心血管疾病 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001080

亚硝酸钠对高肺血流肺动脉高压大鼠的影响及机制研究

袁瑞雪[1],涂生芬[2],陈 萍[1],高 进[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院麻醉科,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属儿童医院麻醉科,重庆 400014)

【摘 要】**目的**:探讨亚硝酸钠对高肺血流肺动脉高压大鼠的影响及亚硝酸盐转化为 NO 的可能机制,为临床治疗先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)肺动脉高压提供依据。**方法**:健康清洁级雄性 SD 大鼠 50 只,体质量 200~230 g,按照随机数字表法随机分为 5 组:假手术组(S 组)、肺动脉高压组(P 组)、亚硝酸钠组(N 组)、亚硝酸钠+黄嘌呤氧化还原酶(xanthine oxidase, XOR)抑制剂组(NX 组)、XOR 抑制剂组(X 组),每组 10 只。S 组仅开腹暴露腹主动脉和下腔静脉,其余各组进行腹主动脉-下腔静脉造瘘手术,建立左向右分流高肺血流肺动脉高压大鼠模型。术后 11 周分别给予 N 组和 NX 组亚硝酸钠 6 mg/kg,X 组XOR 抑制剂别嘌呤醇 30 mg/kg 灌胃干预,NX 组在亚硝酸钠给药前 1 h 给予 XOR 抑制剂别嘌呤醇 30 mg/kg, 其余 2 组给予等容量的生理盐水,每天 1 次,共 3 周。14 周时监测平均肺动脉压(mean pulmonary artery pressure, mPAP)和平均动脉压(mean arterial pressure, MAP);计算右心室肥厚指数(RVHI)=右心室质量/(左心室质量+室间隔质量)[RV/(LV+IS)];硝酸还原酶法检测血及肺组织中 NO 含量;HE 染色光镜下观察肺动脉的病理学结果;Western blot 检测肺组织内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)、XOR 蛋白含量变化。**结果**:与 S 组比较,P 组大鼠 mPAP、RV/(LV+IS)显著升高(P=0.000),血清 NO 含量降低(P=0.000),肺匀浆 NO 含量差异无统计学意义(P>0.05),光镜下肺动脉管壁增厚,eNOS 蛋白含量表达降低(P=0.005);与 P 组比较,N 组、NX 组和 X 组大鼠 mPAP 和 RV/(LV+IS)明显降低(P<0.05)、血清 NO 含量升高(P=0.000),N 组肺匀浆 NO 含量差异无统计学意义(P>0.05),NX 组和 X 组肺匀浆 NO 含量降低(P=0.000),N 组 eNOS 和 XOR 蛋白含量表达增加(P=0.000);与 N 组比较,NX 组和 X 组 mPAP、RV/(LV+IS)差异无统计学意义(P>0.05),NX 组和 X 组血清和肺匀浆 NO 含量降低(P=0.000)、XOR 表达降低(P=0.000)。N 组、NX 组、X 组光镜下肺动脉病理学损伤程度明显减轻。5 组大鼠 MAP 比较差异无统计学意义(P>0.05)。**结论**:亚硝酸钠(6 mg/kg)灌胃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;亚硝酸钠降低肺动脉的压力不完全被 XOR 抑制剂阻断;同时实验中发现 XOR 抑制剂本身具有降低肺动脉压力的作用。亚硝酸钠转化为 NO 的机制需要进一步研究。

【关键词】肺动脉高压;亚硝酸钠;一氧化氮;黄嘌呤氧化还原酶抑制剂

【中图分类号】R541.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-05-03

Effects of sodium nitrite on rats with high pulmonary blood flow and pulmonary hypertension and its mechanism

Yuan Ruixue[1], *Tu Shengfen*[2], *Chen Ping*[1], *Gao Jin*[1]

(*1. Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;*
2. Department of Anesthesiology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To investigate the effects of chronic sodium nitrite treatment on rats with high pulmonary blood flow and pulmonary hypertension and to explore its mechanism in order to provide references for the treatment of pulmonary arterial hypertension. ***Methods***: Fifty healthy male sprague-dawley rats were randomly assigned into 5 groups (n=10): the sham group (group S), the PAH group (group P), the sodium nitrite group (group N), the sodium nitrite+xanthine oxidase (XOR) inhibitor group (group NX) and the XOR inhibitor group (group X). A left-to-right shunt pulmonary hypertension model was established via an arterial-venous shunt surgery, creating a shunt between the abdominal aorta and the inferior vena cava in all groups except group S. After 11 weeks, sodium nitrite was administered (6 mg/

