

血小板源性生长因子-BB对缺氧性肺动脉高压 新生大鼠肺血管重塑的影响及机制研究

郭鑫¹ 李明霞² 巴依尔才次克² 杨延青¹ 王乐²

(1.新疆医科大学儿科学院, 新疆乌鲁木齐 830054;

2.新疆医科大学第一附属医院新生儿科, 新疆乌鲁木齐 830054)

[摘要] **目的** 探讨血小板源性生长因子-BB (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB) 对缺氧性肺动脉高压 (hypoxia pulmonary hypertension, HPH) 新生大鼠肺血管重塑的影响。**方法** 128只新生大鼠随机分为: PDGF-BB+HPH组、HPH组、PDGF-BB+常氧组、常氧组 (各组 $n=32$)。PDGF-BB+HPH组、PDGF-BB+常氧组经尾静脉注射 $13\ \mu\text{L}\ 6\times 10^{10}$ PFU/mL携带PDGF-BB基因的腺病毒载体。转染腺病毒载体24 h后, HPH组和PDGF-BB+HPH组建立HPH新生大鼠模型。缺氧3、7、14、21 d检测右心室收缩压 (right ventricular systolic pressure, RVSP), 苏木精-伊红染色后光学显微镜下观察肺血管形态学变化及血管重塑指标 (MA%、MT%), 免疫组化法检测肺组织中PDGF-BB、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的表达水平。**结果** PDGF-BB+HPH组和HPH组RVSP在各时间点均高于同日龄常氧组 ($P<0.05$)。PDGF-BB+HPH组缺氧3 d出现血管重塑, HPH组缺氧7 d开始出现血管重塑; 缺氧3 d时, PDGF-BB+HPH组MA%、MT%高于HPH组、PDGF-BB+常氧组、常氧组 ($P<0.05$); 缺氧7、14、21 d时, PDGF-BB+HPH组和HPH组MA%、MT%均高于PDGF-BB+常氧组、常氧组 ($P<0.05$)。PDGF-BB+HPH组、HPH组在各时间点PDGF-BB、PCNA表达均高于常氧组 ($P<0.05$), 缺氧3、7、14 d时, PDGF-BB+HPH组PDGF-BB、PCNA表达高于HPH组 ($P<0.05$), PDGF-BB+常氧组PDGF-BB、PCNA表达较常氧组高 ($P<0.05$)。**结论** 外源性给予HPH新生大鼠PDGF-BB, 可上调PCNA表达, 促进肺血管重塑, 提高肺动脉压力。

[中国当代儿科杂志, 2023, 25 (4): 407-414]

[关键词] 血小板源性生长因子-BB; 肺动脉高压; 血管重塑; 增殖; 新生大鼠

Effect of platelet-derived growth factor-BB on pulmonary vascular remodeling in neonatal rats with hypoxic pulmonary hypertension and its mechanism

GUO Xin, LI Ming-Xia, BAYER Caicike, YANG Yan-Qing, WANG Le. Department of Neonatology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China (Wang L, Email: wangle200727@163.com)

Abstract: Objective To study the effect of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) on pulmonary vascular remodeling in neonatal rats with hypoxic pulmonary hypertension (HPH). **Methods** A total of 128 neonatal rats were randomly divided into four groups: PDGF-BB+HPH, HPH, PDGF-BB+normal oxygen, and normal oxygen ($n=32$ each). The rats in the PDGF-BB+HPH and PDGF-BB+normal oxygen groups were given an injection of $13\ \mu\text{L}\ 6\times 10^{10}$ PFU/mL adenovirus with PDGF-BB gene via the caudal vein. After 24 hours of adenovirus transfection, the rats in the HPH and PDGF-BB+HPH groups were used to establish a neonatal rat model of HPH. Right ventricular systolic pressure (RVSP) was measured on days 3, 7, 14, and 21 of hypoxia. Hematoxylin-eosin staining was used to observe pulmonary vascular morphological changes under an optical microscope, and vascular remodeling parameters (MA% and MT%) were also measured. Immunohistochemistry was used to measure the expression levels of PDGF-BB and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in lung tissue. **Results** The rats in the PDGF-BB+HPH and HPH groups had a significantly higher RVSP than those of the same age in the normal oxygen group at each time point ($P<0.05$). The rats

[收稿日期] 2022-12-02; [接受日期] 2023-03-07

[基金项目] 国家自然科学基金 (82060287)。

[作者简介] 郭鑫, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 王乐, 女, 副教授。Email: wangle200727@163.com。

in the PDGF-BB+HPH group showed vascular remodeling on day 3 of hypoxia, while those in the HPH showed vascular remodeling on day 7 of hypoxia. On day 3 of hypoxia, the PDGF-BB+HPH group had significantly higher MA% and MT% than the HPH, PDGF-BB+normal oxygen, and normal oxygen groups ($P<0.05$). On days 7, 14, and 21 of hypoxia, the PDGF-BB+HPH and HPH groups had significantly higher MA% and MT% than the PDGF-BB+normal oxygen and normal oxygen groups ($P<0.05$). The PDGF-BB+HPH and HPH groups had significantly higher expression levels of PDGF-BB and PCNA than the normal oxygen group at all time points ($P<0.05$). On days 3, 7, and 14 of hypoxia, the PDGF-BB+HPH group had significantly higher expression levels of PDGF-BB and PCNA than the HPH group ($P<0.05$), while the PDGF-BB+normal oxygen group had significantly higher expression levels of PDGF-BB and PCNA than the normal oxygen group ($P<0.05$). **Conclusions** Exogenous administration of PDGF-BB in neonatal rats with HPH may upregulate the expression of PCNA, promote pulmonary vascular remodeling, and increase pulmonary artery pressure. [Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2023, 25(4): 407-414]

