

实验研究

中药脑肺康对大鼠缺氧性肺动脉高压治疗作用的探讨

陈颖¹ 阮英茹¹ 李莉¹ 朱明娟² 褚雁¹ 李晓惠¹ 周晓梅³ 司文学¹ 徐新林¹

摘要 目的:探讨中药脑肺康对大鼠缺氧性肺动脉高压的治疗作用及其机理。方法:设立对照组、常压缺氧模型组、脑肺康3个剂量给药组及西药合心爽对照组,用免疫组化法观察肺内血红素氧合酶(HO)-1、内皮型和诱导型一氧化氮合酶(eNOS和iNOS)表达的变化。结果:脑肺康中、大剂量组有明显减轻肺动脉高压性结构重塑、保护血管内皮细胞的功能,可能是通过促进eNOS表达和抑制HO-1、iNOS的表达发挥作用。结论:脑肺康对血管内皮及超微结构的保护作用优于合心爽。

主题词 高血压,肺性/中医药疗法 @ 脑肺康

缺氧性肺动脉高压是慢性阻塞性肺疾病(COPD)、高山病常见的危害较大的并发症之一,但迄今尚无理想的治疗方法。中药脑肺康(又名814)是中国医学科学院血液病研究所近些年来从活血化瘀中药丹参中提取的新药。我们以往的研究表明,脑肺康有明显的抗缺氧、保护血管内皮细胞、防治肺气肿等功能^[1]。本实验的目的是观察脑肺康对大鼠缺氧性肺动脉高压的治疗作用,并与临床上治疗肺动脉高压的钙离子拮抗剂合心爽对比,初步探讨其药效。

内源性一氧化碳(CO)是与一氧化氮(NO)相似的血管舒张因子和血管重塑抑制剂,CO和NO分别在血红素氧合酶(HO)和一氧化氮合酶(NOS)作用下生成。HO有3种同工酶,其中HO-1又称诱导型HO,可被缺氧等多种因素诱导^[2]。HO-1、eNOS和iNOS被认为是受缺氧刺激而在肺组织中发生变化的酶,本实验还观察了脑肺康对慢性缺氧大鼠肺小动脉(SPA)(外径<200μm)HO-1、eNOS和iNOS表达的影响,以探讨其可能的作用机理。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组及慢性缺氧模型的复制:Wistar大鼠60只,体重180~200g,雌雄各半(北京首都医科大学动物饲养所)。随机分为正常对照组、模型组、脑肺康

小剂量组(2.5g生药/kg)、中剂量组(25g生药/kg)、大剂量组(50g生药/kg)及合心爽对照组(15mg/kg)共6组,每组10只。合心爽由天津田边制药公司生产,批号002430号。脑肺康糖衣片(主要由丹参组成,每片含生药0.3g)由中国医学科学院血液病研究所研制,天津同仁堂制药厂生产(津卫药制剂第27号)。用常压缺氧方法^[3]复制模型:氧气浓度(10±1)%,8小时/天,6天/周,持续6周。各治疗组均从缺氧2周后开始灌胃给药,每天给药1次,用药至缺氧4周结束。正常对照组和模型组同期给予等体积生理盐水。光镜和电镜取材、制片方法同以往本组报告^[4]。

1.2 观测指标

右室收缩压(RVSP)、右心肥大指数(RVHI)和肺组织形态学定量:按以往本组报告^[4,5]的方法测定RVSP,计算RVHI,测定和计算平均SPA中膜厚度百分比(MT%)和平均中膜面积百分比(MS%),每例测20个SPA。透射电镜进行超微结构观察。

血液循环内皮细胞(CEC)检测:按以往本组报告的方法^[4]分离CEC,显微镜下观察细胞形态并进行计数。每一标本计数4次,结果取其平均值,以每立方毫米中内皮细胞个数表示。

肺组织匀浆上清液环磷酸鸟苷(cGMP)水平测定:左肺匀浆,采用¹²⁵I标记的环磷酸鸟苷(¹²⁵I-cGMP)放射免疫竞争抑制法,按试剂盒(上海中医药大学同位素室)说明操作。

肺组织HO-1 Western印迹杂交和免疫组织化学检测:新鲜肺组织匀浆、离心后取上清与等体积2×上样缓冲液混合,上样,电泳,转膜,加1:1000稀释的HO-1兔抗鼠多克隆抗体室温1小时,二抗室温1小时,DAB显色,照相,扫描,测定杂交条带的光密度值。正常组大鼠脾组织作阳性对照。结果以HO-1各杂交带光密度除以内对照β-actin各杂交带光密度值,以排除蛋白上样量差异造成的误差。应用显微—微机图像分析系统对SPA的阳性细胞进行色度分析,色度比为0计0分,<10计1分,10~20计2分,>20计3分。0分表示阴性,1分表示弱阳性,3分表示强阳性。每例肺切片选择15~20个血管进行分析,计算平均值,每组

