

· 实验研究 ·

高肺血流性肺动脉高压大鼠肾上腺髓质素前体 N 端 20 肽的变化

齐建光¹, 李晓惠¹, 丁亚光¹, 唐朝枢^{2,3}, 杜军保^{1,3}

(1. 北京大学第一医院儿科, 北京 100034; 2. 北京大学第一医院心血管病研究所, 北京 100034;
3. 教育部分子心血管病学重点实验室, 北京 100083)

〔摘要〕 目的 高肺血流性肺动脉高压的形成机制至今尚未完全阐明。该实验通过研究高肺血流性肺动脉高压大鼠肺组织肾上腺髓质素前体 N 端 20 肽(PAMP)表达以及血浆 PAMP 含量的变化,探讨 PAMP 在高肺血流性肺动脉高压形成中的作用。**方法** 16 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组和分流组,每组各 8 只。对分流组大鼠行腹主动脉-下腔静脉分流术。11 周后,以右心导管法测定肺动脉收缩压(sPAP)、肺动脉舒张压(dPAP)和肺动脉平均压(mPAP),观察肺动脉超微结构的变化。并且以放射免疫法测定血浆中 PAMP 含量,以免疫组织化学法检测肺组织中 PAMP 表达。**结果** 分流组大鼠 sPAP、dPAP 和 mPAP 均明显高于对照组(均 $P < 0.01$)。电镜下,肺腺泡内动脉内皮细胞增生、肿胀,内弹力层不规则,平滑肌细胞肥厚、向合成表型转化。并且分流组大鼠血浆 PAMP 含量明显高于对照组($P < 0.01$),肺动脉内皮细胞和平滑肌细胞 PAMP 表达明显增强。**结论** 肺动脉和血浆 PAMP 表达的上调可能参与了高肺血流性肺动脉高压的形成。 [中国当代儿科杂志,2007,9(6):574-576]

〔关键词〕 肾上腺髓质素前体 N 端 20 肽;肾上腺髓质素;高血压,肺性;左向右分流;大鼠

〔中图分类号〕 R-332 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1008-8830(2007)06-0574-03

Alterations of proadrenomedullin N-terminal 20-peptide in rats with pulmonary hypertension induced by high pulmonary blood flow

QI Jian-Guang, LI Xiao-Hui, DING Ya-Guang, TANG Chao-Shu, DU Jun-Bao. Department of Pediatrics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China (Email: qijianguang@sohu.com)

Abstract: Objective The mechanism of high pulmonary blood flow-induced pulmonary hypertension remains unclear. The aim of this study was to explore the effect of proadrenomedullin N-terminal 20-peptide (PAMP) on pulmonary hypertension, through examining the alterations of pulmonary PAMP expression and plasma PAMP concentration in rats with pulmonary hypertension induced by high pulmonary blood flow. **Methods** Sixteen male Sprague-Dawley rats were randomly divided into control ($n=8$) and shunt groups ($n=8$). Aortocaval shunting was produced in the shunt group. After 11 weeks of shunting, systolic pulmonary artery pressure (sPAP), diastolic pulmonary artery pressure (dPAP) and mean pulmonary artery pressure (mPAP) were evaluated by using a right cardiac catheterization procedure. The ultrastructural changes in intra-acinar pulmonary arteries were observed. The concentration of plasma PAMP was measured by radioimmunoassay. The expression of PAMP in pulmonary arteries was detected by immunohistochemical assay. **Results** sPAP, dPAP and mPAP were significantly increased in shunt rats compared with controls ($P < 0.01$). Ultrastructural changes, such as hyperplasia and swelling of endothelial cells, irregularity of internal elastic lamina, and hypertrophy and increased number of synthetic phenotype of smooth muscle cells, were found in intra-acinar pulmonary muscularized arteries in the shunt group. Plasma PAMP concentration (616 ± 195 pg/mL vs 427 ± 90 pg/mL) and PAMP expression in endothelial cells (0.62 ± 0.09 vs 0.38 ± 0.12) and in smooth muscle cells (0.24 ± 0.07 vs 0.14 ± 0.05) of pulmonary arteries increased significantly in the shunt group compared with controls. **Conclusions** The up-regulation of pulmonary and plasma PAMP expression might be involved in the development of high pulmonary blood flow-induced pulmonary hypertension. [Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9 (6):574-576]

