

## 琥珀酸促进野百合碱诱导的心肺小动脉间质纤维化

吴泽宇,石奇琪,黄河溯源,杨磊,陆梦婷,莫绪明\*

(南京医科大学附属儿童医院心胸外科,江苏 南京 210009)

**[摘要]** 目的:探讨琥珀酸能否促进野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠模型心肺小动脉间质纤维化,并初步探索其机制。方法:4~5 周龄健康雄性 SD 大鼠 30 只,体重 120~180 g,随机分为对照组、野百合碱(monocrotaline,MCT)组、野百合碱和琥珀酸(succinic acid,SUC)联合使用组(MCT+SUC 组),每组 10 只。MCT 组和 MCT+SUC 组予腹腔注射 MCT 建造大鼠肺小动脉高压模型,MCT+SUC 组继续予 SUC 干预 4 周。4 周后,利用漂浮导管检测平均肺动脉压(mean pressure of pulmonary artery,mPAP)、右心室收缩压(right ventricular systolic pressure,RVSP)、肺动脉收缩压(systolic blood pressure,SBP)和肺动脉舒张压(diastolic blood pressure,DBP)等血流动力学指标。安乐死后取组织测定右室肥厚指数,行 HE 染色观察心脏和肺组织小动脉的肌化情况,Masson、天狼星红染色观测心脏和肺小动脉周围纤维化情况,Western blot 和免疫组织化学检测心脏组织血管紧张素 II(angiotensin II,Ang II)、血小板衍生因子-BB(platelet derived growth factor,PDGF-BB)和成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor 2,FGF2)等蛋白表达水平。结果:MCT 组、MCT+SUC 组大鼠均表现食量减少、倦卧等症状,MCT+SUC 组大鼠出现唇周紫绀、气促等表现较早。MCT+SUC 组 RVSP、mPAP、肺动脉 SBP 和肺动脉 DBP、右室肥厚指数、心肺小动脉中层增厚程度均明显大于 MCT 组( $P < 0.05$ )。HE 染色显示,MCT 组心肺小动脉轻度增厚,MCT+SUC 组心脏小动脉壁增厚程度较 MCT 组更加明显,局部心肌组织炎性细胞浸润增加。天狼星红染色与 Masson 染色结果显示,MCT+SUC 组心肺小动脉周围间质内胶原纤维异常增生,MCT 组心肺小动脉周围未见胶原纤维异常增生。Western blot 和免疫组织化学结果显示,MCT+SUC 组和 MCT 组肺组织 Ang II、PDGF-BB、FGF2 蛋白表达水平变化与对照组相比均有不同程度的升高,MCT+SUC 组较 MCT 组上升水平更加明显。结论:SUC 可以促进 MCT 诱导的心肺小动脉间质纤维化的形成,其机制可能是上调 FGF2 和 PDGF-BB 等促纤维化的细胞因子,Ang II 表达升高,导致心肺小动脉间质纤维化的形成。

**[关键词]** 肺动脉高压;早期纤维化;琥珀酸;野百合碱

**[中图分类号]** R541.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)09-1136-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170913

## Effects of succinic acid on early interstitial fibrosis of small cardio-pulmonary arteries in monocrotaline-induced pulmonary hypertension

