

论著·实验研究

## 钙敏感受体对持续肺动脉高压新生小鼠Ⅱ型11 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶及皮质醇的影响

陈志文<sup>1</sup> 李翔<sup>1</sup> 吴冰霞<sup>1</sup> 马克涛<sup>2</sup> 谷强<sup>1</sup>

(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** 研究钙敏感受体(CaSR)在持续肺动脉高压(PPH)新生小鼠模型中对Ⅱ型11 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶(11 $\beta$ -HSD2)表达及皮质醇浓度的影响。**方法** 56只新生C57BL/6小鼠随机分为对照组、PPH组、激动剂组及抑制剂组( $n=14$ )。PPH组、激动剂组和抑制剂组小鼠暴露在12%的氧浓度环境中,激动剂组和抑制剂组小鼠每天分别给予CaSR激动剂GdCl<sub>3</sub>(16 mg/kg)及其抑制剂NPS2390(1 mg/kg)腹腔注射1次;对照组小鼠暴露在空气中,并和PPH组每日以等量生理盐水替代注射;共持续14 d。采用苏木精-伊红染色行心脏和肺组织形态学检测;实时荧光定量PCR和Western blot法分别检测各组小鼠肺组织中11 $\beta$ -HSD2 mRNA及其蛋白的表达水平;ELISA法检测各组小鼠肺组织中脑利钠肽(BNP)和皮质醇水平。**结果** 与对照组相比,PPH组肺小动脉血管壁厚度(WT%)、右心室与左心室壁厚度比(RV/LV)、肺泡平均内衬间隔及BNP浓度明显增加,径向肺泡计数减少( $P<0.05$ );WT%和BNP浓度在激动剂组较PPH组有所加重,而上述指标在抑制剂组均较PPH组有所减轻( $P<0.05$ )。与对照组相比,PPH组的11 $\beta$ -HSD2 mRNA及其蛋白表达水平降低,皮质醇浓度增加( $P<0.05$ );上述指标在激动剂组均较PPH组进一步加重,而在抑制剂组有一定程度的逆转( $P<0.05$ )。**结论** CaSR可能通过调节11 $\beta$ -HSD2的表达及皮质醇浓度来控制新生小鼠PPH的发生发展。

[中国当代儿科杂志, 2019, 21(11): 1124-1130]

**【关键词】** 持续肺动脉高压;钙敏感受体;Ⅱ型11 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶;皮质醇;新生小鼠

### Effects of calcium-sensitive receptors on 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and cortisol in neonatal mice with persistent pulmonary hypertension

CHEN Zhi-Wen, LI Xiang, WU Bing-Xia, MA Ke-Tao, GU Qiang. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China (Gu Q, Email: guqiang106@sina.com)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of calcium-sensitive receptors (CaSR) on the expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 $\beta$ -HSD2) and cortisol concentration in a neonatal mouse model of persistent pulmonary hypertension (PPH). **Methods** Fifty-six newborn C57BL/6 mice were randomly divided into a control group ( $n=14$ ), a PPH group ( $n=14$ ), an agonist group ( $n=14$ ), and an inhibitor group ( $n=14$ ). The mice in the PPH, agonist, and inhibitor groups were exposed to a 12% oxygen concentration, and the agonist group and inhibitor group were given CaSR agonist (GdCl<sub>3</sub>, 16 mg/kg) and CaSR antagonist (NPS2390, 1 mg/kg) intraperitoneally once a day, respectively. The mice in control group were exposed to air, and then injected with an equal volume of normal saline as those in the PPH group every day. All mice were treated for 14 days. Morphological examination of heart and lung tissues was performed using hematoxylin-eosin staining. The expression levels of 11 $\beta$ -HSD2 mRNA and 11 $\beta$ -HSD2 protein in lung tissues were measured by qRT-PCR and Western blot respectively. Brain natriuretic peptide (BNP) and cortisol levels in lung tissues were determined using ELISA. **Results** Compared with the control group, the PPH group had significantly increased pulmonary artery wall thickness (WT%), ratio of right to left ventricular thickness (RV/LV), alveolar mean linear intercept, and BNP concentration and a significantly reduced radial alveolar count ( $P<0.05$ );

