

论著·实验研究

钙敏感受体在新生小鼠持续性肺动脉高压中的作用

王萌萌¹ 李贺² 张方方² 马克涛² 曹薇薇² 谷强¹

(1. 石河子大学医学院第一附属医院儿科, 新疆 石河子 832000;
2. 石河子大学医学院, 新疆 石河子 832000)

[摘要] **目的** 探讨钙敏感受体(CaSR)激动剂及抑制剂在新生小鼠持续性肺动脉高压(PPH)模型中对CaSR的表达影响,明确其在新生小鼠PPH模型中的作用。**方法** 将49只新生小鼠随机分为对照组($n=10$)、PPH组($n=11$)、激动剂组($n=13$)和抑制剂组($n=15$);将PPH组、激动剂组和抑制剂组小鼠暴露在12%的氧浓度中,对照组小鼠暴露在空气中。激动剂组和抑制剂组每日分别给予GdCl₃(16 mg/kg)、NPS2390(1 mg/kg)腹腔注射1次,低氧组和对照组每日以生理盐水替代,共持续14 d。采用苏木精-伊红染色和免疫组化检测肺血管的变化;采用激光共聚焦技术观察CaSR在新生小鼠肺组织中的表达位置及含量;qRT-PCR技术检测新生小鼠肺组织中CaSR mRNA表达;Western blot法检测新生小鼠肺组织中CaSR蛋白的表达。**结果** 与对照组相比,PPH组肺小动脉血管壁厚度(WT%)及右心室与左心室壁厚度比(RV/LV)均较对照组明显增大($P<0.05$),模型验证成功。与对照组相比,PPH组CaSR mRNA和蛋白表达水平明显增加($P<0.05$),激动剂组表达水平增加更加明显($P<0.05$),而抑制剂组表达减少(均 $P<0.05$)。**结论** CaSR参与了低氧诱导的新生小鼠PPH,可能发挥重要作用。 [中国当代儿科杂志, 2017, 19(2): 208-214]

[关键词] 持续性肺动脉高压;钙敏感受体;新生小鼠

Role of calcium-sensing receptor in neonatal mice with persistent pulmonary hypertension

WANG Meng-Meng, LI He, ZHANG Fang-Fang, MA Ke-Tao, CAO Wei-Wei, GU Qiang. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China (Gu Q, Email: guqiang106@sina.com)

Abstract: Objective To study the effect of calcium-sensing receptor (CaSR) agonists and antagonists on the expression of CaSR in neonatal mice with persistent pulmonary hypertension (PPHN), and to clarify the role of CaSR in neonatal mice with PPHN. **Methods** Forty-nine neonatal mice were randomly divided into four groups: control ($n=10$), hypoxia (PPHN; $n=11$), agonist ($n=13$), and antagonist ($n=15$). The mice in the PPHN, agonist, and antagonist groups were exposed to an oxygen concentration of 12%, and those in the control group were exposed to the air. The mice in the agonist and antagonist groups were intraperitoneally injected with gadolinium chloride (16 mg/kg) and NPS2390 (1 mg/kg) respectively once daily. Those in the PPHN and the control groups were given normal saline daily. All the mice were treated for 14 consecutive days. Hematoxylin and eosin staining and immunohistochemistry were used to observe the changes in pulmonary vessels. Laser confocal microscopy was used to observe the site of CaSR expression and measure its content in lung tissues. qRT-PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of CaSR in lung tissues. **Results** Compared with the control group, the PPHN group had significant increases in the pulmonary small artery wall thickness and the ratio of right to left ventricular wall thickness ($P<0.05$), which suggested that the model was successfully prepared. Compared with the control group, the PPHN group had a significant increase in the mRNA and protein expression of CaSR ($P<0.05$), and the agonist group had a significantly greater increase ($P<0.05$); the antagonist group had a significant reduction in the mRNA and protein expression of CaSR ($P<0.05$). **Conclusions** CaSR may play an important role in the development of PPHN induced by hypoxia in neonatal mice. [Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(2): 208-214]

Key words: Persistent pulmonary hypertension; Calcium-sensing receptor; Neonatal mice

