・论著・

亚高原地区野百合碱诱导大鼠肺动脉高压模型的剂量研究

陈婷婷^{a,b},杨占婷^a,华玉美多^a,冀磊^a,顾存林^{a,b},王珊^a,张小楠^a,南星梅^b,李占强^{a,b*}, 芦殿香^{a,b*}[青 海大学,a.高原医学研究中心,高原医学教育部重点实验室,青海省高原医学应用基础重点实验室(青海-犹他高原医学联合重点实验室),b.医学 院,西宁 810001]

摘要:目的 探讨亚高原地区野百合碱(monocrotaline, MCT)诱导大鼠肺动脉高压模型的最佳剂量。方法 将从平原地区 购买 85 只 SD 大鼠随机分为对照组、MCT-20 mg·kg⁻¹组、MCT-30 mg·kg⁻¹组、MCT-40 mg·kg⁻¹组、MCT-50 mg·kg⁻¹组、 MCT-60 mg·kg⁻¹组。除对照组外,所有大鼠于同日接受单次不同浓度 MCT 皮下注射,随后置于亚高原地区饲养,MCT 注射第 28 天末采用右心导管术检测大鼠平均肺动脉压力,并计算大鼠右心室肥厚指数以评估右心肥厚程度,取大鼠肺组 织行 HE 染色以评价肺血管重构情况,同时将大鼠的一般情况、生存率、体质量变化、脏器系数、血液学指标和模型成 功率作为辅助评价指标。结果 与对照组比较,单次皮下注射 MCT-30,40,50,60 mg·kg⁻¹均可引起大鼠平均肺动脉压 力增高、右心室肥厚和血管重构(P<0.05),模型符合肺动脉高压诊断标准。结论 30 mg·kg⁻¹是亚高原地区 MCT 诱导大 鼠肺动脉高压模型的最佳剂量。

关键词: 亚高原; 野百合碱; 大鼠; 肺动脉高压; 剂量研究 中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)21-2625-07 DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.21.001 引用本文:陈婷婷, 杨占婷, 华玉美多, 等. 亚高原地区野百合碱诱导大鼠肺动脉高压模型的剂量研究[J]. 中国现代应用药

学, 2021, 38(21): 2625-2631.

Dose Research of Monocrotaline Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats at Moderate Altitude

CHEN Tingting^{a,b}, YANG Zhanting^a, HUAYU Meiduo^a, JI Lei^a, GU Cunlin^{a,b}, WANG Shan^a, ZHANG Xiaonan^a, NAN Xingmei^b, LI Zhanqiang^{a,b*}, LU Dianxiang^{a,b*}[Qinghai University, a.Research Center for High Altitude Medicine, Key Laboratory of High Altitude Medicine(Ministry of Education), Key Laboratory of Application and Foundation for High Altitude Medicine Research in Qinghai Province(Qinghai-Utah Joint Research Key Lab for High Altitude Medicine), b. College of Medical, Xining 810001, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the optimal dose of monocrotaline(MCT) induced pulmonary arterial hypertension in rats at moderate altitude. **METHODS** Eighty-five male SD rats were randomly divided into control group, MCT-20 mg·kg⁻¹ group, MCT-30 mg·kg⁻¹ group, MCT-40 mg·kg⁻¹ group, MCT-50 mg·kg⁻¹ group and MCT-60 mg·kg⁻¹ group. Except for the control group, all rats received a single subcutaneous injection of MCT, and then were raised in moderate altitude area. Right heart catheterization was used to determine the mean pulmonary artery pressure(mPAP) after 28 d. The right ventricular hypertrophy index was calculated as a parameter of right ventricular hypertrophy. Vascular remodeling was assessed by HE staining. In addition, the general condition, survival rate, body weight, organ coefficient, hematological indexes and success rate of the model in rats were used as auxiliary evaluation indexes. **RESULTS** Compared with the control group, single subcutaneous injection of MCT-30, 40, 50, 60 mg·kg⁻¹ could cause increased mPAP, right ventricular hypertrophy and vascular remodeling in rats(P<0.05). The model met the diagnostic criteria for pulmonary arterial hypertension. **CONCLUSION** MCT-30 mg·kg⁻¹ is the optimal dose to induce pulmonary arterial hypertension; dose study

