲洗 3 次每次 3 分钟, 滴加生物素标记的驴抗兔 IgG 工作液(上海沪峰化工有限公司), 室温孵育 1 h。PBS 冲洗 3 次每次 3 分钟, 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素, 孵育 1h。新鲜配制 DAB 溶液, 显色处理, 自来水冲洗。苏木素复染, 自来水冲洗。切片经过梯度酒精干燥, 二甲苯透明, 之后使用中性树脂胶封固。脱色后, 在显微镜下观察处理。

1.5 统计学方法

数据分析应用 SPSS16.0, 采用 $\bar{x} \pm s$ 表示计量数据, 数据分析应用单因素方差分析法, 组间两两比较分析应用 LSD- t 检验; $P < 0.05$ 说明差异具有统计学显著性。

2 结 果

2.1 各组大鼠肺动脉病理学形态观察

在 HE 染色后, 光镜下观察, 对照组大鼠肺动脉壁薄且光滑、内皮细胞外形扁平; 肺动脉高压组大

鼠肺动脉内膜及中膜显著肥厚,平滑肌细胞较对照组明显增多且排列比较紊乱,肺动脉的管腔变的较

为狭窄,可见较多的炎性细胞浸润;治疗组的上述情况较模型组均有显著的改善(图1)。

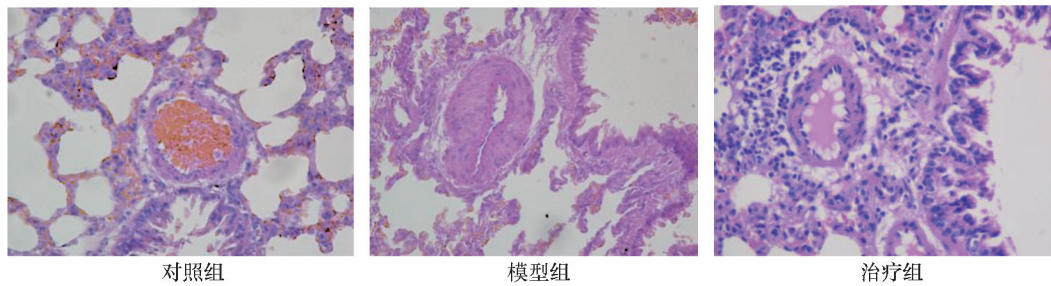


图1 各组大鼠肺动脉重构结果(HE 400×)

2.2 各组大鼠的血流动力学指标

干预3周后,模型组大鼠的MPAP、MRVP、RVSP、RVHI测定值均高于对照组($P<0.05$);治疗组大鼠的MPAP、MRVP、RVSP、RVHI测定值均低于模型组($P<0.05$)(表1)。

表1 各组大鼠的血流动力学指标比较

组别	<i>n</i>	MPAP (mmHg)	MRVP (mmHg)	RVSP (mmHg)	RVHI ($\times 10^{-2}$)
对照组	12	13.6 $\pm$ 1.5	21.6 $\pm$ 2.6	36.1 $\pm$ 3.1	27.3 $\pm$ 1.8
模型组	12	29.6 $\pm$ 4.2 ^a	40.8 $\pm$ 4.5 ^a	55.2 $\pm$ 6.3 ^a	37.6 $\pm$ 2.4 ^a
治疗组	12	18.9 $\pm$ 2.0 ^{ab}	27.6 $\pm$ 3.2 ^{ab}	42.1 $\pm$ 4.3 ^{ab}	31.2 $\pm$ 2.0 ^{ab}
<i>F</i>		21.639	25.055	29.004	17.635
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000	0.000

与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$

2.3 各组大鼠的血清及肺匀浆液中的NO水平

干预3周后,模型组大鼠的血清NO测定值低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);治疗组大鼠血清NO测定值高于模型组($P<0.05$);对照组、模型组和治疗组肺组织匀浆液中NO含量差异无统计学意义($P>0.05$)(表2)。

