

# 大鼠肺血管重塑动物模型的建立及 HIF-1 $\alpha$ 在其中的作用

许 果 赵兴吉 向小勇 王继相 余 凯

**摘 要** **目的** 探讨大鼠左全肺切除后是否导致肺血管重塑,以及低氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )在肺血管重塑中的作用。**方法** 切除大鼠左全肺建立动物模型,12周后检测平均肺动脉压(mPAP)和动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>),在电镜、光镜下观察大鼠肺小血管结构改变,计算其肌型动脉(MA)、部分肌型动脉(PMA)、非肌型动脉(NMA)、中膜厚度(MTV)、中膜面积(MAV)及其百分比作为肺血管重塑指标。通过免疫组织化学法检测 HIF-1 $\alpha$  在肺动脉管壁的表达。**结果** 实验组 mPAP、MA%、PMA%、MTV、MAV、MTV% 和 MAV% 明显高于对照组( $P < 0.01$ ),PaO<sub>2</sub>、NMA% 明显低于对照组( $P < 0.01$ )。实验组肺动脉壁 HIF-1 $\alpha$  的 IOD 值(26.47  $\pm$  4.16)明显高于对照组(6.12  $\pm$  2.14, $P < 0.01$ )。相关分析表明,HIF-1 $\alpha$  的表达强度与 PaO<sub>2</sub> 呈负相关,与 MTV% 和 MAV% 呈正相关。**结论** 通过大鼠左全肺切除可以建立肺血管重塑动物模型。低氧血症是大鼠左全肺切除后肺血管重塑的重要因素,HIF-1 $\alpha$  在低氧导致的肺血管重塑过程中起着重要作用。

**关键词** 肺血管重塑 动物模型 低氧诱导因子-1 $\alpha$

**中图分类号** R655.3

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.02.033

**Pulmonary Vascular Remodeling in a Rat Model and the Role of HIF-1 $\alpha$  in the Pathogenesis.** Xu Guo, Zhao Xingji, Xiang Xiaoyong, et al. Department of Cardiothoracic Surgery, Four Zero Four Hospital, Institute of Cardiovascular Diseases, Mianyang, Sichuan 621000, China

**Abstract Objective** To investigate the existence of the pulmonary vascular remodeling after left lung pneumonectomy in rats and the role of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ) in the pulmonary vascular remodeling. **Methods** To establish an animal model created by open-chest left lung pneumonectomy. After 12 weeks of feeding, the mean pulmonary artery pressure (mPAP) and partial pressure of oxygen in artery (PaO<sub>2</sub>) of each rat were measured. The ultrastructures of intra-acinar pulmonary artery of lung specimens were examined by electron microscope. Muscularize degree of three kinds of small pulmonary vascular (muscularized artery MA, partially muscularized artery PMA, non-muscularized artery NMA) were observed by light microscope, and the percentage of each kind of pulmonary vascular (MA%, PMA%, NMA%) were calculated. Vascular external diameter, media thickness of vessel (MTV), total vascular area, media area of vessel (MAV), MTV% and MAV% were calculated as criterion of pulmonary vascular remodeling. The expressions of HIF-1 $\alpha$  in artery were detected by immunohistochemistry. **Results** mPAP, MA%, PMA%, MTV, MAV, MTV% and MAV% in the experimental group were much higher than those in the control group ( $P < 0.01$ ). PaO<sub>2</sub>, NMA% were significantly lower than those in the control group ( $P < 0.01$ ). The meaning IOD value of HIF-1 $\alpha$  expressed in pulmonary arterial wall were 26.47  $\pm$  4.16 in experimental group, which were much higher than those in the control group (6.12  $\pm$  2.1,  $P < 0.01$ ). Linear correlation analysis showed that the expression of HIF-1 $\alpha$  was correlated with MTV% and MAV% positively, and correlated with PaO<sub>2</sub> negatively. **Conclusion** The animal model of pulmonary vascular remodeling can be successfully established by left lung pneumonectomy. Hypoxia is a key factor in the development of pulmonary vascular remodeling, HIF-1 $\alpha$  may play an important role in the pathogenesis.

