

· 基础研究 ·

褪黑素干预动脉性肺动脉高压大鼠的实验研究

杨婉琳, 杨德辉*, 汤瑜映, 易定锋

(解放军联勤保障部队第九二一医院心血管内科, 长沙 410022)

【摘要】 目的 探讨褪黑素(MEL)干预对野百合碱(MCT)诱导的动脉性肺动脉高压(PAH)大鼠肺动脉压及肺组织环氧合酶-2(COX-2)表达情况的影响。方法 36只大鼠按随机数表法分为对照组、造模组(MCT)、干预组(MCT+MEL)。造模组和干预组分别按2.5 ml/kg(50 mg/kg,溶于无水乙醇+生理盐水混合液)规格腹膜内注射MCT溶液。对照组按2.5 ml/kg接受腹膜内注射溶媒。造模后第1~28天,干预组予以MEL 10 ml/kg(10 mg/kg,溶于无水乙醇+生理盐水混合液)腹膜内注射,1次/d,对照组和造模组予以单位等体积溶媒腹膜内注射,1次/d。测量并记录3组大鼠平均肺动脉压(mPAP)、右心室肥厚指数(RVHI)、肺小动脉管壁厚度占血管外径的百分比(WT%)、肺小动脉血管壁面积占血管总面积的百分比(WA%)及肺小动脉COX-2平均光密度值(AOD)。应用SPSS 22.0统计软件对数据进行分析。结果 与对照组比较,造模组大鼠mPAP、RVHI、WT%、WA%、AOD显著升高;与造模组比较,干预组大鼠上述指标均有不同程度降低,但仍高于对照组,差异均具有统计学意义($P < 0.001$)。相关性分析显示,AOD与mPAP、RVHI、WT%、WA%呈显著正相关(r 依次为0.836、0.749、0.823、0.821, P 均 < 0.01)。结论 MEL能够降低MCT诱导的PAH大鼠的肺动脉压,改善肺血管重塑,这可能与抑制COX-2表达水平有关。

【关键词】 褪黑素;野百合碱;动脉性肺动脉高压;环氧合酶-2

【中图分类号】 R972

【文献标志码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2019.10.167

Interventional effect of melatonin in rat model of pulmonary arterial hypertension

YANG Wan-Lin, YANG De-Hui*, TANG Yu-Yi, YI Ding-Feng

(Department of Cardiology, No. 921 Hospital of PLA Joint Service Support Unit, Changsha 410022, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of melatonin(MEL) on pulmonary artery pressure and expression of cyclooxygenase-2(COX-2) in rats with monocrotaline(MCT)-induced pulmonary arterial hypertension(PAH). **Methods** Thirty-six rats were randomly divided into control group, model group(MCT), and intervention group(MCT+MEL). MCT of 2.5 ml/kg(50 mg/kg, dissolved in mixture of anhydrous ethanol and normal saline) was injected intraperitoneally into the rats of the model group and intervention group to establish PAH. The rats from the control group received intraperitoneal injection of 2.5 ml/kg of the solvent. From the 1st day to the 28th day after the injection, MEL of 10 ml/kg(10 mg/kg, dissolved in mixture of anhydrous ethanol and normal saline) was injected intraperitoneally in the intervention group, once a day, and the control group and the model group were given same dose of the solvent. Mean pulmonary artery pressure(mPAP), right ventricular hypertrophy index(RVHI), vascular wall thickness/vascular external diameter(WT%), vascular wall area/total vascular area(WA%), and the average optical density(AOD) of COX-2 expression were measured and recorded. SPSS statistics 22.0 was used for data analysis. **Results** Compared with control group, the mPAP, RVHI, WT%, WA% and AOD were significantly higher in the model group, but the above indices were reduced in the intervention group when compared with those of the model group, but still higher than those in control group with statistical significance($P < 0.001$). Correlation analysis showed that AOD was positively correlated with mPAP, RVHI, WT% and WA% ($r = 0.836, 0.749, 0.823, 0.821$ respectively, $P < 0.01$). **Conclusion** MEL can reduce MCT-induced PAH and improve pulmonary vascular remodeling in rats, which may be associated with its inhibiting COX-2 expression.