[收稿日期] 2019-06-18; [接受日期] 2019-09-27

[基金项目] 国家自然科学基金(81560257)。

[作者简介] 陈志文,男,硕士研究生。

[通信作者] 谷强,男,主任医师。Email: guqiang106@sina.com。

compared with the PPH group, the agonist group showed significant increases in WT% and BNP concentration, while the inhibitor group showed significant reductions in the two indicators ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, the PPH group showed significant reductions in the expression levels of 11 $\beta$ -HSD2 mRNA and 11 $\beta$ -HSD2 protein, but a significant increase in cortisol concentration ( $P<0.05$ ); compared with the PPH group, the agonist group had significantly lower expression levels of 11 $\beta$ -HSD2 mRNA and 11 $\beta$ -HSD2 protein, but a significant higher cortisol concentration, while the inhibitor group showed opposite changes in these indicators ( $P<0.05$ ). **Conclusions** CaSR may control the development and progression of PPH in newborn mice by regulating the expression of 11 $\beta$ -HSD2 and cortisol concentration. [Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(11): 1124-1130]

**Key words:** Persistent pulmonary hypertension; Calcium-sensitive receptor; 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2; Cortisol; Newborn mice

新生儿持续肺动脉高压 (persistent pulmonary hypertension, PPH) 是一种新生儿综合征, 由于出生后肺血管阻力下降失败而导致的低氧血症、酸中毒等病症<sup>[1]</sup>, 全球每年约 10%~20% 的 PPH 新生患儿会发生死亡<sup>[2-3]</sup>, 但目前其具体的发病机制尚不清楚, 临床治疗效果欠佳。糖皮质激素在调节血管收缩舒张、血管平滑肌细胞增殖及水盐平衡方面有重要的作用<sup>[4]</sup>, 而 II 型 11 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶 (11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, 11 $\beta$ -HSD2) 是糖皮质激素代谢的关键酶之一, 将有生物活性的皮质醇氧化为无活性的皮质酮, 可直接调节糖皮质激素的水平<sup>[5]</sup>。研究表明, 缺氧是 PPH 形成的始动原因<sup>[6]</sup>。本课题组前期研究已表明在新生小鼠 PPH 的模型中钙感受受体 (CaSR) 的表达水平和细胞内钙离子浓度升高, 激动剂组较 PPH 组明显增加而抑制剂组有所下降<sup>[7-9]</sup>。由此猜测: 在新生儿 PPH 中, CaSR 可能通过调控钙离子浓度而介导 11 $\beta$ -HSD2 的表达, 导致皮质醇浓度改变, 继而导致肺动脉高压。所以本研究通过构建 PPH 小鼠模型, 并通过干预 CaSR 进而观察 11 $\beta$ -HSD2 的表达及皮质醇的浓度变化, 为新生儿 PPH 的临床诊断和治疗提供新的思路 and 依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

小鼠抗大鼠 11 $\beta$ -HSD2 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司), CaSR 激动剂氯化钆 (GdCl<sub>3</sub>, 美国 Sigma 公司), CaSR 抑制剂 NPS2390 (德国 R&D 公司), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体、小鼠抗大鼠  $\beta$ -actin 单克隆抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司), 11 $\beta$ -HSD2 反转录试剂盒、QuantiNova SYBR Green qPCR 荧光定量试剂盒 (美国 Fermentas 公司), 皮质醇测定试剂盒 (上

海酶联生物科技有限公司), 小鼠脑利钠肽 (BNP) ELISA 试剂盒 (上海江莱生物科技有限公司), TRIzol (美国 Invitrogen 公司)。

主要仪器包括荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司), 病理图像分析处理系统 (美国 Media Cybernetics 公司), 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) 等。

### 1.2 实验动物分组及模型建立

参考文献<sup>[10]</sup>采用慢性缺氧的方法构建 PPH 动物模型。SPF 级健康 C57BL/6 小鼠, 体重 17~28 g, 由新疆维吾尔自治区实验动物研究中心提供。按雌雄鼠 2:1 配对, 待孕鼠产仔后将新生小鼠随机分为对照组 ( $n=17$ )、PPH 组 ( $n=17$ )、激动剂组 ( $n=17$ )、抑制剂组 ( $n=17$ )。对照组小鼠暴露在空气中, 其他 3 组小鼠置于氧浓度为 12% 的低氧箱中, 持续 2 周。称量新生小鼠体重计算体重增长率 (RBWI),  $RBWI = (\text{终末体重} - \text{初始体重}) / \text{初始体重} \times 100\%$ 。低氧处理同时, 激动剂组和抑制剂组每日分别腹腔注射 GdCl<sub>3</sub> 16 mg/kg 和 NPS2390 1 mg/kg<sup>[11]</sup>, 对照组和 PPH 组以每日等量生理盐水替代, 持续 2 周。

### 1.3 标本采集及处理

造模完成后, 各组小鼠用 1% 戊巴比妥钠麻醉, 常规消毒后沿左侧肋缘剪断胸骨打开胸腔。取出肺组织和心脏, 10% 甲醛固定, 石蜡包埋后用于苏木精-伊红 (HE) 染色和免疫组化; 将未做处理的肺组织置于液氮过夜, -80℃ 储存备用。

