

论著·临床研究

缺氧性肺动脉高压新生儿血清 HIF-1 α 、ET-1 及 Ca²⁺ 变化及意义

周英 王乐 李明霞

(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** 探讨血清缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、内皮素-1 (ET-1) 及血清钙 (Ca²⁺) 水平在新生儿缺氧性肺动脉高压 (HPH) 中的变化及意义。**方法** HPH 组 75 例 (轻度 29 例、中度 25 例、重度 21 例), 对照组为非 HPH 住院新生儿 22 例, 所有新生儿均于生后 24 h 内行超声心动图测定肺动脉收缩压 (PASP), 用 ELISA 法测定血清 HIF-1 α 、ET-1 水平, 离子选择电极法测定血清 Ca²⁺ 浓度。**结果** HPH 3 组患儿血清 HIF-1 α 及 ET-1 水平较对照组明显增高 ($P < 0.01$), 并随 PASP 增加而递增, 分别和 PASP 呈正相关 ($r_{\text{HIF-1}\alpha} = 0.75, P < 0.01$; $r_{\text{ET-1}} = 0.56, P < 0.05$); 重度 HPH 患儿血清 Ca²⁺ 水平明显低于对照组 ($P < 0.05$), HPH 患儿血清 Ca²⁺ 水平与 PASP 无相关性。**结论** HPH 新生儿血清 HIF-1 α 、ET-1 水平与 PASP 存在相关性, HIF-1 α 、ET-1 参与了 HPH 的发生, 重度 HPH 血清 Ca²⁺ 水平较对照组明显降低, 提示血清 Ca²⁺ 在重度 HPH 的形成过程中发挥了一定的作用。

[中国当代儿科杂志, 2011, 13(3):181-184]

[关键词] 缺氧性肺动脉高压; 缺氧诱导因子; 内皮素; 钙离子; 新生儿

[中图分类号] R722.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)03-0181-04

Serum levels of HIF-1 α , ET-1 and Ca²⁺ in neonates with hypoxic pulmonary hypertension

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

Abstract: **Objective** To study the changes and significance of serum hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), endothelin-1 (ET-1) and calcium (Ca²⁺) levels in neonates with hypoxic pulmonary hypertension (HPH). **Methods** Seventy-five neonates with HPH (29 mild, 25 moderate and 21 severe) and 22 hospitalized neonates with non-HPH (control group) were enrolled. Pulmonary artery systolic blood pressure (PASP) was measured by bedside echocardiography within 24 hrs after birth. Serum levels of HIF-1 α and ET-1 were measured using ELISA. Serum Ca²⁺ concentrations were measured with ion selective electrode. **Results** Serum levels of HIF-1 α and ET-1 in the HPH group increased significantly compared with those in the control group ($P < 0.01$), and were positively related with PASP ($r_{\text{HIF-1}\alpha} = 0.75, P < 0.01$; $r_{\text{ET-1}} = 0.56, P < 0.05$). Serum Ca²⁺ levels in neonates with severe HPH were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). There were no correlation between serum Ca²⁺ levels and PASP. **Conclusions** Serum HIF-1 α and ET-1 levels are positively related with PASP in neonates with HPH, suggesting that serum HIF-1 α and ET-1 may be involved in the occurrence of neonatal HPH. Serum Ca²⁺ levels are reduced in severe neonates with HPH, suggesting that serum Ca²⁺ may play a role in the occurrence of severe HPH.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(3):181-184]

Key words: Hypoxic pulmonary hypertension; Hypoxia-inducible factor; Endothelin; Calcium; Neonate

新生儿期肺动脉高压的原因以缺氧最多见, 各种疾病引起的缺氧可导致新生儿肺血管痉挛、肺循环阻力增高, 最终致肺动脉压升高, 称为缺氧性肺动脉高压 (hypoxic pulmonary hypertension, HPH)。目前有关 HPH 的发病机制不清, 缺氧诱导因子-1 α

(HIF-1 α) 是缺氧时机体产生的一种重要的蛋白质调节因子, 可调控多种靶基因^[1], 其中包括血管收缩因子内皮素-1 (ET-1)。另外, 钙信号转导在 HPH 发生、发展过程中也具有特别重要的作用, ET-1 可通过增加胞浆 Ca²⁺ 浓度而使肺血管发生收缩反应,

