

· 基础研究 ·

## 水飞蓟素对野百合碱诱发肺动脉高压大鼠肺血管重构的保护作用

杨 勇, 吕进泉<sup>△</sup>, 赵文生

(江苏大学附属医院儿科, 江苏镇江 212001)

**摘要:**目的 探讨水飞蓟素对野百合碱(MCT)诱发肺动脉高压大鼠模型肺血管重构的保护作用及机制。方法 24 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组(C 组)、MCT 诱发肺动脉高压模型组(M 组)、水飞蓟素治疗组(S 组), 每组 8 只。28 d 后, 右心导管法测量各组右心室收缩压(RVSP), 称量法计算右心室肥大指数(RVHI), HE 染色和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)免疫组织化学染色观察肺血管重构, TUNEL 法检测肺动脉平滑肌细胞凋亡, RT-PCR 法行肺组织 Fas mRNA 半定量检测。结果 与 M 组比较, S 组 RVSP、RVHI、 $\alpha$ -SMA 表达均降低( $P < 0.01$ ), 肺动脉平滑肌细胞凋亡稍升高, 肺组织 Fas mRNA 表达升高( $P < 0.05$ )。结论 水飞蓟素对野百合碱诱发肺动脉高压大鼠肺血管重构具有保护作用。

**关键词:**高血压, 肺性; 水飞蓟素; 野百合碱

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.30.024

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)30-3186-02

## Protective effect of Silymarin on rats with monocrotaline induced pulmonary hypertension

Yang Yong, Lv Jinquan<sup>△</sup>, Zhao Wensheng

(Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

**Abstract: Objective** To investigate the protective effects of silymarin on rats with monocrotaline induced pulmonary hypertension and explore its therapeutic mechanism. **Methods** 24 male SD rats were randomly divided into 3 groups, the control group( $n=8$ ), the pulmonary hypertension model group( $n=8$ ) and the silymarin treatment group( $n=8$ ). Right ventricular systolic pressure (RVSP) were detected by right heart catheter after twenty-eight days. Right ventricular hypertrophy index(RVHI) was calculated as the right ventricle to the left ventricular plus septum weight. With HE staining, immunohistochemical analysis of  $\alpha$ -smooth muscle actin( $\alpha$ -SMA) to observe pulmonary artery structural changes. The pulmonary artery smooth muscle cells apoptosis were detected by TUNEL. The expression of Fas mRNA in the pulmonary tissue was detected by RT-PCR. **Results** Compared with the model group, silymarin treatment group decreased RVSP, RVHI and  $\alpha$ -SMA, increased apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells and Fas mRNA. **Conclusion** Silymarin could protect rats with monocrotaline induced pulmonary hypertension.

**Key words:** hypertension, pulmonary; silymarin; monocrotaline

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是由于肺循环受限引起肺血管阻力进行性增加, 最终导致右心衰竭的综合征。病情进展迅速, 预后极差<sup>[1]</sup>。本研究通过大剂量外源性水飞蓟素干预经腹腔注射野百合碱(MCT)复制的肺动脉高压大鼠模型, 观察肺动脉高压大鼠模型的肺血管重构及 Fas mRNA 的表达变化, 探讨水飞蓟素对肺动脉高压大鼠模型肺血管重构的保护作用及机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** 雄性 Sprague Dawley(SD)大鼠 24 只, 体质量 230~250 g, 由江苏大学实验动物中心提供。

**1.2 仪器与试剂** MCT(美国 Sigma 公司); 水飞蓟素(天津天士力制药股份有限公司), Medlab-U/8C502 生物信号处理系统(南京美易科技有限公司); Bio-Rad 实时定量 PCR 仪 C1000(伯乐生命医学产品有限公司);  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)抗体(武汉博士德生物工程有限公司, 货号: BM0002); RT 试剂盒(Fermentas 中国公司, 货号: K1622); 荧光定量 PCR 试剂盒(东洋纺生物科技有限公司); TUNEL 凋亡试剂盒(南京凯基); Fas 引物序列(扩增产物 198 bp, 上海生工生物工程有限公司): 上游 5'-TGA AGA CAT CCT TGA GCC TTG-3', 下游 5'-AGA TTC ATT GGC ACA CTT TCA G-3';  $\beta$ -actin 引物序列(扩增产物 207 bp, 上海生工