Wu Zeyu, Shi Qiqi, Huanghe Shuyuan, Yang Lei, Lu Mengting, Mo Xuming\*

(Department of Cardiothoracic Surgery, the Affiliated Children's Hospital of NJMU, Nanjing 210009, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate whether succinic acid could exacerbate the early interstitial fibrosis of cardio-pulmonary arteries induced by monocrotaline in a rat model of pulmonary hypertension, and to explore its pathological and molecular mechanisms. **Methods:** A total of 30 healthy male SD rats aged 4 to 5 weeks and weighted 120~180 g were randomly divided into the control group (C group), the monocrotaline group(MCT group), and the monocrotaline and succinic acid group(MCT+SUC group), with 10 rats in each group. The MCT group and the MCT+SUC group were subjected to intraperitoneal injection with monocrotaline in 60 mg/kg. The MCT+SUC group was given SUC for 4 weeks. The rats in the control group and the MCT group were injected with equal volume of saline, lasting for 4 weeks. After 4 weeks, hemodynamic indices including mean pressure of pulmonary artery(mPAP), right ventricular systolic pressure(RVSP), systolic blood pressure(SBP) and diastolic blood pressure(DBP) of pulmonary artery were measured by floating catheter in all groups. The right ventricular hypertrophy index was measured after euthanasia. HE staining, Masson staining and Sirius red staining were conducted to detect the remodeling of arteriole in the heart and lung tissues. Western blot and immunohistochemistry were conducted to examine the protein level of angiotensin II (Ang II), platelet derived growth factor (PDGF-BB), and platelet derived growth factor(FGF2) in the pulmonary hypertension rat model. **Results:** The rats in the MCT group and the SUC

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81370277)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: mohsuming15@sina.com

group both showed decreased activity, sleepiness and poor appetite. Lips cyanosis and shortness of breath appeared earlier in the MCT+SUC group. Hemodynamic examination exhibited that indices, including mPAP, RVSP, SBP and DBP of pulmonary artery, the right ventricular hypertrophy index, the thickening of arteriole in the heart and lung tissues were significantly higher in the MCT+SUC group than those in the MCT group (all  $P < 0.05$ ). HE staining showed slight thickening of the small arteries in the MCT group, the degree of thickening of the arterial wall of the MCT+SUC group was more obvious than that of the MCT group, and the infiltration of inflammatory cells in local myocardium increased. Sirius red staining and Masson staining showed abnormal proliferation of collagen fibers in the interstitial cells of the MCT+SUC group, and no abnormal collagen fibers in the MCT group. Western blot and immunohistochemistry showed that Ang II, FGF-2 and PDGF-BB expression levels in the MCT+SUC group and the MCT group were significantly higher than those in the control group, and the protein expressions of Ang II, FGF-2 and PDGF-BB in the MCT+SUC group increased more significantly than those in the MCT group. **Conclusion:** Succinic acid can exacerbate the formation of early fibrosis of cardiopulmonary arterioles in rats with pulmonary hypertension induced by monocrotaline. The mechanism may be due to regulating the expression of FGF-2 and PDGF-BB in the body, and eventually lead to increased expression of Ang II, causing interstitial fibrosis of cardio-pulmonary arteries.

[Key words] pulmonary hypertension; early fibrosis; succinic acid; monocrotaline

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(09): 1136-1141]

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是由一组多种原因引起的肺循环压力高于正常的病症,以肺血管阻力的持续增加及肺循环高压为特征的综合征,是一种严重的具有潜在破坏力的慢性肺循环疾病,PH 诱导的心肌早期纤维化是引起右心衰竭从而导致患者死亡的重要原因。有学者发现,在炎症应激环境下,巨噬细胞可以将代谢产物琥珀酸(succinic acid, SUC) 迅速地转运到细胞外,刺激机体免疫应答,促进成纤维细胞的活化,引起组织纤维蛋白酶原的活化和沉积。有学者提出 SUC 结合受体 G 蛋白偶联受体 91(G-protein coupled receptor 91, GPR91)可能是潜在有效的 PH 治疗靶点。但国内外关于 PH 引起心肌纤维化的机制研究较少,对 SUC 在 PH 心肌纤维化中所起的作用尚存争议。本研究拟验证 SUC 能否刺激机体成纤维细胞的活化并导致 PH 早期心肌组织的纤维化,并初步探讨其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

5~6 周龄健康雄性 SD 大鼠 30 只(由南京医科大学动物实验中心提供),体重 120~180 g,随机分为正常对照组、野百合碱(monocrotaline, MCT)组(MCT 组)、MCT 与 SUC 联用组(MCT+SUC 组),每组 10 只。兔抗鼠成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor 2, FGF-2)抗体、兔抗鼠血小板衍生因子-BB(platelet derived growth factor, PDGF-BB)抗体(CST 公司,美国),兔抗鼠血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)抗体(EPR2931, Abcam 公司,美国),GAPH

抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(杭州碧云天生物技术公司),MCT、SUC(Sigma 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物造模

MCT 组和 MCT+SUC 组腹腔注射 MCT 60 mg/kg 建造大鼠 PH 模型<sup>[2]</sup>,对照组腹腔注射等体积生理盐水。MCT+SUC 组大鼠于建模 30 min 时腹腔注射 SUC 2 mg/kg,建模第 2 天起腹腔注射 SUC 1 mg/(kg·d),对照组和 MCT 组腹腔注射等体积生理盐水,连续使用 4 周。

#### 1.2.2 血流动力学检测

血流动力学监测在造模后第 28 天进行,监测 3 组大鼠血流动力学的变化:腹腔注射 5%水合氯醛 0.1 mL/kg 对大鼠进行麻醉,连接心电图电极,行心电监护,分离右侧颈外静脉,静脉插入肝素化的聚乙烯测压管,测压管另一端连接换能器,由多导生理记录装置(Power Lab8/30; AD Instruments, 澳大利亚)进行检测记录,根据显示器波形及压力变化判定测压管位置,波形稳定后调整测压管位置,至测压管进入肺动脉,待波形稳定,保存检测结果,分析波形,计算各组压力值<sup>[1]</sup>。包括平均肺动脉压(mean pressure of pulmonary artery, mPAP)、右心室收缩压(right ventricular systolic pressure, RVSP)、肺动脉收缩压(systolic blood pressure, SBP)和肺动脉舒张压(diastolic blood pressure, DBP)。

#### 1.2.3 心脏肥厚指数比较

大鼠血流动力学指标检测结束后,打开胸腔,充分暴露心和肺,充分灌注心脏及肺组织。根据解剖结

构去掉大血管和心房,分离左、右心室,滤纸吸干表面水分,称右心室重量、肺湿重、左心室加室间隔的重量,并计算右心室肥厚指数,右心室肥厚指数=右心室重量/(左心室重量+室间隔重量)。

#### 1.2.4 病理学指标检测及血管周围胶原定量分析

充分灌洗后去除全身组织内的血液,整体取下大鼠肺及心脏组织,将新鲜心脏组织及肺组织浸入多聚甲醛中固定,取肺纵向切面及心室冠状切面,厚度约5 μm,分别采用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色、天狼星红染色和 Masson 染色观察肺组织及心肌组织细胞形态及胶原纤维增生情况。使用 Image-Pro Plus6.0 软件对肺和心脏小动脉的直径及管壁进行测量,从而计算肺和心脏小动脉中层增厚的程度。光镜下观察血管周围胶原含量变化情况,应用 HPIAS 2000 型计算机图像分析系统,随机分析5个视野,通过灰度调节区分胶原与非胶原成分,计算组织血管周围胶原面积(perivascular collagen area, PVCA)=小动脉管腔周围胶原面积/动脉管腔面积。指标观察采用单盲法,由2位观察者独立评价。

#### 1.2.5 纤维化相关蛋白水平检测

取固定后的石蜡切片脱蜡至水,经抗原修复后磷酸盐缓冲溶液洗3次,每次3 min,室温下血清封闭1 h,分别加入 FGF-2 (1:500)、PDGF-BB (1:500)及 Ang II (1:500)的一抗,4℃孵育过夜,PBS冲洗后加生物素标记的二抗,室温下孵育1 h,PBS冲洗后滴加链霉亲和素-过氧化物酶,室温孵育30 min。之后用 DAB 显色剂显色,用梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树脂封片。

Western blot 实验,取肺组织,加入裂解液进行裂变,离心后取上清95℃变性后进行 SDS-PAGE 电泳,然后将蛋白转到 PVDF 膜上,分别加入 FGF-2 (1:500)、PDGF-BB(1:500)及 Ang II (1:500)的一抗,4℃孵育过夜,同时以 GAPDH 作为内参(1:500),洗涤后,室温下加入二抗孵育1 h,采用化学发光法进行胶片显影,使用 Image J 软件对电泳条带进行蛋白表达相对值分析。

