

尼可地尔对家兔慢性空气栓塞性肺动脉高压及其肺血管重构的影响

鲍丽刚 屈百鸣 王海鹏

摘要 **目的** 研究尼可地尔对慢性空气栓塞所致的家兔肺动脉高压及肺血管重构的影响。**方法** 将 36 只家兔随机分为 3 组, 每组 12 只, 对照组 (control, C 组)、空气栓塞组 (air embolism, AE 组) 和空气栓塞 + 尼可地尔组 (nicorandil, N 组), 后两组经家兔耳缘静脉注入洁净空气 1ml [0.05ml/(min · kg)], 连续 28 天后测定 3 组家兔肺动脉收缩压 (PASP)、舒张压 (PADP)、平均肺动脉压 (mPAP) 和右心室肥厚指数 (RVHI)。光镜下结合图像软件观测肺小动脉的病理变化及管壁厚度指数 (thickness index, TI) 和面积指数 (area index, AI); 超声心动图测主肺动脉内径评估肺高压的情况。**结果** (1) 肺动脉压力和 RVHI: AE 组肺动脉 PASP、PADP、mPAP 和 RVHI 均显著高于 C 组 (P 均 < 0.05), 而 N 组较 AE 组均显著减低 (P 均 < 0.05)。 (2) 肺小动脉病理: AE 组较 C 组肺小动脉管壁增厚、管腔狭窄及肺血管重构明显, TI 和 AI 显著增高 (P 均 < 0.05), 而 N 组较 AE 组肺小动脉管壁增厚、管腔狭窄及肺血管重构明显减轻, TI 和 AI 显著减低 (P 均 < 0.05)。 (3) 超声测量主肺动脉内经: AE 组主肺动脉内经高于对照组 ($P < 0.05$), 而 N 组较 AE 组减低 ($P < 0.05$)。**结论** 尼可地尔可以显著降低慢性空气栓塞性肺动脉高压家兔的肺动脉压, 拮抗右心室肥厚, 抑制肺血管增殖重构, 减低肺小动脉管壁 TI 和 AI 及降低主肺动脉扩张程度。

关键词 尼可地尔 慢性空气栓塞 肺动脉高压 血管重构 兔

Effect of Nicorandil on the Chronic Air Embolism – induced Pulmonary Hypertension and Pulmonary Vascular Remodeling in Rabbits. Bao Ligang, Qu Baiming, Wang Haipeng. Zhejiang University of Chinese Medicine, Zhejiang 310000, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of nicorandil on the chronic air embolism induced pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rabbits. **Methods** A total of 36 rabbits were randomly divided into control group, air embolic group, and air embolic + nicorandil treated group with 12 rabbits of each group. In the latter two air embolic groups of rabbits filtered air were continuously infused through ear vein about 1ml [0.05ml/(min · kg)] for 28 days. Then the systolic, diastolic, mean pulmonary artery pressure (PASP, PADP, mPAP) and right ventricle hypertrophy index (RVHI) were measured. The pathological changes of small pulmonary arteries were observed. The thickness index (TI) and area index (AI) of the small pulmonary arteries in three groups were evaluated with microscopy for morphological analysis. The internal diameters of the pulmonary trunk was measured with echocardiography for assessing pulmonary hypertension in three groups. **Results** ①The PAP and RVHI in air embolism group were all significantly higher than those in control group, respectively ($P < 0.05$), and these in nicorandil treated group were significantly lower than those in air embolism group, respectively ($P < 0.05$). ②The thickness of wall increased and the cavity became narrow in air embolic group, and these were significantly ameliorated in nicorandil treated group. The TI and AI in air embolic group were significantly higher than those in control group, respectively ($P < 0.05$), and these in nicorandil treated group were significantly lower than those in air embolic group, respectively ($P < 0.05$). ③The internal diameters of the pulmonary trunk was higher in air embolic group than that in control group, ($P < 0.05$). That was reduced in nicorandil treated group ($P < 0.05$). **Conclusion** Nicorandil can significantly attenuate the chronic air embolism – induced pulmonary hypertension, improve pulmonary vascular remodeling of the small pulmonary artery and right ventricular hypertrophy and reduce the internal diameters of the pulmonary trunk.

