

沙库巴曲缬沙坦治疗肺动脉高压大鼠的效果及其机制研究



扫描二维码
查看更多

李敏琦¹, 谭思远¹, 唐艺金¹, 唐毅^{1,2}, 郑昭芬^{1,2}

【摘要】 目的 分析沙库巴曲缬沙坦治疗肺动脉高压 (PAH) 大鼠的效果及其机制。方法 2020年6—11月, 适应性喂养1周后将27只6周龄雄性SD大鼠随机分为对照组、PAH组和沙库巴曲缬沙坦组, 各9只。PAH组、沙库巴曲缬沙坦组大鼠单次腹腔注射野百合碱 (MCT) 溶液 (60 mg/kg) 以构建PAH模型, 对照组大鼠单次腹腔注射等体积0.9%氯化钠溶液; 从第2天起, 对照组、PAH组大鼠给予0.5%羟乙基纤维素钠灌胃 (3 ml·kg⁻¹·d⁻¹), 沙库巴曲缬沙坦组大鼠给予沙库巴曲缬沙坦灌胃 (60 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 持续给药3周。PAH组中1只大鼠在实验第18天死亡。检测三组大鼠血流动力学指标 [右心室收缩压 (RVSP)]、右心室重构指标 [右心室肥厚指数 (RVH)]、肺血管重构指标 [肺动脉中膜厚度百分比 (PAMT%)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)] 及血浆环磷酸鸟苷 (cGMP)、心房利钠肽 (ANP)。结果 PAH组、沙库巴曲缬沙坦组大鼠RVSP、RVH高于对照组 ($P < 0.05$); 沙库巴曲缬沙坦组大鼠RVSP、RVH低于PAH组 ($P < 0.05$)。PAH组、沙库巴曲缬沙坦组大鼠PAMT%、 α -SMA高于对照组 ($P < 0.05$); 沙库巴曲缬沙坦组大鼠PAMT%、 α -SMA低于PAH组 ($P < 0.05$)。PAH组大鼠血浆cGMP低于对照组, 血浆ANP高于对照组 ($P < 0.05$); 沙库巴曲缬沙坦组大鼠血浆cGMP、ANP高于对照组、PAH组 ($P < 0.05$)。结论 沙库巴曲缬沙坦可以降低PAH大鼠RVSP, 减轻大鼠右心室重构和肺血管重构, 其机制可能与上调大鼠血浆cGMP水平有关。

【关键词】 肺动脉高压; 大鼠; 沙库巴曲缬沙坦; 治疗结果

【中图分类号】 R 541.5 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2023.00.022

Effect and Mechanism of Sacubitril/Valsartan in the Treatment of Rats with Pulmonary Arterial Hypertension LI Minqi¹, TAN Siyuan¹, TANG Yijin¹, TANG Yi^{1,2}, ZHENG Zhaofen^{1,2}

1. Department of Cardiovascular, the First Affiliated Hospital of Hunan Normal University/Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410000, China

2. Clinical Medicine Research Center of Heart Failure of Hunan Province, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410000, China

Corresponding author: ZHENG Zhaofen, E-mail: zhaofenz@foxmail.com

【Abstract】 **Objective** To analyze the effect and mechanism of sacubitril/valsartan in the treatment of rats with pulmonary arterial hypertension (PAH). **Methods** From June to November 2020, 27 6-week-old male SD rats were randomly divided into control group, PAH group and sacubitril/valsartan group after adaptive feeding for one week, with 9 rats in each group. Rats in PAH group and sacubitril/valsartan group were single intraperitoneally injected with monocrotaline (MCT) solution (60 mg/kg) to establish PAH model, and rats in control group were single intraperitoneally injected with equal volume of 0.9% sodium chloride solution. From the second day, the rats in control group and the PAH group were given 0.5% hydroxyethyl cellulose sodium gavage (3 ml·kg⁻¹·d⁻¹), and the rats in sacubitril/valsartan group were given sacubitril/valsartan gavage (60 mg·kg⁻¹·d⁻¹) for 3 weeks. One rat in PAH group died on the 18th day of the experiment. Hemodynamic index [right ventricular systolic pressure (RVSP)], right ventricular remodeling index [right ventricular hypertrophy (RVH)], pulmonary vascular remodeling indexes [percentage of pulmonary artery media thickness (PAMT%), α -smooth muscle actin (α -SMA)], plasma cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and atrial natriuretic peptide (ANP) in the three groups were detected. **Results** The RVSP and RVH of rats in PAH group and sacubitril/valsartan group were higher than those in control group ($P < 0.05$); the RVSP and