肺动脉高压是由多种病因所致的疾病,其特 环境引起的肺动脉高压称为高原肺动脉高压^[2], 征是中小肺动脉重构,导致肺动脉压升高,最终 属于低氧性肺动脉高压中的一类,是高原常见疾 导致右心衰竭和死亡^[1]。因长期暴露于高原低氧 病,亟待深入研究。

基金项目:国家自然科学基金项目(82060786, 81860768, 32060088);青海省科技计划项目(2020-ZJ-784);中科院兰州分院"西部之光"立 项项目

作者简介:陈婷婷,女,博士生,讲师 Tel: (0971)6104063 E-mail: 1185857808@qq.com ^{*}通信作者: 李占强,男,博士,副教授 Tel: (0971)6109507 E-mail: zhanqiang_li@163.com 芦殿香,女,博士,教授 Tel: (0971)6109507 E-mail: ludianxiang@126.com

目前高原肺动脉高压的造模方法主要有高海 拔地区现场造模和低压低氧舱内造模 2 种,这 2 种方法造模成功率高,使用广泛。近些年来,越 来越多的研究开始重视炎症在低氧性肺动脉高压 中的作用^[3],为了更好地研究高原肺动脉高压和炎 症的联系,笔者尝试在高原地区建立野百合碱 (monocrotaline, MCT)诱导的大鼠肺动脉高压炎症 模型^[4]。

已经有研究表明大鼠接受MCT单次皮下注射 (50 mg·kg⁻¹或 60 mg·kg⁻¹)2周后会形成肺动脉高 压^[5],但是确切剂量和造模时间尚无定论。课题组 [位于青海省西宁市(海拔 2 260 m)]曾使用文献报 道的 60 mg·kg⁻¹ MCT 给大鼠单次皮下注射,发现 大鼠肺血管重构严重,死亡率较高,与已有文献 报道不一致。故设想海拔高度对 MCT 诱导大鼠肺 动脉高压模型有影响,为探讨此问题,本研究首 次在亚高原地区进行实验,明确亚高原地区 MCT 造模的最佳剂量。

1 材料

1.1 动物

85 只 SD 健康大鼠, 3, 体质量 170~200 g, 购自西安交通大学医学部实验动物中心, 动物使用许可证号: SYXK(青)2020-0001, 动物生产许可证号: SCXK(陕)2018-001。本研究中动物实验遵守国际通用实验动物伦理原则, 实验方案经青海大学医学院动物伦理委员会审查通过。

1.2 试剂和仪器

MCT(上海源叶生物科技有限公司,批号: K20N11K131409); 肝素钠(Biotopped 公司); 乌拉 坦(国药集团化学试剂有限公司,批号: T20080624); 4%多聚甲醛固定液(北京雷根生物技 术有限公司,批号: 0927A19); HE 染色试剂盒(北 京索莱宝科技有限公司, 批号: 20190618); 二甲 苯(天津市恒兴化学试剂制造有限公司)。

MP150 多导生理记录仪(美国 BIOPAC 公司); BC-5000Vet 五分类全血细胞分析仪(深圳迈瑞公 司); AUX320 型万分之一电子天平(日本岛津公 司); EG1150H 自动组织包埋机、RM2265 切片机、 HI1220 烤片机、HI1210 捞片机均购自 Leica 生物 系统公司。

2 方法

2.1 分组

85 只公SD 健康大鼠按照随机数字表法分为对

照组、MCT-20 mg·kg⁻¹组、MCT-30 mg·kg⁻¹组、 MCT-40 mg·kg⁻¹组、MCT-50 mg·kg⁻¹组、 MCT-60 mg·kg⁻¹组。MCT 组大鼠(每组 15 只)于到 达西宁第 2 天接受单次 MCT 皮下注射, 对照组大 鼠(10 只)同日接受等体积生理盐水皮下注射,随后 所有大鼠置于西宁地区饲养,期间自由进食进水, 每 4 d 更换 1 次垫料,环境温度(22±2)℃、相对湿 度 45%~55%。于 MCT 注射第 28 天末麻醉大鼠后 采集数据。

