

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research环丙贝特调控 Ang2/Tie 通路对缺氧性肺动脉
高压新生大鼠肺血管重塑的影响

Effect of ciprofibrate on pulmonary vascular remodeling in neonatal rats with hypoxic pulmonary hypertension by regulating the Ang2/Tie pathway

刘莉¹, 李瑞麟², 朱蓉¹,
钟明媚³

(1. 安徽医科大学第三附属医院(合肥市第一人民医院)儿科,安徽合肥 230001; 2. 安徽医科大学第三附属医院(合肥市第一人民医院)药学部,安徽合肥 230001; 3. 安徽医科大学第三附属医院(合肥市第一人民医院)呼吸与危重症医学科,安徽合肥 230001)

LIU Li¹, LI Rui-lin²,
ZHU Rong¹, ZHONG Ming-mei³

(1. Department of Pediatrics, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University (Hefei First People's Hospital), Hefei 230001, Anhui Province, China; 2. Department of Pharmacy, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University (Hefei First People's Hospital), Hefei 230001, Anhui Province, China; 3. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University (Hefei First People's Hospital), Hefei 230001, Anhui Province, China)

基金项目: 抗炎免疫药物教育部重点实验室开放课题项目(KFJJ-2024-05); 安徽医科大学第三附属医院基础与临床合作研究提升计划培育专项立项资助项目(2023sfy011)

作者简介: 刘莉(1980-), 女, 副主任医师, 从事儿科内分泌、呼吸方面的研究

通信作者: 钟明媚, 主任医师

MP: (0551)62189166

E-mail: 17697326@qq.com

摘要:目的 探讨环丙贝特调控血管生成素 2 (Ang2)/酪氨酸蛋白激酶 (Tie) 通路对缺氧性肺动脉高压 (HPH) 新生大鼠肺血管重塑的影响。**方法** 新生大鼠随机分为正常组、HPH 组、环丙贝特低浓度组、环丙贝特中浓度组、环丙贝特高浓度组、环丙贝特高浓度 + Ang2 激活剂大鼠 Ang2 重组蛋白 (rrAng2) 组, 每组 12 只。除正常组外, 其他组新生大鼠均需构建 HPH 模型, 从缺氧第一天开始给药, 每天给药 1 次, 持续 2 周。检测右心室收缩压 (RVSP)、右心室肥厚指数的变化; 苏木精-伊红 (HE) 染色检测肺组织的病理及肺小动脉中层管壁厚度占其外径的百分比 (MT)、肺小动脉中层横截面积占其总横截面积的百分比 (MA) 变化; 免疫荧光染色检测肺动脉中缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、内皮素-1 (ET-1) 相对荧光强度; ELISA 检测肺动脉中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-8 水平; Western blot 检测肺动脉中 Ang2、Tie2 蛋白。**结果** 与正常组相比, HPH 组大鼠肺动脉壁厚增加, 管腔狭窄, RVSP、右心室肥厚指数、MA、MT、肺动脉中 HIF-1 α 、ET-1 相对荧光强度、TNF- α 、IL-8 水平及 Ang2、Tie2 蛋白升高 ($P < 0.05$); 与 HPH 组相比, 环丙贝特低、中、高浓度组大鼠肺动脉壁增厚及管腔狭窄现象有所改善, RVSP、右心室肥厚指数、MA、MT、肺动脉中 HIF-1 α 、ET-1 相对荧光强度、TNF- α 、IL-8 水平及 Ang2、Tie2 蛋白降低 ($P < 0.05$); 与环丙贝特高浓度组相比, 环丙贝特高浓度 + rrAng2 组大鼠肺动脉壁增厚及管腔狭窄现象更明显, RVSP、右心室肥厚指数、MA、MT、肺动脉中 HIF-1 α 、ET-1 相对荧光强度、TNF- α 、IL-8 水平及 Ang2、Tie2 蛋白升高 ($P < 0.05$)。**结论** 环丙贝特可能通过抑制 Ang2/Tie 通路抑制 HIF-1 α 、ET-1 表达及炎症反应进而改善 HPH 新生大鼠肺血管重塑。

关键词: 环丙贝特; 缺氧性肺动脉高压; 肺血管重塑; 炎症; 血管生成素 2/酪氨酸蛋白激酶通路

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.06.009

中图分类号: R725.6; R96 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2026)06-0805-07