[收稿日期] 2016-08-27; [接受日期] 2016-12-21

[基金项目] 国家自然科学基金(81560257)。

[作者简介] 王萌萌,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 of the newborn, PPHN) 是新生儿出生后肺血管阻力持续性增高, 肺动脉压超过体循环动脉压, 使由胎儿型循环过渡至正常“成人”型循环发生障碍而引起的心房和 / 或动脉导管水平血液的右向左分流, 临床上出现严重低氧血症等症状^[1]。PPHN 是在多种因素作用下的临床综合征, 常见于早产儿及过期产儿, 与其他类型的肺动脉高压差异很大^[2]。虽然 PPHN 并不多见, 但其病死率较高, 达 4%~33% 不等^[3]。钙感受受体 (calcium-sensing receptor, CaSR) 作为 G 蛋白偶联的膜受体能够感受细胞外 Ca^{2+} 浓度变化, 并通过多种信号途径包括 $[Ca^{2+}]_i$ 和细胞外调节蛋白激酶将信号传递到细胞内, 导致细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高, 从而促进细胞增殖, 导致血管构型重建。本课题前期研究已证实在新生大鼠持续性肺动脉高压 (PPH) 模型中 CaSR 的表达增加^[4]。本研究观察 CaSR 激动剂和抑制剂对 PPH 的影响, 进一步明确 CaSR 在 PPH 中的作用, 及通过激动剂和抑制剂的干预来促进和纠正 PPH 发生发展产生的效应, 为 PPHN 的临床治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

小鼠抗大鼠单克隆 CaSR 抗体 (美国 Abcam 公司), CaSR 激动剂氯化钆 ($GdCl_3$, 美国 Sigma 公司), CaSR 抑制剂 NPS2390 (德国 R&D 公司), 兔单克隆 α -SMA 抗体 (美国 Abcam 公司), 兔抗小鼠单克隆 CaSR 抗体、FITC 标记山羊抗兔抗体 (北京中杉金桥公司, 106103), Propidium Iodide (美国 Sigma 公司, SLBD2912V), CaSR 反转录试剂盒、CaSR 荧光定量试剂盒 (美国 Fermentas 公司), TRIzol (美国 Invitrogen 公司)。引物由上海生工生物工程公司合成。

主要仪器包括低温台式离心机 (美国 Thermo-scientific 公司), 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司), 激光共聚焦显微镜 (德国卡尔蔡司公司), 微量加样器 (上海高鹤公司), 病理图像分析处理系统 (美国 Media Cybernetics 公司) 等。

1.2 实验动物分组及模型建立

采用慢性缺氧的方法建立动物模型^[5]。SPF 级

健康 C57BL/6 小鼠, 体重 18~22 g, 由新疆医科大学实验动物中心提供。小鼠怀孕产仔后, 将新生小鼠随机分为对照组 ($n=10$)、PPH 组 ($n=11$)、激动剂组 ($n=13$) 和抑制剂组 ($n=15$), 对照组新生小鼠暴露在空气中, 其余 3 组新生小鼠暴露在 12% 氧浓度环境中。激动剂组每日给予 $GdCl_3$ 16 mg/kg^[6] 腹腔注射 1 次; 抑制剂组每日给予 NPS2390 1 mg/kg^[6] 腹腔注射 1 次; PPH 组和对照组每日给予同干预组等量的生理盐水腹腔注射; 共持续 14 d。通过控制氮气的流入继而控制低氧箱氧浓度的设置水平, 气体流量氮气约为 1 L/min, 并通过低氧箱中的测氧仪持续监测氧浓度, 维持 FiO_2 在 12% 左右。保持箱内温度 25~27℃, 湿度 50%~70%。母鼠可在箱内自由饮食、饮水; 各处理组新生小鼠每天暴露于空气中的时间小于 10 min; 定时添加水、饲料及更换垫料。

1.3 各组小鼠体重监测

实验期间, 每天称量新生小鼠体重 (body weight, BW), 绘制时间 - 体重曲线, 按公式计算 BW 增加率 (rate of BW increase, RBWI) 反映 BW 变化。RBWI = (终末 BW - 初始 BW) / 初始 BW × 100%。

1.4 组织学处理

在完成低氧 / 常氧曝光后, 水合氯醛麻醉各组小鼠, 打开胸腔。使用 24-G 静脉留置针对新生小鼠进行气管插管, 并用 10% 福尔马林灌入肺部以固定。取出肺组织及心脏进行石蜡包埋, 然后通过苏木精 - 伊红 (HE) 染色以及免疫组化观察肺血管形态。同时将新生小鼠处死后立即取灌入福尔马林的肺组织并液氮速冻后 -80℃ 保存。

