

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2019.02.017

论著·实验研究

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

李翔¹ 吴冰霞¹ 李贺¹ 王萌萌¹ 马克涛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)在持续性肺动脉高压(PPH)新生小鼠模型中对内皮型一氧化氮合酶(eNOS)表达及一氧化氮(NO)浓度的影响。**方法** 将80只新生C57BL/6小鼠随机分为对照组、PPH组、激动剂组和抑制剂组。对照组小鼠暴露于空气中, PPH组、激动剂组和抑制剂组小鼠暴露于12%的氧浓度中。激动剂组和抑制剂组分别腹腔注射CaSR激动剂(GdCl₃) 16 mg/kg、CaSR抑制剂(NPS2390) 1 mg/kg, PPH组和对照组以生理盐水替代, 共14 d。采用苏木精-伊红染色检测各组小鼠肺泡和肺血管变化; 采用Western blot、qRT-PCR和免疫组化检测各组小鼠肺组织中eNOS蛋白、mRNA的表达; 采用ELISA法分别检测肺组织匀浆中脑利钠肽(BNP)及NO的含量。**结果** 与对照组相比, PPH组和激动剂组肺泡平均内衬间隔、肺小动脉血管壁厚度、右心室与左心室壁厚度比(RV/LV)及BNP浓度均明显增大, 径向肺泡计数明显减少($P<0.05$); 除RV/LV外, 上述指标在抑制剂组均较PPH组和激动剂组有所改善($P<0.05$)。与对照组相比, eNOS蛋白、mRNA表达量及NO浓度在PPH组明显增高, 在激动剂组中表达水平进一步增加, 而在抑制剂组中表达减少($P<0.05$)。**结论** CaSR可能通过影响eNOS的表达和NO浓度在新生小鼠PPH发病中发挥重要作用。

[中国当代儿科杂志, 2019, 21(2): 189-194]

[关键词] 持续性肺动脉高压; 钙敏感受体; 内皮型一氧化氮合酶; 一氧化氮; 新生小鼠

Effect of calcium-sensitive receptors on endothelial nitric oxide synthase and nitric oxide in neonatal mice with persistent pulmonary hypertension

LI Xiang, WU Bing-Xia, LI He, WANG Meng-Meng, 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 study the effect of calcium-sensitive receptors (CaSR) on the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and the concentration of nitric oxide (NO) in a neonatal mouse model of persistent pulmonary hypertension (PPH). **Methods** Eighty neonatal C57BL/6 mice were randomly divided into control, PPH, agonist and antagonist groups. The control group was exposed to air, and the other three groups were exposed to 12% oxygen. The agonist and antagonist groups were intraperitoneally injected with a CaSR agonist (GdCl₃ 16 mg/kg) and a CaSR antagonist (NPS2390, 1 mg/kg), respectively, while the PPH and control groups were intraperitoneally injected with normal saline instead. All mice were treated for 14 days. Alveolar development and pulmonary vessels were assessed by hematoxylin-eosin staining. The protein and mRNA expression of eNOS and its localization in lung tissues were determined by Western blot, qRT-PCR and immunohistochemistry. The levels of brain natriuretic peptide (BNP) and NO in lung homogenate were determined using ELISA. **Results** Compared with the control group, the PPH and agonist groups showed significant increases in alveolar mean linear intercept, the percent wall thickness of pulmonary arterioles, right to left ventricular wall thickness ratio (RV/LV) and BNP concentration, but a significant reduction in radial alveolar count ($P<0.05$). The antagonist group had significant improvements in all the above indices except RV/LV compared with the PPH and agonist groups ($P<0.05$). Compared with those in the control group, the protein and

[收稿日期] 2018-09-05; [接受日期] 2019-01-08

[基金项目] 国家自然科学基金(81560257)。

[作者简介] 李翔, 男, 硕士研究生。

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

mRNA expression of eNOS and NO concentration were significantly increased in the PPH group and increased more significantly in the agonist group, but were significantly reduced in the antagonist group ($P<0.05$). **Conclusions** CaSR plays an important role in the development of PPH in neonatal mice, possibly by increasing eNOS expression and NO concentration. [Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(2): 189-194]

