

小春花治疗肺心病模型大鼠肺动脉高压的研究

应茵^{1,2}, 叶佐武², 黄萍², 何俏军^{1*} (1.浙江大学药学院, 杭州 310058; 2.浙江省立同德医院, 杭州 310012)

摘要: 目的 观察小春花对肺心病模型大鼠肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)的影响。方法 120只SD大鼠随机分为正常对照组、模型组、西地那非组和小春花提取物高、中、低剂量组,每组20只。采用野百合碱(60 mg·kg⁻¹)皮下注射建立大鼠肺心病 PAH 模型;连续灌胃给药 21 d。采用右心导管法测定平均右心室压(mean right ventricular pressure, mRVP)、平均肺动脉压(mean pulmonary arterial pressure, mPAP)和最大右心室压(max right ventricular pressure, max RVP),处死动物测定称取肺湿重(lung wet weight, WW)、右心室游离壁(right ventricular free wall mass, RV)、左心室加心室间隔(left ventricular plus septal, LV+S)重量,计算肺指数(lung index, LI)和右心肥厚指数(right ventricular hypertrophy index, RVHI)。结果 模型组大鼠 mRVP、mPAP 和 max RVP 显著高于正常对照组($P<0.001$);与模型组比较,小春花高、中剂量组大鼠 mPAP、mRVP 和 max RVP 均显著降低($P<0.001\sim0.05$);小春花高剂量组大鼠 RV、LV+S、WW、LI 均显著低于模型组($P<0.001\sim0.01$)。结论 小春花对野百合碱诱导的大鼠肺心病 PAH 有一定的干预作用。

关键词: 肺心病; 肺动脉高压; 小春花

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)07-0790-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.004

Sceptridium Ternatum For the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension in Rats with Pulmonary Heart

YING Yin^{1,2}, YE Zuowu², HUANG Ping², HE Qiaojun^{1*} (1. Institute of Pharmaceutics, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Tongde Hospital of Zhejiang, Hangzhou 310012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effect of *Sceptridium ternatum* on pulmonary arterial hypertension in rats with pulmonary heart disease. **METHODS** All of 120 SD rats were randomly divided into control, model, sildenafil, *Sceptridium ternatum* low-dose, middle-dose and high-dose drug groups, 20 rats in each group. The animal model were established by intraperitoneally injecting monocrotaline of 60 mg·kg⁻¹. Rats in control and model groups were given saline by gavage for 21 d. The mean right ventricular pressure(mRVP), mean pulmonary arterial pressure(mPAP), and max RVP were measured by using right cardiac catheterization. The rats were then sacrificed for determination of lung wet weight(WW) and the weight of right ventricle(RV) and left ventricle plus septum(LV+S). Lung index(LI) and right ventricular hypertrophy index(RVHI) were calculated. **RESULTS** The mRVP, mPAP, max RVP in model group were higher than those of the control group($P<0.001$), and those parameters in the middle- and high-dose drug groups were lower than those of the model group($P<0.001\sim0.05$). The RV, LV+S, WW, RVHI and LI in the high-dose drug group were smaller than those of the model group($P<0.001\sim0.01$). **CONCLUSION** *Sceptridium ternatum* may have some effect on pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline in rats. **KEY WORDS:** pulmonary heart disease; pulmonary arterial hypertension; *Sceptridium ternatum*

肺源性心脏病(肺心病)是由肺组织、肺血管或胸廓慢性病变引起的肺组织结构和(或)功能改变,致使肺血管阻力增加,肺动脉压力升高,使右心室扩张(或肥厚),伴或不伴右心功能衰竭的一类疾病^[1-2]。此外,还伴随着一些组织功能障碍及内源性生物分子水平的改变^[3-4],具有高流行性、高患病率、高死亡率高和高费用的特点,严重威胁到人类健康。肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是肺心病发生发展的病理生理学基础,持续的PAH,