基金项目:国家科委“九五”攻关资助项目(96-906-02-16)

1 中国医学科学院、中国协和医科大学阜外心血管病医院病理科,北京阜成门外北礼士路167号(100037)

2 中国医学科学院、中国协和医科大学天津血液病研究所

3 中国医学科学院、中国协和医科大学基础医学研究所

收稿日期:2002-06-13;修回日期:2002-07-30

表 1 各组 RVSP、RVHI、MT%、MS% 比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	RVSP(mmHg)	RVHI(%)	MT%	MS%
正常对照组	23.83 ± 3.37(7)	18.04 ± 2.75(7)	19.63 ± 1.58(6)	29.35 ± 2.52(7)
模型组	44.51 ± 4.94(7)**	41.12 ± 2.61(7)**	34.00 ± 2.21(6)**	49.21 ± 2.10(6)**
脑肺康小剂量组	42.29 ± 9.76(7)**#	21.73 ± 3.43(7)△*	32.19 ± 2.33(6)**#	44.12 ± 2.98(6)**△#
脑肺康中剂量组	34.86 ± 6.54(7)△**	20.80 ± 4.24(7)△	26.78 ± 2.48(7)△**	37.70 ± 1.57(7)△**
脑肺康大剂量组	33.00 ± 7.00(7)△**	21.25 ± 3.53(7)△	21.90 ± 1.40(6)△*	35.17 ± 2.34(6)△**
合心爽对照组	28.67 ± 4.21(7)△*	24.26 ± 4.50(7)△**	23.71 ± 3.29(7)△*	33.32 ± 4.06(7)△

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.01$; 与合心爽对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 括号内为动物数

选 6~7 例, 再进行组间比较。

肺组织 eNOS 和 iNOS 免疫组织化学检测: 方法如前所述, 一抗的稀释度分别为: eNOS(兔抗鼠多克隆抗体, Santa Cruze 公司) 1:120 稀释, iNOS(兔抗鼠多克隆抗体, Santa Cruze 公司) 1:400 稀释。

统计分析: 采用 SPSS 10.0 统计软件包, 运用单因素方差分析方法进行统计。

2 结果

各组 RVSP、RVHI、肺组织显微及超微结构和形态定量比较: 表 1 示, 模型组 RVSP 和 RVHI 显著高于正常对照组(P 均 < 0.01)。正常对照组肺血管、支气管、肺泡等未见异常, 电镜下 SPA 内皮细胞、平滑肌细胞及间质胶原正常。模型组 SPA 中膜较正常对照组明显增厚, MT% 和 MS% 均显著高于正常对照组(P 均 < 0.01)。电镜示血管内皮细胞线粒体不同程度地肿胀, 嵴溶解, 结构模糊, 内皮表面不平整, 内皮细胞胞质蚧状突起增多, 有的内皮细胞胞质表层有坏死脱落, 可见血小板粘集; 平滑肌细胞粒体等细胞器增多; 肺泡上皮细胞多数线粒体肿胀, 嵴消失, 空泡化。脑肺康小剂量组上述各指标仍显著高于正常对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 超微结构的改变与模型组相似; 脑肺康中剂量及大剂量组、合心爽对照组 RVSP、RVHI、MT% 和 MS% 均显著低于模型组(P 均 < 0.01), 电镜下脑肺康中剂量组动脉内皮细胞突起较模型组减少, 大部分内膜平整, 结构基本正常, 平滑肌细胞偶见嵴稀疏, 大部分正常。肺泡上皮部分恢复正常, 部分仍有线粒体肿胀、空泡化。脑肺康大剂量组肺小血管内皮、平滑肌结构恢复正常, 肺泡上皮结构亦正常。合心爽对照组血管内皮细胞肿胀、坏死脱落, 肺泡上皮细胞线粒体肿胀, 内质网扩张, 与模型组比较无显著性差异。脑肺康小、中剂量组 RVSP、MS%, 小剂量组 MT% 与合心爽对照组比较, 差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而大剂量组各项指标与合心爽对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。