Key words: Platelet-derived growth factor-BB; Pulmonary hypertension; Vascular remodeling; Proliferation; Neonatal rat

新生儿缺氧性肺动脉高压 (hypoxia pulmonary hypertension, HPH) 是新生儿常见的极危重症之一, 严重者出现右心室血流异常, 引起右心室压力升高, 最终导致呼吸循环功能衰竭, 目前没有有效治疗方法, 病死率高^[1-2]。其早期主要病理特征为肺血管阻力增加, 早期干预可逆, 晚期表现为小动脉内膜增生, 引起肺血管重塑^[3-4]。成人肺动脉高压研究表明肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary artery smooth muscle cell, PASMC) 过度增殖导致内膜增厚, 可能是肺血管重塑及肺动脉高压发病机制的关键环节^[5]。有研究表明血小板源性生长因子-BB (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB) 是最有效的有丝分裂原, 通过其潜在负性调节因子可促进PASMC增殖, 加重肺血管重塑^[6-7]。缺氧刺激可以促进PASMC细胞周期蛋白表达, 上调增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的表达, 调控细胞周期, 并导致PASMC增殖^[8]。而PDGF-BB是否通过调控PCNA促进PASMC增殖, 加重肺血管重塑进程, 在新生儿HPH发病机制中尚不清楚。本研究通过建立HPH新生大鼠模型, 经尾静脉注射表达PDGF-BB的腺病毒载体, 研究PDGF-BB是否可提高HPH新生大鼠肺动脉压力, 加重肺血管重塑, 为新生儿HPH的治疗提供新策略。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要仪器试剂

128只健康清洁级Wistar新生大鼠, 日龄7~10 d, 体重20~30 g, 由新疆医科大学动物实验中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (新) 2011-0004。本实验已通过新疆医科大学第一附属医院动物医学伦理委员会审批 (IACUC-20200318-64)。

BL-420S生物机能实验系统 (成都泰盟科技有限公司); CY-100B间歇氧环境控制器 (上海玉研科学仪器有限公司); CM1860冰冻切片机 (德国莱卡公司); PDGF-BB腺病毒 (上海吉凯基因科技有限公司)。

1.2 实验动物分组及腺病毒转染

将新生大鼠随机分为PDGF-BB+HPH组、HPH组、PDGF-BB+常氧组、常氧组。PDGF-BB+HPH组、PDGF-BB+常氧组新生大鼠经尾静脉注入 $13\ \mu\text{L}\ 6\times 10^{10}\ \text{PFU/mL}$ 的腺病毒 (标有绿色荧光蛋白并携带PDGF-BB基因的腺病毒载体), HPH组和常氧组新生大鼠经尾静脉注入相同剂量的0.9%氯化钠溶液。

1.3 建立HPH新生大鼠模型

尾静脉注射腺病毒载体24 h后, 按照本课题组前期造模方法^[9]建立新生大鼠HPH模型, HPH组和PDGF-BB+HPH组新生大鼠连同母鼠置于低氧舱内, 以 $1.5\ \text{L/min}$ 的速度将8%氧浓度的氮氧混合气输入低氧舱, 用氧浓度测定仪监测舱内氧浓度, 使其维持在 $10.0\%\pm 0.5\%$, 舱内置小风扇, 钠石灰和无水氯化钙以吸收二氧化碳与水蒸气。舱内温度维持在 $22\sim 24\ ^\circ\text{C}$, 湿度 $60\%\sim 70\%$, 昼/夜比为12 h/12 h, 每天缺氧8 h, 缺氧期间新生大鼠及其母鼠自由进食水, PDGF-BB+常氧组和常氧组在常氧下饲养, 余饲养条件同上。

1.4 检测新生大鼠右心室收缩压

缺氧3、7、14、21 d检测新生大鼠右心室收缩压 (right ventricular systolic pressure, RVSP), 各组新生大鼠称重, 10%水合氯醛 ($0.3\ \text{mL}/100\ \text{g}$) 腹腔麻醉后, 取仰卧位并固定, 颈部做纵行切口, 暴露气管并行气管插管, 连接小动物呼吸机, 胸前做U型切口, 暴露心脏, 连接BL-420S生物机能实验系统及压力传感器, 远端的4.5号头皮针倾斜

刺入右心室，出现稳定的压力曲线并记录 RVSP，腹腔内注射 10% 水合氯醛（0.5 mL/100 g），每个时间点每组处死 8 只新生大鼠并留取肺组织。

1.5 检测腺病毒载体在新生大鼠肺组织中的定位及转染效果

取各组的左肺上叶组织，大小约 5 g，4% 多聚甲醛固定，于 20% 蔗糖溶液过夜，OTC 胶包埋，制作冰冻切片，室温复温，丙酮固定，DAPI 染色，封片，激光共聚焦荧光显微镜下观察腺病毒标记的增强型绿色荧光蛋白情况，并采集图像。