最终将导致右心室肥厚、扩大,甚至右心衰竭,肺动脉压越高,其预后越差^[5]。小春花(*Sceptridium ternatum*)为阴地蕨科植物阴地蕨 *Sceptridium ternatum* (Thunb.) Lyon.的带根全草,为长江以南多个省份常用中药材,具有清热解毒、平肝熄风、止咳、止血、明目祛翳等功效^[6],民间用于治疗支气管哮喘、百日咳、小儿高热惊搐等病。本实验采用野百合碱诱导建立肺心病大鼠模型,旨在观察小春花提取物对肺心病模型大鼠 PAH 的干预作用。

基金项目: 浙江省中医药优秀青年人才基金项目(2011ZQ001、2013ZQ003)

作者简介: 应茵,女,硕士生,主管药师 Tel: (0571)89972240
Tel: (0571)88208400 E-mail: qiaojunhe@zju.edu.cn

E-mail: kingadams@163.com *通信作者: 何俏军,男,博导,教授

1 材料

1.1 动物

健康成年 SD 大鼠 100 只, ♀ ♂ 各半, 体质量 (200±20)g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 生产许可证号: SCXK(沪)2008-0016, 动物级别为 SPF 级, 动物合格证号: 2008001630484。

1.2 药物

小春花提取物(自制); 西地那非(辉瑞制药有限公司, 批号: 1383014, 规格: 25 mg); 生理盐水(杭州民生药业有限公司, 批号: 21205062); 野百合碱(上海佰世凯化学科技有限公司, 批号: 12120505, 含量: 98.39%)。戊巴比妥钠(湖北兴银河化工有限公司, 批号: 120505, 含量: 99.03%)。

1.3 仪器

Mettler Toledo AL104 分析天平(瑞士梅特勒-托利多); BIOPAC MP150 型 16 通道生理信号记录分析系统(美国 BIOPAC); 德力西恒温手术台(德力西集团); AD113B08114 偏振光显微镜(日本奥林巴斯)。

2 方法

2.1 小春花提取物的制备

将野生采集的小春花全草, 晾干, 粉碎。称取小春花粗粉 80.0 g, 以 10 倍体积 70%乙醇溶液加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 过滤, 合并滤液, 减压浓缩至无醇味, 并加去离子水, 使其浓度为 500 mg·mL⁻¹, 待用。

2.2 造模及给药

120 只大鼠随机分为正常对照组、模型组、西地那非组、小春花高、中、低剂量组, 每组 20 只。正常对照组大鼠皮下注射等量乙醇-生理盐水(2:8)的混合溶液; 其余各组大鼠一次性皮下注射野百合碱(以乙醇:生理盐水=2:8 为溶剂)60 mg·kg⁻¹, 造模后第 2 天开始灌胃, 正常对照组、模型组每次生理盐水灌胃 10 mL·kg⁻¹; 西地那非组每次给药量为 17 mg·kg⁻¹; 小春花提取物高、中、低剂量组每次给药量分别为 10, 5, 2.5 g·kg⁻¹(与生理盐水混合后给药); 1 次·d⁻¹, 连续给药 21 d, 末次给药后 1 h 监测指标。

2.3 指标检测

2.3.1 体质量检测 试验期间, 每周 1 次测定动物体质量。

2.3.2 右心室压和肺动脉压检测 采用右心导管法。将特制好的 PE50 管从右心房进入右心室, 最后达到肺动脉, 并记录相应的压力和波形, 待稳

定后记录平均肺动脉压(mean pulmonary arterial pressure, mPAP)、平均右心室压(mean right ventricular pressure, mRVP)、最大右心室压(max right ventricular pressure, max RVP)。

2.3.3 计算右心肥厚指数 处死动物, 取出心脏, 沿房室沟剪去心房及大血管根部, 沿后室壁间沟将其分离成右心室和左心室加室间隔, 滤纸吸干多余的血, 用电子天平称量右心室游离壁(right ventricular free wall mass, RV)及左心室加室间隔(left ventricular plus septal, LV+S)的重量, 计算右心肥厚指数(right ventricular hypertrophy index, RVHI)。RVHI=[RV/(LV+S)]×100%。