Key words: Persistent pulmonary hypertension; Calcium-sensitive receptor; Endothelial nitric oxide synthase; Nitric oxide; Neonatal mice

新生儿持续性肺动脉高压 (persistent pulmonary hypertension of the newborn, PPHN) 影响约 2/1000 的活产婴儿^[1]。PPHN 的典型特征是肺血管阻力逐渐增加、从右到左的肺外分流血液和出生后低氧血症^[2]。一氧化氮 (NO) 由内皮细胞小凹结构中的内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 产生, 并且 NO 在维持心血管稳态中起关键作用, 包括血管张力、血管平滑肌细胞增殖和血管重塑的调节^[3]。本课题前期研究结果表明在低氧诱导的新生 C57BL/6 小鼠持续性肺动脉高压 (PPH) 中, 钙敏感受体 (CaSR) 的表达量及肺动脉平滑肌细胞内钙离子浓度增加, 在 CaSR 激动剂组中增加明显, 而在 CaSR 抑制剂组中减少^[4-5]。本研究以 PPH 小鼠模型为基础, 分别给予 CaSR 激动剂和抑制剂干预, 通过探讨 eNOS 的表达及 NO 浓度的变化, 以期对新生儿 PPH 的临床诊断及治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

小鼠抗大鼠 eNOS 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司), 小鼠抗大鼠 β -actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司), 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), eNOS 反转录试剂盒、Quantinova SYBR Green qPCR 荧光定量试剂盒 (美国 Fermentas 公司), TRIzol (美国 Invitrogen 公司), NO 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 小鼠脑利钠肽 (BNP) ELISA 试剂盒 (上海江莱生物科技有限公司)。

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), 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^[4,6]。SPF

级健康 C57BL/6 小鼠, 体重 18~25 g, 由新疆维吾尔自治区实验动物研究中心提供。怀孕小鼠分娩后, 将新生小鼠随机分为对照组、PPH 组、激动剂组和拮抗剂组, 各 20 只。对照组新生小鼠暴露在室内空气中, 其他 3 组新生小鼠从出生开始暴露于氧浓度为 12% 的缺氧室中。激动剂和拮抗剂组小鼠每日分别通过给予 $GdCl_3$ 16 mg/kg 和 NPS2390 1 mg/kg 腹腔注射 1 次。同时, PPH 组和对照组每日给予同干预组等量的生理盐水腹腔内注射。定期添加水、饲料及更换垫料, 连续处理 14 d。在 14 d 造模期间内, 每日测量新生幼仔的体重。计算体重增长率 (RBWI) 以表示幼崽体重的变化。RBWI = (终末体重 - 初始体重) / 初始体重 $\times$ 100%。

1.3 标本采集

造模完成后, 每组新生小鼠用水合氯醛麻醉, 打开胸腔。用 24-G 静脉留置针进行气管插管, 用 10% 福尔马林灌入肺部固定。取出小鼠肺及心脏组织行石蜡包埋, 并通过苏木精-伊红 (HE) 染色观察肺组织形态。同时, 取各组未行福尔马林固定的肺组织, 在液氮中速冻后于 -80°C 储存待测。

1.4 肺泡及肺血管形态学检测

每组随机选取 6 张 HE 染色的肺组织切片以评估肺泡发育。计算肺泡平均内衬间隔 (MLI) 来表示肺泡平均内径, 即肺泡大小^[7]。计算径向肺泡计数 (RAC) 来表示从终末细支气管到最近的结缔组织隔膜的肺泡隔板数量^[8]。每组每张肺组织切片中随机选取 6~10 个视野用于 MLI 及 RAC 测量。实验独立重复 3 次。

每组随机选取 6 张 HE 染色的肺组织切片以评估肺血管形态。每张肺组织切片随机选取 5 个视野测量直径为 20~99 μm 及 100~150 μm 的肺小动脉。肺动脉壁厚度 (WT) 以血管壁厚度占外径百分比表示。WT (%) = $100 \times (2 \times \text{血管内侧壁厚度}) / \text{血管外径}$ 。同时每组随机选取 6 张 HE 染色的心脏组织切片, 测量右心室与左心室厚度比 (RV/LV), 作为反映肺动脉高压及右心室肥大的

