

一氧化氮吸入对肺动脉高压大鼠血压和血浆中血管活性物质水平的影响

顾勇, 王治平, 张希, 孙培吾, 刘秀琴¹

(中山大学附属第一医院心脏外科; 1. 放射免疫中心, 广东省广州市 510080)

[关键词] 外科学; 吸入一氧化氮可影响肺动脉高压的形成过程; 大鼠野百合碱肺动脉高压模型; 一氧化氮吸入; 右心室收缩压; 内皮素; 心房钠尿肽; 降钙素基因相关肽

[摘要] 为探讨一氧化氮吸入是否对肺动脉高压的形成和发展具有阻抑作用, 并进一步探讨血浆中血管活性物质与肺动脉高压形成和发展的关系。将 109 只大鼠(实验终结时 101 只)分为四组: 对照组腹腔注射生理盐水, 其它三组腹腔注射野百合碱复制肺动脉高压模型, 其中预防组同时吸入一氧化氮, 治疗组第 3 周才开始吸入一氧化氮, 模型组自由呼吸。每隔 1 周分别检测血浆中内皮素、心房钠尿肽和降钙素基因相关肽水平, 测定右心室收缩压和颈动脉平均压。结果发现, 腹腔内注射野百合碱时右心室收缩压由 1.71 ± 0.35 kPa 升至 2.35 ± 0.44 kPa, 第 3 周末升至 4.56 ± 0.65 kPa, 证明肺动脉高压已经形成。内皮素和心房钠尿肽均随肺动脉压力升高而增加, 内皮素由 130 ± 4 ng/L 升至 187 ± 37 ng/L; 心房钠尿肽由 172 ± 28 ng/L 升至 207 ± 27 ng/L。降钙素基因相关肽则下降, 由 232 ± 57 ng/L 降至 187 ± 23 ng/L。间断长期吸入一氧化氮后, 至第 5 周末, 内皮素和心房钠尿肽呈下降趋势, 前者由模型组的 636 ± 148 ng/L 降至预防组的 534 ± 44 ng/L, 后者由模型组的 1111 ± 248 ng/L 降至预防组的 772 ± 145 ng/L; 降钙素基因相关肽则有所升高, 由模型组的 45 ± 11 ng/L 增至预防组的 80 ± 16 ng/L。右心室收缩压则下降, 由 2.35 ± 0.44 kPa 降至 2.02 ± 0.29 kPa, 与正常组比较, 差异显著。此结果提示, 肺动脉高压的发生和发展与血浆中内皮素及心房钠尿肽存在正相关关系, 与降钙素基因相关肽存在负相关关系; 间断长期吸入一氧化氮可使肺动脉高压的产生减缓, 程度减轻; 对已形成的肺动脉高压具有治疗作用。

[中图分类号] R541.1

[文献标识码] A

The Plasma Concentrations of Endothelin, Atrial Natriuretic Peptide and Calcitonin Gene Related Peptide and Blood Pressure in Rats with Pulmonary Hypertension Influenced by Exogenous Nitric Oxide

GU Yong, WANG Zhi-Ping, ZHANG Xi, SUN Pei-Wu, and LIU Xiu-Qin

(The First Affiliated Hospital, ZhongShan University, Guangzhou 510080, China)

