DOI:10.16016/j.1000-5404.201412199

论著

亚硝酸钠和单硝酸异山梨酯对高肺血流肺动脉高压大鼠肺动脉压力和肺血管重塑的影响

袁瑞雪[1],陈 萍[1],涂生芬[2],高 进[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院麻醉科[1];400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院麻醉科[2])

[摘要] **目的** 比较口服亚硝酸钠和单硝酸异山梨酯对高肺血流肺动脉高压大鼠肺动脉压力和肺血管重塑的影响。**方法** 健康雄性SD大鼠40只,将大鼠按随机数字表法分为假手术组(S组)、肺动脉高压组(P组)、亚硝酸钠组(T1组)、单硝酸异山梨酯组(T2组)。P组、T1组、T2组大鼠通过腹主动脉-下腔静脉分流法建立左向右分流肺动脉高压大鼠模型。饲养11周后连续21 d每天分别给予T1组、T2组大鼠6 mg/kg亚硝酸钠和5 mg/kg单硝酸异山梨酯灌胃干预,余2组给予等量的生理盐水。14周后,监测平均动脉压(MAP)、平均肺动脉压(mPAP)的变化;计算右心室肥厚指数:右心室质量/(左心室质量+室间隔质量)[RV/(LV+S)]、右心室质量/体质量(RV/BW)及(左心室+室间隔质量)/体质量[(LV+S)/BW];硝酸根还原酶法检测血及肺组织中NO含量变化;HE染色光镜下观察肺动脉的病理改变。**结果** 与S组比较,分流手术后P组大鼠mPAP、RV/(LV+S)和RV/BW升高,BW降低,血清NO含量降低($P<0.05$),光镜下肺动脉管壁增厚,表明肺动脉高压模型建模成功;与P组比较,T1组和T2组mPAP、RV/(LV+S)和RV/BW均明显降低($P<0.05$),T1组血清NO含量明显升高($P<0.05$),T2组血清NO含量升高,但差异无统计学意义($P>0.05$);与T1组比较,T2组mPAP比T1组下降幅度大;T1组、T2组光镜下肺动脉病理学损伤程度明显减轻。4组大鼠MAP、(LV+S)/BW、肺匀浆NO含量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 长期口服亚硝酸钠和单硝酸异山梨酯均能降低高肺血流肺动脉高压大鼠平均肺动脉压力,减轻肺血管重塑;单硝酸异山梨酯的降平均肺动脉压力作用大于亚硝酸钠。

[关键词] 肺动脉高压;亚硝酸钠;单硝酸异山梨酯;一氧化氮;血流动力学
[中图法分类号] R-332;R544.160.5;R972.4 [文献标志码] A

Effects of sodium nitrite and isosorbide mononitrate on pulmonary artery pressure and pulmonary vascular remodeling in rats with high pulmonary blood flow pulmonary artery hypertension

Yuan Ruixue[1], Chen Ping[1], Tu Shengfen[2], Gao Jin[1] ([1]Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016;[2]Department of Anesthesiology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To compare the effects of sodium nitrite and isosorbide mononitrate on pulmonary artery pressure and pulmonary vascular remodeling in rats with high pulmonary blood flow pulmonary artery hypertension (PAH). **Methods** According to a random number table method, 40 healthy

[基金项目] 国家自然科学基金(31200853);卫生部国家临床重点专科建设项目[财社(2011)170号];重庆市卫生局医学科研计划项目(2012-1-018);重庆市医学重点学科[渝卫科教(2007)2号]
[通信作者] 陈 萍,E-mail:mazuichen@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150324.1322.015.html(2015-03-24)