Key words Nicorandil; Chronic air embolism; Pulmonary arterial hypertension; Vascular remodeling

慢性栓塞性肺动脉高压目前发病机制不明确, 认为主要由于机械阻塞后引起解剖学肺血管床的减少,

以及在神经、体液及低氧血症等多种因素作用下所致肺血管痉挛、功能性的肺血管床面积减少, 导致血管阻力增大和肺动脉压增高, 引发肺血管结构重建, 最终导致为右心衰竭^[1]。

尼可地尔是一种具有多种用途的烟酰胺线粒体 ATP 敏感度钾通道开放剂 (mitochondria ATP – sensi-

作者单位: 310000 杭州, 浙江中医药大学第二临床学院 (鲍丽刚、王海鹏); 浙江省人民医院 (屈百鸣)

通讯作者: 屈百鸣, 电子信箱: qubaiming@163.com

tive K + channel openers, mitoKATPCOs)。有实验研究表明,mitoKATPCOs 尼可地尔具有降低肺血管收缩和抑制肺血管增殖重构的作用,但对慢性栓塞性肺动脉高压的作用及机制目前尚无研究^[2]。通过建立家兔慢性空气栓塞的肺动脉高压模型,研究探讨尼可地尔对家兔慢性栓塞性肺动脉高压及其肺血管结构重建的影响及可能的机制。

材料与方法

1. 材料:健康家兔 36 只,3~4 月龄,体重 1.8~2.3kg,由浙江中医药大学实验动物中心提供。尼可地尔片(中外制药株式会社,进口药品注册证 H20060401),氨基甲酸乙酯注射液(乌拉坦,西安医科大学药厂),4% 多聚甲醛(武汉博士德公司),多道生理信号采集处理系统(RM6240BD 型,成都仪器厂),压力换能器(YJP01,成都仪器厂),GE 公司 Vivid 7 Dimension 超声心动图仪,M3S 探头,频率为(1.5~3.5)MHz。
2. 实验分组和动物模型:慢性空气栓塞性肺动脉高压家兔模型,并结合自身的实验研究建立^[3]。家兔分笼饲养,自由饮水、进食,适应性饲养 1 周后,将家兔随机分为 3 组(每组 12 只):C 组家兔每日给予 2.5ml/kg 的 0.9% 生理盐水灌胃连续 28 天。AE 组家兔每日给予等体积的 2.5ml/kg 的 0.9% 生理盐水灌胃,30min 后经耳缘静脉注入洁净的空气 1ml[0.05ml/(min·kg)],连续 28 天。N 组家兔每日给予等体积的 2.5mg/kg 的尼可地尔片灌胃,30min 后经耳缘静脉注入洁净的空气 1ml[0.05ml/(min·kg)],连续 28 天。
3. 肺动脉压力测定:行超声测量后,用 20% 乌拉坦 4ml/kg 经家兔耳缘静脉注射麻醉,固定^[4,5]。经前正中切口,暴露心脏,棉签推开胸腺组织,显露肺动脉根部。将充满肝素钠的静脉留置针插入肺动脉,退出针芯后接压力换能器和生理记录仪,记录肺动脉压力波形。
4. 右心室肥厚指数(RVHI)测定:以房室沟为界剪去心房

及大血管根部组织,沿室间沟将心室剪成右心室和左心室+室间隔,沾干后电子称量右心室游离壁(RV)及左心室加室间隔(LV+S)湿重。计算公式为:RVHI = RV/LV + S。

5. 肺组织病理学:家兔测压后,放血处死,立即开胸,将心、肺取出,用 4℃ NS 和 0.1mol/L PBS 液反复冲洗。取左下肺叶组织放入 4℃、4% 多聚甲醛固定 4h,然后脱水、石蜡包埋、切片及 HE 染色,评价肺血管病理形态改变,采用 Image Pro Plus 6.0 专业图像分析软件,随机选取直径 50~200μm 的肺小动脉 6 支,计算 TI 和 AI 评估肺小动脉中膜增厚和肺血管重构。计算公式为:TI = 1 - 管腔内径/血管外径, AI = 1 - 管腔面积/血管总面积。
6. 超声心动图测定:家兔纳肛注射水合氯醛(2.5ml/kg)镇静,左侧仰卧位,胸前区涂净胸毛,超声探头置于兔胸骨左侧进行测量,获取心底短轴及心尖四腔切面,测主肺动脉内径。
7. 统计学方法:所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用统计分析软件 SPSS 16.0 进行统计学分析。多组比较采用方差分析(*F* 检验),组间比较采用 *LSD* 法,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 实验动物情况:实验前 3 组家兔体重无统计学差异,C 组 2.02 ± 0.17kg,AE 组 2.02 ± 0.16kg,N 组 1.99 ± 0.11kg,实验后体重也无统计学差异,C 组 2.42 ± 0.18kg,AE 组 2.27 ± 0.17kg,N 组 2.32 ± 0.10kg。第 1 周与 C 组相比,AE 组和 N 组家兔出现活动迟缓和呼吸急促表现,从第 2 周开始,C 组无明显异常,AE 组家兔活动明显下降,嘴唇发绀明显,皮毛无光泽,呼吸急促,N 组上述情况改善。实验期间,C 组正常,AE 组死亡 3 只,N 组死亡 1 只。
2. 家兔血流动力学及右心室重构的情况:详见表 1。