Abstract: Objective To investigate the effect of ciprofibrate on pulmonary vascular remodeling in neonatal rats with hypoxic pulmonary hypertension (HPH) by regulating the angiotensin 2 (Ang2)/tyrosine protein kinase (Tie) pathway. **Methods** Newborn rats were randomly separated into normal group, HPH group, low concentration ciprofibrate group, medium concentration ciprofibrate group, high concentration ciprofibrate group, and high concentration ciprofibrate + Ang2 activator rat Ang2 recombinant protein (rrAng2) group, with 12 rats in each group. Except for the normal group, newborn rats in all other groups were constructed with HPH models and administered once a day for 2

weeks starting from the first day of hypoxia. The changes in right ventricular systolic pressure (RVSP) and right ventricular hypertrophy index were detected. Hematoxylin-eosin (HE) staining was applied to detect the pathology of lung tissue and the percentage of pulmonary artery middle layer wall thickness to its outer diameter (MT), and the percentage of pulmonary artery middle layer cross-sectional area to its total cross-sectional area (MA) changes. Immunofluorescence staining was applied to detect the relative fluorescence intensity of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and endothelin-1 (ET-1) in pulmonary arteries. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to detect levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-8 in pulmonary arteries. Western blot was applied to detect Ang2 and Tie2 proteins in pulmonary arteries. **Results** Compared with the normal group, the HPH group showed an increase in pulmonary artery wall thickness and narrowing of the lumen, the RVSP, right ventricular hypertrophy index, MA, MT, HIF-1 α , ET-1 relative fluorescence intensity, TNF- α , IL-8 levels, and Ang2 and Tie2 proteins in the pulmonary artery increased ($P < 0.05$). Compared with the HPH group, the pulmonary artery wall thickening and luminal stenosis in rats in the low, medium, and high concentration ciprofibrate groups were improved, the RVSP, right ventricular hypertrophy index, MA, MT, HIF-1 α , ET-1 relative fluorescence intensity, TNF- α , IL-8 levels, and Ang2 and Tie2 proteins in the pulmonary artery reduced ($P < 0.05$). Compared with the high concentration ciprofibrate group, the high concentration ciprofibrate + rrAng2 group showed more significant thickening of the pulmonary artery wall and narrowing of the lumen in rats, the RVSP, right ventricular hypertrophy index, MA, MT, HIF-1 α , ET-1 relative fluorescence intensity, TNF- α , IL-8 levels, and Ang2 and Tie2 proteins in the pulmonary artery increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Ciprofibrate may improve pulmonary vascular remodeling in neonatal rats with HPH by inhibiting the Ang2/Tie pathway, thereby suppressing the expression of HIF-1 α and ET-1 as well as the inflammatory response.

Key words: ciprofibrate; hypoxic pulmonary hypertension; pulmonary vascular remodeling; inflammation; angiotensin 2/tyrosine protein kinase pathway

新生儿缺氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPH)是新生儿重症监护病房中最常见的严重肺血管疾病^[1]。其特征是血管狭窄和肺动脉阻力增加,最终右心室衰竭和死亡^[2]。众所周知,不利的肺血管重塑是导致 HPH 血管阻力增加的关键病理特征,尽管已经为 HPH 治疗开发了多种先进的药物疗法,但 HPH 的治疗效果仍不尽如人意^[3-4]。因此,迫切需要发现安全有效的药物来缓解 HPH 过程中的肺动脉重塑。环丙贝特是一种高度亲脂性的药物,通常用于血脂异常治疗^[5]。已有报道,环丙贝特可以减轻慢性阻塞性肺病大鼠的气道重塑^[6];环丙贝特可抑制促炎细胞因子的释放进而降低心血管事件发生率^[7];且炎症与 HPH 肺血管重构的关键病理过程高度重合^[8]。但关于环丙贝特对 HPH 新生大鼠肺血管重塑的影响鲜有报道。相关研究显示,血管生成素 2(angiotensin 2, Ang2)/酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinase, Tie)通路的阻断抑制了遗传性出血性毛细血管扩张症大鼠的大脑血管病变^[9]。但环丙贝特是否可通过调控 Ang2/Tie 通路影响 HPH 新生大鼠肺血管重塑尚不可知。基于此,本研究拟通过构建 HPH 新生大鼠模型,

主要探究环丙贝特对 HPH 新生大鼠肺血管重塑的影响及机制。

材料与方法

1 材料

动物 8~10 日龄,体质量为 28~30 g 的 72 只 SPF 级 Wistar 新生大鼠(雌雄各半)购自凯学生物科技有限公司,动物生产许可证号为 SCXK(沪)2022-0013,动物使用许可证号:SYXK(皖)2022-004。本实验获得安徽医科大学实验动物伦理委员会批准(伦理批号:LLSC20231026)。

试剂 环丙贝特,规格:100 mg,纯度:98%,批号:52214-84-3,杭州卢普生物科技有限公司生产;Ang2 激活剂大鼠 Ang2 重组蛋白(Ang2 activator rat Ang2 recombinant protein, rrAng2),上海泽叶生物科技有限公司生产;兔源一抗缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、Ang2、Tie2、羊抗兔二抗,均由英国 Abcam 公司生产;大鼠肿瘤坏死因

子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-8 酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒,均由上海臻科生物科技发展有限公司生产。

2 实验方法

2.1 HPH 新生大鼠模型的构建

将新生大鼠置于常压低氧舱中,每日上午 9:00 至下午 17:00 连续缺氧 8 h,氧浓度设置为 $(10.0 \pm 0.5)\%$,温度设置 $25 \sim 27\text{ }^{\circ}\text{C}$,湿度设置为 $50\% \sim 70\%$,持续此操作 2 周以构建 HPH 新生大鼠模型^[10]。模型构建成功后,通过检测右心室收缩压(RVSP)和右心室肥厚指数进行验证,以 RVSP 显著升高且右心室肥厚指数 >0.3 作为 HPH 模型构建成功的预期标准。

