

多西他赛对野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压的治疗作用

郑常龙¹, 陈天天¹, 詹蔚¹, 邹勇², 邓凯³, 符永玫¹

(1. 中山大学附属第三医院急诊科, 2. 中山大学附属第三医院输血科, 广东广州 510630; 3. 广州医科大学附属广州市第八人民医院研究所, 广东广州 510080)

摘要:【目的】研究多西他赛对野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压的作用及可能机制。【方法】50只雄性SD大鼠随机分为5组: 正常对照组(control)、多西他赛组(control+DTX)、野百合碱组(MCT)、野百合碱+溶媒组(MCT+SOL)和野百合碱+多西他赛组(MCT+DTX)。后3组大鼠一次性腹腔注射野百合碱(60 mg/kg)建立肺动脉高压模型。野百合碱注射后第21天和第28天, 经尾静脉注射多西他赛(5 mg/kg)或溶媒进行干预。多导生理记录仪测定大鼠右心血流动力学, 计算右心室肥厚指数(RVHI); 左肺病理切片行van Geison染色, 光镜下观察肺内小动脉病理改变, 并计算肺小动脉中膜厚度与血管直径比值。Western blotting检测右肺组织中p-PDGFR和PDGFR的表达水平。【结果】与control组相比, MCT和MCT+SOL组大鼠的RVSP、RVHI、肺小动脉中膜厚度与血管直径比值、p-PDGFR和PDGFR的表达均显著增加($P < 0.05$); 与MCT+SOL组相比, MCT+DTX组RVSP、RVHI、肺小动脉中膜厚度与血管直径比值、p-PDGFR和PDGFR的表达均显著下降($P < 0.05$); Control+DTX组与control组相比, 以上指标的差异均无显著性($P > 0.05$)。【结论】多西他赛可降低野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压、减轻肺血管重构, 其机制可能与抑制PDGFR的表达及其磷酸化有关。

关键词:肺动脉高压; 野百合碱; 多西他赛; 血小板源性衍生因子受体

中图分类号: R54 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2018)05-0654-06

Treatment of Docetaxel on Pulmonary Arterial Hypertension Induced by Monocrotaline in Rats

ZHENG Chang-long¹, CHEN Tian-tian¹, ZHAN Wei¹, ZOU Yong², DENG Kai³, FU Yong-mei¹

(1. Department of Emergency, 2. Department of Blood Transfusion, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 3. Research Institute of Guangzhou Eighth People's Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: FU Yong-mei, E-mail: fuyongmei1973@163.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect and mechanism of docetaxel on pulmonary hypertension induced by monocrotaline in rats. 【Methods】 50 male SD rats were randomly divided into five groups: normal control group (control), docetaxel group (control+DTX), monocrotaline group (MCT), monocrotaline+ dissolvent group (MCT+SOL) and monocrotaline+docetaxel group (MCT+DTX). The rats in the later three groups were intraperitoneally injected with monocrotaline (60 mg/kg) to establish the pulmonary hypertension model. Docetaxel (5 mg/kg) or solvent was respectively injected from the tail vein at the 21st day and 28th day after monocrotaline injection. The right ventricular systolic pressure (RVSP) and right ventricular hypertrophy index (RVHI) were measured. The left lung tissue slices were stained with van Geison staining. The morphological changes of pulmonary arterioles were observed, and the ratio of median thickness and

收稿日期: 2018-04-26

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81500287); 广东省科技发展专项基金(2017A030310035); 广东省自然科学基金(2016A030313357)

作者简介: 郑常龙, 主治医师, 从事急诊与危重症研究, E-mail: zhengchanglong@163.com; 符永玫, 通信作者, E-mail: fuyongmei1973@163.com

vessel diameter of pulmonary arterioles was calculated. The expression of p-PDGFR and PDGFR in right lung tissues was detected by western blotting. 【Results】RVSP, RVHI, the ratio of median thickness and vessel diameter of pulmonary arterioles and the level of p-PDGFR and PDGFR in the MCT group and MCT+SOL group were significantly increased compared with those in the normal control group ($P < 0.05$). Compared with the MCT+SOL group, these parameters of RVSP, RVHI, the ratio of median thickness and vessel diameter of pulmonary arterioles and the expression of p-PDGFR and PDGFR were significantly decreased in MCT+DTX group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the above parameters between control+DTX group and control group ($P > 0.05$). 【Conclusion】Docetaxel is capable of reducing pulmonary hypertension and reversing pulmonary vascular remodeling on pulmonary hypertension induced by monocrotaline in rats, which may be related to the inhibition of PDGFR expression and its phosphorylation.

