

缺氧性肺动脉高压新生大鼠肺血管重塑与肺血管 HIF-1 α 、ET-1、iNOS 表达的相关性研究

王建荣¹ 周英¹ 桑葵² 李明霞¹

(1 新疆医科大学第一附属医院新生儿科,新疆 乌鲁木齐 830054; 2 香港大学深圳医院,广东 深圳 518000)

[摘要] **目的** 了解缺氧性肺动脉高压(HPH)新生大鼠肺血管重塑与肺血管 HIF-1 α 、ET-1、iNOS 表达的相关性。**方法** 建立 HPH 新生大鼠模型,检测平均肺动脉压力(mPAP);并计算肺小动脉中层壁厚占肺小动脉的外径百分比(MT%)、肺小动脉管壁中层横截面积占肺小动脉总横截面积的百分比(MA%)作为肺血管重塑指标;免疫组化法检测新生大鼠肺组织中 HIF-1 α 、ET-1、iNOS 反应强度及 mRNA 表达;进行肺血管重塑与 HIF-1 α 、ET-1、iNOS mRNA 相关性分析。**结果** 缺氧 3、5、7、10、14、21 d,新生大鼠 mPAP 持续增高,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。缺氧 7 d 后 MT%、MA%明显高于对照组($P < 0.05$)。肺组织中 HIF-1 α 表达在缺氧 3、5、7、10 d 时显著高于对照组($P < 0.05$),其 mRNA 表达在 3、5、7 d 高于对照组($P < 0.05$);ET-1 表达在缺氧 3、5、7 d 时显著高于对照组($P < 0.05$),其 mRNA 表达在缺氧 3 d 时高于对照组($P < 0.05$);iNOS 蛋白及 mRNA 表达在缺氧 3、5、7 d 时均显著高于对照组($P < 0.05$)。MT% 和 MA%与 HIF-1 α mRNA 呈正相关(r 分别为 0.835、0.850, $P < 0.05$)。**结论** 新生大鼠缺氧 7 d 后肺血管出现重塑;HIF-1 α 、ET-1 及 iNOS 共同参与了新生大鼠 HPH 的发生及发展。

[中国当代儿科杂志,2013,15(2):138-144]

[关键词] 肺动脉高压;血管重塑;缺氧诱导因子-1 α ;内皮素-1;诱导型一氧化氮合酶;新生大鼠

Association between pulmonary vascular remodeling and expression of hypoxia-inducible factor-1 α , endothelin-1 and inducible nitric oxide synthase in pulmonary vessels in neonatal rats with hypoxic pulmonary hypertension

WANG Jian-Rong, ZHOU Ying, SANG Kui, LI Ming-Xia. Department of Neonatology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China (Li M-X, Email: limingxia1203@sohu.com)

Abstract: Objective To investigate the association between pulmonary vascular remodeling and expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), endothelin-1 (ET-1) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in pulmonary vessels in neonatal rats with hypoxic pulmonary hypertension (HPH). **Methods** A neonatal rat model of HPH was established as an HPH group, and normal neonatal rats were enrolled as a control group. The mean pulmonary arterial pressure (mPAP) was measured. The percentage of medial thickness to outer diameter of the small pulmonary arteries (MT%) and the percentage of medial cross-section area to total cross-section area of the pulmonary small arteries (MA%) were measured as the indicators for pulmonary vascular remodeling. The immunohistochemical reaction intensities for HIF-1 α , ET-1 and iNOS and their mRNA expression in lung tissues of neonatal rats were measured. Correlation analysis was performed to determine the relationship between pulmonary vascular remodeling and mRNA expression of HIF-1 α , ET-1 and iNOS. **Results** The mPAP of the HPH group kept increasing on days 3, 5, 7, 10, 14, and 21 of hypoxia, with a significant difference compared with the control group ($P < 0.05$). The HPH group had significantly higher MT% and MA% than the control group from day 7 of hypoxia ($P < 0.05$). HIF-1 α protein expression increased significantly on days 3, 5, 7 and 10 days of hypoxia, and HIF-1 α mRNA expression increased significantly on days 3, 5 and 7 days of hypoxia in the HPH group compared with the control group ($P < 0.05$). ET-1 protein expression increased significantly on days 3, 5 and 7 days of hypoxia and ET-1 mRNA expression increased significantly on day 3 of hypoxia in the HPH group compared with the control group ($P < 0.05$). Both iNOS protein and mRNA expression were significantly higher on days 3, 5 and 7 days of hypoxia than the control group ($P < 0.05$). Both MT% and MA% were positively correlated with HIF-1 α mRNA expression ($r = 0.835$ and 0.850 respectively; $P < 0.05$). **Conclusions** Pulmonary vascular remodeling is developed on

