

• 基础研究 •

内皮素双受体拮抗剂在实验性急性肺栓塞中的应用研究

贾一新 李简

【摘要】 目的 观察静脉内皮素双受体拮抗剂 RO2610612 在急性肺栓塞中的应用效果,研究内皮素与急性肺栓塞的关系。方法 12 只健康杂种犬随机分为对照组和实验组,每组 6 只。两组所有动物给予戊巴比妥静脉麻醉后分别于颈静脉插入热稀释漂浮导管连接生理监护仪;气管内插入气管插管连接呼吸描记器。采集栓塞前数据后于颈静脉注射自体血栓建立急性肺栓塞动物模型。实验组建立模型后 1h 开始持续静滴 RO2610612 $0.2\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})$,对照组同时输入等量生理盐水。对照组及实验组所有动物于栓塞前、栓塞后 1,2,4,6h 记录体、肺循环血流动力学指标、呼吸生理指标;取股动脉血 3ml,采用放射免疫法测定动脉血内皮素-1 水平,并测动脉血气。结果 两组动物栓塞后较栓塞前血浆内皮素-1 水平、肺动脉平均压、肺血管阻力、呼吸频率、动脉血二氧化碳分压和肺气道阻力显著性升高($P<0.05$),心输出量、动脉血氧分压和肺动态顺应性显著性下降($P<0.05$)。实验组于栓塞 2h 后肺动脉平均压、肺血管阻力、呼吸频率、肺气道阻力升高水平显著性低于同时期对照组($P<0.05$),血浆内皮素-1 水平、心输出量、和肺顺应性显著性高于对照组($P<0.05$)。结论 在急性肺栓塞病理过程中,内皮素参与了肺循环阻力升高与肺气道阻力升高和肺顺应性下降的形成。内皮素受体拮抗剂拮抗内皮素与其受体的结合,在急性肺栓塞中,可以减缓肺循环阻力、肺气道阻力的上升,因而可能成为急性肺栓塞临床治疗的新手段。

【关键词】 肺栓塞;内皮缩血管肽类;内皮缩血管肽受体拮抗剂

The application of a dual receptor antagonist of endothelin in experimental acute pulmonary embolism

JIA Yixin*, LI Jian

* Cardiac Surgery Department, Beijing An Zhen Hospital, Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100029, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of application of RO2610612, a dual receptor antagonist of endothelin (ET), on experimental acute pulmonary embolism (APE), and to study the relation between endothelin and APE. Methods Twelve dogs were randomly assigned to a control group ($n=6$) and a RO2610612 group ($n=6$) and anesthetized with pentobarbital sodium. For each animal, a thermolabile balloon-tipped pulmonary artery catheter was inserted into the left external jugular vein and connected to a physiological monitor. A polyethylene cannula was intubated into the trachea and connected to a pneumotachograph. After measuring the parameters before embolization, the autologous blood clot was injected to the right jugular vein of each dog to establish the animal model. For experimental group, RO2610612 was injected ivgtt with the dose of $0.2\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ 1 h after APE, while for control group the same amount of saline was given. Pulmonary and systemic hemodynamic parameters, respiratory physiological parameters, arterial blood, ET-1 concentration and arterial blood gas analysis were determined before embolization and 1,2,4,6 h after embolization. Results Plasma ET-1 levels, mean pulmonary arterial pressure (MPAP), pulmonary vascular resistance (PVR), respiratory rate (RR), pulmonary airway resistance (R_L) and arterial carbon dioxide pressure (PaCO_2) increased ($P<0.05$), while the cardiac output (CO), the arterial blood oxygen pressure (PaO_2) and the dynamic compliance of the respiratory system (C_{dyn}) decreased significantly after embolization in both groups compared with the data before embolization ($P<0.05$). In RO2610612 group, MPAP, PVR, RR, R_L were significantly lower compared with the control group ($P<0.05$), ET-1 levels, CO and C_{dyn} were significantly higher compared with

收稿日期:2006-04-29

作者单位:100029 北京市,首都医科大学附属北京安贞医院心外科(贾一新);100003 北京市,北京大学第一医院胸外科(李简)

作者简介:贾一新,男,1975年8月生,辽宁省沈阳市人,在读博士研究生,住院医师。E-mail:jason.jia@163.com

the control group ($P < 0.05$) 2 h after embolization. **Conclusion** Endothelin partially contributes to the hemodynamic derangement and the bronchoconstriction of APE. A dual receptor antagonist of endothelin can attenuate the increase in the pulmonary vascular resistance and pulmonary airway resistance and might serve as a useful therapeutic drug for APE.