1.6 观察肺血管形态及肺血管重塑指标

取各组的左中叶肺组织，4% 多聚甲醛固定，石蜡包埋，制作石蜡切片，烤片脱蜡脱水，苏木精-伊红（hematoxylin and eosin, HE）染色后光学显微镜下观察肺小动脉形态变化。通过 Image-Pro Plus 图像分析软件测量血管总横截面积、肺小动脉中层横截面积、肺小动脉中层血管壁厚度、肺小动脉外径，并计算肺血管重塑指标肺小动脉中层血管壁厚度占肺小动脉外径的百分比（MT%）、肺小动脉中层横截面积占总横截面积的百分比（MA%）。

1.7 免疫组化法检测 PDGF-BB、PCNA 的表达水平

取各组石蜡切片，经烤片、脱蜡、脱水、封闭、抗原修复、冷却、冲洗后，山羊血清室温封

闭 25 min，一抗孵育（PDGF-BB 单克隆抗体稀释度为 1 : 200；PCNA 单克隆抗体稀释度为 1 : 200），4℃ 过夜，次日，室温 40 min，二抗室温孵育 2 h，封片并采集图像，通过 Image-Pro Plus 软件分析计算积分光密度与面积的比值（IOD/Area）代表目的蛋白的表达水平。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件对数据进行统计学分析，符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时间点各组新生大鼠 RVSP 比较

缺氧 3、7、14 d 时，PDGF-BB+HPH 组、HPH 组、PDGF-BB+常氧组新生大鼠 RVSP 均高于同日龄常氧组（*P* < 0.05），PDGF-BB+HPH 组 RVSP 较 HPH 组高（*P* < 0.05）；缺氧 21 d 时，PDGF-BB+HPH 组和 HPH 组新生大鼠 RVSP 均高于 PDGF-BB+常氧组、常氧组（*P* < 0.05），而 PDGF-BB+HPH 组与 HPH 组 RVSP 比较差异无统计学意义（*P* > 0.05），PDGF-BB+常氧组与常氧组 RVSP 比较差异无统计学意义（*P* > 0.05）。见表 1。

表 1 各组新生大鼠 RVSP 比较（ $\bar{x} \pm s$, mmHg）

组别	<i>n</i>	缺氧 3 d	缺氧 7 d	缺氧 14 d	缺氧 21 d
常氧组	8	16.6 ± 0.6	18.9 ± 1.0	22.8 ± 0.8	24.1 ± 1.6
PDGF-BB+常氧组	8	17.9 ± 0.5 ^a	20.7 ± 1.1 ^a	23.1 ± 1.2 ^a	24.7 ± 1.7
HPH 组	8	22.0 ± 1.3 ^{a,b}	24.8 ± 1.2 ^{a,b}	28.7 ± 1.0 ^{a,b}	32.2 ± 1.2 ^{a,b}
PDGF-BB+HPH 组	8	23.4 ± 1.0 ^{a,b,c}	27.2 ± 0.7 ^{a,b,c}	31.1 ± 1.4 ^{a,b,c}	33.1 ± 0.7 ^{a,b}
<i>F</i> 值		96.33	102.95	147.09	101.21
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：[RVSP] 右心室收缩压；[PDGF-BB] 血小板源性生长因子-BB；[HPH] 缺氧性肺动脉高压。a 示与常氧组比较，*P* < 0.05；b 示与 PDGF-BB+常氧组比较，*P* < 0.05；c 示与 HPH 组比较，*P* < 0.05。

2.2 表达 PDGF-BB 的腺病毒载体在新生大鼠肺组织中的转染效果

常氧组在 3 d 时几乎看不见绿色荧光；在缺氧 3、7 d，PDGF-BB+HPH 组可见明显绿色荧光，表明腺病毒成功转染至新生大鼠肺组织，随时间延长绿色荧光强度逐渐减弱；缺氧 14 d 时，可见微弱绿色荧光；缺氧 21 d 几乎看不到绿色荧光。见图 1。

2.3 不同时间点各组肺血管形态学及血管重塑指标的变化

常氧组肺小动脉管壁薄，血管管腔较大，内膜细胞呈单层排列。缺氧 3 d 时，PDGF-BB+HPH 组可见血管壁部分增厚，而 HPH 组、PDGF-BB+常氧组与常氧组比较无明显改变；缺氧 7、14 d 时，PDGF-BB+HPH 组、HPH 组、PDGF-BB+常氧组可见血管壁增厚，肺小动脉管腔比常氧组狭小，随

时间延长更明显；缺氧 21 d 时，PDGF-BB+HPH 组、HPH 组管腔较前更狭窄，PDGF-BB+HPH 组较 HPH 组不明显，PDGF-BB+HPH 组、HPH 组与 PDGF-BB+常氧组、常氧组比较管腔明显狭窄。见图 2。

缺氧 3 d 时，PDGF-BB+HPH 组 MA%、MT% 高于 HPH 组、PDGF-BB+常氧组、常氧组 ($P<0.05$)，而 HPH 组 MA%、MT% 与常氧组、PDGF-BB+常氧

组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)；缺氧 7、14 d 时，PDGF-BB+HPH 组、PDGF-BB+常氧组和 HPH 组 MA%、MT% 较常氧组显著增高 ($P<0.05$)；缺氧 21 d 时，PDGF-BB+HPH 组、HPH 组 MA%、MT% 明显高于 PDGF-BB+常氧组、常氧组 ($P<0.05$)，PDGF-BB+HPH 组与 HPH 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)，PDGF-BB+常氧组与常氧组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