### 1.4 心脏和肺组织形态学检测

心脏和肺组织标本石蜡包埋后制作石蜡切片, 脱蜡后进行 HE 染色, 光学显微镜下观察。

每组取 10 只小鼠的肺组织标本, 从每个肺组织标本中随机选取 8 张切片于 400 倍的显微镜下观察, 每张切片随机选取 6 个视野测量直径

20~50  $\mu\text{m}$ 、100~199  $\mu\text{m}$  的肺小动脉。计算肺小动脉血管壁厚度 (WT) 来评价肺血管,  $\text{WT}\% = 100 \times (2 \times \text{血管内侧壁厚度}) / \text{血管外径}$ 。每张切片随机选取 4~6 个视野用于测量肺泡平均内衬间隔 (MLI) 及径向肺泡计数 (RAC)<sup>[12-13]</sup>, 用于评价肺泡发育状况。

每组取 10 只小鼠的心脏组织标本, 从每个心脏组织标本中随机选取 8 张切片, 每张切片随机选取 6 个视野测量右心室和左心室的室壁厚度, 计算右心室与左心室的室壁厚度之比 (RV/LV) 来评价肺动脉高压和右心室肥大程度。

### 1.5 免疫组织化学法检测肺组织 11 $\beta$ -HSD2 的表达

每组取小鼠的肺组织标本石蜡切片。石蜡切片脱蜡后用枸橼酸抗原修复, 冷却至室温后用 PBS 缓冲液震洗, 擦去多余的 PBS 后血清封闭, 加入小鼠抗大鼠 11 $\beta$ -HSD2 一抗 (1:500), 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育隔夜后 PBS 冲洗, 擦去多余的 PBS 后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (1:1000), DAB 显色, 在显微镜下观察。

### 1.6 实时荧光定量 PCR 法测量新生小鼠肺组织 11 $\beta$ -HSD2 mRNA 的表达

每组取 8 只小鼠肺组织标本, 放于研钵中液氮研磨后用 TRIzol 法提取肺组织匀浆总 RNA, 采用 QuantiNova SYBR Green qPCR 试剂盒检测 11 $\beta$ -HSD2 mRNA 的相对含量。11 $\beta$ -HSD2 上游引物: 5'-GATGTTCCCCTCGCCTGAA-3', 下游引物: 5'-ATGAGCAGTGCAATAGCTGCCTTG-3'。MACT(内参)上游引物: 5'-TTCCTTCTTGCGTATGGAAT-3'。下游引物: 5'-GAGCAATGATCTTGATCTTC-3'。反应体系: 上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ 、SYBR Green I 10  $\mu\text{L}$ 、无水酶 5  $\mu\text{L}$ 、cDNA 3  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  退火 20 s, 共 40 个循环。11 $\beta$ -HSD2 的相对表达量以  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  表示。

### 1.7 Western blot 法检测新生小鼠肺组织 11 $\beta$ -HSD2 蛋白表达

每组取 8 只小鼠, 每只小鼠取 50 mg 肺组织放于研钵中, 液氮研磨后加入蛋白裂解酶和 PMSF 冷却 30 min 后离心, 取上清液进行测定。取 50  $\mu\text{g}$  蛋白样品, 10% SDS-PAGE 电泳, 80 V 120 min 后转移至 PVDF 膜, 室温封闭 2 h, 加入小鼠抗大鼠 11 $\beta$ -HSD2 一抗 (1:500),  $\beta$ -actin 一抗 (1:1000) 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜; TBST 洗膜 4 次, 每次 8 min, 加入辣

根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (1:1000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜 4 次, 每次 8 min, 然后显色定影。定影后用 image J 软件检测分析灰度值, 计算 11 $\beta$ -HSD2 蛋白的相对表达量, 结果用 11 $\beta$ -HSD2 蛋白与内参  $\beta$ -actin 蛋白的比值表示。

### 1.8 新生小鼠血清皮质醇及肺组织 BNP 浓度检测

每组取 10 只小鼠, 每只小鼠取 20 mg 肺组织置于研钵中研磨后, 静置离心取上清液, 按照皮质醇测定试剂盒说明书的方法检测其浓度。取 30 mg 肺组织置于研钵中研磨后, 静置离心取上清液, 按照小鼠 BNP ELISA 试剂盒说明书检测上清液 BNP 水平, 450 nm 波长下测定吸光度值, 计算新生小鼠肺组织 BNP 浓度。

### 1.9 统计学分析

采用 SPSS 20.0 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。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 新生小鼠的基本情况

