doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2009005

论著・实验研究

### 血管内皮生长因子 A 对缺氧性肺动脉高压新生大鼠 肺血管重塑的影响及其机制研究

曹静1 罗佳媛1 吴典2 赵倩2 李明霞1

(1.新疆医科大学第一附属医院新生儿科,新疆乌鲁木齐 830054;
2.新疆医科大学儿科学院,新疆乌鲁木齐 830054)

[摘要] 目的 探讨血管内皮生长因子 A (VEGF-A) 调控生存素 (SVV) 在缺氧性肺动脉高压 (HPH) 新生大鼠肺血管重塑中的作用。方法 96 只新生大鼠随机分为 HPH+VEGF-A 组、HPH 组和对照组,每组再随 机分为3d、7d、10d和14d亚组,每个亚组8只大鼠。HPH+VEGF-A组和HPH组分别经气管内转染携带/不 携带 VEGF-A 的腺病毒载体后建立 HPH 模型,对照组气管内注射 0.9%NaCl 溶液后常氧下饲养。直接测压法测 定新生大鼠平均右心室收缩压(RVSP);苏木精 - 伊红染色后光镜下观察肺血管形态学变化,计算肺小动脉中 层血管壁厚度占肺小动脉外径的百分比(MT%)和肺小动脉中层横截面积占总横截面积的百分比(MA%);免 疫组化法检测肺组织中 VEGF-A 和 SVV 的表达水平。结果 HPH 组新生大鼠平均 RVSP 高于同时间点对照组和 HPH+VEGF-A 组(P<0.05)。缺氧7d, HPH 组出现肺血管重塑, HPH+VEGF-A 组自缺氧 10d 开始出现。缺 氧 7 d 时, HPH 组 MT% 和 MA% 高于对照组和 HPH+VEGF-A 组(P<0.05); 缺氧 10 d 和 14 d 时, HPH 组及 HPH+VEGF-A 组 MT% 和 MA% 均高于对照组(P<0.05)。缺氧各时间点 HPH 组和 HPH+VEGF-A 组 VEGF-A 表达均高于对照组(P<0.05);缺氧3d和7d时,HPH+VEGF-A组VEGF-A表达高于HPH组(P<0.05)。缺 氧 14 d 时, HPH 组 SVV 表达高于对照组(P<0.05); 缺氧各时间点 HPH+VEGF-A 组 SVV 表达均高于对照组 (P<0.05);缺氧3d和7d时,HPH+VEGF-A组SVV表达高于HPH组(P<0.05)。结论 预防性外源性气管 内给予 HPH 新生大鼠 VEGF-A, 可在缺氧早期通过上调 SVV 表达抑制肺血管重塑, 降低肺动脉压力, 为新生儿 HPH 肺血管重塑干预治疗提供了依据。 [中国当代儿科杂志, 2021, 23(1): 103-110]

[关键词] 血管内皮生长因子; 生存素; 肺动脉高压; 血管重塑; 新生大鼠

### Effect and mechanism of vascular endothelial growth factor-A on pulmonary vascular remodeling in neonatal rats with hypoxic pulmonary hypertension

CAO Jing, LUO Jia-Yuan, WU Dian, ZHAO Qian, LI Ming-Xia. Department of Neonatology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China (Li M-X, Email: limingxia1203@sohu.com)

**Abstract: Objective** To study the role of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) in pulmonary vascular remodeling in neonatal rats with hypoxic pulmonary hypertension (HPH) by regulating survivin (SVV). **Methods** A total of 96 neonatal rats were randomly divided into three groups: HPH+VEGF-A group, HPH group, and control group. Each group was further randomly divided into 3-, 7-, 10-, and 14-day subgroups (*n*=8 in each subgroup). The neonatal rats in the HPH+VEGF-A and HPH groups were intratracheally transfected with adenoviral vectors with or without VEGF-A gene respectively. Those in the control group were given intratracheal injection of normal saline and were then fed under normoxic conditions. The direct measurement method was used to measure mean right ventricular systolic pressure (RVSP). Hematoxylin-eosin staining was used to observe the morphological changes of pulmonary vessels under a light microscope and calculate the percentage of media wall thickness (MT%) and the percentage of media wall cross-sectional area (MA%) in the pulmonary arterioles. Immunohistochemistry was used to measure the expression