指标。实验独立重复3次。

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

取50 mg肺组织研磨后置于冷却的蛋白裂解液和PMSF中,静置15 min,在4℃下12000 r/min离心20 min后取上清,用BCA分析法测蛋白浓度。取50 μg蛋白样品行8%SDS-PAGE凝胶电泳,80 V 120 min将蛋白转移至PVDF膜,在室温下用5%脱脂牛奶封闭2 h;加入小鼠抗大鼠eNOS一抗(1:1000),小鼠抗大鼠β-actin一抗(1:1000)4℃过夜;TBST洗膜3次,每次10 min;加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG二抗(1:20000),常温孵育2 h,显色液显色,定影后用Image J软件分析光密度值。结果以目的蛋白与内参蛋白的比值表示。实验独立重复3次。

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

根据说明书,采用QuantiNova SYBR Green qPCR试剂盒检测eNOS mRNA相对表达量。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。用于实时荧光定量RT-PCR的引物序列如下:eNOS上游:5'-GTCTGCGGCGATGTCACTATGG-3',下游:5'-GTATGCGGCTTGTACCTCCTG-3'。MACT(内参)上游:5'-TTCCTTCTTGGGTATGGAAT-3'。下游:5'-GAGCAATGATCTTGATCTTC-3'。

使用TRIzol提取新生小鼠肺组织匀浆总RNA,取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℃预变性2 min;95℃变性30 s,60℃退火20 s,共运行40个循环。以eNOS PCR产物与MACT内参的荧光密度比值作为eNOS mRNA的相对表达含量,表达的相对定量结果以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。实验独立重复3次。

1.7 ELISA 法检测新生小鼠肺组织匀浆 BNP 及 NO 浓度

取50 mg肺组织加入适量生理盐水研磨后,置于4℃下3000 r/min离心20 min,取上清,根据试剂盒说明书,使用小鼠BNP ELISA试剂盒和NO检测试剂盒检测上清液中BNP和NO的水平,通过450 nm波长下测定吸光度(OD值)来计算新生小鼠肺组织匀浆中BNP和NO的浓度。实验独

立重复3次。

1.8 免疫组化法检测新生小鼠肺组织 eNOS 表达

肺组织用酒精脱水后包埋于石蜡中。将肺组织切片脱蜡处理后,经3%过氧化氢处理,并用枸橼酸抗原热修复,室温冷却后PBS冲洗3次,加入小鼠抗大鼠单克隆eNOS抗体(1:500),4℃孵育过夜后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG二抗(1:1000),加入DAB显色液,中性树脂胶封片后晾干,置于镜下观察。

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±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 新生小鼠一般状况

四组新生小鼠的体重和RBWI如表1所示。PPH组和激动剂组的新生小鼠生长缓慢、反应迟钝、精神相对较差,但死亡率并没有增加。与对照组相比较,PPH组和激动剂组的体重和RBWI显著降低($P < 0.05$),而抑制剂组小鼠的体重和RBWI并无明显差别($P > 0.05$)。

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	20	5.1 ± 0.4	8.2 ± 2.3
PPH组	20	3.7 ± 0.5 ^a	5.3 ± 1.6 ^a
激动剂组	20	3.6 ± 0.5 ^a	5.1 ± 1.0 ^a
抑制剂组	20	4.9 ± 0.3	7.9 ± 1.4
<i>F</i> 值		25.227	7.844
<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 各组小鼠肺组织中肺泡形态、大小及肺泡隔板变化

HE染色肺组织切片结果显示:与对照组相比较,PPH组小鼠的肺泡变大,肺泡隔板减少;MLI值增加,RAC值减小($P < 0.05$);提示缺氧对肺泡发育有抑制作用。同时,激动剂组的肺泡形态、MLI值、RAC值与PPH组相似,说明CaSR激动剂并没有加重缺氧诱导的肺泡抑制作用。抑制剂