生物工程有限公司), 上游 5'-CAC CCG CGA GGT CAA CCT TC-3', 下游 5'-CCC ATA CCC ACC ATC ACA CC-3'。

**1.3 实验动物分组、模型制备与干预** 随机分为正常对照组(C 组)、MCT 诱发肺动脉高压模型组(M 组)、水飞蓟素治疗组(S 组), 每组 8 只。MCT 先溶于 1 mol/L 浓盐酸, 加去离子水, 然后用 1 mol/L 的氢氧化钠调 pH 至 7.4, 最终配置成浓度 20 mg/mL 野百合碱溶液。M 组、S 组大鼠一次性腹腔注射 MCT 60 mg/kg, C 组一次性腹腔注射生理盐水 3 mL/kg。将水飞蓟素用生理盐水配成 50 mg/mL 溶液, S 组自第 2 天开始按照水飞蓟素每次 150 mg/kg, 每天灌胃 3 次, 共 27 d。M 组和 C 组用生理盐水每次 2 mL/kg, 每天灌胃 3 次。

**1.4 观测指标及检测方法**

**1.4.1 右心导管法测定平均右心室收缩压(right ventricular systolic pressure, RVSP)** 28 d 后, 记录大鼠质量, 右心导管法测定平均肺动脉压, 大鼠以 200 mg/mL 乌拉坦麻醉(2.5 mL/kg)后用聚氯乙烯导管插入右颈外静脉, 缓慢进入右心房、右心室, 导管内加入肝素盐水, 测压导管接压力传感器记录压力变化。

**1.4.2 心肺组织取材** 完成肺动脉压测量后, 取出分离心肺组织。测量心指数: 分离右心室, 除去心耳、心房, 用滤纸吸去血液、盐水。分别称取右心室和左心室加室间隔的质量, 右心

室肥大指数(right ventricular hypertrophy index, RVHI) = 右心室质量/(左心室质量+室间隔质量)。右肺以 40 g/L 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋后切片,用 HE 染色、 $\alpha$ -SMA 免疫组织化学染色、TUNEL 法检测肺动脉平滑肌细胞凋亡。左肺置于液氮中冻存,用于 Fas mRNA 半定量 RT-PCR 检测。

**1.4.3 HE 染色** 肺组织石蜡切片常规脱蜡至水,HE 染色,脱色透明后,中性树胶封片。显微镜下观察肺动脉大体形态变化。

**1.4.4 肺动脉  $\alpha$ -SMA 免疫组织化学染色** 肺组织石蜡切片常规脱蜡至水,SP 法检测  $\alpha$ -SMA 抗原的表达,1:100 稀释一抗,DAB 显色。胞质棕黄色着色为阳性信号。采用 Image-Pro Plus 图像分析系统,随机选取 50~100  $\mu$ m 血管 20 根,取平均光密度值(平均光密度值=累积光密度/面积)评价肺小动脉平滑肌细胞增殖程度。

**1.4.5 TUNEL 法检测大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡** 肺组织切片脱蜡至水,参照 TUNEL 凋亡试剂盒说明书进行操作。结果判定:显微镜下随机选取 50~100  $\mu$ m 左右的肺动脉,计数 500 个肺动脉平滑肌细胞中的凋亡细胞数,求得凋亡指数(AI)。AI=凋亡细胞数/总细胞数 $\times$ 100%。

