

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002307

野百合碱诱导运动诱发肺动脉高压大鼠模型的建立及他达那非早期干预效果

朱中凯¹, 易鑫², 何杨柯¹, 丰天宇³, 赵勇鹏¹, 李丹¹, 陈中祝⁴, 黄玮¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院心内科, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第二医院心内科, 重庆 400010; 3. 重庆医科大学检验医学院、临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016; 4. 重庆文理学院国际靶向治疗与创新研究院、重庆市酶调节剂创新医学重点实验室、重庆市目标与创新治疗工程实验室, 重庆 402160)

【摘要】目的:建立运动诱发肺动脉高压(exercise induced PH, EiPH)大鼠模型, 早期明确诊断, 及时给予治疗, 评估大鼠 PH 进展、肺血管重塑情况及生存率。**方法:**雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠 60 只, 体质量 200~220 g, 大鼠注射野百合碱(monocrotaline, MCT)(60 mg/kg)后, 分别在第 1、3、5、7、9 天检测大鼠静息状态下平均肺动脉压力(mean pulmonary artery pressure, mPAP)及运动状态下峰值 mPAP(maximum mPAP, mPAP_{max})。选取大鼠静息 mPAP<25 mmHg 且运动状态下 mPAP_{max}>30 mmHg 定义为 EiPH 组; 将大鼠静息 mPAP≥25 mmHg 随机分为静息 PH(rest PH, rPH)组和 PH 组; 注射生理盐水的大鼠为对照组。EiPH 组与 rPH 组大鼠分别给予等量他达那非灌胃 2 周。各组大鼠于实验终点完成超声心动图检查, 改良右心导管测压, 留取心肺组织。**结果:**MCT 注射后第 7 天, 大鼠运动状态下 mPAP_{max} 较对照组明显升高[(38.5 ± 2.7) mmHg vs. (27.24 ± 0.46) mmHg, $P=0.000$]。MCT 注射后第 35 天, rPH+T 组大鼠静息 mPAP 升高[(26.67 ± 0.11) mmHg vs. (35.23 ± 0.47) mmHg, $P=0.000$]、右室肥厚指数增加(0.34 ± 0.01 vs. 0.46 ± 0.02, $P=0.004$)、肺动脉中膜厚度百分比增加(44.4% vs. 55.6%, $P=0.008$)。**结论:**本研究成功建立 EiPH 大鼠模型。他达那非干预实验结果表明, 早期阶段给予 PH 大鼠治疗的降压及抑制肺血管重构效果优于同等剂量药物的晚期用药。

【关键词】侵入性运动试验; 早期诊断; 肺高压; 他达那非**【中图分类号】**R543.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-04-24

Establishment of exercise induced pulmonary hypertension rat model induced by monocrotaline and early intervention effect of tadalafil

Zhu Zhongkai¹, Yi Xin², He Yangke¹, Feng Tianyu³, Zhao Yongpeng¹, Li Dan¹, Chen Zhongzhu⁴, Huang Wei¹

(1. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

3. College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University/Key Laboratory of Medical Diagnostics, Ministry of Education; 4. International Academy of Targeted Therapeutics and Innovation,

Chongqing University of Arts and Sciences/Chongqing Key Laboratory of Kinase Modulators as Innovative Medicine/Chongqing Engineering Laboratory of Targeted and Innovative Therapeutics)

【Abstract】Objective: To establish exercise induced pulmonary hypertension (EiPH) rats model, diagnose in the early phase and treat as soon as possible, so as to assess the pulmonary hypertension (PH) progression, pulmonary artery remodeling and survival rate.

Methods: Sixty male Sprague Dawley (SD) rats, with weight 200 to 220 g, were intraperitoneally injected with monocrotaline (MCT, 60 mg/kg). After injecting MCT, the mean pulmonary artery pressure (mPAP) under resting and exercising condition and maximum mPAP (mPAP_{max}) under exercising condition on the 1st, 3rd, 5th, 7th and 9th day were measured. Rats with resting mPAP<25 mmHg and exercising mPAP_{max}>30 mmHg were classified into EiPH group; rats with resting mPAP≥25 mmHg were randomly divided into resting PH (rPH) group and PH group; rats with injection of saline were classified into control group. Rats in the EiPH and the rPH group were given same dose tadalafil (T) by gavage for two weeks. Echocardiography was performed at the end of experiment, right heart

catheter was improved to measure the pulmonary artery pressure and the cardiopulmonary tissue was taken and kept.

Results: On the 7th day after MCT injection, the exercising mPAP_{max} in the MCT group was higher than that in the control group [(38.5 ± 2.7) mmHg vs. (27.24 ± 0.46) mmHg, $P=0.000$].

作者介绍: 朱中凯, Email: zhongkai92@gmail.com,

研究方向: 肺动脉高压的诊断与治疗。

通信作者: 黄玮, Email: weihuangcq@gmail.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190918.1335.004.html>

(2019-09-19)

On the 35th day after MCT injection, resting mPAP in the rPH+T group was increased [(26.67 ± 0.11) mmHg vs. (35.23 ± 0.47) mmHg, $P=0.000$], right ventricular hypertrophy index was raised (0.34 ± 0.01 vs. 0.46 ± 0.02 , $P=0.004$) and the percentage of pulmonary artery wall thickness (44.4% vs. 55.6% , $P=0.008$) was magnified. **Conclusion:** The EiPH rat model was successfully established. According to tadalafil intervention experiment, effectiveness of lowering blood pressure and inhibiting pulmonary vessel remodeling in the early phase is better than treating with a same dose drugs in the late phase.