Key words: Proadrenomedullin N-terminal 20-peptide; Adrenomedullin; Hypertension, pulmonary; Left to right shunt; Rats

肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)和肾上腺髓质素前体 N 端 20 肽(proadrenomedullin-N-20-peptide, PAMP)来源于同一基因编码的肾上腺髓质素前体原(preproadrenomedullin, preproADM),具有

[收稿日期]2007-08-04;[修回日期]2007-09-18
[基金项目]国家自然科学基金(30300376),国家杰出青年科学基金(30425010),国家自然科学基金重点项目(30630031),国家重点基础研究发展规划项目基金(2006CB503807)资助项目。
[作者简介]齐建光,女,博士,副主任医师。主攻方向:肺动脉高压发病机制的研究。
[通讯作者]杜军保,教授,北京大学第一医院儿科,邮编:100034。

相似但是各自独立的生物学效应,均能够舒张血管、降低血压和抑制血管平滑肌细胞增殖,但是 PAMP 作用弱于 ADM^[1]。国外研究显示先天性心脏病合并肺动脉高压患者血浆中 ADM 水平升高^[2,3],提示 ADM 可能参与了高肺血流性肺动脉高压的形成。然而关于 preproADM 水解产生的另一肽段 PAMP 是否也参与了高肺血流性肺动脉高压的形成至今尚无研究报道。本实验通过研究高肺血流性肺动脉高压大鼠肺组织 PAMP 表达以及血浆 PAMP 含量的变化,探讨 PAMP 在高肺血流性肺动脉高压形成中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验分组及动物模型建立

雄性 SD 大鼠 16 只,购自北京大学第一医院动物实验中心,体重 120 ~ 140 g,随机分为分流组和对照组,每组各 8 只。分流组大鼠经 10% 水合氯醛(0.2 ~ 0.4 mL/100 g)腹腔内注射麻醉后,行腹主动脉-下腔静脉分流术。若观察到下腔静脉内有鲜红的动脉血流动并伴血管波动,说明分流手术成功^[4]。对照组大鼠仅开腹后暴露腹主动脉和下腔静脉,不作动静脉间的穿刺。两组大鼠饲养条件相同,共饲养 11 周。

1.2 肺动脉压力测定

11 周后以右心导管法测量记录肺动脉收缩压(systolic pulmonary artery pressure, sPAP)、肺动脉舒张压(diastolic pulmonary artery pressure, dPAP)和肺动脉平均压(mean pulmonary artery pressure, mPAP)^[4]。

1.3 肺血管超微结构的观察

大鼠开胸后,取相同部位新鲜肺组织切为 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小固定于 3 % 戊二醛溶液,再用 1 % 锇酸后固定,梯度酒精脱水后 Epon 812 包埋。半薄切片甲苯胺蓝染色后定位与呼吸性细支气管以下伴行的肺腺泡内动脉行超薄切片,超薄切片经醋酸铀及枸橼酸铅双染色后在 J EM-100CX II 透射电子显微镜(日本电子显微公司)下观察肺动脉超微结构变化。

1.4 血浆 PAMP 含量测定

自大鼠颈总动脉采血 5 mL 加入 10% EDTA 和抑肽酶混匀,3 000 r/min 低温离心 10 min,取上清液,按放免试剂盒(购自美国 Phoenixpeptide 公司)说明书操作。