male Sprague-Dawley rats were randomly assigned into 4 groups ($n=10$): sham operation group (group S), PAH group (group P), sodium nitrite 6 mg/kg group (group T1) and isosorbide mononitrate 5 mg/kg group (group T2). A left-to-right shunt PAH model was established by an arterial-venous shunt surgery created between abdominal aorta and inferior vena cava in group P, group T1 and group T2. After the rats were fed for 11 weeks, sodium nitrite (6 mg/kg) and isosorbide mononitrate (5 mg/kg) were given in group T1 and group T2, respectively, for 21 d. The same volume saline was given in group S and group P. At the end of 14 weeks, the mean arterial pressure (MAP) and mean pulmonary arterial pressure (mPAP) were monitored. The hearts were weighted to calculate right ventricular hypertrophy index (RVHI), right ventricle mass/(left ventricle mass + septum mass) [RV/(LV + S)], right ventricle mass/body weight (RV/BW) and left ventricle mass + septum mass/body weight [(LV + S)/BW]. The nitric oxide (NO) content in serum and lung homogenate was determined with a nitrate reductase method. The pathological change of pulmonary artery was examined with an optical microscope. **Results** Compared with group S, the mPAP, RV/(LV + S) and RV/BW of group P were increased, and the BW and serum NO content were reduced ($P<0.05$). The pathological damage was severer in group P than in group S. Compared with group P, the mPAP, RV/(LV + S) and RV/BW were reduced in group T1 and group T2 ($P<0.05$) and the serum NO content was increased in group T1 ($P<0.05$) and group T2 ($P>0.05$). Isosorbide mononitrate and sodium nitrite alleviated the pathological damage in the lung. There were no significant differences in the levels of MAP, (LV + S)/BW and the NO content in lung homogenate among the 4 groups ($P>0.05$). **Conclusion** Long-term administration of sodium nitrite and isosorbide mononitrate improves the hemodynamics in the rats with high pulmonary blood flow PAH and attenuates pulmonary vascular remodeling induced by PAH, and the mPAP-lowering effect of isosorbide mononitrate is better than that of sodium nitrite.

[**Key words**] pulmonary arterial hypertension; sodium nitrite; isosorbide mononitrate; nitric oxide; hemodynamics

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31200853), the National Clinical Key Subject Construction Project of Ministry of Health (2011-170), the Project of Medical Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2012-1-018), and the Project of Chongqing Medical Key Disciplines (2007-2). Corresponding author: Chen Ping, E-mail: mazuichen@163.com

吸入一氧化氮(nitric oxide,NO)在治疗原发性和继发性肺动脉高压中具有显著作用,但是NO吸入需要借助特殊设备,实时监测血中NO的浓度并对其进行精确调节,因此操作相对复杂、价格昂贵,且NO作用时间较短,突然中断会造成反跳性肺动脉高压[1],因此吸入NO更适于术中降低肺动脉高压,而在慢性肺动脉高压的治疗中受到限制。我们前期研究发现口服亚硝酸钠(sodium nitrite)能通过转化为NO产生降低肺动脉高压大鼠肺动脉压力的作用;而临床中另一个通过释放NO扩张静脉产生降压作用的药物是单硝酸异山梨酯(isosorbide mononitrate,ISMN),那么单硝酸异山梨酯是否具有降低肺动脉压力的作用?本研究比较亚硝酸钠和单硝酸异山梨酯对高肺血流肺动脉高压大鼠血流动力学和肺动脉病理形态的影响。

1 材料与方法

1.1 动物选择及分组

健康清洁级雄性SD大鼠40只,日龄35~42 d,体质量200~230 g,由重庆医科大学实验动物中心提供,合格证:SCXK(渝)2012-0001。采用随机数字表法,将大鼠分为4组($n=10$):假手术组(S组)、肺动脉高压组(P组)、亚硝酸钠组(T1组)、单硝酸异山梨酯组(T2组)。

1.2 药物及仪器

食品级亚硝酸钠(上海科昌精细化学品公司,批号:20121013);单硝酸异山梨酯(山东鲁南贝特制药公司,国药准字H10940039);TKR-200C型小动物呼吸机(江西特力麻醉呼吸机设备公司);压力传感器及PM-9000多导生理记录仪(深圳迈瑞生物医疗电子股

份有限公司);一氧化氮测定试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司)。

1.3 动物模型制备及分组处理

大鼠禁食12 h后,10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉,仰卧固定于小动物手术台上,保持自主呼吸。参考Garcia[2]的建模方式,P组、T1组、T2组大鼠进行左向右分流肺动脉高压大鼠模型的建立。具体方法:腹部左旁正中切口打开腹腔,用拉钩将腹内容物拉向大鼠右侧,暴露腹主动脉和下腔静脉;用小动脉夹钳分别夹住腹主动脉上方近肾动脉处和下方两侧髂总动脉分叉处,在该段腹主动脉中下1/3处,18G静脉穿刺针于腹主动脉正上方穿入腹主动脉,然后以45°角斜行向右上方刺破腹主动脉-下腔静脉联合壁,进入下腔静脉形成瘘口;拔出穿刺针,以一滴氰基丙基酸盐粘合剂封住穿刺口,30 s后松开小动脉夹。若观察到下腔静脉增粗、鲜红色的血流自腹主动脉流向下腔静脉且下腔静脉有搏动,则证实分流建立成功,腹腔内脏器复位,关闭腹腔。S组为假手术组,仅单纯开腹,暴露腹主动脉和下腔静脉,腹主动脉夹闭不做腹主动脉下腔静脉造瘘手术。造瘘手术11周后,T1组、T2组大鼠分别给予亚硝酸钠6 mg/kg和单硝酸异山梨酯5 mg/kg灌胃干预;S组和P组大鼠给予等量的生理盐水,每天1次,共3周。然后进行以下指标观察。