[Key words] invasive exercise test; early diagnosis; pulmonary hypertension; tadalafil

肺高压 (pulmonary hypertension, PH) 是一类静息状态下经右心导管诊断平均肺动脉压增高 (mean pulmonary arterial pressure, mPAP ≥ 25 mmHg) 的恶性进展性疾病^[1-2]。PH 早期症状隐匿且不典型, 经常被误诊、漏诊^[3]。患者从出现症状到明确诊断, 平均需要 27 个月, 而无典型危险因素的特发性 PH 患者, 诊断延误可长达 47 个月^[4]。临床上超过 75% 的 PH 患者在明确诊断时心功能处于 III 级或 IV 级, 预后极差^[5]。近期研究发现结缔组织病患者的运动能力降低与运动峰值 (maxium mPAP, mPAP_{max}) > 28 mmHg 相关, mPAP_{max} > 30 mmHg 则更容易发展为静息 PH (rest PH, rPH)^[6]。侵入性心肺运动试验用于评估受试者心肺储备能力和运动耐量, 提供有关血流动力学、呼吸、代谢和肌肉对身体活动的反应数据^[7-10]。运动诱发肺动脉高压 (exercise induced PH, EiPH) 病例中有约 20% 在三年内发展为静息 PH^[6]。现有的如超声心动图、心电图、心脏 CT、MRI、B 型钠尿肽等均为 rPH 的临床筛查方法。

目前, 尽管 PH 指南推荐的靶向药物可以减缓 PH 的进展, 但却无法治愈, 甚至不能改善长期预后^[11-13]。同时, 有研究表明尽早进行药物治疗可延长 PH 患者的生存率^[14-16]。诊断时间过晚与 PH 患者的不良预后及死亡率相关, 早期诊断 PH 是改善预后的关键^[15, 17-18]。由于早期肺高压病人心肺组织样本难以获得, 需要相关动物模型来研究 PH 病理生理学改变并探索早期治疗靶标。经典野百合碱 (monocrotaline, MCT) 大鼠模型主要局限于反映 PH 的晚期阶段^[19-21]。为研究 PH 早期病理生理学变化, 迫切需要建立早期诊断模型。因此, 本研究旨在药物诱导大鼠后不同时间段行侵入性运动试验, 对 PH 实现早期诊断和干预。

1 材料及方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 所有动物实验程序均经过重庆医科大学

伦理委员会批准, 合格证书编号: SCXK (渝) 2012-0002。按照重庆医科大学动物中心制定的标准对大鼠进行管理和饲养。8~10 周龄, 体质量为 200~220 g, 健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠饲养在恒温屏障中, 恒定 12 h/12 h 亮/暗比。自由获取食物和水。

1.1.2 实验试剂 ①野百合碱 (MCT, Sigma, USA)^[19] 的配置: 取 250 mg MCT 粉末溶于 5 mL 1 mol/L 的 HCL 中, pH 仪检测状态下用 1 mol/L 的 NaOH 滴定至溶液 pH 为 7.3~7.5。加生理盐水至总体积为 25 mL。②他达拉非的配置: 取 500 mg 羧甲基纤维素钠粉末溶于 100 mL 双蒸水中, 搅拌均匀, 配置成 0.5% 羧甲基纤维素钠溶剂; 取 180 mg 他达拉非原药粉末溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠溶剂中配置成他达拉非悬浊液, 震荡至溶质均匀分布于溶剂中。③10% 水合氯醛的配置: 取 2 g 水合氯醛粉末溶于 20 mL 生理盐水中, 配置成 10% 水合氯醛。

1.2 实验方法

1.2.1 MCT 诱导大鼠肺动脉高压 大鼠称重后将配置好的 MCT 溶液给予一次性腹腔内注射 (60 mg/kg), 对照组按体质量给予等量的生理盐水。

1.2.2 运动训练 由于大鼠在平板跑步机 (小动物实验跑台, 中国) 上运动需要进行专项训练, 所有大鼠造模前均需接受跑步机运动训练。初始速度为 15 m/min, 持续 8 min; 在熟悉期间逐渐增加至 25 m/min, 持续 10 min, 跑步机平板后部的弱电刺激可促进大鼠跑步行为的训练。

1.2.3 运动血流动力学检测及分组 分别在 MCT 注射后第 1、3、5、7、9、11 天用 10% 水合氯醛麻醉大鼠 (300 mg/kg)。通过右心导管 (BIOPAC MP150 多导生理记录仪, 美国) 于静息状态下测量大鼠肺动脉压力。准确测量到肺动脉压力后, 将右侧颈外静脉与导管用缝线固定, 留置并保持导管处于肺动脉中, 调整张力并固定于颈后部。关闭伤口前再次检查导管位置是否稳定于肺动脉内, 血流动力学信号是否完整。缝合创口, 导管游离端肝素帽封堵。手术动物均接受抗生素 (5 mg/kg Enrofloxacin, Bayer, Germany)。为确定 MCT 诱导大鼠早期 PAH 的大致时间点, 大鼠分别于第 1、3、5、7、9、11 天置管, 在麻醉苏醒 24 h 后进行侵入性运动试验, 将静息 mPAP < 25 mmHg 且运动时 mPAP_{max} > 30 mmHg 的大鼠定义为 EiPH 组, 即早期 PH 组; 将静息 mPAP > 25 mmHg 大鼠定义为 rPH 组, 即晚期 PH 组 (图 1)。

1.2.4 他达拉非干预 经右心导管诊断确定 EiPH 分组, MCT 后第 7 天给予他达拉非灌胃 (9 mg/kg, qd) 2 周, 即 EiPH

组大鼠在 MCT 后第 21 天停止治疗,继续常规饲养 2 周;rPH 组于注射 MCT 后第 21 天开始用同等剂量他达那非灌胃 2 周;对照组给予等量生理盐水灌胃。