1.5 肺组织 PAMP 免疫组化分析

采用过氧化物酶标记链霉卵白素染色法(SP

法)。肺组织石蜡切片 60℃ 烤片 1 h,二甲苯梯度乙醇脱蜡入水,3% H₂O₂ 乙醇封闭内源性过氧化物酶活性后置枸橼酸缓冲液中,微波修复抗原 10 min,加入兔抗鼠 PAMP(购自美国 Phoenixpeptide 公司,稀释度为 1: 400) 4℃ 孵育过夜。加二抗和三抗后分别在室温下孵育 30 min, DAB 显色,苏木素复染。光镜下,棕黄色沉淀为阳性信号。用半定量方法对肺动脉 PAMP 表达进行分析^[5],每个样品至少检测 10 条,将其反应强度分为 3 个等级:肺动脉平滑肌细胞或内皮细胞无 PAMP 蛋白表达者为(-);肺动脉 1% ~ 50% 平滑肌细胞或内皮细胞 PAMP 呈现阳性表达者为(+);肺动脉 51% ~ 100% 平滑肌细胞或内皮细胞 PAMP 呈现阳性表达者为(++)。为便于理解和统计学处理,将肺动脉 PAMP 表达用积分值表示,即以不同表达强度的肺动脉百分比乘以反应强度加权值(“-”者,反应强度加权值为 0;“+”者,反应强度加权值为 0.5;“++”者,反应强度加权值为 1)。

1.6 统计学处理

实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 10.0 统计软件采用独立样本 *t* 检验对两组间差异进行显著性检验。

2 结果

2.1 肺动脉压力的变化

分流 11 周后,分流组大鼠 sPAP 比对照组升高 49.3%, dPAP 升高 64.8%, mPAP 升高 60.8% (均 *P* < 0.01),见表 1。

表 1 肺动脉压力的变化 ($\bar{x} \pm s$, mmHg)

组别	例数	肺动脉收缩压	肺动脉舒张压	肺动脉平均压
对照组	8	26.5 ± 3.2	12.6 ± 4.5	19.7 ± 4.3
分流组	8	39.6 ± 5.3	20.8 ± 5.4	31.7 ± 4.2
<i>t</i>		5.92	3.28	5.68
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01

2.2 肺血管超微结构的变化

对照组大鼠肺动脉内皮细胞胞体扁平,内衬血管内壁,结构正常;内弹力层均匀一致;平滑肌细胞胞浆被大量肌丝占据,并见许多致密斑,呈收缩表型。分流组大鼠肺动脉内皮细胞增生、肿胀、变性、脱落;内弹力层不规则、厚薄不均;平滑肌细胞体积增大、垂直排列,呈合成表型。

2.3 血浆 PAMP 含量和肺动脉 PAMP 表达的变化

分流组大鼠血浆 PAMP 含量较对照组升高 44.3% (*P* < 0.05);分流组大鼠肺动脉内皮细胞

PAMP 表达积分值明显高于对照组 ($P < 0.01$); 而肺动脉平滑肌细胞 PAMP 表达积分值也明显高于对照组 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 血浆 PAMP 含量和肺动脉 PAMP 表达的变化
($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	血浆 PAMP 含量	肺动脉 PAMP 表达积分	
		(pg/mL)	内皮细胞	平滑肌细胞
对照组	8	427 ± 90	0.38 ± 0.12	0.14 ± 0.05
分流组	8	616 ± 195	0.62 ± 0.09	0.24 ± 0.07
<i>t</i>		2.49	4.40	3.02
<i>P</i>		<0.05	<0.01	<0.01

3 讨论

高肺血流性肺动脉高压是左向右分流型先天性心脏病常见的合并症,其严重程度影响患者外科手术时机的选择和术后的生存质量。高肺血流性肺动脉高压的形成机制至今尚未完全阐明,血管活性物质合成和分泌的失衡可能参与了其发生。ADM 是 1993 年在人嗜铬细胞瘤中发现的一种血管活性多肽,来源于其基因编码的前体原 preproADM,具有舒张血管、抑制血管平滑肌细胞迁移和增殖及排钾、利尿等重要作用^[1]。研究证实^[6], preproADM 在体内经内源性肽酶的作用可以降解产生 4 个不同的活性肽段: PAMP (preproADM22-41), prepro ADM45-92, ADM (preproADM95-146) 和肾上腺加压素 (preproADM153-185)。PAMP 由 Kuwasako 等^[7]从人的嗜铬细胞瘤组织中纯化发现,广泛分布于多种器官和组织,具有较弱的舒张血管和降低血压的作用。与 ADM 主要通过激活环磷酸腺苷 (cAMP) 舒张血管的机制不同,PAMP 不影响细胞内 cAMP 的水平,而可能通过抑制交感神经末梢去甲肾上腺素的释放,发挥其舒张血管的作用^[8]。PAMP 不仅是一种循环激素,也是血管壁细胞旁分泌/自分泌因子,参与了包括高血压在内的多种疾病病理生理的发生发展^[9]。