#### 1.3 统计学方法

采用 SPSS15.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,3组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法,计数资料用构成比表示,采用卡方检验进行数据分析。采用 Graphpad Prism6.0 软件进行图表制作, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠一般情况观察

MCT 组腹腔注射 MCT 1 周后与对照组比较,逐渐出现活动减少,反应迟钝,倦卧,食量减少,第2~3周出现毛发枯糙,喘息,甚至出现鼻部及唇周发绀,MCT+SUC 组大鼠同样出现活动减少,倦卧,食量减少,第2周即有大鼠出现唇周发绀、气促等表现,第22天死亡1只,病理解剖发现死亡大鼠心脏呈充血样,右心明显增大。

### 2.2 血流动力学指标检测结果

MCT 组及 MCT+SUC 组 RVSP、mPAP、肺动脉 SBP 和肺动脉 DBP 明显高于对照组 ( $P<0.01$ );MCT+SUC 组各指标均明显高于 MCT 组( $P<0.05$ ,图1)。

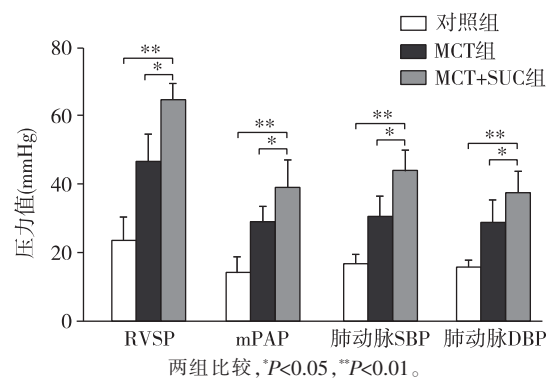


图1 分别处理4周后3组大鼠血流动力学的比较

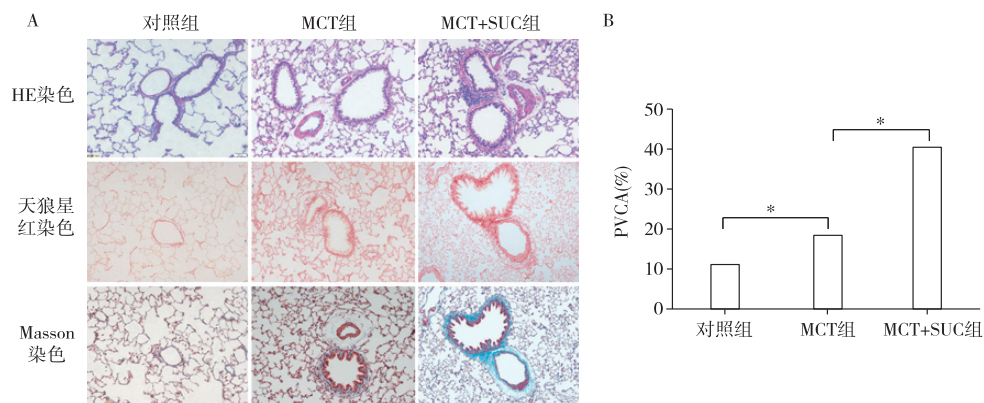
Figure 1 Comparison of hemodynamics in the three groups of rats after four weeks

### 2.3 肺组织病理染色及 PVCA 结果

HE 染色示 MCT 组肺小动脉轻度增厚,MCT+SUC 组肺小动脉壁增厚程度较 MCT 组更加明显,局部肺组织炎性细胞浸润增加。天狼星红染色及 Masson 染色显示 MCT+SUC 组肺小动脉周围间质内胶原纤维异常增生,MCT 组肺小动脉周围未见胶原纤维异常增生。2种染色均显示给予 SUC 的大鼠肺小动脉周围出现了明显的胶原纤维表达上调,显示肺小动脉周围间质在 PH 形成的早期即出现了明显纤维化。PVCA 测定结果显示 MCT+SUC 组肺动脉周围胶原纤维含量明显高于对照组及 MCT 组(图2)。