2.2 处理方法

2.2.1 平均肺动脉压力(mean pulmonary artery pressure, mPAP)测定 大鼠麻醉后仰卧位固定于解剖台,从颈部正中偏右处做一纵行切口,分离出颈外静脉,用外科手术线结扎颈外静脉远心端和近心端,取眼科剪在颈外静脉宽大处剪口后持导管插入,导管依次经上腔静脉、右心房、右心室进入肺动脉^[6]。

2.2.2 右心室肥厚指数(right ventricular hypertrophy index, RVHI)测定 分离出心脏后, 剪去心脏 周围血管及心房, 沿室间隔边缘小心剪下右心室 游离壁, 分别称量右心室游离壁(right ventricular free wall, RV)及左心室加室间隔(left ventricular plus septum, LV+S)的质量, RVHI=RV 质量/(LV+S) 质量^[6]。

2.2.3 脏器系数测定 将大鼠心脏、肺脏、肝脏、 脾脏、肾脏依次取出,滤干后称重,计算各脏器 的脏器系数,脏器系数=脏器质量(g)/体质量 (g)×100%^[7]。

2.2.4 血液学指标检测 从大鼠腹正中线处剪开腹腔,将肠管推向一侧,用手指轻轻分开脊柱前的脂肪,使腹主动脉充分暴露,用一次性采血针在腹主动脉分叉处平行刺入血管,使用含 EDTA-K2 的抗凝管采集血液后上下摇晃数次,行全血细胞分析。

2.2.5 肺组织 HE 染色 切下左肺中部及下端组 织(每只大鼠至少做 2 处不同部位肺组织的切片), 大小约 1 cm×0.5 cm×0.3 mm, 4%多聚甲醛内室温 固定 48 h, 48 h 后进行 HE 染色,显微镜下拍照。 从每只大鼠的肺组织切片中随机选取直径<50 μm 和直径在 50~100 μm 的肺动脉各 10 根,用图像分 析软件测量其血管壁横截面积(wall area, WA)和中 线周长,由此计算血管壁厚度(wall thickness, WT)、 血管外径(external diameter, ED)和血管总面积。 以血管壁面积百分比(WA%)、血管壁厚度百分比 (WT%)作为衡量肺血管重构的指标。WA%=WA/ 血管总面积×100%,WT%=2×WT/ED×100%。

2.2.6 统计学方法 采用 SPSS 27.0 软件进行数 据统计分析。服从正态分布的计量资料多组间比 较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两 比较选择 Bonferroni 检验;方差不齐时两两比较采 用 Tamhane's T2。组间生存率的比较采用 Log-rank 检验。检验水准 α=0.05, P<0.05 表示差异有统计 学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况比较

每日观察内容包括大鼠被毛、进食进水量、 垫料干燥程度、精神状态、活动度等。结果发现, MCT-20 mg·kg⁻¹组和 MCT-30 mg·kg⁻¹组大鼠一般 情况较好,同对照组比较无差异; MCT-40 mg·kg⁻¹ 组和 MCT-50 mg·kg⁻¹组大鼠进入第 3 周后进食进 水量骤减,伴被毛竖立,但未见活动迟缓; MCT-60 mg·kg⁻¹组大鼠进入第 2 周即出现被毛竖 立不泽,第 3 周时加重,伴进食进水量骤减、呼 吸急促、活动迟缓、翘尾、四肢冰凉等。

3.2 各组大鼠生存率的比较

对照组、MCT-20 mg·kg⁻¹组和 MCT-30 mg·kg⁻¹ 组大鼠全部存活; MCT-40 mg·kg⁻¹组和 MCT-50 mg·kg⁻¹组大鼠生存率为 87%,与对照组比较无 差异,但 40 mg·kg⁻¹组大鼠死亡时间早于 50 mg·kg⁻¹组; MCT-60 mg·kg⁻¹组进入第 3 周后连 续死亡 6 只大鼠,生存率为 60%,与对照组比较有 统计学差异(*P*<0.05)。提示除 MCT-60 mg·kg⁻¹外, 其余剂量对大鼠生存时间影响较小。结果见图 1。



图1 各组大鼠生存率的比较与对照组比较, ¹⁾P<0.05。

Fig. 1 Comparison of survival rate of rats in each group Compared with control group, ^{11}P <0.05.