Key words: pulmonary hypertension; monocrotaline; docetaxel; platelet derived growth factor receptor

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(5): 654-659]

肺动脉高压 (pulmonary artery hypertension, PAH) 是一种进行性加重的致命性疾病, 其主要特征是肺血管重构和肺血管阻力进行性增高, 最终右心功能衰竭甚至死亡^[1]。有研究表明, 肺血管重构与肺血管内皮细胞损伤、肺动脉平滑肌细胞异常增殖和移行导致肺内小动脉中膜肥厚、管腔狭窄有关^[2]。多西他赛 (docetaxol, DTX) 是一种紫杉醇类抗肿瘤药物, 可通过干扰细胞有丝分裂及分裂间期细胞功能所必需的微管网络而起到抗肿瘤作用, 临床上主要用于乳腺癌、非小细胞肺癌和卵巢癌等的辅助化疗^[3]。研究表明, 多西他赛可通过阻断血小板源性衍生因子受体 (platelet derived growth factor receptor, PDGFR) 磷酸化从而抑制血管平滑肌细胞异常增殖^[4]。那么, 多西他赛能否在体内通过抑制血管平滑肌细胞的异常增殖而减轻肺血管重构从而治疗肺动脉高压呢? 目前国内尚未见相关报道。本实验在野百合碱 (monocrotaline, MCT) 诱导的肺动脉高压大鼠模型中观察多西他赛的干预作用, 并探讨其作用的可能机制, 为临床上肺动脉高压的治疗提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 实验动物和材料

该实验所用 SD 大鼠购自中山大学实验动物中心, 并饲养于该中心 SPF 级动物房。实验动物生产和使用许可证分别为: SCXK (粤) 2016-0029 和 SYXK (粤) 2017-0081。饲养环境为恒温 (22 ± 2) °C, 恒湿 (55 ± 5)%, 每天照明 12 h, 自由饮水进

食。野百合碱购自美国 Sigma 公司; 多西他赛购自美国 Selleck Chemicals 公司; p-PDGFR、PDGFR 和 β -actin 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。MP150 多导生理记录仪购自美国 BIOPAC 公司。本动物实验经中山大学实验动物伦理委员会批准, 并根据中山大学动物实验中心的实验动物操作标准进行。

1.2 动物分组和模型建立

使用随机数字表法将 50 只 8 周龄 (体质量 220 ~ 250 g) 雄性 SD 大鼠随机分为 5 组, 每组 10 只: 正常对照组 (control)、野百合碱组 (MCT)、野百合碱 + 溶媒组 (MCT+SOL)、野百合碱 + 多西他赛组 (MCT+DTX) 和多西他赛组 (control+DTX)。MCT 组、MCT+SOL 组和 MCT+DTX 组大鼠一次性经腹腔注射野百合碱 (60 mg/kg) 建立肺动脉高压模型, control 组和 control+DTX 组经腹腔注射生理盐水作对照。腹腔注射后第 21 天和第 28 天, MCT+DTX 组、control+DTX 组和 MCT+SOL 大鼠分别经尾静脉缓慢注射多西他赛 (5 mg/kg) 或溶媒 (30% 聚乙二醇 300+5% 吐温 80+双蒸水), control 组和 MCT 组大鼠经尾静脉注射生理盐水作对照。

1.3 血流动力学指标和右心室肥厚指数的测定

野百合碱注射后第 35 天, 所有动物经腹腔内注射戊巴比妥钠 (依体质量 40 mg/kg) 麻醉后固定于小动物手术台, 右侧颈部行纵形切口, 钝性分离右颈外静脉, 远心端结扎, 在近心端剪开颈外静脉约 1/3, 用预充盈肝素钠盐水的 PE-100 聚乙烯管缓缓插入, 经上腔静脉入右心房后进入右心室, 聚

