

野百合碱诱导大鼠肺动脉高压动物模型的制备

赵方允¹, 王紫微¹, 潘纯红^{2*}

1. 昆明市延安医院 昆明医科大学附属延安医院 药学部, 云南 昆明 650051

2. 昆明市第一人民医院 昆明医科大学附属甘美医院 药学部, 云南 昆明 650000

摘要: **目的** 采用注射野百合碱(MCT)制备大鼠肺动脉高压模型,并对肺动脉压测定方法进行优化。**方法** 通过ip MCT诱导建立大鼠肺动脉高压模型,通过测定大鼠肺血管阻力的方法来对大鼠右心室压进行测定,采用阳性药对照、血流动力学测定和组织学观察确定模型是否建立成功。**结果** ip 50 mg/kg MCT 4周后大鼠右心室平均压、右心肥大指数对比对照组明显增高,观察病理组织切片,可见明显的内皮细胞损伤,分布不均,动脉管壁明显增厚,肺组织有大量的炎性细胞浸润,出现肺血管的重构,证实肺动脉高压动物模型造模成功。**结论** 采用ip MCT可以建立稳定的大鼠肺动脉高压模型,且具有较高的存活率,同时建议采用改良的心导管测定方法测定大鼠右心室压力。

关键词: 野百合碱;肺动脉高压;动物模型制备;存活率

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)10-2004-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.10.003

Preparation and determination of animal model of pulmonary hypertension induced by monocrotaline in rats

ZHAO Fang-yun¹, WANG Zi-wei¹, PAN Chun-hong²

1. Department of Pharmacy, Yan'an Hospital of Kunming City, Yan'an Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming 650051, China

2. Department of Pharmacy, Kunming First People's Hospital, Calmette Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming 650051, China

Abstracts: Objective To establish pulmonary hypertension model of rats by injection of monocrotaline (MCT), and to optimize measurement method of pulmonary arterial pressure. **Methods** Rat pulmonary hypertension model was established by ip MCT induction, and right ventricular pressure was measured by measuring pulmonary vascular resistance in rats. Positive drug control, hemodynamic measurement, and histological observation were used to determine whether the model was established successfully. **Results** Four weeks after ip MCT rat average pressure, right heart right ventricular hypertrophy index were increased compared to control group obviously, observed the pathological tissue slice, visible obvious endothelial cell damage, uneven distribution, the artery wall thickening obviously, there are a large number of inflammatory cells infiltration, lung tissue of pulmonary vascular reconstruction, confirmed that the pulmonary hypertension animal model building success. **Conclusion** Intraperitoneal injection of 50 mg/kg MCT can establish a stable rat model of pulmonary hypertension with a high survival rate, and it is recommended to use an improved cardiac catheterization method to measure right ventricular pressure in rats.

Key words: monocrotaline; pulmonary hypertension; animal model preparation; survival rate

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是由于肺血管收缩反应性增强及肺血管结构重建,最终引起肺动脉压力升高为主要特征的一组病理生理综合征^[1]。伴随疾病的进展,肺动脉管腔狭窄,阻力进一步增加,会引起代偿性的右心室结构重

构,甚至导致患者因右心室衰竭而死亡^[2-3]。目前,人们对于PH的发病机制尚未完全清楚,对其治疗的药物一般只通过一到两种机制发挥作用,治疗措施缺乏。在PH的基础研究中,简单实用的PH动物模型是研究PH的基础。目前PH模型的建立经

收稿日期: 2021-02-19

基金项目: 云南省高层次卫生计生技术人才培养经费资助(H-2019026); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资金项目[2018FE001(-082)]

作者简介: 赵方允,男,主管药师,研究方向为医院药学、药理学。E-mail: 89101425@qq.com

*通信作者: 潘纯红,女,主管药师,研究方向为医院药学、药理学。E-mail: 147473883@qq.com

过不断改进,为 PH 的研究提供帮助,但是此类模型能否代表 PH 的病理发病机制,以及能够在多大程度上模拟临床肺动脉高压的细胞和分子发生机制仍需探讨^[4]。目前建立 PH 模型的方法主要有低氧吸入诱导法、野百合碱(monocrotaline, MCT)注射法和外科手术介入分流术等方法。本实验通过 ip MCT 制备大鼠肺动脉高压模型。采用 MCT 制备模型比较其他方法相比,具有时间短,操作方法简便,费用低,重复性好等优点^[5-6]。肺动脉压测定多采用右心导管、频谱多普勒超声、气囊漂浮导管法等方法,但以上方法并不适用于大鼠。因此本实验参照改良心导管测定大鼠肺血管阻力的方法来对大鼠右心室压进行测定^[7-9]。以期建立较为稳定、高效、实用的测定方法,为 PH 动物模型建立和肺动脉高压的测定寻找一种科学、简便、实用、稳定的方法。