各组 CEC 检测结果比较: 表 2 示, 模型组 CEC 数

明显高于正常对照组($P < 0.01$), 脑肺康中、大剂量组 CEC 数均显著低于模型组($P < 0.01$), 而与正常对照组比较差异无显著性, 脑肺康小剂量组 CEC 也显著低于模型组($P < 0.05$), 但仍高于正常对照组($P < 0.05$); 合心爽对照组 CEC 与模型组比较差异无显著性, 而与正常对照组差异有显著性($P < 0.05$)。

各组肺匀浆上清液 cGMP 水平比较: 表 2 示, 模型组肺匀浆上清液 cGMP 水平高于正常对照组($P < 0.05$), 脑肺康小、大剂量组及合心爽对照组 cGMP 水平与模型组差异无显著性($P > 0.05$), 脑肺康中剂量组 cGMP 水平显著低于模型组($P < 0.05$), 而与正常对照组差异无显著性($P > 0.05$)。

表 2 各组 CEC、肺匀浆上清液 cGMP 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	CEC(个/mm ³)	肺匀浆上清液 cGMP 含量(pmol/mg)
正常对照组	6.11 ± 1.07(8)	0.22 ± 0.66(6)
模型组	12.57 ± 2.64(8)**	0.64 ± 0.20(6)*
脑肺康小剂量组	9.38 ± 3.38(8)△*	0.37 ± 0.12(6)
脑肺康中剂量组	7.08 ± 3.30(8)△△	0.18 ± 0.06(6)
脑肺康大剂量组	7.71 ± 2.49(8)△△	0.22 ± 0.03(6)
合心爽对照组	10.94 ± 4.65(8)*	0.49 ± 0.16(6)

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 括号内为动物数

各组肺组织 HO-1 蛋白量和分布比较: 表 3 示, Western 印迹结果表明, 模型组 HO-1 蛋白水平较正常对照组显著升高, 杂交条带的光密度值较正常对照组增加 4.08 倍($P < 0.01$)。脑肺康各剂量组及合心爽对照组杂交条带的光密度值与模型组比较, 均无显著性差异($P > 0.05$)。正常对照组 HO-1 阳性反应分布在肺动脉内皮细胞、细支气管上皮细胞和肺泡巨噬细胞呈弱阳性或阴性表达, 模型组 SPA 内皮细胞 HO-1 染色阳性反应明显增强, 支气管上皮细胞和肺泡巨噬细胞 HO-1 表达也增多, 脑肺康中、大剂量组 SPA 内皮细胞 HO-1 染色阳性反应较模型组明显减弱(P 均 < 0.05), 脑肺康小剂量组及合心爽对照组 SPA 内皮细胞 HO-1 染色强度与模型组比较差异无显著性

表3 各组 HO-1 Western 印迹及 HO-1、eNOS、iNOS 免疫组化半定量结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	HO-1 Western 印迹 条带相对光密度值	HO-1(计分)	eNOS(计分)	iNOS(e)(计分)	iNOS(s)(计分)
正常对照组	0.039±0.034(4)	0.24±0.22(7)	2.30±0.37(7)	0.61±0.24(7)	0.28±0.10(7)
模型组	0.159±0.069(4)**	1.66±0.83(7)**	0.63±0.18(7)**	1.77±0.60(7)**	1.54±0.31(7)**
脑肺康小剂量组	0.146±0.044(4)**	1.44±0.53(6)**	0.53±0.15(6)**	1.19±0.40(6)*	1.26±0.22(6)**
脑肺康中剂量组	0.072±0.044(4)	0.63±0.30(7)△*	1.68±0.26(7)△△**	0.47±0.13(7)△△	0.48±0.16(7)△△
脑肺康大剂量组	0.084±0.053(4)	0.71±0.31(6)△**	1.69±0.35(6)△△*	0.48±0.15(6)△△	0.49±0.13(6)△△
合心爽对照组	0.159±0.065(4)*	1.41±0.56(7)**	1.90±0.60(7)△△	0.66±0.21(7)△△	0.43±0.14(7)△△

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 括号内为动物数; e: 肺小动脉内皮细胞; s: 肺小动脉平滑肌细胞