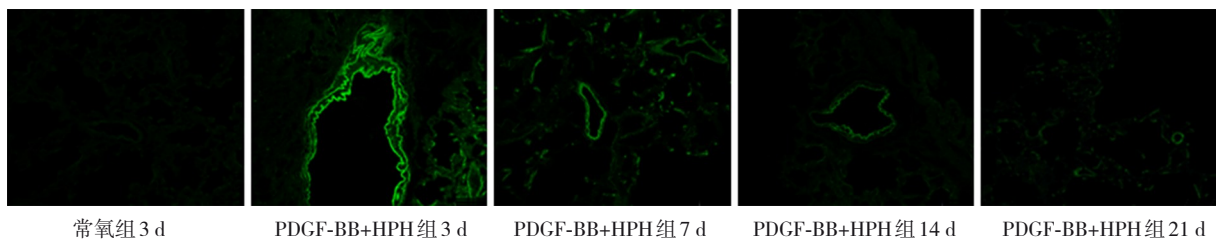


图1 腺病毒载体在新生大鼠肺组织中的转染效果 (激光共聚焦荧光显微镜, $\times 200$) 常氧组 3 d 时几乎看不见绿色荧光, PDGF-BB+HPH 组缺氧 3 d 时可见明显绿色荧光, 绿色荧光随时间延长逐渐减弱, 缺氧 21 d 时几乎看不到绿色荧光。

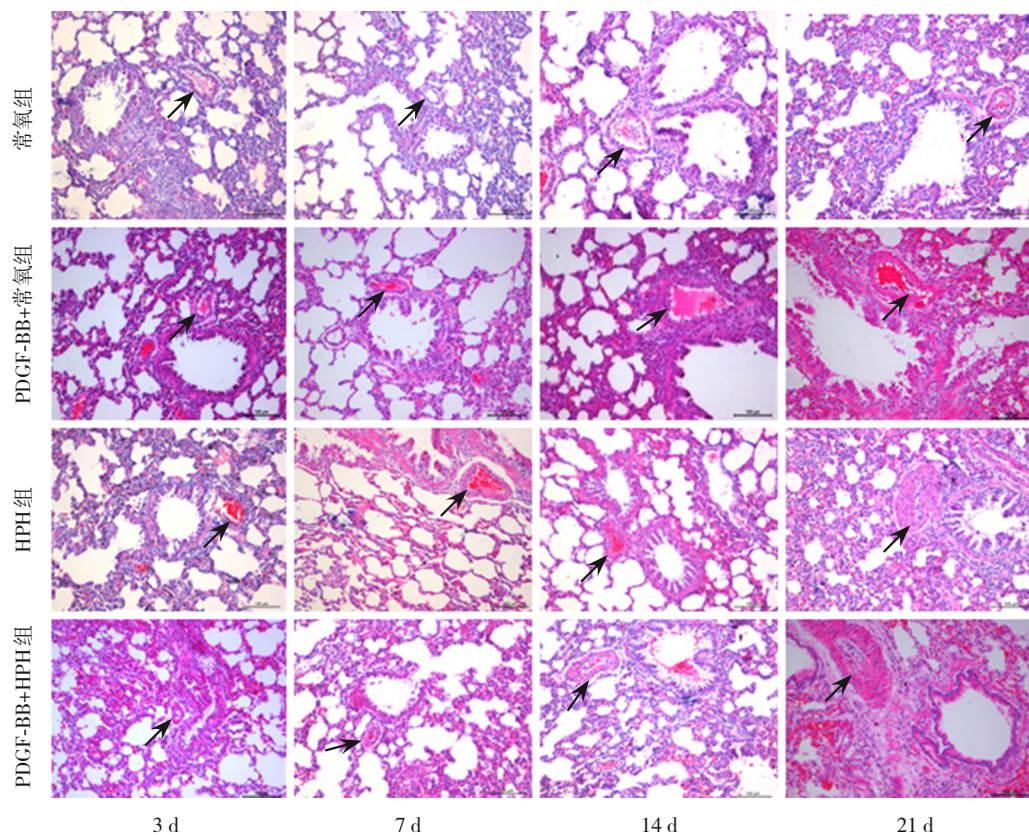


图2 各组新生大鼠肺血管形态学改变 (苏木精-伊红染色, $\times 200$) 常氧组肺小动脉管壁薄, 血管管腔大; PDGF-BB+HPH 组和 HPH 组随着时间延长, 管腔逐渐狭窄, 血管壁增厚更明显; PDGF-BB+HPH 组缺氧 3 d 时可见血管壁部分增厚; HPH 组与 PDGF-BB+常氧组缺氧 7 d 时可见血管壁增厚, 肺小动脉管腔比常氧组狭小, 随时间延长更明显。箭头所指为肺小动脉管壁。

表2 不同时间点各组新生大鼠 MA%和 MT%比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$, %)