【Key words】 pulmonary embolism; endothelin; endothelin receptor antagonist

急性肺栓塞(acute pulmonary embolism, APE)是内源性或外源性栓子堵塞肺动脉或分支引起肺循环障碍和肺通气功能障碍的临床综合征。其死亡率可达 23%~38%,占死亡原因的第三位,仅次于肿瘤和心肌梗死^[1]。在 APE 发生的过程中,肺血管阻力增大,肺动脉压力升高,右心室通过增加收缩力和做功来维持肺循环血量。如栓塞发生急促或面积较大,则右心失代偿,可迅速发生右心衰竭而致死亡。尽管机械梗阻是直接的致病因素,但人们仍然确信一些体液因子的产生、释放和作用加重了其病理发展^[2,3]。

内皮素(endothelin, ET)为 1985 年 Hickey 等^[4]发现的一种生物活性肽,有着广泛的生理作用。其主要效能是收缩血管平滑肌,并具有强大的收缩支气管以及促血管平滑肌增殖作用。缺氧,凝血酶,血管牵拉,儿茶酚胺等多种因素均可促进内皮细胞合成与释放 ET^[5]。目前发现的 ET 有 ET-1、ET-2、ET-3 和血管活性肠收缩肽 4 种。其生物活性以 ET-1 最强。ET-1 主要分布于心血管、脑、肺、肝、肾及胃肠等器官,以肺内含量最高。ET-1 是目前已知的最强的缩血管物质。近年来的研究表明 ET-1 参与多种心血管疾病如高血压、心衰、肺栓塞、慢性阻塞性肺病等的病理生理过程。在缺氧性肺动脉高压的形成中,ET-1 也起到了关键性的作用^[6]。ET 通过与 ET 受体结合而发挥其生物学效能,因而内皮素受体拮抗剂也日益成为治疗内皮素相关疾病的研究热点。我们观察了肺栓塞前后实验动物血浆内皮素水平的变化及循环动力学和呼吸生理学指标,并利用内皮素受体拮抗剂 RO2610612 阻断 ET-1 与其受体的结合,借以探讨 ET-1 在 APE 中发挥的病理生理作用,并尝试应用内皮素受体拮抗剂治疗 APE 的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验动物准备 健康杂种犬 12 只,体重 13~19 kg(平均 16.6 kg)。随机分为 2 组:对照组和实验组,每组 6 只,雌雄不限。5%戊巴比妥钠耳缘静脉注射麻醉,剂量为 0.6 ml/kg。麻醉后仰卧位固定于手术台。右股处剪毛后,碘伏消毒,暴露股动脉,置入 20G 套管针用于心率、动脉血压的持续监测和血

液标本的采集。气管内插入气管插管,另一端经传感器(Fleisch,荷兰)与呼吸流速仪(Godart,荷兰)相连测定潮气量和气体流速。经口插注水聚乙烯导管至食管中段,连接压力换能器,测量食管胸腔段内压替代胸腔内压。颈部剪毛后,碘伏消毒,暴露左颈外静脉,插入 7F 标准三腔漂浮导管,另一切口插入 7F 导管,深度为 15~18 cm 至右心房。

1.2 血栓制备及注入 在无菌条件下,自股动脉取血 40 ml,加入 400 U 凝血酶后于平皿内混匀,室温下静置约 1 h,形成血栓,将血栓剪成直径 3 mm,长 5 mm 圆柱形备用。栓塞前标本及数据采集完毕后,经 7F 导管缓慢注入先前制备的血栓 5~10 min,直至肺动脉平均压达到 45 mmHg。快速推注生理盐水 10 ml 以防栓子滞留于导管或颈静脉内。