对照组小鼠由于哺乳状况和小鼠个体原因, 以及其他 3 组小鼠对于干预药物和缺氧的耐受较差, 造成了建模过程中小鼠的死亡, 即造模完成后各组小鼠均死亡 3 只。对照组小鼠在造模期间活动量大、精神良好、反应灵敏; PPH 组和激动剂组上述情况较差甚至出现不同程度的呼吸困难, 抑制剂组较 PPH 组上述情况有轻微的好转, 但相比对照组略差。PPH 组和激动剂组体重和 RBWI 较对照组明显下降 ( $P < 0.05$ ), 抑制剂组的体重及 RBWI 与对照组、PPH 组和激动剂组比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 低氧 14 d 后各组小鼠体重及 RBWI 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别         | <i>n</i> | 体重 (g)                       | RBWI                       |
|------------|----------|------------------------------|----------------------------|
| 对照组        | 14       | 5.62 $\pm$ 0.41              | 13.1 $\pm$ 3.0             |
| PPH 组      | 14       | 3.68 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup> | 9.1 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup> |
| 激动剂组       | 14       | 3.35 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup> | 8.3 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup> |
| 抑制剂组       | 14       | 4.52 $\pm$ 0.13              | 10.8 $\pm$ 3.2             |
| <i>F</i> 值 |          | 132.39                       | 4.981                      |
| <i>P</i> 值 |          | <0.001                       | <0.001                     |

注: [RBWI] 体重增长率。a 示与对照组比较,  $P < 0.05$ 。



## 2.2 各组小鼠肺动脉管壁、右心室厚度及BNP浓度的变化

与对照组比较, PPH组和激动剂组小鼠肺小动脉在低氧条件下管壁明显增厚, 而抑制剂组小鼠肺小动脉管壁厚度与PPH组和激动剂组相比略薄(图1)。与对照组比较, PPH组和激动剂组WT%明显增加( $P<0.05$ ), 而抑制剂组较PPH组和激动剂组WT%有所减少( $P<0.05$ ), 对照组和抑制剂组WT%比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。PPH组和激动剂组较对照组RV/LV值明显增加( $P<0.05$ ), 说明右心室肥大; PPH组与激动剂组RV/LV值比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 抑制剂组RV/LV值低于PPH组, 但高于对照组( $P<0.05$ ), 与激动剂组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与对照组相比, PPH组的BNP浓度明显升高, 激动剂组较PPH组进一步升高( $P<0.05$ ); 抑制剂组BNP浓度较激动剂组和PPH组有所降低( $P<0.05$ ), 且与对照组相比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表2。

## 2.3 各组小鼠肺泡发育状况

对照组小鼠肺泡密度较大, 肺泡完整, 单个肺泡较小; PPH组肺泡明显增大, 密度降低, 间隔破坏严重; 激动剂组较PPH组肺泡间隔破坏更加严重, 肺泡密度更小; 而抑制剂组较PPH组和激动剂组肺泡间隔破坏有所减轻, 肺泡密度相对增加(图2)。与对照组相比, 激动剂组和PPH组MLI值增大, RAC值明显减小( $P<0.05$ ); 而抑制剂组较激动剂组和PPH组MLI值减小, RAC值增加( $P<0.05$ ), 且与对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 激动剂组和PPH组MLI值和RAC值比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表3。

## 2.4 新生小鼠肺组织11 $\beta$ -HSD2的表达

免疫组织化学结果表明: 11 $\beta$ -HSD2蛋白主要分布于肺动脉血管平滑肌细胞和内皮细胞, 阳性表达呈棕褐色。PPH组较对照组11 $\beta$ -HSD2蛋白阳性表达减弱, 说明缺氧能够抑制11 $\beta$ -HSD2蛋白的表达; 在激动剂组11 $\beta$ -HSD2蛋白阳性表达较对照组减弱; 抑制剂组11 $\beta$ -HSD2蛋白阳性表达较PPH组和激动剂组明显加深, 提示激动剂在缺氧的基础上进一步抑制该蛋白的表达, 同时抑制剂能够逆转这种状况。见图3。