【Key words】 melatonin; monocrotaline; pulmonary arterial hypertension; cyclooxygenase-2

This work was supported by the Type C Project of Hunan Provincial Health Commission (C2019087).

Corresponding author: YANG De-Hui, E-mail: 980450828@qq.com

收稿日期: 2019-03-09; 接受日期: 2019-05-22

基金项目: 湖南省卫健委C类项目(C2019087)

通信作者: 杨德辉, E-mail: 980450828@qq.com

动脉性肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是一种严重的进行性疾病,其特点是肺血管阻力和动脉压升高,导致右心室肥厚,最终导致右心力衰竭^[1]。PAH的病理变化主要包括炎性细胞浸润、平滑肌细胞增殖,进而肺血管收缩、管腔变窄,导致肺血流受限^[2,3]。目前关于PAH的治疗主要是对症治疗,以血管舒张为主,但这些疗法只是改善临床症状或延缓疾病的进展,尽管临床医师做出了巨大的努力,但PAH的死亡率仍然居高不下。目前,治疗PAH急需新的方法和更有效的药物^[4]。褪黑素(melatonin, MEL)是松果体产生的一种神经内分泌激素,在调节昼夜节律方面发挥重要作用。MEL以对自由基强大的清除能力和高亲脂性而闻名,可以抑制肺组织炎症,降低肺氧化应激标志物水平,增强酶和非酶抗氧化能力,从而减少肺组织损伤^[5],同时,其经济性和安全性两大特点确保了长期的临床应用^[6,7]。鉴于此,我们猜想MEL是否对PAH具有潜在的治疗作用,若具有治疗作用,这种作用是否通过抗炎、抗氧化应激来发挥作用?为进一步验证该猜想,我们建立野百合碱(monocrotaline, MCT)诱导的大鼠PAH模型,给予MEL进行干预,通过观察相关指标的变化规律探讨MEL对PAH作用的机制,旨在为MEL治疗PAH提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

36只健康成年雄性大鼠,180~220g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司;MEL购自美国Sigma公司;MCT购自湖南BioRike公司;环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)一抗购自Immunoway公司;免疫组织化学试剂盒购自湖南BioRike公司。

1.2 动物分组

按随机数表法将大鼠分为对照组、造模组(MCT)和干预组(MCT+MEL),每组12只。造模组和干预组分别按50mg/kg(2.5ml/kg)规格腹腔内注射MCT溶液(MCT溶于无水乙醇+生理盐水混合液)以制作PAH模型^[8]。对照组接受单次腹腔内注射单位等体积溶媒,即2.5ml/kg。造模后第1~28天,干预组每天予以MEL 10mg/kg(MEL溶于无水乙醇+生理盐水中,使浓度达10ml/kg)腹腔内注射1次,对照组和造模组每日予以单位等体积溶媒腹腔内注射1次。28d后到达实验终点,进行相关指标的观察与评估。

1.3 指标检测

1.3.1 平均肺动脉压及右心室肥厚指数 以

3ml/kg的剂量腹腔内注射10%水合氯醛溶液麻醉大鼠。根据参考文献[9-12]中的测压方法,测定平均肺动脉压(mean pulmonary artery pressure, mPAP)。导管测压结束后,处死大鼠,取出心脏,分离右心室(right ventricular, RV)、左心室+室间隔(left ventricular+septum, LV+S),称质量,计算右心室肥厚指数(right ventricular hypertrophy index, RVHI), $RVHI=RV/(LV+S)$ 。

1.3.2 HE染色观察肺小动脉形态学变化 取肺组织经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、展片、烤片制作石蜡切片,行HE染色。选取血管直径在50~200 μ m的肺小动脉作为观察对象。在400倍光学显微镜下从每个切片中随机选取5条肺小动脉,测量血管壁厚度(vascular wall thickness, WT)、血管外径(vascular external diameter, ED)、血管腔面积(vascular lumen area, IA)、血管总面积(total vascular area, TA),计算肺小动脉管壁厚度占血管外径的百分比(wall thickness/vascular external diameter, WT%) and 肺小动脉血管壁面积占血管总面积的百分比(vascular area/total vascular area, WA%), $WT\%=(2\times WT/ED)\times 100\%$, $WA\%=(TA-IA)/TA\times 100\%$ 。