作者介绍:袁瑞雪,Email:790748255@qq.com,
研究方向:先天性心脏病肺动脉高压。

通信作者:涂生芬,Email:519194496@qq.com。

基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(编号:cstc2012jjA10036);重庆市医学高端后备人才培养资助项目(编号:2015HBRC007);卫生部国家临床重点专科建设资助项目(编号:财社(2011)170 号);重庆市医学重点学科资助项目(编号:渝卫科教(2007)2 号)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20161215.1139.026.html (2016-12-15)

kg) once per day for 21 days in group N and group NX. Allopurinol (30 mg/kg), which is a XOR inhibitor, was administered in group X and in group NX one hour before sodium nitrite administration. The same volume saline was given in group S and group P. At the end of the 14 weeks, the mean arterial pressure (MAP) and the mean pulmonary artery pressure (mPAP) were monitored. The hearts were weighted to calculate right ventricular hypertrophy index (RVHI): the weight ratio of the right ventricle mass to left ventricle plus septum mass (RV/LV+IS). The NO contents in serum and lung homogenate were determined by Nitrate reductase method. The structures in pulmonary arteries were examined in goptical microscope. The endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and XOR contents in lung tissues were measured by using Western blot. ***Results***: Shunting of the abdominal aorta and inferior vena cava resulted in a significant increase in pulmonary artery pressures. The intragastric administration of sodium nitrite (6 mg/kg) and XOR inhibitor resulted in a significant reduction of the mPAP in PAH models. Compared with animals that received no inhibitors, the use of inhibitors caused no significant change in the mPAP. There was no significant difference in MAP in the five groups. Rats with high pulmonary blood flow and pulmonary hypertension had significantly higher RV/LV+IS weights than the sham operation rats. The rats with high pulmonary blood flow and pulmonary hypertension that were treated with intragastrically administered sodium nitrite (6 mg/kg for 21 days) had significantly lower RV/LV+S weights than untreated rats with high pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. Compared with animals that received no inhibitors, the use of inhibitors caused no significant changes in RV/LV+IS weights. Compared with that of group S, the serum NO level decreased in group P and group NX ($P<0.05$). Compared with that of group P, the serum NO level increased in group N ($P<0.05$). NO levels in the lung tissue decreased in groups NX ($P<0.05$). The histological analysis of sections from the left lower lung lobe revealed the development of medial hypertrophy in the small pulmonary arteries from animals with high pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. Treatment with 6 mg/kg of intragastrically administered sodium nitrite daily for 21 days resulted in a reduction in the extent of medial hypertrophy in the small pulmonary arteries in comparison with the vessels from untreated animals with high pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. Western blot revealed that eNOS/GAPDH and XOR/GAPDH ratios of group P were significantly lower than those of group S ($P<0.05$). However, the XOR/GAPDH ratios of the sodium nitrite-treated groups were significantly increased. The XOR/GAPDH ratio was significantly decreased in groups NX. ***Conclusion***: These data suggest that long term administration of sodium nitrite improves the hemodynamics in rats with high pulmonary blood flow and pulmonary hypertension and attenuates pulmonary vascular remodeling induced by pulmonary hypertension, but the mechanism of sodium nitrite that underlies this effect requires further study.

【Key words】pulmonary hypertension; sodium nitrite; nitric oxide; xanthine oxidase inhibitor