[KEY WORDS] Pulmonary Hypertension; Vaso-Active Substance; Exogenous Nitric Oxide; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To observe whether the level of endothelin (ET), atrial natriuretic peptide (ANP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the plasma of rats with pulmonary hypertension (PH) can be influenced by exogenous nitric oxide. **Methods** A monocrotaline (MCT) PH model was founded in rat. Exogenous NO were inhaled during the forming and developing of PH. The changes of ET, ANP and CGRP and systolic pressure of right ventricle (RVSP), mean cervical arterial pressure were measured. **Results** It demonstrated that the RVSP of MCT rats had been elevated since the first week: from 1.71 ± 0.35 kPa to 2.35 ± 0.44 kPa, and (PH) was formed at the time of the third week: 4.56 ± 0.65 kPa, the plasma concentration of ET and ANP in MCT rats were increased along with pulmonary arterial pressure, ET: from 130 ± 4 ng/L, elevated to 187 ± 37 ng/L; ANP: from 172 ± 28 ng/L elevated to 207 ± 27 ng/L at the first week, but CGRP were lowered: from 232 ± 57 ng/L reduced to 187 ± 23 ng/L at the first week. After exogenous NO were inhaled intervally at long-term, ET and ANP have the tendency to reduce: ET reduced from 636 ± 148 ng/L to 534 ± 44 ng/L; ANP reduced from 1111 ± 248 ng/L to 772 ± 145 ng/L. But CGRP increased from 45 ± 11 ng/L to 80 ± 16 ng/L at the fifth week, RVSP lowered from 2.35 ± 0.44 kPa to 2.02 ± 0.29 kPa at the first week. In comparison with control group, there is a significant difference ($P < 0.05$). **Conclusions** There is a positive significant correlation between the forming and developing of PH and plasma concentration of ET and ANP, but negative significant correlation with CGRP. The methods of interval and long-term time of inhaled exogenous NO could not only attenuate the forming of PH and partly prohibit the process and progress of PH, but also had an effect on the formed PH.

[收稿日期] 2002-09-24

[修回日期] 2003-04-22

[作者简介] 顾勇, 男, 1964 年出生, 江苏省南通市人, 主治医师。王治平, 男, 1956 年出生, 湖南省永州市人, 副主任医师, 副教授。张希, 男, 1952 年出生, 广东省汕头市人, 主任医师, 教授。

多种心肺疾病在晚期伴发肺动脉高压(pulmonary artery hypertension, PAH)。PAH 时, 血浆中血管活性物质内皮素^[1,2]、心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP)^[3]和降钙素基因相关肽(calcitonin gene-

related peptide, CGRP)^[4,5]均发生明显变化。近年来认为 PAH 形成与肺泡内肺动脉(intracinar pulmonary artery, IAPA)构型重建有关,一氧化氮(nitric oxide, NO)吸入可使 IAPA 舒张^[6], PAH 降低。这种给予 NO 的方式是否影响血浆中血管活性物质尚不清楚。为此,通过大鼠野百合碱(monocrotaline, MCT)肺动脉高压模型予以观察。

1 材料和方法

1.1 设备与试剂

带循环水浴控制装置的日立 U-2000 紫外分光光度计, NO 和 NO₂ 分析仪(PULMONOX ㊟型, Canada), 全自动图象分析系统(Kontron IBAS 2.0, USA), 心电监护仪(Hewlett Packard, USA), 低温冰箱(SANYO, Japan)。野百合碱(monocrotaline, MCT; Sigma); NO 气体瓶(100 ppm, 广州气体厂); 内皮素和 CGRP 测定试剂盒(北京东亚免疫技术研究所), ANP 测定试剂盒(北京北方生物技术研究所)。

1.2 动物分组及处理

实验选用健康雄性纯系 SD 大鼠 109 只, 体重 150~200 g。随机分为四组: 对照组 25 只, 每只大鼠腹腔内一次性注射生理盐水 2.5 mL/kg。模型组 50 只, 每只大鼠腹腔内一次性注射 2% MCT 50 mg/kg, 使其成为肺动脉高压动物模型。此组动物第 2 周末和第 3 周末各死亡 1 只, 第 5 周末死亡 2 只, 实得 46 只。以上两组大鼠分别于实验开始后的第 1 周末、第 2 周末、第 3 周末、第 4 周末和第 5 周末进行血压和血管活性物质测定。预防组, 24 只, 每只大鼠腹腔内一次性注射 2% MCT 50 mg/kg, 同时吸入 50 ppm 的 NO, 每日 1 h, 此组动物第 3 周末和第 5 周末各死亡 1 只, 实得 22 只; 分别于第 1 周末、第 3 周末和第 5 周末进行血压和血管活性物质测定。治疗组 10 只, 每只大鼠腹腔内注射 2% MCT 50 mg/kg, 三周后再吸入 NO, 剂量同上, 其中死亡 2 只, 实得 8 只; 于第 5 周末进行血压和血管活性物质测定。