1.2.5 静息血流动力学检测 MCT 注射后第 35 天麻醉大鼠,右锁骨上区备皮,经颈外静脉行右心导管测量右心室和肺动脉收缩压、舒张压等并记录(图 2)。

1.2.6 组织病理 完成测压后取左肺下叶固定于 10%多聚甲醛溶液中,脱水,石蜡包埋,切片厚度 5 μm ,HE 染色。光学显微镜下观察拍照,Image J 测量分析血管直径 25~100 μm 的肌性肺小动脉。血管壁厚度指数=(血管总面积-管腔面积)/血管总面积 $\times 100\%$ 。右心室肥厚指数(RVH)=右心室/(左心

室+室间隔)。

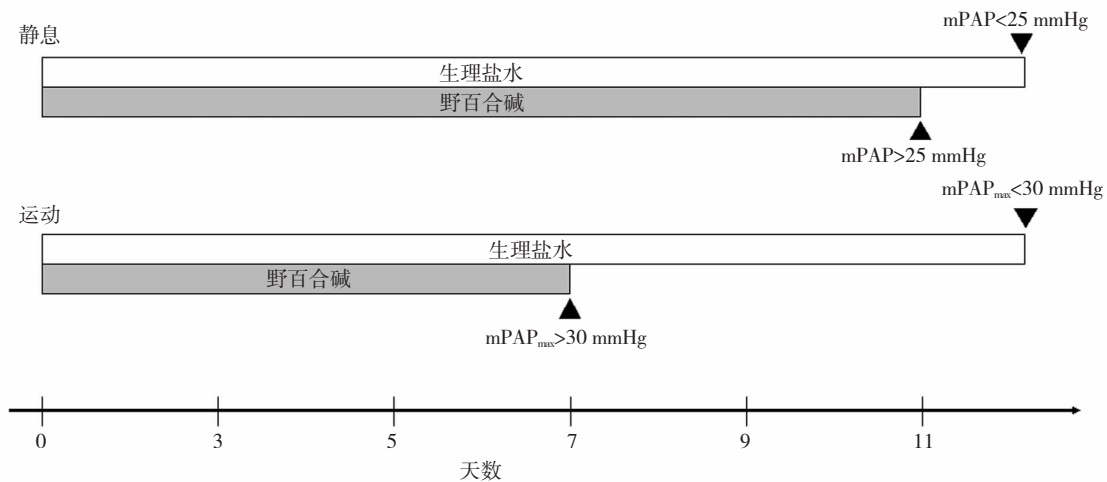
1.3 统计学处理

所有实验数据资料采用 SPSS 21.0 统计学软件进行处理。所得到的数值均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。其两两比较采用 LSD- t 法检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