肺动脉高压(pulmonary hypertension)是先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)中最常见的并发症，特别是有心脏分流的患者，其发生发展直接影响 CHD 患者的手术结果及预后。在肺动脉高压的治疗中，一系列新型药物被批准应用，如：磷酸二酯酶-5 型抑制剂、内皮素受体拮抗剂、前列环素及其类似物。这些药物虽然能够改善患者的临床症状，推迟临床恶化，但是价格十分昂贵。目前的这种治疗状况极大地限制了肺动脉高压患者的生存及生活质量。开发一种可长期使用且价廉物美的药物，对肺动脉高压的治疗具有非常重要的意义。一氧化氮(nitric oxide, NO)因其对肺动脉具有选择性扩张作用，临床中主要应用于术中降低肺动脉压力。由于 NO 吸入在具体实施中的复杂性，如需要借助气管插管和供氧装置等特殊设备以及实时监测血中 NO 的浓度并对其进行精确调节，使其在实际临床治疗中应用受限[1]。亚硝酸盐曾经仅仅被认为是 NO 的一种无活性代谢产物，但最近的研究发现，在某些病理和生理条件下，由于产生 NO 的传统途径 L-精氨酸-一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)-NO 途径受损，将无法正常产生 NO 时，亚硝酸盐将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[2-3]。已有研究表明，在心肌缺血再灌注损伤、急性心肌梗死模型中，外源性亚硝酸盐对其具有细胞保护作用。已有研究应用雾化吸入或静脉注射亚硝酸钠的方式，干预肺动脉高压模型，降低肺动脉压力[1]。然而雾化吸入和静脉补充[4-5]亚硝酸钠的半衰期较短[6]，在长期治疗中，口服补充亚硝酸盐(饮食或者药物)更方便。本研究拟探讨亚硝酸钠对高肺血流肺动脉高压大鼠的影响及亚硝酸盐转化为 NO 的可能机制，为药物治疗肺动脉高压提供新的参考。

1 材料与方法

1.1 动物选择及分组

本实验选取健康清洁级雄性 SD 大鼠 50 只，42~49 日龄，体质量 200~230 g，由重庆医科大学动物实验中心提供，合格证：SCXK(渝)2012-0001。采用随机数字表法，将 50 只健康清洁级雄性 SD 大鼠随机分为 5 组(n=10)：假手术组(S 组)、肺动脉高压组(P 组)、亚硝酸钠组(N 组)、亚硝酸钠+黄嘌呤氧化还原酶(xanthine oxidase，XOR)抑制剂组(NX 组)、XOR 抑制剂组(X 组)。

1.2 动物模型制备及分组处理

建模手术前将 SD 大鼠禁食 12 h，禁饮 2 h，然后称其体质量，用 10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)通过腹腔注射的方法将其麻醉，待动物安静且对痛觉没有反应时，将其仰卧固定于小动物手术台，保持其自主呼吸。参照文献[7]介绍的方法，具体方法如下：给大鼠腹部备皮，碘伏消毒，自制无菌消毒手术单铺单，在腹部旁正中切口位置打开腹腔，用无菌拉钩将腹内容物拉向大鼠右侧，使用无菌弯镊钝性分离并暴露腹主动脉和下腔静脉。用无菌小动脉夹分别钳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。如果观察到下腔静脉内有来自腹主动脉的鲜红色血流且下腔静脉增粗、有搏动，则证实分流模型建立成功，腹腔内脏器复位，关闭腹腔。除 S 组外，各组进行腹主动脉-下腔静脉分流手术，建立左向右分流高肺血流肺动脉高压大鼠模型。术后 11 周分别给予 N 组和 NX 组大鼠亚硝酸钠 6 mg/kg，X 组大鼠 XOR 抑制剂别嘌呤醇 30 mg/kg 灌胃干预，NX 组在亚硝酸钠给药前 1 h 给予 XOR 抑制剂别嘌呤醇 30 mg/kg，其余 2 组给予等容量的生理盐水进行灌胃，每天 1 次，共 3 周。末次给药结束 24 h 后进行以下指标的检测。

1.3 观察指标

1.3.1 平均动脉压(mean arterial pressure，MAP)和平均肺动脉压(mean pulmonary artery pressure，mPAP)监测 将大鼠称重后，用 10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)通过腹腔注射的方法将其麻醉，将大鼠仰卧位固定于小动物手术台，颈部备皮，消毒铺巾，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(江西特力麻醉呼吸机设备公司)，潮气量 2 mL/100g、呼吸频率 40 次/min，控制大鼠的呼吸。暴露左颈总动脉，同时在右 3、4 肋间打开胸腔暴露肺动脉，分别将带有肝素的一次性动脉穿刺针套管置入左颈总动脉和肺动脉处，连接压力传感器及 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)，稳定后记录MAP 和 mPAP。

