

肝素通过增加细胞周期抑制因子 p27 减轻大鼠低氧性肺动脉高压

司马欣元¹ 李燕² 李大伟² 徐敦全³ 武阳^{2△}

(1 北京军区总医院门诊部 北京 100007 ; 2 北京军区总医院体检中心 北京 100007 ;

3 第四军医大学病理生理学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 研究肝素防治大鼠低氧性肺动脉高压的作用机制。**方法:** 复制慢性低氧性肺动脉高压大鼠模型, 将大鼠分为常氧对照组(Hypoxia), 常氧加肝素组(Normoxia+H), 缺氧模型组(Hypoxia)及缺氧加肝素组(Hypoxia+H)共四组。待模型复制完毕后, 测定大鼠 RVPSP 和 RV/LV+S, 然后进行组织病理分析, 测定 MA%和 MT%以确定肺动脉高压的程度。利用 Western-blot 实验与 RT-PCR 实验检测肺动脉中 p27 蛋白水平及 RNA 水平的变化。**结果:** 慢性低氧显著增加了大鼠 RVPSP、RV/LV+S、MA%和 MT%, 引起了大鼠肺动脉压力的增高、右心室肥厚和肺中小动脉的中膜增厚及外膜增生, 肝素的使用减轻了慢性缺氧条件下大鼠的 RVPSP 和 RV/LV+S, 降低了 MA%和 MT%, 有效降低了肺动脉高压、右心室肥厚, 并减轻了肺中小动脉的中膜增厚和外膜增生。Western-blot 实验发现使用肝素的缺氧组大鼠肺动脉中 p27 蛋白表达增加, 而 RT-PCR 实验发现 p27 的转录水平变化不显著。**结论:** 结果显示肝素可能通过增加 p27 的表达, 从而抑制肺动脉平滑肌细胞的增殖, 减轻了肺动脉血管的狭窄及降低了肺动脉高压。

关键词: 低氧性肺动脉高压; 肝素; 肺动脉平滑肌细胞; p27

中图分类号: Q95-3, R544.16 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2012)19-3635-04

Heparin Alleviates Hypoxic Pulmonary Hypertension Through Upregulating p27

SIMA Xin-yuan¹, LI Yan², LI Da-wei², XU Dun-quan³, WU Yang^{2△}

(1 Outpatient of Beijing Military General Hospital, 100007, Beijing, China;

2 Medical Examination Center, Beijing Military General Hospital, Beijing, 100007, China; 3 Department of Pathology and

Pathophysiology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the alleviating effects of heparin on chronic hypoxia induced pulmonary hypertension and investigate the underlying mechanism. **Methods:** Male SD rats were assigned into four groups treated with or without heparin. The different groups of rats were challenged by intermittent chronic hypoxia exposure for four weeks. Then we get the hypoxic pulmonary hypertension rat models. Subsequently, hemodynamic and pulmonary pathomorphology data were gathered. Western blotting or reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR) were adopted to test p27 changes in rat pulmonary artery. **Results:** Heparin effectively attenuated hypoxic pulmonary hypertension and elevated the expression of p27. **Conclusion:** Heparin can effectively relieve hypoxic pulmonary hypertension. The mechanism underlying the effects of heparin might be upregulation of p27.

Key words: Hypoxic pulmonary hypertension; Heparin; p27; Pulmonary artery smooth muscle cells

Chinese Library Classification: Q95-3, R544.16 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)19-3635-04

前言

低氧性肺动脉高压是许多低氧性肺疾病常见的严重并发症, 可以导致极高的发病率和死亡率, 其诊断和治疗十分困难^[1]。肺动脉血管结构重建是肺动脉高压形成的一个重要标志, 在组织病理学上表现为内膜的增生, 中膜平滑肌层和外膜纤维层的过度增生和肥大, 外周小血管的肌化和微血管丛的闭合等^[2]。肺动脉平滑肌细胞的过度增殖增生是慢性低氧导致肺动脉血

