

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.30.021

# γ 氨基丁酸对肺动脉高压大鼠肺组织 VEGF、MMP-9 表达的影响

陈 刚<sup>1,2</sup>, 宋 军<sup>2</sup>, 相 虹<sup>2</sup>, 张璐洁<sup>2</sup>, 吕进泉<sup>2△</sup>

(1. 江苏大学临床医学院, 江苏镇江 212001; 2. 江苏大学附属医院儿科, 江苏镇江 212001)

**摘 要:**目的 研究 γ 氨基丁酸(GABA)对野百合碱(MCT)诱导肺动脉高压大鼠的治疗作用,并检测血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达水平的变化。方法 应用随机数字表法将 30 只雄性 SD 大鼠随机分 3 组,分别为正常对照组(对照组)、MCT 模型组(模型组)、γ 氨基丁酸干预组(干预组),每组 10 只。观测平均右心室压(mRVP),计算右心室肥厚指数(RVHI),测定肺小动脉管壁厚度与动脉外直径的百分比(WT%)及管壁面积与血管总面积的百分比(WA%),免疫组织化学染色法观察 MMP-9、实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测 VEGF mRNA 在肺组织中的表达。结果 干预组 mRVP、RVHI、WT%、WA%、MMP-9 蛋白和 VEGF mRNA 的表达水平明显高于对照组( $P<0.05$ );而低于模型组( $P<0.05$ )。结论 GABA 可抑制野百合碱诱导的肺动脉高压模型大鼠肺组织 VEGF mRNA 和 MMP-9 蛋白的表达,对肺动脉高压有治疗作用。

**关键词:**高血压,肺动脉;GABA;VEGF;MMP-9;野百合碱

中图分类号:R543.2

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)30-4043-03

## Effect of GABA on expression of VEGF and MMP-9 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension rats

Chen Gang<sup>1,2</sup>, Song Jun<sup>2</sup>, Xiong Hong<sup>2</sup>, Zhang Lujie<sup>2</sup>, Lv Jinquan<sup>2△</sup>

(1. School of Clinical Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China;

2. Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

**Abstract:** Objective To study the therapeutical effect of γ-aminobutyric acid on monocrotaline(MCT)induced pulmonary hypertension rats, and to elucidate the expression of VEGF and MMP-9. Methods Thirty SD rats were randomly divided into 3 groups; a normal control group(control group), a MCT-induced pulmonary hypertension group(model control group), and an γ-aminobutyric acid treatment group(treatment group). The mean right ventricular pressure(mRVP)were detected, the right ventricular hypertrophy index(RVHI)were measured, WT% and WA% were evaluated, and the expression of VEGF mRNA in the lung tissue and MMP-9 were detected with FQ-PCR and immunohistochemical staining method respectively. Results mRVP, RVHI, WT%, WA% and the expression of MMP-9 and VEGF mRNA of treatment group were lower than those in the model control group( $P<0.05$ ), but higher than the control group( $P<0.05$ ). Conclusion GABA has a therapeutic effect on pulmonary hypertension rats through regulating the expression of VEGF mRNA and MMP-9 protein.

**Key words:** hypertension, pulmonary; γ-aminobutyric(GABA); VEGF; MMP-9; monocrotaline

肺动脉高压是由多种病因引起的以肺动脉压力升高、肺血管阻力增大为特征的一组病理综合征,其主要机制是血管收缩、血管重塑和原位血栓形成,最终导致右心负荷增加,直至右心衰竭<sup>[1-2]</sup>。研究证明,交感神经系统活性亢进是肺动脉高压动物模型及肺动脉高压患者发病机制之一<sup>[3]</sup>。γ 氨基丁酸(GABA)是神经系统重要抑制性递质,除了存在于中枢神经系统,还存在于外周交感神经系统。本研究通过观测 GABA 对肺动脉高压大鼠的影响,并检测肺组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)mRNA 和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP 9)蛋白表达水平,来探讨 GABA 在防治肺动脉高压中的作用。