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (2021JJ40294); 湖南省重点领域研发计划项目 (2019SK2021); 湖南省科技创新计划项目 (2020SK50922)

1.410000湖南省长沙市, 湖南师范大学附属第一医院 湖南省人民医院心血管内科 2.410000湖南省长沙市, 湖南省人民医院湖南省心力衰竭临床医学研究中心

通信作者: 郑昭芬, E-mail: zhaofenz@foxmail.com

RVH of rats in sacubitril/valsartan group were lower than those in PAH group ($P < 0.05$). The PAMT% and α -SMA of rats in PAH group and sacubitril/valsartan group were higher than those in control group ($P < 0.05$); the PAMT% and α -SMA of rats in sacubitril/valsartan group were lower than those in PAH group ($P < 0.05$). The plasma cGMP of rats in PAH group was lower than that in control group and the plasma ANP was higher than that in control group ($P < 0.05$); while the plasma cGMP and ANP in sacubitril/valsartan group were higher than those in control group and PAH group ($P < 0.05$). **Conclusion** Sacubitril/valsartan can reduce RVSP, right ventricular remodeling and pulmonary vascular remodeling in PAH rats. Its mechanism may be related to the up regulation of plasma level of cGMP in rats.

【Key words】 Pulmonary arterial hypertension; Rats; Sacubitril/valsartan; Treatment outcome

肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 是一种以肺血管重塑和肺动脉压力升高为特征的致命性疾病, 可导致右心室肥厚、纤维化, 最终发展成右心衰竭甚至导致患者死亡^[1]。尽管经过了有效的管理与治疗, PAH患者仍存在症状反复发作、预后欠佳等情况。因此, 寻找新型的、能有效治疗PAH的药物具有重要意义。

研究表明, 内皮素1通路、前列环素通路和一氧化氮 (nitric oxide, NO) /可溶性鸟苷酸环化酶 (soluble guanylate cyclase, sGC) /环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 通路在PAH发生发展过程中具有重要意义^[2], 其中, 增加cGMP水平的治疗策略是目前已批准的治疗方案之一^[3-4]。沙库巴曲缬沙坦是一种由脑啡肽酶抑制剂和1型血管紧张素II受体阻滞剂组成的复合药物, 其能通过调控cGMP水平及抑制利钠肽的降解而发挥舒张血管、抗心肌肥厚及纤维化的作用^[5-6]。近年来, 国外有少量研究表明, 沙库巴曲缬沙坦可通过增加体内cGMP水平而舒张小动脉并改善血管重塑, 有作为PAH有效治疗方式的潜力^[4, 6], 但国内尚未见相关报道。本研究旨在探讨沙库巴曲缬沙坦治疗PAH大鼠的效果及其机制, 以期为临床PAH的药物治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验时间 本实验时间为2020年6—11月。

1.2 实验大鼠 27只6周龄雄性SD大鼠 (体质量160~180 g) 购自湖南斯莱克景达实验动物公司, 饲养在室内空气 (O_2 浓度为21%)、光照/黑暗12 h交替循环的环境中, 使用专用大鼠合成饲料喂养, 不限制饮水。本实验经湖南省人民医院医学伦理委员会批准 (批准文号: 2020-59)。

1.3 主要实验试剂 野百合碱 (monocrotaline, MCT) 购自美国Sigma-Aldrich公司, 抗 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体购自美国Abcam公司, cGMP ELISA试剂盒购自美国开曼公司, 心房利钠肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) ELISA试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 分组与干预方法 适应性喂养1周后将大鼠随机分为对照组、PAH组和沙库巴曲缬沙坦组, 各9只。将MCT溶解在1 mol/L的HCl溶液中, 并用1 mol/L的NaOH溶液调节pH值至7.4, 以制备MCT溶液; PAH组、沙库巴曲缬沙坦组大鼠单次腹腔注射MCT溶液 (60 mg/kg) 以构建PAH模型, 对照组大鼠单次腹腔注射等体积0.9%氯化钠溶液; 从第2天起, 对照组、PAH组给予0.5%羟乙基纤维素钠灌胃 (3 ml \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹), 沙库巴曲缬沙坦组给予沙库巴曲缬沙坦灌胃 (将100 mg沙库巴曲缬沙坦溶于5 ml 0.5%羟乙基纤维素钠中) (60 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹), 持续给药3周。PAH组中1只大鼠在实验第18天死亡。