**Key words** Pulmonary vascular remodeling; Animal model; Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$

肺切除是临床上治疗肺部疾病的重要术式,由于治疗手段的进步,全肺切除的比例逐渐下降,但随着

肺癌和肺结核等良性肺疾病发生率的增加,全肺切除的数量却有明显增加<sup>[1,2]</sup>。目前有关全肺切除的研究主要是围术期处理,对术后远期疗效的评价缺乏病理学依据。本实验通过切除大鼠左全肺建立动物模型,以模拟临床全肺切除术后的病理生理改变,了解远期是否发生肺血管重塑和肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH),探讨肺血管重塑可能的机制。

作者单位:621000 四川绵阳四〇四医院胸心外科、绵阳市心脑血管疾病研究所(许果、王继相、余凯);400014 重庆市急救医疗中心胸心外科(赵兴吉);400016 重庆医科大学附属第一医院胸心外科(向小勇)

通讯作者:赵兴吉,电子邮箱:donaldxu1975@aliyun.com

### 材料与与方法

1. 实验动物及分组: 雄性 SD 大鼠 24 只, 随机分为两组: 实验组 12 只, 行左全肺切除; 对照组 12 只, 行假手术。术后饲养 12 周。

2. 动物模型的建立: 3.5% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 行气管切开, 置入自制气管导管, 接小动物呼吸机。沿左胸第 5 肋间进入胸腔, 切除左全肺。对照组麻醉同前, 沿左胸第 5 肋间进入胸腔, 不切除左全肺。

3. 肺动脉压力测定: 采用右心导管法测定平均肺动脉压 (mPAP)。

4. 动脉血氧分压 (PaO<sub>2</sub>) 测定: 从左心室抽血, 用于测定 PaO<sub>2</sub>。

5. 电镜标本制备及观察: 切除右肺, 从外周部位及肺门水平切取 2~3 块 1~2mm 组织块, 处理后在电镜下观察肺腺泡内动脉内皮细胞和平滑肌细胞的大小、形态、排列形式、细胞内部结构的变化、表型的转化等。

6. 光镜标本制备及观察: 肺组织标本用 10% 中性甲醛固定, 用石蜡包埋, 沿右肺门横断取材, 分别作 HE 及免疫组化染色。(1) 3 型肺小血管不同肌化程度百分比的测定: 在 400 倍光镜下, 观察并计数肺小血管 (15μm < 直径 ≤ 200μm) 中肌型动脉 (muscularized artery, MA)、部分肌型动脉 (partially muscularized artery, PMA) 及非肌型动脉 (non-muscularized artery, NMA) 的数目, 分别计算它们各占肺小血管总数的百分比, 反映肺小血管的肌化程度。每例标本观测 10 个血管。(2) 肺中、小型动脉相对中膜厚度及面积的测定: 应用 Mias 图像分析系统测取动脉外径、中膜厚度 (media thickness of vessel, MTV)、血管总面积及中膜面积 (media area of vessel, MAV), 分别计算中膜厚度与动脉外径的比值 (MTV%), 中膜面积与血管总面积的比值 (MAV%), 作为肺血管重塑的指标。每只大鼠各测量 10 个肺中型动脉 (100μm < 直径 ≤ 200μm) 和肺小型动脉 (15μm < 直径 ≤ 100μm) 上述各值, 并求其均值。

7. 肺组织免疫组织化学染色 SABC 法: 操作按试剂盒说明进行。

8. 图像分析: 对免疫组织化学染色强度进行测量, 每张切片均测量其背景灰度, 以消除切片间的误差。用 Image-Pro Plus 图像分析系统心肺血管分析软件测量所选血管管壁阳性染色积分光密度 (integrated optical density, IOD) 作为肺动脉管壁 HIF-1α 的相对含量。

9. 统计学方法: 采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理。实验数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 统计方法采用独立样本 *t* 检验, *Pearson* 检验进行直线相关分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 平均肺动脉压与动脉血氧分压的比较: 实验组 mPAP (31.91 ± 1.98 mmHg) 明显高于对照组 (17.82 ± 1.94 mmHg), PaO<sub>2</sub> (77.46 ± 5.36 mmHg) 明显低于对照组 (90.39 ± 6.02 mmHg), 差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。

2. 3 型肺小血管不同肌化程度百分比的比较: 实验组肺小血管中 MA% 和 PMA% (22.50 ± 4.52, 23.33 ± 4.92) 明显高于对照组 (13.33 ± 4.92, 14.17 ± 5.15, *P* < 0.01), NMA% (54.17 ± 5.15) 明显低于对照组 (72.50 ± 7.54, *P* < 0.01)。