2.3.4 肺指数 先向肺动脉内注入生理盐水, 洗出肺内血液, 剪去肺门, 滤纸吸干表面水分, 电子天平称量肺湿重量(lung wet weight, WW), 结合体质量(body weight, BW)计算肺指数(lung index, LI), LI=WW/BW×100%。

2.3.5 肺组织 HE 染色病理形态学观察 用 4%多聚甲醛后固定肺 48 h, 剪去肺门, 沿肺门横切, 取左肺组织块, 经洗涤和脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、展片及 HE 染色处理, 光学显微镜观察肺肌型小动脉。

2.4 统计方法

所有计量数据, 各剂量组间及对照组作方差齐性检验, 若方差齐($P>0.05$), 则做单因素方差分析; 若方差不齐($P<0.05$), 则进行非参数检验(Kruskal-Wallis H 检验), 有统计学差异($P<0.05$), 则各剂量组与对照组间做 Mann-Whitney U 检验。

3 结果

3.1 一般情况比较

实验中, 模型组大鼠第 3 周开始, 精神较差, 进食减少, 实验末期多只大鼠表现呼吸急促; 与模型组相比, 药物治疗各组大鼠实验期间精神状态、饮水情况正常, 进食较多。实验过程中无动物意外死亡。

3.2 不同组别实验大鼠体质量变化

实验中, 模型组在第 15 天时体质量增加趋于缓慢, 至第 19 天时体质量均低于其他组, 与正常对照组相比, 差异具有统计学意义($P<0.05$); 小春花高剂量组实验前期体质量增加较为明显, 均高于其余 4 组($P<0.05$), 第 15 天时体质量增加趋缓, 第 22 天时体质量较正常对照组轻, 但组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见表 1。

表 1 不同组别大鼠体重变化比较($n=20$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison the changes of body weight in rats between different groups($n=20$, $\bar{x} \pm s$)

组别	体质量/g						
	1 d	5 d	8 d	12 d	15 d	19 d	22 d
正常对照组	209.56±12.51	223.87±6.45	249.21±10.44	257.76±9.81	280.54±16.78	310.75±21.56	344.90±29.70 ²⁾
模型组	217.98±8.97	230.38±8.84	244.46±9.66	258.58±9.29	273.65±16.26	299.40±16.16 ¹⁾	318.30±7.67 ¹⁾
小春花高剂量组	214.60±13.89	240.85±12.04 ¹⁾²⁾	267.86±15.11 ¹⁾²⁾	288.75±21.99 ¹⁾²⁾	306.53±23.90 ¹⁾²⁾	319.05±5.28	336.04±14.47
小春花中剂量组	217.02±10.40	231.59±8.84	259.70±12.75 ²⁾	264.69±13.24	281.29±9.10	310.33±16.36	337.22±19.71
小春花低剂量组	213.56±9.78	240.27±7.34	259.52±5.86 ²⁾	273.19±24.15	279.72±22.52	311.26±4.74	332.43±14.98

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.05$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$

3.3 mRVP 和 max RVP、mPAP 的比较

SD 大鼠使用野百合碱造模 3 周后, 模型组大鼠的 mPAP 和 mRVP、max RVP 显著升高($P<0.001$); 与模型组比较, 小春花高、中剂量组大鼠 mPAP、mRVP 和 max RVP 均显著降低($P<0.001\sim 0.05$)。结果见表 2。

表 2 小春花对 PAH 大鼠右心室压和肺动脉压的影响($n=20$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Influence of *Sceptridium ternatum* on the right ventricle and pulmonary artery pressures($n=20$, $\bar{x} \pm s$)

组别	mRVP/mmHg	mPAP/mmHg	max RVP/mmHg
正常对照组	16.6±1.8	24.2±3.1	36.3±3.6
模型组	35.0±6.0 ¹⁾	45.9±6.8 ¹⁾	78.1±10.2 ¹⁾
西地那非组	26.8±4.4 ⁴⁾	36.4±5.5 ⁴⁾	65.0±14.8 ⁴⁾
小春花低剂量组	31.2±6.7	41.4±7.5	76.6±14.9
小春花中剂量组	27.1±5.5 ⁴⁾	38.8±5.9 ³⁾	69.3±13.5 ²⁾
小春花高剂量组	27.0±6.8 ⁴⁾	37.7±7.1 ³⁾	65.3±13.2 ³⁾