[收稿日期]2012-10-12;[修回日期]2012-11-02

[基金项目]国家自然科学基金(30960410)。

[作者简介]王建荣,女,硕士研究生,主治医师。现工作单位:新疆医科大学第五附属医院,邮编:830011。

[通信作者]李明霞,主任医师。

day 7 of hypoxia in neonatal rats. HIF-1 α , ET-1 and iNOS are all involved in the occurrence and development of HPH in neonatal rats. [Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(2):138-144]

Key words: Pulmonary hypertension; Vascular remodeling; Hypoxia-inducible factor-1 α ; Endothelin-1; Inducible nitric oxide synthase; Neonatal rats

新生儿缺氧性肺动脉高压(hypoxia-induced pulmonary hypertension, HPH)在临床上并不少见,若缺氧未及时得到纠正,肺动脉压力持续增高,肺血管可能出现不可逆性重塑改变,预后差。在成人相关研究中发现缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 alpha, HIF-1 α)及其下游目的基因内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)共同参与肺动脉高压的形成^[1],其中,肺血管内皮结构受损导致功能的改变被认为是 HPH 的始动因素^[2]。目前有关新生儿 HPH 时肺血管重塑和 HIF-1 α 、ET-1、iNOS 表达之间的关系报道较少。本研究拟通过了解新生大鼠缺氧后肺血管重塑及 HIF-1 α 、ET-1 及 iNOS 在肺血管中的表达,研究肺血管重塑与三因子之间的关系,以期为临床诊治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

120 只日龄 3~5 d Wistar 新生大鼠由新疆医科大学动物实验中心提供,平均体重 20 ± 5 g。随机分为实验组及对照组,实验组根据不同缺氧时间分为 3、5、7、10、14、21 d 6 组,每组 10 只,不同实验组分别设定同日龄正常对照组。

1.2 主要试剂及设备

主要试剂:VG 染色试剂盒由福州迈新生物技术开发有限公司提供,一抗采用兔抗鼠 HIF-1 α 、ET-1 及 iNOS 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),二抗选用山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体(中杉金桥生物工程有限公司),TRIzol 购自 Invitrogen 公司,反转录试剂盒购自 Fermentas 公司,PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司,PCR 引物由上海生工公司合成。

主要设备:特制常压低氧舱、氧浓度仪(CY-100B 型医用氧浓度测定仪,杭州利华科技有限公司)、小动物呼吸机(HX-200 型小动物呼吸机,成都泰盟科技有限公司)、电镜(日立 JEOL-1230,日本)、BX41TF 光学显微镜(日本奥林巴斯公司)、PIPS-2020 型病理图像分析软件。

1.3 实验方法

将实验组新生大鼠置于特制常压低氧舱内,由

气体输入口输入含 8% O₂ 的氮氧混合气,气体流速为 1.5 L/min 左右,使用氧浓度仪监测舱内氧浓度,使其维持在 $(10 \pm 0.5)\%$,通过电磁阀和减压阀对舱内压力进行调控,仓内置小风扇,以保证气体均匀。分别用钠石灰和无水氯化钙吸收舱内的 CO₂ 与水蒸气。昼/夜比为 12:12,每天低氧 8 h。对照组除所输入的气体为常压空气外,其余饲养条件同实验组。各组大鼠同期分别于第 3、5、7、10、14、21 天进行相关检测指标的检测。

1.4 标本采集

1.4.1 平均肺动脉压检测 各组大鼠在拟定时间点经氯胺酮(75 mg/kg)、地西泮(7.5 mg/kg)、阿托品(0.375 mg/kg)混合液腹腔内注射麻醉,经气管插管、接小动物呼吸机行机械通气(呼吸机参数:呼吸频率 100~120 次/min,潮气量 4~6 mL/min),开胸后在肺动脉根部用头皮针逆血流方向刺入肺动脉,头皮针另一端接压力传感器,通过多导生理记录仪记录平均肺动脉压(mPAP)。

1.4.2 观察大鼠肺动脉超微结构的变化 mPAP 测定后,立即处死大鼠,迅速切取大鼠右上肺组织并以 4% 多聚甲醛固定 1 周。常规石蜡包埋,连续切片,厚度 4 μ m。进行苦味酸-酸性品红染色(VG 染色),光镜下观察大鼠肺小动脉超微结构,每只大鼠观察 3 张切片。取右肺下叶末梢肺组织固定、漂洗、脱水、浸透、包埋、切片,电镜观察大鼠肺小动脉超微结构的变化,每只大鼠观察 3 张切片。