管重构过程中一个主要因素^[3]。

目前治疗肺动脉高压的手段有: 1) 吸氧; 2) 药物治疗: PEI2 和 PGE1 药物、内皮素受体拮抗剂、 α 受体阻滞剂等; 3) 手术治疗等^[4]。目前的治疗措施总体说来多以缓解症状为主, 而且多数比较昂贵。肝素作为常见的抗凝剂在临床上广泛应用, 除了它的抗凝作用外还有抑制血小板、调节血脂、抗炎、抗过敏等功能^[5,6]。Garg 等人的研究显示肝素可以抑制肺动脉平滑肌细胞的增殖^[7]。最近的研究显示肝素可以抑制低氧导致的小鼠的肺动脉高压, 并且可能有细胞周期抑制因子 p27 的参与^[8,9]。

由于细胞周期及相关蛋白的相互作用及调节对调控细胞增殖起到重要作用, 肺动脉平滑肌细胞的增殖过程的细胞周期相关蛋白可能在低氧所致的肺动脉血管重构过程中起到很重要的作用。最近多项实验提示抑制或促进某些细胞周期相关蛋白的表达可能对于治疗血管增生性疾病有作用^[10], 因此细胞周

作者简介: 司马欣元(1978-), 女, 本科, 主要研究方向: 心血管病护理、门诊护理管理 E-mail: simaxinyuan@163.com; 共同第一作者: 李燕, 硕士 E-mail: anglxu0_0@yahoo.com.cn

△通讯作者: 武阳, 电话: 18910906079,

E-mail: a60861@hotmail.com

(收稿日期: 2011-11-06 接受日期: 2011-11-30)

期相关蛋白有可能作为未来治疗血管增生性疾病的靶点。细胞周期是由周期蛋白依赖激酶和由它调节的特定的细胞周期蛋白所调控。周期蛋白依赖激酶抑制因子包括 INK4 和 cip 家族, INK4 和 cip 家族的成员可以抑制周期蛋白激酶和周期蛋白形成的复合物的活性^[1]。INK4 家族成员包括 p15、p16、p18 及 p19 蛋白,它们可以抑制 CDK4/6 和与其形成的复合物的活性。第二种的 cip/kip 家族抑制因子包括 p21、p27 和 p57 蛋白,它们发挥抑制作用需要以周期蛋白和周期蛋白依赖激酶形成复合物为前提,并且在体外试验中可以抑制所有的周期蛋白/周期蛋白依赖激酶复合物。cip/kip 家族中以 p21 和 p27 的作用最为重要,它们对周期蛋白与周期蛋白依赖激酶形成的复合物具有广泛的抑制作用。

由于肝素可以抑制小鼠低氧性肺动脉高压,我们以大鼠为模型进一步验证肝素降低肺动脉高压过程中是否有 p27 的参与,并进一步探讨了其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

由第四军医大学动物中心提供的健康成年雄性 SD 大鼠(180-200g)32 只,根据实验需要将大鼠随机分为四个组,即缺氧对照组(Hypoxia 组, n=8),低氧+肝素(上海通用药业股份有限公司)组(Hypoxia+H 组, n=8),常氧组(Normoxia 组, n=8)和常氧+肝素组(Normoxia+H 组, n=8)。低氧+肝素组每天缺氧前腹腔注射给予肝素(100 μg/Kg),与缺氧对照组同时置于低氧舱内,使舱内压力保持在 375 mmHg(50Kpa, O₂ 浓度约为 10%,相当于海拔 5574 米处的空气浓度),每天 10 小时,连续缺氧 28 天;常氧+肝素组每天同样腹腔注射给予肝素(100 μg/Kg)和常氧组置于海拔 400 米(西安市区的海拔高度)环境中饲养,所有动物饲养在 12:12 小时昼夜环境中,可自由获得水和食物。

1.2 实验数据采集

1.2.1 血流动力学与心肺指标测定 各实验组大鼠经 28 天缺氧/常氧条件下的饲养期满后,用 20%的乌拉坦(4 mL/Kg)麻醉动物后经颈外静脉插管,测定右心室收缩压力(RVSP)代替肺动脉压,经颈总动脉插管测定平均颈总动脉压(mCAP),插管后稳定 30 分钟,记录系统记录数据。实验结束后,打开胸腔取出大鼠心肺组织,仔细分离肺动脉,准备下一步的实验。将心脏用 PBS 洗去血液放入 10%福尔马林溶液中固定 72 小时后剪去心房组织,沿室间隔边缘分离出右心室(RV)和左心室+室间隔(VL+S),用滤纸吸干水分后称量 RV 和 VL+S 的重量,以 RV/(VL+S)比值来反映右心室肥厚程度。剪取左下肺叶 10%福尔马林固定,剩余肺组织放入 -70℃冰箱中冷冻保存。

