

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.01.004

野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠血清中瘦素和肺组织中瘦素受体的表达及意义*

钱天赐¹, 彭星星², 梁先柱¹, 阮富贵¹, 孙江滨¹, 王海永^{1△}

(1. 桂林医学院附属医院心血管外科, 广西桂林 541001; 2. 桂林医学院第二附属医院心胸外科, 广西桂林 541001)

[摘要] **目的** 探讨瘦素及其受体(OB-R)在野百合碱(MCT)诱导的肺动脉高压(PAH)发生、发展中的意义。**方法** 15 只 SD 大鼠被分为对照组($n=5$)和两个实验组($n=10$)。实验组经腹腔注射 MCT 建立大鼠 PAH 模型, 对照组注射相同剂量的溶媒。两个实验组大鼠在注射 MCT 后分别于第 2、4 周抽取静脉血测量平均肺动脉压及右心肥厚指数, 随后取出肺组织, 观察肺血管的病理学变化, ELISA 检测血清瘦素的表达, Western blot 检测肺组织中 OB-R 的表达情况。**结果** 与对照组相比, 实验组大鼠的平均肺动脉压和右心肥厚指数明显升高($P<0.05$); 血清中瘦素及肺组织中 OB-R 的表达水平明显增加($P<0.05$), 且与平均肺动脉压呈正相关($r=0.912, P<0.05; r=0.861, P<0.05$)。**结论** 瘦素及 OB-R 可能在 MCT 诱导 PAH 的发生、发展中起重要作用。

[关键词] 瘦素; 受体; 瘦素; 高血压, 肺性; 野百合碱
[中图分类号] R543.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)01-0011-03

Expression and significance of serum leptin and lung tissue leptin receptor in rats with pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline*

QIAN Tianci¹, PENG Xingxing², LIANG Xianzhu¹, RUAN Fugui¹, SUN Jiangbin¹, WANG Haiyong^{1△}

(1. Department of Cardiovascular Surgery, The Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China)

[Abstract] **Objective** To study the significance of leptin and its receptor(OB-R) in the occurrence and development of pulmonary arterial hypertension(PAH) induced by monocrotaline(MCT). **Methods** Fifteen SD rats were divided into the control group($n=5$) and two experimental groups($n=10$). The experimental groups were intraperitoneally injected by MCT for constructing the PAH model and the control group was injected by the same dose of solvent groups. The venous blood was extracted at 2, 4 weeks after MCT injection in the two experimental groups. The mean pulmonary artery pressure(mPAP) and right ventricular hypertrophy index(RVHI) were measured and then the lung tissue was removed. The pathological change of lung blood vessels was observed. The expression of serum leptin was detected by ELISA. The expression of OB-R in lung tissue was tested by Western blot. **Results** Compared with the control group, mPAP and RVHI in the experimental groups were significantly increased($P<0.05$); the expression levels of serum leptin and lung tissue OB-R were increased significantly($P<0.05$), moreover, which were positively correlated with mPAP($r=0.912, P<0.05; r=0.861, P<0.05$). **Conclusion** Leptin and OB-R may play an important role in the occurrence and development of PAH induced by MCT.

[Key words] leptin; receptors, leptin; hypertension, pulmonary; monocrotaline

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是由于转化生长因子- β (TGF- β)、氧化应激、炎症反应等因素使得肺动脉压力升高, 并超过一定界值的血流动力学状态^[1], 其主要的病理变化是血管内膜增生、非肌型血管肌化和肌型血管增厚。瘦素是肥胖基因编码的一个相对分子质量为 16×10^3 的非糖基化蛋白类激素, 一直以来被认为是抑制肥胖的主要物质。最近研究发现, 瘦素不仅能够促进炎症反应, 而且还可以促进血管平滑肌细胞的增殖和迁移^[2-3]。但瘦素在 PAH 发病过程中的变化规律却很少报道, 本研究以野百合碱(monocrotaline, MCT)诱导的 PAH 大鼠模型为研究对象, 观察瘦素及其受体(leptin receptor, OB-R)的表达情况, 并初步判断其与 PAH 的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 选择健康雄性 SD 大鼠 15 只(购于桂林医学院实

验动物中心), 体质量 200~260 g, 将其分为对照组($n=5$)和实验组($n=10$), 其中实验组又分为实验组一($n=5$)与实验组二($n=5$)。本实验符合桂林医学院动物伦理委员会的相关规定。

1.2 方法

1.2.1 实验动物模型的建立 实验组大鼠按照 60 mg/kg 剂量在腹腔注射 1% MCT 溶液(无水乙醇与生理盐水以 1:4 混合作为溶剂), 在对照组大鼠腹腔注射无水乙醇与生理盐水 1:4 混合液。