注: 与正常对照组比较: ¹⁾ $P<0.001$; 与模型组比较: ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.001$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.001$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.001$

3.4 各组大鼠 WW 和 LI 的比较

SD 大鼠使用野百合碱造模后, 模型组大鼠 WW、LI 均显著大于正常对照组($P<0.001$); 小春花高、中、低剂量组 WW、LI 均显著低于模型组($P<0.001\sim 0.05$)。结果见表 3。

3.5 各组大鼠 RVHI 的比较

SD 大鼠使用野百合碱造模后, 模型组大鼠 RV、LV+S 均显著大于正常对照组($P<0.001\sim 0.05$); 小春花高剂量组大鼠 RV、LV+S 显著低于模型组($P<0.001\sim 0.01$); 小春花中、低剂量组大鼠 LV+S 显著低于模型组($P<0.05$)。结果见表 4。

表 3 小春花对 PAH 大鼠 WW 和 LI 的影响($n=20$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Influence of *Sceptridium ternatum* on the WW and LI($n=20$, $\bar{x} \pm s$)

组别	WW/g	LI/%
正常对照组	1.26±0.20	0.440±0.070
模型组	2.00±0.26 ¹⁾	0.590±0.085 ¹⁾
西地那非组	1.94±0.28	0.56±0.09
小春花低剂量组	1.79±0.28 ²⁾	0.520±0.073 ³⁾
小春花中剂量组	1.78±0.22 ³⁾	0.512±0.067 ³⁾
小春花高剂量组	1.67±0.31 ³⁾	0.494±0.086 ³⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.001$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.001$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$

表 4 小春花对 PAH 大鼠 RVHI 的影响($n=20$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Influence of *Sceptridium ternatum* on the RVHI($n=20$, $\bar{x} \pm s$)

组别	RV/g	LV+S/g	RVHI/%
正常对照组	0.170±0.030	0.710±0.100	24.4±2.5
模型组	0.327±0.060 ³⁾	0.839±0.062 ¹⁾	39.3±8.0 ²⁾
西地那非组	0.300±0.040	0.860±0.060	35.4±4.9
小春花低剂量组	0.310±0.062	0.793±0.042 ⁴⁾	38.9±6.3
小春花中剂量组	0.300±0.056	0.794±0.067 ⁴⁾	37.8±6.5
小春花高剂量组	0.270±0.045 ⁵⁾	0.767±0.055 ⁶⁾	35.1±5.1

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$; 与模型组比较, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$, ⁶⁾ $P<0.001$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$; compared with model group, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$, ⁶⁾ $P<0.001$

3.6 肺病理形态结构的比较

光镜下 HE 染色观察发现, 正常对照组肺小动脉壁较薄且规则, 模型组肺小动脉中膜平滑肌细胞明显增生, 血管壁明显增厚; 小春花高、中、低剂量组与模型组比较: 肺小动脉厚度肺小动脉厚度有下降趋势。结果见图 1 和表 5。