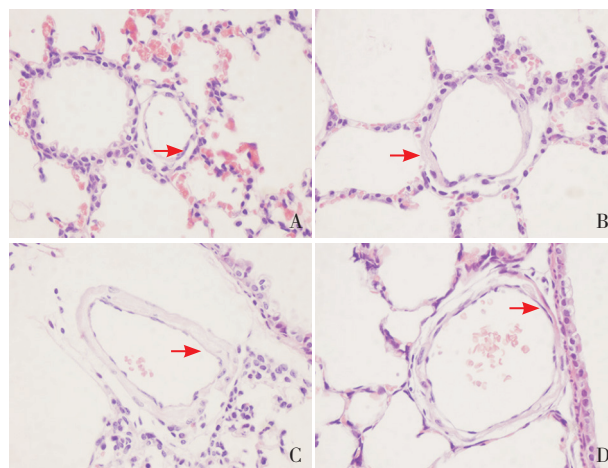


图1 各组新生小鼠肺小动脉血管壁变化(苏木精-伊红染色,  $\times 400$ ) A为对照组, B为PPH组, C为激动剂组, D为抑制剂组。与对照组相比, PPH组和激动剂组肺小动脉血管壁显著增厚, 抑制剂组血管壁厚度较PPH组减小(箭头所示)。

表2 各组小鼠WT%、RV/LV和BNP浓度的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | n  | WT%                           | RV/LV                            | BNP (pg/mL)                 |
|------|----|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| 对照组  | 10 | 19.2 $\pm$ 0.8                | 0.531 $\pm$ 0.027                | 511 $\pm$ 15                |
| PPH组 | 10 | 33.1 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>   | 0.856 $\pm$ 0.031 <sup>a</sup>   | 666 $\pm$ 10 <sup>a</sup>   |
| 激动剂组 | 10 | 47.8 $\pm$ 4.2 <sup>a,b</sup> | 0.786 $\pm$ 0.010 <sup>a</sup>   | 703 $\pm$ 9 <sup>a,b</sup>  |
| 抑制剂组 | 10 | 22.7 $\pm$ 1.2 <sup>b,c</sup> | 0.730 $\pm$ 0.007 <sup>a,b</sup> | 596 $\pm$ 12 <sup>b,c</sup> |
| F值   |    | 63.763                        | 209.459                          | 259.256                     |
| P值   |    | <0.001                        | <0.001                           | <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; [BNP] 脑利钠肽。a示与对照组比较,  $P<0.05$ ; b示与PPH组比较,  $P<0.05$ ; c示与激动剂组比较,  $P<0.05$ 。

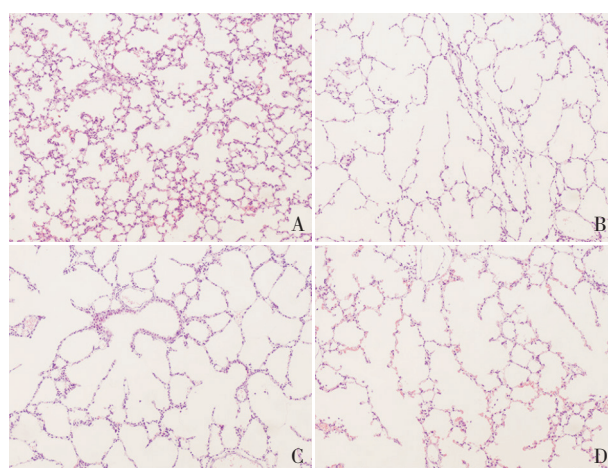


图2 各组新生小鼠肺泡形态(苏木精-伊红染色,  $\times 100$ ) A为对照组, B为PPH组, C为激动剂组, D为抑制剂组。与对照组相比, PPH组新生小鼠肺泡破坏严重, 肺泡变大, 肺泡隔板数量减少; 激动剂组新生小鼠肺泡情况与PPH组小鼠相比无明显差异; 抑制剂组较PPH组肺泡破坏程度有所减轻。

表3 各组小鼠肺泡 MLI 及 RAC 值的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | n  | MLI                   | RAC                      |
|-------|----|-----------------------|--------------------------|
| 对照组   | 10 | 66 ± 10               | 6.6 ± 1.2                |
| PPH 组 | 10 | 100 ± 21 <sup>a</sup> | 3.0 ± 0.4 <sup>a</sup>   |
| 激动剂组  | 10 | 105 ± 15 <sup>a</sup> | 3.1 ± 0.9 <sup>a</sup>   |
| 抑制剂组  | 10 | 90 ± 9 <sup>b,c</sup> | 4.4 ± 0.8 <sup>b,c</sup> |
| F 值   |    | 3.315                 | 14.643                   |
| P 值   |    | <0.001                | <0.001                   |

注: [MLI] 肺泡平均内衬间隔; [RAC] 径向肺泡计数。a 示与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b 示与 PPH 组比较,  $P < 0.05$ ; c 示与激动剂组比较,  $P < 0.05$ 。

