

论著 · 实验研究

肾上腺髓质素缓解低氧性肺动脉高压大鼠肺动脉中胶原堆积的研究

齐建光¹ 邢长青² 丁亚光¹ 杜军保¹

(1. 北京大学第一医院儿科, 北京 100034; 2. 河北北方学院附属第二医院儿科, 河北 张家口 075100)

[摘要] **目的** 观察长期应用肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)对慢性低氧性肺动脉高压大鼠肺血管胶原代谢的影响,以探讨ADM对慢性低氧性肺血管结构重建的作用及其可能机制。**方法** 19只雄性Wistar大鼠随机分为对照组($n=6$)、低氧组($n=7$)、低氧+ADM组($n=6$)。对于低氧+ADM组大鼠,通过微量渗透泵皮下持续给予ADM(300 ng/h)2周。低氧2周后,以右心导管法测定肺动脉平均压,检测右心室与左心室加室间隔比值,观测肺血管显微变化。用免疫组化法检测肺动脉中胶原I、胶原III和转化生长因子(TGF)- β 的表达。**结果** 低氧2周后,大鼠肺动脉平均压明显升高($P<0.01$),右心室与左心室加室间隔的比值明显增加($P<0.01$),肺小血管肌化程度和肺动脉相对中膜厚度较对照组均明显增高($P<0.01$),同时肺动脉胶原I、胶原III和TGF- β 表达增强。与低氧组大鼠相比,低氧+ADM组大鼠肺动脉平均压明显降低($P<0.01$),右心室与左心室加室间隔的比值明显下降($P<0.01$),肺小血管肌化程度和肺动脉相对中膜厚度较低氧组均明显降低(均 $P<0.01$),同时肺动脉胶原I、胶原III和TGF- β 表达减弱。**结论** 外源性补充ADM可能通过抑制肺动脉TGF- β 表达,减少肺动脉壁胶原异常堆积,对低氧性肺动脉高压和肺血管结构重建发挥调节作用。 [中国当代儿科杂志,2012,14(1):54-58]

[关键词] 肾上腺髓质素; 肺性高血压; 低氧; 胶原; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)01-0054-05

Adrenomedullin alleviates collagen accumulation in pulmonary arteries of rats with hypoxic pulmonary hypertenison

QI Jian-Guang, XING Chang-Qing, DING Ya-Guang, DU Jun-Bao. Department of Pediatrics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China (Email: qijianguang@sohu.com)

Abstract: Objective To observe the effect of adrenomedullin (ADM) on the pulmonary vascular collagen metabolism in hypoxic rats in order to study the effect of ADM on chronic hypoxic pulmonary vascular structural remodeling and its possible mechanism. **Methods** Nineteen male Wistar rats were randomly divided into three groups: normal control ($n=6$), hypoxia ($n=7$) and ADM-treated hypoxia ($n=6$). ADM was subcutaneously administered into rats of the ADM-treated hypoxia group by mini-osmotic pump (300 ng/h) for two weeks. After two weeks of hypoxic challenge, mean pulmonary arterial pressure (mPAP) was evaluated using a right cardiac catheterization procedure. The ratio of right ventricular mass to left ventricular plus septal mass [RV/(LV+S)] was measured. The changes of pulmonary vascular microstructure were observed. Meanwhile, the expression levels of collagen I, collagen III and transforming growth factor (TGF)- β in pulmonary arteries were detected by immunohistochemical assay. **Results** mPAP and RV/(LV+S) increased significantly in the hypoxia group compared with normal controls ($P<0.01$). The muscularization of small pulmonary vessels and the relative medial thickness of pulmonary arteries increased obviously in the hypoxia group compared with those in the normal control group ($P<0.01$). Meanwhile, the expression levels of collagen I, collagen III and TGF- β of pulmonary arteries in the hypoxia group increased markedly compared with those in the normal control group. However, mPAP and RV/(LV+S) were significantly reduced in the ADM-treated hypoxia group compared with those in the hypoxia group ($P<0.01$). ADM ameliorated pulmonary vascular structural remodeling of hypoxic rats, with a decrease in the expression of collagen I, collagen III and TGF- β of pulmonary arteries. **Conclusions** ADM might play a regulatory role in the development of hypoxic pulmonary hypertension and hypoxic pulmonary vascular remodeling, through inhibiting the expression of TGF- β and alleviating the collagen accumulation of pulmonary arteries.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14 (1):54-58]