1.5 心脏组织 HE 染色和免疫组化染色

常规固定后的心脏和肺组织进行石蜡包埋, 制作心脏组织和肺组织石蜡切片。脱蜡后的心脏组织切片进行苏木精染色 3 min, 自来水洗 3 次后 1% 盐酸乙醇中酸化 4~6 s, 再次自来水冲洗后并在水中蓝化 5 min, 伊红染色 2 min, 脱水透明后中性树胶封片, 光学显微镜下观察。脱蜡后的肺组织切片入蒸馏水, 3% 过氧化氢处理后进行枸橼酸抗原热修复, 室温冷却, 浸于 PBS 中震洗 3 次, 每次 5 min, 擦去多余 PBS 后加适量 α -SMA 一抗 (抗体浓度为 1 : 500), 4℃ 孵育过夜后加适量辣根过氧化物酶标记二抗, 37℃ 孵育 30 min, DAB 显色 1~2 min, 苏木精复染 1 min, 中性树胶封片后

晾干,光学显微镜下观察。

(1)肺小动脉血管壁厚度(WT):每个肺组织样本随机选取4张处理好的免疫组化染色切片,置于400倍显微镜下观察,随机选取5个视野,通过阳性的 α -SMA免疫染色测量直径20~50 μm 、50~99 μm 的肺小动脉。由公式计算血管壁厚度占外径百分比: $WT\% = 100 \times (2 \times \text{血管内侧壁厚度}) / \text{血管外径}$ 。

(2)右心室与左心室壁厚度比(RV/LV):每个心脏组织样本随机选取4张HE染色切片,置于400倍显微镜下观察,每张切片随机选取5个视野,测量心脏RV/LV值。

(3)肺泡密度:每组每个肺组织样本随机选取4张HE染色切片,置于100倍光镜下,每张切片随机选取8~10个视野(避开大血管和支气管)观察,计数每个视野内肺泡数(N_a),并计算每个视野的面积($S=0.203 \text{ mm}^2$),按公式计算每平方厘米肺泡数以反映肺泡密度:平均肺泡数(MAN) = $N_a/S \times 100$ 。

(4)肺泡大小:每组每个肺组织样本随机选取4张HE染色切片,置于100倍光镜下,每张切片随机选取8~10个视野(避开大血管和支气管),在每个视野正中划十字交叉线,计数与十字交叉线相交的肺泡隔数(N_s),同时测出十字线总长($L=913 \mu\text{m}$),按公式计算肺泡平均内衬间隔(MLI)以表示肺泡平均内径即肺泡的大小: $MLI=L/N_s$ 。

1.6 激光共聚焦方法检测新生小鼠肺组织 CaSR 的表达

取出制作好的肺组织石蜡切片,脱蜡后进行枸橼酸抗原热修复,室温冷却后PBS缓冲液震洗3次 \times 5 min,吸水纸吸去组织周围多余PBS后血清封闭30 min,加入兔抗小鼠CaSR一抗(1:500),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,冲洗一抗,PBS缓冲液震洗3次 \times 5 min,吸去多余PBS后加入FITC标记山羊抗兔二抗(1:50),将切片置于暗盒中37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,用PBS洗去二抗,用吸水纸吸干组织周围多余的PBS,用10 $\mu\text{g/L}$ Propidium Iodide进行核染色,甘油封片后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。

1.7 实时荧光定量PCR法检测新生小鼠肺组织 CaSR mRNA 表达水平

应用Primer Premier 5.0软件、Oligo 6.0引物评估软件设计并确定引物为CaSR特异性序列。引

物由上海生工生物工程公司合成。引物序列为:CaSR上游:5'-AGTGGTGAGACAGATGCGAGT-3',下游:5'-AGTGAGAGCGATTCCAAAGG-3',片段长度132 bp。MACT(内参)上游:5'-TTCCTTCTTGGGTATGGAAT-3',下游:5'-GAGCAATGATCTTGATCTTC-3',片段长度203 bp。取100 mg肺组织低温充分匀浆后,用TRIzol法提取总RNA,取总RNA 5 μL 进行逆转录操作合成20 μL 的cDNA。反应体系:cDNA 3 μL 、SYBR Green I 10 μL 、上下游引物各1 μL 、无酶水5 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火20 s,共40个循环。以CaSR PCR产物与内参照的荧光密度比作为CaSR mRNA的相对表达含量,表达的相对定量结果以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 表示。

