

低氧性肺动脉高压大鼠血清和肺组织 凝血酶敏感蛋白-1 的变化*

杨艳娟¹, 郑西卫¹, 杨桂兰¹, 程德云², 张 鹏¹

1. 宁夏医科大学附属医院 呼吸内科(银川 750004); 2. 四川大学华西医院 呼吸内科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨凝血酶敏感蛋白-1(TSP-1)在低氧性肺动脉高压发病机制中的可能作用。**方法** 将 20 只雄性 Wistar 大鼠分为低氧性肺动脉高压组($n=10$)和对照组($n=10$)两组,肺动脉高压组以常压低氧建立大鼠平均肺动脉高压模型,以微导管法测定两组大鼠平均肺动脉压力(mPAP),采用图像分析测量肺小动脉管壁厚度,计算管壁厚度占血管外径的百分比(WT%) and 管壁面积占血管总面积的百分比(WA%),酶联免疫吸附法检测大鼠血清 TSP-1 的浓度和荧光定量 PCR 法观察大鼠肺组织 TSP-1 mRNA 的表达。**结果** 低氧 3 周后,低氧组大鼠 mPAP 为(2.86 ± 0.39)kPa,右心室肥厚指数[右心室/(左心室+室间隔)]为(43.53 ± 3.38)%、WT% 为(35.24 ± 11.20)%,WA% 为(55.09 ± 12.38)%,分别与正常对照组[(1.35 ± 0.28)kPa、(23.68 ± 3.48)%、(23.63 ± 9.74)%和(41.62 ± 12.83)%]相比升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);血清 TSP-1 浓度高于对照组[(758.6 ± 46.4)ng/mL vs. (382.7 ± 32.8)ng/mL, $P < 0.05$],大鼠肺组织 TSP-1 mRNA 的含量亦较对照组增加[(6.53 ± 2.43) vs. (3.07 ± 1.87), $P < 0.01$]。相关分析表明,TSP-1 mRNA 与 WT%、WA%、mPAP 呈正相关($r=0.748, 0.686, 0.942, P < 0.05$)。**结论** 低氧后大鼠肺组织 TSP-1 的合成和释放增多,TSP-1 增加可能与低氧性肺动脉高压的发生有关。

【关键词】 低氧 肺动脉高压 凝血酶敏感蛋白-1

The Expression of Thrombospondin-1 in Serum and Pulmonary Arterioles of Hypoxic Pulmonary Hypertension Rats

YANG Yan-juan¹, ZHENG Xi-wei¹, YANG Gui-lan¹, CHENG De-yun², ZHANG Peng¹ 1. Department of Respiratory Disease, Affiliated Hospital of Ningxia Medical College, Yinchuan 750004, China; 2. Department of Respiration Diseases, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression of thrombospondin-1 (TSP-1) in serum and pulmonary arterioles of rats with hypoxic pulmonary hypertension. **Methods** Twenty male Wistar rats were divided into two groups and exposed to air and isobaric hypoxia for 3 weeks respectively. The mean pulmonary artery pressure (mPAP) was measured by right cardiac catheterization. The rates of wall thickness/external diameter (WT%) and wall area/total vascular area (WA%) were calculated. The TSP-1 level in serum was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. TSP-1 mRNA expression in lung tissue was evaluated by quantitative PCR. **Results** The pulmonary artery pressure increased in the hypoxia exposed rats. The chronic hypoxia also elicited the thickening of the wall and the narrowing of the lumen of pulmonary arterioles. It led to the increases of pulmonary artery pressure, the index of right ventricular hypertrophy [RV/(LV+S)], WA% and WT% compared to the controls [mPAP: (2.86 ± 0.39) kPa vs. (1.35 ± 0.28) kPa; RV/(LV+S): (43.53 ± 3.38)% vs. (23.68 ± 3.48)%; WT%: (35.24 ± 11.20)% vs. (23.63 ± 9.74)%; WA%: (55.09 ± 12.38)% vs. (41.62 ± 12.83)% respectively, $P < 0.05$]. In hypoxic group, the expression of TSP-1 mRNA in the lung was significantly up-regulated, the expression level of TSP-1 in serum was higher than that in control group ($P < 0.01$). Linear correlation analysis showed that TSP-1 mRNA was positively associated with WT%, WA% and mPAP ($r=0.748, 0.686, 0.942$ respectively, $P < 0.05$). **Conclusion** The TSP-1 may play an important role in the pathogenesis process of hypoxic pulmonary vascular remodeling and pulmonary hypertension.