2.2 大鼠分组及处理

新生大鼠随机分为正常组、HPH 组、环丙贝特低浓度组、环丙贝特中浓度组、环丙贝特高浓度组、环丙贝特高浓度 + rrAng2 组,每组 12 只。正常组新生大鼠饲养于标准条件下的空气中,不进行缺氧处理。除正常组外,其他组新生大鼠均需构建 HPH 模型,从缺氧第一天开始给药,每日上午 9:00 固定时间给药。环丙贝特低浓度组、环丙贝特中浓度组、环丙贝特高浓度组^[6]新生大鼠分别灌胃 $2.5\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $5\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $10\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 环丙贝特,灌胃体积均为 $10\text{ }\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ 体质量,且均需尾静脉注射与 rrAng2 等量的生理盐水,尾静脉注射与灌胃同步进行,每日 1 次;环丙贝特高浓度 + rrAng2 组^[11]新生大鼠灌胃 $10\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 环丙贝特(灌胃体积 $10\text{ }\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ 体质量)且尾静脉注射 $2\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ rrAng2,尾静脉注射与灌胃同步进行,每日 1 次;正常组、HPH 组新生大鼠均灌胃与环丙贝特等量($10\text{ }\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ 体质量)且尾静脉注射与 rrAng2 等量的生理盐水,尾静脉注射与灌胃同步进行,每日 1 次。每天给药 1 次,持续 2 周。

2.3 RVSP 的检测

末次处理 24 h 后,麻醉所有新生大鼠,使其仰卧在手术台上,将充满肝素的聚乙烯导管经右颈外静脉插入右心室,用 BL-420 生物功能实验系统检测 RVSP 的变化。

2.4 右心室肥厚指数的检测

RVSP 检测完成后,处死所有大鼠收集心脏,显微镜下分离右心室、左心室和室间隔,并称量其质量。最后计算右心室肥厚指数 = 右心室质量/(左心室质量 + 室间隔质量)。

2.5 肺组织的苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色检测

快速收集心脏后,随机选取 6 只大鼠取其肺组织室温置于 4% 多聚甲醛缓冲液中过夜,脱水后石蜡包埋。所有 $5\text{ }\mu\text{m}$ 厚的肺组织切片固定在载玻片上,烘烤至干燥。HE 后,切片浸泡在二甲苯脱色,梯度乙醇水化后,用中性树脂密封切片。干燥后,用光学显微镜对肺血管形态进行评估和成像。最后通过 Image Pro Plus 软件计算肺小动脉中层管壁厚度占其外径的百分比,即为 MT;肺小动脉中层横截面积占其总横截面积的百分比,即为 MA。

2.6 肺动脉中 HIF-1 α 、ET-1 表达的免疫荧光染色检测

取 2.5 中各组大鼠的距肺门 2 mm、外径 $20 \sim 150\text{ }\mu\text{m}$ 的肺动脉,制备石蜡切片,脱蜡后置于 Tris-EDTA 修复液中进行抗原修复,再在含有 0.3% Triton X-100 的 PBS 中浸泡 10 min,室温下用山羊血清封闭 40 min。再与一抗 HIF-1 α (1:600)、ET-1 (1:800) 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。第二天加入荧光二抗 (1:800) 室温下暗处孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次, DAPI 染色进行核染色,再洗涤 3 次,共聚焦显微镜成像并统计 HIF-1 α 、ET-1 相对荧光强度。

2.7 肺动脉中 TNF- α 、IL-8 水平的 ELISA 检测

取各组剩余的 6 只大鼠的肺动脉,根据 ELISA 试剂盒说明检测肺动脉中 TNF- α 、IL-8 水平。

2.8 肺动脉中 Ang2、Tie2 蛋白的检测

取 2.7 中 6 只大鼠的肺动脉,使用 RIPA 裂解缓冲液提取大鼠肺动脉的全蛋白,并通过二辛可宁酸法获取其浓度。通过电泳分离相同量的蛋白样品并电转移到 PVDF 膜上,经 5% 脱脂牛奶封闭后,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下将膜与一抗 Ang2 (1:3 000)、Tie2 (1:2 000)、GAPDH (1:4 000) 孵育过夜,然后与二抗 (1:4 000) 共孵育 2 h。通过 ECL 试剂对膜进行可视化, ImageJ 软件确定蛋白条带灰度值。

3 统计学分析

用 SPSS 25.0 进行统计分析。数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。首先,采用 Shapiro-Wilk 检验对数据进行正态性检验,采用 Levene 检验进行方差齐性检验,所有数据均符合正态分布且方差齐。使用单因素方差分析比较组间差异,然后进行事后 SNK-q 测试。

结 果

1 环丙贝特对大鼠 RVSP 的影响

与正常组相比, HPH 组大鼠 RVSP 显著升高

($P < 0.05$);与 HPH 组相比,环丙贝特低、中、高浓度组大鼠 RVSP 均显著降低(均 $P < 0.05$);与环丙贝特高浓度组相比,环丙贝特高浓度 + rrAng2 组大鼠 RVSP 显著升高($P < 0.05$),见表 1。