1.4.3 肺血管重塑指标检测及诊断标准 选取进行 VG 染色的大鼠肺组织切片,每隔 3 张选取 1 张,随机选取 3 张,选取的切片随机取 5 个视野,观察与呼吸性细支气管伴行的横断面积较圆、直径为 100~150 μ m 的肺小动脉 5 支,利用 PIPS-2020 型病理图像分析软件精确测量每张切片中肺小动脉的外径(ED)、肺小动脉中层壁厚(MT)、肺小动脉管壁中层横截面积(MA)、肺动脉血管总横截面积(TAA);同一大鼠不同切片所得上述值取平均值,然后计算肺小动脉中层壁厚占肺小动脉的外径百分比(MT%) [MT% = MT/ED]、肺小动脉管壁中层横截面积占肺小动脉总横截面积的百分比(MA%) [MA% = MA/TAA] 作为肺血管重塑指标^[3]。如实验组 MT%、MA% 较对照组比较差异有统计学意义

($P < 0.05$),则提示出现肺血管重塑,若仅为比值增高但差异无统计学意义($P > 0.05$),则认为是血管痉挛。

1.4.4 肺组织 HIF-1 α 、ET-1 及 iNOS 免疫组化

所有时间点的新生大鼠肺组织切片经常规脱蜡至水,热抗原修复。一抗采用兔抗鼠 HIF-1 α 、ET-1 及 iNOS 多克隆抗体,工作浓度 1:100,4℃ 过夜,PBS 冲洗 3 次,按照一抗来源,二抗选用山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体,37℃ 孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次。加新鲜配置 3,3'-二氨基联苯二胺盐酸盐(DAB)0.01 mol/L 显色,PBS 代替一抗作为阴性对照。每个标本隔 2 张选取 1 张切片,共 3 张切片,应用 BX41TF 光学显微镜采集标本图片,以细胞内出现棕黄色至黄色颗粒为阳性细胞,每张切片随机选取 10 个视野,统计每个视野阳性细胞数及全部细胞数,计算 30 个视野细胞总数并换算成阳性细胞数的百分比,将免疫组化强度分为“-”(阴性,阳性细胞 <1%);“+”(弱阳性,阳性细胞 1%~33%);“2+”(阳性,阳性细胞 34%~64%);“3+”(强阳性,阳性细胞 65%~100%)。

1.4.5 肺组织 HIF-1 α 、ET-1、iNOS mRNA 测定

各组大鼠按检测时间点分别于处死后 5 min 内取肺组织,液氮(-196℃)冻存,检测时每个标本取肺组织 50~100 mg,加入液氮研磨成粉状;加入 TRIzol 1.5 mL(按照试剂说明书)进行操作抽取总 RNA,以 3 μ L 反转录所得 cDNA 为模板,上海生工合成的目的基因上、下游引物,荧光 PCR MIX、ddH₂O 进行大鼠 HIF-1 α 、ET-1、iNOS 基因及内参基因 β -actin 的 PCR 扩增,反应体系 20 μ L。扩增条件:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,退火 30 s(温度见表 1),72℃ 延伸 30 s,35 个循环;72℃ 再延伸 5 min 终止反应。为消除系统及定量误差,各基因 mRNA 的表达水平以相对表达量即 HIF-1 α / β -actin、ET-1/ β -actin、iNOS/ β -actin 比率来计算。各目的基因及内参照基因的 PCR 引物序列、扩增片段长度及反应条件见表 1。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,相同时间点两组计量资料之间比较采用 t 检验,等级资料采用平均 Ridit 分析方法,相关性分析采用直线相关回归法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 各目的基因及内参照基因的 PCR 引物序列、扩增片段长度、反应条件

基因	引物序列 (5'-3')	扩增片段 长度(bp)	退火温度 (℃)
β -actin	F:GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA R:GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG	150	56
HIF-1 α	F:CAACTGCCACCACTGATGAAT R:CCACTGTATGCTGATGCCTTAG	133	53
ET-1	F:TGTTCAGACTGGCAGAGGAC R:CAAGAAGAGGCAAGAGAATCACT	120	53
iNOS	F:TTCTTGCCGTGGATGCTG R:GCTACACTTCCAACGCAACA	113	50

2 结果

2.1 各组大鼠 mPAP 的变化

大鼠缺氧 3、5、7、10、14、21 d mPAP 较对照组均明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示造模成功。见表 2。