1.8 Western blot法检测新生小鼠肺组织 CaSR 蛋白表达水平

取100 mg肺组织放入研钵中,液氮研磨后加入蛋白裂解液及PMSF,冰上静置30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 下12000 r/min离心20 min后取上清进行蛋白定量;取50 μg 蛋白样品,10%SDS-PAGE凝胶电泳,23 V 46 min转移至硝酸纤维素膜,脱脂牛奶封闭膜2 h;加入小鼠抗大鼠CaSR一抗(1:1000),anti-GAPDH(1:1000)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;TBST充分洗膜,5 min \times 6次,碱性磷酸酶标记的抗IgG二抗(1:20000)常温孵育1 h,显色液(Promega)显色,定影处理晾干后扫描,分析光密度值。

1.9 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 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SNK- q 检验;若数据方差不齐,则运用Kruskal-Wallis H 秩和检验,组间两两比较采用Mann-Whitney U 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 新生小鼠基本情况

对照组小鼠反应灵敏,精神良好,被毛时间短,且毛发色泽光亮;与对照组相比,PPH组、激动剂组、抑制剂组小鼠均出现反应迟钝,精神较对照组差,被毛时间长的情况,且抑制剂组小鼠死亡2只。低氧2周后,PPH组RBWI显著低于对照组($P<0.05$);而激动剂组和抑制剂组RBWI与

对照组和 PPH 组比较差异均无统计学意义，且两组间比较差异亦无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

表 1 低氧 2 周后各组小鼠 RBWI 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	RBWI
对照组	10	3.61 ± 0.43
PPH 组	11	1.73 ± 0.48 ^a
激动剂组	13	2.19 ± 0.21
抑制剂组	13	2.63 ± 0.70
F 值		7.833
P 值		0.025

注：a 示与对照组比较， $P<0.05$ 。

2.2 各组小鼠肺小动脉血管壁及右心室壁厚度变化

对照组肺小动脉血管壁光滑无增厚，管腔无狭窄，血管内皮细胞分布均匀，连续性完整；与对照组相比，PPH 组 WT% 显著增加 ($P<0.05$)，官腔狭窄，中层平滑肌细胞排列紊乱；激动剂组和抑制剂组 WT% 与对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图 1, 表 2)。光学显微镜下观察，对照组 RV/LV 值无增厚，心肌细胞排列整齐，细胞大小均一。与对照组相比，激动剂组和 PPH 组 RV/LV 值均增大，细胞肥大，细胞大小不规则；抑制剂组 RV/LV 值亦较对照组增大 (表 2)。

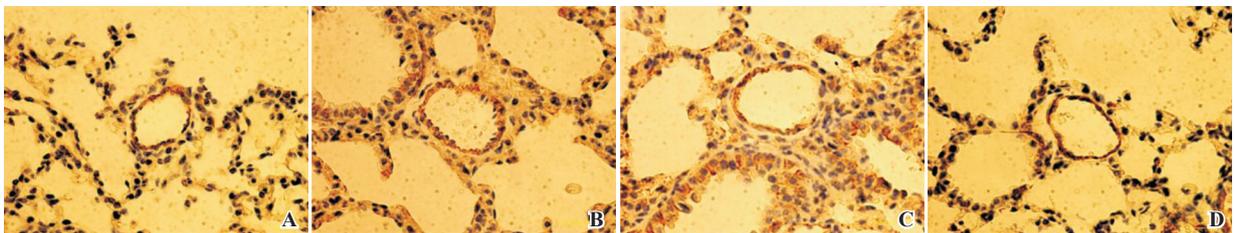


图 1 各组新生小鼠肺小动脉血管壁变化 (DAB 显色, $\times 400$) 与对照组 (A) 相比, PPH 组 (B) 血管壁显著增厚; 激动剂组 (C) 和抑制剂组 (D) 血管壁厚度与对照组相比无显著差别。

表 2 各组 WT% 及 RV/LV 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	WT%	RV/LV 值
对照组	10	19.7 ± 1.7	0.543 ± 0.019
PPH 组	11	29.9 ± 2.7 ^a	0.934 ± 0.235 ^a
激动剂组	13	20.0 ± 1.0	0.743 ± 0.466 ^a
抑制剂组	13	19.6 ± 1.5	0.738 ± 0.011 ^a
H 值		12.763	50.257
P 值		0.005	<0.001

