

## • 基础论著 •

## apelin 对实验性大鼠肺动脉高压的影响

沈妍 韩流 鲍红光

**【摘要】 目的** 观察 apelin 对野百合碱 (Monocrotaline, MCT) 诱导的大鼠肺动脉高压的影响。**方法** 45 只雄性 SD 大鼠随机分成正常对照组 ( $n=15$ ), MCT 组 ( $n=15$ ), apelin 组 ( $n=15$ )。MCT 组和 apelin 组一次性腹腔注射 MCT 建立肺动脉高压模型, 正常对照组一次性腹腔注射等量生理盐水, apelin 组大鼠每天腹腔注射 [Pyr1] apelin-13 (0.2 mg/kg), MCT 组和正常对照组注射等量生理盐水。4 周后, 采用右心导管法检测大鼠平均肺动脉压 (mPAP); 处死大鼠后取心脏称量右心室 (RV) 与左心室 (LV) 加室间隔 (S) 质量的比值 [RV/(LV+S)], 取肺组织匀浆后采用 ELISA 法测定白细胞介素 6 (IL-6), 肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平。**结果** 4 周后, MCT 组与正常对照组相比 mPAP, RV/(LV+S) 均显著增高 [ (28.8  $\pm$  3.56) mm Hg vs. (18.3  $\pm$  2.87) mm Hg, (39.05  $\pm$  2.35)  $\times 10^{-2}$  vs. (25.19  $\pm$  2.12)  $\times 10^{-2}$ ,  $P < 0.01$  ], 并且肺组织 IL-6、TNF- $\alpha$  含量也升高 [ (729.8  $\pm$  31.03) pg/ml vs. (55.02  $\pm$  3.39) pg/ml, (1202.28  $\pm$  90.15) pg/ml vs. (40.12  $\pm$  10.58) pg/ml,  $P < 0.01$  ]。apelin 组的相关指标与 MCT 组相比明显降低 [ mPAP (21.7  $\pm$  4.59) mm Hg vs. (28.8  $\pm$  3.56) mm Hg, RV/(LV+S) (28.79  $\pm$  3.12)  $\times 10^{-2}$  vs. (39.05  $\pm$  2.35)  $\times 10^{-2}$ , IL-6 (168.7  $\pm$  24.52) pg/ml vs. (729.8  $\pm$  31.03) pg/ml, TNF- $\alpha$  (371.02  $\pm$  43.12) pg/ml vs. (1202.28  $\pm$  90.15) pg/ml,  $P < 0.01$  ]。大鼠 mPAP 与肺组织匀浆中 IL-6、TNF- $\alpha$  水平均呈正相关。**结论** apelin 可以减轻 MCT 诱发的肺动脉高压, 该作用可能与抑制某些前炎症因子有关。

**【关键词】** 高血压, 肺性; apelin; 炎症反应

**Effect of apelin on inflammation of pulmonary hypertensive rats** SHEN Yan, HAN Liu, BAO Hong-guang.  
Department of Anesthesiology, Affiliated Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China  
Corresponding author: BAO Hong-guang, Email: hong\_guangbao@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To study the effects of apelin on pulmonary hypertension rats. **Methods** Forty-five Sprague-Dawley male rats were randomized into three groups: normal control group ( $n=15$ ), MCT group ( $n=15$ ) and apelin group ( $n=15$ ). MCT group and apelin group were injected with MCT to establish pulmonary arterial hypertension models, normal control group was injected with normal saline. Rats of apelin group were injected with [Pyr1] apelin-13 (0.2 mg/kg) every day by intraperitoneal injection, and those of MCT group and normal control group were injected normal saline four weeks later, mean pulmonary arterial pressure (mPAP) of rats was measured by using a right cardiac catheterization procedure. Dry weight of right ventricle (RV), left ventricle + septum (LV+S) were measured and RV/(LV+S) ratio was calculated. IL-6 and TNF- $\alpha$  in pulmonary tissue were detected by ELISA. **Results** The results showed that there was a significant increase of mPAP, RV/(LV+S) and the contents of IL-6, TNF- $\alpha$  in pulmonary tissue in MCT group compared with that of normal control group [ mPAP (28.8  $\pm$  3.56) mm Hg vs. (18.3  $\pm$  2.87) mm Hg, RV/(LV+S) (39.05  $\pm$  2.35)  $\times 10^{-2}$  vs. (25.19  $\pm$  2.12)  $\times 10^{-2}$ , IL-6 (729.8  $\pm$  31.03) pg/ml vs. (55.02  $\pm$  3.39) pg/ml, TNF- $\alpha$  (1202.28  $\pm$  90.15) pg/ml vs. (40.12  $\pm$  10.58) pg/ml,  $P < 0.01$  ], while the related data of apelin group were lower than that of MCT group [ mPAP (21.7  $\pm$  4.59) mm Hg vs. (28.8  $\pm$  3.56) mm Hg, RV/(LV+S) (28.79  $\pm$  3.12)  $\times 10^{-2}$  vs. (39.05  $\pm$  2.35)  $\times 10^{-2}$ , IL-6 (168.7  $\pm$  24.52) pg/ml vs. (729.8  $\pm$  31.03) pg/ml, TNF- $\alpha$  (371.02  $\pm$  43.12) pg/ml vs. (1202.28  $\pm$  90.15) pg/ml,  $P < 0.01$  ]. **Conclusions** Apelin can attenuate MCT induced pulmonary artery hypertension, which might be associated with inhibition of lung tissue inflammation.