1.3 一氧化氮的吸入方法

将 NO 瓶通过“Y”型管与氧气瓶相接, 汇成流出管, 混合气体经 PULMONOX ㊟型 NO 分析仪测定, 将流出管口的 NO 浓度调节至 50 ppm, 同时测定 NO₂ (灵敏度为 1 ppm)。将大鼠放入特制的鼠笼, 固定大鼠口鼻部, 将流出管口对大鼠口鼻部, NO 经鼻腔吸入, 同时进行流量及 NO 和 NO₂ 浓度的监控。

1.4 右心室收缩压和颈动脉平均压的测定

实验大鼠腹腔内注射戊巴比妥钠麻醉, 仰卧位固定, 作颈正中偏右切口, 暴露并游离右颈外静脉 1 cm。用充满 0.1% 肝素盐水的维尼纶医用导管, 经右颈外静脉插入右心室, 记录右心室收缩压(right ventricular systemic pressure, RVSP), 以此来反映肺动脉血压。钝性分离出颈总动脉 1.5 cm 并插管, 插管另一端通过压力换能器与 Hewlett Packard 监护仪相连, 记录颈动脉平均压(mean cervical arterial pressure, MCAP)的变化。

1.5 血浆中血管活性物质的检测

1.5.1 制备抽血试管 按下表加入试剂制备三类抽血试管。

类别	加 10% EDTA-Na ₂ 量	加 Aprotinin 量
内皮素	15 μL	20 μL
ANP	20 μL	10 μL
CGRP	15 μL	20 μL

1.5.2 采血及处理 实验大鼠在戊巴比妥钠麻醉下, 开胸暴露心脏, 用一次性注射器, 自心尖区抽血 5~7 mL, 迅速分别加入已制备好的内皮素、ANP 及 CGRP 抽血试管, 其中 CGRP 抽血试管每管加血 1.5 mL, 其它各管加血 1 mL。然后在 4℃下用 3 500 r/min 离心 20 min, 分离出血浆, 放入 -20℃低温冰箱保存。

1.5.3 检测操作 将冰冻血浆标本置室温或冷水中复融, 在 4℃下, 3 500 r/min 离心 5 min, 取上清液。分别加样, 按照内皮素、ANP 和 CGRP 测定试剂盒说明书进行测定, 所有操作均在冰水浴中进行。

1.6 统计学方法

所有数据均经 SPSS 软件系统处理。多组均数的比较使用方差分析, 计数资料使用卡方检验, 检验水准设为以 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 血压检测结果

模型组动物 MCAP 虽随时间有所下降, 但与对照组比较, 差异无显著性统计学意义; 而 RVSP 随时间逐渐升高, 说明 PAH 模型复制成功。预防组 RVSP 同样随时间而升高, 但升高幅度较模型组小($P<0.05$); 治疗组虽推迟 3 周后吸入 NO, 但能达到同样的效果(表 1, Table 1)。此结果提示, NO 的吸入可减缓 MCT 引起的 RVSP 的升高幅度。

表 1. 各组动物不同时间右心室收缩压的比较($\bar{x} \pm s$, kPa)

Table 1. Changes of RVSP in each group and time

分 组	n	第 1 周末	第 2 周末	第 3 周末	第 4 周末	第 5 周末
对照组	25	1.71 \pm 0.35	1.68 \pm 0.29	1.81 \pm 0.20	1.68 \pm 0.42	1.65 \pm 0.29
模型组	46	2.35 \pm 0.44 ^a	3.51 \pm 0.20 ^b	4.56 \pm 0.65 ^b	5.96 \pm 1.00 ^b	8.63 \pm 1.21 ^b
预防组	22	2.02 \pm 0.29 ^{ac}	—	3.75 \pm 0.37 ^{bc}	—	6.91 \pm 0.74 ^{bc}
治疗组	8	—	—	—	—	6.72 \pm 0.87 ^{bc}

与对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与模型组比较, c: $P < 0.05$.