Key words: Adrenomedullin; Pulmonary hypertension; Hypoxia; Collagen; Rats

[收稿日期]2011-09-05;[修回日期]2011-10-19
[基金项目]国家自然科学基金资助项目(30300376,30973226)。
[作者简介]齐建光,女,博士,副主任医师。

肺动脉高压是众多心肺血管疾病发生发展过程中的重要病理生理环节,肺血管结构重建是低氧性肺动脉高压形成中的重要病理基础^[1]。胶原作为细胞外基质的重要组成部分,在肺血管结构重建过程中发挥了极其重要的作用^[2-3]。目前低氧性肺动脉高压和肺血管结构重建的发生机制仍未完全阐明。以往研究显示肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)在低氧性肺动脉高压形成中发挥重要保护作用,能够降低肺动脉高压,缓解肺血管结构重建^[4-7],但其对细胞外基质重构是否有作用尚不清楚。本研究通过皮下埋放微量渗透泵的方法持续给予低氧大鼠ADM,观察长期应用ADM对慢性低氧性肺动脉高压大鼠肺血管胶原代谢的影响,探讨ADM对慢性低氧性肺血管结构重建的作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

雄性Wistar大鼠19只(购自北京大学第一医院实验动物中心),体重130~150 g,随机分为正常对照组($n=6$)、低氧组($n=7$)和低氧+ADM组($n=6$)。

1.2 试剂与材料

ADM购自美国Phoenix Pharmaceuticals公司,微量渗透泵(2002型)购自美国Alza公司,一抗兔抗大鼠胶原I、III和转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 购自中杉金桥生物技术有限公司,山羊抗兔IgG抗体购自华利泰森生物科技有限公司。

1.3 动物模型的制备

将低氧组和低氧+ADM组大鼠置于自制常压低氧舱内,将高纯氮气(浓度95%,普莱克斯气体公司)通入低氧舱,与舱体缝隙透入的空气混合,依据氧监测仪对舱内氧浓度进行实时监测,通过电磁阀和减压阀对舱内氧浓度进行调控,保持舱内氧浓度为 $(10.0 \pm 0.5)\%$,用无水氯化钙吸收水分,钠石灰吸收二氧化碳^[8],每天低氧处理8 h,持续2周。对低氧+ADM组大鼠在开始低氧处理前1 d,将大鼠ADM溶于200 μ L生理盐水后注入微量渗透泵,于鼠背部皮下作一长约1 cm的切口,将泵置入皮下,泵开口朝向鼠背前方,持续皮下给药2周,剂量为300 ng/h。各组大鼠的常规饲养与饮食条件相同。

1.4 实验方法及指标测定

1.4.1 血流动力学指标的测定 模型制作两周后以右心导管法测量肺动脉压力。大鼠腹腔注射10%水合氯醛(0.2 g/kg)麻醉后,将聚乙烯导管插

入右颈外静脉,经上腔静脉、右心房和右心室直至肺动脉,另一端经压力传感器与生理多道仪(成都泰盟电子产品公司)BL-410生物机能试验系统相连,描记肺动脉压力曲线,测定肺动脉平均压(mean pulmonary arterial pressure, mPAP)。游离大鼠心脏后,剪去左、右心房及脂肪、血管等组织,将右心室(right ventricular free wall, RV)与左心室(left ventricular free wall, LV)和室间隔(septum, S)剥离,用滤纸吸干水分后称重,计算RV/(LV+S)比值,为右心室肥厚的指标。