注：[WT] 肺小动脉血管壁厚度；[RV/LV] 右心室与左心室壁厚度比。a 示与对照组比较， $P<0.05$ 。

2.3 各组小鼠肺泡形态、密度及大小的变化

肺组织 HE 染色显示，对照组新生小鼠肺泡完整，单位面积内肺泡数量多，肺间质无炎性细胞浸润；与对照组相比，PPH 组新生小鼠肺泡明显破坏，肺间质增厚并伴有中性粒细胞等炎性细胞浸润，MAN 及 MLI 显著降低 ($P<0.05$)；激动剂组和抑制剂组 MAN 较 PPH 组增多，但差异无统计学意义 ($P>0.05$)，MLI 显著高于 PPH 组和对照组 ($P<0.05$)；激动剂组和抑制剂组间比较 MAN 和 MLI 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 2, 表 3。

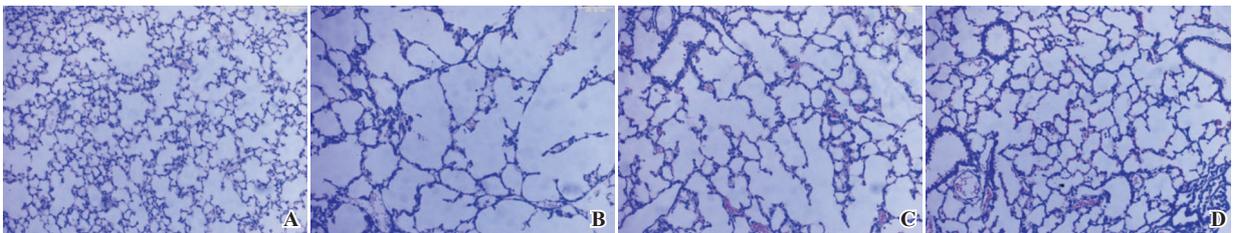


图 2 各组新生小鼠肺泡形态及数目变化 (苏木精-伊红染色, $\times 100$) 与对照组 (A) 相比, PPH 组 (B) 新生小鼠肺泡明显破坏, 肺间质增厚并伴有中性粒细胞等炎性细胞浸润, 单位面积内肺泡数减少; 激动剂组 (C) 和抑制剂组 (D) 单位面积内肺泡数较 PPH 组增多, 但仍少于对照组; 激动剂组和抑制剂组相比单位面积内肺泡数无差异。

表3 各组肺泡MAN和MLI比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MAN	MLI
对照组	10	26 350 ± 2 205	0.069 ± 0.006
PPH组	11	11 424 ± 1 601 ^a	0.051 ± 0.004 ^a
激动剂组	13	16 872 ± 1 056 ^a	0.123 ± 0.009 ^{a,b}
抑制剂组	13	17 409 ± 2 024	0.805 ± 0.005 ^{a,b}
H值		126.218	225.752
P值		<0.001	<0.001

注: [MAN] 平均肺泡数; [MLI] 肺泡平均内衬间隔。a 示与对照组比较, $P < 0.05$; b 示与 PPH 组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 新生小鼠肺组织中CaSR的表达

CaSR 为绿色荧光, 红色荧光为细胞核。激光共聚焦显微镜下显示, CaSR 在各组新生小鼠肺组织中广泛表达, 主要表达在肺血管上皮细胞。

PPH 组 CaSR 表达较对照组明显增高, 激动剂组较 PPH 组进一步增高, 而抑制剂组较 PPH 组有明显降低 (图 3)。对照组、PPH 组、激动剂组和抑制剂组新生小鼠荧光强度分别为 42.6 ± 2.2 、 91.7 ± 5.6 、 140.7 ± 3.3 、 2.9 ± 1.3 , 差异有统计学意义 ($F = 296.20$, $P < 0.01$); 与对照组相比, PPH 组 CaSR 表达较对照组明显增高, 激动剂组较 PPH 组进一步增高, 而抑制剂组较 PPH 组有明显降低 ($P < 0.05$)。

2.5 新生小鼠肺组织中CaSR mRNA及其蛋白的表达情况

激动剂组、PPH 组 CaSR mRNA 及其蛋白表达量均高于对照组; 而抑制剂组 CaSR mRNA 及其蛋白表达量低于对照组 ($P < 0.05$)。见表 4, 图 4。

