

## 脂氧素受体激动剂 BML-111 对左向右分流型肺动脉高压大鼠作用的影响

龚兴瑞,陈永梅,向勇,许先成,王贤裕,秦成名

(湖北医药学院附属太和医院麻醉科,湖北 十堰 442000)

**【摘要】目的** 观察脂氧素受体激动剂 BML-111 对肺动脉高压大鼠肺动脉压力和肺组织炎症的影响。**方法** 选择 SD 大鼠 30 只,随机分为三组:C 组、PH 组、B 组,PH 组和 B 组大鼠行建立左颈总动脉-颈外静脉吻合加左侧股动脉-股静脉吻合,吻合饲养六周后,PH 组每天腹腔注射生理盐水,B 组每天腹腔注射  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  BML-111 连续四周,C 组每天腹腔注射等量生理盐水。实验测量指标:平均肺动脉压力、右心室收缩压、RV/(LV+S)、肺小动脉中膜厚度百分比、小动脉肌化程度、新生内膜厚度百分比、肺组织匀浆炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 的水平。**结果** PH 组和 B 组平均肺动脉压力、右心室收缩压、RV/(LV+S)、肺小动脉中膜厚度百分比、小动脉肌化程度、新生内膜厚度百分比高于 C 组( $P < 0.05$ ),PH 组和 B 组大鼠肺组织匀浆 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 的含量高于 C 组( $P < 0.05$ );B 组平均肺动脉压力、右心室收缩压、肺小动脉中膜厚度百分比、新生内膜厚度百分比低于 PH 组( $P < 0.05$ ),B 组大鼠肺组织匀浆 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 均低于 PH 组( $P < 0.05$ )。**结论** 脂氧素受体激动剂 BML-111 可减轻左向右分流型肺动脉高压大鼠肺动脉压力,其机制可能与减轻肺周围组织炎症反应有关。

**【关键词】** BML-111; 左向右分流; 肺动脉高压; 大鼠

**【中图分类号】** R-332    **【文献标识码】** A    **【文章编号】** 1003—6350(2013)02—0160—03

**Effect of lipoxin receptor agonist BML-111 on rats with pulmonary hypertension induced by left-to-right shunt.** GONG Xing-rui, CHEN Yong-mei, XIANG Yong, XU Xian-cheng, WANG Xian-yu, QIN Cheng-ming. Department of Anesthesiology, Taihe Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, CHINA

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of BML-111 on pulmonary arterial pressure and inflammation of rats with pulmonary hypertension induced by left-to-right shunt. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into three groups: C group, PH group and B group. Both PH group and B group applied left common carotid artery-external jugular vein shunt and left femoral artery-vein shunt. Six weeks later, rats in B group received intraperitoneal injection of BML-111  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , while those in PH group received saline injection for four weeks. The rats in C group were treated by intraperitoneal injection of saline. The MPAP, RVSP, RV/(LV+S), the ratio of media thickness of pulmonary arterioles, distal arteriole muscularization and the count of neointimal proliferation, and the level of IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1 of pulmonary tissue were compared between the three groups. **Results** Compared with C group, the PH group and B group has significantly higher levels of MPAP, RVSP, RV/(LV+S), the ratio of media thickness of pulmonary arterioles, distal arteriole muscularization and the count of neointimal proliferation, and significantly higher levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1 in pulmonary tissue ( $P < 0.05$ ). Compared with B group, the PH group has higher levels of MPAP, RVSP, the ratio of media thickness of pulmonary arterioles and the count of neointimal proliferation, IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1 in pulmonary tissue ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** BML-111 can ameliorate pulmonary arterial hypertension. The mechanism might be attributed to the reduction of the inflammation of pulmonary tissue.