表 2 两组新生大鼠 mPAP ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	mPAP(mm Hg)					
	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	21 d
对照组	5.1 $\pm$ 1.0	8.1 $\pm$ 1.1	8.7 $\pm$ 0.9	12.2 $\pm$ 2.5	8.9 $\pm$ 0.7	11.2 $\pm$ 1.6
实验组	8.5 $\pm$ 1.6	10.0 $\pm$ 1.8	10.9 $\pm$ 3.2	16.8 $\pm$ 2.2	13.0 $\pm$ 2.9	21.0 $\pm$ 2.6
t 值	5.3	2.9	2.1	5.0	4.2	9.5
P 值	<0.01	<0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01

2.2 各组大鼠肺动脉超微结构的变化

2.2.1 VG 染色后光镜下观察大鼠肺动脉变化

通过 VG 染色后光镜观察到对照组大鼠肺小动脉管壁薄、管腔大,血管壁结构层次清晰。实验 7 d 组肺小动脉管腔逐渐缩小,部分出现塌陷,管壁增厚,结构紊乱,红染部分明显增厚。实验 21 d 组上述表现更为显著。显示自缺氧 7 d 时出现肺小动脉中膜增厚、管壁狭窄的肺血管重塑。见图 1。

2.2.2 电镜下观察大鼠肺小动脉超微结构的变化

电镜下观察大鼠肺小动脉超微结构,对照组大鼠可见内皮细胞扁平、形状规则、排列整齐;弹力膜完整,薄厚均匀、连续;平滑肌细胞呈梭形排列整齐。实验 7 d 组可见内皮细胞增大,细胞器增多,排列不规则,呈隆突样向管腔内生长。实验 21 d 组可见弹力膜不规则,部分断裂;内皮细胞形状不规则,核增大,核形不规则;平滑肌细胞形状、排列不规则,隆起。显示随着缺氧时间的延长,第 7 天出现肺血管重塑现象。见图 2。

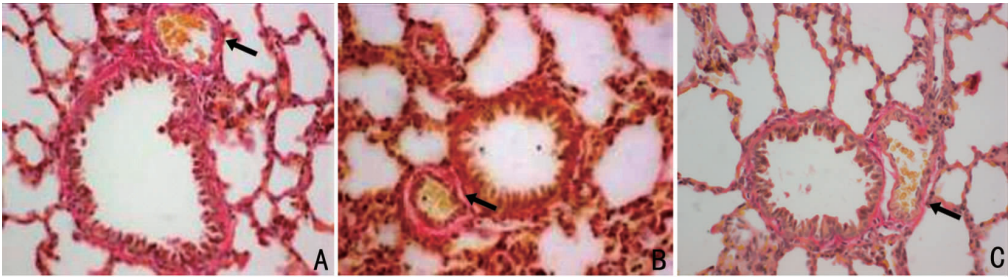


图1 缺氧后大鼠肺动脉形态改变(VG染色, ×400) A:对照组,肺小动脉管壁薄、管腔大,血管壁结构层次清晰;B:实验7 d组,肺小动脉管腔逐渐缩小,部分出现塌陷,管壁增厚,结构紊乱;C:实验21 d组,肺小动脉管腔明显缩小,其余表现亦较7 d组更为显著。箭头所指为肺动脉管壁。

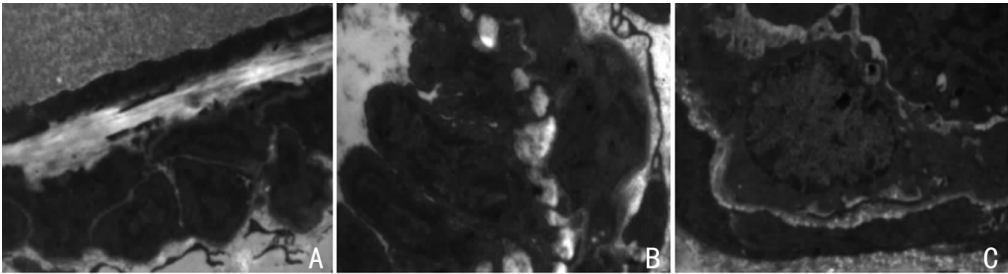


图2 缺氧后大鼠肺动脉超微结构变化(×10000) A:对照组,可见内皮细胞扁平、排列整齐,弹力膜完整,薄厚均匀、连续;B:实验7 d组,可见内皮细胞增大,排列不规则,弹力膜完整破坏;C:实验21 d组,可见弹力膜断裂,内皮细胞核形不规则。

2.2.3 两组 MT% 和 MA% 值比较 实验组大鼠在缺氧3~5 d MT% 和 MA% 值较对照组虽有增高,但差异无统计学意义($P>0.05$),提示肺血管未发生血管重塑;实验组缺氧7 d~21 d MT% 和 MA%

值较对照组明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$),提示自缺氧第7天开始出现肺血管重塑现象。见表3。