乙烯管连接三通管,通过换能器连接MP150生物信号采集系统,并根据显示器上的波形变化,确认导管进入右心室后记录右心室收缩压(right ventricular systolic pressure, RVSP)和心率(heart rate, HR)。稳定记录10~15 min后保存数据,撤出导管,结扎右颈外静脉。放血处死大鼠后,分离大鼠心脏,剪去左、右心房及大血管根部,4 ℃ PBS冲洗干净后将心室剪为右心室游离壁(RV)、左心室和室间隔(LV+S)两部分,分别称重,计算两者重量的比值即为右心室肥厚指数(right ventricle hypertrophy index, RVHI),即 $RVHI = RV / (LV+S)$ 。

1.4 肺小动脉病理改变及中膜/外径比值测定

分离出大鼠肺组织,经4 ℃ PBS反复冲洗干净,将右肺组织经液氮冷冻后置于-80 ℃冰箱冻存,切取左下肺组织(厚度约5 mm),经40 g/L多聚甲醛溶液固定、梯度酒精脱水、包埋后制成石蜡切片行van Geison染色,在光学显微镜下观察肺内小动脉的病理改变,每张切片随机选取管径在25~100 μm肺小动脉20根,运用图像分析软件测量小动脉中膜和血管外径的厚度,并分别计算血管直径在25~50 μm以及51~100 μm的肺小动脉的中膜/外径比值进行统计分析。

1.5 Western blotting 检测肺组织中 p-PDGFR 和 PDGFR 的表达

取约100 mg左右冻存右肺组织,加入500 μL组织蛋白裂解液,在研磨器中充分研磨、冰上静置30 min后于4 ℃ 12 000 r/min($r = 7$ cm)高速离心提取总蛋白质。Bradford方法测定蛋白质浓度。用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法将等量蛋白质进行分离并转移至PVDF膜上,用含10 g/L小牛血清白蛋白的TBS-T溶液封闭2 h后,分别加入抗p-PDGFR、PDGFR和β-actin抗体(1:1 000),4 ℃孵育过夜。洗膜后加入辣根过氧化物酶(HRPO)偶联羊抗兔或小鼠IgG孵育2 h,TBS-T洗膜后用化学底物进行发光显迹。最后用IBAS图像处理系统对胶片进行扫描,应用Image图像分析软件分析各条带的灰度值进行比较。

1.6 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,多重比较采用LSD法,采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量和血流动力学指标的比较

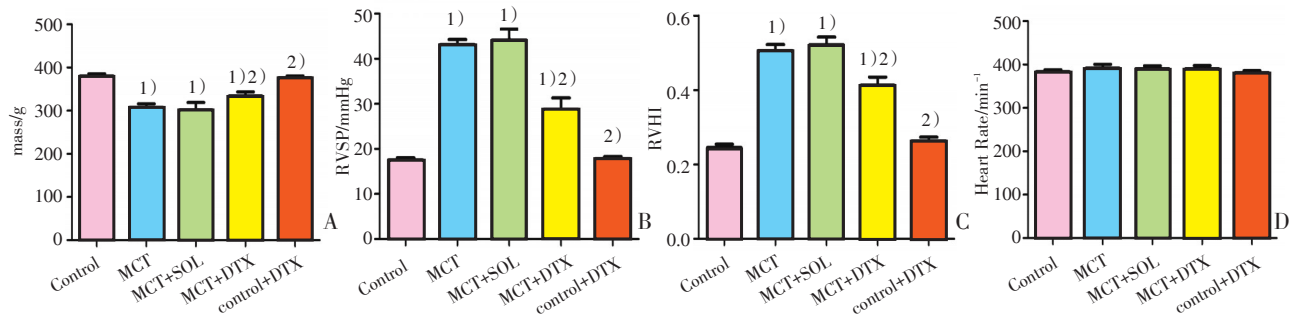
到达实验终点时,MCT组和MCT+SOL组大鼠的体质量(g)分别为 308 ± 22 和 302 ± 18 ,均明显低于control组(380.7 ± 14.7 , P 皆 < 0.001),MCT+DTX组大鼠体质量(334 ± 25)g,显著高于MCT组和MCT+SOL组(P 值分别为0.046和0.020,图1A)与control组相比,control+DTX组大鼠的大鼠的RVSP和RVHI均无显著差异(P 值分别为0.873和0.689),MCT组和MCT+SOL组RVSP和RVHI均显著升高,差异有统计学意义(均 $P < 0.001$),表明野百合碱诱导的肺动脉高压模型建立成功。与MCT+SOL组相比,MCT+DTX组大鼠的RVSP和RVHI明显降低(均 $P < 0.001$;图1B、1C)。五组大鼠的心率均无显著差异($F = 0.677$, $P = 0.613$;图1D)。