1.2.2 组织病理学指标测定 从左肺下叶取相同位置的肺组织块固定后常规石蜡包埋,连续切片,HE 染色,光镜下观察肺小动脉形态学变化。病理学专家以双盲法测量肺小动脉(直径小于 100 μm)的半径、血管壁厚度、血管横截面积、血管壁横截面积,然后分别计算血管壁厚度占血管半径的百分比(MT%),血管壁横截面积占血管总横截面积的百分比(MA%),反映肺小血管管壁增厚程度。每只大鼠的肺切片在连续 5 个视野寻找 5-7

条肺小动脉,每组总计 40 条小血管作为肺动脉重塑指标进行统计学分析。

1.2.3 Western blot 实验 取各组 -70℃冷冻保存的大鼠肺动脉 100 mg,冷的 PBS 洗涤去除残留的血液,加入 1 mL 的 RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司),裂解液中提前加入 100 μL PMSF,再加入 20 μg 的氟化钠(蛋白酶抑制剂)匀浆器充分匀浆,置冰上数分钟,反复研磨使组织充分裂解。30 min 后用移液器将组织裂解后的液体移至 1.5 mL 离心管中,12000 rpm 离心 5 min,取上清保存,Bradford 法测定蛋白浓度。12%的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,半干法转移蛋白至 NC 膜。10%脱脂奶粉溶液封闭(TBST 液稀释),一抗 4℃孵育过夜;结合 HRP 的二抗 37℃孵育 2 小时,ECL 发光试剂盒显影。使用的一抗包括 p27kip1 单克隆抗体(1:1000, Millipore, Bedford, US-A)和内参 β-actin 单克隆抗体(1:10000, Millipore, Bedford, US-A)。Western blot 实验重复 3 次。

1.2.4 RT-PCR 实验 使用 RNA 提取液(TRIZOL Invitrogen 公司)提取各组肺动脉的 RNA,两步法 RT-PCR 试剂盒(M-MLV)购自贝博公司。大鼠 P27 正义链为 5'CTTGGA-GAAGCACTGCCGAGAT3',反义链为 5'CCCTGGACACT-GCTCCGCTA3',扩增产物为 319bp,PCR 扩增程序按 95℃变性 30 秒,51℃退火 30 秒,72℃延伸 1 分钟,总共 35 个循环进行;内参为 β-actin,正义链为 5'ATCATGTTTGAGAC-CTTCAACA 3',反义链为 5'CATCTCTTGCTCGAAGTCCA 3',扩增产物为 270bp,PCR 扩增程序按 95℃变性 30 秒,55℃退火 30 秒,72℃延伸 1 分钟,总共 35 个循环进行。取 10 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶(浓度 1%)电泳,凝胶中预先加入终浓度为 0.5 μg/ml 的溴化乙锭,凝胶成像系统紫外光成像并拍照记录。P27 的 mRNA 含量分以其灰度值与 β-actin 灰度值相比表示。PCR 实验重复 3 次。

1.3 统计分析

数据以 ± SD 表示,使用 Spss 16.0 分析,组内及组间两两比较采用 LSD-T 检验。对不满足正态和方差齐性条件的,组内及组间采用 Dunnett's C 检验。以 P < 0.05 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 肝素对各组大鼠血流动力学和右心室肥厚指数的影响