表 1 大鼠 RVSP 变化比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Table 1 Comparison of changes in rat RVSP ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Group	RVSP(mmHg)
Normal group	18.26 ± 0.73
HPH group	27.73 ± 1.01 *
Low concentration ciprofibrate group	25.56 ± 0.92 #
Medium concentration ciprofibrate group	23.31 ± 0.74 #&
High concentration ciprofibrate group	21.22 ± 0.58 #&@
High concentration ciprofibrate + rrAng2 group	24.66 ± 0.67 △

Note: * Compared with normal group, # Compared with HPH group, & Compared with low concentration ciprofibrate group, @ Compared with medium concentration ciprofibrate group, △ Compared with high concentration ciprofibrate group, $P < 0.05$.

2 环丙贝特对大鼠右心室肥厚指数的影响

与正常组相比,HPH 组右心室肥厚指数显著升高($P < 0.05$);与 HPH 组相比,环丙贝特低、中、高浓度组右心室肥厚指数均显著降低(均 $P < 0.05$);与环丙贝特高浓度组相比,环丙贝特高浓度 + rrAng2 组右心室肥厚指数显著升高($P < 0.05$),见表 2。

表 2 大鼠右心室肥厚指数变化比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Table 2 Comparison of changes in right ventricular hypertrophy index in rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Group	Right ventricular hypertrophy index
Normal group	0.21 ± 0.02
HPH group	0.58 ± 0.04 *
Low concentration ciprofibrate group	0.50 ± 0.03 #
Medium concentration ciprofibrate group	0.41 ± 0.02 #&
High concentration ciprofibrate group	0.30 ± 0.02 #&@
High concentration ciprofibrate + rrAng2 group	0.43 ± 0.03 △

Note: * Compared with normal group, # Compared with HPH group, & Compared with low concentration ciprofibrate group, @ Compared with medium concentration ciprofibrate group, △ Compared with high concentration ciprofibrate group, $P < 0.05$.

3 环丙贝特对大鼠肺组织病理及肺小动脉中层管壁厚度占其外径的百分比(MT)、肺小动脉中层横截面积占其总横截面积的百分比(MA)的影响

正常组大鼠肺动脉结构正常;HPH 组大鼠肺动脉壁厚增加,管腔狭窄;与 HPH 组相比,环丙贝特低、

中、高浓度组大鼠肺动脉壁增厚及管腔狭窄现象有所改善;与环丙贝特高浓度组相比,环丙贝特高浓度 + rrAng2 组大鼠肺动脉壁增厚及管腔狭窄现象更明显,见图 1。

与正常组相比,HPH 组大鼠 MA、MT 均显著升高(均 $P < 0.05$);与 HPH 组相比,环丙贝特低、中、高浓度组大鼠 MA、MT 均显著降低(均 $P < 0.05$);与环丙贝特高浓度组相比,环丙贝特高浓度 + rrAng2 组大鼠 MA、MT 均显著升高(均 $P < 0.05$),见表 3。

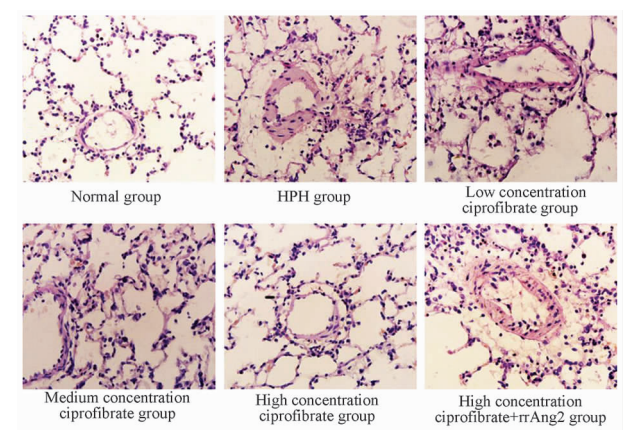


图 1 大鼠肺组织病理的苏木精 - 伊红(HE)染色检测结果($\times 200$)
Figure 1 Results of hematoxylin and eosin (HE) staining for histopathology of rat lungs ($\times 200$)

Figure 1 Results of hematoxylin and eosin (HE) staining for histopathology of rat lungs ($\times 200$)

表 3 大鼠 MA、MT 变化比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 3 Comparison of MA and MT changes in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	MA(%)	MT(%)
Normal group	57.65 ± 2.12	49.33 ± 1.82
HPH group	78.39 ± 2.91 *	70.01 ± 2.36 *
Low concentration ciprofibrate group	74.11 ± 2.53 #	66.12 ± 2.01 #
Medium concentration ciprofibrate group	69.32 ± 2.18 #&	60.77 ± 1.81 #&
High concentration ciprofibrate group	62.26 ± 1.85 #&@	54.55 ± 1.59 #&@
High concentration ciprofibrate + rrAng2 group	72.05 ± 2.31 △	63.66 ± 1.82 △

Note: * Compared with normal group, # Compared with HPH group, & Compared with low concentration ciprofibrate group, @ Compared with medium concentration ciprofibrate group, △ Compared with high concentration ciprofibrate group, $P < 0.05$.