**1.4.6 肺组织 Fas mRNA RT-PCR 检测** 采用 Trizol 法提取肺组织总 RNA,核酸蛋白分析仪测总 RNA 的纯度。cDNA 第一链的合成和荧光定量 PCR 过程采用 RT 试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒,按照说明书操作。扩增反应条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 1 min,按下列步骤扩增 40 个循环,95  $^{\circ}$ C 变性 5 s,56  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s;最后一个循环后,72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS13.0 软件对所得数据进行分析,实验数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 RVSP 及 RVHI 的变化** 与 C 组相比,MCT 诱发 28 d 后,M 组的 RVSP 及 RVHI 明显升高( $P<0.05$ )。经干预后,S 组 RVSP 及 RVHI 低于 M 组( $P<0.05$ ),见表 1。

表 1 3 组大鼠 RVSP 和 RVHI 变化的比较( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	RVSP	RVHI
C 组	17.02 $\pm$ 1.69*	26.04 $\pm$ 1.46*
M 组	40.34 $\pm$ 3.89	46.03 $\pm$ 2.08
S 组	31.78 $\pm$ 2.40*	37.51 $\pm$ 2.23*

\*:  $P<0.01$ ,与 M 组比较。

表 2 3 组大鼠肺动脉平滑肌细胞  $\alpha$ -SMA、凋亡指数及肺组织 Fas mRNA 表达的比较( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	$\alpha$ -SMA	细胞凋亡指数 (%)	Fas mRNA 相对表达量
C 组	0.51 $\pm$ 0.04*	0.80 $\pm$ 0.42*	1*
M 组	1.15 $\pm$ 0.18	0.44 $\pm$ 0.33	0.10 $\pm$ 0.03
S 组	0.80 $\pm$ 0.13*	0.64 $\pm$ 0.36*	0.69 $\pm$ 0.27*

\*:  $P<0.01$ ,与 M 组比较。

**2.2 肺组织 HE 染色、 $\alpha$ -SMA 免疫组织化学染色、细胞凋亡指数、Fas mRNA 相对表达量** HE 染色所见:C 组(封 3 图 1A)肺动脉管壁菲薄;S 组(封 3 图 1B)肺动脉管壁较 C 组明显增厚,但较 M 组薄,炎症细胞浸润减轻;M 组(封 3 图 1C)肺动

脉管壁明显增厚,管腔狭窄,大量炎症细胞浸润。与 M 组(封 3 图 2A)比较,C 组(封 3 图 2B) $\alpha$ -SMA 表达低( $P<0.01$ )、Fas mRNA 表达高( $P<0.01$ )、细胞凋亡指数升高( $P<0.05$ ),S 组(封 3 图 2C) $\alpha$ -SMA 表达低( $P<0.01$ )、Fas mRNA 表达高( $P<0.01$ )、细胞凋亡指数稍升高,见表 2。

**3 讨 论**

目前,研究认为,炎症、过氧化物、遗传基因等多种因素损伤肺微小动脉内皮细胞是肺动脉高压(PAH)发生的始动环节<sup>[2]</sup>。肺动脉内皮细胞功能紊乱、平滑肌细胞和纤维原细胞活化、血管壁细胞间交互作用、循环祖细胞黏附、血管壁的持续性收缩是 PAH 血管重构主要机制<sup>[3]</sup>。SD 大鼠腹腔注射 MCT 后,药物经肝脏代谢生成五元杂环的吡咯 MCT,可特异性损伤肺血管内皮细胞,引起内皮细胞功能障碍、血管平滑肌细胞增生、肺动脉压力增高,复制肺动脉高压模型<sup>[4]</sup>。