1.3 标本、观察数据采集 实验组于栓塞后 1 h 经 7F 导管给予 RO2610612 0.2 mg/(kg·h)泵入,对照组给予同等量生理盐水。每只动物分别于栓塞前、栓塞后 1, 2, 4, 6 h 记录心率(heart rate, HR)、动脉平均压(mean arterial pressure, MAP)、肺动脉平均压(mean pulmonary arterial pressure, MAP)、肺毛细血管嵌压(pulmonary capillary wedge pressure, PCWP)、心输出量(cardiac output, CO)、呼吸频率(respiratory rate, RR)、潮气量、气体流速、胸内压。取股动脉血 1 ml,用于测定动脉血气,记录氧分压(arterial oxygen pressure, P_{aO_2})和二氧化碳分压(arterial carbon dioxide pressure, P_{aCO_2}),另取股动脉血 2 ml 加入有 4000 IU 抑肽酶和抗凝剂试管中,3000 rpm 离心 10 min 后取上清冷冻备检,测定 ET-1 的浓度。血清中 ET-1 浓度测定用放射免疫非平衡法测定(放射免疫测定试剂盒购自东亚免疫技术研究所,放免计数器为上海日环仪器厂 FMJ-182 型免疫 γ -计数器)。

1.4 数据处理 计算肺血管阻力(pulmonary vascular resistance, PVR),计算公式为: $PVR = MPA - PCWP / CO$,单位为 mmHg/(min·L)。采用 Amdur 和 Mead 方法^[7]计算肺气道阻力(resistance of lung, R_L)和肺顺应性(dynamic compliance of the respiratory system, C_{dyn})。采用 SPSS10.0 软件处理统计数据。测定值用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验,栓塞前后用

配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组实验动物血浆内皮素水平的变化 两组实验动物血浆 ET-1 水平在栓塞后 1h 内较栓塞前显著性升高 ($P < 0.05$), 对照组于栓塞 1h 后达到较为稳定的水平。实验组栓塞后 ET-1 水平持续升高, 栓塞 2h 后与同时期对照组 ET-1 水平比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 两组实验动物循环动力学指标的变化 两组实验动物的 HR、MAP、PCWP 栓塞前后各时间段

数据的比较无统计学差异。两组动物 MPAP、PVR 在栓塞 2h 后各时段较栓塞前均显著性升高 ($P < 0.05$)。对照组 PVR 随时间有上升趋势, 实验组 PVR 栓塞 2h 后有下降趋势, 栓塞 2h 后各时段 PMAP、PVR 与对照组两指标比较低, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。两组动物 CO 于栓塞后各时段较栓塞前显著降低 ($P < 0.05$), 对照组有持续下降趋势, 实验组在栓塞 2h 后各时段较对照组比较高, 其差异有显著性 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 两组实验动物呼吸生理指标的变化 表 3 表明两组实验动物的动脉血 PaO_2 在栓塞后较栓塞前

表 1 两组实验动物血浆 ET-1 变化水平

组别	栓塞前	栓塞后			
		1h	2h	4h	6h
对照组	20.6±6.3	24.9±5.6*	25.9±10.7*	24.6±8.7*	25.2±7.0*
实验组	19.8±7.4	25.3±14.9*	41.5±19.8*#	46.7±23.8*#	49.3±37.2*#

注: ET-1 浓度单位: pg/L; 与栓塞前比较, * $P < 0.05$, 与同时期对照组比较, # $P < 0.05$ 。

表 2 两组实验动物循环动力学指标变化水平

组别	指标	栓塞前	栓塞后			
			1h	2h	4h	6h
对照组	HR	128±11	141±10	148±8	147±13	142±9
实验组		129±7	141±11	134±12	137±15	132±10
对照组	MAP	127±12	134±13	131±12	139±14	138±13
实验组		128±14	138±7	137±12	131±11	129±8
对照组	MPAP	12±1	25±6*	26±4*	28±5*	26±7*
实验组		12±2	25±4*	20±3*#	21±2*#	18±5*#
对照组	PCWP	4±1	5±1	6±1	4±1	5±1
实验组		4±1	5±1	5±0	5±1	4±1
对照组	CO	3.3±0.3	2.3±0.3*	2.2±0.2*	1.9±0.3*	1.8±0.2*
实验组		3.3±0.3	2.4±0.3*	2.8±0.5*#	2.6±0.3*#	2.7±0.2*#
对照组	PVR	2.71±0.23	7.42±0.77*	8.90±1.35*	10.82±1.58*	11.27±2.83*
实验组		2.74±0.24	7.34±0.82*	6.76±2.57*#	6.78±1.49*#	5.51±1.39*#