4 环丙贝特对大鼠肺动脉中 HIF-1 α 、ET-1 相对荧光强度的影响

与正常组相比,HPH 组大鼠肺动脉中 HIF-1 α 、ET-1 相对荧光强度升高($P < 0.05$);与 HPH 组相比,环丙贝特低、中、高浓度组大鼠肺动脉中 HIF-1 α 、

ET-1 相对荧光强度降低 ($P < 0.05$); 与环丙贝特高浓度组相比, 环丙贝特高浓度 + rrAng2 组大鼠肺动脉中 HIF-1 α 、ET-1 相对荧光强度升高 ($P < 0.05$), 见图 2 和表 4。

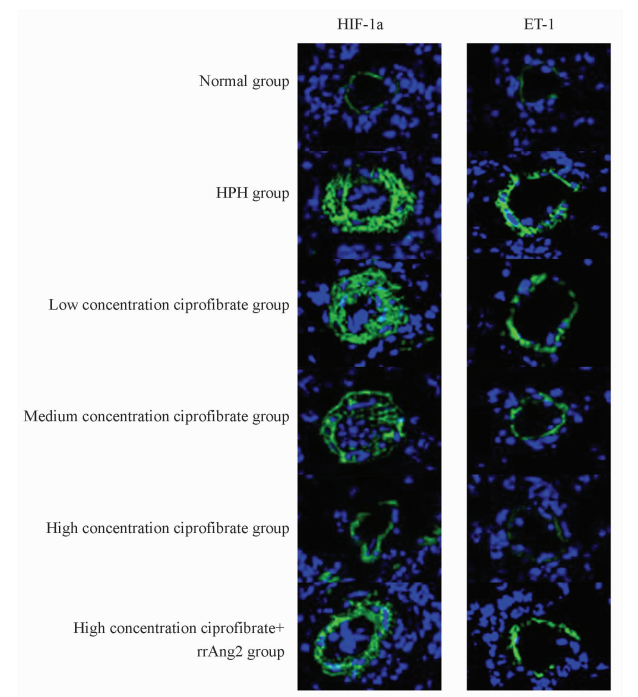


图 1 大鼠肺动脉中 HIF-1 α 、ET-1 表达的免疫荧光染色检测结果 ($\times 400$)

Figure 1 Immunofluorescence staining results of HIF-1 α and ET-1 expression in rat pulmonary artery ($\times 400$)

表 4 大鼠肺动脉中 HIF-1 α 、ET-1 相对荧光强度变化比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Comparison of changes in relative fluorescence intensity of HIF-1 α and ET-1 in rat pulmonary artery ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Relative fluorescence intensity of HIF-1 α	Relative fluorescence intensity of ET-1
Normal group	13.31 $\pm$ 0.54	7.56 $\pm$ 0.29
HPH group	28.22 $\pm$ 1.25 *	18.65 $\pm$ 0.64 *
Low concentration ciprofibrate group	25.03 $\pm$ 1.01 #	16.01 $\pm$ 0.52 #
Medium concentration ciprofibrate group	21.17 $\pm$ 0.83 #&	13.63 $\pm$ 0.41 #&
High concentration ciprofibrate group	17.22 $\pm$ 0.63 #&@	10.22 $\pm$ 0.34 #&@
High concentration ciprofibrate + rrAng2 group	23.35 $\pm$ 1.02 Δ	15.17 $\pm$ 0.43 Δ

Note: * Compared with normal group, # Compared with HPH group, & Compared with low concentration ciprofibrate group, @ Compared with medium concentration ciprofibrate group, Δ Compared with high concentration ciprofibrate group, $P < 0.05$.

5 环丙贝特对大鼠肺动脉中 TNF- α 、IL-8 水平的影响

与正常组相比, HPH 组大鼠肺动脉中 TNF- α 、IL-8 水平均显著升高 (均 $P < 0.05$); 与 HPH 组相比, 环丙贝特低、中、高浓度组大鼠肺动脉中 TNF- α 、IL-8 水平均显著降低 (均 $P < 0.05$); 与环丙贝特高浓度组相比, 环丙贝特高浓度 + rrAng2 组大鼠肺动脉中 TNF- α 、IL-8 水平均显著升高 (均 $P < 0.05$), 见表 5。

表 5 大鼠肺动脉中 TNF- α 、IL-8 水平变化比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Comparison of changes in TNF- α and IL-8 levels in rat pulmonary arteries ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	TNF- α (pg $\cdot$ mL ⁻¹)	IL-8 (pg $\cdot$ mL ⁻¹)
Normal group	56.67 $\pm$ 2.33	19.44 $\pm$ 0.78
HPH group	121.33 $\pm$ 5.65 *	41.15 $\pm$ 1.85 *
Low concentration ciprofibrate group	108.85 $\pm$ 4.72 #	35.56 $\pm$ 1.51 #
Medium concentration ciprofibrate group	89.85 $\pm$ 3.71 #&	29.95 $\pm$ 1.23 #&
High concentration ciprofibrate group	70.55 $\pm$ 2.88 #&@	23.38 $\pm$ 0.95 #&@
High concentration ciprofibrate + rrAng2 group	92.21 $\pm$ 3.07 Δ	31.44 $\pm$ 1.06 Δ

Note: * Compared with normal group, # Compared with HPH group, & Compared with low concentration ciprofibrate group, @ Compared with medium concentration ciprofibrate group, Δ Compared with high concentration ciprofibrate group, $P < 0.05$.