<sup>[</sup>收稿日期] 2020-09-02; [接受日期] 2020-11-20

<sup>[</sup>基金项目]国家自然科学基金(81760278);新疆维吾尔自治区卫生健康青年医学科技人才专项科研项目(WJWY-201901)。 [作者简介]曹静,女,硕士,主治医师。

<sup>[</sup>通信作者]李明霞, 女, 教授。Email: limingxia1203@sohu.com。

levels of VEGF-A and SVV in lung tissue. **Results** The HPH group had a significantly higher mean RVSP than the control and HPH+VEGF-A groups at each time point (P<0.05). Pulmonary vascular remodeling occurred in the HPH group on day 7 of hypoxia, while it occurred in the HPH+VEGF-A group on day 10 of hypoxia. On day 7 of hypoxia, the HPH group had significantly higher MT% and MA% than the control and HPH+VEGF-A groups (P<0.05). On days 10 and 14 of hypoxia, the HPH and HPH+VEGF-A groups had significantly higher MT% and MA% than the control group (P<0.05). The HPH and HPH+VEGF-A groups had significantly higher expression of VEGF-A than the control group at each time point (P<0.05). On days 3 and 7 of hypoxia, the HPH+VEGF-A group had significantly higher expression of VEGF-A than the HPH group (P<0.05). On day 14 of hypoxia, the HPH+VEGF-A group had significantly higher expression of SVV than the control group (P<0.05). On days 3 and 7 of hypoxia, the HPH+VEGF-A group had significantly higher expression of SVV than the control group (P<0.05). On days 3 and 7 of hypoxia, the HPH+VEGF-A group had significantly higher expression of SVV than the control group (P<0.05). On days 3 and 7 of hypoxia, the HPH+VEGF-A group had significantly higher expression of SVV than the control group (P<0.05). On days 3 and 7 of hypoxia, the HPH+VEGF-A group had significantly higher expression of SVV than the control group (P<0.05). On days 3 and 7 of hypoxia, the HPH+VEGF-A group had significantly higher expression of SVV than the HPH group (P<0.05). Conclusions Prophylactic intratracheal administration of exogenous VEGF-A in neonatal rats with HPH can inhibit pulmonary vascular remodeling and reduce pulmonary arterial pressure by upregulating the expression of SVV in the early stage of hypoxia. This provides a basis for the interventional treatment of pulmonary vascular remodeling in neonatal HPH. [Chin J Contemp Pediatr, 2021, 23(1): 103-110]

Key words: Vascular endothelial growth factor; Survivin; Pulmonary hypertension; Vascular remodeling; Neonatal rats

新生儿缺氧性肺动脉高压 (hypoxic pulmonary hypertension, HPH)是新生儿期缺氧性疾病诱发的 急危重症,早期表现为肺血管痉挛,扩血管等对 症治疗有效;晚期可导致不可逆性肺血管重塑、 右心室肥厚甚至功能衰竭<sup>[1-3]</sup>,病死率高,因此延 缓或扭转肺血管重塑是该病救治成功的关键。成 人 HPH 研究发现肺血管内皮细胞损伤是该病的 起始环节,而该细胞稳态破坏是导致肺血管重塑 的关键因素<sup>[4-5]</sup>。血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGF-A)是调控血管 内皮细胞功能的重要因子,其通过保护肺血管内 皮细胞功能抑制了肺血管重塑进程[6-7]。生存素 (survivin, SVV)是一种重要的抗调亡蛋白,有研 究发现 VEGF-A 激活蛋白激酶 B/ 鼠双微基因 2 等 信号通路上调 SVV 表达,抑制了半胱氨酸蛋白酶 (Caspase)的活性,阻断了细胞凋亡,维持了细 胞稳态<sup>[8-9]</sup>。而在新生儿 HPH 发病机制中 VEGF-A 能否通过调控 SVV 保护肺血管内皮细胞进而抑 制肺血管重塑进程不清楚。本研究通过建立 HPH 新生大鼠模型、腺病毒基因转染等手段深入研究 VEGF-A、SVV 在新生大鼠 HPH 肺血管重塑中的 作用,为阻断或逆转新生儿 HPH 肺血管重塑提供 新的治疗靶点。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物及仪器试剂