注: HR 单位: 次/min; AP、PAP、PCWP 单位: mmHg; CO 单位: L/min; PVR 单位: mmHg/(min·L); 与栓塞前比较, * $P < 0.05$, 与同时期对照组比较, # $P < 0.05$ 。

表 3 两组实验动物呼吸生理指标变化水平

指标	组别	栓塞前	栓塞后			
			1h	2h	4h	6h
对照组	RR	22±2	44±4*	43±6*	41±4*	44±5*
实验组		21±3	46±7*	34±5*#	32±5*#	32±6*#
对照组	PaO_2	91±5	58±8*	63±9*	67±8*	71±7*
实验组		88±6	62±6*	67±4*	72±5*	73±7*
对照组	PaCO_2	36±1	52±6*	57±4*	52±5*	51±3*
实验组		37±2	55±4*	50±3*#	51±2*	48±5*
对照组	R_L	0.62±0.04	2.38±0.17*	2.34±0.19*	2.49±0.22*	2.48±0.16*
实验组		0.63±0.06	2.49±0.21*	1.23±0.15*#	1.07±0.13*#	1.03±0.09*#
对照组	C_{dyn}	16.7±2.2	8.6±1.7*	8.9±2.3*	7.8±2.5*	7.2±2.8*
实验组		17.1±2.0	9.1±1.8*	12.2±2.5*#	12.7±3.4*#	14.5±2.3*#

注: RR 单位: 次/min; PaO_2 、 PaCO_2 单位: mmHg; R_L 单位: $\text{cmH}_2\text{O}/(\text{L} \cdot \text{s})$; C_{dyn} 单位: $\text{ml}/\text{cmH}_2\text{O}$; 与栓塞前比较, * $P < 0.05$, 与同时期对照组比较, # $P < 0.05$ 。

显著降低($P < 0.05$), PaCO_2 显著升高($P < 0.05$), 栓塞后各时段无统计学差异。两组 RR 和 R_L 栓塞后较栓塞前显著升高($P < 0.05$), 实验组栓塞 2h 后各时段数据显著性低于对照组($P < 0.05$)。两组 C_{dyn} 于栓塞后较栓塞前显著下降, 对照组随时间有下降趋势, 实验组栓塞 2h 后各时段数据较对照组为高, 其差异有显著性($P < 0.05$)。

3 讨论

ET 作为继血管紧张素之后发现的最重要的血管活性物质, 自 1988 年由日本学者 Yanagisawa 等^[8]首次由猪主动脉内皮细胞分离提取后, 受到了广泛的关注和研究。所有的 ET 均与 ET 受体结合而发挥其生理作用, ET 受体有 ET_A 受体和 ET_B 受体两种, 位于血管平滑肌细胞的两种受体均介导缩血管作用, 而位于内皮细胞上的 ET_B 受体通过 NO 和前列腺素的释放介导血管舒张作用, 有人把前者称为 $\text{ET}_{\text{B}2}$ 受体, 后者称为 $\text{ET}_{\text{B}1}$ 受体^[9]。研究表明, ET_A 受体对人血管收缩的相对贡献比 ET_B 受体大两个数量级。在肺循环, ET 主要表现为缩血管作用。位于支气管平滑肌细胞的 ET 受体 80%~85% 为 $\text{ET}_{\text{B}2}$ 受体, 介导支气管收缩作用^[10]。基于此原理, 我们尝试用非选择性 $\text{ET}_{A/B}$ 双受体拮抗剂 RO2610612 来进行实验。