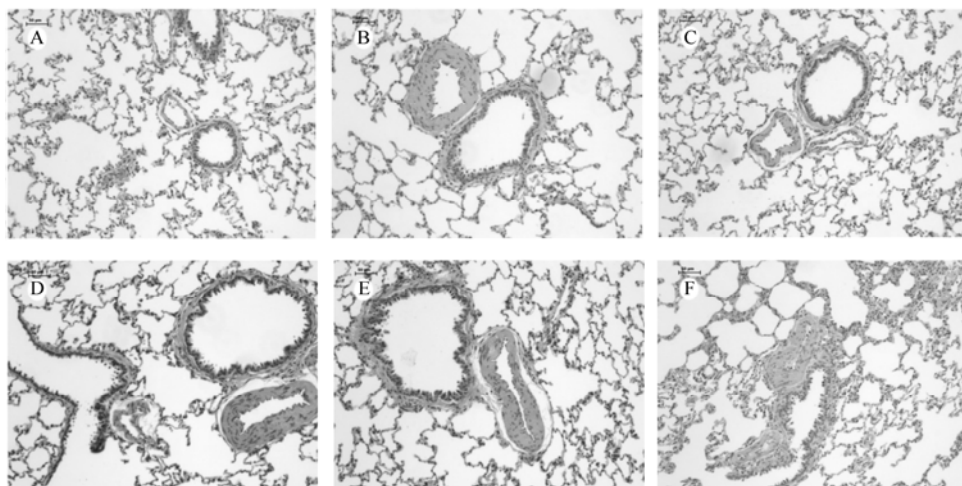


图 1 小春花对 PAH 大鼠肺病理的影响

A-正常对照组; B-模型组; C-西地那非组; D-小春花低剂量; E-小春花中剂量; F-小春花高剂量

Fig. 1 Effects of *Sceletidium ternatum* on pulmonary pathology

A-control group; B-model group; C-sildenafil group; D-*Sceletidium ternatum* low-dose drug group; E-*Sceletidium ternatum* middle-dose drug group; F-*Sceletidium ternatum* high-dose drug group

表 5 小春花对 PAH 大鼠肺血管壁厚度的影响

Tab. 5 Effects of *Sceletidium ternatum* on pulmonary vascular wall thickness

组别	血管壁厚度/ μm
正常对照组	6.1 $\pm$ 1.6
模型组	47.8 $\pm$ 14.2 ¹⁾
西地那非组	13.3 $\pm$ 6.1 ³⁾
小春花低剂量组	42.5 $\pm$ 10.6
小春花中剂量组	32.0 $\pm$ 5.7 ²⁾
小春花高剂量组	26.8 $\pm$ 12.6 ²⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.001$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.001$
Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.001$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.001$

4 讨论

肺心病主要病理变化为 PAH 和心脏病变(右心肥厚)两方面, 其中 PAH 是肺心病发病过程中的中心环节和先决条件, 是心脏病变时肺心病的最终归宿和集中表现。主要治疗措施有改善呼吸功能、纠正缺氧和二氧化碳潴留、抗凝剂、血管扩张剂的应用等^[7-8], 目前尚缺乏成熟的治疗药物和措施。近年来, 中医药在防治肺心病方面已经取得了一定的进展^[9]。

据目前所知小春花的主要化学成分为黄酮类: 木犀草素和阴地蕨素^[10]。现代药理研究表明: 从小春花中分离得到的阴地蕨素具有抗炎、抗过敏、抗氧化、抗增生等多种作用^[11]。以小春花为主药配伍的方剂具有增强小鼠网状内皮系统功能, 提高小鼠的免疫功能^[12]。王少明等^[13]的研究

表明小春花具有较强的癌症化学预防作用, 再次说明了小春花增强免疫功能的作用。小春花口服液具有一定的化痰作用, 同时对烟熏所致的小鼠慢性支气管炎的病理形态改变也有很好的保护作用^[14]。

肺心病大鼠模型被广泛应用于大量基础研究中, 国内目前制备 PAH 模型及右心室重构或右心衰竭的主要有以下几种方式: ①野百合碱模型; ②低压低氧模型; ③体-肺循环的分流模型; ④其他。结合文献报道, 本课题组采用皮下注射野百合碱的方式诱导 PAH, 这也是目前最常用和比较成熟的方法^[15-16]。

本研究结果显示, 造模给药 3 周后, 模型组动物体质量显著降低($P<0.05$), 而小春花对造模动物体质量的减轻有缓解趋势。与模型组比较, 小春花高、中剂量组大鼠 mPAP、mRVP 和 max RVP 均显著降低($P<0.001\sim 0.05$), 而肺组织病理结果中, 小春花给药组与模型组比较, 肺小动脉厚度有下降趋势, 肺间质炎症明显减轻, 炎症细胞主要局限在肺小动脉周围。以上结果提示小春花可能通过改善肺血管重构, 减轻肺组织炎症而发挥缓解 PAH 的作用。随着时间的进展, 肺心病模型大鼠逐渐表现出右心衰竭的情况, 其 RV、WW 明显增大, LV+S 重量减少。小春花高剂量组大鼠 RV、LV+S、WW、LI 均显著低于模型组($P<0.001\sim 0.01$), 显示小春花可以一定程度抑制肺心病模型大鼠右心衰竭, 且呈现剂量依赖性。