1.3.3 免疫组织化学法检测COX-2表达 将肺组织石蜡切片经脱蜡水洗、抗原修复、血清封闭、加一抗、二抗、显色、复染、脱水、透明、封胶一系列免疫组织化学步骤后,在400倍光学显微镜下观察肺小动脉的COX-2阳性表达区域(area of interest, AOI),使用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统确定积分吸光度值(integral absorbance value, IA),并计算单位肺小动脉COX-2阳性表达面积的平均光密度值(average optical density, AOD), $AOD=IA/AOI$ 。

1.4 统计学处理

应用SPSS 22.0统计软件对数据进行分析。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析(Oneway ANOVA),有统计学意义的行SNK-q两两比较。趋势性分析采用直线相关性分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 试验终点3组大鼠存活情况

对照组全部存活,造模组于第24、26天各死亡1只,干预组于第27天死亡1只,大鼠在死亡前均有严重的呼吸困难。

2.2 3组大鼠mPAP和RVHI比较

对各组剩余大鼠进行相关指标观察。mPAP在对照组、造模组及干预组大鼠中的水平依次为

(14.30±0.82)、(27.70±2.41)和(20.30±1.89)mmHg (1mmHg=0.133kPa),RVHI水平依次为(0.219±0.031)、(0.418±0.093)和(0.297±0.033)。与对照组相比,造模组大鼠mPAP及RVHI水平均升高,差异有统计学意义(mPAP: $P<0.001$;RVHI: $P<0.001$)。与造模组相比,干预组大鼠mPAP和RVHI水平均有不同程度的降低,但仍高于对照组,差异有统计学意义(mPAP: $P<0.001$;RVHI: $P<0.001$)。

2.3 3组大鼠肺小动脉HE染色及WA%、WT%比较

对照组肺小动脉结构清晰,壁薄均匀,管腔面积大;造模组肺小动脉管壁增厚,管腔狭窄,平滑肌细胞增生、排列紊乱;干预组管壁增厚、管腔狭窄、平滑肌细胞增生情况改善,肺小动脉血管重构情况改善(图1)。WT%在对照组、造模组及干预组大鼠中的水平依次为(24.77±2.46)%、(51.25±5.87)%和(31.46±4.09)%,WA%水平依次为(30.15±4.07)%、(55.49±6.87)%和(39.87±5.11)%。与对照组相比,造模组肺小动脉WT%及WA%均增加,差异有统计学意义($P<0.001$)。与造模组相比,干预组肺小动脉WT%和WA%均显著降低,但高于对照组,差异均具有统计学意义($P<0.001$)。

2.4 3组大鼠肺组织COX-2表达比较

免疫组化结果显示肺小动脉内皮及平滑肌细胞

胞质中COX-2蛋白表达呈棕黄色,肺小动脉平滑肌细胞核呈蓝色。对照组肺小动脉未见明显COX-2蛋白表达,管壁较薄、管腔面积大;造模组肺小动脉可见大量深棕黄色COX-2蛋白表达,且管壁增厚、管腔狭窄;干预组COX-2蛋白表达减少,管壁增厚、管腔狭窄情况改善(图2)。COX-2在对照组、造模组及干预组的表达水平分别为(0.248±0.059)、(0.629±0.098)和(0.406±0.062)。相比对照组,造模组大鼠肺小动脉COX-2表达量增加,差异具有统计学意义($P<0.001$)。给予MEL干预后,相比于造模组,COX-2蛋白的表达水平显著下降,但较对照组仍相对较高,且差异均有统计学意义($P<0.001$)。

2.5 COX-2表达与mPAP、RVHI、WT%、WA%的相关性分析

大鼠肺组织中COX-2的表达水平与mPAP、RVHI、WT%及WA%呈正相关(r 分别为0.836、0.749、0.823、0.821, P 均 <0.01)。

3 讨论

近20年国内外研究者为开发有效的PAH治疗方法做了大量的努力。目前治疗PAH主要是通过影响血管收缩的病理改变,达到促进血管扩张、改善疾病症状的效果^[13]。但这些疗法不能阻止疾病的