2.2 各组大鼠肺内小动脉的病理变化

肺组织切片van Geison染色结果提示,与control组相比,control+DTX组肺内小动脉在形态上无明显变化(图2A,2E),而MCT组和MCT+SOL组大鼠肺小动脉中膜明显增厚(图2B,2C);与MCT+SOL组相比,MCT+DTX组肺动脉中膜肥厚程度明显减轻(图2D)。血管直径分别在25~50 μm和51~100 μm的肺小动脉中膜厚度/血管直径比值的统计结果提示:野百合碱注射可导致肺小动脉中膜厚度/血管直径比显著增加,经多西他赛干预后肺小动脉中膜厚度/血管直径比可明显下降,差异有统计学意义(25~50 μm, $F = 62.513$, $P < 0.001$;51~100 μm $F = 29.553$, $P < 0.001$)。而control+DTX组与control组相比,中膜厚度/血管直径比值无明显差异($P > 0.05$),提示多西他赛可减轻野百合碱诱导的肺血管的重构,而对正常肺动脉无明显影响(图2F,2G)。

2.3 各组大鼠肺组织 p-PDGFR 和 PDGFR 的表达

Western blotting检测结果提示,与control组相比,control+DTX组大鼠肺组织中p-PDGFR和PDGFR的表达无明显改变,MCT组和MCT+SOL组p-PDGFR和PDGFR的表达均明显上调,而与MCT+SOL组相比,MCT+DTX组大鼠肺组织中p-PDGFR和PDGFR的表达均显著下调,差异具有统计学意义(p-PDGFR, $F = 53.764$, $P < 0.001$;PDGFR, $F = 54.429$, $P < 0.001$;图3)。



Comparison of body mass (A), RVSP (B), RVHI (C) and heart rate (D) of rats in each group 5 weeks after MCT injection. RVSP: right ventricular systolic pressure; RVHI: right ventricle hypertrophy index; 1) $P < 0.05$, versus control; 2) $P < 0.05$ versus MCT+SOL.