[收稿日期] 2010-04-04; [修回日期] 2010-09-04

[作者简介] 周英, 女, 硕士, 副主任医师。

[通信作者] 李明霞, 主任医师。

升高肺动脉压^[2]。但是目前在新生儿 HPH 的发生发展过程中,HIF-1 α 是否通过调节 ET-1 进而影响血清 Ca²⁺ 浓度而发挥作用,仍不清楚。

因此,本研究通过观察 HPH 新生儿血清 HIF-1 α 、ET-1、Ca²⁺ 水平的变化,了解 HIF-1 α 、ET-1、Ca²⁺ 与肺动脉收缩压(PASP)的关系,探讨 HIF-1 α 、ET-1、Ca²⁺ 在新生儿 HPH 中的变化及意义,为进一步研究 HPH 的治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

所有研究对象均来源于 2007 年 12 月至 2009 年 2 月在我院新生儿科住院的患儿,共 97 例,分为 HPH 组 and 对照组。HPH 组 75 例,男 42 例,女 33 例;胎龄 36.5 $\pm$ 3.1 周(33 ~ 41 周);出生体重 2778 $\pm$ 324 g(2100 ~ 3900 g);其原发病包括:重度窒息 27 例次,胎粪吸入综合征 13 例次,肺炎 15 例次,呼吸窘迫综合征 28 例次。纳入标准:(1)均有明确的围产期缺氧史、缺氧症状、动脉血气分析及经皮氧饱和度(TcSaO₂)监测提示低氧血症(PaO₂ $\leq$ 60 mmHg, Tc-SaO₂ $\leq$ 85%);(2)经多普勒超声心动图检查,证实合并肺动脉高压(PASP $\geq$ 40 mmHg)^[3]。依据 PASP 升高的程度不同^[4],将 HPH 组分为 3 个亚组:轻度 HPH 组 29 例(PASP 40 mmHg ~)、中度 HPH 组 25 例(PASP 50 mmHg ~)、重度 HPH 组 21 例(PASP 70 mmHg ~)。排除合并先天性心脏病、先天性肺发育畸形、气胸、膈疝等新生儿。

对照组为同期在我科住院的非 HPH 新生儿 22 例,男 12 例,女 10 例;胎龄 36.2 $\pm$ 2.5 周(34 ~ 40.5 周),体重 2798 $\pm$ 345 g(2120 ~ 3980 g)。纳入标准:(1)无缺氧表现及心肺疾病,TcSaO₂ 测定显示无低氧血症(TcSaO₂ $\geq$ 85%);(2)经多普勒超声心动图检查,证实未合并肺动脉高压(PASP < 40 mmHg)。对照组与 HPH 组的体重、胎龄、性别差异无统计学意义,具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 PASP 测定 所有患儿均于生后 24 h 内行床旁超声心动图检查。在无右室流出道梗阻及肺动脉狭窄时,采用三尖瓣返流压差(TRPG)法测定肺动脉收缩压。测算方法:测量三尖瓣返流峰值速度(Vm),根据简化 Bernoulli 方程计算出 PASP,即 PASP = TRPG + 10 mmHg。当未测得三尖瓣返流时,根据动脉导管处或卵圆孔未闭处分流的最大速度,计算出主动脉与肺动脉间收缩期最大压差(Δ P),

PASP = 主动脉收缩压 - Δ P。其中主动脉的收缩压用肱动脉压代替。心脏超声测量时保持受检者安静,所有值均由具有丰富超声心动图检查经验的同一医师进行测量。为了减少测量误差,对所有数据均连续测量 3 个心动周期,取平均值。

1.2.2 血清 HIF-1 α 、ET-1 及 Ca²⁺ 浓度测定 所有新生儿均于检测 PASP 的同时抽取外周静脉血 2 mL,3000 rpm 离心 10 min,抽取上清液,样品密封后,-80℃冰箱保存。冰冻样品测定前置于室温或常温水中复融,并将样品摇匀。由专人按说明书用 ELISA 法进行血清 HIF-1 α 、ET-1 水平测定,试剂盒由上海西唐生物科技有限公司提供;离子选择电极法测定血清 Ca²⁺ 浓度。所有血清标本避免反复冻融,一旦标本溶血,予以剔除。测量时使用盲法(单盲)原则,检测医师在未知被测样本所代表的组别的前提下完成定量检测工作。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件包和 Excel 2003 软件包进行数据处理和统计学分析,资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 q 检验。各组血清 HIF-1 α 、ET-1、Ca²⁺ 水平与 PASP 之间的相关性用两个变量间直线相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清 HIF-1 α 、ET-1 及 Ca²⁺ 水平比较