2.2 各组动物血浆内皮素的变化

模型组和预防组动物血浆内皮素水平随时间而逐渐升高。除模型组第 1 与第 2 周末, 第 2 与第 3 周末无显著性差异外, 其余各组周间比较, 均有统计学差异。同一时间比较发现, 预防组均较模型组低 ($P < 0.05$)。治疗组(第 5 周末)也较模型组降低 ($P < 0.05$), 与预防组无显著差异(表 2, Table 2)。此结果提示, 吸入 NO 可降低 MCT 引起的内皮素水平的升高幅度。

表 2. 各组在不同时间的血浆内皮素水平($\bar{x} \pm s$, ng/L)

Table 2. Changes of ET in each group and time

时 间	对照组 (n=25)	模型组 (n=46)	预防组 (n=22)	治疗组 (n=8)
第 1 周末	130 \pm 4	187 \pm 37 ^a	170 \pm 23 ^a	—
第 2 周末	133 \pm 22	238 \pm 35 ^b	—	—
第 3 周末	139 \pm 45	307 \pm 57 ^b	283 \pm 24 ^b	—
第 4 周末	136 \pm 17	438 \pm 80 ^b	—	—
第 5 周末	140 \pm 41	636 \pm 148 ^b	543 \pm 44 ^{bc}	532 \pm 41 ^{bc}

与对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与模型组比较, c: $P < 0.05$ 。

表 3. 各组在不同时间的血浆心房钠尿肽水平($\bar{x} \pm s$, ng/L)

Table 3. Changes of ANP in each group and time

时 间	对照组 (n=25)	模型组 (n=46)	预防组 (n=22)	治疗组 (n=8)
第 1 周末	172 \pm 28	207 \pm 27	196 \pm 33	—
第 2 周末	166 \pm 15	281 \pm 57 ^a	—	—
第 3 周末	156 \pm 33	472 \pm 85 ^b	401 \pm 62 ^b	—
第 4 周末	153 \pm 20	835 \pm 197 ^b	—	—
第 5 周末	153 \pm 31	1 111 \pm 248 ^b	773 \pm 145 ^{bc}	734 \pm 107 ^{bc}

与对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与模型组比较, c: $P < 0.05$ 。

2.3 各组在不同时间血浆心房钠尿肽水平的变化

模型组和预防组动物血浆 ANP 水平随时间而

升高; 两组各周间两两比较, 除模型组第 1 周末与第 2 周末无显著性差异外, 其余均有显著性差异 ($P < 0.05$); 同一时间比较, 第 1 周末模型组与预防组无显著差异, 其余各周均有差异, 模型组高于预防组; 第 5 周末治疗组较模型组为低 ($P < 0.05$), 治疗组与预防组间无显著差异(表 3, Table 3)。此结果提示, 吸入 NO 可减少 MCT 引起的 ANP 升高幅度。

2.4 各组动物血浆降钙素基因相关肽的变化

模型组和预防组动物血浆 CGRP 水平随时间而逐渐减少。除模型组第三周和第四周间无显著性差异, 其余各组各周间两两比较, 均有显著性差异。同一时间比较, 第 1 周末, 模型组与预防组相比无显著性差异, 其余各周, 模型组降低均较预防组明显 ($P < 0.05$); 第 5 周末, 治疗组较模型组明显增高 ($P < 0.05$), 与预防组无显著差异(表 4, Table 4)。此结果提示, 自第 2 周末起, NO 的吸入可减少 MCT 引起的 CGRP 的降低幅度。