本实验给予大剂量水飞蓟素干预 S 组大鼠后,S 组大鼠粪便稍有稀烂改变,1 周后好转,未见其他不良反应。给予大剂量水飞蓟素干预 S 组大鼠,大鼠 RVSP 下降,肺血管重构的病理改变减轻,说明大剂量水飞蓟素干预可以减轻肺动脉高压模型大鼠肺血管的重构,改善肺动脉高压症状。其机制可能为:(1)抗氧化作用。氧化损伤可以通过损伤血管内皮、促进肺动脉平滑肌细胞增殖、促进血管外基质增生等多条途径参与肺血管重构<sup>[5]</sup>。活性氧(reactive oxygen species,ROS)是细胞内重要的具有氧化还原潜能的氧衍生物,参与血管平滑肌细胞增殖、分化、凋亡、迁移等多种功能调控<sup>[6]</sup>。水飞蓟素具有良好的抗氧化和自由基清除活性<sup>[7]</sup>。水飞蓟素可以抑制细胞与组织 ROS 的产生,并促进细胞组织产生超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px),通过抑制氧自由基的过度产生和促进氧自由基降解酶生成抑制细胞损伤及血管重构。(2)抗炎作用。研究显示炎症反应参与了肺动脉高压的发生及发展过程,中性粒细胞等炎症细胞、IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、PDGF、VEGF 等炎症因子均参与了内皮细胞损伤及血管壁重构<sup>[8-10]</sup>。水飞蓟素可以通过抑制 NF- $\kappa$ B 的转录活性、清除活性氧自由基等机制抑制炎症反应<sup>[11-12]</sup>。本实验观察到大剂量水飞蓟素干预后肺微小动脉周围炎症反应减轻,证实水飞蓟素可以通过抗炎作用减轻血管重构。(3)本实验研究发现水飞蓟素干预 MCT 诱发 PAH 模型大鼠可以提高肺组织 Fas mRNA 表达,肺动脉血管平滑肌细胞凋亡增多,可部分调节血管平滑肌的增殖与凋亡平衡,具体机制尚不明确<sup>[13]</sup>。(4)基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPs)大量分泌可以降解弹力纤维,破坏正常胶原结构,诱发肺小动脉重构。水飞蓟素可以通过降低细胞 MMPs 表达水平,抑制胶原合成,发挥对组织的保护作用<sup>[14-15]</sup>。

本实验结果显示大剂量水飞蓟素可以减轻 MCT 诱发肺动脉高压大鼠模型肺组织炎症细胞浸润,促进肺动脉高压大鼠肺组织 Fas mRNA 表达,提高肺动脉高压大鼠肺血管平滑肌细胞凋亡,降低 RVSP,减轻肺动脉重构变化,对 MCT 诱发的肺动脉高压大鼠具有保护作用。

**参考文献:**

[1] Mclaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, et al. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 53 (17): 1574-1619. (下转第 3191 页)

缩能力的  $\pm dp/dt \max$  下降明显,这与临床中-重度胸部撞击伤较为一致,此模型可作为可靠的大鼠胸部撞击伤致心肺联合损伤动物模型。

在交通事故伤中,因胸部撞击伤所致的心脏损伤往往因伤情隐匿、临床表现不明显而被严重的肺损伤及肋骨骨折等所掩盖<sup>[11-12]</sup>。本实验所建立的撞击伤致心肺联合损伤模型具备以下优点:(1)适用于中-小型动物,撞击设备操作简便,物理参数可精确调整,撞击部位准确,可重复性好;(2)符合交通事故的致伤特点,心、肺损伤的病理表现、类型及伤情与临床较为接近;(3)能在致伤模型上完成血流动力学及分子生物学等多项实验指标的检测;(4)为临床研究胸部撞击伤后心肺联合损伤的各种病理生理变化提供了理想的模型基础,对后期深入研究其发生机制,并探讨有效的预防措施具有重要的临床和社会意义。

#### 参考文献:

- [1] 王正国. 全国道路交通事故伤流行病学——1998 年回顾[J]. 中华创伤杂志, 2000, 16(5): 308-312.
- [2] Noland RB, Quddus MA. Improvements in medical care and technology and reductions in traffic-related fatalities in Great Britain[J]. *Accid Anal Prev*, 2004, 36(1): 103-113.
- [3] 荔志云, 周杰. 兰州市 2004 年度道路交通事故伤流行病学分析[J]. 西北国防医学杂志, 2006, 27(5): 342-344.
- [4] 童建菁, 陈尔真, 史以珏, 等. 上海市 2003 年道路交通事故

故伤流行病学分析[J]. *中国急救医学*, 2005, 25(10): 738-741.