1 材料

1.1 试剂

MCT(Sigma,纯度:100%,批号 WXBC4737V),枸橼酸西地那非[Sigma,纯度:(98.6±0.1)%,批号 LRAA9454.2],肝素钠(江苏万邦生化医药股份有限公司,2 mL:1.25 万 U,批号 51709108),0.9%氯化钠注射液(昆明南疆制药有限公司,批号 BD171121),水合氯醛(S08250 美仑生物)。

1.2 仪器

多导生理检测仪(上海玉研科学仪器有限公司),BL-420F 生物机能实验系统(成都泰盟软件有限公司),TP1102 电子天平(上海光正医疗仪器有限公司),CMIAS 图像处理与分析系统,石蜡切片机(Thermo Scientific HM 355S)。

1.3 实验动物

SPF 级,雄性 SD 大鼠,6~8 周龄,体质量为(170±10)g,购自昆明医科大学实验动物中心,动物许可证号:SCXK(滇)k2015-0002。实验课题通过伦理审查。

2 方法

2.1 实验分组与造模

将雄性 SD 大鼠随机分为 3 组。对照组(8 只)ip 0.9%氯化钠注射液 1 mL;模型组(10 只)1 次性 ip MCT 50 mg/kg^[5];西地那非组(8 只)在模型组的基础上从第 1~20 天 ig 西地那非 10 mg/(kg·d)。

2.2 实验动物的生活状态及生存率

观察大鼠活动及呼吸等情况,记录大鼠体质量

变化,并计算各组大鼠的生存率。

2.3 右心室压力的测定

4 周后,取对照组和模型组大鼠,ip 10%水合氯醛(30 mL/kg),麻醉后参照改良心导管测定大鼠肺血管阻力的方法^[7-9],采用自制弯曲经肝素化抗凝处理的 PE-50 导管,从颈外动脉插管至右心室,直至多道生理仪显示右心室波形。

2.4 心肺组织形态观察及右心肥大指数的测定

完整切除大鼠心脏及肺叶,观察心肺组织的外表、体积是否有明显变化,触碰后弹性是否有变化,是否出现瘀血及瘀斑等。取下心脏组织,分离左心室(LV)、室间隔(S)和右心室(RV),分别进行称质量。按照公式右心室肥厚指数(RVHI)=RV 质量/(LV 质量+S 质量)计算 RVHI。

2.5 制作肺组织病理切片并观察

取左下肺组织,制作成病理切片,放置于显微镜下观察是否出现内皮损伤、管腔是否变得狭窄、小动脉是否出现肌化、动脉管壁是否出现玻璃样变、肺组织是否有大量炎性细胞浸润,肺血管密度是否变小等。

2.6 肺小动脉形态计量学指标测定

HE 染色肺组织病理切片,采用 CMIAS 图像处理与分析系统,测量与终末细支气管伴行的肺小动脉管壁中膜厚度(MT)、管腔面积(VA)、管壁面积(MA)、外径(ED)和血管总面积(TAA),按公式(2×MT/ED)计算中膜厚度百分比(MT)、MA/TAA 值(WA)及 VA/TAA 值(VA)。

2.7 肺组织微血管密度的测定

用石蜡包埋染色肺组织后制作切片,在显微镜下测定微血管密度。

2.8 统计学处理

应用 SPSS Statistics v20 软件分析数据,数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 实验动物生活状态及生活率

与对照组相比,模型组大鼠出现活动量减少、食欲下降、体质量减轻、毛发直竖、灰暗且无光泽,并出现喘鸣音、呼吸困难、口腔鼻腔出血、胸腹水。对照组存活率为 100%,模型组存活率为 80%,西地那非组存活率为 75%。