**【Key words】** Hypertension, pulmonary; Apelin; Inflammation

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension)是以肺动脉收缩,肺血管增生重构为特征的一类病理生理综合征,表现为肺循环阻力进行性增加,进而右心衰竭,以至死亡,预后较差。肺动脉高压的发生与多种因素有关,其中炎症反应是肺动脉高压发展中的一个重要的病理生理机制<sup>[1]</sup>,这提示抗炎作用也是肺动脉高压治疗的一个靶点。apelin是新近发现的小分子多肽,具有广泛的生理功能,除了在心血管保护,摄食,体液稳态平衡等方面有调控作用外,研究表明其与炎症反应及氧化应激也有关联<sup>[2]</sup>。apelin及其受体APJ(putative receptor protein related to the angiotension receptor AT1,血管紧张素样受体或称血管紧张素受体 AT1 相关受体蛋白)在肺动脉内皮上的定位<sup>[3]</sup>提示了 apelin/APJ 系统在维持肺稳态中的作用,经典的 MCT 诱导肺动脉高压模型是一种慢性炎症反应过程<sup>[4]</sup>,apelin 对野百合碱(Monocrotaline, MCT)诱导肺动脉高压模型炎症反应的影响目前还未见报道。包含 77 个氨基酸的长 apelin 原从 C 末端裂解出不同长度的活性多肽存在于生物体内发挥作用,如 apelin10、17、36、13 以及焦谷氨酸乙酯化的 apelin-13 ([Pyr1] apelin-13)等,有人提出 [Pyr1] apelin-13 是 apelin 的最终活性产物,有更强抗裂解酶能力,效能可能最强<sup>[5-7]</sup>。本实验采用 MCT 诱导肺动脉高压模型,观察 [Pyr1] apelin-13 对肺动脉高压及相关炎性指标的影响,探讨 apelin 与肺动脉高压之间的关系。

## 材料与方法

### 一、材料

实验所用 SD 大鼠由南京市第一医院动物实验中心提供, MCT 购自中国大连美仑生物公司, [Pyr1] apelin-13 购自上海默悉生物科技有限公司, 大鼠 IL-6、TNF- $\alpha$  ELISA kit 购自上海朗顿生物技术有限公司。

### 二、实验方法

1. 实验动物分组及肺动脉高压模型建立: 健康雄性 SD 大鼠 45 只, 体重 200 ~ 300 g, 随机均分为 3 组: 正常对照组 (15 只), MCT 组 (15 只), apelin 组 (15 只)。MTC 用乙醇和生理盐水 (2:8) 混合液配成 1% 溶液, MCT 组和 apelin 组每只大鼠一次性腹腔注射 1% MTC 60 mg/kg, 正常对照组注射等量生理盐水。apelin 组每日予以 [Pyr1] apelin-13 0.2 mg/kg 的剂量腹腔注射给药一次, MCT 组每日予以生理盐水 0.2 mg/kg 的剂量腹腔注射给药一次。所有大鼠于同等环境, 自由摄食饮水饲养 4 周后进行以下相关检测。

