

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.09.015

论著·实验研究

## 11 $\beta$ -HSD2 及相关信号分子在新生大鼠 持续性肺动脉高压发病中的作用

王彦梅<sup>1</sup> 吴健容<sup>1</sup> 田松柏<sup>2</sup> 李姗姗<sup>1</sup> 谷强<sup>3</sup>

(1. 石河子大学医学院, 新疆 石河子 832000; 2. 阿克苏第一人民医院妇产科, 新疆 阿克苏 843000;  
3. 石河子大学医学院第一附属医院儿科, 新疆 石河子 832008)

**[摘要]** **目的** 探讨肺组织中 II 型 11 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶 (11 $\beta$ -HSD2) 及相关信号分子在新生大鼠持续性肺动脉高压 (PPH) 发病中的作用。**方法** 6 只 Sprague-Dawley 大鼠在孕第 19 天随机分为 PPH 组和对照组, 每组 3 只, 其中 PPH 组置于 12% 的氧浓度中及腹腔内注射吲哚美辛 0.5 mg/kg, 每日两次, 连续 3 d, 建立胎鼠肺动脉高压模型; 对照组暴露在空气中并同时腹腔注射等量生理盐水。对照组和 PPH 组于孕第 22 天剖腹分别获取新生大鼠 28 只、31 只, 两组分别随机处死 15 只新生大鼠。采用激光共聚焦技术观察 11 $\beta$ -HSD2 在新生大鼠肺组织中的表达, ELISA 检测 PPH 大鼠血清中皮质醇及肺组织中前列腺素、肾素、血管紧张素、醛固酮的浓度。**结果** 11 $\beta$ -HSD2 在对照组及 PPH 组大鼠肺组织广泛表达。与对照组比较, PPH 组肺组织中 11 $\beta$ -HSD2 及前列腺素的表达降低 ( $P<0.05$ ), 而血清皮质醇及肺组织中肾素、血管紧张素、醛固酮的表达增高 ( $P<0.05$ )。**结论** 11 $\beta$ -HSD2 及相关信号分子在新生大鼠 PPH 的发生发展中发挥了作用。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(9): 939-943]

**[关键词]** 持续性肺动脉高压; II 型 11 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶; 皮质醇; 血管紧张素; 醛固酮; 新生大鼠

### Roles of type II 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and its signaling factors in pathogenesis of persistent pulmonary hypertension in neonatal rats

WANG Yan-Mei, WU Jian-Rong, TIAN Song-Bai, LI Shan-Shan, GU Qiang. Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832008, China (Gu Q, Email: guqiang106@sina.com)

**Abstract: Objective** To study the roles of type II 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD2) and its signaling factors in the lung tissue in pathogenesis of persistent pulmonary hypertension (PPH) in neonatal rats. **Methods** Six Sprague-Dawley rats on the 19th day of pregnancy were randomly divided into PPH and control groups ( $n=3$  each). The PPH group was intraperitoneally injected with indomethacin (0.5 mg/kg) twice daily and exposed in 12% oxygen for three days, in order to prepare a fetal rat model of PPH. The control group was intraperitoneally injected with an equal volume of normal saline and exposed to air. Neonatal rats were born by caesarean section from both groups on the 22nd day of pregnancy. In each group, 15 neonatal rats were randomly selected and sacrificed. 11 $\beta$ -HSD2 expression in the lung tissue of neonatal rats were observed by Confocal laser technology, and serum cortisol levels and prostacyclin, renin, angiotensin and aldosterone in the lung tissue of both groups were measured using ELISA. **Results** 11 $\beta$ -HSD2 protein was widely expressed in the lung tissue of the control and PPH groups. The levels of 11 $\beta$ -HSD2 and prostacyclin in the lung tissue were lower in the PPH group than in the control group, while serum cortisol levels and renin, angiotensin and aldosterone in the lung tissue were higher in the PPH group than in the control group ( $P<0.05$ ). **Conclusions** 11 $\beta$ -HSD2 and its signaling factors play roles in pathogenesis of PPH in neonatal rats.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(9): 939-943]