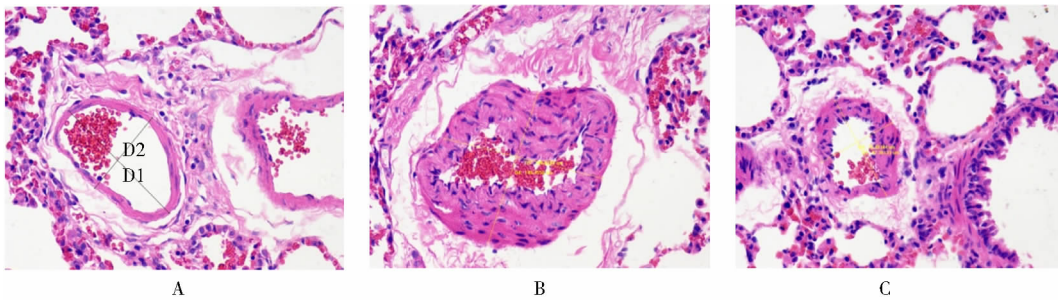


图1 各组大鼠肺小动脉形态学变化

Figure 1 Morphological change of pulmonary arterioles in rats in each group (HE ×400)

A: control group; B: model group; C: intervention group. D1: 129.7646 μm; D2: 82.43242 μm.

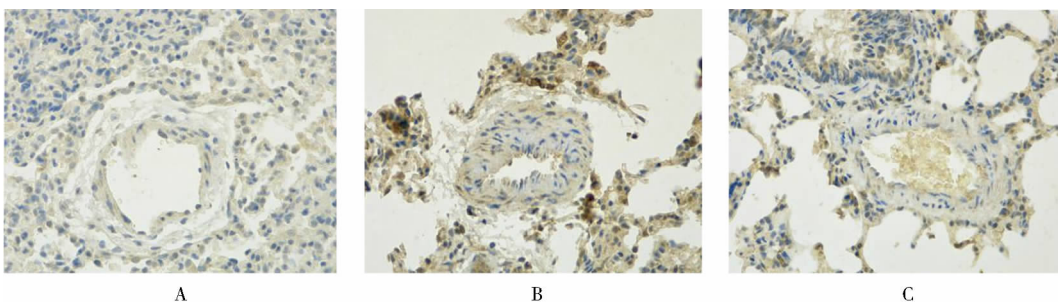


图2 各组大鼠肺组织COX-2表达情况

Figure 2 COX-2 expression in lung tissues of rats in each group (IHC ×400)

A: control group; B: model group; C: intervention group. COX-2: cyclooxygenase-2.

进展或逆转疾病进程,因大多数患者仍然死于该病或对药物治疗反应不足,导致5年生存率仅为59%,即对死亡率的影响非常有限。鉴于此,临床上迫切需要新的药物来更好地治疗PAH^[14]。研究认为,PAH发病是血管收缩、血管重塑、炎症等多种因素相互作用的结果^[15]。因此,越来越多的相关研究涉及到PAH发展的分子途径,其中炎症被认为是PAH血管重塑的重要因素^[16,17]。肺血管受损时会产生大量的炎症介质并招募炎症细胞,后者能持续性地释放包括生长因子在内的炎性细胞因子,促进肺组织中的胶原沉积、平滑肌异常增殖和肺血管收缩的重塑,从而增加肺血管阻力^[18]。

MCT诱导的PAH大鼠模型是目前最常用的PAH建模方法之一,该建模方法引起的大鼠肺组织病理改变与临床PAH相似^[18]。本研究旨在探讨MEL对MCT诱导的PAH治疗效果及对COX-2表达的影响,结果证实腹腔内注射MEL对大鼠PAH模型的形成具有显著抑制作用。有研究表明,MEL能够抑制氧化应激、减轻炎症反应和细胞凋亡^[19]。MEL在氧化应激和炎症反应中是一种强大而有效的自由基清除剂,可以通过降低氧化应激保护细胞、组织和器官免受氧化损伤,并部分逆转纤维化,且不具有毒性或诱变作用。具体机制可能为MEL作为抗氧化剂可以保护线粒体和核DNA,降低氧化应激水平,抑制肺动脉平滑肌细胞的增殖,缓解肺动脉高压^[20]。