组较 PPH 组肺泡破坏程度有所缓解；MLI 值小于 PPH 组但仍大于对照组，而 RAC 值大于 PPH 组但仍小于对照组 ($P<0.05$)；说明在低氧条件下，CaSR 抑制剂能改善的肺泡发育，增加肺泡隔板数量，但不能完全恢复。见图 1，表 2。

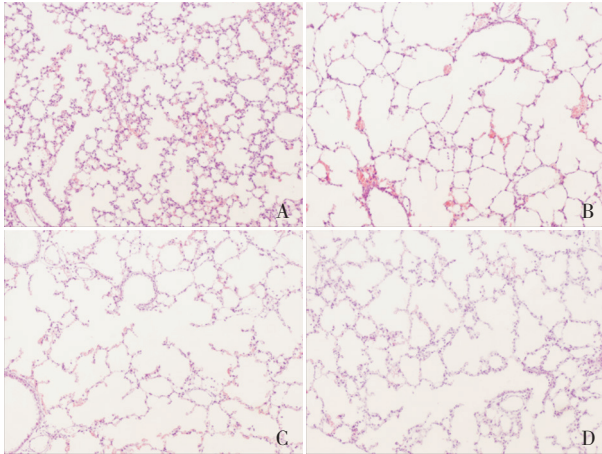


图 1 各组新生小鼠肺泡形态 (苏木精-伊红染色, $\times 100$) A 为对照组, B 为 PPH 组, C 为激动剂组, D 为抑制剂组。与对照组相比, PPH 组新生小鼠肺泡破坏显著, 肺泡变大, 肺泡隔板数量减少; 激动剂组新生小鼠与 PPH 组小鼠相似; 抑制剂组较 PPH 组肺泡破坏程度有所缓解, 但仍高于对照组。

表 2 各组肺泡 MLI 及 RAC 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MLI	RAC
对照组	8	45 ± 9	7.4 ± 1.2
PPH 组	8	76 ± 7 ^a	3.8 ± 0.7 ^a
激动剂组	8	72 ± 6 ^a	3.9 ± 0.8 ^a
抑制剂组	8	61 ± 8 ^{a,b,c}	5.0 ± 0.8 ^{a,b,c}
F 值		26.000	28.419
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, $P<0.05$ 。

2.3 各组小鼠肺小动脉血管壁、右心室厚度及 BNP 浓度变化

观察各组肺组织 HE 染色切片, 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减小, 与对照组无明显差异 (图 2)。同时, PPH 组和激动剂组 WT% 值均较对照组显著增加 ($P<0.05$), 但激动剂组与 PPH 组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$); 抑制剂组较 PPH 组 WT%

值明显降低 ($P<0.05$)。本实验通过检测 BNP 浓度反映肺动脉压^[9]。PPH 组和激动剂组中的 BNP 浓度较对照组显著增加 ($P<0.05$), 说明 PPH 组和激动剂组小鼠存在明显的肺动脉高压和肺血管重塑; 抑制剂组中 BNP 浓度较 PPH 组和激动剂组明显降低, 但仍高于对照组 ($P<0.05$), 说明抑制剂组小鼠肺动脉高压和肺血管重塑有所改善, 但不能完全恢复。与对照组相比较, PPH 组小鼠的 RV/LV 值显著增加 ($P<0.05$), 说明存在右心室肥大; 激动剂组和拮抗剂组 RV/LV 值较 PPH 组有所降低, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 3。

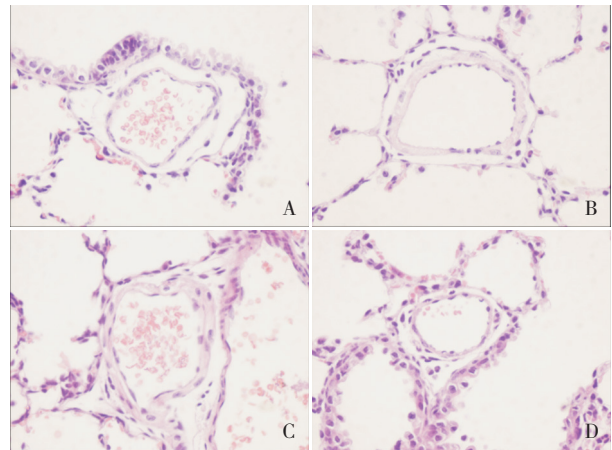


图 2 各组新生小鼠肺小动脉血管壁变化 (苏木精-伊红染色, $\times 400$) A 为对照组, B 为 PPH 组, C 为激动剂组, D 为抑制剂组。与对照组相比, PPH 组和激动剂组血管壁显著增厚, 抑制剂组血管壁厚度较 PPH 组减小, 与对照组无明显差异。