1.4.2 血流动力学、右心室重构指标检测 实验结束后腹腔注射2%戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 以麻醉大鼠, 分离颈部血管, 将聚乙烯-50导管经右颈外静脉送入右心室, 使用生物信号采集和分析系统 (成都泰盟软件有限公司) 测量并记录大鼠右心室收缩压 (right ventricular systolic pressure, RVSP), 共测量3次, 取平均值。检测完RVSP后, 对所有大鼠进行安乐死, 打开大鼠胸腔, 立即解剖心脏和肺, 将右心室从左心室和室间隔中分离出来, 并分别称重, 计算右心室肥厚指数 (right ventricular hypertrophy, RVH), $RVH = \text{右心室重量} / (\text{左心室重量} + \text{室间隔重量})$ 。

1.4.3 肺血管重构指标检测 使用4 ℃的杜氏磷酸盐缓冲液灌洗大鼠肺后取出肺组织, 并用4%多聚甲醛溶液固定, 乙醇溶液脱水、石蜡包埋并切片后进行HE染色; 收集肺小动脉 (直径为30~100 μ m) 的图像并测量其外径和肺动脉中膜厚度 (pulmonary artery media thickness, PAMT), 计算肺动脉中膜厚度百分比 (percentage of pulmonary artery media thickness, PAMT%), $PAMT\% = 2 \times PAMT / \text{外径} \times 100\%$ 。大鼠肺组织经固定切片后进行抗 α -SMA免疫组化染色, 使用Image-Pro Plus 6.0版软件 (美国Media Cybernetics公司) 计算 α -SMA积分光密度值, 即 α -SMA水平。

1.4.4 血浆cGMP、ANP检测 检测完RVSP后, 从大鼠的腹主动脉收集全血样本, 1 000 r/min离心10 min (离心半径8.6 cm), 取血浆保存在-80 ℃冰箱中备用。参

照ELISA试剂盒说明书检测各组大鼠血浆cGMP、ANP。

1.5 统计学方法 使用SPSS 22.0软件进行统计分析。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血流动力学、右心室重构指标 三组大鼠RVSP、RVH比较,差异有统计学意义($P < 0.05$); PAH组、沙库巴曲缬沙坦组大鼠RVSP、RVH高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$); 沙库巴曲缬沙坦组大鼠RVSP、RVH低于PAH组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 三组大鼠血流动力学、右心室重构指标比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of hemodynamic and right ventricular remodeling indexes in the three groups

组别	只数	RVSP (mm Hg)	RVH
对照组	9	28.6 ± 6.6	0.23 ± 0.02
PAH组	8	56.6 ± 10.4 ^a	0.44 ± 0.09 ^a
沙库巴曲缬沙坦组	9	40.6 ± 8.4 ^{ab}	0.34 ± 0.05 ^{ab}
F值		22.967	28.470
P值		<0.001	<0.001

注: PAH=肺动脉高压, RVSP=右心室收缩压, RVH=右心室肥厚指数; 1 mm Hg=0.133 kPa; ^a表示与对照组比较, $P < 0.05$; ^b表示与PAH组比较, $P < 0.05$

2.2 肺血管重构指标 三组大鼠PAMT%、 α -SMA比较,差异有统计学意义($P < 0.05$); PAH组、沙库巴曲缬沙坦组大鼠PAMT%、 α -SMA高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$); 沙库巴曲缬沙坦组大鼠PAMT%、 α -SMA低于PAH组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2、图1~2。

2.3 血浆cGMP、ANP 三组大鼠血浆cGMP、ANP比

较,差异有统计学意义($P < 0.05$); PAH组大鼠血浆cGMP低于对照组,血浆ANP高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$); 沙库巴曲缬沙坦组大鼠血浆cGMP、ANP高于对照组、PAH组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

表2 三组大鼠肺血管重构指标比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of pulmonary vascular remodeling indexes in the three groups

组别	只数	PAMT% (%)	α -SMA (AU)
对照组	9	18.6 ± 2.0	1.19 ± 0.12
PAH组	8	43.7 ± 1.9 ^a	1.62 ± 0.18 ^a
沙库巴曲缬沙坦组	9	29.0 ± 2.1 ^{ab}	1.40 ± 0.07 ^{ab}
F值		340.096	24.472
P值		<0.001	<0.001

注: PAMT%=肺动脉中膜厚度百分比, α -SMA= α -平滑肌肌动蛋白; ^a表示与对照组比较, $P < 0.05$; ^b表示与PAH组比较, $P < 0.05$

表3 三组大鼠血浆cGMP、ANP比较($\bar{x} \pm s$)