### 2.4 右心室肥厚指数及心、肺小动脉管壁厚度

MCT 组和 MCT+SUC 组右心室肥厚指数明显大于对照组 ( $P<0.01$ ),MCT+SUC 组右心室肥厚指数明显大于 MCT 组( $P<0.05$ )。表明加用 SUC 后大鼠心室重构较单用 MCT 组更为明显。MCT 组和 MCT+SUC 组心、肺小动脉中层增厚程度明显大于对照组 ( $P<$



A: 病理染色结果( $\times 200$ ); B: PVCA 统计结果, 两组比较,  $*P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠肺小动脉病理染色及 PVCA 统计结果

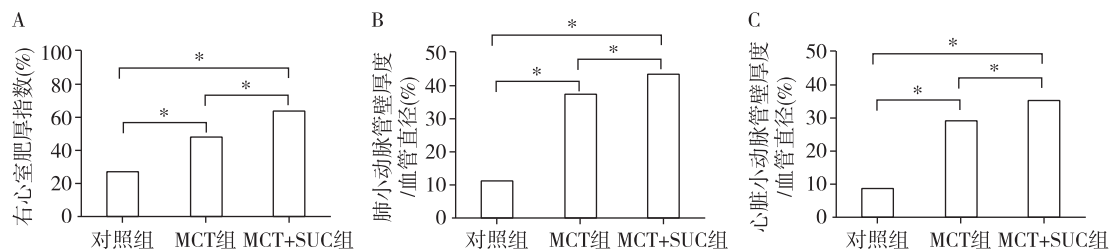
Figure 2 Histopathological results of pulmonary arterioles in rats and PVCA statistical results in each group

0.05); MCT+SUC 组心、肺小动脉中层增厚程度明显大于 MCT 组( $P < 0.05$ , 图 3)。

### 2.5 心肌组织病理染色及 PVCA 结果

HE 染色示 MCT 组心脏小动脉轻度增厚, MCT+SUC 组心脏小动脉壁增厚程度较 MCT 组更加明显, 局部心肌组织炎性细胞浸润增加。天狼星红染色及 Masson 染色显示 MCT+SUC 组心脏小动脉周围间质

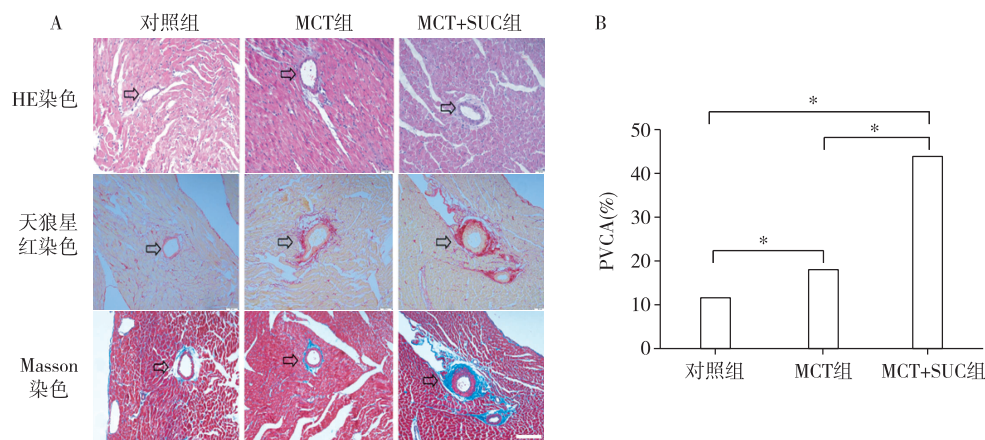
内胶原纤维异常增生, MCT 组心脏小动脉周围未见胶原纤维异常增加, 心脏小动脉在 PH 研究领域一直是一个被忽视的环节, 本研究中观察到给予 SUC 的大鼠心脏小血管周围间质内早期即出现了胶原纤维的沉积。PVCA 测定结果显示 MCT+SUC 组心脏小动脉周围胶原纤维含量明显高于对照组及 MCT 组, 差异有统计学意义(图 4)。