1.3.2 右心室肥厚指数测定 MAP 和 mPAP 监测完毕后，采集肺动脉血样 3~4 mL，置于干燥离心管内。分离肺组织，然后将其放于液氮中保存，留待后续相关指标的检测。取出大鼠心脏放在盛有生理盐水的干净培养皿中，用小手术剪剪去心房组织，以室间隔为界，分离成两部分，一部分为右心室，另一部分为室间隔+左心室。用生理盐水将这两部分冲洗干净后，用滤纸吸干水分。然后分别将它们放于电子天平上，称其质量，以右心室质量/(左心室+室间隔)质量表示右心室肥厚指数，即 RVHI=RV/(LV+IS)。

1.3.3 血及肺组织 NO 含量测定 MAP 和 mPAP 监测完毕后，采集肺动脉血样 3~4 mL，置于干燥离心管内。静置于实验台上促其凝固，待血液凝固后，在 4℃条件下以 3 000 r/min(离心半径为 8.5 cm)离心 20 min，取上清液盛于无菌 EP 管中，置于-80 ℃中保存待用。精确称取右肺上叶肺组织。按质量(g)：体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的冰生理盐水。用匀浆器在冰水浴条件下机械匀浆。将匀浆液置于干燥离心管中，在 4 ℃条件下以 2 500 r/min(离心半径为 8.5 cm)离心 10 min，取上清液，置于-80 ℃保存待用。应用 NO 测定试剂盒(硝酸还原酶法)，严格按照说明书中步骤，检测血清及肺组织中 NO 的含量，NO 测定试剂盒购自北京四正柏生物科技有限公司。

1.3.4 肺动脉形态学观察 MAP 和 mPAP 监测完毕后，取大鼠左肺上叶肺组织，放于盛有生理盐水的培养皿中清洗 3次，然后用滤纸吸干肺组织水份，4%多聚甲醛固定。48 h 后进行常规的石蜡包埋、切片，最后进行 HE 染色，观察肺动脉的形态学。

1.3.5 Western blot 法检测肺组织内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase，eNOS)和 XOR 蛋白的表达 用 PIPA 裂解液提取肺组织蛋白，BCA 法进行蛋白定量。上样，SDS-PAGE 凝胶电泳，电转至硝酸纤维素膜，5%脱脂牛奶封闭，加一抗(稀释浓度：XOR 1:500、eNOS 1:500、GAPDH 1:3 000)4 ℃孵育过夜，次日 TBST 缓冲液室温洗膜 10 min×3 次，二抗(1:5 000)室温 2 h，TBST 漂洗 10 min×4 次，洗膜后 ECL 显色，暗室曝光成像，采用 Quantity One 软件进行吸光度分析，目的蛋白相对表达量以目的蛋白与内参蛋白吸光度比值来表达。

1.4 统计学处理

计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学处理，进行正态性检验后做方差齐性检验，方差齐的组间比较采用单因素方差分析，方差不齐的组间比较采用多个独立样本的秩和检验。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 MAP 和 mPAP 监测

与 S 组比较，P 组大鼠 mPAP 明显升高(P=0.000)，表明肺动脉高压模型建模成功；与 P 组比较，N 组(P=0.000)和 X 组(P=0.001)大鼠 mPAP 明显降低(P<0.05)；加入 XOR 抑制剂后，与 N 组比较，添加抑制剂组差异无统计学意义(P>0.05)。5 组大鼠 MAP 比较差异无统计学意义(P>0.05)。见表1。

表 1 各组大鼠 MAP、mPAP 和右心室肥厚指数比较（$\bar{x}\pm s$，n=10）

Tab.1 Comparison of MAP, mPAP and RVHI of each group（$\bar{x}\pm s$，n=10）

组别	MAP(mmHg)	mPAP(mmHg)	RV/(LV+IS)(×10^{-2})
S组	92.1 ± 2.0	13.9 ± 0.6	27.2 ± 2.4
P组	92.8 ± 3.1	28.7 ± 1.1^{a}	37.4 ± 1.0^{a}
N组	93.8 ± 1.2	15.0 ± 2.0^{b}	28.0 ± 2.6^{b}
NX组	92.4 ± 3.6	16.1 ± 2.6^{b}	29.9 ± 2.2^{b}
X组	93.3 ± 3.9	16.0 ± 2.6^{b}	30.3 ± 2.5^{ab}
F 值	3.162	29.227	30.113
P 值	0.531	0.000	0.000