组别	MA%				MT%			
	缺氧3 d	缺氧7 d	缺氧14 d	缺氧21 d	缺氧3 d	缺氧7 d	缺氧14 d	缺氧21 d
常氧组	53.1 ± 2.8	55.1 ± 3.8	60.1 ± 5.0	63.1 ± 5.0	43.2 ± 2.4	45.4 ± 4.5	49.6 ± 4.6	54.0 ± 4.6
PDGF-BB+ 常氧组	54.0 ± 1.1	60.1 ± 5.2 ^a	65.4 ± 4.6 ^a	67.2 ± 3.7	43.7 ± 2.6	51.8 ± 5.3 ^a	55.2 ± 5.2 ^a	58.4 ± 4.6
HPH 组	54.3 ± 1.8	65.3 ± 3.4 ^{a,b}	70.4 ± 3.9 ^{a,b}	74.2 ± 6.6 ^{a,b}	44.6 ± 2.8	58.2 ± 7.0 ^{a,b}	67.3 ± 5.4 ^{a,b}	72.3 ± 5.0 ^{a,b}
PDGF-BB+ HPH 组	60.7 ± 1.7 ^{a,b,c}	72.1 ± 5.0 ^{a,b,c}	75.7 ± 5.6 ^{a,b,c}	77.6 ± 3.8 ^{a,b}	48.2 ± 1.7 ^{a,b,c}	67.8 ± 6.9 ^{a,b,c}	72.5 ± 3.7 ^{a,b,c}	76.5 ± 3.9 ^{a,b}
F值	25.99	21.89	15.46	14.27	7.11	20.38	39.61	45.41
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: [MA%] 肺小动脉中层横截面积占总横截面积百分比; [MT%] 肺小动脉中层血管壁厚度占肺小动脉外径百分比; [PDGF-BB] 血小板源性生长因子-BB; [HPH] 缺氧性肺动脉高压。a 示与常氧组比较, $P<0.05$; b 示与 PDGF-BB+常氧组比较, $P<0.05$; c 示与 HPH 组比较, $P<0.05$ 。

2.4 不同时间点各组新生大鼠肺组织中 PDGF-BB、PCNA 的表达变化

免疫组化结果显示, PDGF-BB+HPH 组、HPH 组在各时间点 PDGF-BB、PCNA 表达均高于 PDGF-BB+常氧组、常氧组 ($P<0.05$), 见图 3~4; 缺氧 3、7、14 d 时, PDGF-BB+HPH 组 PDGF-BB、PCNA 高

于 HPH 组 ($P<0.05$), PDGF-BB+常氧组高于常氧组 ($P<0.05$); 缺氧 21 d 时, PDGF-BB+常氧组 PDGF-BB、PCNA 与常氧组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), HPH 组与 PDGF-BB+HPH 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 3~4。

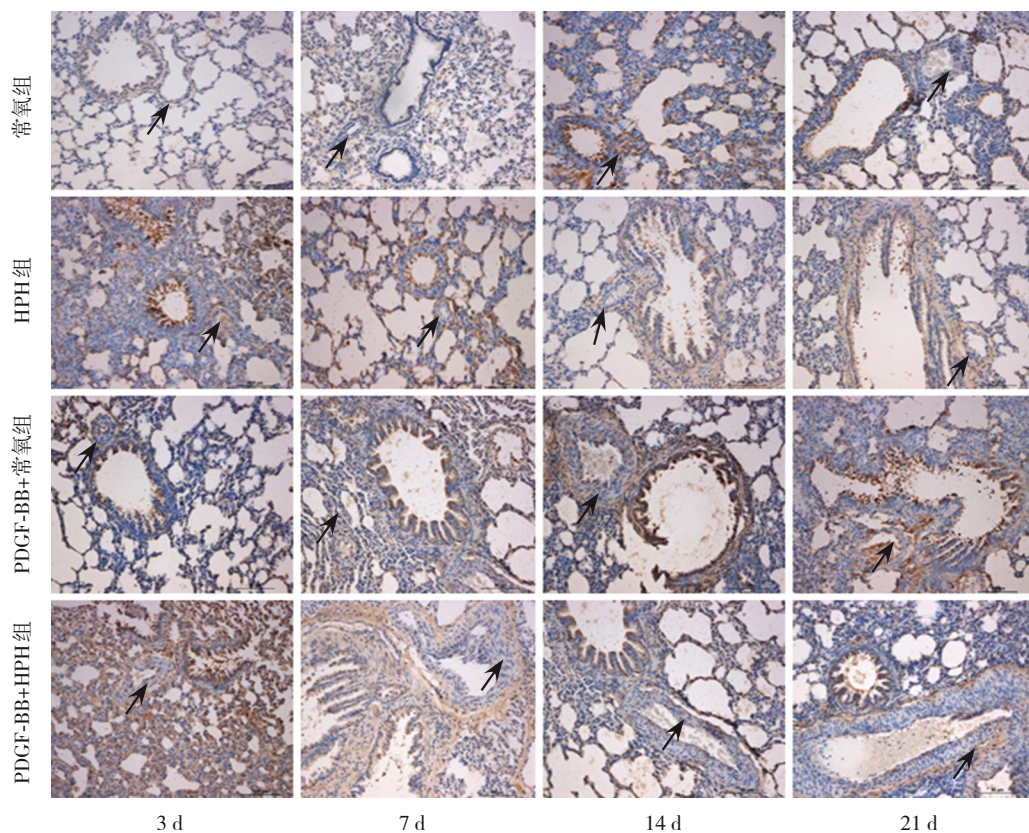


图3 各组新生大鼠肺组织中 PDGF-BB 表达 (免疫组化, $\times 200$) 常氧组 PDGF-BB 在肺血管的阳性表达少。缺氧 3、7、14 d 时, PDGF-BB+HPH 组、HPH 组、PDGF-BB+常氧组在肺血管的 PDGF-BB 阳性表达较常氧组增加; 缺氧 21 d 时, PDGF-BB+HPH 组较 HPH 组 PDGF-BB 阳性表达差异不明显, PDGF-BB+常氧组较常氧组 PDGF-BB 阳性表达差异不明显。箭头所指为 PDGF-BB 阳性表达呈棕色。