表2 大鼠的血清及肺匀浆液中的NO含量比较

组别	血清(μ mol/L)	肺匀浆液(μ mol/L)
对照组	41.6 $\pm$ 7.6	40.8 $\pm$ 4.8
模型组	16.4 $\pm$ 3.5 ^a	39.6 $\pm$ 5.1 ^a
治疗组	32.0 $\pm$ 4.7 ^{ab}	40.5 $\pm$ 4.5 ^{ab}
<i>F</i>	28.646	1.882
<i>P</i>	0.000	0.296

与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ ($n=12$)

2.4 各组大鼠肺组织中NF- κ B、TGF- β 1、VEGF蛋白表达

干预3周后,模型组大鼠肺组织中NF- κ B蛋白、TGF- β 1、VEGF蛋白表达高于对照组($P<0.05$);治疗组肺组织中NF- κ B蛋白、TGF- β 1、VEGF蛋白表达显著低于模型组($P<0.05$),其蛋白表达见图2,相对表达量见表3。

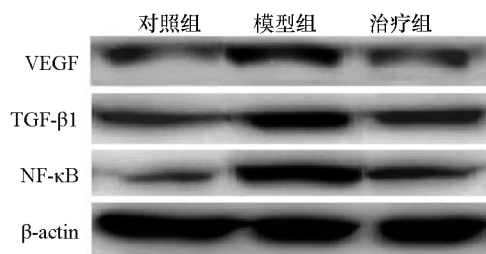


图2 大鼠肺组织中NF- κ B、TGF- β 1、VEGF蛋白表达

表3 大鼠肺组织中的NF- κ B、TGF- β 1、VEGF蛋白表达灰度值

组别	NF- κ B	TGF- β 1	VEGF
对照组	0.5 $\pm$ 0.1	0.42 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.2
模型组	1.1 $\pm$ 0.4 ^a	1.69 $\pm$ 0.4 ^a	1.2 $\pm$ 0.4 ^a
治疗组	0.8 $\pm$ 0.3 ^{ab}	0.8 $\pm$ 0.3 ^{ab}	0.8 $\pm$ 0.2 ^{ab}
<i>F</i>	43.065	29.875	31.164
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ ($n=12$)

3 讨 论

肺动脉高压是指肺动脉压力升高超过一定界值并导致右心室衰竭为特征的一种疾病^[6]。先天性心脏缺陷引起的肺动脉高压是儿童先天性心脏病最常见并发症之一。肺小动脉进行性狭窄导致

肺动脉持续增高,右心压力负荷过重、右心衰竭。肺小动脉血管重构是肺动脉高压最基本的病理特征,先天性心脏病引起肺动脉高压的发病机制涉及多个方面。多数研究表明,肺动脉高压的发展与血管舒张因子和血管收缩因子的失衡有关^[7-8]。NO 吸入作为一种选择性的肺血管扩张剂,是目前肺动脉高压的重要治疗方法。但是,NO 吸入治疗设备昂贵,NO 作用时间较短,仪器操作相对复杂,因此在临床的应用受到一定限制。

亚硝酸盐是一种无机阴离子,以往研究认为亚硝酸盐是 NO 的一种无活性代谢产物。目前有研究发现,亚硝酸盐会通过某些途径重新被机体利用还原成 NO^[9]。NO 是以氧依赖的 L-精氨酸作为底物,一氧化氮合酶(NOS)催化下产生。Sitbon 等研究显示,当机体的 NOS-NO 途径无法正常产生 NO 时,NO 不通过经典的 NO 途径生成,而由亚硝酸盐还原产生^[10]。研究显示,亚硝酸盐具有一定的血管扩张效应,能导致血管舒张,降低血压^[11]。袁瑞雪等研究发现,在大鼠的肺动脉高压模型中,亚硝酸盐有肺血管扩张和产生血管重塑的治疗作用^[12]。本研究结果显示,通过在腹主动脉和下腔静脉之间进行造瘘手术,能成功建立高肺血流肺动脉高压大鼠模型,给予 NaNO₂ 干预 3 周后,治疗组大鼠的 MPAP、MRVP、RVSP、RVHI 测定值均显著降低,表明 NaNO₂ 对高肺血流肺动脉高压大鼠具有显著的降压效果,并能减轻肺动脉血管和右心脏重构,与 Jain 等之前报道的结果相一致^[13]。另外,NaNO₂ 干预 3 周后,治疗组大鼠血清 NO 测定值均显著的高于模型组,表明肺动脉高压大鼠 MPAP 降低与亚硝酸盐转化为 NO 产生血管扩张作用有关。