3.2 右心室收缩压(RVSP)测定

对照组、模型组和西地那非组大鼠 RVSP 分别为(16.38±2.15)、(47.48±4.75)、(21.94±4.03)

mm Hg (1 mm Hg=133 Pa)。模型组大鼠 RVSP 显著高于对照组和西地那非组 ($P<0.01$), 见图 1。

3.3 心肺组织变化和右心肥大指数的测定

模型组在建模 4 周后观察心肺组织表面呈紫红色, 同时见大小不等的凹陷, 伴有瘀血和瘀斑, 触

摸弹性较差、偏硬, 心脏体积以右心室增大为主。而对照组大鼠组织呈灰白色、弹性好, 触之柔软, 未见瘀血瘀斑, 心脏体积正常。与对照组 RVHI (24.32%) 相比, 模型组 RVHI (66.66%) 和西地那非组 RVHI (40.47%) 明显增高。

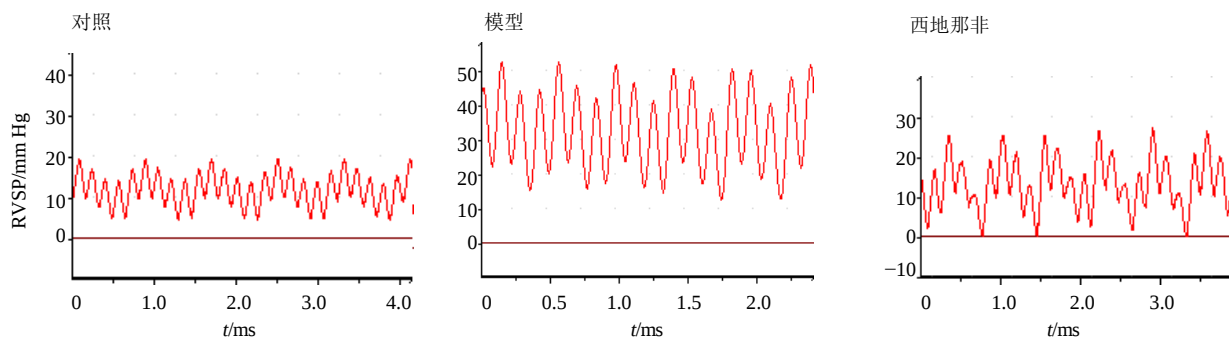


图 1 各组大鼠右心室收缩压波形图

Fig. 1 Right ventricular systolic blood pressure waveform of rats in each group

3.4 肺组织病理改变

相对于对照组, 模型组大鼠肺组织形态学指标出现明显变化, 出现血管内皮细胞损伤, 细胞分布不均, 动脉管壁明显增厚伴玻璃样变, 小动脉管腔狭窄, 肌化明显, 肺组织有大量炎性细胞浸润, 肺血管密度变小。西地那非组与模型组相比肺小管管壁变薄, 管腔明显变大, 见图 2。

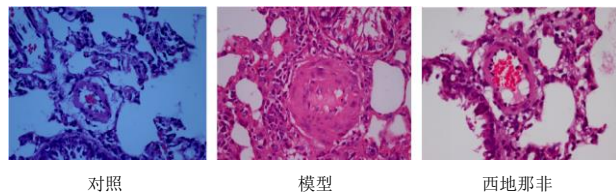


图 2 大鼠病理组织切片 ($\times 40$)

Fig. 2 Pathological sections of rats ($\times 40$)

3.5 肺小动脉形态计量学指标检测结果

模型组中膜厚度百分比为 (60.4 ± 10.9)%, 明显高于对照组的 (32.6 ± 8.3)%; 而西地那非组中膜厚度百分比为 (33.8 ± 8.1)%, 与对照组相近。模型组肺小动脉管壁比对照组明显增厚, 管腔缩小, 西地那非组与对照组无明显差异, 见表 1。

3.6 肺血管微血管密度的测定

与对照组相比, 模型组大鼠肺微血管密度减少明显 ($P<0.01$), 西地那非组大鼠与对照组微血管密度无显著性差异, 见表 2。

4 讨论

PH 是一类慢性肺循环疾病, 其病理基础主要

表 1 大鼠肺小动脉形态计量学指标测定结果

Table 1 Results of morphometric indexes of pulmonary arterioles

组别	n/只	MT/%	VA/%	WA/%
对照	8	32.6 ± 8.3	47.2 ± 4.4	60.8 ± 9.5
模型	8	$60.8 \pm 10.9^{**}$	$25.2 \pm 6.1^*$	$88.2 \pm 13.2^*$
西地那非	6	$33.8 \pm 8.1^{##}$	$46.7 \pm 4.6^{\#}$	$61.2 \pm 10.3^{\#}$