低氧对照组右心室收缩期压力(RVSP)(45.01 ± 4.40 mmHg)较常氧组(26.44 ± 2.57 mmHg)明显增高(P < 0.01),提示慢性低氧造成了显著的肺动脉高压。低氧+肝素组 RVSP(30.02 ± 1.76 mmHg)较低氧对照组(45.01 ± 4.40 mmHg)明显降低(P < 0.01),显示肝素可以明显减轻慢性低氧引起的肺动脉高压。各组间 mCAP 无明显差异。同时低氧组的右心室肥厚指标(51.36 ± 6.00)显著高于常氧组(28.78 ± 3.41, P < 0.01),提示慢性低氧导致右心室明显增厚,低氧+肝素干预组右心室肥厚指标(31.13 ± 2.67)明显低于低氧对照组(39.36 ± 6.00, P < 0.01)。低氧+肝素组 RVSP 依然比常氧组和常氧+肝素组高,同时低氧+肝素组右心室肥厚指数比常氧组和常氧+肝素组高(表 1)。

2.2 肝素对各实验组大鼠肺小动脉形态的影响

经 HE 染色后观察(图 1),常氧组与常氧+肝素组肺组织

表 1 肝素对 HPH 大鼠血流动力学指标和右心室肥厚指数的影响

Table 1 Heparin effects on rat hemodynamic index and RVHI

分组(Group)	mCAP(mmHg)	RVPSP(mmHg)	(RV/LV+S)%
常氧组(Normoxia)	119.06± 8.30	26.44± 2.57	28.78± 3.41
常氧+肝素组(Normoxia+H)	118.37± 6.52	26.16± 1.86	28.61± 2.85
低氧组(Hypoxia)	124.24± 3.31	45.01± 4.40*	39.36± 6.00*
低氧+肝素组(Hypoxia+H)	118.6± 9.82	30.02± 1.76#	31.13± 2.67#

注 数据以 ± SD 表示, n=8。*P<0.01, 与常氧组比较; #P<0.01, 与低氧组比较。

Note: Data are expressed as ± SD, n=8. *P<0.01, compared with Normoxia group; #P<0.01, compared with Hypoxia group.

结构均正常 肺小动脉内膜完整平滑 肌层无增厚,说明常氧条件下肝素对大鼠的肺组织结构无影响;低氧组可见肺泡腔水肿 点、片状渗出、出血 肺小动脉管壁和平滑肌层明显增厚 管腔狭窄变形,有的近乎闭塞,低氧+肝素组的肺形态学变化比低氧组较轻 表现为 肺泡腔散在炎性细胞及渗出物,肺小动脉厚度有一定程度的增加,管腔呈部分狭窄(图 1 A)。肺小动脉

MA%和 MT%值也呈相同变化趋势(图 1, B、C),常氧组与常氧+肝素组无明显差别,低氧组的肺小动脉 MA%和 MT%显著高于常氧组(P<0.01),提示低氧导致大鼠肺小动脉管壁增厚,管腔狭窄;低氧+肝素组大鼠肺小动脉 MA%和 MT%显著低于低氧组(P<0.01),但是与常氧组相比,则不能完全防止低氧引起的 MA%和 MT%的增高(P<0.01)。

