

EPS 对肺动脉高压大鼠右心室重构的影响及机制

李瑞敏, 丁艳艳, 张永祥*

(首都医科大学大兴教学医院呼吸与危重症医学科, 北京 大兴 102600)

摘要: 探讨依帕司他(EPS)对肺动脉高压大鼠右心室重构的影响及机制。采用野百合碱(MCT)诱导的方法建立肺动脉高压大鼠模型。分别给予为 50 mg/kg 和 100 mg/kg EPS 连续干预 4 周, 观察大鼠血流动力学指标、右心室重构及其心肌形态和心肌 Cx43 表达。结果显示, EPS 能够降低右心室收缩压(RVSP)、平均肺动脉压(mPAP)、肺动脉收缩压(PASP)、右心室肥厚指数(RVHI), 右心室质量指数(RVMI)及增加心肌 Cx43 表达, 并呈剂量依赖效应。结果说明, EPS 能改善 MCT 诱导的肺动脉高压大鼠右心室重构, 机制可能与其增加心肌 Cx43 表达有关。

关键词: 依帕司他; 野百合碱; 肺动脉高压; 右心室重构; 大鼠

中图分类号: R544 文献标识码: A

Effect of EPS on right ventricular remodeling of pulmonary hypertension rats and its mechanism

LI Ruimin, DING Yanyan, ZHANG Yongxiang*

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Daxing Teaching Hospital of Capital Medical University, Beijing 102600, China)

Abstract: To investigate the effects of Epalrestat (EPS) on right ventricular remodeling in pulmonary hypertension rats and its mechanism. The rat model of pulmonary hypertension was established by injection of monocrotaline (MCT), after the 50 mg/kg or 100 mg/kg EPS were given for 4 weeks, the hemodynamic parameters and right ventricular remodeling, myocardial morphology and Cx43 expression was observed. Results showed, the right ventricular systolic pressure (RVSP), mean pulmonary arterial pressure (mPAP), pulmonary arterial systolic pressure (PASP), right ventricular hypertrophy index (RVHI), right ventricular mass index (RVMI) were significantly decreased by continuous intervention for 4 weeks of EPS, and the expression of Cx43 was increased.

Key words: epalrestat; monocrotaline; pulmonary hypertension; right ventricular remodeling; rat

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是一种致死率极高的慢性肺循环疾病,病理生理机制为肺循环阻力的增加,引起右心室后负荷增加,导致右心室重构,严重时诱发右心衰竭,甚至造成死亡^[1]。因此寻求疗效确切且能有效改善肺血管及右心室重构的药物具有重要意义^[2]。

研究表明^[3],野百合碱(monocrotaline, MCT)可以诱导 PAH 大鼠右室心肌氧含量降低、心肌细胞线粒体氧耗上调。依帕司他(epalrestat, EPS)是典型的醛糖还原酶选择性抑制剂,研究发现 EPS 具有降压、抑制血管平滑肌细胞增殖和血管重构等作

用^[4-5],本文拟研究 EPS 对 MCT 诱导的肺动脉高压大鼠右心室重构的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选取 SD 大鼠 80 只,体质量 180 ~ 200 g,10 周龄,购自苏州工业园区爱尔麦特科技有限公司,许可证号:SDK(苏)2009-0001;所有大鼠饲养于标准鼠笼,每笼 5 只,室温 22 ~ 25 °C,湿度 35% ~ 50%,自由摄食及饮水,适应性喂养 1 周后进行试验,随机分为对照组、模型组、50 mg/kg EPS,100 mg/kg EPS 组,每组 20 只。

1.2 实验方法

1.2.1 肺动脉高压大鼠模型建立 按照经典方法给予 SD 大鼠 60mg/kg 皮下注射野百合碱构建 PAH 大鼠模型,对照组皮下注射等量的生理盐水。造模过程中的 28 天内,模型组共自发性死亡大鼠 7 只,死亡率为 35%。

1.2.2 药物干预 首先用蒸馏水将磨成粉末状的 EPS 稀释成混悬液,自注射 MCT 之日起,分别给予 50 mg/kg EPS,100 mg/kg EPS,模型组给予等量的生理盐水。一直持续 28 天,并全程密切观察大鼠的一般情况和生存状态并记录。

1.2.3 血流动力学指标测定 首先用 60 mg/kg 的戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉大鼠,将直径为 0.5 mm 的聚乙烯 PE 导管连接上压力换能器并经右颈外静脉插入右心室及肺动脉,MedLab-TA6008 多导生理记录仪(南京美易科技有限公司生产)分别记录右心室收缩压(RVSP)、平均肺动脉压(mPAP)和肺动脉收缩压(PASP)^[6]。