6 环丙贝特对大鼠肺动脉中 Ang2/Tie 通路蛋白表达的影响

与正常组相比, HPH 组大鼠肺动脉中 Ang2、Tie2 蛋白均显著升高 (均 $P < 0.05$); 与 HPH 组相比, 环丙贝特低、中、高浓度组大鼠肺动脉中 Ang2、Tie2 蛋白均显著降低 (均 $P < 0.05$); 与环丙贝特高浓度组相比, 环丙贝特高浓度 + rrAng2 组大鼠肺动脉中 Ang2、Tie2 蛋白均显著升高 (均 $P < 0.05$), 见图 3 和表 6。

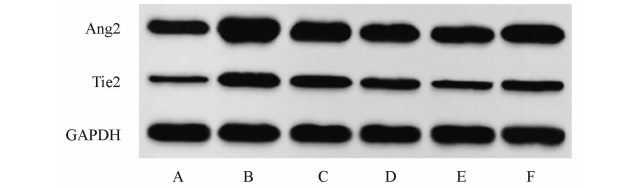


图 3 大鼠肺动脉中 Ang2、Tie2 蛋白表达检测结果图

Figure 3 Plot of the results of Ang2 and Tie2 protein expression assay in rat pulmonary arteries

Note: A: Normal group; B: HPH group; C: Low concentration ciprofibrate group; D: Medium concentration ciprofibrate group; E: High concentration ciprofibrate group; F: High concentration ciprofibrate + rrAng2 group.

表6 大鼠肺动脉中 Ang2、Tie2 蛋白变化比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 6 Comparison of Ang2 and Tie2 protein changes in rat pulmonary arteries ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Ang2/GAPDH	Tie2/GAPDH
Normal group	0.85 ± 0.07	0.23 ± 0.02
HPH group	1.73 ± 0.14 *	0.81 ± 0.06 *
Low concentration ciprofibrate group	1.31 ± 0.12 #	0.65 ± 0.04 #
Medium concentration ciprofibrate group	1.18 ± 0.09 #&	0.51 ± 0.03 #&
High concentration ciprofibrate group	0.96 ± 0.07 #&@	0.33 ± 0.02 #&@
High concentration ciprofibrate + rrAng2 group	1.22 ± 0.10 Δ	0.58 ± 0.04 Δ

Note: * Compared with normal group, # Compared with HPH group, & Compared with low concentration ciprofibrate group, @ Compared with medium concentration ciprofibrate group, Δ Compared with high concentration ciprofibrate group, $P < 0.05$.

讨 论

HPH 是公认的慢性心肺疾病并发症,目前尚无有效治疗方法^[12-13]。肺血管重塑作为 HPH 进展的基础,大量研究表明,肺血管重塑会逐渐导致肺血管阻力和肺动脉压升高,最终导致右心功能障碍、肥大、衰竭甚至死亡^[14]。本研究构建了 HPH 新生大鼠模型,结果显示,与正常组相比,HPH 组大鼠 RVSP 和右心室肥厚指数升高,符合 HPH 的特征,表明 HPH 新生大鼠模型构建成功。肺动脉病理的 HE 染色检测结果显示,HPH 组大鼠肺动脉壁厚增加,管腔狭窄,且 MA、MT 高于正常组,表明 HPH 新生大鼠存在肺血管重塑。另有研究报道,HIF-1α 是一种高度保守的转录因子,在缺氧条件下,HIF-1α 可与缺氧反应元件结合,并激活 ET-1 等下游基因表达,促进血管平滑肌细胞增殖和肺血管重塑^[15-16]。本研究中的 HPH 组大鼠肺动脉中 HIF-1α、ET-1 相对荧光强度高于正常组的结果证实了 HIF-1α、ET-1 参与了 HPH 新生大鼠肺血管重塑过程。最近的研究报道,多种促炎细胞因子参与了缺氧肺血管重塑的过程^[17]。如 IL-8 作为一种炎性细胞因子,可刺激中性粒细胞 T 细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞趋化,损伤内皮细胞,导致微循环充血和组织坏死^[18];TNF-α 是一种能有效调节肺循环的促炎细胞因子,其可导致缺氧区中性粒细胞聚集,微血管阻塞,最终引起肺血管重塑^[19]。本研究中的 HPH 组大鼠肺动脉中 TNF-α、IL-8 水平高于正常组的结果恰好证明了促炎细胞因子参与了缺氧肺血管重塑的过程。因此,抑制 HIF-1α、ET-1 表达及炎症反应可能是改善 HPH 过程中的肺血管重塑的有效途径之一。