A: 3 组右心室肥厚指数比较; B: 3 组肺小动脉中层增厚程度比较; C: 3 组心脏小动脉中层增厚程度比较。两组比较,  $*P < 0.05$ 。

图 3 各组大鼠右心室肥厚情况及大鼠心、肺小动脉管壁厚度的统计结果

Figure 3 Right ventricular hypertrophy, the small arterial wall thickness of heart and lung of rats in each group



A: 病理染色结果( $\times 200$ ); B: PVCA 统计结果, 两组比较,  $*P < 0.05$ 。

图 4 各组大鼠心脏小动脉病理染色及 PVCA 统计结果

Figure 4 Histopathological results of heart arterioles in rats and PVCA statistical results in each group

### 2.6 各组肺组织中 FGF-2、PDGF-BB、Ang II 蛋白表达水平

免疫组化显示 MCT+SUC 组大鼠肺小动脉内 FGF-2、PDGF-BB、Ang II 明显沉积 (图 5)。Western blot 蛋白检测示 MCT+SUC 组和 MCT 组肺组织中的 FGF-2、PDGF-BB、Ang II 蛋白表达水平比对照组明显升高(图 6)。表明给予 MCT 和 SUC 后,肺组织内 FGF-2、PDGF-BB 表达明显上调,且在肺小动脉沉积明显增多。

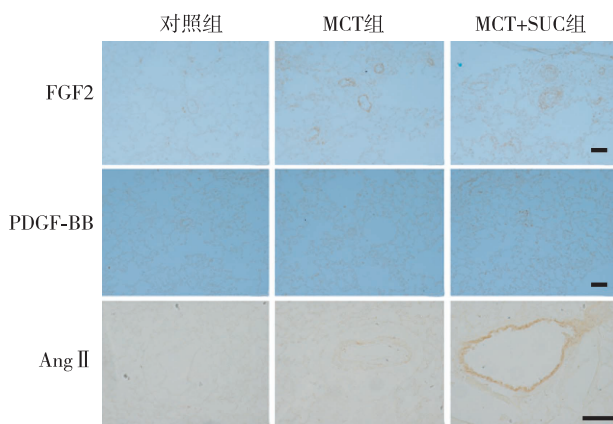
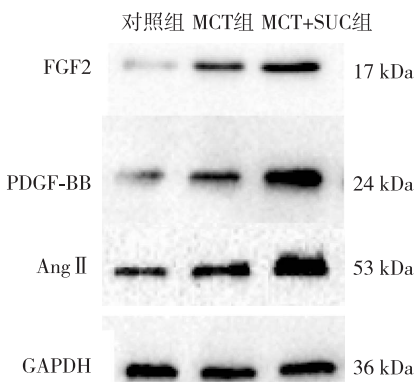


图 5 3 组大鼠肺小动脉免疫组化结果( $\times 400$ )

Figure 5 Immunohistochemical results of pulmonary arterioles in three groups of rats( $\times 400$ )



两组比较,  $*P < 0.05$ 。

图 6 Western blot 检测大鼠肺组织中 FGF2、PDGF-BB、Ang II 蛋白表达水平

Figure 6 Protein expressions of FGF2, PDGF-BB and Ang II in rats detected by Western blot

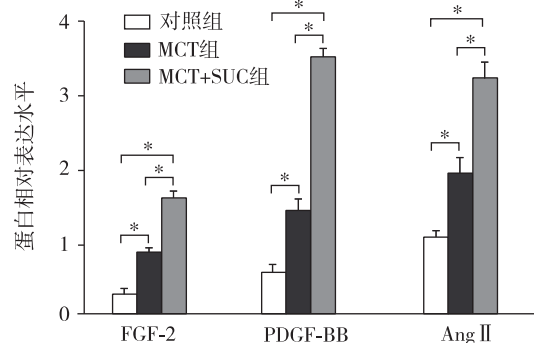
肌组织间质纤维蛋白沉积,引起心肌纤维化<sup>[4-5]</sup>。本研究中,应用 MCT 诱导建立大鼠 PH 动物模型,用药后 4 周,大鼠肺小动脉压力及右心室压力明显升高,右室肥厚指数增加,肺小动脉中膜增厚,表明 PH 模型建立成功。