【Key words】 Hypoxia Pulmonary hypertension Thrombospondin-1

低氧性肺动脉高压(HPH)是慢性阻塞性肺疾

病(COPD)及其他肺部疾病发展为慢性肺源性心脏病的重要病理生理过程^[1,2]。低氧性肺血管重建是低氧性肺动脉高压发生发展的一个最重要环节,一

* 国家自然科学基金(No. 30960142)资助

旦发生肺血管重建,肺动脉高压即可进行性发展,预后很差^[3]。目前研究发现多种炎症介质和细胞因子参与了低氧性肺动脉高压血管重建的过程^[4,5]。凝血酶敏感蛋白-1(thrombospondin-1, TSP-1)是一种相对分子质量为 450×10^3 的糖蛋白,具有调节血小板聚集、细胞黏附、运动及生长的功能,很多研究已明确证实其参与多种脏器纤维化的过程^[6],但其在肺动脉高压发生发展中的具体作用尚不清楚。在本研究中,我们以低氧复制大鼠肺动脉高压模型,观察低氧 3 周对大鼠血清 TSP-1 浓度变化和肺组织 TSP-1 mRNA 表达的影响,以进一步探讨其与肺动脉高压血管重建的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组和处理

雄性 Wistar 大鼠 20 只(购于四川大学实验动物中心),体质量 200~220 g。随机分为低氧肺动脉高压组和正常对照组,每组 10 只。低氧肺动脉高压组大鼠置于自制常压低氧舱内,向舱内充入氮气,调控舱内氧浓度使其维持在 $(10 \pm 0.5)\%$ 。舱内二氧化碳和水蒸气分别用钠石灰和氯化钙吸收,进行间断性低氧,每天 8 h,共 3 周。对照组置于同一实验室中,未予低氧处理。两组大鼠均自由饮水和摄食。

1.2 肺血流动力学测定和右心室肥厚指数的检测

用插入导管法测定平均肺动脉压(mPAP)。低氧结束后,给大鼠腹腔注射 10%水合氯醛(300 mg/kg)麻醉,仰卧固定,暴露右侧颈外静脉并作“V”形切口,以肝素(50 U/mL)抗凝,插入硅胶管(0.45 mm 管内径,0.8 mm 管外径),经右心房、右心室送至肺动脉,导管另一端连接 P23×L 压力传感器,经载波放大器处理,用 Gould-3400s/DASA4600 型生理记录仪记录。然后剖胸取出大鼠心脏置于 10%中性甲醛中固定 1 周,剪去心房组织,沿室间隔边缘分离出右心室(RV)和左心室加室间隔(LV+S),用滤纸吸干水分后称量 RV 和 LV+S,以 RV/LV+S 比值反映右心室肥厚情况。

1.3 大鼠血清中 TSP-1 浓度的测定

在肺动脉压力检测后,从下腔静脉采血 3 mL,然后以 4 000 r/min 离心 10 min,分离出血清,置于 EP 管中,−70 ℃ 保存待检测。用酶联免疫法测定(TSP-1 酶联免疫检测试剂盒购于美国 R&D Systems)大鼠血清中 TSP-1 浓度,实验具体步骤按照试剂盒说明书进行,酶标仪 450 nm 波长测样品光密度(OD)值后于标准曲线查出样品浓度。