本研究发现 HPH 组新生儿血清 HIF-1 α 及 ET-1 水平均较对照组升高($P < 0.01$),而不同程度 HPH 患儿血清 HIF-1 α 和 ET-1 随肺动脉压增高而增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。另外,重度 HPH 组患儿血清 Ca²⁺ 水平明显低于对照组($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 血清 HIF-1 α 、ET-1 及 Ca ²⁺ 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)				
分组	例数	HIF-1 α (pg/mL)	ET-1 (pg/mL)	Ca ²⁺ (mmol/L)
对照组	22	283 $\pm$ 40	44 $\pm$ 8	2.15 $\pm$ 0.12
轻度 HPH 组	29	597 $\pm$ 75 ^a	89 $\pm$ 19 ^a	1.98 $\pm$ 0.14
中度 HPH 组	25	857 $\pm$ 107 ^{a,c}	208 $\pm$ 33 ^{a,c}	1.89 $\pm$ 0.17
重度 HPH 组	21	1040 $\pm$ 212 ^{a,c,d}	370 $\pm$ 41 ^{a,c,d}	1.26 $\pm$ 0.23 ^b
F 值		31.76	28.45	4.11
P 值		<0.01	<0.01	<0.05

与对照组相比, a: $P < 0.01$; b: $P < 0.05$; c: 与轻度 HPH 组相比, $P < 0.05$; d: 与中度 HPH 组相比, $P < 0.05$

2.2 HPH 组血清 HIF-1 α 、ET-1、Ca²⁺ 水平与 PASP 的相关性分析

HPH 患儿 PASP 与血清 HIF-1 α 、ET-1 的变化呈正相关,差异有统计学意义,与血清 Ca²⁺ 变化无相

关性。见图1,图2。

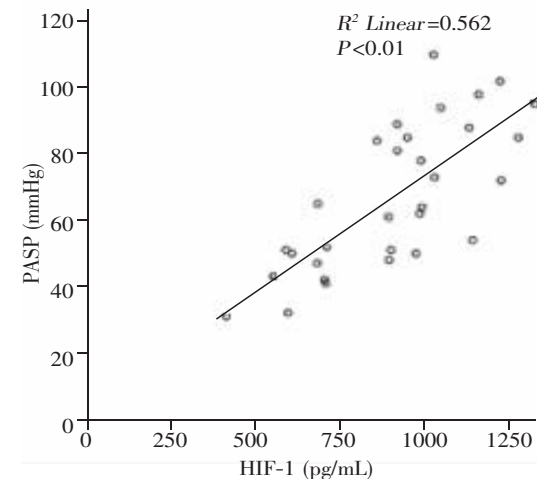


图1 HIF-1与PASP的相关性

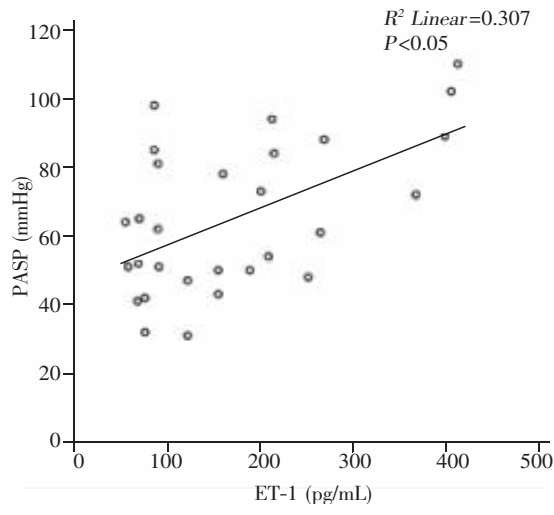


图2 ET-1与PASP的相关性

3 讨论

HPH 的发生涉及到缺氧的直接作用、细胞外神经体液因素(神经递质、血管活性肽、细胞因子、生长因子等)、离子通道(钙通道、钾通道)、基因表达等诸多方面^[5],缺氧作为始动因素,使肺微小动脉内皮受损,导致功能失调,引起血管活性物质及细胞因子产生、释放异常,血管舒缩因子之间平衡失调,共同作用于血管平滑肌,引起缺氧性肺血管收缩,甚至肺血管重建,导致肺动脉高压^[6]。