表 4. 各组在不同时间的血浆降钙素基因相关肽水平的比较($\bar{x} \pm s$, ng/L)

Table 4. Changes of CGRP in each group and time

时间	对照组 (n=25)	模型组 (n=46)	预防组 (n=22)	治疗组 (n=8)
第 1 周末	232 \pm 57	187 \pm 23	200 \pm 20	—
第 2 周末	222 \pm 41	133 \pm 30 ^a	—	—
第 3 周末	227 \pm 23	80 \pm 15 ^b	122 \pm 31 ^{ac}	—
第 4 周末	239 \pm 29	74 \pm 13 ^b	—	—
第 5 周末	237 \pm 25	45 \pm 11 ^b	80 \pm 16 ^{bd}	78 \pm 15 ^b

与对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与模型组比较, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$ 。

3 讨论

3.1 关于野百合碱(MCT)肺动脉高压模型

野百合碱(MCT)是一种豆科植物野百合属(Crotalaria)吡咯烷类生物碱, 早年作为环境毒素引起人们的注意^[7]。给大鼠一次性注射即可引起肝肺

损害^[8],其作用机制可能是,MCT 进入大鼠体内后,在肝脏中经一种氧化酶激活^[9],成为有活性的吡咯野百合碱(monocrotaline pyrrole, MCTP)。MCTP 自肝脏进入静脉系统,到达肺部与肺组织产生共价结合。体外实验证实^[10],MCTP 的靶器官为血管内皮,它使内皮细胞早期出现明显水肿,导致其通透性改变和进行性损伤^[9]。MCT PAH 模型具有方法简便、易于操作等特点;避免了外科手术;可一次性提供小批量标准动物,重复性好;与人类慢性 PAH 过程相似。我们采用此模型,选用 MCT 剂量 50 mg/kg,一次性注射,三周后可形成满意的 PAH 模型。

3.2 肺动脉高压与血管活性物质的关系

各血管活性物质对肺循环的影响决定于其比例多寡及血管的反应性。本实验 MCT 大鼠血浆中内皮素和 ANP 随肺动脉压力升高而增加,CGRP 则减少。血浆中内皮素的进行性增加表明,内皮素或是形成 PAH 的原因或参与对 PAH 的反应。PAH 时,肺血管内皮细胞受损而体循环内皮未改变,因而内皮素表达增加。血浆中内皮素浓度的增加是由于肺循环中内皮素增多。内皮素受体分两型^[11]:内皮素 A 和内皮素 B。内皮素 A 受体主要在血管平滑肌细胞,起收缩血管的作用;而内皮素 B 受体主要在内皮细胞,内皮素通过它舒张血管。当血管内皮受损,内皮细胞表面内皮素 B 受体减少,此时内皮素 A 受体起主导作用,使肺动脉收缩。

血浆中 ANP 浓度随 RVSP 上升而显著增加,两者呈明显的正相关关系。实验发现,直接刺激心房可使 ANP 的释放增多。在人和动物,ANP 在循环中的量伴随肺动脉压力升高而升高^[3]。本文 MCT 大鼠血浆中 ANP 检测结果表明,血浆 ANP 水平可反映 PAH 的进展。当肺动脉压力升高时,右心室舒张压升高,右心房压力负荷增加,刺激 ANP 的分泌,使血浆 ANP 水平升高。血浆 ANP 水平升高可降低循环血管及肺血管阻力,抑制 PAH 的进一步发展。