**Key words:** Persistent pulmonary hypertension; Type II 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase; Cortisol; Angiotensin; Aldosterone; Neonatal rats

[收稿日期] 2014-06-04; [接受日期] 2014-07-08  
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81241123)。  
[作者简介] 王彦梅, 女, 硕士研究生。  
[通信作者] 谷强, 男, 主任医师。

新生儿持续性肺动脉高压 (persistent pulmonary hypertension, PPH) 是新生儿期常见的危重病症之一, 发生率占活产婴儿的 1/1 200~2/1 200<sup>[1]</sup>, 病死率高。研究表明, 围生期窒息缺氧是新生儿 PPH 发生的主要原因之一<sup>[2]</sup>。目前新生儿 PPH 发病机制尚不清楚, 关于 11 $\beta$ -HSD2 及肾素-血管紧张素-醛固酮等相关信号分子在新生儿 PPH 发病中的研究鲜有文献报道。11 $\beta$ -HSD2 是糖皮质激素代谢的关键酶之一, 可通过调节局部组织器官中的糖皮质激素水平来影响血管功能, 低氧状态可负向调控 11 $\beta$ -HSD2 的表达。本研究在采用缺氧加吡啶美辛联合诱导胎鼠肺动脉高压模型的基础上, 从 11 $\beta$ -HSD2 的角度出发, 通过检测 PPH 新生大鼠血清中皮质醇以及肺组织中前列环素、肾素、血管紧张素、醛固酮的浓度, 探讨 11 $\beta$ -HSD2 及相关信号分子在新生儿 PPH 发病中的作用, 从而为新生儿 PPH 的临床诊治及预防提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象及分组

Sprague-Dawley (SD) 清洁级雌鼠 10 只, 雄鼠 5 只, 约 8 周龄, 体重 210~230 g, 购自新疆医科大学实验动物中心, 动物生产许可证号: SCXK [新] 2003-0001。适应性喂养 1 周后, 于上午 10:00 合笼, 次日上午 10:00 查阴道脱落细胞并进行涂片, 以查到精子记为孕 0 d。孕鼠分笼饲养, 共孕 6 只, 随机分配为对照组和 PPH 组各 3 只, 获取对照组新生大鼠 28 只, PPH 组新生大鼠 31 只。分别从对照组和 PPH 组随机抽取 15 只仔鼠用于实验处理。

### 1.2 主要试剂

主要试剂包括吡啶美辛 (Sigma, BCBF9122V)、兔多克隆抗大鼠 11 $\beta$ -HSD2 (美国 Santa Cruz, LO909)、FITC 标记抗兔 (北京中杉金桥, 106103)、Propidium Iodide (Sigma, SLBD2912V)、大鼠血管紧张素、皮质醇、肾素、醛固酮 ELISA 试剂盒 (优尔生, 武汉) 及前列环素 ELISA 试剂盒 (西唐, 上海)。

### 1.3 主要仪器

主要仪器包括恒温水浴箱、酶标仪、低温台

式离心机 (Thermo-scientific, USA)、激光共聚焦显微镜、冰冻切片机、微量加样器等。

### 1.4 胎鼠肺动脉高压模型的建立

采用缺氧加吡啶美辛建立胎鼠肺动脉高压模型<sup>[2]</sup>。在妊娠的第 19 天, 孕鼠被随机分为 PPH 组和对照组。PPH 组: 妊娠第 19 天将大鼠置于 12% 氧浓度的有机玻璃盒中, 保持箱内温度 25~27 $^{\circ}$ C, 湿度 50%~70%, 孕鼠可在箱内自由饮食。每天定时添加水、饲料及更换垫料。腹腔内注射吡啶美辛 0.5 mg/kg, 每日两次, 连续 3 d。对照组: 妊娠第 19 天将大鼠置于空气中, 腹腔内注射与 PPH 组孕鼠相同体积的生理盐水, 其他条件与 PPH 组一致。妊娠第 22 天, 腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉孕鼠并迅速剖腹取出仔鼠 (剔除提前出生的仔鼠)。新生仔鼠处死后立即取出左肺, 将其液氮速冻后 -80 $^{\circ}$ C 保存。右肺组织被取出后用 4% 多聚甲醛固定至少 24 h, 用于苏木精-伊红 (HE) 染色和免疫组化。同时取心脏进行 HE 染色病理检测。并通过比较 PPH 组与对照组新生大鼠右心室游离壁厚度及肺组织中肺小动脉中膜厚度 / (中膜 + 内腔) 厚度比值的差异进行模型验证。