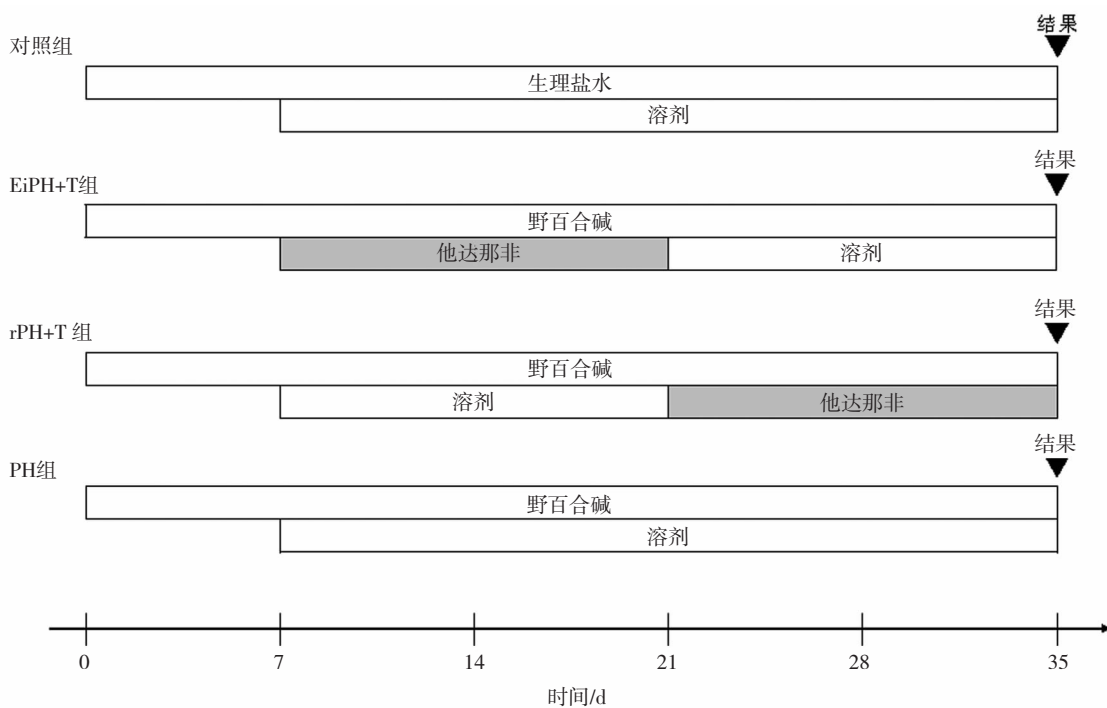
2.1 大鼠侵入性运动试验模型

大鼠于平板跑步机上运动,同时通过 BIOPAC MP150 系统监测肺动脉压力(图 3)。



注:野百合碱注射后分别于第 1、3、5、7、9、11 天时在静息和运动状态下检测大鼠肺动脉压力,每组 10 只

图 1 侵入性运动试验检测大鼠运动状态下 mPAP 时间线



注:每组 10 只大鼠

图 2 肺高压大鼠早期干预及晚期干预时间线

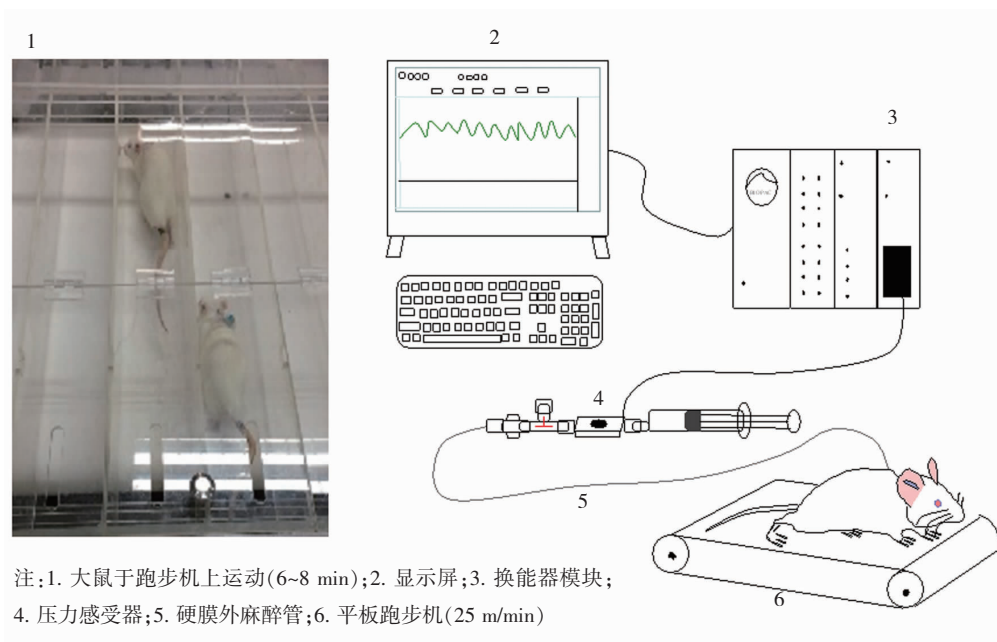
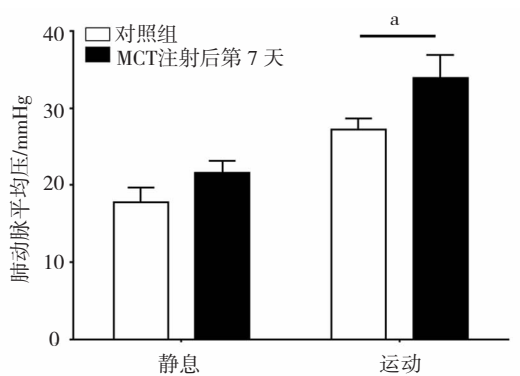


图3 运动诱发肺动脉高压大鼠模型的建立

2.2 运动血流动力学

MCT注射后第7天,MCT组大鼠静息 mPAP 高于对照组 $[(21.60 \pm 0.64) \text{ mmHg vs. } (17.80 \pm 0.97) \text{ mmHg}, P=0.0037]$; 运动状态下 mPAP_{max} 明显高于对照组 $[(38.50 \pm 2.70) \text{ mmHg vs. } (27.24 \pm 0.46) \text{ mmHg}, P=0.000]$ 。大鼠静息 mPAP 高于对照组,符合 EiPH 肺动脉压力诊断标准。因此将野百合碱注射后第7天定义为早期 PH,并且可由侵入性运动试验诊断(图4)。



注:a,与生理盐水组比较, $P=0.000$

图4 MCT注射后第7天大鼠运动峰值平均肺动脉压力

2.3 超声心动图

EiPH+T组左室射血分数较 rPH+T组 $[(49.5 \pm 3.1)\% \text{ vs. } (38.9 \pm 1.3)\%, P=0.016]$ 与 PH组 $[(49.5 \pm 3.1)\% \text{ vs. } (24.2 \pm 4.0)\%, P=0.006]$ 增加; EiPH+T组右心室横径较 rPH+T组 $[(3.6 \pm 0.1) \text{ mm vs. } (4.3 \pm 0.1) \text{ mm}, P=0.001]$ 与 PH组 $(3.6 \pm 0.1) \text{ mm vs. } (4.9 \pm 0.2) \text{ mm}, P=0.000]$ 减小; EiPH+T组主肺动

脉横径与主动脉横径之比较, rPH+T组 $(1.05 \pm 0.02 \text{ vs. } 1.18 \pm 0.03, P=0.016)$ 与 PH组 $(1.05 \pm 0.02 \text{ vs. } 1.21 \pm 0.02, P=0.003)$ 减小; EiPH+T组心排量(cardiac output, CO)较 rPH+T组 $[(63.89 \pm 3.90) \text{ mL/min vs. } (49.03 \pm 1.40) \text{ mL/min}, P=0.009]$ 与 PH组 $[(63.89 \pm 3.90) \text{ mL/min vs. } (41.46 \pm 1.40) \text{ mL/min}, P=0.002]$ 增加(图5)。

2.4 静息血流动力学

经他达那非早期阶段性干预后, EiPH+T组 mPAP 与 rPH+T组 $[(26.7 \pm 0.1) \text{ mmHg vs. } (35.2 \pm 0.5) \text{ mmHg}, P=0.000]$ 及 PH组 $[(26.7 \pm 0.1) \text{ mmHg vs. } (42.2 \pm 0.4) \text{ mmHg}, P=0.000]$ 相比明显降低; rPH组右心室 dp/dt 较 EiPH+T组 $[(873.1 \pm 7.9) \text{ mmHg/s vs. } (1068.0 \pm 39.1) \text{ mmHg/s}, P=0.000]$ 及 PH组 $[(873.1 \pm 7.9) \text{ mmHg/s vs. } (1620.0 \pm 31.6) \text{ mmHg/s}, P=0.000]$ 明显降低。同时,将导管置于主肺动脉中时, rPH+T组主肺动脉 dp/dt 较 EiPH+T组升高 $[(503.5 \pm 17.6) \text{ mmHg/s vs. } (349.8 \pm 18.2) \text{ mmHg/s}, P=0.000]$; rPH+T: $(503.5 \pm 17.6) \text{ mmHg/s vs. PH: } (1072.0 \pm 22.6) \text{ mmHg/s}, P=0.000]$ 。EiPH+T组射血时间较 PH组 $[(0.1260 \pm 0.0020) \text{ s vs. } (0.0986 \pm 0.002) \text{ s}, P=0.000]$ 与 rPH+T组 $[(0.1260 \pm 0.0020) \text{ s vs. } (0.1113 \pm 0.0010) \text{ s}, P=0.000]$ 延长(图6)。