### 1 材料与方法

**1.1 动物、试剂及仪器** 雄性清洁级 SD 大鼠,体质量 170~230 g,由江苏大学动物中心提供。野百合碱(MCT)、GABA 购于 Sigma 公司,Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司,实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)试剂盒、逆转录试剂盒购于大连 TaKaRa 公司, MMP-9 抗体购于武汉博士德生物工程有限公司, VEGF 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,上游 5'-TTC GTC CAA CTT CTG GGC TCT T-3',下游 5'-CTC CTC TTC CTT CTC TTT CTC CCC-3'; β-actin 引物序列,上游 5'-CAC CCG CGA GGT CCA CCT TC-3',下游 5'-CCC ATA CCC ACC

ATC ACA CC-3'。Medlab-U/8C502 生物信号采集系统为南京美易科技有限公司的产品, Bio-Rad FQ-PCR 仪 C1000 为伯乐生命医学有限公司产品, PE50 聚乙烯软管为英国 Smith Medical 公司产品。

**1.2 实验动物分组、建模及干预** 30 只 SD 大鼠根据体质量编号,按照随机数字表法随机分为正常对照组(对照组)、MCT 模型组(模型组)、γ 氨基丁酸干预组(干预组)。模型组和干预组一次性腹腔注射 60 mg/kg MCT 溶液,对照组给予等量生理盐水腹腔注射,然后分组饲喂,干预组给予含 GABA 饮用水(根据大鼠体质量估计大鼠饮水量,称取相应量 GABA 溶于饮水水中, 500 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 的 GABA),对照组、模型组饲喂普通饮用水,实验 4 周后结束。

**1.3 平均右心室压力测定** 根据参考文献[4]报道的方法,于注射 MCT 后第 28 天通过右心导管测定大鼠平均右心室压(mRVP)。大鼠以 10%水合氯醛腹腔注射麻醉后,固定于手术台上,小心分离右侧颈外静脉,再将 PE50 聚乙烯软管弯端沿血管切口插入颈外静脉,通过上腔静脉、右心房直至右心室,导管另一端连接 Medlab-U 生物信号采集系统,根据压力曲线波形变化判断导管位置,并采集 Medlab-U 上压力数据及波形,记录右心室平均收缩压,以此来反映肺动脉收缩压。

**1.4 右心室分离与质量称取** 测压后处死动物,剖开胸腔,取

出心脏,浸入预冷生理盐水漂洗后,去掉心房及大血管,游离右心室(RV)和左心室加室间隔(LV+S),用滤纸吸去表面水分后分别用电子分析天平称取质量,计算反映右心室肥厚程度的右心室肥厚指数(Right ventricular hypertrophy index, RVHI)=右心室质量/(左心室质量+室间隔质量)。

**1.5 苏木素-伊红(HE)染色及免疫组织化学染色** 取右下肺组织放入4%多聚甲醛中固定,固定24 h后,乙醇脱水、石蜡包埋、切片,然后做HE染色及免疫组织化学染色。HE切片:随机选管径在50~100 μm 肺小动脉各10根,用病理图像分析系统Image-Pro Plus 6.0测定管壁厚度(WT)及管径(ED),并计算肺小动脉WT占ED的百分比,WT%=2WT/ED·100。管壁面积(WA)占血管总面积的百分比,WA%=(TA-LA)/TA·100。免疫组织化学切片:肺组织石蜡切片常规脱蜡至水,SP法检测MMP-9抗原表达,1:100稀释一抗,DAB显色,细胞质棕黄色着色为阳性信号。同样采用病理图像分析系统,随机方法选取10根直径在50~100 μm 的血管,取平均光密度值(平均光密度值=累积光密度/面积)评价肺动脉平滑肌细胞的增殖程度。

**1.6 实时荧光定量PCR(FQ-PCR)检测肺组织中 VEGF mRNA 的表达** 取左下肺组织液氮速冻,然后放入-80℃冰箱中保存,留作FQ-PCR。切取100 mg冰冻肺组织放入组织匀浆器中,严格按Trizol说明书操作步骤提取RNA,然后按逆转录试剂盒操作说明书转录成cDNA,再采用VEGF特异性引物扩