中国现代应用药学 2021 年 11 月第 38 卷第 21 期

3.3 各组大鼠体质量变化趋势

各组大鼠基线体质量具有可比性。实验过程 中每4d记录1次体质量。28d内,对照组大鼠的 体质量由(171.2±13.82)g增加到(327.22±21.29)g; 与对照组比较,MCT-20,30,40 mg·kg⁻¹组大鼠 体质量增势稍缓,但差异无统计学意义; MCT-50 mg·kg⁻¹组和 60 mg·kg⁻¹组大鼠进入第21 天体质量出现下降趋势,与对照组比较差异有统 计学意义(P<0.05)。提示除 MCT-50,60 mg·kg⁻¹ 外,其余剂量对大鼠体质量影响较小。结果见图2。



图 2 各组大鼠体质量变化趋势(x±s, n=9~15) 与对照组比较, ¹⁾P<0.05。

Fig. 2 Trend of body weight of rats in each group($\overline{x} \pm s$, n=9-15)

Compared with control group, $^{1)}P < 0.05$.

3.4 各组大鼠 mPAP 和 RVHI 的比较

与对照组比较, MCT-30, 40, 50, 60 mg·kg⁻¹ 均引起大鼠 mPAP、RVHI 增高, 差异有统计学意 义(P<0.05), 但剂量间差异无统计学意义。提示亚 高原地区 MCT-30 mg·kg⁻¹即可诱导大鼠肺动脉高 压形成, 伴右心室肥厚。此外, MCT-20 mg·kg⁻¹ 也能导致 mPAP 升高和右心室肥厚, 但造模成功率 只有 46.7%。结果见表 1~2。

表1 各组大鼠 mPAP、RVHI 的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of mPAP and RVHI of rats in each group $(\overline{x} \pm s)$

| 组别 | п | mPAP/mmHg | RVHI |
|----------------------------|----|--------------------------|------------------------|
| 对照组 | 10 | 17.98±3.08 | $0.28{\pm}0.04$ |
| MCT-20 mg·kg ⁻¹ | 15 | 26.74±8.94 | $0.47{\pm}0.16^{1)}$ |
| MCT-30 mg·kg ⁻¹ | 14 | $34.95{\pm}11.68^{1)}$ | $0.65{\pm}0.19^{1)}$ |
| MCT-40 mg·kg ⁻¹ | 13 | $34.96{\pm}9.53^{1)}$ | $0.68{\pm}0.14^{1)2)}$ |
| MCT-50 mg·kg ⁻¹ | 11 | $44.55 \pm 14.83^{1)2)}$ | $0.74{\pm}0.11^{1)2)}$ |
| MCT-60 mg·kg ⁻¹ | 7 | $50.04 \pm 9.15^{1)2)}$ | $0.88{\pm}0.15^{1)2)}$ |

注:与对照组比较, ¹⁾P<0.05;与 MCT-20 mg·kg⁻¹组比较, ²⁾P<0.05。 Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.05; compared with MCT-20 mg·kg⁻¹ group, ²⁾P<0.05.

Chin J Mod Appl Pharm, 2021 November, Vol.38 No.21 \cdot 2627 \cdot

表2 各组大鼠的模型成功率 Tab. 2 Rate of model establishment of rats in each group

| 组别 | 失败/只 | 成功/只 | 合计/只 | 成功率/% |
|----------------------------|------|------|------|-------|
| MCT-20 mg·kg ⁻¹ | 8 | 7 | 15 | 46.7 |
| MCT-30 mg·kg ⁻¹ | 4 | 10 | 14 | 71.4 |
| MCT-40 mg·kg ⁻¹ | 3 | 10 | 13 | 76.9 |
| MCT-50 mg·kg ⁻¹ | 2 | 9 | 11 | 81.8 |
| MCT-60 mg·kg ⁻¹ | 0 | 7 | 7 | 100.0 |