**【Key words】** BML-111; Left-to-right shunt; Pulmonary hypertension; Rats

肺动脉高压是小儿先天性心脏病常见并发症,其病理改变特点是肺动脉压力的进行性升高,并最终导致右心衰竭和死亡。肺动脉高压的发生机制与炎症反应导致的平滑肌细胞和内皮细胞增殖有密切关系,通常采用吸氧、强心、扩张肺动脉血管治疗等,但疗效

并不满意<sup>[1]</sup>。BML-111 是一种可以激活脂氧素受体的物质,作用后可发挥一种促炎症介质消退作用,其作用机制包括抑制多条细胞内信号转导途径的激活、抑制炎症介质浸润等,因此它用来治疗肺动脉高压成为可能。本试验拟观察 BML-111 对左向右分流型肺

基金项目:十堰市科技局指导项目(编号:ZD20111016)

通讯作者:秦成名。E-mail:qcmxy@126.com

动脉高压大鼠肺动脉压力及肺血管病理改变的影响，并初步分析其机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与器械** 健康成年SD大鼠30只，体重400~450 g，随机分为三组：C组、PH组、B组，每组10只，实验动物由湖北医药学院动物实验中心提供。实验器材准备包括：压力换能器、显微镜、手术显微器械、肝素、水合氯醛、盐酸戊乙奎醚、青霉素等。

**1.2 模型制备** 将盐酸戊乙奎醚注射液1 mg和氟哌利多5 mg加入100 ml水合氯醛，采用3 ml/100 g的剂量腹腔注射麻醉，麻醉后将大鼠固定于手术台上，2 mg/kg肝素行腹腔注射，术中持续面罩给氧。将PH组、B组大鼠沿左侧颈斜形剪开，游离左侧颈总动脉和颈外静脉，对颈外静脉远心端结扎，颈总动脉下段用血管夹夹住，于发出颈外动脉分支前结扎剪断，将BD20G的动脉穿刺针剪取1 cm作为导管连接颈总动脉近心端和颈外静脉近心端，结扎后固定导管，松开血管夹，颈外静脉变红且有搏动则说明分流成功。分离左侧股动脉、股静脉，将动脉近心端，静脉远心端阻断后，动脉、静脉壁分别刺入22G导管穿刺针后行吻合，吻合后松开近心端的血管夹股静脉变红且有搏动则吻合成功。局部喷洒青霉素5万U后缝合伤口。C组仅行麻醉和局部切开操作。将大鼠放回笼中，饲养6周后，PH组每天腹腔注射生理盐水，B组每天腹腔注射 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  BML-111，连续4周后将大鼠取出进行实验。

**1.3 肺动脉压力测量** 将大鼠按照如前的方式行腹腔注射麻醉，麻醉后固定于手术台上，分离右侧颈外静脉，将右心导管充满肝素盐水后插入，连接换能器并与监护仪相连，当置入导管进入右心室时记录其右室收缩压(RVSP)，监护仪出现肺动脉波形时记录其平均肺动脉压力(MPAP)，连续三次读数，计算其平均值。压力测量完毕后处死大鼠，游离右室(RV)和左室+室间隔(LV+S)并称重，计算 $(RV)/(LV+S)$ 。

**1.4 组织病理学测定** 用生理盐水冲洗肺动脉剩余的血液，同时用10%的中性甲醛在20 cmH<sub>2</sub>O(1 cmH<sub>2</sub>O=0.098 kPa)压力下经气管注入肺内，约5 min后切取左肺于10%甲醛中固定48 h，常规石蜡包埋、切片，进行HE、Elastin-Van Gieson染色。

**1.4.1 肺小动脉中膜厚度比** 光镜下观察Elastin-Van Gieson染色切片，用SimplePCI图像采集系统处理，分别测量计算内、外弹力板之间的距离(R)和血管外径(D)，每只大鼠测量30根肺部小动脉，直径位于

30~100 μm，由公式计算中膜厚度百分比： $2R/D \times 100\%$ 。

**1.4.2 新生内膜增殖度的计算** 将处理好的Elastin-Van Gieson染色切片放在400倍显微镜下观察，每只大鼠选择50根直径30~100 μm小动脉，内皮细胞外侧与内弹力层之间部分即为新生内膜。新生内膜增殖度 = 新生内膜血管数/50×100%。

**1.4.3 无肌性血管肌化程度比** 将处理好的标本经α-actin染色，在400倍显微镜下进行观察，每只大鼠观察20个视野，选择直径位于15~50 μm小动脉50根，计算中膜有部分和完整肌层的数量占整个观察血管数的百分比并求其平均值<sup>[2]</sup>。