3. 肺小血管结构改变: HE 染色显示对照组的肺小血管管壁较薄, 内膜光滑, 管腔较大, 平滑肌细胞走行一致 (图 1)。而实验组肺小血管收缩, 管壁增厚, 管腔狭窄, 肺血管平滑肌细胞异常增殖 (图 2)。图像分析表明, 实验组大鼠肺中、小型动脉 MTV、MAV、MTV% 和 MAV% 明显高于对照组 (*P* < 0.01, 表 1、表 2)。

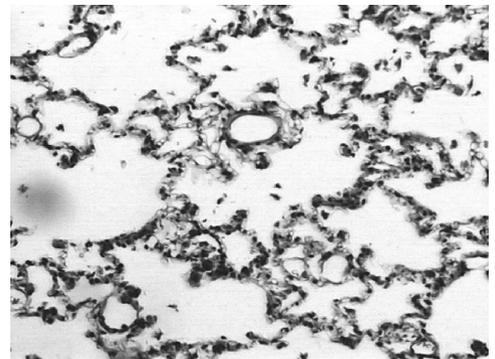


图 1 对照组大鼠肺小动脉 HE 染色 (×100)

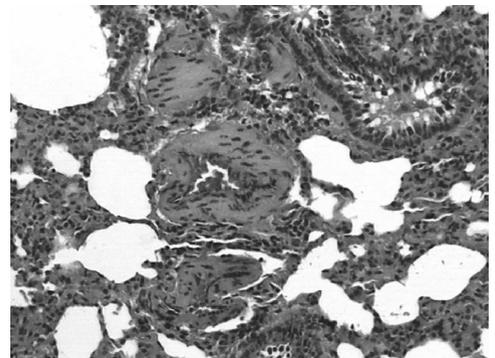


图 2 实验组大鼠肺小动脉 HE 染色 (×100)

表1 实验组和对照组大鼠肺中动脉外径、中膜厚度、MTV%、血管总面积、中膜面积及MAV%的比较

组别	外径(μm)	中膜厚度(μm)	MTV%	血管总面积(μm <sup>2</sup> )	中膜面积(μm <sup>2</sup> )	MAV%
对照组	164.97 ± 19.10	9.82 ± 1.10	5.99 ± 0.76	1808.88 ± 172.68	471.46 ± 71.52	25.83 ± 1.87
实验组	171.97 ± 29.90	12.10 ± 1.72*	7.09 ± 0.57*	1872.23 ± 125.29	770.36 ± 57.20*	41.16 ± 1.70*

与对照组比较, \*P < 0.01

表2 实验组和对照组大鼠肺小动脉外径、中膜厚度、MTV%、血管总面积、中膜面积及MAV%的比较

组别	外径(μm)	中膜厚度(μm)	MTV%	血管总面积(μm <sup>2</sup> )	中膜面积(μm <sup>2</sup> )	MAV%
对照组	76.57 ± 14.36	5.49 ± 1.99	6.96 ± 1.30	768.13 ± 208.51	285.89 ± 70.03	37.58 ± 3.09
实验组	74.79 ± 12.98	12.15 ± 3.58*	15.94 ± 1.97*	757.68 ± 166.66	538.12 ± 138.46*	71.68 ± 6.91*

与对照组比较, \*P < 0.01

4. 肺腺泡内动脉超微结构的变化:电镜观察到对照组肺动脉内皮细胞胞体扁平,细胞器结构正常。实验组肺动脉内皮细胞体积增大,基底变窄,呈柱状突入管腔,细胞器丰富,甚至见内皮细胞肿胀,胞质内大量空泡形成。对照组中膜平滑肌细胞胞体小,平滑肌细胞呈收缩表型。实验组中膜平滑肌细胞数量增多,胞体肥大,细胞器增多,不同程度向合成表型转化。平滑肌细胞间及肺间质见胶原纤维密集,细胞外基质增多(图3~图5)。