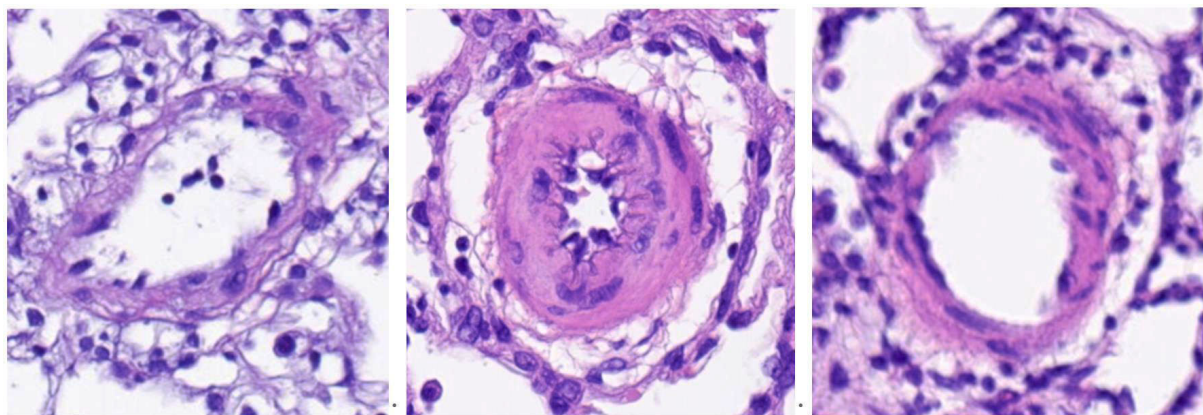
Table 3 Comparison of plasma cGMP and ANP in the three groups

组别	只数	cGMP (pmol/ml)	ANP (pg/ml)
对照组	9	0.20 ± 0.04	214.4 ± 79.7
PAH组	8	0.14 ± 0.21 ^a	313.8 ± 110.6 ^a
沙库巴曲缬沙坦组	9	0.35 ± 0.09 ^{ab}	521.3 ± 111.3 ^{ab}
F值		28.191	21.501
P值		<0.001	<0.001

注: cGMP=环磷酸鸟苷, ANP=心房利钠肽; ^a表示与对照组比较, $P < 0.05$; ^b表示与PAH组比较, $P < 0.05$

3 讨论

PAH是严重影响人类健康的疾病,其突出特点是肺血管重塑导致肺血管阻力和肺动脉压升高。在PAH发展过程中,肺循环后负荷持续升高可导致右心室肥大、右心室纤维化和右心室功能障碍,最终导致右心



对照组

PAH组

沙库巴曲缬沙坦组

注: PAH=肺动脉高压

图1 三组大鼠肺组织HE染色结果($\times 20$)

Figure 1 HE staining results of lung tissue of rats in three groups

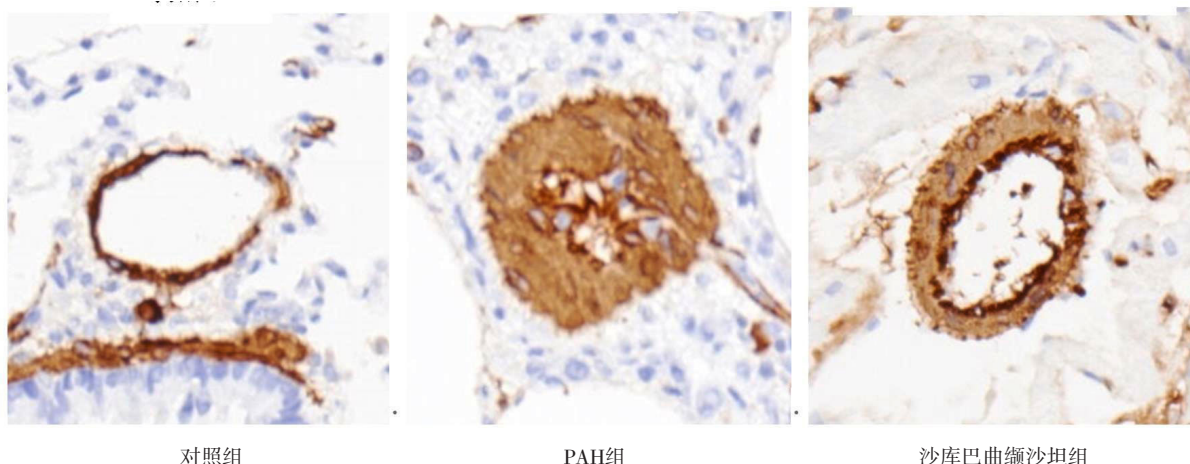


图2 三组大鼠肺组织 α -SMA免疫组化染色结果($\times 20$)