**1.4.4 白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、单核细胞趋化因子-1(MCP-1)含量的测定** 将肺组织剪下100 mg，用缓冲液冲洗干净，加入裂解缓冲液于液氮下磨碎，离心后取上清液于-80℃深低温冰箱保存，用ELISA法测量肺组织匀浆IL-6、TNF-α、MCP-1的含量。

**1.5 统计学方法** 统计学分析采用SPSS13.0统计学软件，选用完全随机设计的方差分析，采用q检验分析各组之间的比较，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 大鼠一般情况** PH组和B组大鼠分流术后普遍表现为进食、活动减少，毛发粗糙，精神较差，PH组个别大鼠出现脱毛、呼吸急促表现。

**2.2 血流动力学改变** 经术后12周的饲养，PH组和B组大鼠右心室收缩压(qB:C=11.12；qB:pH=5.42)、肺动脉平均压力(qB:C=9.35；qB:pH=4.42)均较C组升高，且PH组比B组升高明显，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，大鼠处死后，C组比PH组和B组RV/(LV+S)增加更显著(qB:C=5.74)，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，见表1。

表1 三组大鼠MPAP、RV/(LV+S)、RVSP比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	MPAP(mmHg)	RV/(LV+S)	RVSP(mmHg)
C组	14.6±2.3	0.233±0.022	23.2±3.6
PH组	38.4±4.2 <sup>a</sup>	0.352±0.037 <sup>a</sup>	44.7±5.2 <sup>a</sup>
B组	30.6±5.7 <sup>ab</sup>	0.314±0.031 <sup>a</sup>	37.8±7.4 <sup>ab</sup>

注：与C组比较，<sup>a</sup>P<0.05；与PH组比较，<sup>b</sup>P<0.05；1 mmHg=0.133 kPa。

**2.3 肺血管病理改变** 显微镜下观察发现：PH组和B组大鼠相比C组肺小动脉中膜厚度比(qB:C=12.82，qB:pH=4.31)、新生内膜增殖度(qB:C=7.06，qB:pH=4.92)和血管肌化程度比(qB:C=8.37)均明显增加，且PH组比B组增加更明显，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，见表2。

**表2 三组大鼠中膜厚度比、新生内膜增殖度和血管肌化程度比( $\bar{x}\pm s$ ,%)**

组别	中膜厚度比	新生内膜增殖度	血管肌化
C 组	13.1±2.9	4.2±3.2	11.6±5.8
PH 组	28.2±3.6 <sup>a</sup>	26.6±7.4 <sup>a</sup>	41.3±11.6 <sup>a</sup>
B 组	24.4±4.8 <sup>ab</sup>	17.4±7.0 <sup>ab</sup>	34.2±8.9 <sup>a</sup>

注:与 C 组比较, <sup>a</sup>P < 0.05; 与 PH 组比较, <sup>b</sup>P < 0.05。

2.4 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 水平的比较 PH 组、B 组大鼠与 C 组比较,肺组织匀浆 IL-6 (qB:C=13.02; qB: pH=7.87)、TNF- $\alpha$  (qB: C=7.00 qB: pH=5.97)、MCP-1 (qB:C=18.92; qB:pH=13.14)含量增高,且 PH 组比 B 组增加更明显,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 3。

**表3 三组大鼠 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 水平比较(pg/ml,  $\bar{x}\pm s$ )**

组别	IL-6	TNF- $\alpha$	MCP-1
C 组	64±24	55±18	30±12
PH 组	1236±350 <sup>a</sup>	309±78 <sup>a</sup>	940±256 <sup>a</sup>
B 组	798±179 <sup>ab</sup>	192±56 <sup>ab</sup>	567±124 <sup>ab</sup>