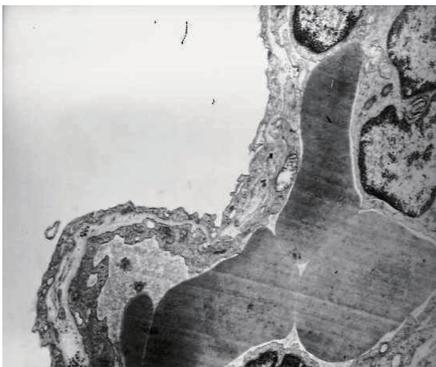


图3 对照组肺血管内皮细胞胞体扁平,结构正常(×8000)



图4 实验组肺腺泡内动脉内皮细胞呈高柱状,突入管腔(×8000)

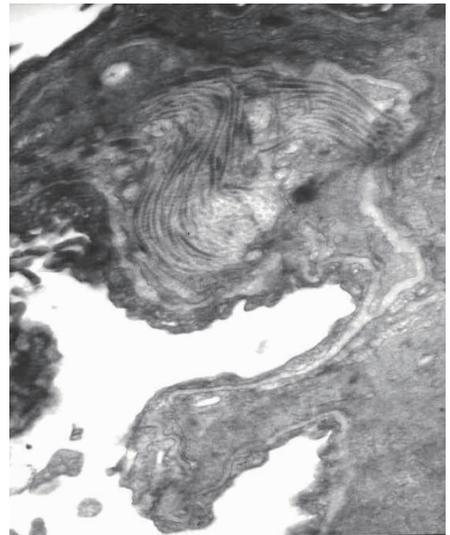


图5 实验组间质胶原纤维堆积(×5000)

5. 肺小血管壁 HIF-1α 的表达:经灰度扫描,实验组肺动脉壁 HIF-1α 的 IOD 值(26.47 ± 4.16)明显高于对照组(6.12 ± 2.14),差异有统计学意义(P < 0.01)。相关分析表明,HIF-1α 阳性染色强度与 PaO<sub>2</sub> 呈负相关(r = -0.712, P < 0.01),与肺小动脉 MTV% (r = 0.657, P < 0.05)及 MAV% (r = 0.684)呈正相关,差异有统计学意义(P < 0.05)。

### 讨 论

虽然 PH 的病因复杂多样,但肺血管重塑是其共同的病理改变。既往许多研究者用多种动物和不同的方法建立过肺血管重塑和 PH 动物模型,以模拟不同的发病因素,包括利用大动物建立体-肺分流,但由于花费大、开胸手术难度较大、病死率较高,因此限制了其进一步推广<sup>[3-5]</sup>。经颈部动静脉血管吻合,或腹主动脉-下腔静脉建立左向右分流 PH 模型,该方法动物病死率高,分流量不易控制,分流处血管通畅率低,实验结果容易出现偏差<sup>[6,7]</sup>。有研究通过给大

鼠注射野百合碱 (monocrotaline, MCT), 导致肺血管内皮损伤, 发生肺血管重塑, 从而形成 PH, 但 MCT 的致伤作用受诸如大鼠种系、性别等多因素影响, 使模型稳定性下降<sup>[8]</sup>。还有研究通过直接吸入低氧气体来诱发 PH, 这种模型低氧是短暂的、一过性的, 不是继发于肺的换气功能障碍, 不能模拟终末期肺动脉高压的组织学改变<sup>[9]</sup>。由于上述缺陷, 这些模型都不能完全模拟外科全肺切除后患者的病理生理改变。

本研究采用左全肺切除方法建立的动物模型, 术后 12 周测得 mPAP 明显升高, 表明 PH 动物模型建立成功。光镜和电镜检查下的病理改变导致肺血管横截面积显著增加, 肺循环阻力持续升高, 与文献报道的肺动脉高压组织学改变是一致的, 表明实验动物发生了肺血管重塑。

在该模型中, 除行肺切除外, 未施加其他干预措施, 观察时间较长, 能较准确地模拟临床全肺切除术后的病理生理改变。由于大鼠体积小, 饲养和管理方便, 实验费用低廉, 该方法手术操作简单, 不需吻合血管, 单人肉眼即可完成, 也不需要显微镜等特殊器械, 避免了许多精细复杂的操作和吻合口出血、梗阻、狭窄等带来的实验结果偏差, 手术过程相对简单, 动物存活率高, 实验重复性好。因此, 本模型在肺血管重塑的研究中有应用价值, 为进一步研究其发病机制进而探索干预途径提供了实验平台。