增其DNA;内参照加入β-actin引物进行扩增,引物序列见上述。PCR反应条件为:95℃预变性5 min;95℃变性15 s,56℃退火30 s,75℃延伸30 s,40个循环;72℃延伸10 min。

**1.7 统计学处理** 采用SPSS17.0软件进行数据统计处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较使用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

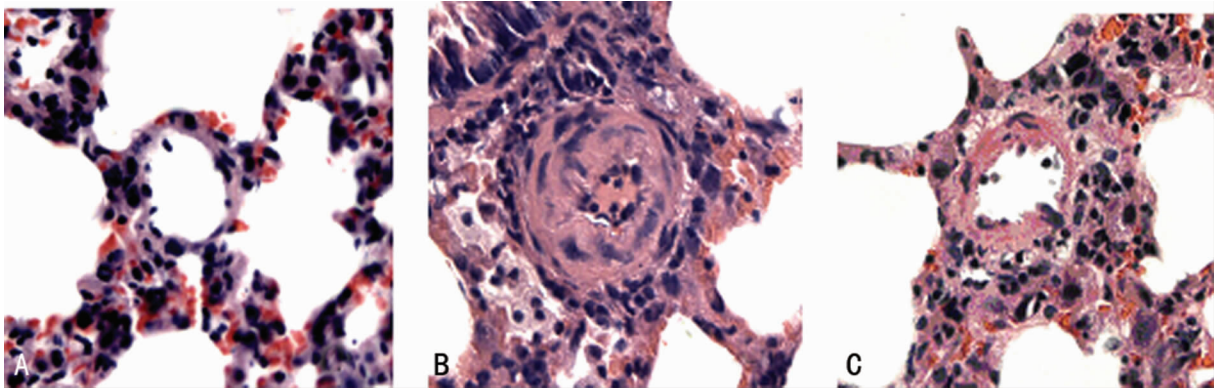
2 结 果

**2.1 大鼠一般情况及体质量变化** 麻醉及右心室插管过程中均未出现老鼠死亡,实验第4周,模型组、干预组较对照组活动减少,反应迟钝,饮食减少,毛色无光泽,模型组实验第27天死亡1只。与对照组比较,模型组体质量明显降低( $P < 0.05$ ),与模型组比较,干预组体质量与之差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表1。

表 1 各组大鼠的体质量、平均右心室压力、右心室肥厚指数( $\bar{x} \pm s$ )

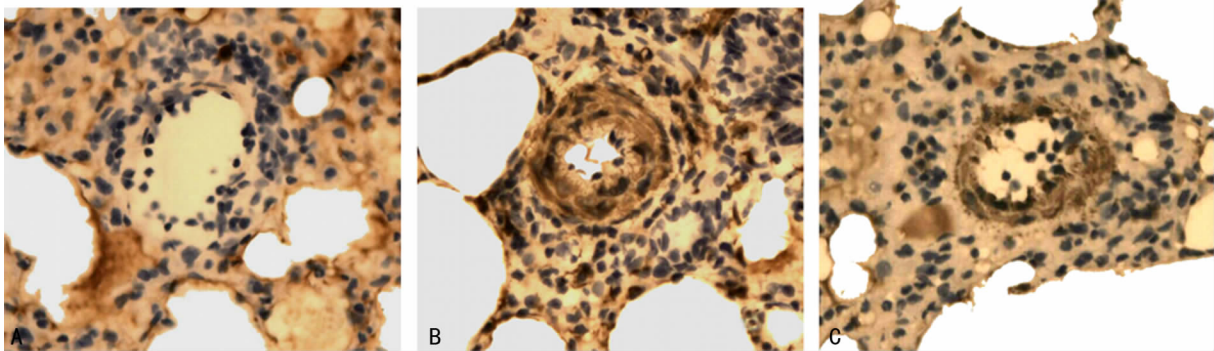
组别	<i>n</i>	体质量(g)	mRVP(mm Hg)	RVHI
对照组	10	365.1±14.6	18.250±1.380	0.257±0.018
模型组	9	290.0±25.2 <sup>a</sup>	44.656±1.411 <sup>a</sup>	0.487±0.032 <sup>a</sup>
干预组	10	291.9±24.9	37.630±1.308 <sup>b</sup>	0.372±0.021 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与对照组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与模型组比较。