1.2.4 组织标本处理及测定

上一步结束后,打开胸腔暴露心和肺,在右心室剪一小口,并剪开左房,将连于灌注装置的磨平的针头经右心室插入至肺动脉,开启灌注装置,用生理盐水冲洗肺至干净,取出心脏,去掉大血管和心房,分离左、右心室,滤纸吸干表面水分,称 RV 重及 LV+SEP 重,并计算右心室肥厚指数(RVHI),右心室质量指数(RVMI)^[7]。将右心室心尖处组织置于 4% 多聚甲醛固定 2 天,用于制备石蜡切片;准确称取 100 mg 右心室组织置于液氮中研磨并加入 1 mL Trizol 试剂进行裂解,置于-80℃冰箱保存;剩余右心室置于液氮中研磨,并在冰上用裂解液对组织裂解 30 min,于 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min 后提取蛋白,检测相关蛋白表达水平。

1.2.5 HE 观察

用 4% 多聚甲醛固定大鼠右心室心尖部 48 h,石蜡包埋切片,进行 HE 染色,具体操作步骤如下:将石蜡切片置于烘箱中 60℃ 烤 1~2 h;石蜡切片常规二甲苯,乙醇脱蜡至水,苏木素染 10 min,流水冲洗,去余色,7% 盐酸乙醇分化数秒钟,流水冲洗,切片变蓝约 15 min,95% 乙醇 30 s,酒精性伊红染 30 s,95% 乙醇 30 s 两次,100% 乙醇 30 s 两次,石碳酸二甲苯 30 s,二甲苯 30 s 两次,中性树胶封片^[8]。

1.2.6 免疫组化染色

免疫组化染色采用链霉素蛋白-生物素免疫染色法。首先常规石蜡切片脱蜡水化,PBS 洗涤 3

min,滴加 0.3% H₂O₂,并于 37℃ 孵育 20 min,再用 PBS 洗涤 3 min 后用正常血清封闭 20 min,接着一抗孵育过夜(4℃),用 PBS 洗涤 3 min,用二抗室温 37℃ 孵育 0.5 h,用 PBS 洗涤,滴加辣根过氧化物酶标记链酶卵白素工作液,并室温孵育 0.5 h,PBS 洗涤 3 min,DAB 显色,苏木素复染,常规脱水、透明。中性树胶封片。染色过程中用 PBS 缓冲液取代一抗作为空白对照^[9]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 进行统计分析,RVSP、mPAP、PASP、RVHI、RVMI 和 Cx43 光密度采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.2 大鼠血流动力学指标

与对照组相比,RVSP、mPAP 和 PASP 在模型组显著增高,给予 EPS 后 RVSP、mPAP 和 PASP 显著降低,并呈剂量依赖效应。见表 1。

表 1 各组大鼠血流动力学指标比较

组别	n	RVSP(mmHg)	mPAP(mmHg)	PASP(mmHg)
对照组	20	20.11±1.90	13.41±1.50	22.41±2.90
模型组	13	47.84±3.22 ^a	36.68±3.06 ^a	50.46±3.03 ^a
50 mg/kg EPS 组	20	38.41±2.22 ^{ab}	27.45±2.27 ^{ab}	41.16±2.84 ^{ab}
100 mg/kg EPS 组	20	31.15±1.87 ^{abc}	20.14±2.11 ^{abc}	30.03±2.90 ^{abc}
F		34.657	28.622	38.876
P		<0.05	<0.05	<0.05

与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与 50 mg/kg EPS 组比较,^c $P < 0.05$

2.3 大鼠右心室重构指标

与对照组比较,模型组 RVHI 和 RVMI 显著增加,给予 EPS 干预后,RVHI 和 RVMI 显著降低,并呈剂量依赖效应。见表 2。

2.4 大鼠右心室心肌 HE 染色

对照组右心室心肌纤维排列整齐,胞浆染色均匀,胞核位于中央,呈卵圆形,核膜边界清楚;模型组心肌纤维排列紊乱,横纹消失,心肌细胞肥大,部分胞核宽大畸形;EPS 组心肌形态学改变较模型组有所改善,其中高剂量组好于低剂量组。见图 1。

表 2 各组大鼠右心室重构指标比较

组别	n	RVHI(g/g)	RVMI(g/kg)
对照组	20	0.24±0.08	0.44±0.10
模型组	13	0.58±0.12 ^a	0.89±0.15 ^a
50 mg/kg EPS 组	20	0.50±0.10 ^{ab}	0.63±0.12 ^{ab}
100 mg/kg EPS 组	20	0.42±0.11 ^{abc}	0.51±0.14 ^{abc}
F		12.034	15.444
P		<0.05	<0.05