与对照组比较: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$; 与模型组比较: $^{\#}P<0.05$

$^{##}P<0.01$

$^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$ vs model group

表 2 各组大鼠微血管个数

Table 2 Number of microvessels in each group

组别	n/只	微血管个数/个
对照	8	7
模型	8	4 **
西地那非	6	6

与对照组比较: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$; 与模型组比较: $^{\#}P<0.05$

$^{##}P<0.01$

$^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$ vs model group

表现为肺血管的重构。迄今为止, 人们仍未完全阐明其发病机制。同时, 对于 PH 的研究, 建立简便与实用的 PH 模型的是研究 PH 的基础。野百合碱在经过大鼠肝脏代谢后, 损伤肺血管内皮细胞, 收缩肺血管。同时受损的血管内皮细胞通过释放炎性细胞因子和趋化因子, 使得病变血管处聚集大量的炎性细胞, 从而引起血管壁细胞异常增殖, 发生血

管重构, 最终导致肺动脉压力升高。因此通过对大鼠腹腔注射野百合碱可以诱导 PH 模型, 且与临床 PH 具有相似性^[5-6]。西地那非是一种降压药, 通过口服的方式给予西地那非, 可以降低肺动脉压, 缓解野百合碱所造成的症状。

模型组大鼠出现喘鸣音、呼吸困难、口腔鼻腔出血、胸腹水等症状, 存活率为 80%。相对于对照组和西地那非组, 模型组 RVSP 显著增高, 大鼠肺组织形态学指标出现明显变化, 肺组织中存在大量炎性细胞浸润, 动脉管壁明显增厚伴玻璃样变, 小动脉管腔狭窄, 肌化明显, 肺血管密度变小。同时伴有明显的内皮细胞损伤。而 PH 的主要病理基础是肺血管重构, 从肺小动脉形态计量学检测可以看出血管重建的情况。对比模型组与对照组、西地那非组的 MT、MA 和 VA 均具有显著的差异, 反映出大鼠肺血管出现重构, 且对模型组右心导管测量的肺动脉收缩压超过 30 mm Hg, 因此认为肺动脉高压动物模型建立成功, 采用 MCT 一次性 ip 可成功建立肺动脉高压模型。

测定大鼠肺动脉压过程中, 参照改良的心导管测定方法来对大鼠右心室压力测定方法进行探索, 通过对聚乙烯管进行改造和对插管方法进行探索, 通过解剖实验动物确定导管头所在位置及开口朝向, 明确不同波形的意义, 指导插管过程。该方法具有测压准确、成功率高、用时少、易操作等优点, 为后期采用动物模型做进一步实验打下基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Paulin R, Michelakis E D. The metabolic theory of

pulmonary arterial hypertension [J]. *Circ Res*, 2014, 115(1): 148-164.

[2] Malenfant S, Margaillan G, Loehr J E, et al. The emergence of new therapeutic targets in pulmonary arterial hypertension: from now to the near future [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2013, 7(1): 43-55.

[3] Simon M A. Assessment and treatment of right ventricular failure [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2013, 10(4): 204-218.

[4] 李波, 何巍. 肺动脉高压动物模型的理论研究及其制备特点 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(11): 2039-2042.

[5] 李松华, 石仁华, 朱琴, 等. 野百合碱注射建立大鼠肺动脉高压模型的方法 [J]. *解放军医学院学报*, 2015, 36(2): 171-174.

[6] Tofovic S P, Salah E M, Mady H H, et al. Estradiol metabolites attenuate monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005, 46(4): 430-437.

[7] Carlino C, Tobias J D, Schneider R I, et al. Pulmonary hemodynamic response to acute combination and monotherapy with sildenafil and brain natriuretic peptide in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension [J]. *Am J Med Sci*, 2010, 339(1): 55-59.

[8] 许庆华, 李文岚, 庄锡彬, 等. 肺动脉高压大鼠右心导管插管方法改进 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2013, 36(12): 984-985.

[9] Zuo X R, Wang Q, Cao Q, et al. Nicorandil prevents right ventricular remodeling by inhibiting apoptosis and lowering pressure overload in rats with pulmonary arterial hypertension [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44485.

[责任编辑 高源]