96 只健康清洁级 Wistar 新生大鼠, 日龄 7~10 d, 体重 20~30 g, 由新疆医科大学实验动物 学实验室提供。

BL-420S 生物机能实验系统由成都泰盟科技有限公司提供;Y-MS-51 氧浓度控制系统(主要包括氧浓度控制器和常压低氧舱)由上海玉研科学仪器有限公司提供;携带和不携带*VEGF-A*基因的腺病毒载体(均标记增强型绿色荧光蛋白)由上海吉凯基因公司提供;VEGF-A及SVV单克隆抗体均由英国Abcam公司提供。

#### 1.2 新生大鼠分组及气管内转染腺病毒载体

新生大鼠随机分为 HPH+VECF-A 组、HPH 组和对照组,各组根据观察时间点随机分为3、 7、10、14d亚组,每个亚组均为8只大鼠。给 予各组新生大鼠腹腔内注射100 mg/kg 氯胺酮和 10 mg/kg 甲苯噻嗪麻醉后,经上门齿悬挂固定, LED 冷光源照射颈部,向左侧外上方拉出舌体, 充分暴露声门,气管导管插入声门并固定,插入 深度约为上门齿与喉部的体表距离;将携带/不携 带*VEGF-A* 基因的 2×10<sup>8</sup> PFU 腺病毒原液稀释至 0.025 mL,分别注入 HPH+VEGF-A 组和 HPH 组新 生大鼠气管内,对照组气管内注射等量的 0.9%NaCl 溶液;随后大鼠取仰卧位,连接小动物呼吸机, 呼吸频率 90~100 次/min,潮气量 4~6 mL/kg; 清醒后拔除气管导管、撤离呼吸机,24 h 后建立 HPH 模型。

#### 1.3 新生大鼠 HPH 模型建立

HPH+VEGF-A 组和 HPH 组新生大鼠按照成年 大鼠<sup>[10-11]</sup>及本课题组前期造模方法<sup>[12-13]</sup>建立 HPH 模型。新生大鼠连同母鼠放入常压低氧舱,舱内 输入氮气和氧气,维持氧浓度(10.0±0.5)%,温 度 22~25℃,湿度 60%~70%,每天缺氧 8 h,昼夜 比 12:12。对照组不给予缺氧干预,饲养条件如上。 新生大鼠因缺氧不耐受、气管插管及合并肺部感 染等原因,共死亡 14 只,实验过程中已补充新生 大鼠以满足样本量要求。

#### 1.4 检测新生大鼠平均右心室收缩压

通过直接测压法测定新生大鼠平均右心室收 缩压(right ventricular systolic pressure, RVSP)代表 平均肺动脉压力<sup>[11,14]</sup>。新生大鼠常规麻醉,取仰卧 位并固定,行气管切开、插管,连接小动物呼吸机, 打开胸腔,暴露心脏,4.5号头皮针远端连接压力 感受器及 BL-420S 生物机能实验系统,针头刺入 右心室心尖部,记录平均 RVSP。

# 1.5 检测携带 VEGF-A 的腺病毒载体在新生大鼠 肺组织中的转染情况

HPH+VEGF-A组的不同时间亚组及对照组 3d的新生大鼠测量平均RVSP后处死,留取右肺 中叶组织,常规制作冰冻切片,在激光共聚焦荧 光显微镜下观察腺病毒标记的增强型绿色荧光蛋 白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)表达 情况, Image-Pro Plus软件分析积分光密度(IOD) 与面积(Area)的比值(IOD/Area),代表EGFP 的荧光强度,用以评价腺病毒在肺组织中的定位 效果。

### 1.6 光学显微镜下观察肺血管形态并检测肺血管 重塑指标

各组新生大鼠测量平均 RVSP 后留取左肺组 织标本,常规制作石蜡切片,苏木精 – 伊红(HE) 染色,在光学显微镜下观察肺小动脉形态,利用 Image-Pro Plus 软件计算肺血管重塑指标:肺小动 脉中层血管壁厚度(MT)占肺小动脉外径(ED) 的百分比(MT%)和肺小动脉中层横截面积(MA) 占总横截面积(TAA)的百分比(MA%)。