注：a，与 S 组比较，$P<0.05$；b：与 P 组比较，$P<0.05$；c：与 N 组比较，$P<0.05$；d：与 NX 组比较，$P<0.05$

2.2 右心室肥厚指数测定

与 S 组比较，P 组大鼠 RV/(LV+IS)明显升高(P=0.000)；与 P 组比较，N 组(P=0.000)和 X 组(P=0.006)大鼠 RV/(LV+IS)明显降低；加入 XOR 抑制剂后，与未添加组比较，添加抑制剂组差异无统计学意义(P>0.05)。见表 1。

2.3 血及肺组织 NO 含量测定

与 S 组比较，P 组大鼠血清 NO 含量降低(P=0.000)，肺匀浆 NO 含量差异无统计学意义(P>0.05)；与 P 组比较，N 组大鼠血清 NO 含量升高(P=0.000)，肺匀浆 NO 含量差异无统计学意义(P>0.05)，加入 XOR 抑制剂后，与未添加组比较，添加抑制剂组血清和肺匀浆 NO 含量降低(P=0.000)；X 组，血清和肺匀浆 NO 含量降低(P=0.033，P=0.021)。见表 2。

表 2 各组大鼠血清、肺匀浆 NO 含量比较(μmol/L，$\bar{x}\pm s$，n=10)

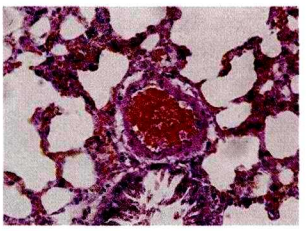
Tab.2 Comparison of NO levels in serum and lung tissues of each group(μmol/L，$\bar{x}\pm s$，n=10)

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 ± 4.0
N组	34.6 ± 2.9^{b}	42.8 ± 3.9
NX组	18.8 ± 3.0^{abc}	18.9 ± 2.4^{abc}
X组	22.2 ± 3.6^{abcd}	15.4 ± 3.0^{abcd}
F 值	93.732	164.524
P 值	0.000	0.000

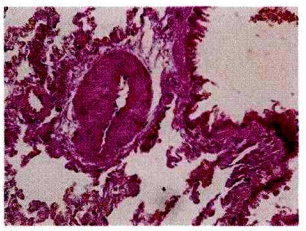
注：a，与 S 组比较，$P<0.05$；b：与 P 组比较，$P<0.05$；c：与 N 组比较，$P<0.05$；d：与 NX 组比较，$P<0.05$

2.4 肺动脉病理形态观察

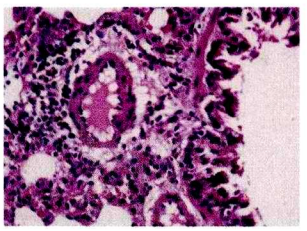
光镜下肺动脉 HE 染色可见 S 组肺动脉管壁较薄，内皮细胞扁平，内膜光滑(图 1A)；P 组大鼠肺动脉内膜及中膜增厚，平滑肌细胞增殖明显且排列紊乱，管腔较假手术组明显变得狭窄，同时伴有炎性细胞浸润(图 1B)；而经过亚硝酸钠治疗后肺动脉管壁增厚和管腔狭窄程度均得到明显减轻，且炎性细胞减少(图 1C)；加入 XOR 抑制剂后，肺血管重塑得到改善(图 1D、E)。



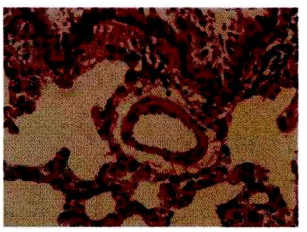
A. S 组大鼠肺动脉形态学观察



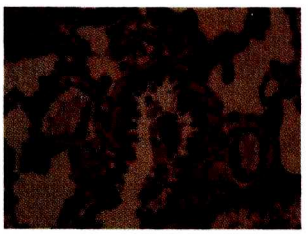
B. P 组大鼠肺动脉形态学观察



C. N 组大鼠肺动脉形态学观察



D. NX 组大鼠肺动脉形态学观察



E. X 组大鼠肺动脉形态学观察

图 1 光镜下各组大鼠肺动脉形态学观察（HE，400×）

Fig.1 Light microscope morphology of pulmonary artery observation in each group（HE，400×）