图1 多西他赛减轻野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压

Fig.1 Docetaxel reduced pulmonary hypertension induced by monocrotaline in rat

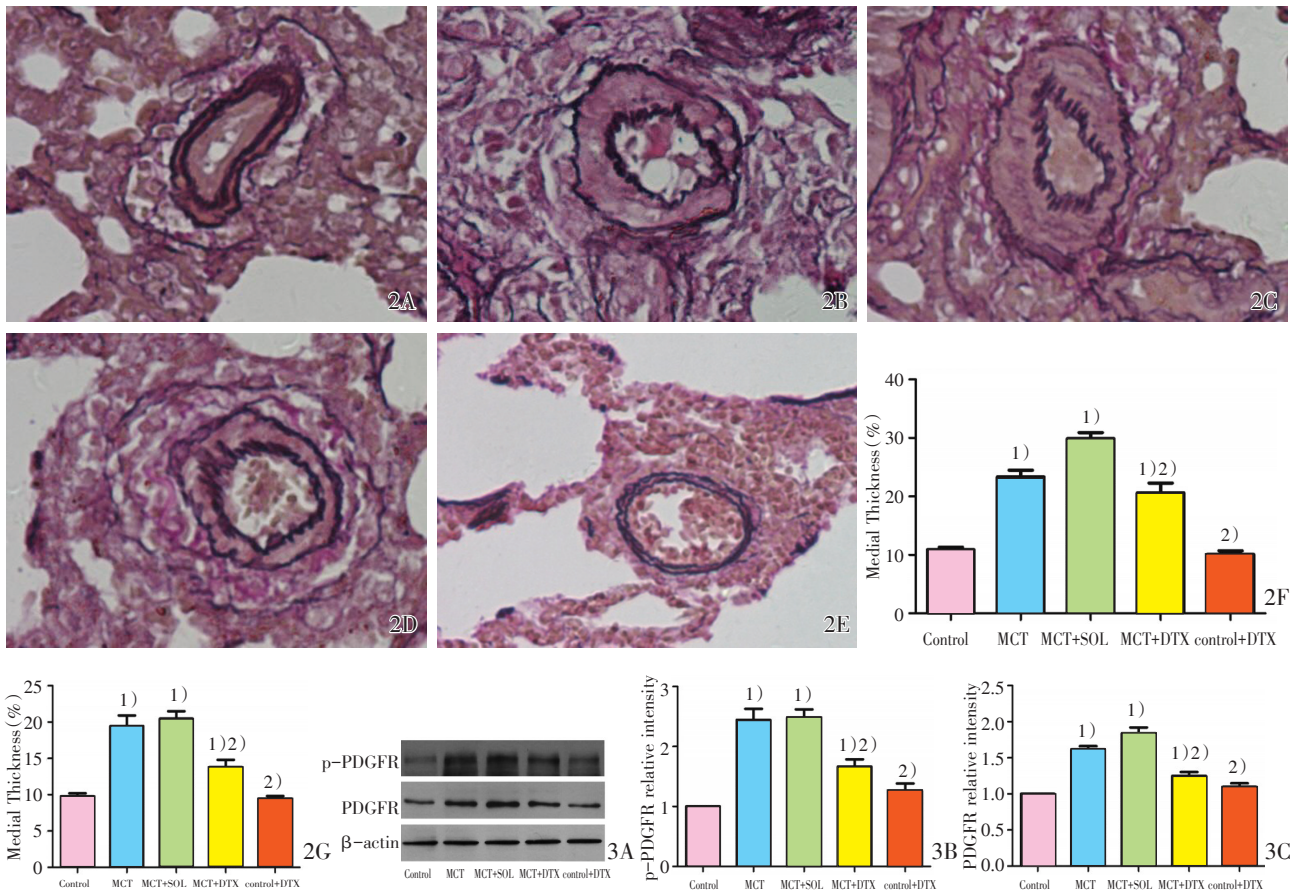
3 讨论

本研究中,野百合碱注射5周后,MCT组和MCT+SOL组大鼠RVSP和RVHI均明显高于正常对照组、肺小动脉中膜厚度及肺小动脉中膜/外径比值也显著高于正常对照组,表明大鼠肺动脉高压模型建立成功。我们的研究结果显示:多西他赛干预2周可显著降低野百合碱诱导的大鼠右心室收缩压、减轻肺血管重构,而多西他赛对正常大鼠的右室收缩压和肺血管重构无明显影响。此外,本研究的结果还表明,野百合碱可导致肺组织p-PDGFR和PDGFR的表达均明显上调,而多西他赛干预可显著降低肺动脉高压大鼠肺组织中PDGFR的表达、减少其磷酸化,提示多西他赛治疗肺动脉高压的机制可能与下调PDGFR的表达、抑制PDGFR磷酸化有关。

多项研究的结果表明,肺动脉血管平滑肌细胞的异常增殖和移行在肺动脉高压的形成和肺血管重构中起着非常重要的作用^[2,5]。越来越多学者认为,肺动脉高压模型中肺动脉血管平滑肌细胞的异常增殖和肿瘤细胞的增殖很相似^[6]。Suzuki等^[7]认为,至少有三类抗肿瘤药物(包括蒽环类、紫杉类药物,和蛋白酶体抑制剂)可以抑制肺动脉平滑肌细胞的异常增殖、减轻肺血管重构。这些药物杀死了异常增殖的肺血管细胞,而不影响正常、健康的肺血管细胞。多西他赛是一种由欧洲浆果紫杉的针叶中提取的化合物半合成的紫杉醇衍生物,其作用机理与紫杉醇类似但疗效明