### 1.5 新生大鼠肺组织 11 $\beta$ -HSD2 表达的检测

在激光共聚焦显微镜下观察 11 $\beta$ -HSD2 在新生大鼠肺组织中的表达。取新生大鼠新鲜肺组织进行冰冻切片 (4~5  $\mu$ m), 储存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中待用。将冰冻切片取出, 静置 10 min, 待切片回温和干燥, 浸于 PBS 中震洗 3 次, 每次 5 min, 用吸水纸吸干组织周围多余的 PBS, 加入一抗兔抗大鼠 11 $\beta$ -HSD2 (1:200), 在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜, 然后冲洗一抗, 在浸于 PBS 中震洗 3 次, 每次 5 min, 用吸水纸吸干组织周围多余的 PBS, 加入二抗山羊抗兔 (1:50), 将切片置于暗盒中 37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min, 用 PBS 洗去二抗, 用吸水纸吸干组织周围多余的 PBS, 用 10  $\mu$ g/L Propidium Iodide 封片。在激光共聚焦显微镜下观察, 并采用 AIM Image Examiner 软件对扫描图像进行量化分析。

### 1.6 新生大鼠血清皮质醇及肺组织前列环素、肾素、血管紧张素、醛固酮浓度的检测

应用 ELISA 检测血清皮质醇及肺组织前列环素、肾素、血管紧张素、醛固酮的浓度。采用断头取血法将新生大鼠血液放置于抗凝管中, 混匀, 静置 20 min 后 3 000 g 离心 20 min, 取上清, 贮存

于-80℃。严格按皮质醇说明书检测血清中的皮质醇的含量。取1g肺脏组织，加入5mL 0.01 M PBS (pH=7.4)，匀浆后5000 r/min离心20 min，取上清，按照试剂盒说明书操作，在450 nm波长下测定吸光度(OD值)，计算新生大鼠肺组织中前列环素、肾素、血管紧张素、醛固酮的浓度。

### 1.7 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析，数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示，两组间比较采用组t检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 评价胎鼠肺动脉高压模型指标的变化

缺氧后，新生大鼠右心室出现肥厚，肺小动脉管壁增厚。HE染色结果显示：与对照组相比，PPH组新生大鼠右心室游离壁厚度增高，差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。新生大鼠肺小动脉中膜厚度/(中膜+内腔)厚度增大，差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表1。

表1 两组右心室游离壁厚度及肺小动脉中膜厚度/(中膜+内腔)厚度的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	右心室游离壁厚度 (mm)	肺小动脉中膜厚度/(中膜+内腔)厚度
对照组	15	1.92 ± 0.28	0.40 ± 0.13
PPH组	15	2.65 ± 0.29	0.55 ± 0.13
t值		7.858	9.783
P值		<0.001	<0.001

### 2.2 新生大鼠肺组织中11β-HSD2的表达

激光共聚焦显微镜下显示11β-HSD2在两组新生大鼠肺组织中广泛表达，主要表达在肺血管上皮细胞、肺泡上皮细胞及支气管上皮细胞胞浆内，见图1C、F。PPH组11β-HSD2表达较对照组减少，见图1A、D。对照组、PPH组新生大鼠肺组织中11β-HSD2的平均荧光强度分别为200 ± 23、72 ± 31，两组比较差异有统计学意义( $t = 11.477$ ,  $P < 0.01$ )。