本研究中主要采用右心室压和肺动脉压力、mPAP、RVHI、LI 及组织病理改变来作为衡量小春花治疗 PAH 的药效学指标。从结果看,小春花对野百合碱诱导的大鼠肺心病 PAH 具有一定的干预作用。但限于当前已知的研究,小春花对影响 PAH 的作用机制及起效的活性成分并不明确,有待进一步探究。

REFERENCES

- [1] JARDIN F, VIEILLARD B A. Acute cor pulmonale [J]. Cur Opin Criti Care, 2009, 15(1): 67-70.
- [2] WANG X T. The etiology and pathogenesis of pulmonary heart disease [J]. Chin Com Doct(中国社区医师), 2010, 10(12): 3-4.
- [3] YANG S Y, LUO X H, FENG E Z, et al. Analysis of prognostic risk factors in the patients with acute exacerbation of chronic cor pulmonale and obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome in high altitude area [J]. Chin Crit Care Med(中国危重病急救医学), 2010, 22(5): 271-274.
- [4] PRIBYLOV S A, KONOPLIA A I, SIROTKIN S A, et al. Endothelial dysfunction mediators in patients with chronic cor pulmonale [J]. Klin Med(Mosk), 2006, 84(11): 20-24.
- [5] KJAERGAARD J, AKKAN D, IVERSEN K K, et al. Prognostic importance of pulmonary hypertension in patients with heart failure [J]. Am J Cardiol, 2007, 99(8): 1146-1150.
- [6] The State Administration of Traditional Chinese Medicine "The Chinese Materia Medica" Editorial Committee. The Chinese Materia Medica: II(中华本草: 第二册) [M]. Vol 1. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999: 408-409.
- [7] LU Z Y, ZHONG N S. Internal Medicine(内科学) [M]. 7th Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 91-97.
- [8] LU H M, LIANG X L, ZHANG C J, et al. Effect of combination of sildenafil and beraprost or atorvastatin on pulmonary arterial hypertension [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(12): 1134-1136.
- [9] YING Y, HUANG P, YANG B. Experimental research progress of traditional Chinese medicine(TCM) treatment of pulmonary heart disease [J]. Zhejiang J Inte Trad West Med(浙江中西医结合杂志), 2013, 23(1): 75-78.
- [10] The State Administration of Traditional Chinese Medicine "The Chinese Materia Medica" Editorial Committee. The Chinese Materia Medica: I(中华本草.上册) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1998: 207.
- [11] RUAN J S. Recent progress on research of *Sceptridium ternatum* and components [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2002, 33(Suppl): 328-329.
- [12] ZHUAN J, RUAN J S. Study on the effect of *Sceptridium ternatum* pill on immune function of mice [J]. Fujian J Trad Chin Med(福建中医药), 2007, 38(3): 40-41.
- [13] WANG S M, RUAN J S. Inhibition of *Sceptridium ternatum* on mouse skin papilloma [J]. Chin Med Mat(中药材), 2008, 31(3): 418-420.
- [14] WANG S M, RUAN J S. Experimental research of the impacts of *Sceptridium ternatum* on expectorant actions and pathological morphology for chronic bronchitis rats [J]. Fujian J Tradit Chin Med(福建中医药), 2001, 32(3): 18-19.
- [15] WANG J D, YANG D K, LI Z G, et al. Establishment of rat models of pulmonary hypertension induced by monocrotaline [J]. J Clin Rehabil Tiss Eng Res(中国组织工程研究与临床康复), 2011, 15(28): 5237-5240.
- [16] WENG J R, GUAN R J, JIANG H, et al. Intervention of rosuvastatin in monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension in rats and its mechanism [J]. Chin J Hyper(中华高血压杂志), 2012, 20(12): 1134-1139.

收稿日期: 2013-10-13