# 1.7 免疫组化法检测肺组织中 VEGF-A 和 SVV 的表达水平

石蜡切片经过脱蜡、脱水、修复、冷却、冲洗后, 5% 羊血清室温封闭 30 min, 一抗孵育(VEGF-A 单克隆抗体,稀释度 1:1000; SVV 单克隆抗体, 稀释度 1:300),4℃过夜,二抗室温孵育 1 h,在 光学显微镜下观察并采集图像,肺血管内皮处棕 黄色颗粒为目的蛋白的阳性表达, Image-Pro Plus 软件检测平均光密度值(IOD/Area)代表目的蛋白 的表达水平。

#### 1.8 统计学分析

应用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行统计学 分析,符合正态分布的计量资料用均数 ± 标准差 (*x*±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 LSD-*t* 检验。*P*<0.05 为差异有 统计学意义。

#### 2 结果

#### 2.1 不同时间点各组新生大鼠平均 RVSP 比较

缺氧 3、7、10、14 d 时, HPH 组平均 RVSP 明显高于同日龄对照组和 HPH+VEGF-A 组 (*P*<0.05),表示成功建立了新生大鼠 HPH 模型; 缺氧 3 d 时, HPH+VEGF-A 组与对照组相比,差 异无统计学意义(*P*>0.05);缺氧 7、10、14 d 时, HPH+VEGF-A 组平均 RVSP 高于对照组(*P*<0.05)。 见表 1。

组别	п	3 d	7 d	10 d	14 d
对照组	8	$17.5 \pm 0.5$	$18.3 \pm 1.2$	$19.7 \pm 0.7$	$21.8 \pm 1.4$
HPH 组	8	$22.1 \pm 1.4^{a}$	$23.1 \pm 0.9^{\circ}$	$24.2 \pm 1.2^{a}$	$27.2 \pm 1.1^{a}$
HPH+VEGF-A 组	8	$19.6 \pm 1.0^{\rm b}$	$20.2\pm0.7^{\rm a,b}$	$21.7\pm0.8^{\rm a,b}$	$24.3 \pm 1.0^{\rm a,b}$
F 值		25.41	17.73	33.22	25.22
P 值		< 0.01	< 0.01	<0.01	<0.01

表 1 各组新生大鼠平均 RVSP 比较  $(\bar{x} \pm s, \text{ mm Hg})$ 

注: [RVSP] 右心室收缩压。a 示与对照组比较, P<0.05; b 示与 HPH 组比较, P<0.05。

# 2.2 携带 VEGF-A 的腺病毒载体转染新生大鼠肺 组织的定位效果

在缺氧 3、7、10 d 时, HPH+VEGF-A 组新生 大鼠肺组织可观察到 EGFP 的绿色荧光,随着观察 时间延长荧光强度逐渐衰减,缺氧 14 d 时仅可见 微弱的绿色荧光;对照组3d时肺组织中几乎看不 到绿色荧光(图1)。对照组3d及HPH+VEGF-A 组各时间点 EGFP 绿色荧光强度比较结果与上述情 况一致,见表2。



**图 1 携带 VEGF-A 的腺病毒载体在新生大鼠肺组织的定位效果**(激光共聚焦荧光显微镜, ×200) 对照组 3 d 时肺组织中几乎看不到绿色荧光; HPH+VECF-A 组在缺氧 3 d 时可见明显的绿色荧光,随着缺氧时间延长,肺组织内荧光 强度逐渐减弱,于缺氧 14 d 时绿色荧光不明显。

#### 表 2 各组新生大鼠肺组织荧光强度比较 (x±s)

组别	п	IOD/Area
对照组 3 d	8	$0.005 \pm 0.002$
HPH+ VEGF-A 组		
3 d	8	$0.057 \pm 0.014^{a}$
7 d	8	$0.047 \pm 0.006^{a}$
10 d	8	$0.040 \pm 0.005^{\mathrm{a,b}}$
14 d	8	$0.019 \pm 0.008^{\rm b,c,d}$
F 值		19.129
P 值		< 0.001

注: a示与对照组3d时比较, P<0.05; b示与HPH+VEGF-A 组3d时比较, P<0.05; c示与HPH+VEGF-A组7d时比较, P<0.05; d示与HPH+VEGF-A组10d时比较, P<0.05。