在这项研究中,我们的结果发现MEL干预可以降低mPAP及RVHI水平,提示其对减少心肺损伤程度具有一定作用。免疫组织化学法证实肺小动脉WT%和WA%有所改善,提示肺组织炎性浸润及肺动脉平滑肌细胞增殖程度有所下降。COX-2作为一种常见的炎症介质,很少在正常上皮细胞中表达,但在发育不良细胞和癌细胞中表达量较高,尤其在炎性细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞中均存在一定程度的表达^[21]。本研究结果发现COX-2蛋白在造模组肺组织中的表达显著高于对照组,经MEL干预后,水平显著下降。相关分析发现,COX-2的表达水平与mPAP、RVHI、WT%及WA%均呈显著正相关,这些就提示,MEL可能是通过抑制炎症反应和下调COX-2表达来减弱肺血管重塑。

综上所述,MEL能够降低MCT诱导的PAH大鼠的肺动脉压,改善肺血管重塑,这可能与其能抑制肺组织中COX-2表达有关。尽管本研究只是在动物实验水平上证明了MEL治疗PAH的可行性与有效性,但至少证明了我们实验设计的有效性和MEL

对PAH保护的可靠性。首先,MEL具有靶向性强、毒性低、成本低等优点,是近年来研究的热点。其次,昂贵的医疗费用是患者临床治疗依从性差的一大主因,而PAH治疗效果有限在一定程度上可归因于药物不足。因此MEL可能是一种潜在的PAH药物,但仍需进一步研究以明确具体分子靶点介导MEL对PAH的保护作用。

【参考文献】

- [1] McLaughlin V, Bacchetta M, Badesch D, *et al.* Update on pulmonary arterial hypertension research: proceedings from a meeting of experts[J]. *Curr Med Res Opin*, 2018, 34(2): 263-273. DOI: 10.1080/03007995.2017.1404974.
- [2] Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, *et al.* Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 42(Suppl 1): 55-66. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.10.032.
- [3] Stacher E, Graham BB, Hunt JM, *et al.* Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 186(3): 261-272. DOI: 10.1164/rccm.201201-01640C.
- [4] Mercurio V, Bianco A, Campi G, *et al.* New drugs, therapeutic strategies, and future direction for the treatment of pulmonary arterial hypertension[J]. *Curr Med Chem*, 2018, 34(2): 171-175. DOI: 10.2174/0929867325666180201095743.
- [5] Onk D, Onk OA, Erol HS, *et al.* Effect of melatonin on antioxidant capacity, inflammation and apoptotic cell death in lung tissue of diabetic rats[J]. *Acta Cir Bras*, 2018, 33(4): 375-385. DOI: 10.1590/s0102-865020180040000009.
- [6] 金海峰. 葡萄籽原花青素和褪黑激素对缺氧性肺动脉高压的作用及机制研究[D]. 大连医科大学, 2016.
Jin HF. Effects and mechanism of grape seed proanthocyanidins and melatonin on hypoxic pulmonary hypertension[D]. Dalian Med Univ, 2016.
- [7] Maarman GJ. Natural antioxidants as potential therapy, and a promising role for melatonin against pulmonary hypertension[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 967: 161-178. DOI: 10.1007/978-3-319-63245-2_10.
- [8] 董丽君, 陈鹏, 程江涛. 不同剂量野百合碱诱导大鼠肺动脉高压模型的实验研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2015, 13(10): 1172-1175. DOI: 10.3969/j.issn.1672-1349.2015.10.007.
Dong LJ, Chen P, Cheng JT. Experimental study on rat pulmonary hypertension induced by different doses of monocrotaline[J]. *Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis*, 2015, 13(10): 1172-1175. DOI: 10.3969/j.issn.1672-1349.2015.10.007.
- [9] 邹丽珍, 陈马云, 黄晓颖, 等. 改良右心导管法测量大鼠肺动脉压力的实验方法研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(4): 757-762. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2014.04.033.
Zou LZ, Chen MY, Huang XY, *et al.* Experimental study on the measurement of pulmonary artery pressure in rats by modified right heart catheterization[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2014, 30(4): 757-762. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2014.04.033.