($P > 0.05$)。

各组肺组织 eNOS 和 iNOS 表达和分布比较: 表 3 显示, 各实验组 eNOS 在 SPA 内皮细胞及 iNOS 在 SPA 内皮细胞和平滑肌细胞的染色计分, eNOS 主要分布于 SPA 内皮细胞, 正常对照组 SPA 内皮细胞呈 eNOS 强阳性表达; iNOS 分布于 SPA 内皮细胞(e)、平滑肌细胞(s)以及肺泡巨噬细胞, 正常对照组 SPA 内皮细胞、平滑肌细胞和肺泡巨噬细胞都呈弱阳性表达。模型组 eNOS 在内皮细胞的表达明显减弱($P < 0.01$), iNOS 在 SPA 内皮和平滑肌的表达则显著增强(P 均 < 0.01)。脑肺康小剂量组 eNOS 计分与模型组比较差异无显著性($P > 0.05$), 中、大剂量组及合心爽对照组 SPA 内皮细胞 eNOS 反应较模型组明显减弱(P 均 < 0.01), 但与正常对照组比较仍较低。脑肺康各剂量组及合心爽对照组 SPA 内皮细胞 iNOS 反应较模型组明显减弱($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但小剂量组尚未恢复正常($P < 0.05$)。小剂量组 SPA 平滑肌细胞 iNOS 计分与模型组比较差异无显著性($P > 0.05$), 中、大剂量组及合心爽对照组 SPA 平滑肌细胞 iNOS 反应较模型组明显减弱(P 均 < 0.01), 与正常对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。

3 讨论

本实验中模型组 RVSP、RVHI、SPA MT% 和 MS% 较正常组明显升高, 说明本实验常压间断缺氧 6 周造成了肺动脉高压性结构重塑, 已使右心室肥厚。脑肺康中、大剂量治疗组和合心爽治疗组的 RVSP、RVHI、MT% 和 MS% 均显著低于模型组, 说明中、大剂量的脑肺康对缺氧性肺动脉高压有较好的治疗作用, 效果与西药钙通道阻滞剂合心爽相似。电镜显示, 中、大剂量的脑肺康对肺动脉高压性超微病变的保护作用优于合心爽。

血液循环内皮细胞(CEC)是反映血管内皮细胞损伤程度的直接指标。本实验中模型组 CEC 计数明显高于正常组, 透射电镜观察表明, 缺氧造成了明显的肺血

管内皮细胞损伤。脑肺康小、中、大剂量组 CEC 数均显著低于模型组, 中、大剂量组肺血管内皮细胞超微结构的改变也有不同程度的恢复。而合心爽对照组 CEC 与模型组无显著差别, 说明脑肺康对肺血管内皮缺氧性损伤的保护作用优于合心爽。大量实验表明, 肺腺泡内动脉内皮细胞损伤和血小板聚集是肺血管结构重塑及肺动脉高压发生的启动因素^[6]。本实验显示中、大剂量的脑肺康能保护内皮细胞免受缺氧损伤, 这就阻断了肺血管结构重塑的启动环节, 可能是脑肺康治疗缺氧性肺动脉高压的重要环节之一。

本实验免疫组化结果发现, 正常情况下 SPA 内皮细胞表达大量的 eNOS 和少量 HO-1, Western 印迹也显示正常对照组大鼠肺组织 HO-1 蛋白水平较低。在缺氧状态下情况则相反。中、大剂量的脑肺康治疗后 eNOS 较模型组显著增多, HO-1 则显著减少, 说明脑肺康可能促进 eNOS 表达, 抑制缺氧造成的 HO-1 增多, 使舒张肺血管的调节机制趋于恢复正常, 从而起到治疗肺动脉高压的作用。中、大剂量脑肺康治疗后内皮和平滑肌 iNOS 的表达较模型组明显减弱, 说明脑肺康可能在抑制过量的 iNOS 合成中起一定的作用从而发挥对肺动脉高压的治疗作用。

参考文献

- 1 宋润兰, 阮英菲, 刘玉和, 等. 中药 814 对地鼠肺气肿防治作用的病理观察. 中国医学科学院学报, 1999, 21(1): 58-61.
- 2 Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. FASEB J, 1988, 2(10): 2557-2568.
- 3 薛全福, 谢剑鸣, 胡长贵, 等. 常压缺氧性大鼠肺动脉高压模型的建立. 中华结核和呼吸杂志, 1989, 12(6): 350-352.
- 4 李莉, 阮英菲, 张旭晨, 等. 吸烟导致慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立及中药脑肺康的防治作用. 中医杂志, 2001, 42(10): 615-618.
- 5 席思川, 阮英菲, 张连庄, 等. 黄芪对大鼠缺氧性肺动脉高压功能形态学的影响. 中华病理学杂志, 1996, 25(4): 236-238.
- 6 李丰, 车东媛, 刘绍春, 等. 缺氧对肺动脉内皮细胞 PDGF 基因及 PDGF-B 链蛋白表达的影响. 中华病理学杂志, 1995, 24(3): 139-142.