1.4.2 肺血管形态学指标的检测 取一侧肺叶以甲醛缓冲液固定,常规行石蜡切片。以Hart's改良法行弹力纤维染色, Van Gieson复染。在400倍光镜下,观察并计数整个切片的肺小血管(外径15~49 μ m)中肌型动脉、部分肌型动脉及非肌型血管的数目,分别计算它们各占肺小血管总数的百分比。肌型动脉在光镜下具有完整的内外两层弹力层;部分肌型动脉在光镜下具有完整的外弹力层,但内弹力层不完整;非肌型血管在光镜下仅有一层弹力层。依照本课题组既往的方法^[9],应用CMIAS图像处理与分析系统计算不同切面角度及处于不同舒缩状态的血管之相对中膜厚度。每只大鼠分别测量10~20条肺中型(外径50~150 μ m)和小型(外径15~49 μ m)肌型动脉,计算其RMT,并求其均值。

1.4.3 肺动脉胶原I蛋白的表达 采用二步法免疫组织化学方法进行检测。肺组织石蜡切片常规二甲苯梯度乙醇脱蜡至水,3%过氧化氢处理12 min用以封闭内源性过氧化物酶,PBS洗3 min $\times$ 3次,胃蛋白酶37℃处理20 min行抗原修复,PBS洗3 min $\times$ 3次,山羊血清孵育30 min行抗原封闭,加入1:300稀释的兔抗大鼠胶原14℃孵育过夜。37℃复温1 h后,PBS洗3 min $\times$ 3次,加入山羊抗兔IgG抗体37℃孵育1 h,PBS洗3 min $\times$ 3次,DAB显色,脱水透明。胶原I表达的阳性信号呈棕黄色。以PBS代替一抗,其余步骤相同,作为阴性对照。应用LeicaQ550cw图像采集及分析系统通过计算单位面积血管平均光密度值检测胶原I的表达强度,光密度值越大代表表达强度越强。每只大鼠检测肺腺泡水平肺动脉8~12条,并取其均值。

1.4.4 肺动脉胶原III蛋白的表达 采用二步法免疫组织化学方法,方法同上,一抗胶原III滴度1:200。结果判断同上。

1.4.5 肺动脉TGF- β 的表达 采用二步法免疫组织化学方法,方法同上,一抗TGF- β 滴度1:100。结果判断同上。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析对组间差异进行统计学比较分析,两两之间的比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血流动力学指标的变化

低氧组大鼠 mPAP 和 RV/(LV + S)较对照组均明显增高(均 $P < 0.01$);低氧 + ADM 组大鼠 mPAP 和 RV/(LV + S)较低氧组均明显降低(均 $P < 0.01$),与对照组比较差异无统计学意义。见表 1。

表 1 3 组大鼠血流动力学指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	鼠数	mPAP (mm Hg)	RV/(LV + S)
对照组	6	13.9 ± 2.3	0.182 ± 0.008
低氧组	7	24.7 ± 6.2 ^a	0.316 ± 0.049 ^a
低氧 + ADM 组	6	14.8 ± 3.3 ^b	0.184 ± 0.012 ^b
F 值		12	40
P 值		<0.01	<0.01

a:与对照组比较, $P < 0.01$; b:与低氧组比较, $P < 0.01$

2.2 肺血管显微形态学指标的变化

低氧组大鼠肺小血管中肌型动脉百分比较对照组明显升高($P < 0.01$),而非肌型血管百分比较对照组明显降低($P < 0.01$)。低氧 + ADM

组大鼠肺小血管中肌型动脉百分比较低氧组明显降低($P < 0.01$),而非肌型血管百分比较低氧组明显升高($P < 0.01$),与对照组比较差异均无统计学意义。见表 2。

低氧组大鼠中型和小型肺动脉相对中膜厚度较对照组均明显增加(均 $P < 0.01$)。低氧 + ADM 组大鼠中型和小型肺动脉相对中膜厚度较低氧组均明显降低(均 $P < 0.01$),与对照组比较差异均无统计学意义。见表 2。