#### 2.3 不同观察时间点各组肺血管形态学变化

对照组肺小动脉管壁较薄,厚度均匀,内 皮细胞排列清晰,中层平滑肌未见明显增厚; HPH组从缺氧7d可见肺小动脉管壁增厚,局部 中层平滑肌增厚,随缺氧时间延长有加重趋势; HPH+VEGF-A组从缺氧10d可见肺小动脉管壁厚 度不均匀增加,并随缺氧时间延长有加重趋势。 见图2。

### 2.4 不同时间点各组肺血管重塑指标 MT% 和 MA% 的变化

缺氧3d时,各组 MT% 和 MA% 比较,差异均无统计学意义(P>0.05);缺氧7d时,HPH 组 MT% 和 MA% 高于对照组和 HPH+VEGF-A 组(P<0.05),HPH+VEGF-A 组与对照组比较差异无统计学意义(P>0.05);缺氧 10d和 14d时,

HPH 组及 HPH+VEGF-A 组 MT% 和 MA% 均高于 对照组(P<0.05),该两组间比较差异无统计学意 义(P>0.05)。见表 3~4。

# 2.5 不同观察时间点各组肺组织 VEGF-A 及 SVV 表达的变化

免疫组化结果显示,对照组 VEGF-A 在肺血 管内皮部位棕色阳性表达少,缺氧各时间点 HPH 组和 HPH+VEGF-A 组 VEGF-A 阳性表达较对照 组增加,VEGF-A 蛋白表达量均明显高于对照组 (*P*<0.05);缺氧3d和7d,HPH+VEGF-A 组肺 血管内皮部位 VEGF-A 阳性表达强于 HPH 组, VEGF-A 蛋白表达量同样高于 HPH 组(*P*<0.05); 缺氧10d和14d,HPH 组与 HPH+VEGF-A 组之 间 VEGF-A 水平比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。 见图 3 和表 5。

缺氧 3 d、7 d 和 10 d, HPH 组和对照组 SVV 在肺血管内皮部位棕色阳性表达差异不明显, SVV 蛋白表达量比较差异无统计学意义(P>0.05); 缺氧 14 d, HPH 组 SVV 阳性表达强于对照组,其 蛋白表达量也高于对照组(P<0.05)。缺氧各时 间点 HPH+VEGF-A 组 SVV 在肺血管内皮部位阳性 表达较对照组增加,其蛋白定量结果也高于对照 组(P<0.05);缺氧 3 d 和 7 d, HPH+VEGF-A 组 SVV 阳性表达强于 HPH 组,其蛋白定量结果同样 高于 HPH 组(P<0.05);缺氧 10 d 和 14 d, HPH 组与 HPH+VEGF-A 组之间 SVV 表达水平比较差异 无统计学意义(P>0.05)。见图 4 和表 6。



**图 2 各组新生大鼠肺血管病理变化**(苏木精-伊红染色,×200) 对照组新生大鼠肺小动脉管壁薄、厚度均匀; HPH组和HPH+VEGF-A组新生大鼠分别从缺氧7d、10d开始可见肺小动脉管壁不均匀增厚,随缺氧时间延长管壁增厚更明显。 箭头指示部位为肺小动脉。

表 3 各组新生大鼠 MT% 比较  $(\bar{x} \pm s, \%)$ 

组别	п	3 d	7 d	10 d	14 d
对照组	8	$44 \pm 8$	$47 \pm 6$	$49 \pm 6$	$52 \pm 5$
HPH 组	8	$45 \pm 8$	$58 \pm 7^{a}$	$63 \pm 5^{a}$	$67 \pm 6^{a}$
HPH+VEGF-A 组	8	$45 \pm 6$	$49 \pm 7^{\mathrm{b}}$	$56 \pm 5^{a}$	$62 \pm 6^{a}$
F 值		0.06	5.67	12.81	13.80
P 值		0.94	0.01	< 0.01	< 0.01

注: [MT%] 肺小动脉中层血管壁厚度占肺小动脉外径百分比。 a 示与对照组比较, P<0.05; b 示与 HPH 组比较, P<0.05。

表 4 各组新生大鼠 MA% 比较  $(\bar{x} \pm s, \%)$ 

组别	п	3 d	7 d	10 d	14 d
对照组	8	$55 \pm 5$	$55 \pm 5$	$59 \pm 4$	$60 \pm 7$
HPH 组	8	$56 \pm 7$	$64 \pm 5^{a}$	$69 \pm 5^{a}$	$71 \pm 5^{a}$
HPH+VEGF-A 组	8	$53 \pm 7$	$58 \pm 4^{\mathrm{b}}$	$66 \pm 5^{a}$	$70 \pm 5^{a}$
F 值		0.43	7.32	10.65	8.69
P 值		0.66	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注: [MA%] 肺小动脉中层横截面积占总横截面积百分比。 a示与对照组比较, P<0.05; b示与 HPH 组比较, P<0.05。