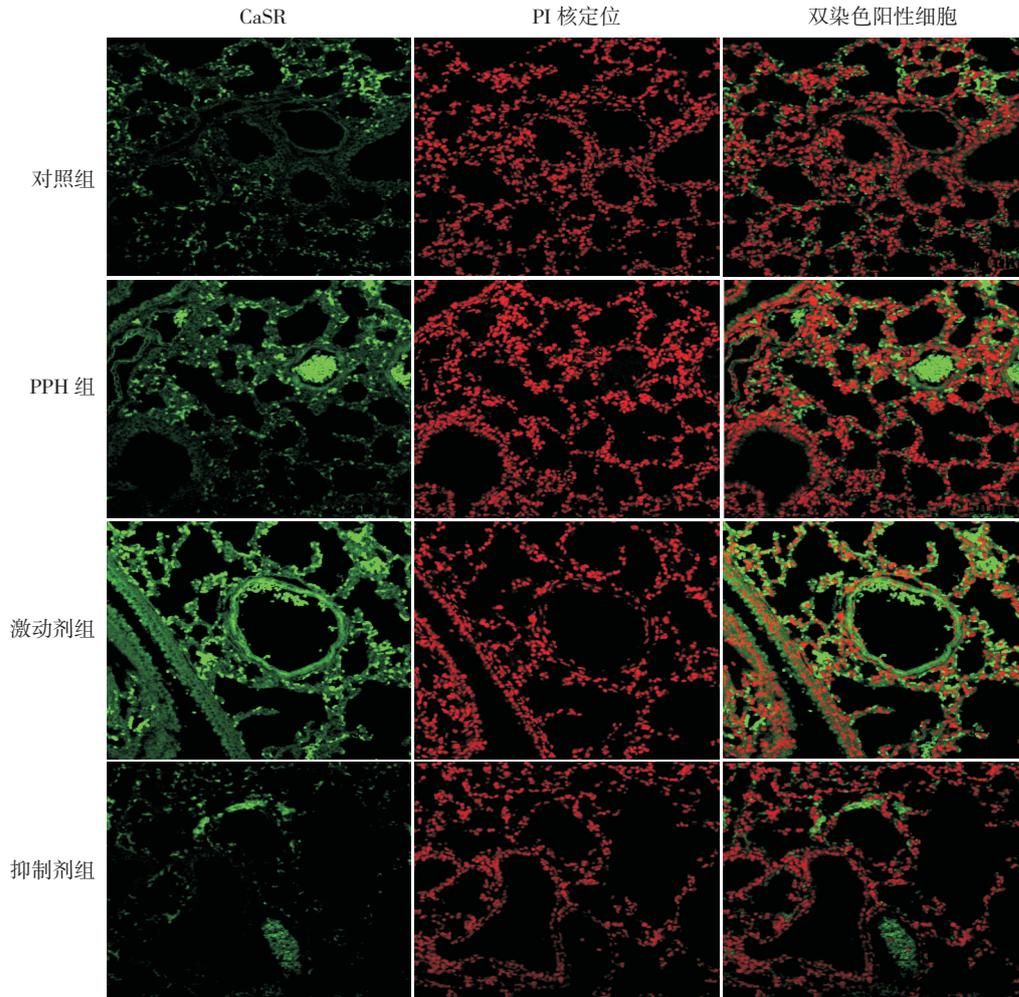


图3 激光共聚焦显微镜定位各组CaSR的表达($\times 400$) 与对照组相比, PPH组CaSR表达较对照组明显增高, 激动剂组较PPH组进一步增高, 而抑制剂组较PPH组有明显降低。CaSR主要在肺血管上皮细胞表达。

表 4 各组小鼠肺组织 CaSR mRNA 及其蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CaSR mRNA	CaSR 蛋白
对照组	10	1.00	0.90 ± 0.18
PPH 组	11	1.85 ± 0.12 ^a	1.31 ± 0.10 ^a
激动剂组	13	5.89 ± 0.35 ^a	1.56 ± 0.11 ^a
抑制剂组	13	0.16 ± 0.01 ^a	0.40 ± 0.10 ^a
F 值		192.825	48.714
P 值		<0.001	<0.001