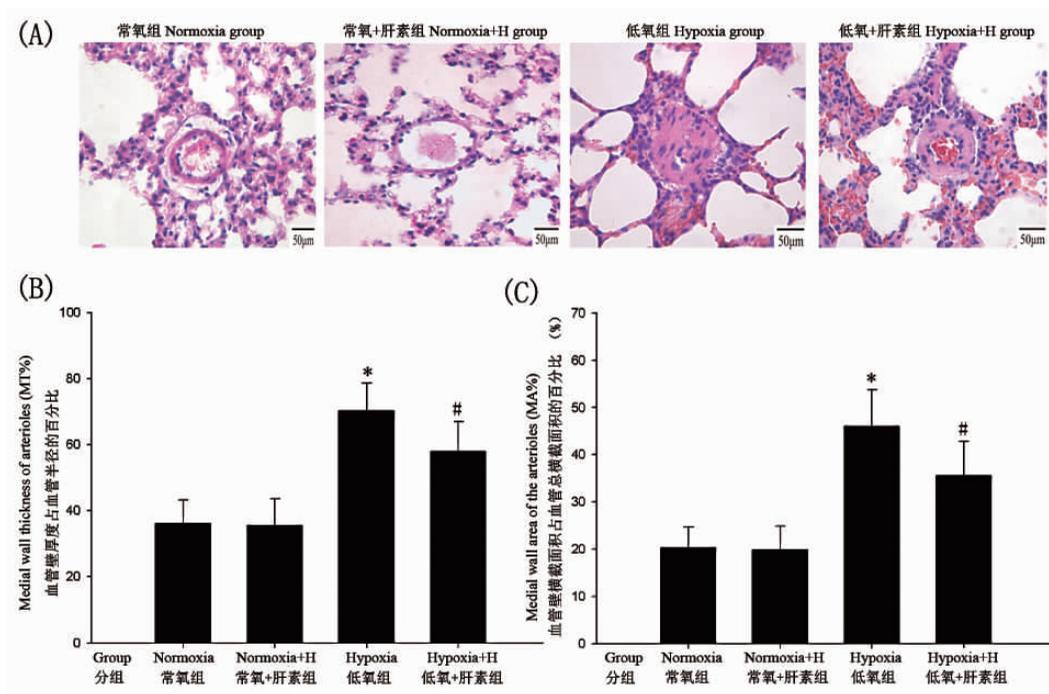


图 1 肝素对各组大鼠肺小动脉形态的影响(HE 染色)

Fig. 1 Hematoxylin-eosin staining of arterioles of rats

注 数据以 ± SD 表示, n=40。*P<0.01, 与常氧组比较; #P<0.01, 与低氧组比较。图片上的标尺为 50 µm。

MT%:血管壁厚度占血管半径的百分比, MA%:血管壁横截面积占血管总横截面积的百分比。

Note: Data are expressed as ± SD, n=40. *P<0.01, compared with Normoxia group; #P<0.01, compared with Hypoxia group.

The scale bars is 50 µm. MT%: Medial wall thickness of arterioles; MA%: Medial wall area of arterioles.

2.3 肝素对慢性缺氧大鼠肺动脉 p27 蛋白表达的影响

为确定 p27 是否参与了缺氧导致的肺动脉平滑肌细胞的增殖,我们进行了 Western blot 实验。如图(2A)所示,Western blot 实验结果显示低氧组 p27 蛋白水平明显低于常氧组(P<0.01),而经肝素处理的缺氧组 p27 蛋白水平明显高于单纯缺氧组(P<0.01)。

2.4 肝素对慢性缺氧大鼠肺动脉 p27mRNA 表达的影响

为确定肝素对缺氧慢性缺氧条件下的大鼠肺动脉 p27

mRNA 水平的影响,我们进行了 RT-PCR 实验。如图(2B)所示,各实验组大鼠肺动脉 p27 的 mRNA 水平没有显著变化。

3 讨论

肺动脉高压的两个典型特征是肺动脉血管收缩和肺小动脉血管的重塑,肺动脉平滑肌层的肥厚增生是肺小动脉结构重塑的最主要的病理变化^[1,2]。肺动脉高压的确切机制极为复杂并且至今仍然没有被完全阐明^[3]。肺动脉高压伴随的肺动脉平滑