2.5 Western blot 法检测肺组织 eNOS 和 XOR 蛋白的表达

Western blot 结果显示，与 S 组比较，P 组 eNOS 蛋白含量表达降低(P=0.005)，X 组 eNOS 和 XOR 表达降低(P=0.000)；与 P 组比较，N 组 eNOS 和 XOR 蛋白含量表达增加(P=0.000)；与未添加 XOR 抑制剂组比较，添加 XOR 抑制剂组 XOR 表达降低(P=0.000)(表 3，图 2)。

表 3 Western blot 法检测各组肺组织 eNOS 和 XOR 的平均吸光度值（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3 Average positive absorbance of eNOS and XOR in each group（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	eNOS表达	XOR表达
S组	0.951 ± 0.051	1.667 ± 0.065
P组	0.794 ± 0.009^{a}	1.313 ± 0.055^{a}
N组	1.864 ± 0.065^{ab}	2.100 ± 0.100^{ab}
NX组	1.725 ± 0.058^{abc}	0.490 ± 0.053^{abc}
X组	0.311 ± 0.067^{abcd}	0.573 ± 0.055^{abc}
F 值	436.340	313.851
P 值	0.003	0.005

注：a，与 S 组比较，$P<0.05$；b：与 P 组比较，$P<0.05$；c：与 N 组比较，$P<0.05$；d：与 NX 组比较，$P<0.05$

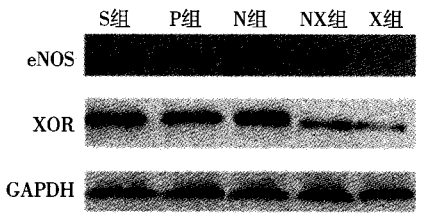


图 2 各组肺组织 eNOS 和 XOR 蛋白表达情况

Fig.2 eNOS and XOR protein expression in pulmonary tissues of rats

3 讨 论

CHD继发的肺动脉高压，其形成关键是由于左向右分流，肺血流量增加，肺血管中的血流速度增快，血流剪切力增强，引起肺血管反应性收缩。若刺激因素持续存在，正常的分子信号途径遭到破坏，导致各种细胞因子失衡，逐渐引起肺血管结构重构，最终造成不可逆性损伤[8]。通过腹主动脉-下腔静脉分流法正是模拟了这一过程。本研究在 Garcia 和 Diebold[7]的建模方式上，对高肺血流肺动脉高压大鼠模型进行了改进，进针的位置从腹主动脉右侧改为腹主动脉正上方，穿入腹主动脉后，再刺破腹主动脉-下腔静脉联合壁处，从而保证滴入粘合剂，放开动脉夹后不会因为穿刺口在侧边造成无法完全粘合的问题。

肺动脉高压的发生发展与 NO 生物活性和反应性减少有关[9]。NO 作为内皮来源的舒张因子由血管内皮持续产生并释放，是肺内一种有效的血管舒张剂[10]。吸入 NO 可以缓解血管收缩，调节细胞内的增殖反应。虽然 NO 具有良好的降低肺动脉压力的作用，但是 NO 在实际临床应用中，由于需要给患者进行气管插管和有供氧装置等特殊设备，同时要实时监测血中 NO 浓度并对其进行精确调节，因此主要应用于围术期降低肺动脉的压力，而对临床中慢性肺动脉高压患者的治疗获益不大。且 NO 作用时间较短，突然中断会造成反跳性肺动脉高压[3]。

长期以来，亚硝酸盐被认为是 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[11]。多项研究已经表明，亚硝酸钠在哺乳动物多个重要脏器的缺血/再灌注损伤模型中，具有减轻组织损伤、抗凋亡的保护作用[12]。本研究参照预实验结果及文献[13]选择亚硝酸钠的用药剂量及给药时间。本研究中所有指标的测定均是在最后一次亚硝酸钠灌胃 24 h 后，因此排除了亚硝酸钠对肺血管的急性扩张作用。