动物实验和临床试验均显示,静脉注射 ADM 以及雾化吸入 ADM 都能够降低肺动脉压力。我们新近的研究显示^[10],通过微量渗透泵外源性长期应用 ADM,能够缓解低氧性肺动脉高压和肺血管结构重建的形成。提示 ADM 对于肺动脉高压具有重要的调节作用。已有研究发现^[2,3],先天性心脏病合并肺动脉高压患者血浆中 ADM 水平升高,提示 ADM 可能参与了高肺血流性肺动脉高压的形成。由 preproADM 在体内降解产生的另外一种活性肽

段 PAMP,在高肺血流性肺动脉高压形成时的变化如何,PAMP 是否也参与了高肺血流性肺动脉高压的形成至今尚无研究报道。我们对此进行了研究,结果显示,在高肺血流性肺动脉高压和肺血管结构重建形成的同时,肺动脉 PAMP 表达和血浆 PAMP 含量也明显上调,提示 PAMP 与高肺血流性肺动脉高压的形成密切相关,PAMP 的上调可能是机体和肺组织对于分流刺激的一种代偿性反应。

关于高肺血流性肺动脉高压时 PAMP 上调的分子机制以及 PAMP 对于高肺血流性肺动脉高压形成的作用及其机制尚有待于进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Beltowski J, Jamroz A. Adrenomedullin-What do we know 10 years since its discovery? [J]. Pol J Pharmacol, 2004, 56(1): 5-27.

[2] 朱晓波,王一彪,郝芳之,张兆华,陈书杰. 肾上腺髓质素在先天性心脏病中的测定及临床意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(2): 90-92.

[3] Lu H, Chen S, Wang H, Cheng P. Role of adrenomedullin in congenital heart disease associated with pulmonary hypertension [J]. J Huazhong Univ Sci Technol (Med Sci), 2003, 23(3): 275-277.

[4] 齐建光,杜军保,李简,汤秀英,魏冰,唐朝枢. 高肺血流量所致肺动脉高压大鼠肺血管结构和气体信使分子的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(12): 1457-1461.

[5] Qi JG, Du JB, Tang XY, Li J, Wei B, Tang CS. The upregulation of endothelial nitric oxide synthase and urotensin-II is associated with pulmonary hypertension and vascular diseases in rats produced by aortocaval shunting[J]. Heart Vessels, 2004, 19(2): 81-88.

[6] Qi YF, Bu DF, Niu DD, Shi YR, Wang SH, Pang YZ, et al. Effects of different peptide fragments derived from proadrenomedullin on gene expression of adrenomedullin gene [J]. Peptides, 2002, 23(6): 1141-1147.

[7] Kuwasako K, Kitamura K, Ichiki Y, Kato J, Kangawa K, Matsuo H, et al. Human proadrenomedullin N-terminal 20 peptide in pheochromocytoma and normal adrenal medulla [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 211(2): 694-699.

[8] Eto T. A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides [J]. Peptides, 2001, 22(11): 1693-1711.

[9] 石湘芸,苏加林,费宇行,马健,吴旭辉,朱智明,等. 肾上腺髓质素前体 N 端 20 肽在血压调节中的作用[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2000, 16(2): 118-120.

[10] Qi JG, Ding YG, Tang CS, Du JB. Chronic administration of adrenomedullin attenuates hypoxic pulmonary vascular structural remodeling and inhibits proadrenomedullin N-terminal 20-peptide production in rats[J]. Peptides, 2007 28(4): 910-919.

(本文编辑:吉耕中)