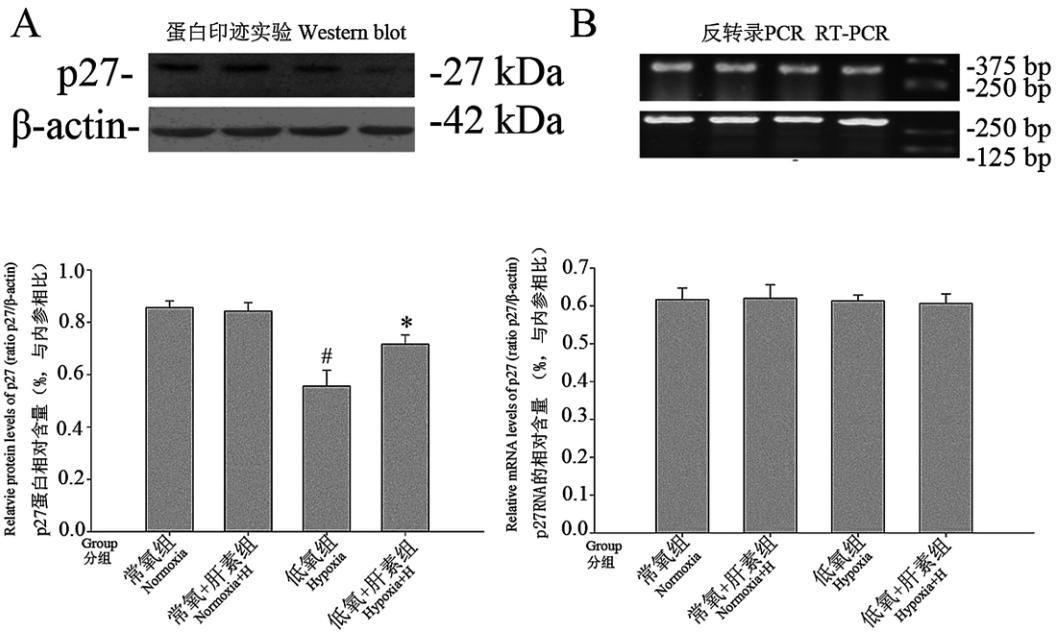


图 2 Western blot 实验与 RT-PCR 实验

Fig. 2 Western blot and RT-PCR assays for expression of p27

数据以 ± SD 表示 n=3。*P<0.01, 与低氧组比较; #P<0.01, 与常氧组比较。

Note: Data are expressed as ± SD, n=3. *P<0.01, compared with Hypoxia group; #P<0.01, compared with Normoxia group.

肌层的肥厚增生主要是由于肺动脉平滑肌细胞的增殖所导致。因此,肺动脉高压治疗策略之一就是抑制肺动脉平滑肌细胞的增殖,进而减轻或逆转肺小动脉血管的重塑,从而降低肺动脉压。

P27 是主要的细胞周期抑制因子之一,通过对周期蛋白与周期蛋白依赖激酶形成的复合物发挥广泛的抑制作用进而抑制细胞周期的 G1/S 期的转换,从而发挥抑制细胞增殖的作用。P27 作为重要的细胞周期抑制因子和抑癌基因蛋白被广泛关注。关于 p27 对肿瘤及血管增殖性疾病的抑制作用的研究已经开展^[12,13]。有研究表明 p27 参与抑制动脉粥样硬化过程中的血管新生、减轻狭窄程度和血管平滑肌的增殖^[14,15]。

我们的实验结果显示 p27 可能参与了肝素对低氧肺动脉高压大鼠的防治作用。在实验中,慢性低氧导致了显著的右心室收缩压的升高、明显的右心室肥厚指数的增加和明显的肺小动脉的增厚。Western blot 实验结果表明,肝素处理的低氧组 p27 蛋白水平明显高于单纯缺氧组。形态学结果显示肝素减轻了肺动脉血管的重构,降低了右心室肥厚,减轻了肺小动脉肌层的肥厚。有趣的是,我们的 RT-PCR 结果显示低氧对 p27 的转录水平没有显著影响,应用肝素对 p27 的转录水平也没有明显影响。这提示肝素上调 p27 的表达可能是通过另外的途径,而不是转录后表达增加。而 Yu 等人发现低氧情况下小鼠肺组织的 p27 的转录水平也有变化^[8],我们认为这个差异可能是由于实验动物的不同所造成的。

总之,我们的结果显示肝素可能通过增加 p27 的表达从而发挥抑制低氧性肺动脉高压过程中肺动脉平滑肌的增生,进而减轻了肺小动脉的重构及阻力,降低了肺动脉高压。但肝素降低肺动脉高压的确切机制以及对内皮细胞功能的影响都有待进一步研究。

我们的研究表明,肝素可以通过增加 p27 的表达而发挥降低肺动脉高压的作用,这可能是肝素的心血管保护作用的机制

之一。因此,以通过增加 p27 的表达为策略可能为防治肺动脉高压提供新的思路。

参考文献(References)