1.4 大鼠肺血管组织学检查

取大鼠左肺以 10%中性甲醛固定 3 d,取左肺沿肺门横断取材,石蜡包埋切片,进行常规 HE 染色,观察肺小动脉形态学变化。用 SPOT COOL CCD 软件采集图像,MAGEPRO plus4.1 软件分析图像,测量 HE 染色切片中与呼吸性细支气管及肺泡伴行的肺小动脉外径、管壁厚度、血管总面积及管壁面积,计算出管壁厚度占外径的百分比(WT%)和管壁面积占管壁总面积的百分比(WA%),反映肺小动脉管壁增厚程度。

1.5 大鼠肺组织 TSP-1 mRNA 的检测

大鼠肺组织 TSP-1 mRNA 的检测采用荧光定量 PCR 法。取液氮保存的大鼠右肺中叶 150 mg,按照说明书提取总 RNA。采用加拿大枫岭公司 FTC2000 实时荧光定量 PCR 仪检测大鼠肺组织 TSP-1 mRNA 水平。两步法检测。将逆转录得到的 cDNA 样品中各取 5 μ L,配制反应体系,行 PCR 扩增。PCR 扩增条件:94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,循环 40 次;72 ℃ 5 min。以 β -actin 作为内参对照。引物由上海生物能公司合成。 β -actin-F:5'-GAAGATCAAGATCATTGCTCCT-3', β -actin-R:5'-TACTCCTGCTTGCTGATCA-3', TaqMan 探针 5'-CTGTCCACCTTCCAGCAGA-3'。TSP-1-F:5'-CCACTGCAAAAAGGACAACTG-3', TSP-1-R:5'-ATGGACAGTTGTCCC TGTCAT-3', TaqMan 探针 5'-CCATCCTTGTCATAGTCTTCCTGC-3'。根据动力学曲线确定每个样品中荧光强度增加到某一特定阈值(threshold)时的扩增循环数(Ct 值),再根据 Ct 值并与标准模板初始拷贝的对数值作图,得到该样品的标准曲线。收集数据,绘制动力学曲线,测定各样品的 Ct 值与标准曲线进行比较,得出待测样品的相对拷贝数,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析两组 TSP-1 mRNA 的相对含量^[7]。

1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间差异比较采用两样本均数比较的 t 检验,不同指标相关关系采用直线相关分析, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 两组大鼠 mPAP 和右室肥厚指数的改变

结果见表 1。低氧肺动脉高压组大鼠 mPAP 高于正常对照组($P<0.01$),RV 和 RV/LV+S 亦高

表 1 两组大鼠 mPAP、RV、LV+S 及 RV/(LV+S)的变化($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Change of mPAP, RV, LV+S and RV/(LV+S) in rats of two groups ($\bar{x}\pm s$)

Group	<i>n</i>	mPAP (kPa)	RV (mg)	LV+S (mg)	RV/(LV+S)(%)
Normal control	10	1.35±0.28	148.72±18.12	575.38±24.41	23.68±3.48
Hypoxia	10	2.86±0.39*	233.60±17.24*	588.32±26.42	43.53±3.38*

mPAP: Mean pulmonary arterial pressure; RV: Right ventricle; LV +S: Left ventricle+septum. * $P<0.01$, compared with normal control group

于正常对照组大鼠($P<0.01$),两组大鼠 LV+S 间差异无统计学意义($P>0.05$)。说明低氧肺动脉高压模型建立成功。

2.2 两组大鼠肺血管组织学变化

肺组织切片 HE 染色显示,正常对照组大鼠肺小动脉管壁较薄,管腔较大(图 1)。低氧肺动脉高压组大鼠肺小动脉管壁明显增厚,管腔狭窄,出现了肺血管重建现象(图 2)。两组大鼠肺小动脉血管外径比较及血管总面积比较差异无统计学意义($P>0.05$);低氧肺动脉高压组大鼠肺小动脉管壁厚度、管壁面积、WA%及 WT%均高于正常对照组($P<0.01$)。见表 2。