3.5 各组大鼠脏器系数比较

与对照组比较, MCT-30, 50, 60 mg·kg⁻¹ 均 可引起大鼠心脏系数和肺脏系数增大(P<0.05); 与 对照组比较, MCT-50, 60 mg·kg⁻¹ 可引起大鼠肝 脏系数和脾脏系数增大(P<0.05); 各剂量 MCT 对 大鼠肾脏系数无影响。提示 MCT 诱导的大鼠肺动 脉高压模型伴随心肺增大,大剂量时出现肝脾增 大,但对肾脏大小无影响。结果见图 3。

3.6 各组大鼠血液学指标变化

与对照组比较, MCT-20, 30, 50, 60 mg·kg⁻¹ 均可引起大鼠白细胞计数增高(P<0.05),且淋巴细 胞升高趋势和白细胞计数一致,但中性粒细胞变 化趋势和白细胞计数不一致;此外,MCT 对大鼠 红细胞计数、血红蛋白和血细胞比容无影响;与

对照组比较,50,60 mg·kg-1 MCT 可引起大鼠血 小板计数下降(P<0.05)。结果见图 4。

各组大鼠肺小动脉形态学变化 3.7

HE 染色结果显示, 对照组大鼠肺小动脉血管 壁厚度正常,管腔无狭窄。各剂量 MCT 处理导致 肺小动脉血管壁增厚,具体表现为中层平滑肌细 胞增殖以及内皮层、外弹力纤维层增厚,进而导 致管腔狭小。其中 MCT-20 mg·kg⁻¹组大鼠肺小动 脉血管壁面积及厚度与对照组比较无统计学差 异,其余剂量组同对照组比较差异均有统计学意 义(P<0.05)。此外, MCT-40, 50, 60 mg·kg⁻¹ 组大 鼠直径<50 µm 肺动脉的动脉血管壁厚度大于直径 50~100 µm 的肺动脉(P<0.05)。提示在亚高原地区, MCT-30, 40, 50, 60 mg·kg⁻¹ 均可导致肺血管重 构,重构主要发生在微小动脉。结果见图 5。

4 讨论

目前, 医学上将海拔>2 500 m 定为高原, 并根 据人体暴露于高原环境时出现的生理学反应将海 拔划分为低海拔(500~1500m)、中度海拔 (1 500~2 500 m)、高海拔(2 500~4 500 m)、特高海 拔(4 500~5 500 m)、极高海拔(>5 500 m)^[8-9]。本研 究选择中度海拔地区的青海省西宁市(2260m)作 为研究地点。



图 3 各组大鼠脏器系数的比较(x±s, n=9~15)

与对照组比较,¹⁾P<0.05;与MCT-20mg·kg⁻¹组比较,²⁾P<0.05;与MCT-30mg·kg⁻¹组比较,³⁾P<0.05;与MCT-40mg·kg⁻¹组比较,⁴⁾P<0.05。 **Fig. 3** Comparison of organ coefficient of rats in each group $(\overline{x} \pm s, n=9-15)$

Compared with control group, ¹⁾P<0.05; compared with MCT-20 mg·kg⁻¹ group, ²⁾P<0.05; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, ³⁾P<0.05; compared with MCT-40 mg·kg⁻¹ group, ⁴⁾P<0.05.



图 4 各组大鼠血液学指标的比较(x ± s, n=9~15)

与对照组比较,¹⁾P<0.05;与MCT-20mg·kg⁻¹组比较,²⁾P<0.05;与MCT-30mg·kg⁻¹组比较,³⁾P<0.05;与MCT-40mg·kg⁻¹组比较,⁴⁾P<0.05。 **Fig. 4** Comparison of hematological indexes of rats in each group $(\overline{x} \pm s, n=9-15)$

Compared with control group, $^{1)}P < 0.05$; compared with MCT-20 mg·kg⁻¹ group, $^{2)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P < 0.05$; compared with MCT-3 with MCT-40 mg·kg⁻¹ group, ⁴⁾P<0.05.