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$ 。

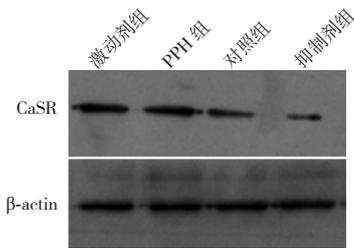


图 4 Western blot 检测各组新生小鼠肺组织 CaSR 蛋白表达电泳图

3 讨论

本研究通过慢性持续低氧建立新生小鼠 PPH 模型^[5]。在此模型中, PPH 组肺小动脉血管壁及右心室游离壁厚度较对照组明显增厚, 这表明新生小鼠 PPH 模型建立成功。有研究证实, 胎儿出生后不能建立正常的肺循环是 PPHN 产生的直接原因^[7]。低氧是肺动脉高压形成的始动因素, 早期的低氧性肺血管收缩和后期的低氧性肺血管重塑是低氧性肺动脉高压肺血管发生病理生理变化的主要原因^[8]。

CaSR 是一种典型的 G 蛋白偶联受体, 细胞外钙是第一个被确认的通过激活 CaSR 而起作用的物质^[9]。CaSR 除了在调节机体钙稳态中起重要作用, 还具有调节细胞增殖、分化、凋亡^[10]和激素的分泌等功能^[11]。CaSR 能够感受细胞外 Ca^{2+} 浓度变化, 并通过多种信号途径, 包括 $[Ca^{2+}]_i$ 和细胞外调节蛋白激酶, 将信号传递到细胞内, 导致细胞内钙离子浓度升高, 从而促进细胞增殖^[12]。

PPHN 的重要病理基础之一是肺血管平滑肌细胞的增殖^[13]。有研究表明, 慢性低氧引发合成型平滑肌细胞增殖, 这有助于血管壁中膜增厚和肺血管重构^[14]。本课题组前期研究

已证实: 在 PPH 大鼠中, 肺动脉 CaSR 表达增加^[4]。在本研究新生小鼠 PPH 模型中, PPH 组 CaSR mRNA 和蛋白的表达量明显高于对照组, 这与人主动脉内皮细胞的研究结果类似^[15], 说明新生小鼠肺动脉有 CaSR 蛋白的表达。免疫荧光染色显示, CaSR 蛋白定位在平滑肌细胞的胞膜和胞浆, 该结果与在其他类型细胞中 CaSR 定位的报道一致^[16]。

为了确定 CaSR 在低氧诱导的新生小鼠 PPH 中的作用, 本研究中给予低氧环境中的新生小鼠激动剂和抑制剂处理, 结果发现: PPH 组新生小鼠 CaSR 的表达量明显高于对照组, $GdCl_3$ (CaSR 激动剂) 能够进一步上调这种增加, 而 NPS2390 (CaSR 抑制剂) 下调了这种增加。本研究中激光共聚焦、CaSR mRNA 及其蛋白的表达都支持上述观点。这与李光伟等^[17]在细胞中的研究相一致。

本研究结果显示: 对照组新生小鼠肺小动脉壁较薄, PPH 组肺小动脉壁厚度较对照组明显增厚; 激动剂组肺小动脉壁厚度较对照组厚但较 PPH 组薄; 抑制剂组血管壁厚度略低于对照组; 但激动剂组、对照组、抑制剂组 3 组之间肺小动脉壁厚度比较差异无统计学意义; 即激动剂和抑制剂对肺小动脉血管壁厚度均无影响。这可能与 $GdCl_3$ 本身的结构和功能有关。在本模型中, 当低氧发生时, 新生小鼠肺组织中 CaSR 的表达量升高, $GdCl_3$ 是 CaSR 的激动剂, 能进一步促进新生小鼠肺组织中 CaSR 的含量升高, 使细胞内钙离子内流增加, 从而加剧细胞增殖和血管构型重建。但同时, $GdCl_3$ 的晶体半径与 Ca^{2+} 高度相似, 能够替换 Ca^{2+} , 干扰 Ca^{2+} 的吸收和 Ca^{2+} 依赖性的细胞进程, 包括吞噬和蛋白质水解激活作用, 阻断细胞膜 Ca^{2+} 通道^[18-19]。而抑制剂组 WT% 与对照组比较差异无统计学意义, 可能与低氧时间较短有关^[20]。对于右心室游离壁厚度, 其他 3 组均较对照组增厚, 这可能与干预时间短, 抑制剂未能完全逆转右心室游离壁的厚度有关。由于 $GdCl_3$ 自身结构和功能的关系, 并不能完全代表 CaSR 激动剂的作用, 故在进一步的研究中我们可能更换 CaSR 激动剂为新霉素。