表3 两组大鼠 MT% 和 MA% 的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	MT%						MA%					
		3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	21 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	21 d
对照组	10	43 ± 13	45 ± 10	49 ± 11	47 ± 9	51 ± 10	55 ± 11	55 ± 8	55 ± 9	56 ± 8	59 ± 6	61 ± 10	62 ± 12
实验组	10	42 ± 11	46 ± 11	53 ± 11	56 ± 11	61 ± 12	64 ± 12	54 ± 11	56 ± 8	60 ± 9	63 ± 7	65 ± 10	68 ± 8
t 值		-0.358	0.737	2.080	4.672	4.543	4.366	-0.345	0.439	2.163	3.300	2.270	3.182
P 值		>0.05	>0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05	>0.05	<0.05	<0.01	<0.05	<0.01

2.3 免疫组化法检测肺组织 HIF-1α、ET-1 及 iNOS 的表达

2.3.1 HIF-1α、ET-1 及 iNOS 阳性率的表达 实验组 HIF-1α、ET-1 和 iNOS 的总阳性表达率均明显高于对照组(χ^2 值分别为12.836、4.937、4.043, P 值分别为<0.001、0.026 和 0.044),阳性表达均位于肺动脉内皮细胞上,说明 HPH 新生大鼠肺动脉内皮细胞以上三因子表达均增强。见图3。

2.3.2 两组 HIF-1α、ET-1 及 iNOS 反应强度比较 实验组在缺氧3、5、7、10 d HIF-1α 表达较对照组增高($P<0.05$);实验组在缺氧3、5、7 d ET-1 表达

较对照组增高($P<0.05$);实验组在缺氧3、5、7 d iNOS 表达较对照组增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4~6。

2.4 肺组织中 HIF-1α、ET-1、iNOS mRNA 的表达

实验组大鼠肺组织 HIF-1α mRNA 表达在缺氧3、5、7 d 明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);ET-1 mRNA 表达在缺氧3 d 显著增高,差异有统计学意义($P<0.05$);iNOS mRNA 表达在缺氧3、5、7 d 显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表7~9。

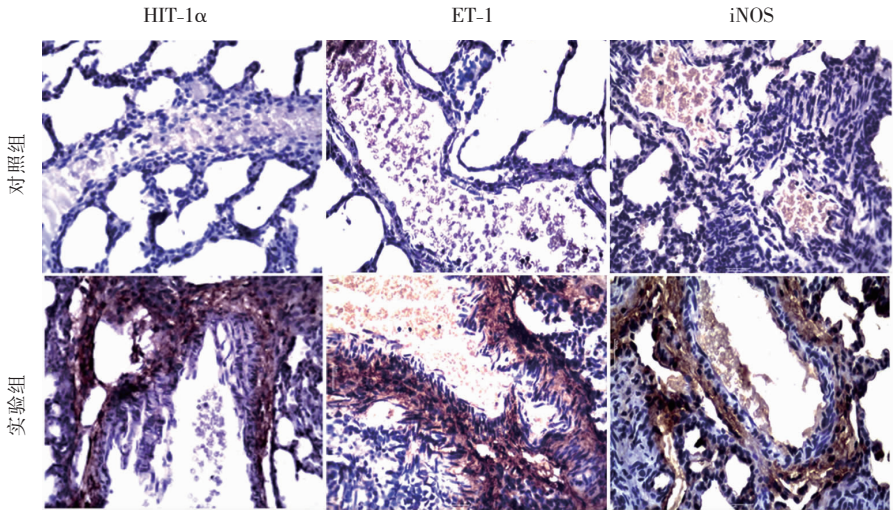


图 3 大鼠肺组织中 HIF-1α、ET-1 及 iNOS 表达(DAB 显色, ×400) 实验 21 d,实验组 HIF-1α、ET-1 及 iNOS 表达均高于对照组。棕黄色至黄色颗粒为阳性细胞。

2.5 肺血管重塑与 HIF-1α、ET-1、iNOS mRNA 的相关性分析

直线相关分析表明:肺血管重塑指标 MT% 和 MA% 与 HIF-1α mRNA 呈正相关(r 分别为0.835、

0.850,均 $P < 0.05$);与 ET-1 mRNA 无显著相关性(r 分别为 -0.085 、 0.021 ,均 $P > 0.05$);与 iNOS mRNA 无显著相关性(r 分别为 0.070 、 0.185 ,均 $P > 0.05$)。