HIF-1 α 是缺氧时机体产生的重要的蛋白质调节因子,受氧浓度调控。急性缺氧时 HIF-1 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]。动物实验提示 HIF-1 α 是肺组

织和肺血管对低氧反应重要的中介因子,在肺动脉高压的形成过程中发挥着一定的调控作用^[8-9]。

本研究结果发现,HPH 组新生儿血清 HIF-1 α 水平明显高于对照组,并随 HPH 程度的加重其水平逐渐增加,相关分析表明 HIF-1 α 与 PASP 呈显著正相关。提示 HPH 时 PASP 与血清 HIF-1 α 水平密切相关,缺氧诱导血清 HIF-1 α 水平增加,继而导致 PASP 的增高。

ET 是迄今为止所发现的作用最强的内源性血管收缩因子,肺部 是 ET-1 作用和代谢的最重要脏器^[10]。缺氧时肺组织内皮细胞受损,ET-1 基因表达及释放增强,当血清中 ET-1 浓度增高时,通过与肺血管平滑肌上的 ET_AR 结合,使 Ca²⁺ 通道开放,胞浆 Ca²⁺ 浓度增加而使肺血管收缩,肺动脉压升高^[11]。用选择性 ET-1-A 受体拮抗剂可阻止缺氧性肺血管收缩,抑制或降低缺氧所致的肺动脉高压的发生和发展^[12],说明 ET-1 参与了 HPH 的形成,是缺氧时促进肺动脉压力升高的重要因素之一。另外,在 ET-1 基因启动子区有 HIF-1 α 的结合位点^[13],低氧可以通过诱导 HIF-1 α 的产生而调节 ET-1 基因的表达,进而导致肺动脉压力升高。

本研究发现,HPH 组新生儿血清 ET-1 水平较对照组升高,且随 PASP 程度加重而升高,相关分析表明 ET-1 水平与 PASP 呈显著正相关。由此可见 ET-1 和 HPH 关系密切,推测血清 ET-1 水平的变化在 HPH 的发病中也起着重要作用。HPH 时血清 ET-1 水平升高考虑与以下原因有关:(1)在肺组织中合成增加:在生理情况下肺泡上皮细胞、肺血管内皮细胞和肺神经内分泌细胞均可表达 ET-1。低氧导致肺动脉高压时肺组织内 ET-1 蛋白水平明显升高^[14],主要分布在伴有中层增厚和内膜纤维化损害的肺动脉中。(2)肺清除 ET-1 的能力下降:肺是 ET-1 代谢的重要器官,正常状态下主动脉血液中 ET-1 水平高于肺动脉,HPH 时肺动脉血液中 ET-1 水平高于主动脉,由此推测肺清除 ET-1 能力下降。由于以上因素,缺氧时 ET-1 水平升高,肺组织及血管内皮细胞 ET-1 释放增多,肺血管对其反应性增强,导致肺血管收缩,发生肺动脉高压。

钙离子是促进平滑肌细胞收缩、触发细胞增殖相关信号转导的关键始动因素之一,在 HPH 发生、发展过程中具有特别重要的作用^[15]。细胞内钙绝大部分分布在细胞核及细胞器中,离子状态的钙量极微。在静息状态下,细胞胞质游离 Ca²⁺ 浓度在数 nmol/L 水平,胞内外 Ca²⁺ 浓度相差 10 万倍,若 Ca²⁺ 受体被激活或生物信号的刺激均可使胞质

Ca²⁺ 浓度升高,进一步发挥生物放大效应。

本研究发现,重度 HPH 组血清钙水平明显降低,且 PASP 与 Ca²⁺ 浓度无相关性,表明重度 HPH 时血清钙参与了肺血管的收缩反应,而在轻、中度组 HPH 中血清钙对肺动脉压力的影响不明显。推测:(1)轻、中度 HPH 仅抑制肺动脉平滑肌引起电压依赖钾通道(Kv)下调,钙通道尚未完全开放,仅有少量钙内流和胞内 Ca²⁺ 释放,细胞内 Ca²⁺ 浓度升高不明显,故其缩血管作用也相对有限,使肺动脉压力升高不显著;(2)重度 HPH 时造成 Kv 关闭,钙通道开放增加^[16],血清钙大量内流,胞内钙 Ca²⁺ 浓度迅速增加,生物效应急剧放大,钙超载明显。同时,在此过程中,氧自由基大量“堆积”,也促进钙超载,Ca²⁺ 使肺血管收缩明显,肺动脉压力明显升高。在本研究中,若增大样本量,是否可观察到中、轻度 HPH 组与对照组血清钙的差别尚需继续研究。