图3 各组新生大鼠肺组织中 VEGF-A 蛋白表达(免疫组化,×200) 对照组 VEGF-A 在肺血管内皮部位阳 性表达少,缺氧各时间点 HPH 组和 HPH+VEGF-A 组 VEGF-A 在肺血管内皮部位阳性表达较对照组增加;缺氧3d和7d, HPH+VEGF-A 组肺血管内皮部位 VEGF-A 阳性表达强于 HPH 组,缺氧10d和14d, HPH 组与 HPH+VEGF-A 组之间 VEGF-A 阳性表达差异不明显。箭头所指为肺血管内皮部位 VEGF-A 阳性表达呈棕色。

#### 表 5 各组新生大鼠肺组织中 VEGF-A 表达比较 $(\bar{x} \pm s, \text{ IOD/Area})$

组别	п	3 d	7 d	10 d	14 d
对照组	8	$0.086 \pm 0.015$	$0.122 \pm 0.003$	$0.154 \pm 0.003$	$0.134 \pm 0.025$
HPH 组	8	$0.130 \pm 0.001^{a}$	$0.159 \pm 0.031^{a}$	$0.174 \pm 0.005^{\circ}$	$0.180 \pm 0.020^{a}$
HPH+VEGF-A 组	8	$0.193 \pm 0.016^{\mathrm{a,b}}$	$0.195 \pm 0.022^{\mathrm{a,b}}$	$0.181 \pm 0.001^{a}$	$0.181 \pm 0.007^{a}$
F 值		53.630	11.113	55.538	17.938
<i>P</i> 值		< 0.001	0.001	< 0.001	0.001

注: [VEGF-A] 血管内皮生长因子 A。a 示与对照组比较, P<0.05; b 示与 HPH 组比较, P<0.05。



图 4 各组新生大鼠肺组织中 SVV 蛋白表达(免疫组化,×200) 缺氧 14 d, HPH 组新生大鼠肺血管内皮部位 SVV 表达较对照组增加;缺氧 3 d、 7 d和 10 d,对照组与 HPH 组 SVV 阳性表达无明显差异。缺氧各时间点,HPH+VEGF-A 组 SVV 阳性表达多于对照组;缺氧 3 d和 7 d, HPH+VEGF-A 组 SVV 阳性表达较 HPH 组增加;缺氧 10 d和 14 d HPH 组和 HPH+VECF-A 组 SVV 阳性表达差异不明显。箭头所指为肺血管内皮部位 SVV 阳性表达呈棕色。

				, ,	
组别	п	3 d	7 d	10 d	14 d
对照组	8	$0.161 \pm 0.027$	$0.148 \pm 0.052$	$0.141 \pm 0.052$	$0.151 \pm 0.025$
HPH 组	8	$0.156 \pm 0.029$	$0.160 \pm 0.042$	$0.185 \pm 0.031$	$0.210 \pm 0.034^{a}$
HPH+VEGF-A 组	8	$0.304 \pm 0.050^{\mathrm{a,b}}$	$0.278 \pm 0.045^{\rm a,b}$	$0.233 \pm 0.035^{a}$	$0.229 \pm 0.031^{a}$
F 值		26.000	15.700	6.458	8.992
<i>P</i> 值		<0.001	< 0.001	0.013	0.004