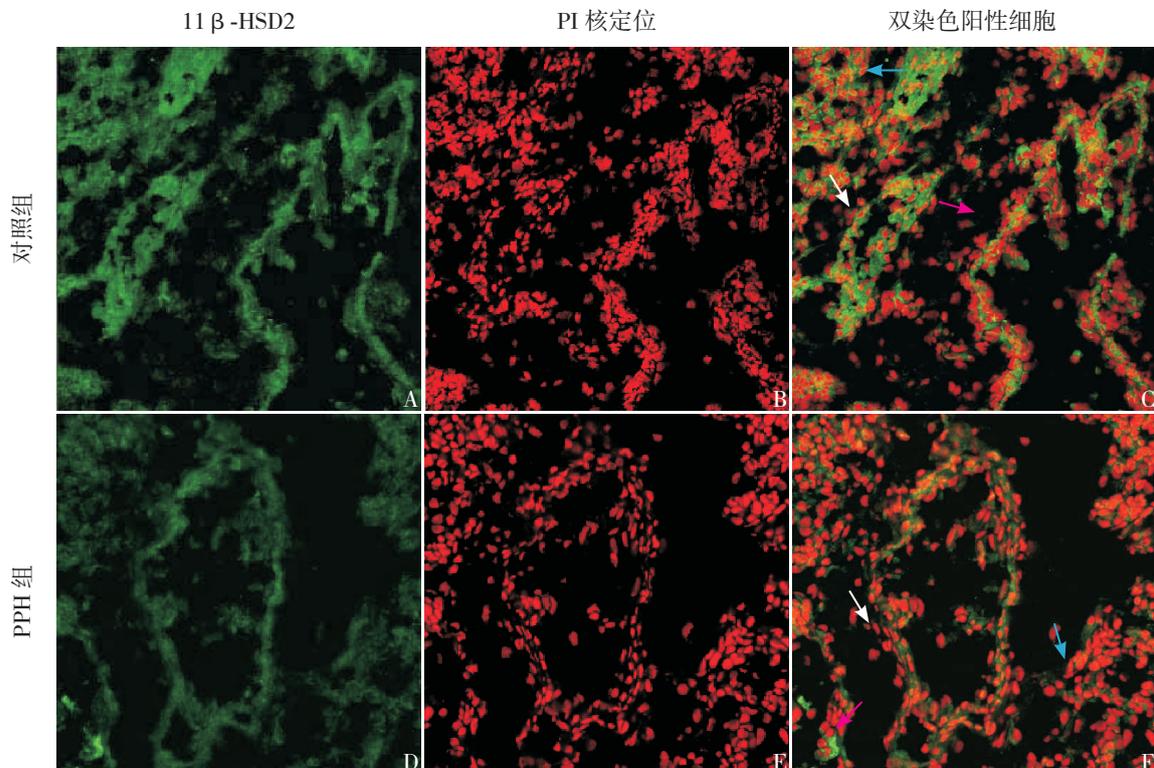


图1 激光共聚焦显微镜定位11β-HSD2的表达(×200) 与对照组(图A)相比，PPH组(图D)11β-HSD2阳性细胞的表达减少。图B、E显示了核染色定位肺血管、肺泡及支气管上皮细胞。图C、F显示11β-HSD2主要是在肺血管上皮细胞(白色箭头所示)、肺泡上皮细胞(蓝色箭头所示)及支气管上皮细胞(红色箭头所示)胞浆内表达。

### 2.3 新生大鼠血清皮质醇与肺组织中前列环素、肾素、血管紧张素、醛固酮的水平

与对照组比较, PPH组新生大鼠血清皮质醇浓度升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); PPH

组肺组织中前列环素的水平降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 肾素、血管紧张素、醛固酮的水平增高, 差异有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ), 见表2。

表2 两组血清皮质醇及肺组织前列环素、肾素、血管紧张素、醛固酮浓度的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	前列环素 (pg/mL)	肾素 (pg/mL)	血管紧张素 (mg/mL)	醛固酮 (ng/mL)	皮质醇 (ng/mL)
对照组	15	41.9 ± 6.5	16 ± 4	267 ± 23	71 ± 3	5.4 ± 1.5
PPH组	15	28.6 ± 1.9	32 ± 6	323 ± 39	86 ± 3	7.6 ± 3.5
t值		7.633	8.297	4.825	13.437	2.256
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.036