环丙贝特是一种过氧化物酶体增殖剂,具有降血脂的作用^[20]。本研究首次证明了低、中、高浓度环丙贝特均可通过抑制 HIF-1α、ET-1 表达及炎症反应

改善 HPH 新生大鼠肺血管重塑,且环丙贝特浓度越高,对应趋势越明显,提示环丙贝特可能成为改善 HPH 的潜在有效药物之一。然而,本研究中高浓度(10 mg · kg⁻¹)环丙贝特组与低浓度(2.5 mg · kg⁻¹)组相比,RVSP 降低幅度约为 6 mmHg。虽然该差异在统计学上具有显著性,但其临床意义需谨慎解读。肺动脉压降低 5 ~ 10 mmHg 在动物模型中可能对应有限的血流动力学改善,且新生大鼠的血管重塑可塑性较强,该幅度的压力下降是否能在临床患儿中转化为右心功能的实质性获益尚不明确。此外,环丙贝特在人体内的代谢途径、药代动力学特征及长期安全性与小鼠存在差异,10 mg · kg⁻¹ 在小鼠中的暴露量折算至人体可能超出常规治疗剂量范围。因此,本研究观察到的浓度依赖性效应提示了环丙贝特的潜在价值,但其临床应用仍需进一步通过更大样本的动物实验及剂量研究加以验证,并结合临床终点指标(如右心功能、长期生存率)综合评估其获益与风险。

Ang2/Tie 通路中 Ang2 在病理条件下上调,调节 Ang/Tie 通路可恢复血管稳定、减少炎症及改善血管重塑^[21]。据报道,Ang2/Tie 通路的抑制阻碍了特发性肺纤维化小鼠的血管生成^[22]。本研究结果与其基本一致,本研究发现低、中、高浓度环丙贝特均可抑制 HPH 新生大鼠肺动脉中 Ang2、Tie2 蛋白表达,且环丙贝特浓度越高,蛋白降低趋势越明显,于是大胆假设环丙贝特抑制 HIF-1α、ET-1 表达及炎症反应进而改善 HPH 新生大鼠肺血管重塑的机制可能与抑制 Ang2/Tie 通路有关。为了证明上述的假设是合理的,本实验用 Ang2 激活剂 rrAng2 处理高浓度环丙贝特干预的 HPH 新生大鼠,结果显示,rrAng2 减弱了高浓度环丙贝特对 HPH 新生大鼠肺血管重塑的改善作用。证实了上述假设成立。值得注意的是,rrAng2 仅部分逆转了环丙贝特的保护作用,并未完全恢复至 HPH 组水平,提示环丙贝特改善 HPH 新生大鼠肺血管重塑的作用并非完全依赖于抑制 Ang2/Tie 通路。环丙贝特作为一种过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPARα) 激动剂,可能通过多条途径发挥血管保护作用。已有研究报道,PPARα 激活可直接抑制 HIF-1α 的转录活性,减少 ET-1 表达,并调节 NF-κB 介导的炎症反应^[23-24]。此外,环丙贝特还可能通过改善脂质代谢、减轻氧化应激、抑制平滑肌细胞增殖等独立于 Ang2/Tie 通路的机制改善肺血管重塑^[25]。因此,环丙贝特对 HPH 新生大鼠肺血管重塑的改善作用可能是多靶点、多通路协同作用的结果,Ang2/Tie 通路仅是其中的重要环节之一。未来研究可通过联

合使用 PPAR α 拮抗剂或在 Ang2/Tie 通路完全阻断的条件下进一步验证环丙贝特的作用机制。然而,本研究存在一定局限性。Ang2/Tie2 下游信号通路包括 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 等,这些通路的磷酸化激活在介导血管内皮细胞存活、增殖及血管重塑中发挥关键作用。本研究仅检测了 Ang2 和 Tie2 蛋白的表达水平,未进一步检测下游 Akt、ERK 等关键信号分子的磷酸化水平,因此未能明确环丙贝特抑制 Ang2/Tie 通路后下游信号通路的转导变化,限制了对环丙贝特作用机制的深度解析。此外,本研究未使用特异性 PPAR α 拮抗剂或 Ang2/Tie2 特异性抑制剂(如 L1-10)进行验证,环丙贝特与 Ang2/Tie 通路之间的直接调控关系仍有待进一步确认。后续研究应结合磷酸化蛋白检测、特异性抑制剂干预及基因沉默等技术,深入阐明环丙贝特调控 Ang2/Tie 下游信号网络的分子机制。

综上所述,环丙贝特可能通过抑制 Ang2/Tie 通路抑制 HIF-1 α 、ET-1 表达及炎症反应进而改善 HPH 新生大鼠肺血管重塑。该研究可能为新生儿 HPH 的治疗提供新的参考依据。

参考文献:

- [1] HUANG W, LIU N, TONG X, *et al.* Sildenafil protects against pulmonary hypertension induced by hypoxia in neonatal rats via activation of PPAR γ -mediated downregulation of TRPC [J]. *Int J Mol Med*, 2022, 49(2):19—31.
- [2] RAJAGOPAL S, YU YA. The pathobiology of pulmonary arterial hypertension [J]. *Cardiol Clin*, 2022, 40(1):1—12.
- [3] HU L, ZHAO C, CHEN Z, *et al.* An emerging strategy for targeted therapy of pulmonary arterial hypertension: Vasodilation plus vascular remodeling inhibition [J]. *Drug Discov Today*, 2022, 27(5):1457—1463.
- [4] KENNY M, CLARKE MM, POGUE KT. Overview of riociguat and its role in the treatment of pulmonary hypertension [J]. *J Pharm Pract*, 2022, 35(3):437—444.
- [5] CORRÊA RLGQ, DOS SANTOS R, ALBUQUERQUE LJC, *et al.* Ciprofibrate-loaded nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Synthesis, characterization, and drug release [J]. *Polymers (Basel)*, 2021, 13(18):3158—3173.
- [6] KE Q, YANG L, CUI Q, *et al.* Ciprofibrate attenuates airway remodeling in cigarette smoke-exposed rats [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2020, 271(1):103290—103298.
- [7] OKOPIEN B, KRYSIAK R, KOWALSKI J, *et al.* Monocyte release of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in primary type IIa and IIb dyslipidemic patients treated with statins or fibrates [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005, 46(3):377—386.
- [8] PAN J, WANG R, PEI Y, *et al.* Sulforaphane alleviated vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension via inhibiting inflammation and oxidative stress [J/OL]. *J Nutr Biochem*, 2023, 111:109182.
- [9] BERNABEU C. Therapeutic targeting of the Ang2/Tie pathway in endothelial cells as a potential treatment of hereditary hemorrhagic telangiectasia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2023, 43(8):1404—1408.
- [10] 刘文光, 刘思佟, 张薇薇, 等. 虎杖苷调节 YAP1/TAZ 信号通路对缺氧性肺动脉高压新生大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2024, 53(1):68—74.
- [11] 覃秋语, 吕祥威, 何梓峰, 等. Ang II诱导大鼠心房间纤维化的 mRNA 表达谱变化 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2023, 54(5):989—964.
- [12] ZHOU X, JIANG Y, WANG Y, *et al.* Endothelial FIS1 DeSUMOylation protects against hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Circ Res*, 2023, 133(6):508—531.
- [13] PAN J, WANG R, PEI Y, *et al.* Sulforaphane alleviated vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension via inhibiting inflammation and oxidative stress [J]. *J Nutr Biochem*, 2023, 111(1):109182—109192.
- [14] YE W, TANG T, LI Z, *et al.* Piperlongumine attenuates vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension by regulating autophagy [J]. *J Cardiol*, 2022, 79(1):134—143.
- [15] LIU Y, WEN B, ZHANG F, *et al.* Effects of blood oxygen saturation on pulmonary artery remodeling in an *in vitro* perfusion circuit model [J]. *J Thorac Dis*, 2021, 13(4):2169—2176.
- [16] 谭骏岚, 易健, 曹闲雅, 等. 基于 PPAR- γ /NF- κ B 信号通路探讨肺心汤对野百合碱诱导肺动脉高压大鼠模型的作用及机制 [J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35(3):307—316.
- [17] SHI H, ZHAO Y, LI S, *et al.* TNF- α and IL-8 levels are positively correlated with hypobaric hypoxic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats [J]. *Open Life Sci*, 2023, 18(1):20220650—20220657.
- [18] MATSUSHIMA K, YANG D, OPPENHEIM J J. Interleukin-8: An evolving chemokine [J]. *Cytokine*, 2022, 153(1):155828—155838.
- [19] JANG D, LEE A H, SHIN H Y, *et al.* The role of tumor necrosis factor alpha (tnf- α) in autoimmune disease and current tnf- α inhibitors in therapeutics [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5):2719—2734.
- [20] CHENG Y, WEI Z, XIE S, *et al.* Alleviation of toxicity caused by overactivation of Ppar α through ppar α -inducible miR-181a2 [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 9(1):195—206.
- [21] JOUSSEN A M, RICCI F, PARIS L P, *et al.* Angiotensin/Tie2 signalling and its role in retinal and choroidal vascular diseases: A review of preclinical data [J]. *Eye (Lond)*, 2021, 35(5):1305—1316.
- [22] WU Y, ZHANG J, WANG X, *et al.* Saikosaponin-d regulates angiogenesis in idiopathic pulmonary fibrosis through angiotensin/Tie-2 pathway [J]. *Acta Histochem*, 2023, 125(8):152100—152107.
- [23] ZHOU J, ZHANG S, XUE J, *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) suppresses hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) signaling in cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(42):35161—35169.
- [24] LI C, MPOLLO MS, GONSALVES CS, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- α -mediated transcription of miR-199a2 attenuates endothelin-1 expression via hypoxia-inducible factor-1 α [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(52):36031—36047.
- [25] KE Q, YANG L, CUI Q, *et al.* Ciprofibrate attenuates airway remodeling in cigarette smoke-exposed rats [J/OL]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2020, 271:103290.