表 2 3 组大鼠肺血管显微形态学指标的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)						
组别	例数	三型肺小血管百分比			相对中膜厚度	
		肌型动脉	部分肌型动脉	非肌型血管	中型肺动脉	小型肺动脉
对照组	6	17 ± 5	21 ± 5	62 ± 4	15.1 ± 2.6	10.0 ± 0.8
低氧组	7	43 ± 6 ^a	17 ± 4	41 ± 6 ^a	29.5 ± 1.5 ^a	14.1 ± 2.1 ^a
低氧 + ADM 组	6	19 ± 4 ^b	17 ± 4	65 ± 7 ^b	19.5 ± 1.4 ^b	9.2 ± 1.2 ^b
F 值		54	1.2	43	101	20
P 值		<0.01	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

a:与对照组比较, $P < 0.01$; b:与低氧组比较, $P < 0.01$

2.3 肺动脉胶原 I 表达的变化

3 组大鼠肺动脉壁均有不同程度的棕黄色阳性表达,主要在中外膜。低氧组大鼠肺动脉胶原 I 表达较对照组明显增强($P < 0.01$),而 ADM 使低氧大鼠肺动脉胶原 I 表达强度明显减弱($P < 0.01$)。见表 3,图 1。

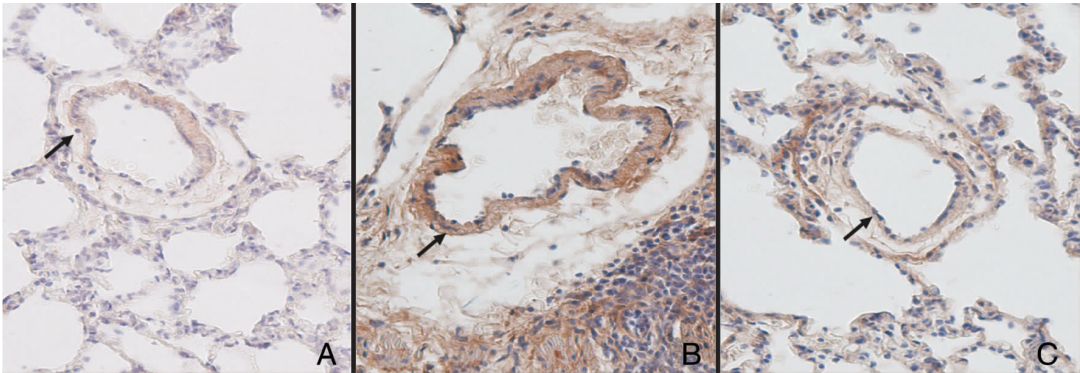


图 1 肺动脉胶原 I 表达的免疫组织化学染色(DAB, ×400) A:对照组; B:低氧组; C:低氧 + ADM 组。肺动脉中外膜呈现不同程度的棕黄色阳性表达,如箭头所示。与对照组相比,低氧组大鼠肺动脉胶原 I 表达增强,而低氧 + ADM 组大鼠肺动脉胶原 I 表达较低氧组减弱。

2.4 肺动脉胶原 III 表达的变化

3 组大鼠肺动脉壁均有不同程度的棕黄色阳性表达,主要在中外膜。低氧组大鼠肺动脉胶原 III 表

达较对照组明显增强($P < 0.01$),而 ADM 使低氧大鼠肺动脉胶原 III 表达强度明显减弱($P < 0.01$)。见表 3,图 2。

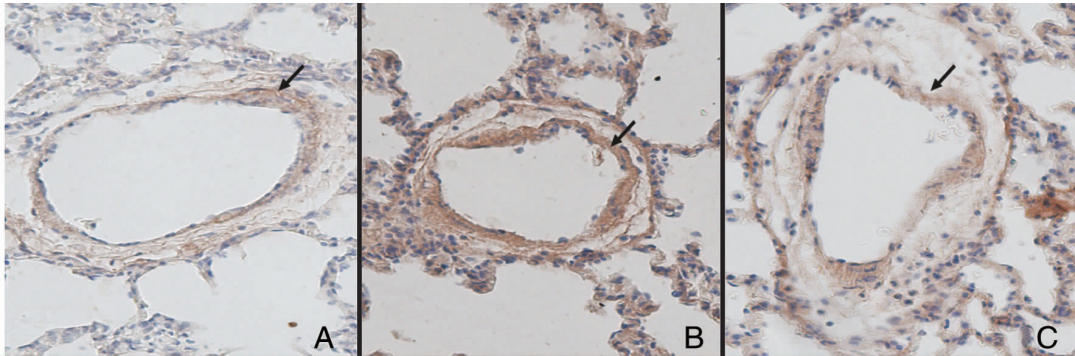


图 2 肺动脉胶原Ⅲ表达的免疫组织化学染色 (DAB, ×400) A:对照组; B:低氧组; C:低氧 + ADM 组。肺动脉中外膜呈现不同程度的棕黄色阳性表达,如箭头所示。与对照组相比,低氧组大鼠肺动脉胶原Ⅲ表达增强,而低氧 + ADM 组大鼠肺动脉胶原Ⅲ表达较低氧组减弱。