### 3 讨论

本研究采用缺氧加吡啶美辛联合诱导的方法建立胎鼠肺动脉高压模型。病理学研究表明: PPH组新生大鼠右心室游离壁及肺小动脉管壁较对照组显著增厚, 表明胎鼠肺动脉高压模型建立成功。相关研究认为缺氧导致肺微小动脉内皮损伤, 进而引起血管内皮功能失调, 使得血管活性物质及细胞因子产生及释放异常, 血管舒缩平衡因子失调, 作用于血管平滑肌, 早期表现为肺血管收缩, 后期表现为肺血管壁病理改变及肺血管重建<sup>[3-4]</sup>。

本研究结果显示: 与对照组相比, PPH组新生大鼠肺组织中11β-HSD2的表达降低, 新生大鼠血清中皮质醇的浓度升高。目前关于11β-HSD2调控皮质激素的研究主要集中在胎盘, 胎盘11β-HSD2在降低母体皮质醇水平从而保护胎儿在宫内的正常生长发育提供重要作用<sup>[5]</sup>。在胎儿宫内生长迟缓和先兆子痫等病理状态的胎盘组织中, 11β-HSD2表达量和酶活性明显低于正常胎盘组织<sup>[6-7]</sup>。已有研究证实胎儿各种组织器官包括肺脏均有11β-HSD2表达<sup>[8]</sup>, 提示宫内缺氧也可能导致肺脏11β-HSD2表达减少从而影响肺血管功能。本研究证实了11β-HSD2主要是在新生大鼠肺组织中肺泡上皮细胞、支气管上皮细胞及肺血管上皮细胞胞浆中表达。

在体内, 健康人外周血管阻力的维持需要少量的皮质激素。11β-HSD2是糖皮质激素代谢的关键酶之一, 为专一氧化酶。在糖皮质激素作用的调节中, 11β-HSD2的激活和调节起着关键作用<sup>[9]</sup>。

11β-HSD2的表达障碍可以导致皮质醇灭活减少, 缺氧抑制了肺组织中11β-HSD2的表达和活性, 使皮质醇浓度增加, 并且还可以通过活化盐皮质激素受体导致高血压<sup>[10]</sup>。根据相关报道, 过多的皮质醇可通过抑制内皮细胞前列环素等血管舒张因子的产生, 同时通过与其受体结合并激活该受体进而增加血管平滑肌细胞上的α肾上腺素受体、血管紧张素II受体等缩血管物质, 从而增加血管的缩血管效应, 最终诱导高血压的发生和发展<sup>[11-12]</sup>。在活体研究中也显示, 抑制血管内皮细胞的11β-HSD2, 可通过反应级联以自分泌的方式使血管收缩, 还会导致血管紧张素II和肾上腺素反应加强<sup>[13]</sup>, 血管紧张素II促进血管收缩和肾上腺皮质分泌醛固酮, 醛固酮可促进钠、水重吸收, 引起血压增高。前列环素与多种肺部疾病相关<sup>[14-15]</sup>, 它主要由内皮细胞分泌, 具有强大的扩张血管, 抑制血小板聚集及细胞黏附的作用, 不仅能预防血栓形成, 还能直接作用于平滑肌细胞, 进而促使血管扩张。近年来证实气管内应用前列环素能选择性降低肺血管阻力<sup>[16]</sup>, 应用前列环素类药物(如前列地尔)能够有效地治疗新生儿PPH<sup>[17]</sup>及低氧性肺动脉高压<sup>[18]</sup>。本研究结果显示, PPH组肺组织中前列环素水平较对照组降低, 肾素、血管紧张素、醛固酮水平较对照组升高, 表明11β-HSD2通过影响前列环素、肾素、血管紧张素、醛固酮参与新生儿PPH的发病机制, 可能成为干预新生儿PPH病情进展的另一个新途径。