2.3 两组大鼠血清 TSP-1 浓度和肺组织 TSP-1 mRAN 的变化

荧光定量 PCR 目的基因的标准曲线和扩增曲线见图 3、图 4。与正常对照组比较,低氧性肺动脉高压组大鼠血清 TSP-1 浓度升高,肺组织 TSP-1 mRNA 升高,差异均有统计学意义($P<0.01$)。见表 3。

2.4 相关分析结果

低氧性肺动脉高压组大鼠肺组织 TSP-1 mRNA 与 WT%、WA%和 mPAP 均呈正相关($r=0.748,0.686,0.942,P$ 均 <0.05)。

图 1 对照组大鼠肺小动脉,管壁较薄,管腔较大。HE ×200

图 2 低氧性肺动脉高压组大鼠肺小动脉,管壁较厚、管腔狭窄。HE ×200

Fig 1 The pulmonary arterioles of normal rats with thinner tube and widen lumen. HE ×200

Fig 2 The pulmonary arterioles of hypoxia rats with thickness tube and narrow lumen. HE ×200

表 2 两组大鼠肺小动脉管壁厚度、外径、WT%、管壁面积、血管总面积及 WA%的变化($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Change of external diameter, wall thickness, WT%,total vascular area,wall area and WA% of pulmonary arterioles in rats ($\bar{x}\pm s$)

Group	<i>n</i>	Wall thickness (μm)	External diameter (μm)	WT%	Total vascular area (μm^2)	Wall area (μm^2)	WA%
Normal control	10	13.68±5.88	56.49±10.42	23.63±9.74	2532.48±884.64	1126.44±576.34	41.62±12.83
Hypoxia	10	19.54±5.63*	56.24±11.23	35.24±11.23*	2746.83±632.41	1518.48±468.29*	55.09±12.38*

WT%: Wall thickness/external diameter×100%; WA%: Wall area/total vascular area×100%. * $P<0.01$, compared with normal control group

表 3 两组大鼠血清 TSP-1 浓度和肺组织 TSP-1 mRNA 变化($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Change of TSP-1 concentration in serum and TSP-1 mRNA in lung tissues of two groups ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	TSP-1 (ng/mL)	TSP-1 mRNA
Normal control	10	382.7 $\pm$ 32.8	3.07 $\pm$ 1.87
Hypoxia	10	758.6 $\pm$ 46.4*	6.53 $\pm$ 2.43*

* $P<0.01$, compared with normal control group

3 讨论

肺动脉高压(PAH)是一种进行性疾病,最终导致右心室功能障碍、衰竭,严重的右心功能不全可致患者死亡。肺血管重建是引起肺动脉高压的重要因素之一,而低氧引起的肺血管重建在临床上则更为常见。本研究以常压低氧复制大鼠肺动脉高压模型发现,低氧 3 周后大鼠 mPAP 和 RV/LV+S 比值明显较正常对照组升高,提示大鼠已形成肺动脉高压和右心室肥厚。同时在低氧大鼠肺组织常规 HE 染色切片中,存在肺小动脉管壁明显增厚和管腔狭窄,经图像分析,显示 WT%和 WA%均较正常对照组明显升高,说明在低氧性肺动脉高压形成过程中出现了显著的肺血管重建,从而证明已成功建立了常压低氧性肺动脉高压模型。