2.5 肺动脉 TGF-β 表达的变化

低氧组大鼠肺动脉 TGF-β 表达较对照组明显增强 ($P < 0.01$),而 ADM 使低氧大鼠肺动脉 TGF-β 表达强度明显减弱 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 3 组大鼠肺动脉胶原 I、胶原 III 和 TGF-β 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	例数	胶原 I 表达强度	胶原 III 表达强度	TGF-β 表达强度
对照组	6	0.212 ± 0.007	0.203 ± 0.007	0.206 ± 0.006
低氧组	7	0.299 ± 0.004 ^a	0.267 ± 0.015 ^a	0.285 ± 0.011 ^a
低氧 + ADM 组	6	0.209 ± 0.004 ^b	0.208 ± 0.007 ^b	0.212 ± 0.009 ^b
F 值		152	71	98
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与低氧组比较, $P < 0.01$

3 讨论

低氧性肺血管结构重建是肺动脉高压形成中重要的病理基础,其主要特征包括肺动脉内皮细胞增生、肿胀,中膜平滑肌细胞增生、肥大和向合成表型转化,以及细胞外基质的异常沉积^[1]。胶原是细胞外基质主要组成部分,胶原的增生、沉积在肺血管结构重建和肺动脉高压的发生发展中发挥了重要而又直接的作用^[2]。肺血管壁的主要胶原成分是 I 型和 III 型胶原, I 型胶原与血管壁的韧性和抗张力有关, III 型胶原与血管壁的弹性有关^[3]。本研究结果提示大鼠低氧 2 周以后肺动脉压力明显增高,右室肥厚程度增加,肺小血管肌化程度明显增强,肺动脉相对中膜厚度明显增加,提示肺血管结构发生重构,肺动脉高压形成,同时肺动脉中胶原 I 和胶原 III 的表达明显增强,提示胶原堆积在低氧性肺血管结构重塑中发挥重要作用。胶原的堆积将导致肺动脉管

壁增厚,管腔变小,血管顺应性下降,促进肺动脉高压的形成。

目前关于低氧性肺动脉高压和肺血管结构重建的形成机制尚未完全清楚,众多的血管活性物质可能参与了其发生机制^[1,9]。ADM 是 1993 年在人嗜铬细胞瘤中发现的一种血管活性多肽,具有舒张血管、抑制血管平滑肌细胞迁移和增殖以及排钾、利尿等重要作用^[10]。研究发现,低氧性肺动脉高压时 ADM 基因表达和合成分泌上调,并且与肺动脉高压的程度成正比^[11]。本课题组既往的研究^[4]以及国内外众多研究^[5-6]显示外源性 ADM 能够缓解低氧性肺血管结构重建和肺动脉高压的形成。但是 ADM 对于低氧性肺动脉高压时肺血管胶原堆积的影响尚无报道。本研究中,给予低氧大鼠外源性 ADM,结果发现 ADM 明显缓解了低氧大鼠肺动脉中胶原 I 和胶原 III 的表达,提示 ADM 可能通过抑制肺动脉胶原异常堆积参与对低氧性肺血管结构重建和肺动脉高压的调节作用。