SUC 是一类柠檬酸循环中的中间体,并可作为细胞外信号调节因子在不同细胞间发挥调节作用<sup>[6]</sup>。研究显示 SUC 作为重要的细胞因子参与肝脏纤维化的形成<sup>[7-8]</sup>。本研究在腹腔注射 MCT 成功建立大

### 3 讨论

PH 是一种多因素参与的以肺血管阻力进行性增高为特征的一类疾病,升高的肺血管压力会进行性地引起肺小动脉增厚,并伴随着一系列复杂的代谢及炎症反应,导致肺血管压力增高,病情继续发展可以引起右心室负荷增加,引起心肌持续的氧容量不足及营养代谢障碍,导致心肌纤维化的形成<sup>[2-3]</sup>。晚期心肌纤维化一旦产生,现有的治疗方法除了心脏移植外尚无好的治疗方案。因此明确 PH 导致心肌纤维化的机制,探索可能的治疗方案势在必行。

一次性皮下或腹腔注射 MCT 是目前应用最广泛的建立 PH 及右心室重构模型的方法之一。MCT 的代谢产物可引起肺血管不可逆性损伤,从而引起肺血管损伤,导致 PH 形成。腹腔注射 MCT 可以特异性损伤大鼠的肺小动脉内皮细胞,引起内皮细胞凋亡增加,坏死增多,严重者还会伴发微血栓形成<sup>[2-3]</sup>。内皮细胞一旦损伤可以特异性地释放多种生物活性物质(如 ET、PDGF、bFGF 等),促进了血栓形成和平滑肌细胞增生,肺小动脉肌化明显增强,肺血管结构重建,引起 PH,导致肺心病。长期肺循环压力增高会引起继发的右心室负荷增加,导致右心室肥厚及心



鼠 PH 模型的基础上,持续给予接近生理水平的 SUC,结果显示 MCT 与 SUC 联用组大鼠口唇青紫出现时间较早,MCT+SUC 组和 MCT 组 RVSP、mPAP、肺小动脉 SBP 和肺小动脉 DBP 明显高于对照组,MCT+SUC 组以上各指标明显高于 MCT 组。肺组织的病理染色:HE 染色示 MCT 组肺小动脉轻度增厚,MCT+SUC 组肺小动脉壁增厚程度较 MCT 组更加明显,局部肺组织炎性细胞浸润增加。天狼星红染色及 Masson 染色显示 MCT+SUC 组肺小动脉周围间质内

胶原纤维异常增生,MCT 组肺小动脉周围未见胶原纤维异常增生。两种染色均显示给予 SUC 后大鼠肺小动脉周围出现了明显的胶原纤维表达上调,显示肺小动脉周围间质在 PH 形成早期即出现了明显纤维化。心肌组织的病理染色显示 MCT+SUC 组心脏小动脉壁在 PH 形成早期也出现了增厚,且心脏小动脉周围间质内胶原纤维异常增生。心肌组织天狼星红染色及 Ang II 免疫组化结果表明 MCT+SUC 组心肌纤维化的发现时间较 MCT 组及对照组更早。结果表明在 PH 模型建立早期给予 SUC 加重大鼠心肌纤维化的严重程度,持续给予 SUC 可以诱导心脏及肺小动脉周围间质内纤维的异常沉积<sup>[9]</sup>。