表 1 家兔肺动脉压力及右心室肥厚指数的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	PASP(mmHg)	PADP(mmHg)	mPAP(mmHg)	RV/(LV+S)
C 组	12	18.68 ± 3.00	7.68 ± 1.29	13.20 ± 1.76	0.29 ± 0.02
AE 组	9	32.37 ± 3.00 *	13.49 ± 1.62 *	21.93 ± 1.10 *	0.47 ± 0.13 *
N 组	11	20.47 ± 3.91 #	9.35 ± 1.48 #	13.74 ± 1.86 #	0.31 ± 0.03 #

与 C 组比较,**P* < 0.05;与 AE 组比较,#*P* < 0.05;1mmHg = 0.133kPa

3. 肺血管的病理形态:C 组家兔肺小动脉管壁菲薄,细胞分布均匀、厚薄一致,血管结构清楚(图 1A),AE 组肺小动脉中膜平滑肌细胞增生肥大,管壁普遍增厚,管腔明显狭窄,血管重构情况明显(图 1B),N 组肺小动脉管壁增厚及血管腔狭窄显著减轻,血管重构情况改善(图 1C)。AE 组肺小动脉的 TI(0.75 ± 0.13)和 AI(0.93 ± 0.09),较 C 组肺小动脉的 TI(0.27 ± 0.11)和 AI(0.45 ± 0.13)明显增加

(*P* 均 < 0.05),而 N 组肺小动脉的 TI(0.38 ± 0.12)和 AI(0.60 ± 0.16),较 AE 组明显降低(*P* 均 < 0.05,图 2)。

4. 超声心动图评估:AE 组家兔主肺动脉内径(0.93 ± 0.14cm)与 C 组主动脉内径(0.57 ± 0.06cm)相比,差异有统计学意义(*P* < 0.05),N 组主肺动脉内径(0.78 ± 0.06cm)与 AE 组主动脉内径比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

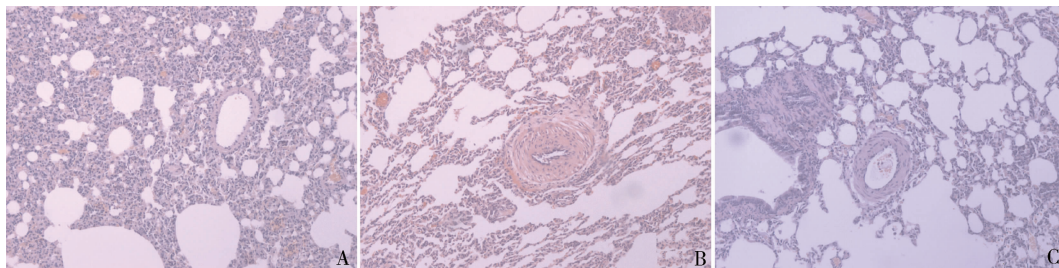


图1 家兔肺小动脉的病理改变(HE, ×200)

A. C组; B. AE组; C. N组

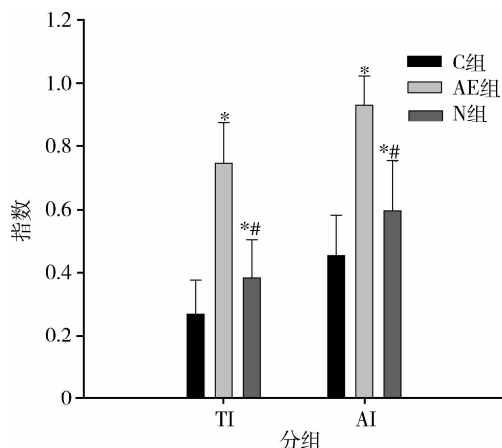


图2 家兔肺小动脉的厚度指数(TI)和面积指数(AI)