TSP-1 又称血小板反应素-1,属黏附糖蛋白家族,相对分子质量为 450×10^3 ,是由 3 条相对分子质量 145×10^3 的相同多肽链以二硫键构成的同源三聚体,有 5 种同型异构体^[8]。TSP-1 在正常成人组织中分布少,炎症和损伤过程中大量表达^[9],生物学效应主要是抑制血管生成、抗肿瘤活性及激活潜在的 TGF- β 等等^[10]。TSP-1 可由多种炎症细胞如单核/巨噬细胞、中性粒细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、成纤维细胞等表达,以旁分泌和自分泌的形式分泌^[11]。TSP-1 与肝素硫酸盐、蛋白聚糖、组织蛋白酶、纤维蛋白原、纤维连接蛋白均可产生相互作用。对于 TSP-1 在肺部疾病的表达目前研究文献各异。有文献表明 TSP-1 可通过激活上皮生长因子受体(EGFR/ErB2)打开肺微血管内皮旁路通道^[12]。Ezzie 等^[13]以博来霉素复制小鼠肺间质纤维化模型,用免疫组化和 RT-PCR 法检测 TSP-1 表达,发现 TSP-1 缺失小鼠纤维化程度更明显,表现为结缔组织生长因子(CTGF)和 I 型胶原表达增殖,似乎提示 TSP-1 基因缺失可增加肺组织胶原和 CTGF 的表达。而 Sage 等^[14]以结扎左肺动脉造成缺血,然后松开造成再灌注损伤复制缺血再灌注模型,检测到前凋亡因子 TSP-1 mRNA 和纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)mRNA 在此过程中过量表达,该实验揭示:在缺血再灌注损伤发生后,阻止内

皮死亡或许会成为将来治疗肺动脉高压的靶向性手段之一,而前凋亡因子 TSP-1 在其中的作用还需进一步研究。本研究发现,低氧性肺动脉高压组大鼠血液中 TSP-1 浓度较正常对照组大鼠明显升高,肺组织 TSP-1 mRNA 亦较正常对照组升高,提示: TSP-1 参与了肺动脉高压发生发展过程。我们推测 TSP-1 参与炎症细胞的表达和参与平滑肌细胞的增殖可能是 TSP-1 参与肺动脉高压肺血管重建的原因所在。因有文献表明 TSP-1 的表达有助于 T 细胞的黏附和渗出,促进中性粒细胞的炎症趋化并且在调节单核细胞/巨噬细胞的炎症反应中起着很重要的作用^[15]。而另有文献表明 TSP-1 在血管平滑肌细胞(VSMC)的增殖和活化中也起着重要作用, TSP-1 与受体结合通过细胞外信号调节蛋白激酶(ErK)和核糖体 S6 激酶(RSK),经血小板源性生长因子(PDGF)诱导促进 VSMC 的增殖^[16]。本研究显示 TSP-1 mRNA 与 WT%、WA%及 mPAP 均呈正相关,提示 TSP-1 参与了低氧性肺动脉高压肺血管重建,这与既往文献一致^[17]。

但关于 TSP-1 如何在低氧性肺动脉高压中发挥确切的生物学功能,以何种通路来实现肺血管重建目前还不十分清楚,下一步我们会通过培养离体肺动脉平滑肌细胞,给予低氧处理后观察 TSP-1 在低氧条件下对肺动脉平滑肌细胞的增殖及迁移能力改变,以进一步明确 TSP-1 在低氧性肺动脉高压肺血管重建方面的作用。

参 考 文 献

- 1 Zakyntinos E, Daniil Z, Papanikolaou J, *et al.* Pulmonary hypertension in COPD: pathophysiology and therapeutic targets. *Curr Drug Targets*,2011;12(4):501-513.
- 2 Chhabra SK. Pulmonary hypertension associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Indian J Chest Dis Allied Sci*, 2010;52(1):29-40.
- 3 Shimoda LA, Semenza GL. HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease. *Am J Respir Crit Care Med*,2011;183(2):152-156.
- 4 Mizuno S, Bogaard HJ, Kraskauskas D, *et al.* p53 Gene deficiency promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*,2011;300(5):L753-L761.
- 5 Demarco VG, Whaley-Connell AT, Sowers JR, *et al.* Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *World J Cardiol*,2010;2(10):316-324.
- 6 Zaslavsky A, Baek KH, Lynch RC, *et al.* Platelet-derived thrombospondin-1 is a critical negative regulator and potential biomarker of angiogenesis. *Blood*,2011;115(22):4605-4613.
- 7 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)). *Method*,2001;25(4):402-408. (下转第 887 页)