表 3 各组 WT%、RV/LV 及 BNP 浓度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	WT%	RV/LV	BNP (pg/mL)
对照组	14	11.4 ± 1.3	0.54 ± 0.03	499 ± 9
PPH 组	14	16.9 ± 1.8 ^a	0.81 ± 0.06 ^a	680 ± 8 ^a
激动剂组	14	17.8 ± 1.7 ^a	0.78 ± 0.05 ^a	698 ± 5 ^{a,b}
抑制剂组	14	12.6 ± 2.1 ^{b,c}	0.76 ± 0.06 ^a	523 ± 7 ^{a,b,c}
F 值		19.848	33.821	783.355
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, $P<0.05$ 。

2.4 新生小鼠肺组织中 eNOS 蛋白及其 mRNA 相对表达量及肺组织匀浆中 NO 浓度变化

通过 Western blot 及 qRT-PCR 检测 eNOS 的蛋白表达及其 mRNA 水平, 结果显示 PPH 组 eNOS

蛋白及其 mRNA 表达量较对照组明显增加, 激动剂组进一步增强 eNOS 的蛋白及其 mRNA 表达量 ($P<0.05$); 而抑制剂组与激动剂组相比, eNOS 蛋白及其 mRNA 表达量有所降低, 但仍然高于对照组 ($P<0.05$)。与对照组相比, PPH 组中 NO 浓度升高, 激动剂组 NO 浓度进一步升高 ($P<0.05$); 抑制剂组 NO 浓度较 PPH 组有所降低, 但仍高于对照组 ($P<0.05$)。见图 3, 表 4。

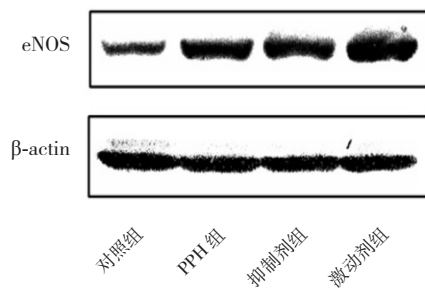


图3 Western blot 检测各组新生小鼠肺组织中 eNOS 蛋白电泳图

表4 各组小鼠肺组织 eNOS 蛋白、mRNA 相对表达量及肺组织匀浆中 NO 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	eNOS 蛋白	eNOS mRNA	NO ($\mu\text{mol/g prot}$)
对照组	14	0.45 ± 0.03	1.00	0.63 ± 0.05
PPH 组	14	0.70 ± 0.18^a	2.81 ± 0.06^a	2.31 ± 0.07^a
激动剂组	14	$0.94 \pm 0.93^{a,b}$	$3.69 \pm 0.05^{a,b}$	$5.97 \pm 0.13^{a,b}$
抑制剂组	14	$0.65 \pm 0.38^{a,c}$	$1.80 \pm 0.03^{a,b,c}$	$1.19 \pm 0.11^{a,b,c}$
F 值		14.884	2 189.627	3 857.052
P 值		0.001	<0.001	<0.001

注: [eNOS] 内皮型一氧化氮合酶; [NO] 一氧化氮。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, $P<0.05$ 。

2.5 新生小鼠肺组织中 eNOS 的表达

免疫组织化学分析结果表明, eNOS 蛋白主要在肺小动脉内皮细胞和平滑肌细胞中表达。与对照组相比, PPH 组的肺动脉中表达 eNOS 的内皮细胞和平滑肌细胞的数量增加 (黄色), 激动剂组增加更加明显 (褐色), 而 eNOS 在抑制剂组中表达有所下降。见图 4。