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGF)最早来源于牛脑内垂体的一种提取液,是一类由 150~200 个氨基酸组成的多肽。FGFs 与存在于细胞表面的 FGF 受体结合,将信号传递到胞内。FGF-2 是其中一类广泛表达于胚胎和成体组织器官内的生长因子。FGF-2 缺乏信号序列和正常的分泌途径,因此其释放主要来自于受损的细胞。细胞受到炎症、代谢异常等因素影响,即可将胞内的 FGF-2 释放至胞外,激活 PI3K、MAPK 等通路<sup>[10]</sup>,导致磷脂酰肌醇 3-激酶系统的激活及局部钙离子的大量释放,引起局部组织纤维酶原的活化,激活纤维酶原系统,导致局部组织的纤维化形成。血小板衍生因子(platelet derived growth factor, PDGF)是一种重要的促有丝分裂因子,一般由局部浸润的炎细胞或者受损的内皮细胞分泌,具有刺激细胞群分裂增殖的能力<sup>[11]</sup>。PDGF 分为两个亚体,在纤维化过程中,主要是 PDGF 的  $\beta$  亚体与 PDGF-BB 受体结合发挥作用。文献报道 PDGF-BB 在肝脏的纤维化过程中起着重要作用<sup>[12]</sup>。肝脏受损时,PDGF 大量分泌导致间质星形细胞增殖,向纤维母细胞转化,并向炎症受损区聚集。PDGF 能够促进肌纤维母细胞释放胶原,最终引起肝纤维化。本研究中 MCT+SUC 组大鼠肺组织内 FGF-2、PDGF-BB 的表达明显上调,表明 SUC 可能参与了炎症及内皮细胞凋亡等纤维化过程。

综上所述,在 MCT 诱导建立的大鼠 PH 模型中给予外源性 SUC,可以导致局部 FGF-2、PDGF-BB 表达水平上调,并最终引起纤维母细胞的活化,导致 Ang II 释放增加,导致心脏及肺组织间质内纤维化的形成。文献报道已有学者在体外细胞水平使用 SUC 拮抗剂,SUC 受体也可能成为新的抑制 PH 引起心脏早期纤维化的治疗靶点,后续将进一步探究其更深入的机制。

#### [参考文献]

- [1] 李江津,邹建刚. 右心导管检查在左心疾病相关性肺动脉高压中的应用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(3):271-274
- [2] Chen NY, D Collum S, Luo F, et al. Macrophage bone morphogenic protein receptor 2 depletion in idiopathic pulmonary fibrosis and group III pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 311(2): L238-L254
- [3] 曹黎明,金波,王凤鸣,等. 儿童动脉导管未闭合并中重度肺动脉高压介入治疗临床分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2016, 36(12):1534-1537
- [4] Franz M, Grün K, Betge S, et al. Lung tissue remodelling in MCT-induced pulmonary hypertension: a proposal for a novel scoring system and changes in extracellular matrix and fibrosis associated gene expression [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(49):81241-81254
- [5] Rain S, Andersen S, Najafi A, et al. Right ventricular myocardial stiffness in experimental pulmonary arterial hypertension: relative contribution of fibrosis and myofibril stiffness[J]. *Circ Heart Fail*, 2016, 9(7):1161
- [6] Pereda D, García-Lunar I, Sierra F, et al. Magnetic resonance characterization of cardiac adaptation and myocardial fibrosis in pulmonary hypertension secondary to Systemic-to-pulmonary shunt [J]. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2016, 9(9):004566
- [7] Littlewood-Evans A, Sarret S, Apfel V. GPR91 senses extracellular succinate released from inflammatory macrophages and exacerbates rheumatoid arthritis journal of experimental medicine [J]. *J Exp Med*, 2016, 213(9): 1655-1662
- [8] 吴苏玲,解卫平,孔辉,等. 埃他卡林对低氧诱导的肺动脉高压大鼠炎症反应的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2013, 33(2):149-154
- [9] Alkukhun L, Wang XF, Ahmed MK, et al. Non-invasive screening for pulmonary hypertension in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Respir Med*, 2016, 117:65-72
- [10] Nakerakanti S, Trojanowska M. The role of TGF-beta receptors in fibrosis[J]. *Open Rheumatol J*, 2012, 6:156-162
- [11] Zhang Y, Liao P, Zhu M, et al. Baicalin attenuates cardiac dysfunction and myocardial remodeling in a chronic pressure-overload mice model [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(3):849-864
- [12] Yu DK, Zhang CX, Zhao SS, et al. The anti-fibrotic effects of epigallocatechin-3-gallate in bile duct-ligated cholestatic rats and human hepatic stellate LX-2 cells are mediated by the PI3K/Akt/Smad pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(4):473-482