综上所述,HPH 时随着 PASP 的增加,血清 HIF-1α、ET-1 水平相应升高,与 PASP 呈显著正相关,因此,缺氧所致血清 HIF-1α、ET-1 水平的变化可能在 HPH 的发病中起着重要作用;重度 HPH 组血清 Ca²⁺ 水平明显降低,可能与此阶段血清 Ca²⁺ 大量内流有关,细胞外钙离子亦参与 HPH 的发展过程。然而 HPH 的形成是一个复杂的、多因素参与的过程,仍需要进一步的探讨。

[参 考 文 献]

[1] Elvert G, Kappel A, Heidenreich R, Englmeier U, Lanz S, Ackert T, et al. Cooperative interaction of hypoxia inducible factor-2α (hif-2α) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) [J]. J Biol Chem, 2003, 278(9): 7520-7530.

[2] Kasaharab Y, Tuder RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(3 Pt 1): 737-744.

[3] McQuillan BM, Picard MH, Leavitt M, Weyman AE. Clinical cor-

relates and reference intervals for pulmonary artery systolic pressure among echocardiographically normal subjects [J]. Circulation, 2001, 104(23): 2797-2802.

[4] McGoon MD. The assessment of pulmonary hypertension[J]. Clin Chest Med, 2001, 22(3): 493-508.

[5] Widimský J. Pulmonary hypertension in chronic lung disease[J]. Cor Vasa, 2007, 49(1): 25-33.

[6] Das R, Balonan L, Ballard HJ, Ho S. Chronic hypoxia inhibits the antihypertensive effect of melatonin on pulmonary artery[J]. Int J Cardiol, 2008, 126(3): 340-345.

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

[8] Carraway MS, Ghio AJ, Suliman HB. Carbon monoxide promotes hypoxic pulmonary vascular remodeling [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 282(4): L693-L702.

[9] 何振华, 张秀峰, 谭小武. 大鼠缺氧性肺动脉高压过程中缺氧诱导因子 1α 和诱导性一氧化氮合酶的变化[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29(11): 775-776.

[10] Endo A, Ayusawa M, Minato M, Takada M, Takahashi S, Harada K. Endogenous nitric oxide and endothelin-1 in persistent pulmonary hypertension of the newborn[J]. Eur J Pediatr, 2001, 160(4): 217-222.

[11] Wang J, Shimoda LA, Weigand L, Wang W, Sun D, Sylvester JT. Acute hypoxia increases intracellular [Ca²⁺] in pulmonary arterial smooth muscle by enhancing capacitive Ca²⁺ entry[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(6): L1059-L1069.

[12] McLaughlin VV, Sitbon O, Badesch DB, Barst RJ, Black C, Galie N, et al. Survival with first-line bosentan in patients with primary pulmonary hypertension [J]. Eur Respir J, 2005, 25(2): 244-249.

[13] Hu R, Dai A, Tan S. Hypoxia-inducible factor 1 α upregulates the expression of inducible nitric oxide synthase gene in pulmonary arteries of hyposic rat[J]. Chin Med J (Engl), 2002, 115(12): 1833-1837.

[14] Kanazawa F, Nakanishi K, Osada H, Kanamaru Y, Ohnishi N, Uenoyama M, et al. Expression of endothelin-1 in the brain and lung of rats exposed to permanent hypobarichypoxia[J]. Brain Res, 2005, 1036(1-2): 145-154.

[15] 李智, 刘洪瑞, 王晓红. 肺动脉高压与钙通道的相关性[J]. 中国药物与临床, 2003, 3(4): 328-332.

[16] Mauban JR, Remillard CV, Yuan JX. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: role of ion channels[J]. J Appl Physiol, 2005, 98(1): 415-420.

(本文编辑:王庆红)