与C组比较, * $P < 0.05$; 与AE组比较, # $P < 0.05$

讨 论

慢性阻塞性肺动脉高压是肺栓塞的并发症,但对其流行病学情况仍不十分清楚,根据 Pengo 等^[6]研究表明,急性肺栓塞患者的慢性血栓栓塞性肺高压的累积发病率 3.8%。本研究结果显示,慢性空气栓塞 28 天后家兔肺动脉压力显著升高且出现右心室肥厚,肺血管重构明显, TI 及 AI 明显增加,主肺动脉干扩张,表明慢性空气栓塞性肺动脉高压家兔模型建立成功。慢性阻塞性肺高压形成是一个多因素参与下的错综复杂的过程,其具体机制至今尚不完全清楚,目前研究认为是由于肺栓塞后,出现肺血管内皮功能不全,激活肺血管中膜平滑肌细胞的表型转化、迁移并增殖,之后引起渐进性的肺血管重构,导致肺动脉压力逐渐升高^[7,8]。越来越多的实验研究表明肺血管重构是不同病因肺动脉高压的病理基础,肺小血管中膜肥厚、内膜增生为主要特点的增殖性病变是最具特征性的病理改变^[9,10]。一旦肺血管出现增殖重构性病变,将进展为不可逆的肺动脉高压,是目前临床治疗上面临的难题。因此改善内皮功能,阻止肺血管的增殖重构是治疗和改善阻塞性肺动脉高压的关键环节。

KATP 是由内向整流性钾通 Kir6. x 家族和磺脲类受体 SUR 组成的八聚体。近年研究表明 KATP 活性状态与肺动脉高压发生发展密切相关^[11]。生理情况下,肺动脉平滑肌膜 KATP 通道不开放;缺血缺氧损伤等病理因素刺激下可代偿性开放,拮抗肺血管收缩反应及血管重构。根据通道的亚细胞定位,将肺血管 KATP 通道分为细胞膜 KATP (SarcKATP) 通道及 mitoKATP 通道。Horinaka 等^[12]研究表明尼可地尔除能激活 mitoKATP 外,在增加内皮源性一氧化氮合酶(eNOS)表达过程中起着主导的作用。eNOS 作为一种关键性的调节酶,其表达的变化与肺动脉高压诸多病理变化密切相关^[2,13]。

尼可地尔是近年来研制的一种具有多种用途的 mitoKATP 通道开放剂, Edwards 和 Weston 根据化学结构不同将其归为烟酰胺类。目前尼可地尔在临床上主要用于治疗心血管疾病,大型临床研究显示在心绞痛及心肌梗死的治疗中均有良好的疗效^[14]。此外尼可地尔可减轻和部分逆转心肌缺血引起的心室重构,显著改善心力衰竭者的血流动力学^[15]。因此尼可地尔可能具有广阔的临床应用前景,但是尼可地尔对肺动脉高压和防治肺血管结构重建的作用机制如何,目前缺乏比较系统的研究。根据国内外现有的研究推测,尼可地尔治疗肺高压的可能机制有:①通过开放肺动脉平滑肌细胞膜 KATP 通道、 K^+ 外流增加,细胞膜超极化、电压依赖性钙通道关闭、 Ca^{2+} 内流减少、胞内 $[Ca^{2+}]$ 下降。可降低血管平滑肌对 Ca^{2+} 敏感度;影响细胞内的磷酸化酶而产生舒血管效应;②通过增加肺血管 eNOS 表达,调节内皮功能,平衡肺动脉平滑肌细胞的增殖与凋亡机制,实现抗增殖重构的作用;③特有的硝酸盐样效应发挥额外的舒张肺血管作用。Sahara 等^[2]用野百合碱诱导的 PAH 大鼠的研究证实,尼可地尔改善野百合碱诱导的 PAH 作用明显。俞硯喆等 HPH 大鼠的研究也证明有相关的作用^[16]。

但是慢性栓塞性肺动脉高压的发病机制与野百合碱诱导的 PAH 和 HPH 仍有些差别,为模拟临床上慢性血栓性肺动脉高压,本实验采用家兔慢性空气栓塞建立肺动脉高压模型,实验结果显示,与 AE 组相比,N 组肺动脉压力及右心室肥厚指数明显降低,肺血管重构等病理改变及 TI 和 AI 均明显减轻,主肺动脉扩张程度改善。此实验表明尼可地尔对家兔的慢性栓塞性肺高压具有良好的治疗作用。