表 4 两组肺组织 HIF-1α 反应强度的比较

组别	例数	对照组				R 值	实验组				R 值	t 值	P 值
		-	+	2 +	3 +		-	+	2 +	3 +			
3 d	10	9	1	0	0	0.371	4	4	2	0	0.628	-2.686	0.018
5 d	10	9	0	1	0	0.384	4	4	1	1	0.616	-2.327	0.033
7 d	10	8	1	1	0	0.377	3	4	2	1	0.624	-2.320	0.032
10 d	10	7	2	1	0	0.377	3	2	3	2	0.624	-2.244	0.038
14 d	10	7	1	1	1	0.382	2	3	3	2	0.619	-2.083	0.052
21 d	10	6	0	1	3	0.435	2	2	3	3	0.564	-1.037	0.314

表 5 两组肺组织 ET-1 反应强度的比较

组别	例数	对照组				R 值	实验组				R 值	t 值	P 值
		-	+	2 +	3 +		-	+	2 +	3 +			
3 d	10	8	2	0	0	0.433	4	3	2	1	0.614	-2.167	0.047
5 d	10	8	1	1	0	0.386	4	1	3	2	0.614	-2.155	0.045
7 d	10	7	2	1	0	0.369	3	1	4	2	0.651	-2.426	0.026
10 d	10	5	1	3	1	0.391	1	2	4	3	0.608	-1.838	0.083
14 d	10	5	4	0	1	0.436	4	1	3	2	0.564	-1.045	0.310
21 d	10	9	0	0	1	0.411	5	1	3	1	0.589	-1.775	0.093

表 6 两组肺组织 iNOS 反应强度的比较

组别	例数	对照组				R 值	实验组				R 值	t 值	P 值
		-	+	2 +	3 +		-	+	2 +	3 +			
3 d	10	9	0	0	1	0.385	4	3	1	2	0.615	-2.259	0.038
5 d	10	7	1	1	1	0.377	2	2	4	2	0.624	-2.197	0.041
7 d	10	7	2	1	0	0.379	3	2	4	1	0.6213	-2.198	0.041
10 d	10	6	2	1	1	0.445	4	2	3	1	0.555	-0.892	0.384
14 d	10	4	4	1	1	0.558	6	3	1	0	0.443	0.95	0.355
21 d	10	5	2	3	0	0.475	4	3	2	1	0.525	-0.394	0.698

表 7 两组肺组织 HIF-1α mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HIF-1α mRNA					
		3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	21 d
对照组	10	0.23 ± 0.16	0.44 ± 0.29	0.69 ± 0.13	1.20 ± 0.56	0.64 ± 0.17	0.42 ± 0.20
实验组	10	1.30 ± 0.49	1.02 ± 0.47	1.45 ± 0.76	1.29 ± 0.46	0.98 ± 0.35	0.68 ± 0.36
t 值		8.83	2.12	2.38	0.32	1.12	1.24
P 值		<0.01	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05

表 8 两组肺组织 ET-1 mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ET-1 mRNA					
		3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	21 d
对照组	10	0.006 ± 0.005	0.020 ± 0.015	0.050 ± 0.040	0.090 ± 0.040	0.100 ± 0.050	0.050 ± 0.040
实验组	10	0.040 ± 0.020	0.020 ± 0.010	0.060 ± 0.040	0.070 ± 0.030	0.060 ± 0.030	0.030 ± 0.010
t 值		2.26	0.56	0.74	1.71	1.32	0.41
P 值		<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

表 9 两组肺组织 iNOS mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	iNOS mRNA					
		3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	21 d
对照组	10	0.0030 ± 0.0001	0.0060 ± 0.0018	0.0380 ± 0.0119	0.0500 ± 0.0207	0.0610 ± 0.0470	0.0760 ± 0.0110
实验组	10	0.0330 ± 0.0270	0.3210 ± 0.3110	0.5300 ± 0.1580	0.0500 ± 0.0307	0.1740 ± 0.1350	0.0920 ± 0.0230
t 值		-2.633	-2.443	-7.492	-1.348	-1.702	-1.948
P 值		<0.05	<0.05	<0.01	>0.05	>0.05	>0.05

3 讨论

本研究将新生大鼠置于低氧环境中建立新生大鼠 HPH 模型,结果显示,缺氧 3 ~ 21 d 新生大鼠肺动脉压力较对照组显著升高,表明新生大鼠 HPH 模型建立成功。

本实验中新生大鼠自缺氧 3 d 即出现 mPAP 增强,而到第 7 天才出现肺血管重塑,推测缺氧 3 d 到 7 d 时间内即缺氧早期肺血管处于收缩痉挛状态,后期由于缺氧持续存在,肺动脉结构改变,主要包括肌型小动脉中膜增生肥厚、无肌型细动脉肌化等,最终导致肺血管重构的发生^[4]。这是肺血管为适应缺氧而提高肺毛细血管灌注压进行自身调节所发生的重构性改变。本研究结果与此一致。