Figure 2 Immunohistochemical staining results of α -SMA in lung tissue of rats in three groups

衰竭。沙库巴曲缬沙坦是脑啡肽酶抑制剂和血管紧张素 II 受体阻滞剂组成的复合药物,可发挥舒张血管、抗心室重构的作用。本研究旨在进一步探讨沙库巴曲缬沙坦对PAH大鼠右心室肥厚、肺血管重构的影响及其潜在机制。

本研究结果显示,PAH组、沙库巴曲缬沙坦组大鼠RVSP高于对照组,提示造模成功;沙库巴曲缬沙坦组大鼠RVSP低于PAH组,提示沙库巴曲缬沙坦可减小PAH大鼠右心室压力。本研究结果还显示,PAH组、沙库巴曲缬沙坦组大鼠RVH高于对照组,沙库巴曲缬沙坦组大鼠RVH低于PAH组,表明沙库巴曲缬沙坦可以减轻PAH大鼠右心室重构。此外,本研究结果还显示,PAH组、沙库巴曲缬沙坦组大鼠PAMT%、 α -SMA高于对照组,沙库巴曲缬沙坦组大鼠PAMT%、 α -SMA低于PAH组,提示沙库巴曲缬沙坦可以减轻PAH大鼠肺血管重构。ANDERSEN等^[6]通过Mikro-Tip导管测量SU5416和缺氧(SU5416 and hypoxia, SuHx)诱导的PAH大鼠的RVSP,并采用体视学方法评估肺血管和右心室组织形态学改变情况,结果显示,沙库巴曲缬沙坦能够降低大鼠RVSP,减轻大鼠肺血管重构及右心室肥厚、扩张,本研究结果与之相似。

舒张血管以降低血管阻力是PAH的重要治疗策略,而cGMP、ANP在血管舒张过程中发挥着重要作用。组织中的NO可激活sGC,而激活后的sGC可促进其底物三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)转化为cGMP并激活蛋白激酶G(protein kinases G, PKG),进而导致平滑肌松弛^[7-8]。有研究提示,ANP延缓PAH进展的潜在机制可能是其与自身受体结合后,可使cGMP水平升高,进而促进血管舒张^[9]。CLEMENTS等^[10]研究显示,沙库巴曲缬沙坦能降低SuHx诱导的PAH大鼠的右心室舒张末期压和肺动脉收缩压,减轻右心室肥厚及

纤维化,减轻肺血管重构,增加肺组织中ANP、脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)、cGMP水平。本研究结果显示,PAH组大鼠血浆cGMP水平低于对照组,沙库巴曲缬沙坦组大鼠血浆cGMP水平高于对照组、PAH组,提示沙库巴曲缬沙坦可能通过升高血浆cGMP水平来降低PAH大鼠RVSP、减轻其右心室重构及肺血管重构。本研究结果还显示,PAH组大鼠血浆ANP水平高于对照组,这可能与PAH发病时右心负荷增加导致心肌细胞释放ANP有关;沙库巴曲缬沙坦组大鼠血浆ANP水平高于对照组、PAH组,分析原因为沙库巴曲缬沙坦可抑制脑啡肽酶,从而减少ANP的降解。

综上所述,沙库巴曲缬沙坦可以降低PAH大鼠RVSP,减轻大鼠右心室重构和肺血管重构,其机制可能与上调大鼠血浆cGMP水平有关,这为PAH的临床治疗提供了新思路。但本研究是通过MCT构建PAH大鼠模型的,结果不宜直接套用到其他PAH模型(如SuHx诱导的PAH模型)上,需要在不同方法构建的PAH模型中进一步验证沙库巴曲缬沙坦治疗PAH的效果。

作者贡献:李敏琦进行文章的构思与设计,撰写论文;李敏琦、唐毅进行研究的可行性分析、论文修订;李敏琦、谭思远、唐艺金进行实验实施及统计学处理;郑昭芬负责文章的质量控制及审校,对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] RUBIN L J. Primary pulmonary hypertension [J]. *N Engl J Med*, 1997, 336(2): 111-117. DOI: 10.1056/NEJM199701093360207.
- [2] ZOLTY R. Pulmonary arterial hypertension specific therapy: the old and the new [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 214: 107576. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107576.

(下转第88页)