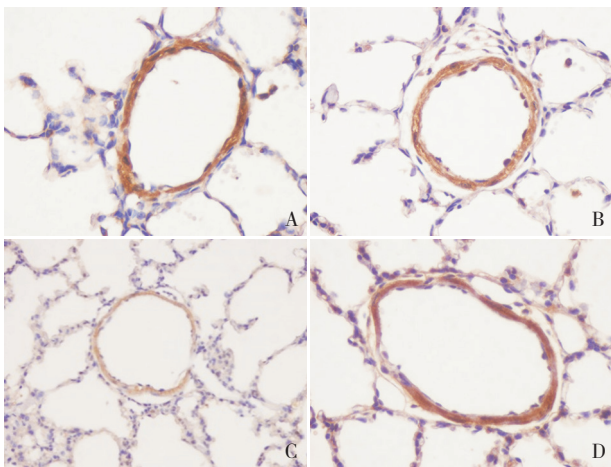


图3 免疫组化法检测各组小鼠肺组织 11β-HSD2 的表达 (DAB, ×400) A 为对照组, B 为 PPH 组, C 为激动剂组, D 为抑制剂组。11β-HSD2 主要在肺小动脉内皮细胞和平滑肌细胞中表达, 阳性表达呈棕褐色。与对照组相比, PPH 组肺动脉中 11β-HSD2 表达有所下降, 激动剂组进一步下调; 而与 PPH 组和激动剂组相比, 11β-HSD2 在抑制剂组中表达有所上调。

## 2.5 新生小鼠肺组织中 11β-HSD2 mRNA 及其蛋白的表达及皮质醇的水平变化

与对照组相比, PPH 组的 11β-HSD2 mRNA 及其蛋白的表达明显下降 ( $P < 0.05$ ), 激动剂组的 11β-HSD2 mRNA 及其蛋白的表达水平进一步下调 ( $P < 0.05$ ), 而抑制剂组 11β-HSD2 mRNA 及其蛋白的表达水平较 PPH 组和激动剂组明显上调, 但与对照组相比差异仍有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。各组皮质醇的浓度变化水平和 11β-HSD2 的表达呈现相反的变化趋势。见图 4, 表 4。

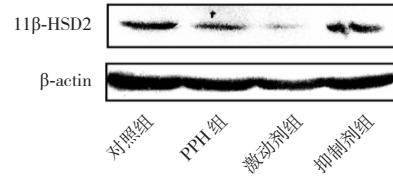


图4 Western blot 检测各组新生小鼠肺组织中 11β-HSD2 蛋白电泳图

表4 各组小鼠肺组织 11β-HSD2 mRNA 及其蛋白相对表达量及皮质醇浓度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 11β-HSD2 mRNA (n=8)          | 11β-HSD2 蛋白 (n=8)              | 皮质醇 (n=10)                  |
|-------|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 对照组   | 1.00                         | 0.511 ± 0.013                  | 16.8 ± 1.2                  |
| PPH 组 | 0.33 ± 0.09 <sup>a</sup>     | 0.342 ± 0.063 <sup>a</sup>     | 29.3 ± 2.3 <sup>a</sup>     |
| 激动剂组  | 0.15 ± 0.11 <sup>a,b</sup>   | 0.141 ± 0.030 <sup>a,b</sup>   | 40.6 ± 2.1 <sup>a,b</sup>   |
| 抑制剂组  | 0.48 ± 0.06 <sup>a,b,c</sup> | 2.701 ± 1.873 <sup>a,b,c</sup> | 22.5 ± 2.1 <sup>a,b,c</sup> |
| F 值   | 1356.623                     | 4.626                          | 135.398                     |
| P 值   | <0.001                       | 0.037                          | <0.001                      |

注: [11β-HSD2] II 型 11β- 羟基类固醇脱氢酶。a 示与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b 示与 PPH 组比较,  $P < 0.05$ ; c 示与激动剂组比较,  $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

有研究表明, 低氧因素会导致肺动脉血管的收缩、肺血管内皮细胞功能障碍、平滑肌细胞的增殖和迁移及凋亡抑制, 从而诱导肺动脉高压的发生发展<sup>[14]</sup>; 同时结合课题组前期的实验结果及相关文献报道 CaSR 确实参与了肺动脉高压 (如肺动脉平滑肌细胞增殖、血管重构) 的发生发展<sup>[15]</sup>。为研究在这之间是否有其他分子或者蛋白参与, 进而本次研究通过低氧诱导构建 PPH 新生小鼠动物模型, 来研究 CaSR 激动剂和 CaSR 抑制剂对 PPH 模型小鼠 11β-HSD2 及皮质醇的作用。实验结果显示: PPH 组较对照组右心室壁厚度、肺动脉管壁厚度及 BNP 浓度均显著增加且具有统计学意义, 表明本次实验构建 PPH 动物模型成功。