2.5 右心室及肺小动脉重构

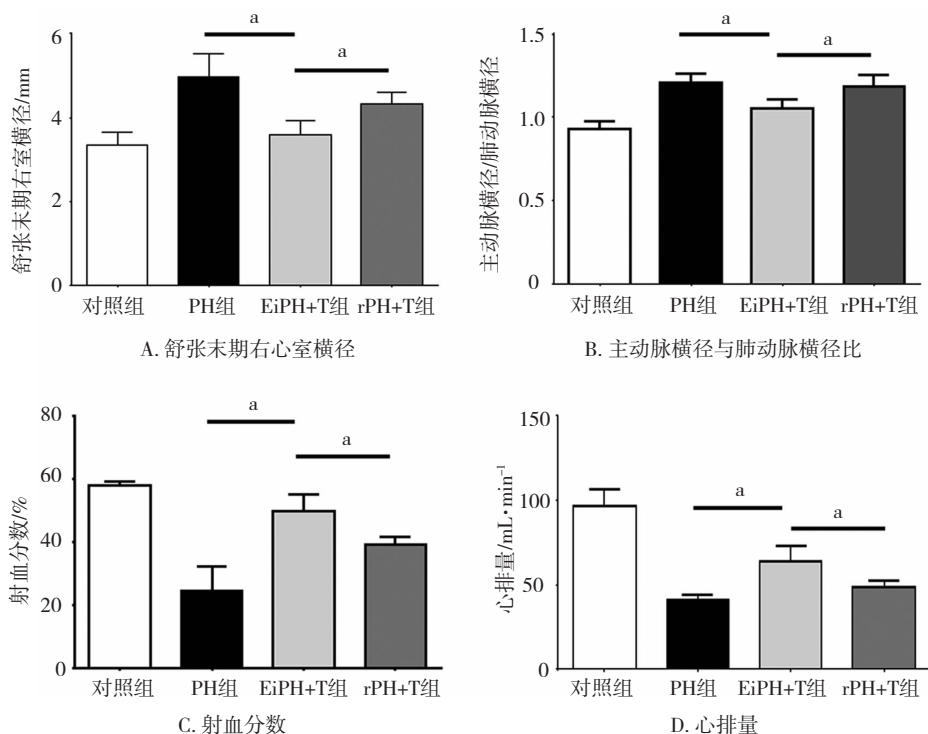
肺组织 HE 染色 EiPH+T组肺小动脉中膜未见明显增厚, EiPH+T组 RVH 明显低于 rPH+T组 $(0.34 \pm 0.01 \text{ vs. } 0.46 \pm 0.02, P=0.004)$, PH组较 EiPH+T组 RVH 明显增加 $(0.48 \pm 0.02 \text{ vs. } 0.34 \pm 0.01, P=0.001)$ 。EiPH+T组在他达那非干预后肺小动脉中膜指数为 44.4%, 较 rPH+T组 $(55.6\%, P=$

0.008)与 PH 组(61.2%, $P=0.000$)明显降低(图 7)。

2.6 生存率

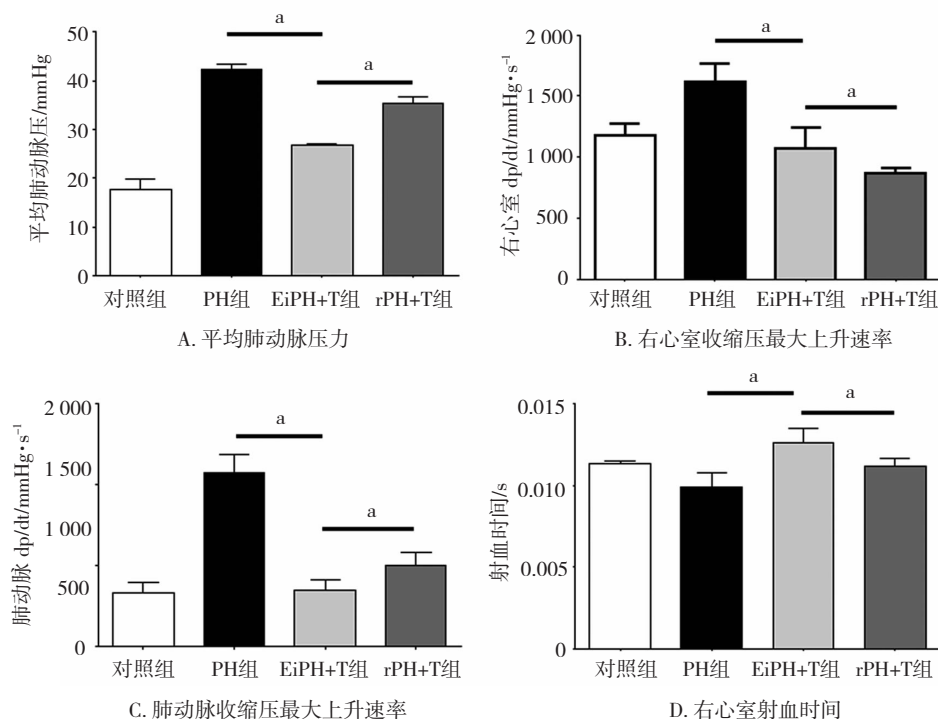
实验终点 EiPH+T 组与 rPH+T 组相比体质量明显增加,

中位生存时间分别为 MCT 后第 28、29 天,EiPH+T 组与 rPH+T 组大鼠实验终点生存率未见明显差异(44.4% vs. 16.7%, $P=0.06$)(图 8)。