A-对照组; B-MCT-20 mg·kg⁻¹组; C-MCT-30 mg·kg⁻¹组; D-MCT-40 mg·kg⁻¹组; E-MCT-50 mg·kg⁻¹组; F-MCT-60 mg·kg⁻¹组; 与对照组比较, ¹⁾P<0.05;与MCT-20 mg·kg⁻¹组比较,²⁾P<0.05;与MCT-30 mg·kg⁻¹组比较,³⁾P<0.05;与同组直径<50 μm 肺动脉比较,⁴⁾P<0.05。

Fig. 5 Morphology changes of pulmonary arterioles in rats in each group $(\overline{x} \pm s, n=4)$ (HE, 200×)

A-control group; B-MCT-20 mg·kg⁻¹ group; C-MCT-30 mg·kg⁻¹ group; D-MCT-40 mg·kg⁻¹ group; E-MCT-50 mg·kg⁻¹ group; F-MCT-60 mg·kg⁻¹ group; compared with control group, $^{1)}P<0.05$; compared with MCT-20 mg·kg⁻¹ group, $^{2)}P<0.05$; compared with MCT-30 mg·kg⁻¹ group, $^{3)}P<0.05$; compared with the same group of pulmonary arteries with a diameter $<50 \ \mu m$, $^{4)}P < 0.05$.

中国现代应用药学 2021 年 11 月第 38 卷第 21 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2021 November, Vol.38 No.21 · 2629 · MCT 是经典的诱导大鼠肺动脉高压形成的药物,与人原发性和继发性肺动脉高压病理过程高度相似^[10]。课题组前期实验中使用 MCT-60 mg·kg⁻¹诱导大鼠肺动脉高压模型,发现大鼠一般情况差,死亡率高,遂推测高原低氧环境下 MCT 诱导大鼠肺动脉高压的剂量可能会低于平原地区,但是具体剂量不清楚。故设计本实验首先探讨亚高原地区 MCT 诱导大鼠肺动脉高压模型的最佳剂量。

本研究采用经右心导管测定的 mPAP ≥ 25 mmHg 来确定大鼠造模是否成功^[1],以 RVHI 评价大鼠右心肥厚程度,以肺组织 HE 染色评估肺 血管重构情况。同时将大鼠的一般情况、生存率、体质量变化、脏器系数、血液学指标和模型成功 率作为辅助评价指标。

研究结果表明, 在亚高原地区, MCT-30, 40, 50, 60 mg·kg⁻¹均可导致 mPAP 增高至 25 mmHg, 伴右心室肥厚, 肺微小动脉重构, 说明 30 mg·kg⁻¹ MCT 即可诱导大鼠肺动脉高压形成。同时笔者发 现, 亚高原本身并不会升高大鼠 mPAP, 但本研究 证实大鼠在亚高原地区接受不同剂量 MCT 处理 后,其 mPAP 和 RVHI 均高于平原地区^[11-13], 且马 凯等^[13]证实, 在平原地区采用 MCT-30 mg·kg⁻¹无 法诱导大鼠肺动脉高压形成。由此可得出结论, MCT 在亚高原地区更易诱导大鼠肺动脉高压形 成, 且剂量更低。

此外,之前的研究很少关注到 MCT 处理后大 鼠脏器系数和血液学指标的变化,为了评估模型 效果,本研究将其纳入评价范围。结果表明, MCT-30,40,50,60 mg·kg⁻¹ 诱导的大鼠肺动脉 高压伴随心肺增大,对肾脏大小无影响,肝脾肿 大只有在50 mg·kg⁻¹和60 mg·kg⁻¹时出现。同时, MCT 诱导的大鼠肺动脉高压伴随白细胞计数的升 高^[14-15],其中淋巴细胞升高趋势同白细胞计数一 致^[16],而大鼠红细胞系统相关指标(红细胞计数、 血红蛋白、血细胞比容)没有变化,上述数据说明 MCT 诱导大鼠肺动脉高压形成主要是通过淋巴细 胞等炎症细胞的积聚^[17],而不是通过增加红细胞 数量实现的。有趣的是,40 mg·kg⁻¹ MCT 诱导的 大鼠肺动脉高压不伴白细胞相关指标升高,其原 因及机制尚不清楚,后续将加大样本量验证。