- [1] Hibbert, B. Pulmonary hypertension [J]. Can J Cardiol, 2010, 26(5): 176-177
- [2] Rubin, L.J. Primary pulmonary hypertension [J]. N Engl J Med, 1997, 336(2):111-117
- [3] Prabha, M. Mechanisms responsible for pulmonary hypertension [J]. Chin Med J (Engl), 2008, 121(24):2604-2609
- [4] Galie, N. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension [J]. Eur Respir J, 2009, 34(6): 1219-1263
- [5] 张治云. 低分子肝素药理作用研究进展 [J]. 食品与药品, 2006, 8(1A):7-9
Zhang Zhi-yun. Progress in pharmacologic action of low molecular weight heparin [J]. Food and drug, 2006,8(1A):7-9
- [6] 马艳, 杨育红. 低分子肝素的药理作用研究进展 [J]. 中国误诊学杂志, 2008, 8(5):1027-1028
Ma Yan, Yang Yu-hong. Advancement in the pharmacologic effects of low molecular weight heparin [J]. Chin J Misdiag, 2008, 8(5): 1027-1028
- [7] Garg, H.G., B.T. Thompson and C.A. Hales, Structural determinants of antiproliferative activity of heparin on pulmonary artery smooth muscle cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279(5): 779-789
- [8] Yu, L. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1, but not p21WAF1/Cip1, is required for inhibition of hypoxia-induced pulmonary hypertension and remodeling by heparin in mice [J]. Circ Res, 2005, 97(9):937-945
- [9] Yu, L. Gene expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and effect of heparin on their expression in mice with hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 345(4):1565-1572

(下转第 3656 页)

- therapy in the treatment of wounds in home healthcare Medicare patients[J]. *Ostomy Wound Manage*,1999,45(11):41-50
- [10] 张挺. 负压封闭引流技术治疗皮肤软组织缺损的初步临床分析 [D]. 中国医科大学 中国医科大学,2009
Zhang Ting. The clinical analysis of vacuum sealing drainage therapy in treating the skin and soft tissue absent [D]. China Medical University China Medical University,2009
- [11] Leininger B E, Rasmussen T E, Smith D L, et al. Experience with wound VAC and delayed primary closure of contaminated soft tissue injuries in Iraq[J]. *J Trauma*,2006,61(5):1207-1211
- [12] Kolios L, Kolios G, Beyersdorff M, et al. Cost analysis of Topical Negative Pressure (TNP) Therapy for traumatic acquired wounds[J]. *Ger Med Sci*,2010,8:c13
- [13] 王洪,罗怀灿,杨述华,等. 封闭式负压吸引技术治疗四肢骨筋膜室综合征[J]. *中华创伤骨科杂志*,2003,5(4):342-343
Hong Wang, Huai-can Luo, Shu-Hua Yang, et al. Treatment of osteofascial compartment syndrome with closed negative pressure sucking technique[J]. *Chinese Journal of Orthopaedic Trauma*,2003,5(4):342-343
- [14] Hiskett G. Clinical and economic consequences of discharge from hospital with on-going TNP therapy: a pilot study[J]. *J Tissue Viability*,2010,19(1):16-21
- [15] Medina N D, Kovach S R, Levin L S. An evidence-based approach to lower extremity acute trauma [J]. *Plast Reconstr Surg*,2011,127(2):926-931

(上接第 3638 页)

- [10] Charron, T., N. Nili and B.H. Strauss, The cell cycle: a critical therapeutic target to prevent vascular proliferative disease [J]. *Can J Cardiol*,2006,22 Suppl B:41B-55B
- [11] Sherr, C.J. and J.M. Roberts, CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression [J]. *Genes Dev*,1999,13(12):p. 1501-1512
- [12] Fouty, B.W. p27 (Kip1) is important in modulating pulmonary artery smooth muscle cell proliferation [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001,25(5):652-658
- [13] Abukhdeir, A.M. and B.H. Park, P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance [J]. *Expert Rev Mol Med*,2008,10: p. e19-21
- [14] Van Tiel, C.M., et al. p27kip1-838C>A single nucleotide polymorphism is associated with restenosis risk after coronary stenting and modulates p27kip1 promoter activity [J]. *Circulation*,2009,120(8): p. 669-676
- [15] Diez-Juan, A.. Role of the growth suppressor p27Kip1 during vascular remodeling [J]. *Curr Vasc Pharmacol*,2003,1(1):99-106