综上所述, 11β-HSD2在新生大鼠肺组织中广泛表达。PPH新生大鼠肺组织中11β-HSD2的表达减低, 使新生大鼠血清皮质醇浓度升高。过

高浓度的皮质醇一方面通过抑制肺血管内皮细胞分泌舒血管物质,另一方面又通过激活 $\alpha$ 肾上腺素、血管紧张素II等缩血管物质,使肺血管舒缩功能失衡,持续处于收缩状态,肺血管压力升高,进而造成肺动脉高压。血管紧张素II又促进了肾上腺皮质分泌醛固酮,造成体内水钠潴留,进一步增加了肺血管的压力。

[参 考 文 献]

- [1] 杜立中,魏克伦,孙眉月. 新生儿持续肺动脉高压诊疗常规[J]. 中华儿科杂志, 2002, 40(7): 438-439.
- [2] Xu XF, Gu WZ, Wu XL, et al. Fetal pulmonary vascular remodeling in a rat model induced by hypoxia and indomethacin[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2011, 24(1): 172-182.
- [3] Das R, Balonan L, Ballard HJ, et al. Chronic hypoxia inhibits the antihypertensive effect of melatonin on pulmonary artery[J]. Int J Cardiol, 2008, 126(3): 340-345.
- [4] 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.
- [5] 姚锋祥,汤彪,黄引平. 胎盘11 $\beta$ -HSD2表达与皮质醇代谢水平的关系及其对子痫前期的相关性研究[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(8): 1336-1339.
- [6] Dy J, Guan H, Sampath-Kumar R, et al. Placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is reduced in pregnancies complicated with idiopathic intrauterine growth restriction: evidence that this is associated with an attenuated ratio of cortisone to cortisol in the umbilical artery[J]. Placenta, 2008, 29(2): 193-200.
- [7] Ostreicher I, Almeida JR, Campean V, et al. Changes in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in a low-protein rat model of intrauterine growth restriction[J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25(10): 3195-3203.
- [8] Garbrecht MR, Schmidt TJ, Krozowski ZS, et al. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and the regulation of surfactant protein A by dexamethasone metabolites[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006, 290(4): E653-E660.
- [9] 陈晓琳. 11 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶2与炎症疾病的关系[J]. 医学综述, 2011, 17(12): 1769-1772.
- [10] Campino C, Carvajal CA, Cornejo J, et al. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type-2 and type-1 (11 $\beta$ -HSD2 and 11 $\beta$ -HSD1) and 5 $\beta$ -reductase activities in the pathogenesis of essential hypertension[J]. Endocrine, 2010, 37(1): 106-114.
- [11] Ong SLH, Whitworth JA. How do glucocorticoids cause hypertension: role of nitric oxide deficiency, oxidative stress, and eicosanoids[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2011, 40(2): 393-407.
- [12] Dodt C, Wellhoner JP, Schutt M, et al. Glucocorticoids and hypertension[J]. Internist (Berl), 2009, 50(1): 36-41.
- [13] Hadoke PWF, Christy C, Kotelevtsev YV, et al. Endothelial cell dysfunction in mice after transgenic knockout of type 2, but not type 1, 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase[J]. Circulation, 2001, 104(23): 2832-2837.
- [14] Hache M, Denault AY, Belisle S, et al. Inhaled prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) is an effective addition to the treatment of pulmonary hypertension and hypoxia in the operating room and intensive care unit[J]. Can J Anesth, 2001, 48(9): 924-929.
- [15] Schütte H, Schell A, Schäfer C, et al. Subthreshold doses of nebulized prostacyclin and rolipram synergistically protect against lung ischemia-reperfusion[J]. Transplantation, 2003, 75(6): 814-821.
- [16] Tissot C, Beghetti M. Review of inhaled iloprost for the control of pulmonary artery hypertension in children[J]. Vasc Health Risk Manag, 2009, 5(1): 325-331.
- [17] 赵芳萍,石静云,易彬. 新生儿持续肺动脉高压的治疗进展[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(22): 3521-3524.
- [18] 张凌云,高宝安. 肺动脉平滑肌细胞与低氧性肺血管重塑形成机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(2): 177-181.

( 本文编辑: 邓芳明 )