根据相关报道,HPH 肺血管重塑患者其 MT% 明显增加^[3],所以目前研究者已将 MT% 及 MA% 作为评价肺血管重塑的重要指标。本研究结果显示,实验组大鼠缺氧第 7 天时 MT%、MA% 值较对照组明显增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),此结果可提示新生大鼠缺氧至第 7 天,可能是肺血管痉挛向血管重塑这一不可逆变化发展的一个时间点。此结果与以往成年大鼠 HPH 研究结果有所不同,在与本实验相同缺氧条件下,成年大鼠缺氧 2 ~ 5 周才出现肺血管重

塑指标的变化^[5],说明较之成年大鼠,新生大鼠更容易发生 HPH,从而导致肺血管重塑。此点可为临床新生儿 HPH 早期治疗提供理论参考依据。

有研究证实在大鼠肺动脉高压模型中肺动脉内膜 HIF-1α 表达增加,从而上调其下游基因 ET-1 及 iNOS 表达,导致肺动脉内膜血管内皮细胞增殖,肺血管内皮结构受损,从而促进血管生成,最终导致肺血管重塑^[6]。本研究从蛋白质、基因表达两方面推测 HIF-1α、ET-1 及 iNOS 可能均参与缺氧导致 HPH 的病理过程。

缺氧时 HIF-1α 在肺的许多细胞中表达增多,以肺泡、支气管上皮细胞及血管内皮细胞最多^[7]。本研究免疫组化结果中 HIF-1α 表达在缺氧 3、5、7、10 d 时较对照组增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而 HIF-1α mRNA 表达在缺氧 3、5、7 d 时明显高于对照组 ($P < 0.05$)。两者表达不全一致考虑为: mRNA 属于基因水平定量表达,持续缺氧严重抑制基因转录及翻译过程,可影响 mRNA 持续表达,使其表达时间较短;而免疫组化属于蛋白水平的定性表达,表达较恒定,影响因素较少,故免疫组化与 mRNA 表达不同步,其表达相对滞后。本实验进一步进行肺血管重塑与 HIF-1α mRNA 表达的相关性研究得出,肺血管重塑与 HIF-1α mRNA 的表达呈现正相关,推测为肺动脉内皮细胞可能有 5% 的基因受到 HIF-1α 的调控^[8],HIF 由 α 亚基和 β 亚基组成,是具有转录活性

的异源二聚体,HIF-1 α 是缺氧条件下细胞应答最基本的调控因子,调控着下游众多基因如 VEGF、ET-1 等的转录和表达^[9],另外当细胞处于低氧状态时一方面脯氨酸羟化酶活性被抑制;另一方面线粒体电子传递链被干扰,导致胞内的活性氧自由基升高,Fe²⁺被氧化成 Fe³⁺,HIF-1 α 的泛素化降解过程被抑制,故低氧时 HIF-1 α 表达量在细胞内呈指数式增加^[10]。因此,本研究得出肺血管重塑与 HIF-1 α mRNA 表达呈正相关。

ET-1 是迄今为止发现的最强的内源性血管收缩因子,肺部是 ET-1 作用和代谢的重要脏器^[11],缺氧 ET-1 基因表达及释放增强。本研究免疫组化中 ET-1 表达在缺氧 3、5、7 d 时较对照组增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 ET-1 mRNA 表达仅在缺氧 3 d 时显著增高($P < 0.05$),出现上述不同步原因推测为缺氧早期在低氧刺激下血管内皮细胞产生大量 HIF-1 α ,HIF-1 α 诱导下游目的基因 ET-1 mRNA 使其呈高表达,但 ET-1 mRNA 不稳定,随着缺氧时间延长,其活性受到低氧的抑制并导致其表达下降,故本研究中检测 ET-1 mRNA 表达在缺氧 3 d 时以后即逐渐下降,与对照组无明显差异;但肺血管内皮细胞对 ET-1 的分泌方式为边合成边分泌,较 ET-1 mRNA 而言,ET-1 表达相对较稳定。本实验研究提示,肺血管重塑与 ET-1 mRNA 表达无相关性。原因可能为 HPH 的始动因素为肺血管内皮结构受损导致功能的改变^[2],而肺血管内皮细胞没有储存 ET-1 的致密颗粒;另外相关研究提示 ET-1 mRNA 合成调节不仅受到缺氧及 HIF-1 α 的调控,而且凝血酶、切变应激酶、TNF- α 、IL-1 均可诱导 ET-1 mRNA 的表达^[12],结合上述因素故本研究中未发现肺血管重塑与 ET-1 mRNA 表达的相关性。