HIF-1 是一种转录因子, 由  $\alpha$  和  $\beta$  两个蛋白亚基组成, HIF-1 $\alpha$  多肽链是唯一的氧调节亚单位, 决定 HIF-1 的活性。HIF-1 $\alpha$  是细胞最早感受缺氧刺激的因子之一, 常氧条件下 HIF-1 无 DNA 结合活性, 而在低氧条件下其表达显著升高<sup>[10]</sup>。本研究检测到实验组大鼠存在慢性低氧血症, 在其肺动脉内皮细胞, 平滑肌细胞和支气管内皮细胞等处有明显的 HIF-1 $\alpha$  免疫阳性表达。说明由于大鼠左肺切除导致的低氧血症刺激诱导了肺内 HIF-1 $\alpha$  表达增加。HIF-1 $\alpha$  可诱导大量与低氧应答有关的下游目的基因的表达, 如 VEGF、EPO、iNOS 等<sup>[11,12]</sup>。在这些细胞因子作用下, 血管平滑肌细胞 (PASMC) 持续收缩和大量增殖, 使血管中膜增厚和非肌性血管肌化, 血管腔变窄, 同时 PASMC 合成分泌的细胞外基质增多, 使肺血管弹性回缩力和顺应性降低, 血流阻力增加, 促进 PH 形成<sup>[13-15]</sup>。这与本研究中观察到的病理改变一致。

因此, 笔者认为低氧血症是大鼠左全肺切除后肺

血管重塑的重要因素。当低氧刺激通过血流到达血管壁时, 引起血管内皮细胞和平滑肌细胞的分泌功能和细胞骨架的改变, 诱导合成和分泌 HIF-1 $\alpha$  增加, 从而参与了低氧性肺血管重塑过程。

#### 参考文献

- 徐小雄, 张鹏, 段亮, 等. 同济大学附属上海肺科医院 20 年间手术治疗肺癌患者疾病谱的变化 [J]. 中华胸心血管外科杂志, 2014, 30(1):1-10
- Owen RM, Force SD, Pickens A, et al. Pneumonectomy for benign disease: analysis of the early and late outcomes [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2013, 43(2):312-317
- Galie N, Manes A, Palazzini M, et al. Management of pulmonary arterial hypertension associated with congenital systemic-to-pulmonary shunts and Eisenmenger's syndrome [J]. Drugs, 2008, 68(8):1049-1066
- Pfister S, Somberg L, Lowry T, et al. Mechanisms underlying increased reactivity of pulmonary arteries contralateral to a localized high-flow anastomosis [J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2011, 141(2):425-431
- 吕民, 符韶鹏, 王巍, 等. 高肺血流肺动脉高压形成机制的研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(9):1240-1244
- 龚兴瑞, 陈永梅, 许先成, 等. 左向分流型肺动脉高压动物模型的建立 [J]. 广东医学, 2013, 34(4):521-522
- 陈传斯, 庞玉生, 马建法, 等. 高肺血流性肺动脉高压大鼠肺间质的病理变化 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2014, 29(1):15-18
- 赵瑾, 刘蓉, 李洪涛, 等. 野百合碱诱导的肺动脉高压小型猪的病理改变 [J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(6):867-869
- 刘银花, 杨汉文, 王小同, 等. 羟胺对慢性低氧高二氧化碳大鼠肺动脉高压的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(11):2171-2174
- 王莘莘, 孔繁平, 陈学群, 等. 低氧细胞应激的 HIF-1 信号通路 [J]. 浙江大学学报:医学版, 2011, 40(5):559-566
- Shimoda LA, Semenza GL. HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(2):152-156
- Chowdhury R, Godoy LC, Thiantanawat A, et al. Nitric oxide produced endogenously is responsible for hypoxia-induced HIF-1 $\alpha$  stabilization in colon carcinoma cells [J]. Chem Res Toxicol, 2012, 25(10):2194-2202
- Yang XR, Lin MJ, James SK. Physiological functions of transient receptor potential channels in pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. Adv Exp Med Biol, 2010, 661(5):109-122
- Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension [J]. J Clin Invest, 2012, 122(12):4306-4313
- Sakai N, Chun J, Duffield JS, et al. LPA1-induced cytoskeleton reorganization drives fibrosis through CTGF-dependent fibroblast proliferation [J]. FASEB J, 2013, 27(5):1830-1846

(收稿日期:2015-06-11)

(修回日期:2015-07-08)