在分流型肺动脉高压中，分流使肺血流量增加，肺血管中的血流速度增快，血流剪切力增强，内皮依赖性的肺血管舒张功能受损，引起 eNOS 表达减少，eNOS 酶活性降低，受损的 eNOS 通过经典的 L-精氨酸-NOS-NO 途径产生超氧阴离子，而不是NO，继而造成 NO 生物利用度降低及氧化应激增加，导致甚至加重内皮功能的障碍[14]。本研究中，在腹主动脉和下腔静脉之间进行的分流手术使肺血流量增加，增加的肺血流量形成的血流剪切力对内皮细胞造成了损伤，使肺动脉高压组大鼠平均肺动脉压力显著增加，eNOS 表达减弱，血清 NO 含量减少，右心室肥厚指数增加，光镜下肺动脉管腔狭窄，管壁增厚，这表明高肺血流肺动脉高压大鼠模型建模成功。外源性给予少量亚硝酸盐对肺组织亚硝酸盐浓度的影响并不明显，但对血浆中亚硝酸盐的影响明显。

在连续 21 d 的时间里，每天分别给予肺动脉高压大鼠 6 mg/kg 的亚硝酸钠灌胃干预后，mPAP 显著下降；右心室肥厚指数明显下降，血清 NO 含量增加，表明肺动脉高压大鼠 mPAP 的降低和亚硝酸盐转化为 NO 产生血管扩张作用有关；亚硝酸钠在降低大鼠肺动脉压力的同时并没有引起全身低血压，这可能与 NO 对肺循环的选择性有关；亚硝酸钠治疗后 eNOS 表达增强，肺动脉管腔狭窄程度减轻，管壁变薄，减轻了肺血管重塑，减轻了内皮功能紊乱。

本研究结果表明，经过亚硝酸钠的长期干预，在不降低 MAP 的前提下，肺动脉高压大鼠的 mPAP 显著下降，右心室肥厚指数下降，显著改善了肺血管病理状态。亚硝酸钠由于其所谓的副作用不为临床医师所接受，但是基础及动物实验的结果也不容忽视。

目前体内产生 NO 的方式有经典的 L-精氨酸-NOS-NO 通路和硝酸盐-亚硝酸盐-NO 途径[15]。在正常生理状态下，NO 由经典的 L-精氨酸-NOS-NO 途径产生；而在病理情况下，L-精氨酸-NOS-NO 途径受损，由于 NOS 脱偶联无法正常产生 NO 时，在多种病理模型中已发现可通过硝酸盐-亚硝酸盐-NO 途径产生 NO，从而发挥各种有益作用[14]。但是以亚硝酸盐发挥有益治疗效果的机制是不确定的，研究认为亚硝酸盐可能通过去氧肌红蛋白、去氧血红蛋白、XOR 等方式将亚硝酸盐转化为 NO 从而产生有益作用。

XOR 的功能受氧分压调节：在正常氧分压条件下，XOR 可充当还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（reduced nicotinamide adenine dinucleotide，NADH）氧化酶的作用，催化产生超氧离子；但在缺氧条件下，NADH/NAD+比例增加，该酶可将亚硝酸盐还原成 NO[16]。在大鼠缺血再灌注损伤模型中，将 XOR 抑制

剂加到心脏灌流液中，与未加入抑制剂之前相比，心脏组织产生 NO 的量明显减少[2]，说明在缺血缺氧组织中，XOR 可能诱导了亚硝酸盐向 NO 的转化。XOR 抑制剂（别嘌呤醇）已经在心脏和肝脏疾病模型中被发现可减少亚硝酸盐向 NO 的转化[16]。经过亚硝酸钠治疗后，eNOS、XOR 蛋白表达增强，可见一方面亚硝酸钠因降低肺动脉压力，使血流剪切力对内皮细胞的损伤作用得到减轻，同时使 eNOS 蛋白表达增强，减轻内皮功能紊乱；另一方面因加入亚硝酸钠后，XOR 蛋白表达得到增强，使 NO 含量增加。加入 XOR 抑制剂后，虽然 XOR 表达减弱，NO 含量减少，但是却未阻断亚硝酸盐降低肺动脉压力的作用，同时发现单用 XOR 抑制剂可降低肺动脉压力。研究发现，XOR 抑制剂能改善心衰患者内皮细胞功能，改善其心功能和预后。将小剂量别嘌呤醇注入进行冠脉造影的扩张型心肌病患者的冠状动脉中，发现小剂量别嘌呤醇在改善患者心肌收缩功能的同时并没有增加患者的心肌耗氧量[17]。说明 XOR 抑制剂本身可能具有改善内皮细胞功能、降低动脉血压的作用。加入 XOR 抑制剂后，与未添加组比较，添加抑制剂组右心室肥厚指数差异无统计学意义，这可能与加入 XOR 抑制剂后，降低了肺动脉压力，从而减轻右心室肥厚有关，但查阅文献尚未直接发现 XOR 抑制剂具有降低肺动脉压力的作用，究其机制需要在进一步的研究中进行探讨。本研究中，XOR 抑制剂的使用没有完全阻止亚硝酸钠对肺动脉高压的降压作用，这可能与 XOR 抑制剂本身具有降低肺动脉压力的作用有关，也可能由于亚硝酸盐通过其他途径转化为 NO，比如去氧血红蛋白、去氧肌红蛋白等其他途径。