1.2.2 测量平均肺动脉压、右心室肥厚指数及标本的收集 实验组一与实验组二大鼠在注射 MCT 后, 分别于第 2、4 周经腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(3 mL/kg)麻醉, 抽取静脉血 2 mL, 4℃ 静置, 以 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液并于 -80℃ 冰箱冻存待测。使用聚乙烯导管缓慢通过右侧颈静脉进入肺动

* 基金项目: 广西医药卫生自筹经费计划课题资助项目(Z2015397)。 作者简介: 钱天赐(1989—), 住院医师, 硕士, 主要从事胸部疾病基础及临床研究。 △ 通信作者, E-mail: 601700556@qq.com。

脉,再用生理多导监测仪分别记录平均肺动脉压(mean pulmonary artery pressure,mPAP)。开胸收集肺组织以备实验使用,同时分离右心室、左心室和室间隔,并称其质量,计算出右心室肥厚指数(right ventricular hypertrophy index,RVHI),即右心室游离壁/(左心室+室间隔)。对照组在第 4 周测量 mPAP,其余处理同实验组。

1.2.3 苏木精-伊红(HE)染色方法 将标本在 10%甲醛中固定后,用石蜡包埋,将肺组织制作成 4 μm 病理切片,然后各组取两张切片进行 HE 常规染色,观察大鼠肺动脉的形态学变化情况。

1.2.4 血清瘦素检测 采用 ELISA 检测外周血中瘦素,试剂盒购自上海一基实业有限公司,按说明书具体步骤操作,测定吸光度,由标准曲线计算血清瘦素水平。

1.2.5 Western blot 测 OB-R 表达 将 100 mg 肺组织用剪刀剪碎后置于 4 mL EP 管中,加入 2 mL 的 RIPA 蛋白裂解液,用研磨棒研磨 3 min,将 EP 管置于超声仪下裂解组织,4 ℃ 离心机 12 000 r/min 离心 15 min。取上清液置于 EP 管中,用二喹啉甲酸(BCA)法检测蛋白水平。取出 400 μg 总蛋白,加入上样缓冲液,煮沸后取出 20 μL 蛋白,用 10%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳 1.5 h,蛋白质转移至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶 37 ℃ 封闭 1 h,TBST 洗膜 3 次,加入 Abcam 公司的 OB-R 一抗孵育,4 ℃ 过夜;次日,加入二抗,室温孵育 1 h,洗膜后加电化学发光(ECL)液显影,扫描仪中成

像。运用 Image Lab 软件分析各组 Western blot 条带,计算灰度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,计数资料以频数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用 Spearman 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

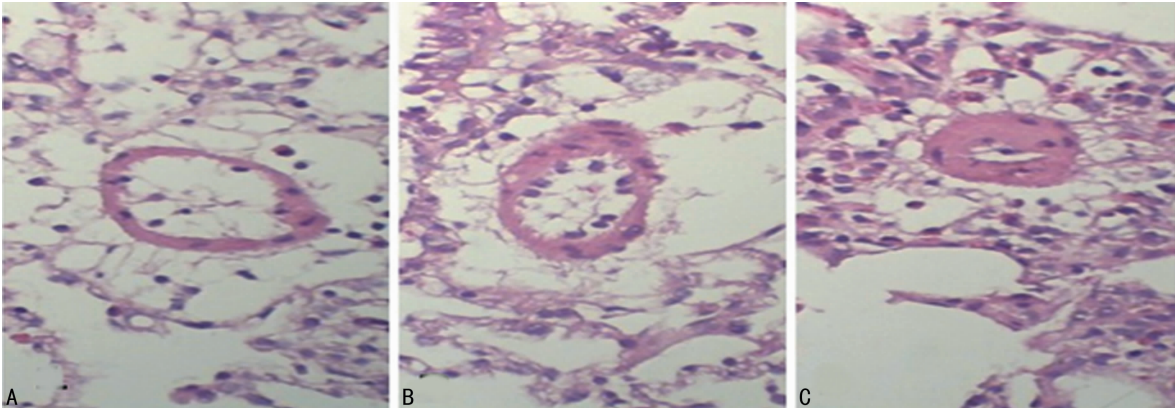
2 结 果

2.1 大鼠血流动力学变化和右心肥厚指标 实验组大鼠 mPAP 及 RVHI 显著增加,且随 MCT 注射时间的延长而逐渐升高,各组间比较差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 3 组大鼠 mPAP 和 RVHI 的比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	mPAP(mm Hg)	RVHI(%)
对照组	5	12.84±2.90	19.59±2.32
实验组一	5	28.55±3.07 ^a	27.73±4.08 ^a
实验组二	5	49.53±6.47 ^{ab}	51.96±9.06 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与实验组一比较