1.4 观察指标

1.4.1 血流动力学监测 大鼠称质量后,10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉,经颈正中切口行气管切开,插入16号静脉留置针套管,接TKR-200C型小动物呼吸机,潮气量2 mL/100 g、呼吸频率40次/min。暴露左颈总动脉,将一次性动脉穿刺针置入左颈总动脉,在右3、4肋间打开胸腔,直接将20号静脉留置针套管置入肺动脉处,连接压力传感器及PM-9000多导生理记录仪,稳定后记录平均动脉压(MAP)、平均肺动脉压力(mPAP)。

1.4.2 右心室肥厚指数测定 血流动力学监测完毕,肺动脉取血3~4 mL备用,剖胸取出大鼠心脏,剪去心房组织,沿室间隔边缘分离出右心室(RV)和左心室+室间隔(LV+S)。以生理盐水冲洗剩余血液并用滤纸吸干水分后,使用电子天平分别称其质量,分别计算右心室肥厚指数:右心室质量/(左心室+室间隔)[RV/(LV+S)],右心室质量/体质量(RV/BW)及(左心室+室间隔)/体质量[(LV+S)/BW]。

1.4.3 血及肺组织NO含量测定 肺动脉血置于干燥离心管内,4 ℃以3 000 r/min(离心半径为8.5 cm)离心20 min,取上清液,置于-80 ℃保存备测。取大鼠右肺上叶肺组织,生理盐水清洗血迹,用滤纸吸干,电子天平称质量,按质量体积比1∶9加冷生理盐水制备成10%肺匀浆,10 000 r/min(离心半径为8.5 cm)离心10 min,取上清液,煮沸3 min后10 000 r/min(离心半径为8.5 cm)离心5 min,取上清液,置于-80 ℃保存备测。用一氧化氮测定试剂盒(酶法)测量血清NO含量。

1.4.4 肺动脉形态学观察 取左肺上叶,生理盐水清洗净,滤纸吸干,4%多聚甲醛中固定。48 h后常规石蜡包埋,4 μm厚制片行HE染色,观察肺动脉形态学变化。

1.5 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件进行分析,计量资料用$\bar{x} \pm s$表示,多组间比较采用单因素方差分析,正态性检验后做方差齐性检验,方差齐作LSD检验,方差不齐的组间比较采用多个独立样本的秩和检验。

2 结果

2.1 血流动力学监测

与假手术组比较,肺动脉高压组大鼠平均肺动脉压升高($P<0.05$),表明肺动脉高压模型建模成功。与肺动脉高压组大鼠比较,亚硝酸钠组和单硝酸异山梨酯组大鼠平均肺动脉压力均明显降低($P<0.05$);单硝酸异山梨酯组比亚硝酸钠组降低更显著($P<0.05$)。4组平均动脉压比较差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。

表1 4组大鼠的血流动力学指标比较(mmHg, $n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	MAP	mPAP
S组	92.1±2.0	13.9±0.6
P组	92.8±3.1	28.7±1.0[a]
T1组	93.8±1.2	15.0±2.0[b]
T2组	94.6±2.1	10.8±2.9[abc]

a:$P<0.05$,与S组比较;b:$P<0.05$,与P组比较;c:$P<0.05$,与T1组比较

2.2 右心室肥厚指数测定

与假手术组比较,肺动脉高压组和单硝酸异山梨酯组大鼠体质量降低($P<0.05$),肺动脉高压组RV/(LV+S)和RV/BW升高($P<0.05$)。与肺动脉高压

组比较,亚硝酸钠组和单硝酸异山梨酯组 RV/(LV + S)和 RV/BW 降低($P<0.05$);与单硝酸异山梨酯组比较,亚硝酸钠组 BW 升高($P<0.05$),RV/(LV + S)和 RV/BW 差异无统计学意义($P>0.05$)。4 组大鼠(LV + S)/BW 比较差异无统计学意义($P>0.05$,表 2)。