表 3 各组新生大鼠肺组织中 PDGF-BB 表达比较 (x̄ ± s, IOD/Area)

组别	n	缺氧 3 d	缺氧 7 d	缺氧 14 d	缺氧 21 d
常氧组	8	0.074 ± 0.014	0.088 ± 0.015	0.118 ± 0.010	0.126 ± 0.013
PDGF-BB+常氧组	8	0.099 ± 0.029 ^a	0.117 ± 0.024 ^a	0.121 ± 0.011 ^a	0.124 ± 0.011
HPH 组	8	0.129 ± 0.024 ^{a,b}	0.146 ± 0.026 ^{a,b}	0.152 ± 0.019 ^{a,b}	0.170 ± 0.094 ^{a,b}
PDGF-BB+HPH 组	8	0.182 ± 0.011 ^{a,b,c}	0.190 ± 0.039 ^{a,b,c}	0.166 ± 0.017 ^{a,b,c}	0.172 ± 0.015 ^{a,b}
F 值		38.92	20.42	20.09	36.41
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：[PDGF-BB] 血小板源性生长因子-BB；[HPH] 缺氧性肺动脉高压。a 示与常氧组比较， $P<0.05$ ；b 示与 PDGF-BB+常氧组比较， $P<0.05$ ；c 示与 HPH 组比较， $P<0.05$ 。

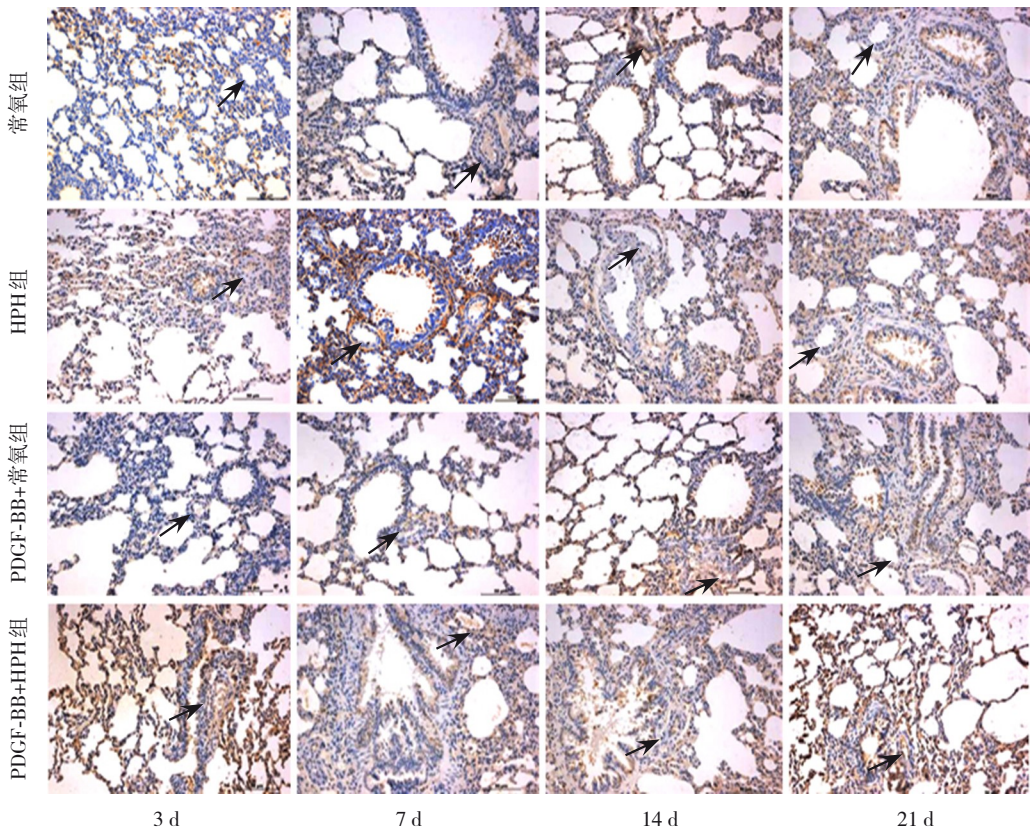


图 4 各组新生大鼠肺组织中 PCNA 表达 (免疫组化, ×200) PDGF-BB+HPH 组与 HPH 组各时间点 PCNA 在肺血管的阳性表达较常氧组增加。缺氧 3、7、14 d 时, PDGF-BB+HPH 组 PCNA 阳性表达较 HPH 组增加, PDGF-BB+常氧组 PCNA 阳性表达多于常氧组; 缺氧 21 d 时, PDGF-BB+HPH 组较 HPH 组 PCNA 阳性表达差异不明显, PDGF-BB+常氧组较常氧组 PCNA 阳性表达差异不明显。箭头所指为 PCNA 阳性表达呈棕色。

表 4 各组新生大鼠肺组织中 PCNA 表达比较 (x̄ ± s, IOD/Area)