#### 表 6 各组新生大鼠肺组织中 SVV 表达比较 $(\bar{x} \pm s, \text{ IOD/Area})$

注: [SVV] 生存素。a 示与对照组比较, P<0.05; b 示与 HPH 组比较, P<0.05。

### 3 讨论

新生儿 HPH 在新生儿期并不少见,随着一 氧化氮吸入等技术的应用,提高了该病在肺血管 痉挛期的救治成功率,然而在肺血管重塑期,迄 今仍无有效的治疗方法<sup>[3]</sup>。成人 HPH 研究发现 VEGF-A 通过保护肺血管内皮功能抑制了 HPH 肺 血管重塑<sup>[6,15]</sup>,另有研究表明 VEGF-A 通过调控 SVV 表达对血管内皮细胞起到了保护效果<sup>[16]</sup>。本 研究通过气管内转染携带 *VEGF-A* 的腺病毒载体 提高了 HPH 新生大鼠肺组织中 VEGF-A 的表达, 上调了肺组织中 SVV 的水平,降低了肺血管重塑, 在该病发病机制中发挥了保护性作用。

本研究发现, HPH 新生大鼠肺组织中

VEGF-A 水平高于对照组,且随着缺氧时间延长 呈上升趋势,说明 VEGF-A 在新生大鼠 HPH 发 病机制中可能发挥了重要作用。进一步通过气 管内转染携带 VEGF-A 的腺病毒载体,发现标 记 EGFP 的腺病毒载体能够定位到肺组织,并随 时间延长绿色荧光逐渐变弱,提示腺病毒量逐渐 衰减。另外免疫组化结果显示,缺氧 3 d、7 d, HPH+VEGF-A 组 VEGF-A 表达高于 HPH 组,表明 外源性 VEGF-A 转染成功。但在缺氧 10 d、14 d, HPH+VEGF-A 组 VEGF-A 表达与 HPH 组比较差异 无统计学意义,提示随着肺组织内腺病毒的衰减, 外源性 VEGF-A 也呈降低趋势。

VEGF 是血管内皮细胞的专用肽丝裂原,其家 族成员 VEGF-A 是调节血管功能的最关键因子[17-18]。 VEGF-A 能够与血管内皮细胞上的酪氨酸蛋白激酶 受体结合,发挥促进细胞存活、新生血管形成、 血管扩张等功能。成人 HPH 研究发现 VEGF-A 可 能通过保护肺血管内皮细胞阻碍了 HPH 疾病进 程<sup>[15]</sup>, 而应用 VEGF-A 受体阻断剂 SU5416 联合 慢性缺氧可能造成内皮细胞存活信号丧失、凋亡 增加, 随之抗凋亡细胞异常增加, 血管闭塞, 引 发严重的肺血管重塑<sup>[19]</sup>。本研究发现在缺氧各时 间点, HPH+VEGF-A 组平均 RVSP 低于 HPH 组, 而自缺氧7d开始高于对照组。由于机体在无右 心阻塞性疾病情况下,平均 RVSP 反映了平均肺 动脉压力水平,因而该结果表明肺组织中 VEGF-A 高表达能够降低 HPH 新生大鼠肺动脉压力。由 于随着缺氧时间延长外源性 VEGF-A 有衰减趋 势, 故 HPH+VEGF-A 组平均 RVSP 高于对照组, 因此有必要进一步探讨 VEGF-A 的治疗策略,使 肺动脉压力接近正常水平。本研究也发现,虽然 缺氧10d、14d, HPH+VEGF-A组VEGF-A水平 与 HPH 组比较差异不明显, 但平均 RVSP 仍低于 HPH 组, 推测其原因可能为: 在缺氧早期, 肺组 织中过表达的 VEGF-A 通过抑制肺血管内皮细胞 凋亡、扩张肺血管等作用抑制了肺血管痉挛,降 低了肺动脉压力,后期虽然 VEGF-A 有衰减,但 仍通过早期对肺血管的保护作用降低了肺动脉压 力。此外,在肺血管重塑方面,缺氧7d,HPH组 新生大鼠出现了肺血管重塑,且随着缺氧时间延 长,肺血管重塑逐渐加重,而HPH+VEGF-A组在 缺氧10d发生肺血管重塑,且程度低于HPH组,