综上,亚高原地区 MCT-30 mg·kg⁻¹即可引起 大鼠 mPAP 增高、血管重构、右心肥厚、炎性细 胞升高,符合肺动脉高压诊断标准,模型创建成 功(71.4%); 且实验期间大鼠一般情况好,全部存活,体质量无下降。故 30 mg·kg⁻¹ 是亚高原地区 MCT 诱导肺动脉高压模型的最佳剂量。本研究提示 MCT 诱导大鼠肺动脉高压形成的剂量与海拔高度有关,故推断,海拔越高,MCT 更易诱导大鼠肺动脉高压形成,且所需剂量越小,但不同海拔高度和 MCT 剂量的关系仍需继续研究。

此外,本研究发现,在亚高原地区使用 MCT-肺动脉高压模型同传统的低压低氧舱(4500m)诱 导大鼠肺动脉高压模型存在较大差异,各有优缺 点。两者均可在4周后成功诱导大鼠肺动脉高压模 型,但从病情严重程度上,低压低氧舱模型大鼠肺 动脉高压程度较轻,其 mPAP 水平约为 30~ 40 mmHg, 同 MCT-30 mg·kg⁻¹相当^[18-19]。而 MCT 诱导的大鼠肺动脉高压程度取决于 MCT 的剂量, 给予大剂量 MCT(50, 60 mg·kg⁻¹)后, 大鼠 mPAP 高达 60 mmHg, 严重者可致 80 mmHg^[11,20]。但 MCT 造模简单方便、重复性好,有利于药物药效 评价及机制研究[21],而低压低氧舱成本较高,且 无法随时观察大鼠状态。但实际应用中研究者应 根据实验目的进行模型选择, MCT 主要通过损伤 大鼠肺的内皮功能以模拟临床上炎性相关的肺动 脉高压, 涉及 p38 MAPK、NF-KB、NO 等信号通 路[22-24];低压低氧舱模型通过引起大鼠缺氧性肺血 管收缩和重塑模拟临床上低氧相关肺动脉高压,主 要涉及 Hif-1α、p38 MAPK、NF-κB、Rho/Rho、 PI3K/Akt/mTOR 等信号通路^[25]。

本研究也存在局限性:①本研究中海拔高度为 2 260 m,属亚高原地区,为了更好地研究高原低氧 和炎症的关系,接下来笔者会进一步在不同海拔高 度探讨 MCT 诱导大鼠肺动脉高压的最佳剂量;② 本研究初步证明了亚高原地区 MCT 更易诱导大鼠 肺动脉高压形成,但其中作用机制未作探讨;③郑 武洪等^[26]发现,平原地区使用 MCT-30 mg·kg⁻¹ 造 模第 8 周时 mPAP 又回落至正常水平,不能建立 稳定的肺动脉高压模型,接下来课题组将在高原 地区继续验证。

REFERENCES

- [1] 中华医学会呼吸病学分会肺栓塞与肺血管病学组. 中国肺动脉高压诊断与治疗指南(2021 版)[J]. 中华医学杂志, 2021, 101(1): 11-51.
- [2] 国际高原医学会慢性高原病专家小组. 第六届国际高原医 学和低氧生理学术大会颁布慢性高原病青海诊断标准[J].

青海医学院学报, 2005, 26(1): 3-5.