表 2 4 组大鼠的右心室肥厚指数比较($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	BW(g)	RV/(LV + S) ($\times10^{-2}$)	RV/BW ($\times10^{-4}$)	(LV + S)/BW ($\times10^{-4}$)
S 组	450.6 ± 7.2	27.2 ± 2.4	4.71 ± 0.22	17.3 ± 1.1
P 组	432.5 ± 1.8[a]	37.4 ± 1.0[a]	6.34 ± 0.12[a]	16.9 ± 0.3
T1 组	445.0 ± 6.3[b]	28.0 ± 2.6[b]	5.19 ± 0.34[b]	16.9 ± 0.5
T2 组	433.6 ± 5.9[ac]	28.7 ± 4.5[b]	4.92 ± 1.19[b]	17.1 ± 3.1

a:$P<0.05$,与 S 组比较;b:$P<0.05$,与 P 组比较;c:$P<0.05$,与 T1 组比较

2.3 血及肺组织 NO 含量测定

与假手术组比较,肺动脉高压组血清 NO 含量降低($P<0.05$);与肺动脉高压组比较,亚硝酸钠组血清 NO 含量显著增高($P<0.05$),单硝酸异山梨酯组血清 NO 含量有所升高,但是差异无统计学意义($P>0.05$)。与亚硝酸钠组比较,单硝酸异山梨酯组血清 NO 含量下降($P<0.05$)。4 组大鼠肺匀浆中 NO 含量比较差异无统计学意义($P>0.05$,表 3)。

表 3 4 组大鼠血清、肺匀浆 NO 含量比较

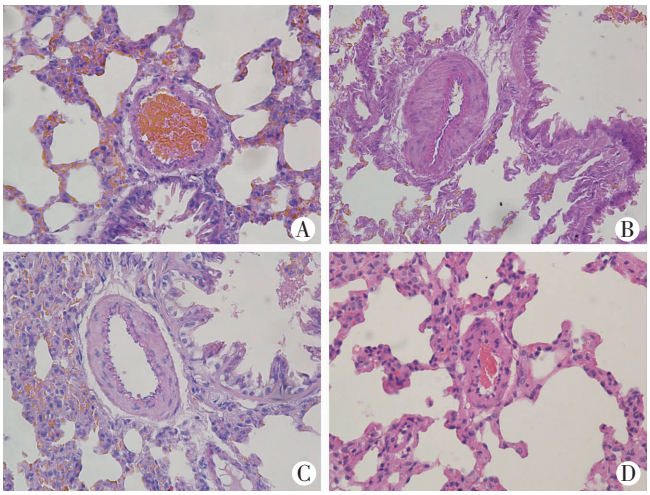
(μmol/L, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	血清 NO 含量	肺匀浆 NO 含量
S 组	41.2 ± 4.3	40.2 ± 2.7
P 组	16.5 ± 3.4[a]	40.8 ± 4.1
T1 组	34.6 ± 2.9[b]	42.8 ± 4.0
T2 组	18.7 ± 5.4[ac]	37.8 ± 5.2

a:$P<0.05$,与 S 组比较;b:$P<0.05$,与 P 组比较;c:$P<0.05$,与 T1 组比较

2.4 肺动脉病理形态观察

光镜下肺动脉 HE 染色可见假手术组肺动脉管壁薄,内膜光滑,内皮细胞扁平(图 1A);肺动脉高压组大鼠肺动脉内膜及中膜肥厚,平滑肌细胞增殖,排列紊乱,管腔狭窄,同时伴有炎性细胞浸润(图 1B);而亚硝酸钠和单硝酸异山梨酯治疗后炎性细胞减少,肺动脉管壁增厚和管腔狭窄程度均得到明显减轻(图 1C、D)。



A:S 组;B:P 组;C:T1 组;D:T2 组

图 1 4 组大鼠肺动脉形态学变化 (HE × 400)

3 讨论

长期以来,人们认为亚硝酸盐是 NO 的一种无活性代谢产物,认为其依赖的亚硝胺的形成与胃癌有关,但是现代流行病学研究未能证实这种关联[3]。最近研究发现当经典的 L-精氨酸-一氧化氮合酶(NOS)-NO 途径无法正常产生 NO 时,亚硝酸盐会被机体重新利用还原成 NO,从而维持机体正常的生理功能[4-5]。而临床上通过产生 NO 产生降压作用的主要是硝酸酯类药物。临床上单硝酸异山梨酯主要用于冠心病的长期治疗和预防心绞痛的发作[6]。多项研究已经表明,亚硝酸盐在哺乳动物心、脑、肝、肾的缺血再灌注损伤模型中,具有减轻组织损伤,抗凋亡的保护作用[7]。吸入和注射亚硝酸钠具有产生快速扩张肺血管,减轻肺动脉高压严重程度的作用[8-10]。我们前期研究也发现亚硝酸钠具有降低肺动脉压力,改善肺血管重塑的作用。摄入过量的亚硝酸钠[5]和单硝酸异山梨酯均可导致高铁血红蛋白血症,临床常用剂量的单硝酸异山梨酯鲜有发生,而已有研究在动物和健康志愿者中证实长期静脉注射合适剂量的亚硝酸钠是安全的[11]。