本研究中肺动脉的免疫组化染色结果发现 11β-HSD2 主要表达于肺血管的平滑肌细胞和内皮细胞中。11β-HSD2 mRNA 及其蛋白水平方面检

测发现, PPH 组较对照组小鼠肺动脉 11 $\beta$ -HSD2 表达明显下降而皮质醇的浓度升高, 表明低氧可以下调 11 $\beta$ -HSD2 的表达, 进而使皮质醇浓度升高。结合本课题组前期研究结果<sup>[8-9,16]</sup>及激动剂组和抑制剂组的结果: CaSR 激动剂能够进一步下调 11 $\beta$ -HSD2 的表达和促进皮质醇的浓度升高; CaSR 抑制剂反而能够上调 11 $\beta$ -HSD2 的表达和抑制皮质醇的分泌。有研究团队研究了非基因组信号通路, 数据表明, 细胞内钙离子是快速抑制 11 $\beta$ -HSD2 的表达和活性的重要介质<sup>[17]</sup>。同时 Hardy 等<sup>[18]</sup>也表明细胞内钙离子的增加会抑制胎盘 11 $\beta$ -HSD2 的活性和表达水平, 这与本次实验结果相一致。其可能原因是细胞内增多的钙离子作用于腺苷酸环化酶 (AC) 而降低其水平, 进而下调其下游分子环磷酸腺苷 (cAMP) 从而抑制蛋白激酶 A (PKA); 11 $\beta$ -HSD2 基因启动子区含有转录因子 NF-1、Sp1 等的结合位点, 其中最重要的转录因子是 NF-1, 而下调的 PKA 不能有效的磷酸化 NF-1 进而下调 11 $\beta$ -HSD2 的水平<sup>[17-19]</sup>。由于 11 $\beta$ -HSD2 水平的降低, 皮质醇不能被有效的灭活而升高。而过量的皮质醇暴露会刺激肺动脉平滑肌细胞过度增殖及内皮细胞受损进而发生血管重构<sup>[20]</sup>, 这也正好符合 PPH 发生的基本病理特征。同时它还可以抑制内皮细胞产生 NO、前列环素等一系列舒血管因子及可以激活相应缩血管物质受体, 从而加强缩血管效应<sup>[21]</sup>。可能通过以上的综合作用诱导 PPH 的产生。

钙敏感受体调节剂正逐渐为呼吸、心血管、肿瘤疾病提供新的治疗可能<sup>[22]</sup>, 其中 CaSR 抑制剂具有多种生物活性, 包括抗炎、抗癌、保护心血管系统等<sup>[23]</sup>, 但本次实验结果发现抑制剂组较 PPH 组肺泡密度较小、肺泡较完整、肺泡间隔破坏较轻、肺动脉平滑肌细胞排列较整齐、RV/LV 值减小、BNP 浓度降低、小鼠精神状态有所好转, 这些结果提示钙敏感受体的阻断可能为 PPH 提供新的治疗策略。同时我们发现 11 $\beta$ -HSD2 可能作为中间的信号蛋白参与其中, 有研究表明选择性抑制 11 $\beta$ -HSD2 对机体有害, 会导致高血压等心血管疾病的发生<sup>[24]</sup>, 相反是否可以选择性激动 11 $\beta$ -HSD2 来更好逆转此病? 以及中间具体的信号通路有待进一步研究。