A:对照组;B:模型组;C:干预组

图 1 各组肺小动脉病理学照片图(HE×400)



A:对照组;B:模型组;C:干预组

图 2 各组肺小动脉 MMP-9 表达情况比较(免疫组织化学×400)

**2.2 大鼠 mRvP 及肺小动脉形态比较** 与对照组比较,模型组 mRvP 明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,干预组 mRvP 明显降低( $P < 0.05$ ),差异均有统计学意义。与对照组比较,模型组 RVHI 明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,干预组 RVHI 明显降低( $P < 0.05$ )。与对照组比较,模型组 WT%、

WA%明显增加( $P < 0.05$ );与模型组比较,干预组 WT%、WA%明显减小( $P < 0.05$ ),见表1、2。肺组织 HE 染色结果见图1,对照组肺小动脉内膜细胞连续,中膜厚度适中,平滑肌无明显增生增厚。与对照组比较,模型组肺小动脉的中膜平滑肌明显增生肥大,内外两层弹力纤维膜之间距离明显增宽,管壁

明显增厚,管腔变窄。与模型相比,干预组肺小动脉内膜细胞较整齐,中膜平滑肌增生程度低,内外两层弹力纤维膜之间距离缩短。

**2.3 大鼠肺小动脉 VEGF mRNA、MMP-9 蛋白表达比较** 与对照组比较,模型组 VEGF mRNA 表达明显增高( $P<0.05$ );与模型比较,干预组 VEGF mRNA 表达明显降低( $P<0.05$ );MMP-9 蛋白免疫组织化学图片见图 2,与对照组比较,模型组内皮、中膜染色较深,且染色面积较大;与模型比较,干预组染色相对较浅,染色面积小。计算各组平均光密度值,与对照组比较,模型组 MMP-9 蛋白表达明显增高( $P<0.05$ );与模型组比较,干预组 MMP-9 蛋白表达明显降低( $P<0.05$ ),见表 2。

表 2 各组大鼠的 WT%、WA%、MMP-9 平均光密度值、VEGF 相对表达量的比较( $\bar{x}\pm s$ )				
组别	WT%	WA %	MMP-9 平均光密度值	VEGF(2-bbCt)
对照组	24.807±1.547	38.030±2.803	0.096±0.016	1
模型组	55.390±2.667 <sup>a</sup>	67.230±3.334 <sup>a</sup>	0.330±0.064 <sup>a</sup>	2.424±0.076 <sup>a</sup>
干预组	31.23±2.540 <sup>b</sup>	50.745±3.107 <sup>b</sup>	0.236±0.049 <sup>b</sup>	1.437±0.087 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与对照组比较;<sup>b</sup>: $P<0.05$ ,与模型组比较。

3 讨 论

MCT 大鼠模型是较为常用的肺动脉高压模型,MCT 在肝脏中被细胞色素 P450 单加氧酶活化为野百合碱吡咯,后者通过血流到肺脏时,沉积于肺小动脉壁及肺毛细血管,血管内皮细胞发生损伤,血管平滑肌增生,形成肺动脉高压<sup>[5-6]</sup>;另外,有研究认为 MCT 肺动脉高压模型中存在交感神经系统活性增强和亢进<sup>[7]</sup>。

交感神经系统活性亢进是高血压的发病机制之一,而在肺动脉高压发病机制方面的研究尚未完全明确。近年交感神经系统活性亢进在肺动脉高压发病过程中的作用正日益受到关注,Velez-Roa 等<sup>[8]</sup>发现在肺动脉高压患者存在交感神经系统活性亢进,Bogaard 等<sup>[9]</sup>使用交感神经活性阻滞剂卡维地洛干预 MCT 肺动脉高压模型,发现其具有降低肺动脉高压的作用。GABA 是交感神经系统的另一抑制性递质,Kimura 等<sup>[10]</sup>实验证明 GABA 干预高血压模型可降低其主动脉压力。而 GABA 是否可以降低肺动脉压力尚未有实验证实,结果显示干预组 mRVP、RVHI 较模型组明显降低,血管内皮连续性中断,血管平滑肌增生减低,MMP-9 蛋白、VEGF mRNA 表达降低,说明 GABA 可以降低 MCT 模型的肺动脉压力,改善其肺血管重构,起到治疗肺动脉高压的作用。