2.2 HE 染色结果 光镜下观察可见,对照组肺组织的小动脉壁未见增厚,肺泡腔内结构完整,有少量炎性细胞浸润;实验组大鼠的肺中小动脉平滑肌细胞明显增生、肥大,血管壁不规则增厚,管腔狭窄,甚至闭塞,肺组织中可见较多炎性细胞浸润,见图 1。

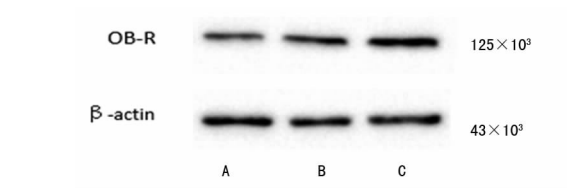


A:对照组;B:实验组一;C:实验组二

图 1 对照组和实验组肺组织 HE 染色(×200)

表 2 OB-R 的灰度值和血清瘦素水平($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	OB-R	瘦素(μg/L)
对照组	5	0.19±0.03	15.08±1.08
实验组一	5	0.47±0.07 ^a	20.57±1.50 ^a
实验组二	5	1.20±0.11 ^{ab}	27.79±1.46 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与实验组一比较



A:对照组;B:实验组一;C:实验组二

图 2 对照组和实验组肺组织中 OB-R 的表达

2.3 各组血清中瘦素水平变化的比较 与对照组比较,实验

组的血清瘦素水平均升高,且随着 MCT 注射时间的延长,血清中瘦素水平也逐步增高,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.4 肺组织中 OB-R 的表达水平 与对照组相比,实验组肺组织中 OB-R 的表达水平均增高($P<0.05$),且随 MCT 注射时间的延长而升高,受体蛋白的表达水平在实验组二的肺组织中最高,见表 2、图 2。

2.5 相关性分析 大鼠血清中瘦素和肺组织中 OB-R 与 mPAP 均呈正相关($r=0.912,P<0.05;r=0.861,P<0.05$)。

3 讨 论

PAH 是伴有肺血流增多的先天性心脏病(简称先心病)常见的并发症,进行性肺血流增多导致肺血管重塑,最终发展为艾森曼格综合征。JING 等^[4]报道先心病继发 PAH 患儿生存率明显低于成人。由于我国未经治疗的先心病患儿的数量已有 200 万例,而且每年至少增加 15 万例^[5],因此,一旦病情发展到 PAH 阶段,将给其家庭和社会带来巨大的经济负担。目

前,对于先心病继发 PAH 的治疗主要以血管活性药物为主,疗效得到了一定认可,但却不能减缓或逆转肺血管重塑,也不能降低病死率。因此,如何抑制肺血管平滑肌增殖已经成为新的研究热点。

在 PAH 的相关研究中,MCT 是经常使用的一种诱导剂,它主要是在猪屎豆的种子和叶子中提取,其代谢产物具有多器官毒性。MCT 能够诱导大鼠肺动脉内皮损伤,从而导致肺组织水肿、肺动脉中膜增厚等病理变化^[6]。本研究 HE 染色结果发现,实验组大鼠肺动脉中膜较对照组肌化明显,与 GEORGE 等^[6]报道的结果一致;同时,mPAP 及 RVHI 随着 MCT 诱导的时间延长而呈进行性升高,这也间接反映了肺动脉的阻塞程度,说明本研究的 PAH 动物模型已成功建立。

瘦素是一种多靶器官、功能广泛的蛋白激素,具有抑制摄食、增加能量消耗、调节炎症反应、促进纤维化、促上皮细胞和血管生长等作用。最近,瘦素对血管的重塑作用得到较多关注。PAH 是以肺血管内皮和平滑肌细胞异常增生为特点的一种肺血管疾病。内皮细胞的异常增殖促进新生血管的形成,产生丛状损伤,这是其病理变化特点。研究认为在 PAH 的发生、发展过程中,内皮细胞的损伤可能处于中心环节^[7]。瘦素通过激活丝裂素活化蛋白激酶(P38 MAPK),引起血管内皮细胞增殖,进而影响血管重塑^[8]。王先梅等^[9]发现,瘦素在体外 0~100 ng/mL 的剂量范围内能够促进内皮细胞和血管平滑肌细胞的增殖。本研究发现,PAH 模型大鼠体内的瘦素及 OB-R 的表达水平显著升高,且与 mPAP 呈正相关,这提示瘦素及其受体可能参与 PAH 发病过程。CHAI 等^[10]在低氧和 MCT 诱导的 PAH 大鼠的研究中也得出类似结论,且还发现瘦素通过细胞外调节蛋白激酶(ERK)、信号传导及转录激活因子(STAT)和蛋白激酶 B(AKT)这 3 条信号转导通路促进肺动脉血管平滑肌细胞的增殖迁移。尽管 PAH 的发生、发展过程复杂,但是神经激素系统的激活一直被认为是 PAH 发病过程中的重要因素之一,尤其是交感神经系统(sympathetic nervous system,SNS)和肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone system,RAAS)^[11]。瘦素不仅能够激活 SNS 和 RAAS,引起儿茶酚胺、血管紧张素-II 及醛固酮的释放增多,还能够引起一系列的氧化应激反应,这在 PAH 的发病过程中具有重要意义^[12-13]。目前已知,炎症微环境与 PAH 的发生和病情进展密切相关。瘦素可以通过诱导内皮细胞第二信使活性氧提高核因子- κ B(NF- κ B)的活性,引起血管内皮细胞功能紊乱,增加炎症因子的表达^[14]。此外,瘦素也可以通过激活 NF- κ B 促进血管平滑肌细胞的增殖和迁移^[15]。