综上所述,mitoKATPCOs 尼可地尔能有效改善慢性空气栓塞诱导的家兔动脉肺高压,抑制肺血管的增殖重构及右心室肥厚,将来可能会成为临床上治疗慢性栓塞性肺高压的良好药物。然而目前研究不能诠释尼可地尔药物对慢性栓塞性肺高压的肺血管结构重构的具体分子干预机制,以及最佳的应用于临床治疗的方法,尚有待进一步深入研究探讨。

参考文献

- 1 Park MH. Advances in diagnosis and treatment in patients with pulmonary arterial hypertension[J]. Catheterization and Cardiovascular Interventions,2008,71(3):205-213
- 2 Sahara M,Sata M,Morita T, *et al.* Nicorandil attenuates monocrotaline induced vascular endothelial damage and pulmonary arterial hypertension[J]. PLoS ONE,2012,7(3):e1932-e1944
- 3 Zhou X,Wang D,Claudia Y, *et al.* A pulmonary hypertension model induced by continuous pulmonary air embolization[J]. Journal of Surgical Research, 2011,170(1):e11-e16
- 4 王伟,张宜乾,吴树明.兔高动力性肺动脉高压模型的建立[J].中国病理生理杂志,2006,22(3):612-613
- 5 Liu R,Wu S,Cao G, *et al.* Transfection of human hepatocyte growth factor gene inhibits advancing pulmonary arterial hypertension induced by shunt flow in a rabbit model[J]. Transplant Proceedings,2013,45

- (2):705-712
- 6 Pengo V,Lensing AW,Prins MH, *et al.* Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after pulmonary embolism[J]. N Engl J Med,2004,350(22):2257-2264
- 7 Auger WR,Fedullo PF. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension[J]. Semin Respir Crit Care Med,2009,30(4):471-483
- 8 Lang I,Kerr K. Risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension[J]. Proc Am Thorac Soc,2006,3(7):568-570
- 9 Lang IM,Klepetko W. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension:an updated review[J]. Curr Opin Cardiol,2008,23(6):555-559
- 10 Stenmark KR,McMurtry IF. Vascular remodeling versus vasoconstriction in chronic hypoxic pulmonary hypertension:a time for reappraisal?[J]. Circ Res,2005,97(2):95-98
- 11 Ko EA,Han J,Jung ID, *et al.* Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells[J]. J Smooth Muscle Res,2008,44(2):65-81
- 12 Horinaka S,Kobayashi N,Higashi T, *et al.* Nicorandil enhances cardiac endothelial nitric oxide synthase expression via activation of adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel in rat[J]. J Cardiovasc Pharmacol,2001,38(2):200-210
- 13 王慧,解卫平,左祥荣,等.埃他卡林对长期低氧大鼠肺组织 eNOSmRNA 和蛋白表达的影响[J].中国药理学通报,2009,25(12):1594-1598
- 14 The IONA Study Group. Trial to show the impact of nicorandil in angina (IONA): design, methodology and management[J]. Heart,2001,85(6):e9(1-7)
- 15 Node K,Asanuma H,Ogita H, *et al.* Opening of the adenosine triphosphate sensitive potassium channel attenuates cardiac remodeling induced by long-term inhibition of nitric oxide synthesis[J]. J Am Coll Cardiol,2002,40(5):991-997

(收稿日期:2013-06-15)

(修回日期:2013-06-24)

SHCBP1 在肝细胞癌中的表达及其临床意义

陶汉川 顾澄宇 蔡兵

摘要 **目的** 研究 SHCBP1 基因在人肝癌组织中的表达情况,探讨 SHCBP1 基因在肝细胞癌发生发展中的作用。**方法** 采用半定量 RT-PCR、荧光定量 PCR(实时 PCR)、免疫组织化学法等方法检测 SHCBP1 基因在 52 例临床肝细胞癌样本的癌及癌旁组织和人正常组织的表达情况,应用统计学方法分析结果。**结果** ①SHCBP1 基因 mRNA 表达水平在人正常组织中表达具有明显差异;在肝细胞癌样本中明显高于癌旁组织($P < 0.05$);②免疫组化结果检测显示 SHCBP1 蛋白在癌旁组织组织中低表达或不表达,而在肝细胞癌组织中表达明显增高,且棕色染色区域主要集中在肿瘤细胞边缘细胞膜位置;③Western blot 检测结果显示 SHCBP1 蛋白在肝细胞癌样本中高表达,癌旁组织中不表达或低表达($P < 0.05$);④临床统计资料分析显示 SHCBP1 基因的表达

作者单位:214023 南京医科大学附属无锡市人民医院肝胆外科

通讯作者:蔡兵,电子信箱:caibing@wuxiph.com