- [5] 闵家新, 朱佩芳, 王正国. 胸部撞击伤后心功能障碍及其诊断研究[J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2008, 24(6): 406-408.
- [6] 闵家新, 朱佩芳. 不同致伤参数对兔胸部撞击伤后心血管损伤的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2000, 12(8): 463-464.
- [7] Meier R, Van Griensven M, Pape HC, et al. Effects of cardiac contusion in isolated perfused rat hearts[J]. *Shock*, 2003, 19(2): 123-126.
- [8] 刘维永, 蔡建辉. 心脏撞击伤生物力学致伤机制及心肌挫伤分级[J]. *第四军医大学学报*, 2000, 21(5): 540-542.
- [9] 廖克龙, 朱佩芳. 大鼠胸部撞击伤肺损伤模型的建立[J]. *创伤外科杂志*, 2001, 3(4): 263-265.
- [10] Liu B, Wang Z, Leng H, et al. Pathologic study of thoracic impact injury involving a relatively static impact pattern[J]. *J Trauma*, 1996, 40(1): 85-89.
- [11] El-Chami MF, Nicholson W, Helmy T. Blunt cardiac trauma[J]. *J Emerg Med*, 2008, 35(2): 127-133.
- [12] Sybrandy KC, Cramer MJ, Burgersdijk C. Diagnosing cardiac contusion: old wisdom and new insights[J]. *Heart*, 2003, 89(5): 485-489.

(收稿日期: 2012-03-10 修回日期: 2012-05-16)

(上接第 3187 页)

- [2] Tudor RM, Abman SH, Braun T, et al. Development and pathology of pulmonary hypertension[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(1): 1-9.
- [3] Morrell NW, Adnot S, Archer SL, et al. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(1): 21-31.
- [4] 熊迈, 姚尖平, 徐颖琦, 等. 两种大鼠肺动脉高压模型肺血管重塑的血流力学、组织学和体视学指标变化[J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 26(8): 1043-1045.
- [5] 刘斌, 彭军. 氧化应激和肺动脉高压血管重构[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(6): 539-542.
- [6] 魏倩萍, 邓华聪. 活性氧簇调控的信号通路与糖尿病肾病[J]. *重庆医学*, 2005, 34(3): 446-448.
- [7] 韩玫瑰, 韩子明, 郭勇. 水飞蓟素对大鼠肾小管间质纤维化的影响及作用机制探讨[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(3): 339-344.
- [8] 卢献灵, 何建国. 肺动脉高压的炎症发病机制[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2009, 32(11): 862-865.
- [9] 董旭, 王钢, 王怀良, 等. 蛋白激酶 C 亚型在慢性“炎症性”

肺动脉高压大鼠肺动脉中的表达[J]. *解放军医学杂志*, 2007, 32(6): 558-560.

- [10] 丁晶, 曾超美, 杜军保. 气体信号分子与肺动脉高压的发病机制[J]. *实用儿科临床杂志*, 2009, 24(13): 1026-1029.
- [11] 王占海, 沈凌鸿, 陈向东, 等. 水飞蓟素对脂多糖性大鼠急性肺损伤的拮抗作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(2): 280-283.
- [12] 陈晓英, 王玉林, 王伟. 核因子- $\kappa B$  抑制剂 PDTC 在肺动脉高压中的作用[J]. *山东大学学报: 医学版*, 2008, 47(1): 55-63.
- [13] 陆俊羽, 姚伟, 钱桂生, 等. Fas 和 FasL 在 Na/H 交换器-1 抑制诱导缺氧大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡中的作用[J]. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(9): 515-518.
- [14] 王蕾蕾, 王国贤. 水飞蓟素对糖尿病大鼠心肌损伤的保护作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(8): 625-629.
- [15] 曾红军, 庞玉生, 梁秀安. 基质金属蛋白酶-1、9 在小儿先天性心脏病肺血管重构中的作用[J]. *广西医学*, 2009, 31(10): 1409-1411.

(收稿日期: 2012-04-09 修回日期: 2012-06-21)