血管内皮细胞可以分泌特定的生长因子如 VEGF、TGF- β 等^[14],其分泌紊乱可以导致血管内皮细胞能紊乱、增殖和凋亡失衡,直接促进肺小动脉血管重构。NF- κ B 是一种调节各种生物现象的关键转录因子,可以调节 TGF- β 1、VEGF 的表达,促进血管重构^[15]。本研究发现干预 3 周后,治疗组肺组织中 NF- κ B、TGF- β 1、VEGF 蛋白表达显著低于模型组,说明 NaNO₂ 可以降低 NF- κ B、TGF- β 1、VEGF 蛋白表达,其机制可能与调节 NF- κ B 信号通路的活性有一定关联。

综上所述,NaNO₂ 对高肺血流肺动脉高压大鼠具有显著的降低肺动脉高压效果,减轻肺动脉血管

和右心脏重构、其作用机制可能与调节肺组织中 NF- κ B、TGF- β 1、VEGF 及 NO 水平有关,值得在临床进一步探讨。

参考文献:

- [1] 中华医学会儿科学分会新生儿学组. 新生儿肺动脉高压诊治专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2017, 55(3):163-8.
- [2] 盖祥云, 林鹏程, 何彦峰, 等. 低氧性肺动脉高压中低氧性肺血管收缩的作用[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(6):768-72.
- [3] 李雪英, 胡苏萍, 陈国忠, 等. 炎症反应与慢性阻塞性肺疾病相关肺动脉高压及其血液高凝状态的关系[J]. 山东医药, 2017, 57(1):71-3.
- [4] 王利婷, 荆志成. 肺动脉高压治疗药物研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(2):127-34.
- [5] GARCIA R, DIEBOLD S. Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat [J]. Cardiovascular Research, 1990, 24(5):430.
- [6] 徐楠, 吴伟春, 牛丽莉, 等. 肺动脉高压患者心室重构的超声心动图指标与肺阻力的相关性研究[J]. 中国循环杂志, 2017, 32(2):700.
- [7] 王文禄, 范文文, 王金菊, 等. 儿童喘息性疾病肺动脉高压筛查及其与肺功能的相关性[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(16):1231-4.
- [8] 黄子旭, 沈捷. 钙通道在肺动脉高压发病机制中的研究进展[J]. 临床儿科杂志, 2016, 34(11):861-5.
- [9] KLINGER JR. Plasma nitrite/nitrate levels: a new biomarker for pulmonary arterial hypertension[J]. European Respiratory J, 2016, 48(5):1265-6.
- [10] SITBON O, SATTLER C, BERTOLETTI L, et al. Initial dual oral combination therapy in pulmonary arterial hypertension. [J]. European Respiratory J, 2016, 47(6):1727-9.
- [11] GU S, HU H, DONG H. Systematic review of health-related quality of life in patients with pulmonary arterial hypertension [J]. Pharmacoeconomics, 2016, 34(8):1-20.
- [12] 袁瑞雪, 涂生芬, 陈萍, 等. 亚硝酸钠对高肺血流肺动脉高压大鼠的影响及机制研究[J]. 重庆医科大学学报, 2016, 23(12):1216-21.
- [13] JAIN S, KHERA R, GIROTRA S, et al. Comparative effectiveness of pharmacological interventions for pulmonary arterial hypertension: a systematic review and network meta-analysis [J]. Chest, 2016, 151(1):90.
- [14] MACHADO RD, LAURA S, EICHSTAEDT CA, et al. Pulmonary arterial hypertension: a current perspective on established and emerging molecular genetic defects [J]. Human Mutation, 2016, 36(12):1113-27.
- [15] 王丹妹, 方莲花, 杜冠华. 转化生长因子 β 1 在肺动脉高压中作用的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(6):741-4.

(本文编辑:秦旭平)