显强于紫杉醇,可通过促进微管双聚体装配成微管,同时防止去多聚化过程而使微管稳定,阻滞细胞于G2和M期,从而抑制细胞的有丝分裂和增殖^[8]。我们的结果提示,多西他赛明显减轻了野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠的肺内小动脉中膜厚度,改善了肺血管的重构、降低了肺动脉压力,而对肺动脉压正常的大鼠无明显作用,这可能与多西他赛对异常增殖肺血管平滑肌细胞有抑制作用,而对正常的肺动脉平滑肌细胞的增殖无明显抑制作用有关^[4],其具体的机制仍需进一步研究以明确。

血小板源性生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)是一种单链跨膜糖蛋白,属于Ⅲ型酪氨酸蛋白激酶家族成员,主要分布于平滑肌细胞、成纤维细胞、内皮细胞等^[9]。PDGFR与配体结合后发生受体各亚单位二聚化,酪氨酸激酶区活化和自身磷酸化反应,引起不同信号转导通路级联反应的发生,在细胞有丝分裂、细胞骨架重排等与生长增殖密切相关的事件中起到重要作用^[9]。PDGF可诱导血管平滑肌细胞的异常增殖^[10],而多西他赛可以明显抑制PDGF-BB信号通路的下游分子,如细胞外信号调节激酶1/2、Akt和磷脂酶C- γ 1的磷酸化,从而抑制血管平滑肌细胞的增殖^[4]。在本研究中,我们发现,野百合碱可以导致肺组织中PDGFR及磷酸化PDGFR表达明显上调,而多西他赛可以有效下调PDGFR的表达,并抑制其磷酸化。由此我们推测,多西他赛治疗肺动脉高压的机制可能与下调PDGFR的表达、抑制PDGFR磷酸化有关,但其具



Morphological changes in the pulmonary arterioles of rats in each group (2A-F: control, MCT, MCT+sol, MCT+DTX, control+DTX; van Geison staining, $\times 400$), ratio of median thickness and vessel diameter of pulmonary arterioles with outer diameter in 25 ~ 50 μm (2F) and 51 ~ 100 μm (2G). 1) $P < 0.05$, vs control; 2) $P < 0.05$ vs MCT+SOL.

图2 多西他赛改善野百合碱诱导的大鼠肺内小动脉重构

Fig.2 Docetaxel improved pulmonary arterioles remodeling induced by monocrotaline in rats

The expression of p-PDGFR and PDGFR in lung tissue of rats in each group was detected by western blotting (3A). The relative intensity of p-PDGFR (3B) and PDGFR (3C) was normalized to β -actin. 1) $P < 0.05$, versus control; 2) $P < 0.05$ versus MCT+SOL.

图3 多西他赛抑制野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠肺组织中 p-PDGFR 和 PDGFR 的表达

Fig.3 Docetaxel inhibited the expression of p-PDGFR and PDGFR in lung tissue of rats with pulmonary hypertension induced by monocrotaline

体机制是否通过抑制 PDGF 下游的信号分子如 ERK1/2 和 AKT 等,从而抑制肺动脉平滑肌细胞的增殖,仍需在细胞水平作进一步研究以明确。Xiao 等^[11]的研究发现 PDGF 可通过活化 PI3K/AKT 通路,促进肺动脉血管平滑肌细胞增殖。而 PDGFR 的选择性抑制剂可降低野百合碱诱导的肺血管重构^[12]。由此可见,PDGFR 可能是一个潜在的肺动脉高压的治疗靶点。

最近, Ibrahim 等^[13]的研究结果发现,在缺氧导致的大鼠肺动脉高压模型中,多西他赛可以通过降低自噬和减轻右心室纤维化从而减低肺动脉

的压力。本研究与 Ibrahim 等的研究有以下不同:其一,本研究采用的野百合碱诱导的肺动脉高压模型而非缺氧模型。野百合碱是一种无活性的双吡咯类生物碱,经肝脏细胞色素 P450 单氧化酶代谢后生成有活性的吡咯野百合碱,经血液循环到达肺脏,并选择性损伤肺血管内皮细胞、促进血管平滑肌异常增殖和迁移,最终导致肺血管重构和肺动脉压升高甚至右心衰竭^[14]。大鼠是目前研究 MCT 诱导的 PAH 的首选物种。单次经腹腔或皮下注射 MCT(常用剂量为 60 mg/kg),3 周即可形成 PAH,5 ~ 6 周时肺动脉压力进一步增高,大鼠可