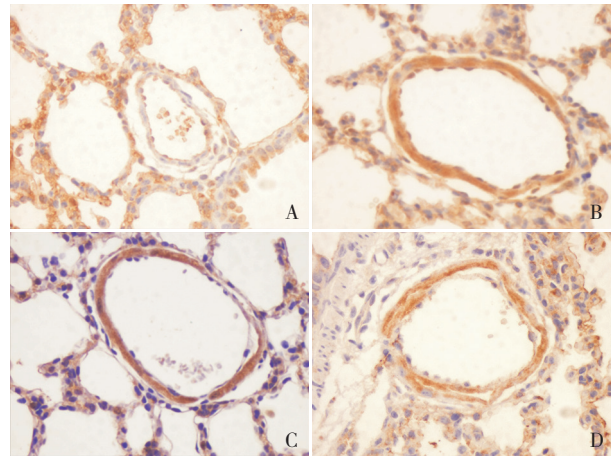


图4 免疫组化法检测各组肺组织 eNOS 的表达 (DAB, $\times 400$) A 为对照组, B 为 PPH 组, C 为激动剂组, D 为抑制剂组。eNOS 主要在肺小动脉内皮细胞和平滑肌细胞中表达。与对照组相比, PPH 组肺动脉中表达 eNOS 的内皮细胞和平滑肌细胞数量增加 (黄色), 激动剂组增加更加明显 (褐色), 而 eNOS 在抑制剂组中表达有所下降。

3 讨论

本研究通过 14 d 低氧诱导 C57BL/6 新生小鼠以建立 PPH 动物模型, 观察 CaSR 激动剂和抑制剂对模型小鼠 eNOS 及 NO 浓度的影响。研究结果显示: 与对照组比较, PPH 组小鼠肺小动脉管壁厚度、右心室游离壁厚度及肺组织匀浆中 BNP 浓度均明显增加, 这说明 PPH 新生小鼠模型建立成功。有研究表明, 多数患有 PPHN 的新生儿在出生不久后便会死亡, 这与肺血管系统重塑相关^[10]。慢性缺氧被认为会导致肺小动脉中膜层平滑肌细胞异常增殖; 同时, 慢性缺氧也是引起 PPHN 和加重病理生理状况的重要因素之一。

eNOS 是一种多结构域酶, 由含有血红素、L-精氨酸、辅因子四氢生物蝶呤和还原酶等结合位点的 N 末端加氧酶结构域组成。eNOS 通过使 NADPH 衍生的电子传递到位于还原酶结构域的黄素中, 然后转移到位于加氧酶结构域中的血红素中, 使得血红素铁可以结合 O_2 并通过催化 L-精氨酸逐步合成 $NO^{[11]}$ 。血管内皮细胞释放多种活性物质, 其中 NO 在心血管稳态及血管内皮功能的调节中发挥关键作用, 包括局部血管平滑肌张力的调节、血管平滑肌细胞的增殖、动脉粥样硬化和血管重塑的调节^[3,12]。