综上所述,瘦素及 OB-R 的异常升高可能与 MCT 诱导的大鼠 PAH 发病有关。本研究提示了一个治疗 PAH 的潜在作用靶点。但是,本研究为体内研究,实验结果受到多方面因素影响,不能直接反映瘦素及 OB-R 与 PAH 的关系,需要进行体外研究加以证实。且由于样本量少,可能会使实验结果产生偏倚,期待大样本量的相关研究。

参考文献

- [1] CSISZAR A, LABINSKYY N, JO H, et al. Differential proinflammatory and prooxidant effects of bone morphogenetic protein-4 in coronary and pulmonary arterial endothelial cells[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008,295(2):569-577.
- [2] SINGH U P, SINGH N P, GUAN H, et al. The emerging role of leptin antagonist as potential therapeutic option for

- inflammatory bowel disease[J]. *Int Rev Immunol*, 2014, 33(1):23-33.
- [3] TSAI Y C, LEE Y M, HSU C H, et al. The effect of ferulic acid ethyl ester on leptin-induced proliferation and migration of aortic smooth muscle cells[J]. *Exp Mol Med*, 2015,47(8):e180.
- [4] JING Z C, XU X Q, HAN Z Y, et al. Registry and survival study in Chinese patients with idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension[J]. *Chest*, 2007, 132(2): 373-379.
- [5] 庄建. 建立全国性先天性心脏病手术数据库,提高诊治水平—对《继发性先天性心脏病术后的主动脉瓣下狭窄手术矫治分析》的评论[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2013,20(6):621-622.
- [6] GEORGE J, D'ARMIENTO J. Transgenic expression of human matrix metalloproteinase-9 augments monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in mice[J]. *J Hypertens*, 2011,29(2):299-308.
- [7] SMADJA D M, GAUSSEM P, MAUGE L, et al. Comparison of endothelial biomarkers according to reversibility of pulmonary hypertension secondary to congenital heart disease[J]. *Pediatr Cardiol*, 2010,31(5):657-662.
- [8] PATEL M, PREDESCU D, TANDON R, et al. A novel p38 mitogen-activated protein kinase/Elk-1 transcription factor-dependent molecular mechanism underlying abnormal endothelial cell proliferation in plexogenic pulmonary arterial hypertension[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(36): 25701-25716.
- [9] 王先梅,梁彦丽,徐亮,等.阿托伐他汀对瘦素诱导血管内皮细胞及平滑肌细胞增殖的作用[J]. *岭南心血管病杂志*, 2015,21(5):685-689,714.
- [10] CHAI S, WANG W, LIU J, et al. Leptin knockout attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension by inhibiting proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells[J]. *Transl Res*, 2015,166(6):772-782.
- [11] LIU C, JIANG X M, ZHANG J, et al. Pulmonary artery denervation improves pulmonary arterial hypertension induced right ventricular dysfunction by modulating the local renin-angiotensin-aldosterone system[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2016,16(1):192.
- [12] MARK A L. Selective leptin resistance revisited[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013, 305(6): 566-581.
- [13] 张艳华,程江涛,胡宇才.氧化应激及其信号转导途径与肺动脉高压关系研究进展[J]. *心肺血管病杂志*, 2016,35(4):334-337.
- [14] FUJIMAKI S, KANDA T, FUJITA K, et al. The significance of measuring plasma leptin in acute myocardial infarction[J]. *J Int Med Res*, 2001,29(2):108-113.
- [15] 王华兵,黄芬,王丽,等.瘦素对血管平滑肌细胞核转录因子 κ B 的影响[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2007, 16(5):509-512.