出现体质量下降、食欲减退、呼吸困难等右心衰竭等症状^[14]。野百合碱诱导的肺动脉高压模型因其更好的模拟人类肺动脉高压的病理生理特征而被广泛用于肺动脉高压的相关研究^[15]；其二，本研究检测了肺组织中PDGFR及其磷酸化的表达，并发现多西他赛能显著降低野百合碱导致的PDGFR的表达，并抑制其磷酸化。本研究的结果提示PDGFR可能是一个潜在的肺动脉高压的治疗靶点，这有望为肺动脉高压的治疗提供新的思路。本研究中我们使用的多西他赛的剂量，采用了文

献^[13,16]中所使用常规剂量(5 mg/kg)。由于多西他赛难溶于水，其在溶媒中的溶解度亦较小，而肺动脉高压大鼠合并不同程度右心衰，尾静脉注射的液体总量受限，故本研究未设置高剂量组进行对比。

综上所述，多西他赛可有效降低野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压，减轻肺血管重构，其作用机制可能与抑制PDGFR的表达及其磷酸化有关。多西他赛有望成为一种新的治疗肺动脉高压的药物，但仍需更多实验进一步证实。

参考文献:

- [1] Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, et al. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management [J]. *BMJ*, 2018, 360(12): 5492-5499.
- [2] Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(12): 4306-4313.
- [3] Fojo T, Menefee M. Mechanisms of multidrug resistance: the potential role of microtubule-stabilizing agents [J]. *Ann Oncol*, 2007, 18 (Suppl 5): v3-8.
- [4] Park ES, Yoo JM, Lim Y, et al. Inhibitory effects of docetaxel on platelet-derived growth factor (PDGF) - BB- induced proliferation of vascular smooth muscle cells through blocking PDGF-receptor β phosphorylation [J]. *J Pharmacol Sci*, 2011, 116(2): 204-213.
- [5] Stenmark KR, Frid MG, Graham BB, et al. Dynamic and diverse changes in the functional properties of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(4): 551-564.
- [6] Voelkel NF, Cool C, Lee SD, et al. Primary pulmonary hypertension between inflammation and cancer [J]. *Chest*, 1998, 114(3 Suppl): 225S-230S.
- [7] Suzuki YJ, Ibrahim YF, Shults NV. Apoptosis-based therapy to treat pulmonary arterial hypertension [J]. *J Rare Dis Res Treat*, 2016, 1(2): 17-24.
- [8] Joerger M. Treatment regimens of classical and newer taxanes [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016, 77(2): 221-233.
- [9] Kazlauskas A. PDGFs and their receptors [J]. *Gene*, 2017, 614(1): 1-7.
- [10] Sachinidis A, Locher R, Vetter W, et al. Different effects of platelet-derived growth factor isoforms on rat vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(13): 10238-10243.
- [11] Xiao Y, Peng H, Hong C, et al. PDGF promotes the warburg effect in pulmonary arterial smooth muscle cells via activation of the PI3K/AKT/mTOR/HIF-1 α signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(4): 1603-1613.
- [12] Shaw DE, Baig F, Bruce I, et al. Optimization of platelet-derived growth factor receptor (pdgfr) inhibitors for duration of action, as an inhaled therapy for lung remodeling in pulmonary arterial hypertension [J]. *J Med Chem*, 2016, 59(17): 7901-7914.
- [13] Ibrahim YF, Shults NV, Rybka V, et al. Docetaxel reverses pulmonary vascular remodeling by decreasing autophagy and resolves right ventricular fibrosis [J]. *J Pharmacol Exp*, 2017, 363(1): 20-34.
- [14] Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(4): L363-369.
- [15] Nogueira-Ferreira R, Vitorino R, Ferreira R, et al. Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2015, 35(1): 8-16.
- [16] Worley DR, Hansen RJ, Wittenburg LA, et al. Docetaxel accumulates in lymphatic circulation following subcutaneous delivery compared to intravenous delivery in rats [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(10): 5071-5078.

(编辑 刘清海)