目前肺动脉高压时引起肺动脉胶原堆积的原因还不完全清楚。血管壁过多的胶原主要来自中膜平滑肌细胞和外膜成纤维细胞。TGF-β 为调控合成胶原蛋白等结缔组织成分的重要细胞因子,可直接刺激平滑肌细胞和成纤维细胞合成胶原蛋白等细胞外基质成分^[12]。它主要作用于胶原的转录和翻译过程,能导致前胶原 mRNA 产生,从而促进胶原蛋白的形成和沉积。胶原堆积除了胶原生成增加的因素以外,还与胶原降解减少有关,胶原的降解主要与基质金属蛋白酶/组织型金属蛋白酶抑制物有关。TGF-β 除了影响胶原合成以外,还能够通过调节基质金属蛋白酶/组织型金属蛋白酶抑制物的表达,抑制胶原蛋白的降解,导致细胞外基质的沉积^[13]。研究显示肺动脉高压时肺动脉 TGF-β 表达增强^[14]。

本研究结果也显示在低氧性肺动脉高压大鼠肺动脉胶原堆积的同时,肺动脉 TGF- β 表达明显增强。提示 TGF- β 可能参与了肺动脉高压时的胶原重塑机制。那么 TGF- β 是否也参与了 ADM 对低氧大鼠肺动脉胶原异常堆积的调节机制,目前尚不清楚。本研究结果显示,ADM 在缓解低氧性肺动脉高压大鼠肺动脉胶原堆积的同时,也抑制了肺动脉 TGF- β 的表达,提示 ADM 可能通过抑制肺动脉 TGF- β 的表达,缓解肺动脉胶原堆积,发挥对低氧性肺动脉高压和肺血管结构重建的调节作用。这为临床防治低氧性肺动脉高压提供了新的思路和靶点。

[参 考 文 献]

[1] 杜军保,唐朝枢. 肺动脉高压[M]. 北京:北京大学医学出版社,2010:27-119.

[2] 梁晨,金红芳,杜淑旭,杜军保. 野百合碱诱导肺动脉高压大鼠肺动脉 I 型胶原的变化[J]. 实用儿科临床杂志,2010, 25 (1):18-20.

[3] Ooi CY, Wang Z, Tabima DM, Eickhoff JC, Chesler NC. The role of collagen in extralobar pulmonary artery stiffening in response to hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 299(6): H1823-H1831.

[4] 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.

[5] Murakami S, Kimura H, Kangawa K, Nagaya N. Physiological significance and therapeutic potential of adrenomedullin in pulmonary hypertension[J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2006, 6(2): 125-132.

[6] Matsui H, Shimosawa T, Itakura K, Xing GQ, Ando K, Fujita T. Adrenomedullin can protect against pulmonary vascular remodeling induced by hypoxia [J]. Circulation, 2004, 109 (18): 2246-2251.

[7] 齐建光,李晓惠,丁亚光,唐朝枢,杜军保. 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[J]. 中国当代儿科杂志,2007,9(6): 574-576.

[8] 薛全福,谢剑鸣,胡长贵,邵茂刚,李长城. 常压缺氧性大鼠肺动脉高压模型的建立[J]. 中华结核和呼吸杂志,1989, 12 (6):350-351.

[9] 田悦,杜军保. 低氧性肺动脉高压发生机制中气体信号分子的病理生理学意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(1): 98-101.

[10] Ishimitsu T, Ono H, Minami J, Matsuoka H. Pathophysiologic and therapeutic implications of adrenomedullin in cardiovascular disorders[J]. Pharmacol Ther, 2006, 111(3): 909-927.

[11] Nakanishi K, Osada H, Uenoyama M, Kanazawa F, Ohnri N, Masaki Y, et al. Expression of adrenomedullin mRNA and protein in rats with hypobaric hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. Am J Physiol Heart Physiol, 2004, 286 (6): H2159-H2168.

[12] Bobik A. Transforming growth factor-betas and vascular disorders [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(8): 1712-1720.

[13] Eickelberg O, Köhler E, Reichenberger F, Bertschin S, Woodtli T, Erne P, et al. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3[J]. Am J Physiol, 1999, 276 (5 Pt 1): L814-L824.

[14] Long L, Crosby A, Yang X, Southwood M, Upton PD, Kim DK, et al. Altered bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta signaling in rat models of pulmonary hypertension: potential for activin receptor-like kinase-5 inhibition in prevention and progression of disease[J]. Circulation, 2009, 119(4): 566-576.

(本文编辑:王庆红)