降钙素基因相关肽(CGRP)是体内最强的舒血管活性肽^[14],本文实验发现 CGRP 水平随 RVSP 升高而降低,RVSP 越高,则 CGRP 越低,两者呈负相关关系。在肺血管中发现有大量的 CGRP 受体,主要分布在血管平滑肌。提示正常时,内源性 CGRP 在调节肺血流时起一定作用。慢性缺氧大鼠注射 CGRP 后可阻止 PAH 的发展;在缺氧的 PAH 大鼠中,肺组织 CGRP 水平明显高于正常对照组,而血浆中 CGRP 水平则低于正常组^[5]。本文结果与之相似,血浆中 CGRP 下降。CGRP 对肺血管的收缩作用不依赖于血管内皮,推测血浆中游离 CGRP 减少也许与肺释

放减少或是与受体结合过多有关。

间断长期吸入 NO 后,血管活性物质发生变化,内皮素和 ANP 呈下降趋势,CGRP 则有所升高。NO 吸入后,降低 RVSP,右心房牵张刺激随之下降,相应使 ANP 分泌减少。NO 和内皮素是一对相互拮抗的血管活性物质,NO 吸入,直接作用于肺血管平滑肌,使其舒张,降低了细胞内 Ca^{2+} 浓度,使内皮素分泌受到抑制。本实验结果与文献报道一致。CGRP 在维持肺血管基础张力方面起重要的作用^[11]。PAH 时,CGRP 基础生成量减少,吸入 NO 后,对 CGRP 没有直接作用,但可间接恢复 CGRP 的产生,以维持肺血管的低张状态。

3.3 外源性 NO 对肺动脉高压的阻抑作用

已形成 MCT PAH 的大鼠(第 3 周末)间断吸入 NO 两周后,与同时时间模型组相比较,血液动力学指标有明显的改变,说明 NO 吸入对 PAH 有治疗作用。可使 PAH 的产生减缓,程度减轻。外源性 NO 是一种选择性肺血管扩张剂^[12],自气管吸入后,由于其脂溶性好、穿透力强,可直接引起肺血管扩张,从而降低肺动脉压力。

[参考文献]

- [1] Brunner. Cardiac endothelin and big endothelin in right-heart hypertrophy due to monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Cardiovasc Res*, 1999, **44** (1): 197-206
- [2] Okada Mo, Yamashita C, Okada Ma, et al. Role of endothelin-1 in beagles with dehydromonocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 1995, **92**: 114-119
- [3] Ueno M, Miyauchi T, Sakai S, et al. Effects of physiological or pathological pressure load in vivo on myocardial expression of ET-1 and receptors. *Am J Physiol*, 1999, **277** (5Pt2): R1 321-330
- [4] McCormack DG, Mak JCW, Coupe MO, et al. Calcitonin gene-related peptide vasodilation of human pulmonary vessels. *J Appl Physiol*, 1989, **67**: 1 265-270
- [6] Bivalacqua TJ, Hyman AL, Kadowits PJ, et al. Role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in the mouse. Influence of gene transfer in vivo. *Regul Pept*, 2002, **108** (2-3): 129-133
- [6] Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH, et al. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med*, 1994, **120**: 227-237
- [7] Mattocks AR. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Nature*, 1968, **217**: 723-728
- [8] Hayashi Y, Hussa JF, Lalich JJ, et al. Cor-pulmonale in rats. *Lab Invest*, 1967, **16**: 875-881
- [9] Bruner LH, Carpenter LJ, Hamlow P, et al. Effect of a mixed function oxidase inducer and inhibitor on monocrotaline pyrrole pneumotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1986, **85**: 416-427
- [10] Sugita T, Hyers TM, Dauber IM, et al. Lung vessel leak precedes right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *J Appl Physiol*, 1983, **54**: 371-374
- [11] Janssen PL, Yucker A. Calcitonin gene-related peptide modulates pulmonary vascular reactivity in isolated rat lungs. *Appl Physiol*, 1994, **77** (1): 142-146
- [12] Aranda M, Bradford KK, Pearl RG. Combined therapy with inhaled nitric oxide and intravenous vasodilators during acute and chronic experimental pulmonary hypertension. *Anesth Analg*, 1999, **89** (1): 152-158

(此文编辑 胡必利)