- [3] SOON E, HOLMES A M, TREACY C M, et al. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension[J]. Circulation, 2010, 122(9): 920-927.
- [4] YING Y, YE Z W, HUANG P, et al. *Sceptridium* ternatum for the treatment of pulmonary arterial hypertension in rats with pulmonary heart[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药 学), 2014, 31(7): 790-794.
- [5] LIU Y, SUN Z X. Research progress in animal models of pulmonary arterial hypertension[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin(中国实验动物学报), 2021, 29(2): 236-241.
- [6] CHEN D, YUAN T Y, CHEN Y C, et al. Evaluation of the preventive effect of DL0805-2 against monocrotaline induced rat pulmonary arterial hypertension[J]. Acta Pharm Sin(药学学 报), 2021, 56(1): 208-216.
- [7] TANG L, SHEN M M, ZHU M, et al. Efficacy evaluation and mechanisms of youguiyin in rats with pulmonary fibrosis[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae(中国实验方剂学杂志), 2018, 24(13): 93-99.
- [8] MOORE L G, NIERMEYER S, ZAMUDIO S. Human adaptation to high altitude: Regional and life-cycle perspectives[J]. Am J Phys Anthropol, 1998, 107(S27): 25-64.
- [9] 格日力. 高原医学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2015.
- [10] LI X W, GAO Y X, LI S. Effect of sesamin on pulmonary vascular remodeling in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension[J]. China J Chin Mater Med(中国中 药杂志), 2015, 40(7): 1355-1361.
- [11] GOMEZ-ARROYO J G, FARKAS L, ALHUSSAINI A A, et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 302(4): L363-L369.
- [12] DONG L J, CHEN P, CHENG J T. Experimental study on different doses of monocrotaline induced pulmonary hypertension in rats[J]. Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovascular Dis(中西医结合心脑血管病杂志), 2015, 13(10): 1172-1175.
- [13] MA K, XING Q S, XING J L, et al. Experimental research of pulmonary arterial hypertension model induced by different dose of MCT in SD rats[J]. Prog Mod Biomed(现代生物医学 进展), 2013, 13(21): 4005-4009.
- [14] GALIÈ N, HUMBERT M, VACHIERY J L, et al. 2015 ESC/ERS guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension[J]. Rev Esp Cardiol: Engl Ed, 2016, 69(2): 177.
- [15] KATO S, KISHIRO I, SUGIMURA H, et al. Changes of sequestered leukocytes and platelets by inhalation prostaglandin E(1) in the pulmonary microvasculature of rats

with monocrotaline-induced pulmonary hypertension[J]. J Vasc Res, 2002, 39(1): 83-87.

- [16] CIRILLO P. Activated platelets and leucocytes cooperatively stimulate smooth muscle cell proliferation and proto-oncogene expression via release of soluble growth factors[J]. Cardiovasc Res, 1999, 43(1): 210-218.
- [17] WANG Q, ZUO X R, WANG Y Y, et al. Monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension is attenuated by TNF-α antagonists via the suppression of TNF-α expression and NF-κB pathway in rats[J]. Vascul Pharmacol, 2013, 58(1/2): 71-77.
- [18] NAN X, SU S, MA K, et al. Bioactive fraction of *Rhodiola* algida against chronic hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension and its anti-proliferation mechanism in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2018(216): 175-183.
- [19] YANG Z T, SUN H X, SU S S, et al. Tsantan sumtang restored right ventricular function in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension rats[J]. Front Pharmacol, 2021(11): 607384. Doi: 10.3389/fphar.2020.607384.
- [20] DAI Y, CHEN X, SONG X X, et al. Immunotherapy of endothelin-1 receptor type A for pulmonary arterial hypertension[J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 73(20): 2567-2580.
- [21] SUN S C, FANG L H, DU G H. Research progress in animal modeling of pulmonary hypertension[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2020, 36(8): 1037-1040.
- [22] LAMÉ M W, JONES A D, WILSON D W, et al. Protein targets of monocrotaline pyrrole in pulmonary artery endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(37): 29091-29099.
- [23] YANG J M, ZHOU R, ZHANG M, et al. Betaine attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats via inhibiting inflammatory response[J]. Molecules, 2018, 23(6): 1274.
- [24] HU Y, FENG Z, FENG W J, et al. AOS ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension by restraining the activation of P-selectin/p38MAPK/NF-κB pathway in rats[J]. Biomed Pharmacother, 2019(109): 1319-1326.
- [25] LI M J, GUO L, YAN J P, et al. Study on effect of Xuefu Zhuyu decoction on pulmonary vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension rats via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用 药学), 2020, 37(21): 2576-2581.
- [26] ZHENG W H, LUO L, LI L, et al. Effects of dose and timing of adipose-derived stem cell transplantation on pulmonary arterial pressure in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats[J]. Chin J Cell Stem Cell: Electron Ed(中 华细胞与干细胞杂志: 电子版), 2018, 8(6): 321-327.

收稿日期:2021-03-29 (本文责编:陈怡心)