2. 大鼠平均肺动脉压 (mPAP)、平均颈动脉压 (mCAP), 右心室 (RV)/左心室 + 室间隔 (LV + S) 及肺

组织 IL-6、TNF- $\alpha$  水平的测定: 大鼠禁食过夜, 自由饮水, 腹腔注射 10% 水合氯醛 (0.4 g/kg) 进行麻醉, 麻醉成功后消毒, 取颈正中切口暴露右颈外静脉, 插入测压导管至肺动脉, 连接生理记录仪记录每只大鼠的肺动脉压力, 分析计算 mPAP, 颈外静脉放血处死大鼠后, 迅速剪开胸腔取出心肺, 剪去心房组织, 沿室间隔剪下右心室, 称量 RV 及 LV + S 的重量, 计算右心肥厚指数 RV/(LV + S) 的值。取肺组织 0.1 g 制备匀浆后, 采用 ELISA 法检测大鼠肺组织中 IL-6、TNF- $\alpha$  水平, 按照试剂盒说明书步骤进行操作。

3. 大鼠一般情况及死亡情况: 正常对照组大鼠毛色光泽, 饮食正常, 反应敏捷, MCT 组及 apelin 组大鼠逐渐虚弱, 皮毛无光泽, 呼吸急促, 迟钝少动。本实验共用 SD 大鼠 45 只, 每组 15 只。MCT 组于实验第 20、24 及 28 天各死亡 1 只, 27 d 死亡 2 只, apelin 组于 26、28 d 各死亡 1 只, 对照组大鼠全部生存。最终成模情况, 正常对照组 15 只, MCT 组 10 只, apelin 组 13 只。实验时, apelin 组因插管测压时心律失常死亡 1 只, 对照组大鼠因麻醉意外死亡 1 只。

### 三、统计学分析

使用 SPSS 17.0 统计学软件, 数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法, 大鼠肺动脉压力与肺组织匀浆中前炎症因子水平采用 Pearson 相关关系,  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 结 果

### 一、肺动脉高压评价指标

MCT 诱导 2 周后大鼠出现活动迟缓, 皮毛无光泽, 呼吸急促等现象, 4 周后 MCT 组及 apelin 组与正常对照组相比 mPAP、RV/(LV + S) 明显升高 ( $P < 0.01$ ), apelin 组 mPAP、RV/(LV + S) 值均显著低于 MCT 组 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。

表 1 各组大鼠肺动脉高压评价指标的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	mPAP (mm Hg)	RV/(LV + S) ( $\times 10^{-2}$ )
正常对照组	14	18.3 $\pm$ 2.87	25.19 $\pm$ 2.12
MCT 组	10	28.8 $\pm$ 3.56 <sup>a</sup>	39.05 $\pm$ 2.35 <sup>a</sup>
apelin 组	12	21.7 $\pm$ 4.59 <sup>ab</sup>	28.79 $\pm$ 3.12 <sup>ab</sup>

注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 MCT 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

### 二、大鼠肺组织 IL-6、TNF- $\alpha$ 水平

ELISA 检测结果见表 2, 分析结果显示 MCT 组肺组织中 IL-6、TNF- $\alpha$  浓度显著高于正常对照组 ( $P < 0.01$ ), apelin 组 IL-6、TNF- $\alpha$  浓度明显低于 MCT 组, 但显著高于正常对照组 ( $P < 0.01$ )。

表2 各组大鼠肺组织匀浆中 IL-6、TNF- $\alpha$  的比较 (pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	IL-6	TNF- $\alpha$
正常对照组	14	55.02 $\pm$ 3.39	40.12 $\pm$ 10.58
MCT组	10	729.8 $\pm$ 31.03 <sup>a</sup>	1202.28 $\pm$ 90.15 <sup>a</sup>
apelin组	12	168.7 $\pm$ 24.52 <sup>ab</sup>	371.02 $\pm$ 43.12 <sup>ab</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与MTC组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$

### 三、大鼠肺动脉压力与肺组织匀浆中前炎症因子水平的相关关系

大鼠 mPAP 值与肺组织匀浆中 IL-6 及 TNF- $\alpha$  水平均呈正相关,见表3。

表3 mPAP 与 IL-6、TNF- $\alpha$  的相关分析 ( $n = 36$ )