综上所述, 本次实验 CaSR 抑制剂能够在一定

程度上恢复 PPH 导致的肺泡损伤、皮质醇浓度过高等病症, 以及从 11 $\beta$ -HSD2 角度为 PPH 的发病提供可能的机制。

#### [参 考 文 献]

- [1] Del Rey Hurtado de Mendoza B, Sánchez-de-Toledo J, Bobillo Perez S, et al. Lung ultrasound to assess the etiology of persistent pulmonary hypertension of the newborn (LUPPHYN Study): a pilot study[J]. *Neonatology*, 2019, 116(2): 140-146.
- [2] Kibe M, Ibara S, Inagaki H, et al. Lethal persistent pulmonary hypertension of the newborn in Bohring-Opitz syndrome[J]. *Am J Med Genet A*, 2018, 176(5): 1245-1248.
- [3] Ng QX, Venkatanarayanan N, Ho CYX, et al. Selective serotonin reuptake inhibitors and persistent pulmonary hypertension of the newborn: an update meta-analysis[J]. *J Womens Health (Larchmt)*, 2019, 28(3): 331-338.
- [4] Burford NG, Webster NA, Cruz-Topete D. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis modulation of glucocorticoids in the cardiovascular system[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10): pii: E2150.
- [5] Chen L, Guilmette J, Luo ZC, et al. Placental 11 $\beta$ -HSD2 and cardiometabolic health indicators in infancy[J]. *Diabetes Care*, 2019, 42(5): 964-971.
- [6] Babooa N, Shi WJ, Chen C. Factors relating caesarean section to persistent pulmonary hypertension of the newborn[J]. *World J Pediatr*, 2017, 13(6): 517-527.
- [7] 张方方, 王彦梅, 田松柏, 等. 钙敏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.
- [8] 王萌萌, 李贺, 张方方, 等. 钙敏感受体在新生小鼠持续性肺动脉高压中的作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(2): 208-214.
- [9] 李贺, 谷强, 王萌萌, 等. 钙敏感受体对低氧诱导的持续性肺动脉高压小鼠肺动脉平滑肌细胞内钙离子浓度的影响[J]. *中国新生儿科杂志*, 2018, 33(1): 59-64.
- [10] 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.
- [11] 甄毅岚. 钙敏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.
- [12] Knudsen L, Weibel ER, Gundersen HJ, et al. Assessment of air space size characteristics by intercept (chord) measurement: an accurate and efficient stereological approach[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2010, 108(2): 412-421.
- [13] Cooney TP, Thurlbeck WM. The radial alveolar count method of Emery and Mithal: a reappraisal 1 - postnatal lung growth[J]. *Thorax*, 1982, 37(8): 572-579.
- [14] 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.
- [15] Nakamura H, Zimmer J, Lim T, et al. Increased CaSR and



- TRPC6 pulmonary vascular expression in the nitrofen-induced model of congenital diaphragmatic hernia[J]. *Pediatr Surg Int*, 2018, 34(2): 211-215.
- [16] 李翔, 吴冰霞, 谷强, 等. 钙敏感受体对持续性肺动脉高压新生小鼠内皮型一氧化氮合酶及一氧化氮的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2019, 21(2): 189-194.
- [17] Kossintseva I, Wong S, Johnstone E, et al. Proinflammatory cytokines inhibit human placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity through Ca<sup>2+</sup> and cAMP pathways[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 290(2): E282-E288.
- [18] Hardy DB, Dixon SJ, Narayanan N, et al. Calcium inhibits human placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 283(4): 756-761.
- [19] 倪晓田. 人绒毛膜促性腺激素促进胎盘糖皮质激素屏障 11 $\beta$ -HSD2 表达的机制研究[D]. 上海: 复旦大学, 2010.
- [20] Zhang L, Zhou J, Jing Z, et al. Glucocorticoids regulate the vascular remodeling of aortic dissection via the p38 MAPK-HSP27 pathway mediated by soluble TNF-RII[J]. *EBioMedicine*, 2018, 27: 247-257.
- [21] Ong SL, 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.
- [22] Vahe C, Benomar K, Espiard S, et al. Diseases associated with calcium-sensing receptor[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2017, 12(1): 19.
- [23] Lee JW, Park HA, Kwon OK, et al. NPS 2143, a selective calcium-sensing receptor antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation[J]. *Mol Immunol*, 2017, 90: 150-157.
- [24] Zhou C, Ye F, Wu H, et al. Recent advances in the study of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 $\beta$ -HSD2) inhibitors[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2017, 52: 47-53.
- (本文编辑: 万静)

· 消息 ·

## 《中国当代儿科杂志》进入中国高质量科技期刊目录

为响应党的十九大提出的建设科技强国的战略目标;为探索认定发布供我国科技工作者使用、供学术文献成果评价参考的高质量科技期刊分级目录,推动同等水平的国内外期刊等效使用,体现应用实践类科研成果的应有价值,引导国内科技工作者将更多优秀成果在我国高质量科技期刊首发,突破我国科技期刊发展瓶颈,推动我国科技期刊进行良性可持续发展,推动建设适应世界科技强国需求的科技期刊体系,助推世界一流科技期刊建设,2019年9月24日,遵照同行评议、价值导向、等效应用原则,中华医学会公布了本领域科技期刊分级目录的初步成果,我刊被收录在临床医学领域高质量科技期刊分级目录T2区。

首批发布的临床医学领域科技期刊分级目录涵盖心血管病学、内分泌病学、儿科学、医学影像学4个方向,遴选源期刊585种,其中包括中国期刊78种,其他国家和地区期刊507种,最终选定170种高水平科技期刊进入分级目录。在分级目录评定过程中,共有相关学科领域的485名专家参与期刊的推荐、审定工作。其他领域的分级目录制定工作会陆续产生成果。

中国当代儿科杂志编辑部  
2019年9月28日