内源性 NO 是血管内皮细胞合成和分泌的另一种血管活性物质,自 1980 年 Furchgott 等^[13]发现以来,即明确它具有很强的舒张血管平滑肌、抑制其增殖的生物学作用。iNOS 是其合成的关键酶,在缺血、缺氧等情况下大量产生,诱导长时间 NO 的释放^[14],另外低氧条件下 HIF-1 α 上调肺动脉内皮细胞中的 iNOS 表达^[6],二者共同激活 iNOS mRNA 的基因表达。本研究中免疫组化 iNOS 表达及 iNOS mRNA 表达均同步于缺氧 3、5、7 d 显著高于对照组($P < 0.05$)。原因为低氧时肺动脉内皮细胞内 iNOS 表达上调与缺氧诱导因子-1(HIF-1)的转录调节有关。低氧可通过诱导 HIF-1 α 表达增强,其作为转录因子结合 iNOS 基因上相应位点而致肺动脉内皮细胞 iNOS mRNA 及蛋白表达增强^[15]。故 iNOS 免疫组化与 mRNA 表达同步。本研究得出肺血管重塑与 iNOS mRNA 表达不相关。原因推测为 iNOS

基因 5'侧翼区存在 3 个转录调控位点:其中之一即为缺氧反应元件,可与 HIF-1 结合,在缺氧诱导的 iNOS 表达^[12],另外两个位点表达受多重因素影响。故在相同缺氧条件下,本研究未得出肺血管重塑与 iNOS mRNA 表达的相关性。

综上所述,低氧作为诱发因素造成肺血管发生痉挛,随着缺氧时间的延长,肺血管由痉挛到重塑,最终导致 HPH。在肺血管重塑过程中,HIF-1 α 、ET-1 及 iNOS 可能发挥一定的作用,需进一步深入研究,为新生儿 HPH 提供诊治依据。

[参 考 文 献]

[1]

He ZH, Dai AG, Zhang XF, Tan XW. Expression of hypoxia inducible factor-1 alpha and inducible nitric oxide synthase gene in the development of hypoxic pulmonary hypertension in rats[J]. Clin Rehab Tissue Eng Res, 2007, 11(36): 7290-7294.

[2]

Budhiraja R, Tudor RM, Hassoun PM. Pivotal role for endothelial tetrahydrobiopterin in pulmonary hypertension[J]. Circulation, 2005, 12(4): 159-165.

[3]

桑葵,周英,李明霞. 缺氧性肺动脉高压新生大鼠肺血管重塑的研究[J]. 中国当代儿科杂志,2012,14(3):210-214.

[4]

杜军保,唐朝枢. 肺动脉高压[M]. 北京:北京大学医学出版社,2010:24-90.

[5]

钟小宁,梁国容,何志义,陈一强,李山,李超乾. 血管内皮生长因子和内皮素在低氧性肺血管重建中的作用[J]. 中华内科杂志,2001,40(8):525-528.

[6]

Li QF, Dai AG. Hypoxia-inducible factor-1 alpha regulates the role of vascular endothelial growth factor on pulmonary arteries of rats with hypoxia induced pulmonary hypertension[J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(6): 1023-1028.

[7]

Schultz K, Fanburg BL, Beasley D. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha promote growth factor-induced proliferation of human vascular smooth muscle cells[J]. Am J Physiol, 2006, 290(6): H2528-H2534.

[8]

Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1[J]. Blood, 2005, 105(2): 659-669.

[9]

刘斌,彭军. 氧化应激和肺动脉高压血管重构[J]. 中国动脉硬化杂志,2011,19(6):539-542.

[10]

Simon MC. Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxic HIF-alpha stabilization[J]. Adv Exp Med Biol, 2006, 588(6): 165-170.

[11]

Schindler MB, Hislop AA, Haworth SG. Porcine pulmonary artery and bronchial responses to endothelin-1 and norepinephrine on recovery from hypoxic pulmonary hypertension[J]. Pediatr Res, 2006, 60(1): 71-76.

[12]

陶莉,陈克正. 缺氧诱导因子-1 及其与内皮素-1、诱生型一氧化氮合酶关系的研究[J]. 医学综述,2004,10(3):133-135.

[13]

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine[J]. Nature, 1980, 288(5789): 373-376.

[14]

魏晋,潘丽,张奕华,徐寒梅. ZX-5 对一氧化氮合酶表达和活性的调节作用[J]. 中国药理学通报,2010,26(8):1029-1033.

[15]

王慧,解卫平,王虹. 一氧化氮及一氧化氮合酶在低氧性肺动脉高压中的研究进展[J]. 国际呼吸杂志,2009,29(6):366-369.

(本文编辑:王庆红)

• 144 •