注:a,与 EiPH 组大鼠相比, $P < 0.05$

图 5 MCT 注射后第 35 天,大鼠超声心动图参数



注:a,与 EiPH 组大鼠相比, $P=0.000$

图 6 MCT 注射后第 35 天,静息状态下右心导管检测大鼠血流动力学

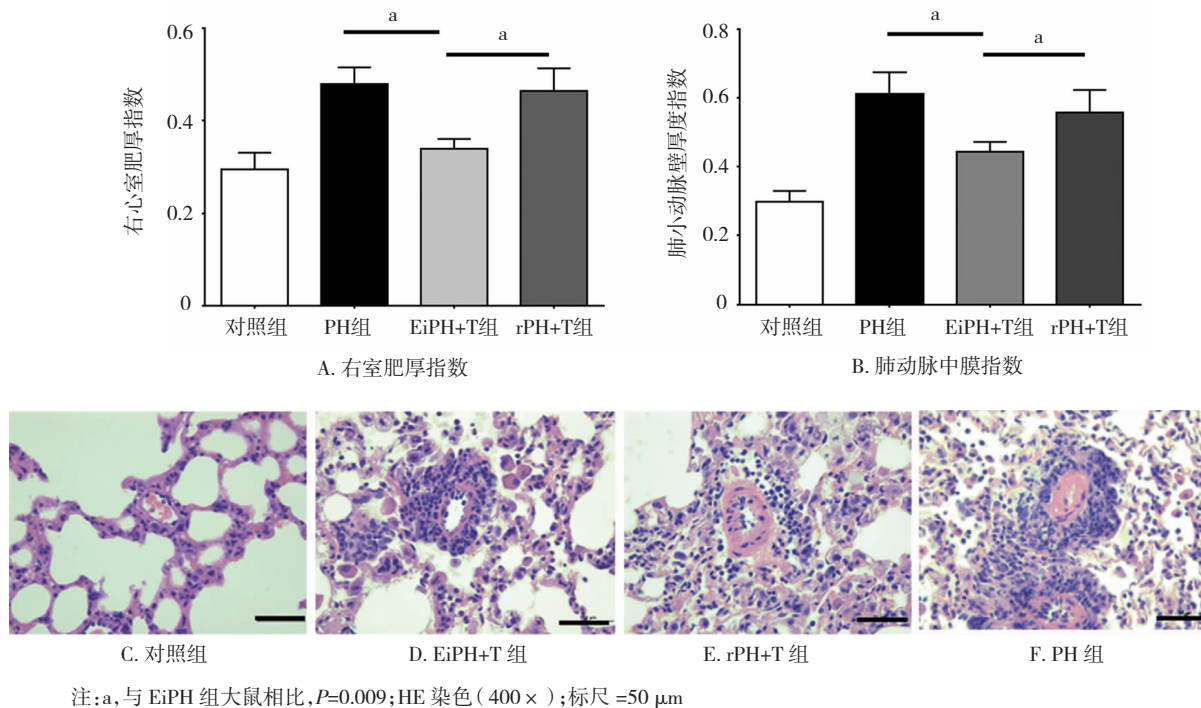


图 7 肺组织学病理结果

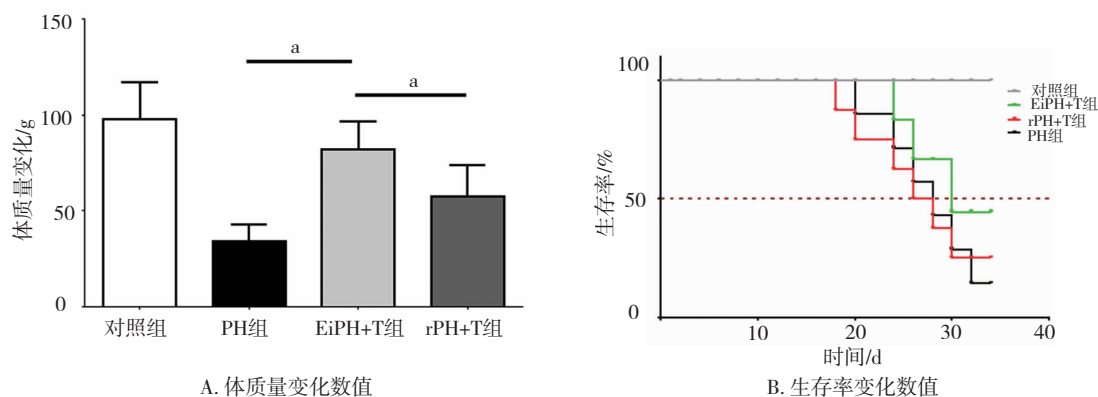


图 8 实验终点大鼠体质量差值与生存率

3 讨论

通常情况下肺循环为高排量、低阻力、低压力系统。正常人为适应运动过程中较安静时增加 3~5 倍 CO, 肺血管以最大程度舒张。此时, 肺动脉顺应性良好, 肺血管阻力较低^[10,22]。iCPET 为一种临床诊断手段, 可测定血流动力学参数和血气分析, 用于确认常规方法诊断困难的亚临床性疾病包括早期的肺血管疾病、运动诱发的舒张性心力衰竭等^[23]。健