组别	n	缺氧 3 d	缺氧 7 d	缺氧 14 d	缺氧 21 d
常氧组	8	0.133 ± 0.007	0.155 ± 0.007	0.173 ± 0.006	0.198 ± 0.011
PDGF-BB+常氧组	8	0.156 ± 0.011 ^a	0.186 ± 0.009 ^a	0.204 ± 0.014 ^a	0.224 ± 0.037
HPH 组	8	0.205 ± 0.016 ^{a,b}	0.243 ± 0.012 ^{a,b}	0.285 ± 0.011 ^{a,b}	0.322 ± 0.015 ^{a,b}
PDGF-BB+HPH 组	8	0.252 ± 0.018 ^{a,b,c}	0.308 ± 0.017 ^{a,b,c}	0.321 ± 0.012 ^{a,b,c}	0.336 ± 0.016 ^{a,b}
F 值		123.46	257.69	257.69	72.98
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：[PCNA] 增殖细胞核抗原；[PDGF-BB] 血小板源性生长因子-BB；[HPH] 缺氧性肺动脉高压。a 示与常氧组比较， $P<0.05$ ；b 示与 PDGF-BB+常氧组比较， $P<0.05$ ；c 示与 HPH 组比较， $P<0.05$ 。

3 讨论

新生儿HPH是新生儿发病及死亡的主要原因之一,可能和多种病因有关,其发病机制复杂,主要特征是肺血管阻力持续增高和血管重塑,导致严重的呼吸窘迫、低氧血症,甚至死亡^[10]。肺血管重塑是肺动脉高压的一个重要特征,其中PASMC过度增殖和迁移可能是血管重塑形成的关键^[11]。有研究表明通过HPH动物模型抑制PDGF-BB表达,减少PASMC增殖和迁移,可逆转肺血管重塑^[12]。本研究通过外源性增加HPH新生大鼠体内PDGF-BB的表达,探讨PDGF-BB对PASMC的作用及肺血管重塑的影响。

本研究通过尾静脉注射表达PDGF-BB的腺病毒载体后,构建HPH新生大鼠模型,发现在缺氧3、7、14、21 d时,HPH组新生大鼠RVSP均显著高于同日龄常氧组,提示HPH新生大鼠模型构建成功,RVSP随时间延长而增加。另外,缺氧3 d时发现PDGF-BB+HPH组新生大鼠肺组织可见标记腺病毒的绿色荧光,且绿色荧光随时间延长而逐渐变弱,提示腺病毒成功转染至新生大鼠肺组织,缺氧21 d外源性的PDGF-BB在体内有衰减趋势,相应的作用减弱。本研究发现HPH组新生大鼠肺组织中PDGF-BB表达水平明显高于常氧组,说明PDGF-BB在新生大鼠HPH形成中有重要作用。免疫组化结果显示,PDGF-BB+HPH组、HPH组在各时间点PDGF-BB、PCNA表达均高于PDGF-BB+常氧组、常氧组,在缺氧3、7、14 d时,PDGF-BB+HPH组PDGF-BB、PCNA表达高于HPH组,PDGF-BB+常氧组较常氧组高,提示表达PDGF-BB的腺病毒载体成功转染至新生大鼠体内。而缺氧21 d时,PDGF-BB+常氧组新生大鼠肺组织中PDGF-BB的表达和常氧组相比无明显差异,HPH组新生大鼠体内PDGF-BB的表达和PDGF-BB+HPH组比较差异无统计学意义,提示腺病毒载体随时间的延长而衰减。

PDGF-BB被认为是血管平滑肌细胞中最强的促分裂原,可明显促进PASMC的增殖及血管壁增厚^[13-15]。PDGF-BB是一种肽类生长因子,它与PDGF家族中的其他细胞因子一样,能促进血管生成、伤口愈合、纤维化、气道重塑^[16]。研究发现成人肺高压患者的肺组织中PDGF-BB及其受体的表达明显增高,在野百合香碱诱导的肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)动物模型中

PDGF-BB在肺动脉及平滑肌细胞中的表达明显上调^[17-18]。研究表明PDGF-BB抑制剂STI571可减轻野百合香碱诱导的PAH动物模型的肺血管重塑,降低肺动脉压力^[12]。本研究发现,缺氧3 d时PDGF-BB+HPH组新生大鼠RVSP高于HPH组,PDGF-BB+常氧组高于常氧组,随时间增加RVSP逐渐升高,表达PDGF-BB的腺病毒载体随时间增加而衰减,而缺氧21 d时,PDGF-BB+HPH组新生大鼠RVSP与HPH组比较无明显差异,PDGF-BB+常氧组与常氧组比较无明显差异,但PDGF-BB+HPH组和HPH组新生大鼠RVSP仍高于PDGF-BB+常氧组与常氧组。进一步说明,缺氧早期,外源性给予PDGF-BB,在HPH发病中有重要作用。

本课题组前期发现,HPH组新生大鼠缺氧7 d可发生血管重塑^[1],本研究在HPH造模前转染PDGF-BB腺病毒载体,发现缺氧3 d时PDGF-BB+HPH组新生大鼠肺血管可见部分血管壁增厚,推测可能由于缺氧环境下外源性增加PDGF-BB,使肺血管重塑更早出现,导致肺动脉压力增高。本研究还发现,在缺氧3、7、14 d时,PDGF-BB+HPH组新生大鼠肺组织中PCNA表达明显高于HPH组、PDGF-BB+常氧组、常氧组,且PDGF-BB+常氧组PDGF-BB的表达明显高于常氧组,故推测通过PDGF-BB的作用,可能促进PASMC的过度增殖,上调PCNA的表达,促进肺血管重塑,提高了肺动脉压力。