与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与 50 mg/kg EPS 组比较,^c $P<0.05$

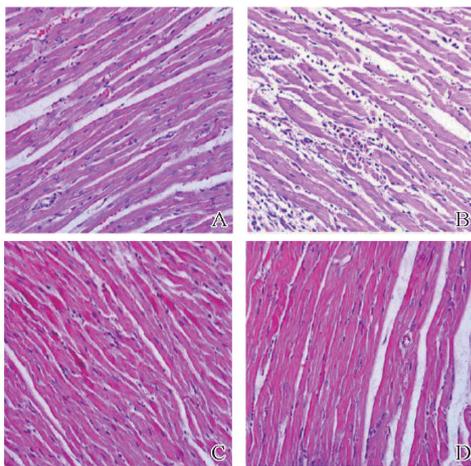


图 1 右心室心肌 HE 染色观察(200×)

A:对照组;B:模型组;C:50 mg/kg EPS 组;D:100 mg/kg 组

2.5 各组右心室心肌 Cx43 表达

与对照组比较,模型组 Cx43 光密度显著降低,给予 EPS 干预后,Cx43 光密度显著增高,并呈剂量依赖效应。说明 PAH 大鼠右心室心肌 Cx43 表达降低,EPS 逆转右心室重构与增加 Cx43 表达有关。见表 3 和图 2。

表 3 各组大鼠右心室心肌 Cx43 比较

组别	n	Cx43 光密度	F	P
对照组	20	0.572±0.076		
模型组	13	0.300±0.065 ^a	10.144	<0.05
50 mg/kg EPS 组	20	0.410±0.087 ^{ab}		
100 mg/kg EPS 组	20	0.499±0.096 ^{abc}		

与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与 50 mg/kg EPS 组比较,^c $P<0.05$

3 讨论

MCT 是从野百合中提取的一种双稠吡咯类生物碱,本身是无活性的,在大鼠肝脏内经 P450 氧化酶可转化为有活性的脱氢产物野百合碱吡咯,可以

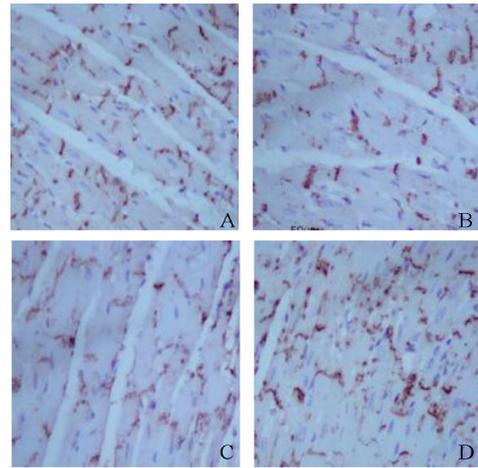


图 2 Cx43 免疫组化染色(200×)

A:对照组;B:模型组;C:50 mg/kg EPS 组;D:100 mg/kg 组

选择性作用于肺血管床^[10]。MCT 可选择性地损伤肺血管内皮细胞,引起肺小动脉平滑肌细胞进行性增殖、肺动脉血管内栓塞形成、诱导肺小动脉肌化和重构、降低内膜完整的肺血管数量、升高肺阻力,最终导致肺动脉高压^[11]。皮下注射 MCT 是公认的用于研究肺动脉高压、非原发于心脏的右心室重构和右心衰竭的方法^[12],本实验结果也证明,采用 MCT 能成功构建肺动脉高压和右心室重构的动物模型。醛糖还原酶(AR)是多元醇通路的关键酶,具有 NADPH 依赖性。AR 被激活后可以使 NADPH/NADP⁺ 比值下降,从而降低抗氧化能力,进而增强氧化应激反应。有研究发现,AR/NADPH 氧化酶-4(NOX-4)介导的氧化应激在肺动脉高压右心室重构中发挥了重要的作用^[13]。EPS 为 AR 抑制剂,可通过抑制 AR 表达,抑制 NOX-4 介导的氧化应激反应,从而改善肺动脉高压大鼠右心室重构。本实验结果发现,在实验造模的 28 天内,模型组共自发性死亡大鼠 7 只,死亡率为 35%,对照组、EPS 组无大鼠死亡,说明 EPS 可以降低 MCT 诱导的肺动脉高压大鼠的死亡率,也间接地说明 EPS 可以减轻肺动脉高压对大鼠的病死率。从血流动力学指标(RVSP、mPAP 和 PASP)可以看出,由高到低的是模型组、EPS 组、对照组,说明示 EPS 具有降低 PAH 大鼠肺动脉压力的作用。从右心室重构指标可以看出,与对照组相比,模型组 RVHI 和 RVMI 明显升高,说明 MCT 成功制造肺动脉高压模型和右心室重构模型,给予 EPS 干预后,PAH 大鼠右心室重构得到抑制。通过对大鼠的右心室心肌进行 HE 染色,结果说明肺动脉高压大鼠的右心室心肌紊乱,EPS 在抑制肺动脉高压同时,也能改善心肌结构。Cx43