综上所述, 新生小鼠肺动脉有 CaSR 的表达, 低氧可以活化 CaSR, 活化的 CaSR 可以引起 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高和促进肺动脉平滑肌细胞增殖, 进而

影响肺血管收缩和重建,促进PPH的发展。CaSR抑制剂可在一定程度上逆转PPH中的肺血管构型重建。CaSR表达增加在低氧性肺动脉高压中发挥重要的作用,其具体作用机制和信号转导途径有待于进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Steinhorn RH. Neonatal pulmonary hypertension[J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2010, 11(2 Suppl): S79-S84.
- [2] 中华医学会儿科学分会心血管学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童肺高血压诊断与治疗专家共识[J]. *中华儿科杂志*, 2015, 53(1): 6-16.
- [3] Alwan S, Bandoli G, Chambers CD. Maternal use of selective serotonin-reuptake inhibitors and risk of persistent pulmonary hypertension of the newborn[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2016, 100(1): 34-41.
- [4] 张方方,王彦梅,田松柏,等. 钙感受体及相关分子在新生大鼠持续肺动脉高压发病中的作用[J]. *中国新生儿科杂志*, 2016, 31(4): 64-68.
- [5] Ambalavanan N, Bulger A, Murphy-Ullrich J, et al. Endothelin-A receptor blockade prevents and partially reverses neonatal hypoxic pulmonary vascular remodeling[J]. *Pediatr Res*, 2005, 57(5 Pt 1): 631-636.
- [6] 甄毅岚. 钙感受体在小鼠缺血性脑卒中的作用及机制[D]. 合肥:安徽医科大学,2014.
- [7] Alano MA, Ngougma E, Ostrea EM Jr, et al. Analysis of nonsteroidal antiinflammatory drugs in meconium and its relation to persistent pulmonary hypertension of the newborn[J]. *Pediatrics*, 2001, 107(3): 519-523.
- [8] Smith KA, Yuan JX. Hypoxia-Inducible factor-1 α in pulmonary arterial smooth muscle cells and hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 189(3): 245-246.
- [9] Li X, Zima AV, Sheikh F, et al. Endothelin-1-induced arrhythmogenic Ca²⁺ signaling is abolished in atrial myocytes of inositol-1,4,5-trisphosphate(IP3)-receptor type 2-deficient mice[J]. *Circ Res*, 2005, 96(12): 1274-1281.
- [10] Sun YH, Li YQ, Feng SL, et al. Calcium-sensing receptor activation contributed to apoptosis stimulates TRPC6 channel in rat neonatal ventricular myocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394(4): 955-961.
- [11] 杨智伟,赵施皓,郑煦暘. 钙感受体参与低氧性肺动脉高压形成的研究进展[J]. *心脏杂志*, 25(4): 490-493.
- [12] Zhang J, Zhou J, Cai L, et al. Extracellular calcium-sensing receptor is critical in hypoxic pulmonary vasoconstriction[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(3): 471-484.
- [13] Li GW, Xing WJ, Bai SZ. The calcium-sensing receptor mediates hypoxia-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells through MEK1/ERK1,2 and PI3K pathways[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2011, 108(3): 185-193.
- [14] Aoshima D, Murata T, Hori M, et al. Time-dependent phenotypic and contractile changes of pulmonary artery in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. *J Pharmacol Sci*, 2009, 110(2): 182-190.
- [15] Ziegelstein RC, Xiong Y, He C, et al. Expression of a functional extracellular calcium-sensing receptor in human aortic endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(1): 153-163.
- [16] Tu CL, Chang W, Bikle DD. The role of the calcium sensing receptor in regulating intracellular calcium handling in human epidermal keratinocytes[J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(5): 1074-1083.
- [17] 李光伟,邢文婧,郝静辉. 钙感受体在缺氧诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(12): 2433-2437.
- [18] 廖锐,龚建平. Kupffer细胞抑制剂氯化钆的研究现状[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2009, 15(10): 791-794.
- [19] Peralta C, Jiménez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu[J]. *J Hepatol*, 2013, 59(5): 1094-1106.
- [20] Peng X, Li HX, Shao HJ. Involvement of calcium-sensing receptors in hypoxia-induced vascular remodeling and pulmonary hypertension by promoting phenotypic modulation of small pulmonary arteries[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 396(1-2): 87-98.

(本文编辑: 万静)