项目	mPAP	
	r 值	P 值
IL-6	0.524	0.000
TNF- $\alpha$	0.536	0.000

## 讨 论

MCT 诱导肺动脉高压模型是经典的肺动脉模型之一,其发生过程与人类肺动脉高压相似,其作用机制可能与 MCT 经肝代谢的毒性产物引起内皮细胞损伤,释放多种炎症反应介质,引起肺动脉收缩,肺血管重构。本研究通过一次性腹腔注射 MCT 制备大鼠肺动脉高压模型,结果显示 MCT 注射 2 周后大鼠出现一系列的肺动脉高压的症状,结合 4 周后 mPAP、mCAP、RV/(LV+S) 数据检测结果,表明大鼠肺动脉高压模型制备成功。

肺动脉高压的发生与多种原因有关,其中炎症反应是肺动脉高压发生发展过程中一个重要的病理生理过程。研究发现肺动脉高压患者肺血管周围有巨噬细胞、T 细胞、B 细胞浸润,这些炎症细胞通过分泌 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  等多种细胞因子参与炎症反应和肺血管重构过程<sup>[8]</sup>。本实验结果发现与正常对照组相比 MTC 诱导肺动脉高压模型肺组织中 IL-6、TNF- $\alpha$  浓度增加,且 Pearson 相关分析表明大鼠 mPAP 与炎症因子 IL-6 及 TNF- $\alpha$  都呈正相关,也提示了炎症因子参与了肺动脉高压的发展过程。

apelin 是 Tatemoto 等<sup>[9]</sup> 在 1998 年发现的孤儿 G 蛋白受体 APJ 的内源性配体,apelin/APJ 系统广泛存在于人体的各种组织如中枢、心脏、脾脏、脂肪、肺等,其在

心血管、免疫、摄食、生物节律、肺稳态等多方面都有调控作用。目前对 apelin 在心脏保护及血管舒张、抗血管增殖方面的研究较多,有研究发现 apelin 可以抑制动脉粥样硬化斑块的炎症反应过程<sup>[10]</sup>。本实验在 MTC 诱导肺动脉高压慢性炎症反应模型上给予 [Pyr1] apelin-13 干预治疗,4 周后的检测结果显示 [Pyr1] apelin-13 干预组中肺组织中 IL-6、TNF- $\alpha$  与 MTC 组相比明显降低,表明 [Pyr1] apelin-13 可以抑制 MTC 诱导的肺动脉高压发生过程中的炎症反应。[Pyr1] apelin-13 抑制炎症反应的机制目前还不清楚,可能与 NO 合成增加有关<sup>[11]</sup>。

综上所述,本研究结果提示 apelin 可以降低肺组织中前炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$  水平,减少炎症反应,延缓肺动脉高压进展。

## 参 考 文 献

- [1] Price LC, Wort SJ, Perros F, et al. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest*, 2012, 141: 210-221.
- [2] Leeper NJ, Tedesco MM, Kojima Y, et al. Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296: 1329-1335.
- [3] Goetze JP, Rehfeld JF, Carlsen J, et al. Apelin: a new plasma marker of cardiopulmonary disease. *Regul Pept*, 2006, 133: 134-138.
- [4] Wang W, Wang YL, Chen XY, et al. Dexamethasone attenuates development of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Mol Biol Rep*, 2011, 38: 3277-3284.
- [5] Falcão-Pires I, Gonçalves N, Henriques-Coelho T, et al. Apelin decreases myocardial injury and improves right ventricular function in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296: 2007-2014.
- [6] Maguire JJ, Kleinz MJ, Pitkin SL, et al. [Pyr1][Pyr1] apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: vasoactive mechanisms and inotropic action in disease. *Hypertension*, 2009, 54: 598-604.
- [7] Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, et al. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem*, 2000, 275: 21061-21067.
- [8] Joppa P, Petrasova D, Stancak B, et al. Systemic inflammation in patients with COPD and pulmonary hypertension. *Chest*, 2006, 130: 326-333.
- [9] Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251: 471-476.
- [10] Leeper NJ, Tedesco MM, Kojima Y, et al. Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296: 329-335.
- [11] El-Shehaby AM, El-Khatib MM, Battah AA, et al. Apelin: a potential link between inflammation and cardiovascular disease in end stage renal disease patients. *Scand J Clin Lab Invest*, 2010, 70: 421-427.

(收稿日期:2012-11-01)

(本文编辑:戚红丹)