康人 $\text{mPAP}_{\text{max}} < 30 \text{ mmHg}$, 而肺血管病患者运动时 mPAP_{max} 可明显增加, iCPET 适用于早期诊断 PH。同时, 有研究指出 EiPH 可能并不是真正意义上的 PH 前期, 在未严格筛选受试者的情况下大于 70 岁无肺部疾病与左心肌病的老年人在运动过程中可引起 $\text{mPAP}_{\text{max}} > 30 \text{ mmHg}$ ^[24]。但 EiPH 的诊断标准依然可以通过校正 CO 的方式使其更具有诊断性意义^[25]。随后的研究更倾向于使用运动过程中的 mPAP -CO 斜率来反映肺循环情况。mPAP-CO 斜率增加可能与运动能力降低及 RV 后负荷增加有关^[26-29]。运动诱发

肺动脉压力异常升高的原因可能与心力衰竭和(或)潜在性的肺血管疾病有关,而 EiPH 与运动能力下降和预后不良有关这一观点进一步支持了 iCPET 可作为检测 PH 早期肺血管功能异常的手段,但其原因与机制尚不清楚。早期 PH 患者的 PA 在运动负荷下的功能变化,PA 及 RV 重构的情况尚不明确,以及何种类型的 PH 在早期阶段可以出现运动诱发肺动脉压力异常升高。随着 iCPET 在 PH 领域的发展应用,EiPH 动物模型有非常重要的意义。此研究发现运动过程中升高的肺动脉压力是对 MCT 诱导后大鼠异常肺动脉功能的直接反应,在 MCT 注射后第 7 天即可检测到大鼠运动时 $mPAP_{max}$ 异常升高,实现了对 MCT 诱导大鼠 PH 的早期诊断。

有研究发现,早期干预 MCT 诱导的 PH 大鼠,其预后包括 $mPAP$ 、RVH 及生存时间明显优于成模后才予以干预的 PH 大鼠,越早对大鼠进行干预获益越大^[30]。此外,已有的研究中对大鼠进行早期干预的时间点选择为 MCT 注射当天给予治疗直至实验终点,此方法符合早期干预的概念,并且能使早期干预的效果发挥到最大,但此种干预方式为无明确干预指征的无差别预防性治疗。在临床诊疗过程中很难给予无症状且存在高致病风险的人群进行诊治,故无法及时给予高危人群治疗。本研究在遵循早期干预的基础上,首先成功通过运动试验过程中检测 $mPAP$ 指标,筛选出运动时 $mPAP_{max} > 30$ mmHg 的个体,明确干预时间点,同时明确了早期治疗指征。对尚无静息血流动力学指标改变的早期 PH 大鼠有指向性地进行为期 2 周的阶段性药物干预,不同于已有研究中持续干预至实验终点的方案,极大程度节约了时间与成本。本实验结果显示,在运动状态下检测出 $mPAP_{max} > 30$ mmHg 时给予药物干预,治疗 2 周后停止治疗,常规饲养,至实验终点肺动脉中膜未见明显增厚,肺动脉未见明显重塑,右心室未见明显肥厚;即使对 rPH 组大鼠给予相同干预时间,相同剂量的干预药物,但实验终点时已经发生重塑的 PA 与 RV 并不能明显逆转,治疗的效果只局限于缓解现有症状。

研究表明他达那非作为临床治疗 PH 的靶向药物可通过特异性抑制磷酸二酯酶-5,从而增加肺血管中鸟苷酸环化酶浓度,使肺血管舒张,降低肺动脉压力,对改善 PH 患者症状有明显的疗效^[31]。本实验

EiPH 组大鼠与 rPH 组大鼠均予以等量他达那非,等时间灌胃给药;而灌胃给药是一种侵入性干预手段,在灌胃过程由于手法不当可能会对大鼠食管造成损伤甚至出现食管穿孔破裂。经解剖未存活至实验终点的大鼠发现,EiPH 组与 rPH 组中各有一只大鼠存在胸段食管穿瘘,考虑因食管瘘引起炎症导致胸腔内严重粘连,最终动物死亡。此次试验周期为 35 d,并非用于研究及观察 PH 大鼠长期预后^[30,32]。同时,实验开始时每组大鼠数量为 10 只,实验动物数量较少。这些原因可能导致实验终点时 EiPH 组与 rPH 组大鼠相比生存率差异无统计学意义。

4 结 论

此研究成功建立 MCT 诱导运动诱发肺动脉高压大鼠模型并对比了他达那非早期干预及晚期干预对肺动脉压力及肺血管重构的影响。运动诱发的肺动脉压力增高可作为提示早期肺动脉功能异常的参考指标。早期诊断并干预 PH 可明显改善肺血管重塑,降低肺动脉压力。早期阶段干预可有效抑制 PA 平滑肌细胞增殖,改善右心功能,延缓疾病进展。EiPH 动物模型可能为探索早期明确诊断 PH 和治疗 PH 提供新思路。

参 考 文 献

- [1] Hoepfer MM, Bogaard HJ, Condliffe R, et al. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension[J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 62(25 S): D42-D50.
- [2] Frost A, Badesch D, Gibbs JSR, et al. Diagnosis of pulmonary hypertension[J]. J Eur Respir J, 2019, 53(1): 1801904.
- [3] Rich JD, Rich S. Clinical diagnosis of pulmonary hypertension[J]. Circulation, 2014, 130(20): 1820-1830.
- [4] Tiosano S, Versini M, Dar Antaki L, et al. The long-term prognostic significance of sarcoidosis-associated pulmonary hypertension—a cohort study[J]. Clin Immunol, 2018, 66(18): 30722-30728.
- [5] Lim Y, Low TT, Chan SP, et al. Pulmonary arterial hypertension in a multi-ethnic Asian population: characteristics, survival and mortality predictors from a 14-year follow-up study[J]. Respirology, 2019, 24(2): 162-170.
- [6] Kovacs G, Avian A, Tscherner M, et al. Characterization of patients with borderline pulmonary arterial pressure[J]. Chest, 2014, 146(6): 1486-1493.
- [7] Farina S, Correale M, Bruno N, et al. The role of cardiopulmonary