是哺乳类动物心室工作细胞最重要的缝隙连接蛋白,它的正常表达和分布是心肌细胞正常活动及协调舒缩的重要保证^[14]。当压力负荷持续存在时(例如肺动脉高压),Cx43 的密度会比正常减少 40%,本实验结果显示,模型组 Cx43 的表达显著降低、注射 EPS 后 Cx43 的表达显著增加。结合前面结果,我们推测 EPS 可能是通过上调了 Cx43 表达量逆转肺动脉高压大鼠右心室重构^[15]。

综上所述,EPS 可以减轻 MCT 诱导的 PAH 大鼠右心室重构,其机制可能与增加右心室心肌 Cx43 表达,抑制醛糖还原酶作用有关。

参考文献:

[1] 王玉秀,徐兴祥,迟培元,等. 5-羟色胺在肺动脉高压中作用机制的研究进展[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2019, 12(3):363-7.

[2] 李先伟,蒋莉莉,左东泽,等. 依帕司他对肺动脉高压大鼠右心室重构的作用及机制[J]. 中国药理学杂志, 2017,52(23): 2079-86.

[3] 杨丹莉,李淑慧,张海港,等. G 蛋白竞争性抑制性肽(GCIP-27)抑制野百合碱所诱导的大鼠右心室心肌细胞凋亡[J]. 中国新药杂志,2018(15):66-70.

[4] 王晓彤,林海雄. α-硫辛酸对比依帕司他治疗糖尿病周围神经病变临床疗效的系统评价[J]. 中国药房, 2017,28(6): 786-90.

[5] 张倩,俞婷婷,蒋莉莉,等. 依帕司他通过抑制醛糖还原酶表达抑制血小板衍生生长因子诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖(英文)[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2018, 3(2): 228-30.

[6] 韩婷,权磊,胡婷婷,等. 野百合碱诱导肺动脉高压大鼠右心

室脂肪酸代谢紊乱的机制[J]. 山东医药, 2017,57(33): 29-31.

[7] 冯莎莎,于文,杜淑旭,等. 野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠内源性硫化氢生成的变化[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016,31(19):1489-92.

[8] 彭永超,彭永超,郑泽琪. 金雀异黄酮、波生坦、他达拉非治疗野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压疗效的比较[J]. 第二军医大学学报, 2017,38(8):997-1003.

[9] 刘莹,董文鹏,陈长富,等. Caspase-1 抑制剂在野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠中的作用[J]. 广东医学, 2017,38(23): 3566-70.

[10] 丁永杰,张本炎,李敏. 辛伐他汀早期与后期干预野百合碱诱导肺动脉高压大鼠的研究[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2017,17(1):64-70.

[11] YOSHIYUKI R, TANAKA R, FUKUSHIMA R, et al. Preventive effect of sildenafil on right ventricular function in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension[J]. Experimental Animals, 2016, 65(3):215-22.

[12] 左艇,全新朵,程晓,等. 新加金水六君煎对野百合碱所致大鼠肺心病肺动脉高压肺血流动力学的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016,4(11):4690-3.

[13] 买买提·依斯热依力,吾布力卡斯木·吾拉木,李义亮,等. 心理应激诱导 NADPH 氧化酶 Nox-4 在食管炎症发生中的作用[J]. 中国临床研究, 2019, 32(7):865-9.

[14] 李兆康,卢青,丁世芳. 缺氧-复氧对 H9c2 心肌细胞自噬和线粒体缝隙连接蛋白 43 的影响及其相互作用[J]. 上海医学, 2019(7):391-6.

[15] NIELSEN EA, SUN M, HONJO O, et al. Dual endothelin receptor blockade abrogates right ventricular remodeling and biventricular fibrosis in isolated elevated right ventricular afterload[J]. PLOS ONE, 2016,11(1):e0146767.

(本文编辑:秦旭平)

读者·作者·编者

更正启示

《中南医学科学杂志》2020 年 7 月第 4 期第 346-348,367 页,刊登的题目为“4-PBA 对大鼠肺动脉高压的作用及药理机制”的论文,通信作者为“孙文锦”,E-mail:rxlivo@163.com。

《中南医学科学杂志》编辑部