注:与 C 组比较, <sup>a</sup>P < 0.05; 与 PH 组比较, <sup>b</sup>P < 0.05。

### 3 讨 论

肺动脉高压是常见疾病,其病理改变表现为肺小动脉重构、过度增殖,炎症反应是肺动脉高压形成和发展过程中的重要机制,包含巨噬细胞细胞、树突状细胞、T 细胞、B 细胞以及血液中某些炎症因子的含量增多,这些炎症反应也是导致肺动脉高压恶化的重要机制<sup>[2]</sup>。脂氧素是重要的促进炎症消退的物质,已经证明在多个脏器损伤中具有抑制炎症反应的作用<sup>[3-5]</sup>。它可抑制体内多个炎症相关信号传导通路的激活,比如它可以减轻失血性休克所导致的肺损伤,其机制可能是抑制髓过氧化物酶的活性和 ICAM-1 的表达,减少前炎性因子 NF- $\kappa$ B、IKBa 表达,它可以阻断 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 通路,从而抑制 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-8 的产生,而 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 通路是肺动脉高压形成过程中重要的激活通路<sup>[6-7]</sup>。由于脂氧素在人体内半衰期极短,因此试验中采用脂氧素受体激动剂 BML-111 腹腔注射,其与脂氧素作用机制相同,都是通过作用脂氧素受体而发挥作用,产生效果类似。

本实验中通过左颈总动脉-颈外静脉吻合加左侧股动脉-股静脉吻合建立肺动脉高压动脉模型,模型建立后 6 周,PH 组大鼠腹腔注射生理盐水,B 组大鼠腹腔

注射 BML-111。在十周将大鼠全部取出进行实验后发现,PH 组肺组织匀浆 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 含量高于 C 组,说明 PH 组肺组织炎症反应重于 C 组,但是加入脂氧素受体激动剂后的 B 组炎症反应相比 PH 组明显减轻。PH 组大鼠 MPAP、RVSP、肺小动脉中膜厚度百分比、小动脉肌化程度、新生内膜厚度百分比程度明显高于 C 组,说明 PH 组肺动脉压力、右心压力更高,肺血管病变程度更重,右室肥厚更加明显,B 组在加入脂氧素受体激动剂后明显减轻了这种改变,说明 BML-111 可能有治疗分流型肺动脉高压的作用,导致 PH 组与 B 组肺动脉压力与肺血管病理改变的差异。

综上所述,脂氧素受体激动剂 BML-111 作用于左向右分流型肺动脉高压大鼠后,可减轻大鼠肺动脉压力,延缓肺血管病变形成,其作用机制可能与减轻肺周围组织炎症反应有关。由此可见,通过激动脂氧素受体抑制肺周围组织炎症可能具有治疗肺动脉高压的作用。

### 参 考 文 献

- Humbert M, Montani D, Perros F, et al. Endothelial cell dysfunction and cross talk between endothelium and smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension [J]. Vascul Pharmacol, 2008, 49(4-6): 113-118.
- Price LC, Wort SJ, Perros F, et al. Inflammation in pulmonary arterial hypertension [J]. Chest, 2012, 141(1): 210-221.
- Wu Y, Ye XH, Guo PP, et al. Neuroprotective effect of lipoxin A4 methyl ester in a rat model of permanent focal cerebral ischemia [J]. J Mol Neurosci, 2010, 42(2): 226-234.
- Peskar BM, Ehrlich K, Schuligoi R, et al. Role of lipoxygenases and the lipoxin A(4)/annexin 1 receptor in ischemia-reperfusion-induced gastric mucosal damage in rats [J]. Pharmacology, 2009, 84(5): 294-299.
- Zhang L, Zhang X, Wu P, et al. BML-111, a lipoxin receptor agonist, modulates the immune response and reduces the severity of collagen-induced arthritis [J]. Inflamm Res, 2008, 57(4): 157-162.
- Wu SH, Liao PY, Dong L, et al. Signal pathway involved in inhibition by lipoxin A(4) of production of interleukins induced in endothelial cells by lipopolysaccharide [J]. Inflamm Res, 2008, 57(9): 430-437.
- Gong J, Guo S, Li HB, et al. BML-111, a lipoxin receptor agonist, protects haemorrhagic shock-induced acute lung injury in rats [J]. Resuscitation, 2012, 83(7): 907-912.

(收稿日期:2012-08-07)