有研究显示, 在慢性阻塞性肺病、心肺转流

和充血性心力衰竭引起的肺动脉高压中观察到 NO 释放减少, 并且 NO 产生减少可能会导致肺动脉高压的发生^[13]。本研究结果显示: 通过免疫组化染色, eNOS 主要在肺小动脉内皮细胞和平滑肌细胞中表达。同时结合 Western blot 和 qRT-PCR 结果说明: 与对照组相比, PPH 组新生 C57BL/6 小鼠肺动脉中 eNOS 的表达增加, 新生小鼠肺组织匀浆中 NO 浓度升高。该结果与 eNOS 蛋白表达在肺动脉高压患者中有一定程度的上调^[14]及缺氧诱导的肺动脉高压大鼠的肺组织匀浆中 eNOS 酶活性增加等研究报道相一致。同时, GdCl₃ (CaSR 激动剂) 能够进一步上调 eNOS 表达和升高 NO 浓度; 而 NPS2390 (CaSR 抑制剂) 能下调其表达和降低 NO 浓度。其可能的原因是, eNOS 上存在 Ca²⁺/钙调蛋白 (CaM) 结合的生物活性结构, 并且 eNOS 的活性由细胞内 Ca²⁺ 浓度和 CaM 结合所决定^[11]。本课题组前期研究表明, 在低氧诱导的新生 C57BL/6 小鼠 PPH 中, 肺动脉中 CaSR 的表达量及肺动脉平滑肌细胞内 Ca²⁺ 浓度增加, 在 CaSR 激动剂组中增加明显, 而在 CaSR 抑制剂组中减少^[4-5]。说明在缺氧环境中, 肺动脉 CaSR 表达量增加, 同时引起细胞内 Ca²⁺ 浓度也随之增高, 增多的 Ca²⁺ 与 eNOS 活性结构上的 CaM 相结合从而上调 eNOS 的活性和其表达, 进而导致 NO 浓度增加。进一步激动 CaSR 能增加 eNOS 在肺动脉上的表达和活性, 并升高 NO 的浓度, 而抑制 CaSR 能减少这种作用。NO 是一种氧自由基性质的分子。生理情况下, 由一氧化氮合酶合成的 NO 可以使得血管平滑肌舒张从而降低血压。但有报道显示, 在低氧环境条件下, NO 增加过多, 并与氧自由基合成过氧亚硝酸盐, 发挥细胞毒性作用, 引起肺血管内皮损伤, 进而导致肺动脉高压的发展^[15-16]。本研究结果提示, CaSR 可能通过调节 Ca²⁺ 浓度而影响 eNOS 和 NO 的表达, 并参与 PPH 的发病。其具体机制及信号通路有待于课题组进一步研究及探讨。

综上所述, 新生小鼠肺动脉中有 eNOS 的表达, 低氧可使 eNOS 表达和 NO 浓度增高, 激动 CaSR 可进一步增加 eNOS 的表达及升高 NO 浓度, 同时 NO 大量释放可致使肺血管内皮损伤, 最终导致 PPH 的发生。CaSR 抑制剂降低 eNOS 的表达及 NO 浓度, 从而在一定程度上减轻 PPH 中肺血管损伤并逆转血管构型重建。

[参 考 文 献]

- [1] Nakwan N. The practical challenges of diagnosis and treatment options in persistent pulmonary hypertension of the newborn: a developing country's perspective[J]. *Am J Perinatol*, 2018, 35(14): 1366-1375.
- [2] Drummond WH. Neonatal pulmonary hypertension[J]. *Equine Vet J*, 1987, 19(3): 169-171.
- [3] Godo S, Sawada A, Saito H, et al. Disruption of physiological balance between nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization impairs cardiovascular homeostasis in mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(1): 97-107.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Wedgwood S, Lakshminrusimha S, Schumacker PT, et al. Hypoxia inducible factor signaling and experimental persistent pulmonary hypertension of the newborn[J]. *Front pharmacol*, 2015, 6: 47.
- [11] Siragusa M, Fleming I. The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction[J]. *Pflugers Arch*, 2016, 468(7): 1125-1137.
- [12] Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, et al. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling[J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(4): 731-736.
- [13] Kruzliak P, Maruyama J, Maruyama K. Role of nitric oxide in pathophysiology and treatment of pulmonary hypertension[J]. *Vitam Horm*, 2014, 96: 407-424.
- [14] Komai H, Naito Y, Aimi Y, et al. Nitric oxide synthase expression in lungs of pulmonary hypertensive patients with heart disease[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2001, 10(1): 29-32.
- [15] 曹静, 朱艳萍, 李明霞. 缺氧诱导因子 -1 α 及下游因子在缺氧性肺动脉高压新生大鼠肺内的表达研究[J]. *中国新生儿科杂志*, 2014, 29(3): 194-199.
- [16] 桑葵, 周英, 李明霞. 缺氧诱导因子 -1 α 及其调控因子在缺氧性肺动脉高压新生大鼠肺组织的蛋白质表达研究[J]. *中华儿科杂志*, 2012, 50(12): 919-924.

(本文编辑: 万静)