综上所述,通过外源性提高HPH新生大鼠PDGF-BB表达水平,可上调PCNA表达,促进肺血管重塑,提高肺动脉压力。本研究表明靶向干预体内PDGF-BB,可为新生儿HPH治疗提供新的理论依据和新思路。

[参 考 文 献]

- [1] Wang L, Li M. Roles of heat shock protein 70 toward hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) blockade in newborn rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2018, 11(12): 13520-13527.
- [2] Wang L, Zheng Q, Yuan Y, et al. Effects of 17 β -estradiol and 2-methoxyestradiol on the oxidative stress-hypoxia inducible factor-1 pathway in hypoxic pulmonary hypertensive rats[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(5): 2537-2543. PMID: 28565876. PMCID: PMC5443199. DOI: 10.3892/etm.2017.4243.
- [3] Rajagopal S, Yu YA. The pathobiology of pulmonary arterial hypertension[J]. *Cardiol Clin*, 2022, 40(1): 1-12. PMID: 34809910. DOI: 10.1016/j.ccl.2021.08.001.
- [4] Yan Y, He YY, Jiang X, et al. DNA methyltransferase 3B

- deficiency unveils a new pathological mechanism of pulmonary hypertension[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(50): eaba2470. PMID: 33298433. PMCID: PMC7725449. DOI: 10.1126/sciadv.aba2470.
- [5] Li D, Shao NY, Moonen JR, et al. ALDH1A3 coordinates metabolism with gene regulation in pulmonary arterial hypertension[J]. *Circulation*, 2021, 143(21): 2074-2090. PMID: 33764154. PMCID: PMC8289565. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048845.
- [6] Xu J, Zhong Y, Yin H, et al. Methylation-mediated silencing of PTPRD induces pulmonary hypertension by promoting pulmonary arterial smooth muscle cell migration via the PDGFRB/PLC γ 1 axis[J]. *J Hypertens*, 2022, 40(9): 1795-1807. PMID: 35848503. PMCID: PMC9451921. DOI: 10.1097/HJH.0000000000003220.
- [7] Qin C, Zan Y, Xie L, et al. Ataxia telangiectasia mutated: the potential negative regulator in platelet-derived growth factor-BB promoted proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 942251. PMID: 35990964. PMCID: PMC9382100. DOI: 10.3389/fcvm.2022.942251.
- [8] Awad KS, West JD, de Jesus Perez V, et al. Novel signaling pathways in pulmonary arterial hypertension (2015 Grover conference Series) [J]. *Pulm Circ*, 2016, 6(3): 285-294. PMID: 27683605. PMCID: PMC5019081. DOI: 10.1086/688034.
- [9] 王乐, 吴海燕, 李明霞. 热休克蛋白 70 对新生大鼠缺氧性肺动脉高压的保护作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(1): 88-94. PMID: 28100330. PMCID: PMC7390131. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2017.01.015.
- [10] Martinho S, Adão R, Leite-Moreira AF, et al. Persistent pulmonary hypertension of the newborn: pathophysiological mechanisms and novel therapeutic approaches[J]. *Front Pediatr*, 2020, 8: 342. PMID: 32850518. PMCID: PMC7396717. DOI: 10.3389/fped.2020.00342.
- [11] Kikuchi N, Satoh K, Kurosawa R, et al. Selenoprotein P promotes the development of pulmonary arterial hypertension: possible novel therapeutic target[J]. *Circulation*, 2018, 138(6): 600-623. PMID: 29636330. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.033113.
- [12] Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(10): 2811-2821. PMID: 16200212. PMCID: PMC1236676. DOI: 10.1172/JCI24838.
- [13] Veith C, Schermuly RT, Brandes RP, et al. Molecular mechanisms of hypoxia-inducible factor-induced pulmonary arterial smooth muscle cell alterations in pulmonary hypertension[J]. *J Physiol*, 2016, 594(5): 1167-1177. PMID: 26228924. PMCID: PMC4771790. DOI: 10.1113/JP270689.
- [14] 陈昌贵, 易春峰, 李立为, 等. 异丹叶大黄素对血小板源性生长因子-BB 诱导的肺动脉平滑肌细胞增殖的影响研究[J]. *中国药师*, 2021, 24(6): 1040-1045. DOI: 10.3969/j.issn.1008-049X.2021.06.010.
- [15] 邱立强, 徐昌武, 李雯静, 等. 斑蝥素对血小板衍生长因子 BB 诱导血管平滑肌细胞增殖和迁移的机制研究[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2019, 21(1): 58-62. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0126.2019.01.015.
- [16] Wang C, Liu Y, He D. Diverse effects of platelet-derived growth factor-BB on cell signaling pathways[J]. *Cytokine*, 2019, 113: 13-20. PMID: 30539778. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.10.019.
- [17] Qian Z, Li Y, Yang H, et al. PDGFBB promotes proliferation and migration via regulating miR-1181/STAT3 axis in human pulmonary arterial smooth muscle cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 315(6): L965-L976. PMID: 30211651. DOI: 10.1152/ajplung.00224.2018.
- [18] Li Y, Li L, Qian Z, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-DNA methyltransferase 1-miR-1281-histone deacetylase 4 regulatory axis mediates platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells[J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(6): e007572. PMID: 29514810. PMCID: PMC5907547. DOI: 10.1161/JAHA.117.007572.

(本文编辑: 杨丹)