- [10] 陈传斯, 庞玉生, 马建法, 等. 右心导管法测大鼠肺动脉压力的改良[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(15): 2863-2866. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.15.015.
Chen CS, Pang YS, Ma JF, *et al.* Improvement of pulmonary artery pressure in rats by right heart catheterization[J]. Adv Mod Biomed, 2014, 14(15): 2863-2866. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.15.015.
- [11] 颜涛. 薯蓣皂苷元对大鼠肺动脉高压及 NF- κ B 表达影响的实验研究[D]. 湖南师范大学, 2016.
Yan T. Experimental study on the effect of diosgenin on pulmonary hypertension and NF- κ B expression in rats [D]. Hunan Norm Univ, 2016.
- [12] 何骑伟. 薯蓣皂苷元干预野百合碱诱导肺动脉高压大鼠实验研究[D]. 湖南师范大学, 2015.
He QW. Experimental study of diosgenin in rats with pulmonary hypertension induced by monocrotaline [D]. Hunan Norm Univ, 2015.
- [13] Shields KJ, Verdalis K, Passineau MJ, *et al.* Three-dimensional micro-computed tomography analysis of the lung vasculature and differential adipose proteomics in the sugen/hypoxia rat model of pulmonary arterial hypertension[J]. Pulm Circ, 2016, 6(4): 586-596. DOI: 10.1086/688931.
- [14] Yang JM, Zhou R, Zhang M, *et al.* Betaine attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats *via* inhibiting inflammatory response[J]. Molecules, 2018, 23(6): E1274. DOI: 10.3390/molecules23061274.
- [15] Suzuki YJ, Ibrahim YF, Shults NV. Apoptosis-based therapy to treat pulmonary arterial hypertension[J]. J Rare Dis Res Treat, 2016, 1(2): 17-24.
- [16] Wong MJ, Kantores C, Ivanovska J, *et al.* Simvastatin prevents and reverses chronic pulmonary hypertension in newborn rats *via* pleiotropic inhibition of RhoA signaling[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016, 311(5): L985-L999. DOI: 10.1152/ajplung.00345.2016.
- [17] Li J, Liang X, Zhou Y, *et al.* Role of dynorphin in hypoxic pulmonary hypertension[J]. Eur J Pharmacol, 2016, 791: 78-84. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.08.019.
- [18] 齐先梅, 王蕾, 张瑞恒, 等. MCC950 在野百合碱诱导大鼠肺动脉高压模型中的治疗作用及其机制研究[J]. 首都医科大学学报, 2018, 39(6): 871-876.
Qi XM, Wang L, Zhang RH, *et al.* Therapeutic effect and mechanism of MCC950 in the rat model of pulmonary hypertension induced by monocrotaline[J]. J Cap Univ Med Sci, 2018, 39(6): 871-876.
- [19] Wang ML, Wei CH, Wang WD, *et al.* Melatonin attenuates lung ischaemia-reperfusion injury *via* inhibition of oxidative stress and inflammation[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2018, 26(5): 761-767. DOI: 10.1093/icvts/ivx440.
- [20] Wang R, Zhou S, Wu P, *et al.* Identifying involvement of H19-miR-675-3p-IGF1R and H19-miR-200a-PDCD4 in treating pulmonary hypertension with melatonin[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2018, 13: 44-54. DOI: 10.1016/j.omtn.2018.08.015.
- [21] Karimfar MH, Rostami S, Haghani K, *et al.* Melatonin alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2015, 29(2): 327-334.

(编辑: 张美)

· 消息 ·

《中华老年多器官疾病杂志》关于录用稿件优先数字出版的启事

为缩短学术论文发表周期,提高学术成果的传播和利用价值,争取科研成果的首发权,《中华老年多器官疾病杂志》已启用优先数字出版(online first)平台。

编辑部会将已被录用并完成排版校对的论文先于印刷版在杂志网站优先数字出版。同时,印刷版一经确定卷、期、页码,将上传至网络出版平台并取代优先出版的数字版。若有作者参阅本刊优先数字出版文献并引为参考文献的,请务必在其引用格式中标注数字出版的时间和网址,以确认该文的首发权。若有不同意优先数字出版的作者,请投稿时特别说明。

地址: 100853 北京市复兴路 28 号,《中华老年多器官疾病杂志》编辑部

电话: 010-66936756

网址: www.mode301.cn

E-mail: zhldnqg@mode301.cn