以往的研究证明, 在 APE 中, 在急性栓塞血管的局部, 血流淤滞, 缺氧, 免疫复合物沉积, 血小板附着和积聚, 激活凝血反应链, 血栓素、转化生长因子- β 、血管紧张素、内毒素、血管加压素的释放等原因刺激了 ET-1 的产生和释放使 ET-1 的局部表达和血浆水平显著升高。本实验中应用 ET 受体拮抗剂阻断了 ET-1 与 ET 受体的结合, 使血液中游离的 ET-1 水平升高。但可能是由于排出障碍或清除增加的原因, 使血浆内皮素并未立即达到很高水平。

在 APE 后, 由于机械梗阻的直接作用和一些神经体液因子, 包括 ET-1 与肺血管平滑肌上 ET_A 受体结合后的肺血管收缩作用, 使肺循环阻力增大, 表现为 MAP、PVR 的上升, CO 的下降。另外, ET-1 又可引起内皮细胞 VonWillebrand factor 的表达^[11], 后者是导致血小板附着和集聚的一种蛋白, 从而增加了血栓的形成, 进一步增加了机械梗阻的因素。ET-1 还可能使栓塞部位的血管痉挛, 阻碍栓子向下一级血管移动。另一实验证明了由肺源产生的 ET 随血流进入冠状动脉系统, 造成心脏功能不

全和血液动力学的恶化^[12]。ET 还可与其他一些血管活性物质协同作用, 如加强去甲肾上腺素的作用、促进血栓素 A_2 的合成^[13], 这些都是 APE 后循环动力学紊乱的病理基础。因此在实验组, 阻断 ET-1 的作用可以明显改善循环血流动力学, 证实了 ET-1 至少部分参与了肺循环动力学紊乱的病理过程。

ET-1 也可与肺支气管平滑肌上的 $\text{ET}_{\text{B}2}$ 受体结合, 引起支气管平滑肌收缩。从对照组呼吸生理指标可见, APE 后, 肺生理死腔增大, 通气/血流比例失调, 加上神经反射、体液因子等的作用, 使 RR 增加, R_L 急剧升高, C_{dyn} 下降。在实验组, 各时段 RR 和 R_L 显著低于对照组, C_{dyn} 显著高于对照组, 表明在 APE 中, 产生和释放增加的 ET-1 同样作用于支气管平滑肌, 使支气管收缩, 管腔变小, 肺气道阻力增大。阻断 ET-1 的支气管收缩作用, 可以使呼吸生理指标有好转趋势。

本实验表明, 在 APE 病理过程中, 内皮素参与了肺循环血流动力学紊乱与肺气道阻力升高、肺顺应性下降的形成。内皮素双受体拮抗剂 RO2610612 拮抗内皮素与其受体的结合, 使血浆游离 ET-1 水平升高, 在 APE 中, 可以改善肺循环动力学、肺呼吸生理学指标。基于此实验, 内皮素双受体拮抗剂有可能成为治疗 APE 的有效手段。

本实验尚缺乏解剖、放射学、免疫组化和分子生物学相关证据的探索, 尚待深入研究。

参考文献

- [1] Dalen JE, Alpert JS. Thrombolytic therapy for pulmonary embolism. Arch Intern Med, 1997, 157: 2550-2556.
- [2] Gurewith V, Cohen ML, Thomas DP. Humoral factors in massive pulmonary embolism; an experimental study. Am Heart J, 1968, 76: 784-794.
- [3] Priebe HJ. Efficacy of vasodilator therapy in canine model of acute pulmonary hypertension. Am J Physiol, 1988, 255: H1232-H1239.
- [4] Hickey KA, Rubanyi GM, Paul RJ, et al. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. Am J Physiol, 1985, 248: C550-C556.
- [5] Battistini B. Modulation and roles of endothelins in the pathophysiology of pulmonary embolism. Can J Physiol Pharmacol, 2003, 81: 555-569.