- exercise tests in pulmonary arterial hypertension[J]. *Eur Respir Rev*, 2018, 27(148): 170134.
- [8] Naeije R, Vonk Noordegraaf A, Kovacs G. Exercise-induced pulmonary hypertension: at last! [J]. *Eur Respir J*, 2015, 46(3): 583–586.
- [9] Mullin CJ, Hsu S, Amancerla K, et al. Evaluation of criteria for exercise-induced pulmonary hypertension in patients with resting pulmonary hypertension[J]. *Eur Respir J*, 2017, 50(3): 1700784.
- [10] 朱中凯, 黄 玮. 心肺运动试验诊断肺高血压临床应用[J]. *中国实用内科学杂志*, 2017, 37(5): 380–382.
- [11] Caravita S, Dewachter C, Soranna D, et al. Haemodynamics to predict outcome in pulmonary hypertension due to left heart disease: a meta-analysis[J]. *Eur Respir J*, 2018, 51(4): 1702427.
- [12] Farber HW, Miller DP, Poms AD, et al. Five-year outcomes of patients enrolled in the reveal registry[J]. *Chest*, 2015, 148(4): 1043–1054.
- [13] Haddad F, Spruijt OA, Denault AY, et al. Right heart score for predicting outcome in idiopathic, familial, or drug- and toxin-associated pulmonary arterial hypertension[J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2015, 8(6): 627–638.
- [14] Rubin LJ, Badesch DB, Fleming TR, et al. Long-term treatment with sildenafil citrate in pulmonary arterial hypertension: the super-2 study[J]. *Chest*, 2011, 140(5): 1274–1283.
- [15] Jansa P, Jarkovsky J, Al-Hiti H, et al. Epidemiology and long-term survival of pulmonary arterial hypertension in the Czech Republic: a retrospective analysis of a nationwide registry[J]. *BMC Pulm Med*, 2014, 14: 45.
- [16] Olsson KM, Delcroix M, Ghofrani HA, et al. Anticoagulation and survival in pulmonary arterial hypertension: results from the comparative, prospective registry of newly initiated therapies for pulmonary hypertension (COMPERA)[J]. *Circulation*, 2014, 129(1): 57–65.
- [17] Benza RL, Miller DP, Gomberg-Maitland M, et al. Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the registry to evaluate early and long-term pulmonary arterial hypertension disease management (REVEAL)[J]. *Circulation*, 2010, 122(2): 164–172.
- [18] Barst RJ, McGoon MD, Elliott CG, et al. Survival in childhood pulmonary arterial hypertension[J]. *Circulation*, 2012, 125(1): 113–122.
- [19] Galie N, Humbert M, Vachiery JL, et al. 2015 ESC/ERS guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the joint task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS); Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT)[J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(1): 67–119.
- [20] Coste F, Guibert C, Magat J, et al. Chronic hypoxia aggravates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: a rodent relevant model to the human severe form of the disease[J]. *Respir Res*, 2017, 18(1): 47.
- [21] Morimatsu Y, Sakashita N, Komohara Y, et al. Development and characterization of an animal model of severe pulmonary arterial hypertension[J]. *J Vasc Res*, 2012, 49(1): 33–42.
- [22] Tolle JJ, Waxman AB, Van Horn TL, et al. Exercise-induced pulmonary arterial hypertension[J]. *Circulation*, 2008, 118(21): 2183–2189.
- [23] Waxman AB. Exercise physiology and pulmonary arterial hypertension[J]. *Progr Cardiovasc Dis*, 2012, 55(2): 172–179.
- [24] Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, et al. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review[J]. *Eur Respir J*, 2009, 34(4): 888–894.
- [25] Herve P, Lau EM, Sitbon O, et al. Criteria for diagnosis of exercise pulmonary hypertension[J]. *Eur Respir J*, 2015, 46(3): 728–737.
- [26] Kovacs G, Maier R, Aberer E, et al. Borderline pulmonary arterial pressure is associated with decreased exercise capacity in scleroderma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180(9): 661–686.
- [27] Degani-Costa LH, Leverage B, Digumarthy SR, et al. Pulmonary vascular response patterns during exercise in interstitial lung disease[J]. *Eur Respir J*, 2015, 46(3): 738–749.
- [28] La Gerche A, MacIsaac AL, Burns AT, et al. Pulmonary transit of agitated contrast is associated with enhanced pulmonary vascular reserve and right ventricular function at exercise[J]. *J Appl Physiol*, 2010, 109(5): 1307–1317.
- [29] Lalande S, Yerly P, Faoro V, et al. Pulmonary vascular distensibility predicts aerobic capacity in healthy individuals[J]. *J Physiology*, 2012, 590(17): 4279–4288.
- [30] Sawamura F, Kato M, Fujita K, et al. Tadalafil, a long-acting inhibitor of PDE5, improves pulmonary hemodynamics and survival rate of monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension in rats[J]. *J Pharmacol Sci*, 2009, 111(3): 235–243.
- [31] Oudiz RJ, Brundage BH, Galie N, et al. Tadalafil for the treatment of pulmonary arterial hypertension: a double-blind 52-week uncontrolled extension study[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60(8): 768–774.
- [32] Wang L, Jia H, Tower RJ, et al. Analysis of short-term treatment with the phosphodiesterase type 5 inhibitor Tadalafil on long bone development in young rats[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2018, 315(4): E446–E453.

(责任编辑:唐秋姗)