肺动脉高压患者的长期治疗可能通过口服效果更好,特别考虑到吸入或者静脉注射亚硝酸盐的半衰期短(< 1 h)[12]。大鼠亚硝酸钠的经口半数致死量为 180 mg/kg,本实验中亚硝酸钠的用药剂量(6 mg/kg)及给药时间参考文献[12]和前期实验结果。单硝酸异山梨酯口服吸收完全,而静脉剂型没有药动学优势,无临床应用价值,因为静脉滴注同样剂量起效比口服

制剂慢,而且容易蓄积[6],所以在本实验中采用口服灌胃干预的方法。本实验中所有指标的测定均是在最后1次亚硝酸钠和单硝酸异山梨酯灌胃24 h后,因此排除了亚硝酸钠和单硝酸异山梨酯对肺血管的急性扩张作用。

本研究结果表明,通过分流手术后,肺动脉高压组大鼠平均肺动脉压力显著增加,体质量明显下降,右心室肥厚指数增加,血清NO含量下降,光镜下肺动脉管腔狭窄,管壁增厚,表明高肺血流肺动脉高压大鼠模型建模成功。对肺动脉高压大鼠分别给予亚硝酸钠和单硝酸异山梨酯治疗后,其平均肺动脉压力均得到显著下降,且单硝酸异山梨酯组降低的幅度大于亚硝酸钠组。分别给予2种药物治疗后,2组肺动脉高压大鼠的右心室肥厚指数均明显下降。HE染色下可见2组大鼠肺动脉管腔狭窄程度减轻,管壁变薄,说明亚硝酸钠和单硝酸异山梨酯治疗后均能减轻肺血管重塑。亚硝酸钠组和单硝酸异山梨酯组大鼠平均肺动脉压力得到显著降低的同时并没有引起全身低血压,这可能与NO对肺循环有选择性有关,对于肺动脉高压患者非常有利。

综上所述,单硝酸异山梨酯作为临床上的常用药物,对于已患冠心病的肺动脉高压患者在扩张冠脉的同时降低心肌氧耗的作用;亚硝酸钠由于其副作用不为临床医师所接受,但是前景也不容忽视。

参考文献:

[1] 夏红萍, 黄国英. 一氧化氮吸入撤离后反跳性肺高压研究进展[J]. 国外医学: 儿科学分册, 2004, 31(3): 143 - 145.

[2] Garcia R, Diebold S. Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat[J]. Cardiovasc Res, 1990, 24(5): 430 - 432.

[3] Sindelar J J, Milkowski A L. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet[J]. Nitric Oxide, 2012, 26(4): 259 - 266.

[4] Webb A, Bond R, McLean P, *et al*. Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(37): 13683 - 13688.

[5] Tsuchiya K, Kanematsu Y, Yoshizumi M, *et al*. Nitrite is an alternative source of NO *in vivo*[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(5): H2163 - H2170.

[6] 胡慧, 詹凌青. 硝酸酯临床应用研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2013, 6(12): 159 - 161.

[7] Sobierajski J, Kelm M, Rassaf T. New strategies in cardioprotection during acute myocardial infarction: Impact of hypoxic nitrate-nitrite-NO signaling[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2013, 138(15): 799 - 804.

[8] Bjorne H H, Petersson J, Phillipson M, *et al*. Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness[J]. J Clin Invest, 2004, 113(1): 106 - 114.

[9] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Methemoglobinemia following unintentional ingestion of sodium nitrite—New York, 2002[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2002, 51(29): 639 - 642.

[10] Dejam A, Hunter C J, Tremonti C, *et al*. Nitrite infusion in humans and nonhuman primates: endocrine effects, pharmacokinetics, and tolerance formation[J]. Circulation, 2007, 116(16): 1821 - 1831.

[11] Pluta R M, Oldfield E H, Bakhtian K D, *et al*. Safety and feasibility of long-term intravenous sodium nitrite infusion in healthy volunteers[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e14504.

[12] Dejam A, Hunter C J, Tremonti C, *et al*. Nitrite infusion in humans and nonhuman primates: endocrine effects, pharmacokinetics, and tolerance formation[J]. Circulation, 2007, 116(16): 1821 - 1831.

(**收稿**:2014-12-19;**修回**:2015-01-09)

(编辑 张 维)