(下转第 428 页)

少在体内蓄积,很适合高龄老年人用药。故高龄老年人 COPD 合并心绞痛服用小剂量比索洛尔治疗是有效、安全的。其血药浓度稳定,副作用小,对于高龄老年人 COPD 合并冠心病、高血压,治疗效果良好,应受到广泛关注。

笔者体会如下:(1)对于 COPD 合并心绞痛患者心率较快者效果明显;(2)对于高龄老年患者应从小剂量开始,逐渐加量;(3)治疗期间密切观察心率、血压及其它病情变化,及时调整治疗剂量;(4)对于治疗期间出现哮喘音、头晕、乏力等副作用,给予对症治疗。

参考文献

[1] 叶任高,陆再英.内科学.第 6 版.北京:人民卫生出版

社,2004.57-63,273-282.

- [2] 郑东诞,曾群英,王强,等.比索洛尔治疗 86 例不稳定性心绞痛分析.中华老年心脑血管杂志,2005,7:64.
- [3] 丁水广.常规方法联用比索洛尔治疗慢性心力衰竭的临床观察.淮海医药,2006,24:53.
- [4] 张仕清,刘运德.长效 β_1 -受体阻滞剂-康可(比索洛尔).心血管病学进展,1997,18:216-218.
- [5] 黄登鹏.康可治疗慢性肺心病心力衰竭临床观察.临床荟萃,2001,16:790-791.
- [6] 官军芳,官伟民,汤建民,等.比索洛尔对老年高血压伴糖尿病和慢性阻塞性肺疾病的疗效观察.中国实用神经疾病杂志,2006,9:130-131.

(上接第 413 页)

参考文献

- [1] Bhardwa JA, Alkayed NJ, Kirsch JR, et al. Mechanisms of ischemic brain damage. Curr Cardiol Rep, 2003, 5: 160-167.
- [2] Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Neurological diseases; mechanisms, challenges and opportunities in stroke. Nat Rev Neurosci, 2003, 4:399-414.
- [3] Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT, et al. C-reactive protein as a cardiovascular risk factor; more than an epiphenomenon? Circulation, 1999, 100:96-102.
- [4] Tracy RP. Inflammation in cardiovascular disease; cart, horse, or both? Circulation, 1998, 97:2000-2002.
- [5] Ding Y, Young CN, Li J, et al. Reduced inflammatory mediator expression by pre-reperfusion infusion into ischemic territory in rats; a real-time polymerase chain reaction analysis. Neurosci Lett, 2003, 353:173-176.
- [6] Vemuganti R, Dempsey RJ, Bowen KK. Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 protein expression by antisense oligonucleotides is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in rat. Stroke, 2004, 35: 179-184.
- [7] Guo Y, Jiang X, Zhou Z, et al. Relationship between levels of serum C reactive protein, leucocyte count and carotid plaque in patients with ischemic stroke. J Hua-zhong Univ Sci Technol Med Sci, 2003, 23:263-265.

(上接第 424 页)

- [6] Stewart DJ, Levy RD, Cemacek P, et al. Increased plasma ET-1 in pulmonary hypertension. Ann Intern Med, 1991, 114:464-469.
- [7] Amdur MO, Mead J. Mechanics of respiration in unanesthetized guinea pigs. Am J Physiol, 1958, 192:364-368.
- [8] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature, 1988, 332:411-415.
- [9] Karaki H, Sudjarwo SA. ETB receptor antagonist, IRL1038, selectively inhibits the endothelin-induced endothelium-dependent vascular relaxation. Eur J Pharmacol, 1993, 231:371-374.
- [10] Hay DWP, Luttmann MA, Hubbard WC, et al. Endothelin receptor subtypes in human and guinea-pig pulmonary tissues. Br J Pharmacol, 1993, 110:1175-1183.
- [11] Halim A, Kanayama NEL, Junadny F, et al. Endothelin-1 increased immunoreactive microthrombosis in rats. Thromb Res, 1994, 76:71-78.
- [12] Dschietzig T, Laule M, Alexiou K, et al. Coronary constriction and consequent cardiodepression in pulmonary embolism are mediated by pulmonary big endothelin and enhanced in early endothelial dysfunction. Crit Care Med, 1998, 26:510-517.
- [13] Del Basso P, Argiolas L. Cardiopulmonary effects of endothelin-1 in the guinea pig; role of thromboxane A_2 . J Cardiovasc Pharmacol, 1995, 26(Suppl 3):S120-S122.