综上所述，亚硝酸钠（6 mg/kg）可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。除经典的 L-精氨酸-NOS-NO 途径以外，硝酸盐-亚硝酸盐-NO 转化途径是体内产生 NO 的另一条途径。特别是当体内环境中氧分压下降或 NOS 活性降低时，这种转化途径将会成为体内 NO 的主要来源。所以在肺动脉高压中，通过外源性补充亚硝酸盐，进而增加 NO 的产生，对肺动脉高压有很好的疗效，因此与该转化途径相关的药物极具研发价值。亚硝酸钠降低肺动脉的压力不能完全被 XOR 抑制剂阻断，可能和 XOR 抑制剂本身具有降低肺动脉压力的作用有关。亚硝酸钠转化为 NO 的机制尚需要进一步研究。

参 考 文 献

[1] Hunter CJ, Dejam A, Blood AB, et al. Inhaled nebulized nitrite is a hypoxia-sensitive no-dependent selective pulmonary vasodilator[J]. Nat Med, 2004, 10(10): 1122-1127.

[2] 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 USA, 2004, 101(37): 13683-13688.

[3] 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.

[4] Casey DB, Badejo AM Jr, Dhaliwal JS, et al. Pulmonary vasodilator responses to sodium nitrite are mediated by an allopurinol-sensitive mechanism in the rat[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 296(2): H524-H533.

[5] Zuckerbraun BS, Shiva S, Ifedigbo E, et al. Nitrite potently inhibits hypoxic and inflammatory pulmonary arterial hypertension and smooth muscle proliferation via xanthine oxidoreductase-dependent nitric oxide generation[J]. Circulation, 2010, 121(1): 98-109.

[6] Pluta RM, Oldfield EH, Bakhtian KD, et al. Safety and feasibility of long term intravenous sodium nitrite infusion in healthy volunteers[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e14504.

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

[8] 黄维佳，覃家锦. 肺动脉高压的动物模型研究[J]. 广西医科大学报，2011，28(6)：969-971.

[9] Champion HC, Bivalacqua TJ, Greenberg SS, et al. Adenoviral gene transfer of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) partially restores normal pulmonary arterial pressure in eNOS-deficient mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(20): 13248-13253.

[10] Klinger JR, Abman SH, Gladwin MT. Nitric oxide deficiency and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 188(6): 639-646.

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

[12] 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.

[13] Pankey EA, Badejo AM, Casey DB, et al. Effect of chronic sodium nitrite therapy on monocrotaline-induced pulmonary hypertension [J]. Nitric Oxide, 2012, 27(1): 1-8.

[14] Förstermann U, Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling[J]. Br J Pharmacol, 2011, 164(2): 213-223.

[15] Sparacino-Watkins CE, Lai YC, Gladwin MT. Nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in pulmonary arterial hypertension therapeutics[J]. Circulation, 2012, 125(23): 2824-2826.

[16] Cantu-Medellin N, Kelley EE. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: insights regarding where, when and how[J]. Nitric Oxide, 2013, 34: 19-26.

[17] Chirinos JA, Zamani P. The nitrate-nitrite-NO pathway and its implications for heart failure and preserved ejection fraction[J]. Curr Heart Fail Rep, 2016, 13(1): 47-59.

（责任编辑：冉明会）