肺动脉血管内皮细胞功能紊乱、血管平滑肌细胞增生肥厚、细胞外基质失衡是肺动脉高压血管重构的主要病理机制<sup>[11]</sup>。VEGF 是肺组织血管内皮细胞、平滑肌细胞等多种细胞分泌的一种特异性生长因子,它通过自分泌和旁分泌的方式使血管内皮增殖,刺激血管平滑肌细胞使其增生肥厚,管腔狭窄<sup>[12]</sup>,导致肺动脉高压的形成。MMP-9 与细胞外基质关系密切,它是基质金属蛋白酶家族(MMPs)重要成员之一,是一组 Zn<sup>2+</sup> 依赖的内肽酶系,主要表达于血管内皮细胞、平滑肌细胞,它通过调控肺动脉胶原纤维降解而参与肺动脉高压的发生发展。另外,VEGF 与 MMP-9 关系密切,VEGF 可刺激表达 MMP-9 蛋白的细胞使 MMP-9 分泌增加,破坏细胞外基质的平衡<sup>[13]</sup>。本文通过 FQ-PCR 方法及免疫组织化学染色发现,模型组 VEGF mRNA、MMP-9 蛋白表达增加,经 GABA 治

后,肺动脉压力降低,肺血管重塑减轻,VEGF mRNA、MMP-9 蛋白表达均降低,表明 GABA 通过降低交感神经活性,降低 VEGF 及 MMP-9 表达,减轻肺血管重塑而减轻肺动脉高压。

综上所述,GABA 治疗使肺组织 VEGF mRNA、MMP-9 蛋白的表达降低,并可减轻肺血管重构来降低肺动脉压力,GABA 具有保护 MCT 诱导的肺动脉高压的作用。

参考文献:

[1] Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(1 Suppl):S43-54.

[2] Obican SG, Cleary KL. Pulmonary arterial hypertension in pregnancy[J]. Semin Perinatol, 2014, 38(5):289-294.

[3] Bogaard HJ, Natarajan R, Mizuno S, et al. Adrenergic receptor blockade reverses right heart remodeling and dysfunction in pulmonary hypertensive rats[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 182(5):652-660.

[4] 孙波, 刘文利. 右心导管测定大鼠肺动脉压的实验方法[J]. 中国医学科学院学报, 1984, 6(6):465-467.

[5] 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.

[6] Kamezaki F, Tasaki H, Yamashita K, et al. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase ameliorates pulmonary hypertension in rats[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 177(2):219-226.

[7] Faber JE, Szymczek CL, Cotecchia S, et al. Alpha1-adrenoceptor-dependent vascular hypertrophy and remodeling in murine hypoxic pulmonary hypertension[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(5):H2316-2323.

[8] Velez-Roa S, Ciarka A, Najem B, et al. Increased sympathetic nerve activity in pulmonary artery hypertension[J]. Circulation, 2004, 110(10):1308-1312.

[9] Bogaard HJ, Natarajan R, Mizuno S, et al. Adrenergic receptor blockade reverses right heart remodeling and dysfunction in pulmonary hypertensive rat[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 182(5):652-660.

[10] Kimura M, Hayakawa K, Sansawa H. Involvement of gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptors in the hypotensive effect of systemically administered GABA in spontaneously hypertensive rats[J]. Jpn J Pharmacol, 2002, 89(4):388-394.

[11] Morrell NW, Adnot S, Archer SL, et al. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(1 Suppl):S20-31.

[12] 马胜军, 刘桂清, 马增山, 等. 先天性心脏病伴肺动脉高压患者血清血管内皮生长因子与肺细小动脉形态变化的关系[J]. 中华心血管病杂志, 2004, 3(1):43-46.

[13] Quinn TP, Schlueter M, Soifer SJ, et al. Cyclic mechanical stretch induces VEGF and FGF-2 expression in pulmonary vascular smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 282(5):L897-903.