进一步说明肺组织过表达 VEGF-A 可能通过在缺 氧早期保护肺血管内皮细胞功能,延缓了肺血管 重塑,也因此进一步降低了肺动脉压力。

SVV 是凋亡抑制蛋白家族最小的成员,在成 年人正常分化的细胞中几乎不表达, 但在生长发 育或增殖的细胞(如胚胎、肿瘤细胞等)中广泛 表达<sup>[20]</sup>。由于新生大鼠处于生长发育期,因此本 研究发现 SVV 在对照组新生大鼠肺组织中有一定 表达。SVV 存在于细胞质、细胞核和线粒体中, 在线粒体内 / 外途径通过抑制 Caspase3、7 和 9 而 阻断细胞凋亡,另外 SVV 作为染色体乘客复合物 家族的一部分,在有丝分裂过程中起着调节染色 单体分离、微管稳定性的作用<sup>[21]</sup>。有研究发现, VEGF-A 诱导 SVV 表达通过抑制肿瘤细胞凋亡及 稳定微管网络而降低了化疗药物的作用,促进了 肿瘤细胞存活和增殖<sup>[22]</sup>。而 VEGF-A 缺失则通过 下调 SVV 促进凋亡因子 Caspase3、Bax 等释放, 增加了化疗药物的促凋亡作用<sup>[16]</sup>。本研究在缺氧 3d、7d时, HPH+VEGF-A组SVV 表达高于对照 组和 HPH 组,缺氧 10 d 和 14 d 仅高于对照组, 说明 HPH 新生大鼠肺组织中 VEGF-A 过表达促进 了 SVV 表达升高, 而随着 VEGF-A 降低, SVV 也 呈下降趋势。结合上述 VEGF-A 过表达降低了肺 血管重塑、肺动脉压力, 推测在缺氧早期 VEGF-A 上调 SVV 可能发挥了抑制血管细胞凋亡、促进其 存活、维持血管内皮完整性的作用,从而延缓了 肺血管重塑,降低了肺动脉压力。但随着外源性 VEGF-A 逐渐衰减, SVV 也呈降低趋势, 肺血管 稳态破坏,于缺氧10d肺血管重塑发生,而此时 SVV 表达仍高于正常大鼠,提示在肺血管重塑期 SVV 可能发挥了促血管细胞增殖的作用。此外, 本研究也发现缺氧3d、7d时, HPH组SVV表 达与对照组无明显差异,缺氧10d其表达呈升高 趋势,缺氧14d明显高于对照组,说明缺氧诱导 SVV 升高落后于 VEGF-A,可能原因为正常新生大 鼠处于生长发育阶段, SVV 表达升高, 但缺氧影 响了新生大鼠的生长发育,可能干扰了 SVV 的表 达,因此在缺氧早期,即使 VEGF-A 表达升高, 也并未诱导SVV上升;而进展至肺血管重塑阶段, 血管细胞异常增殖, SVV 表达也随之上升。上述 VEGF-A 调控 SVV 对肺血管重塑的影响仍需从细 胞水平进一步探讨该途径对肺血管细胞尤其是内

#### 皮细胞凋亡及增殖的作用。

总之,缺氧早期 HPH 新生大鼠肺组织内过表达 VEGF-A 促进了 SVV 的表达,延缓了肺血管重塑进程,降低了肺动脉压力,在新生大鼠 HPH 发病过程中发挥了重要的保护作用,为新生儿 HPH 肺血管重塑的靶向干预提供了参考依据。

#### [参考文献]

- [1] Humbert M, Guignabert C, Bonnet S, et al. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives[J]. Eur Respir J, 2019, 53(1): 1801887.
- [2] Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, et al. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management[J]. BMJ, 2018, 360: j5492.
- [3] Distefano G, Sciacca P. Molecular physiopathogenetic mechanisms and development of new potential therapeutic strategies in persistent pulmonary hypertension of the newborn[J]. Ital J Pediatr, 2015, 41: 6.
- [4] Sakao S, Taraseviciene-Stewart L, Wood K, et al. Apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells stimulates vascular smooth muscle cell growth[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 291(3): L362-L368.
- [5] Rhodes CJ, Im H, Cao A, et al. RNA sequencing analysis detection of a novel pathway of endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2015, 192(3): 356-366.
- [6] Jiang X, Li T, Sun J, et al. SETD3 negatively regulates VEGF expression during hypoxic pulmonary hypertension in rats[J]. Hypertens Res, 2018, 41(9): 691-698.
- [7] Star GP, Giovinazzo M, Lamoureux E, et al. Effects of vascular endothelial growth factor on endothelin-1 production by human lung microvascular endothelial cells in vitro[J]. Life Sci, 2014, 118(2): 191-194.
- [8] Rafatmanesh A, Behjati M, Mobasseri N, et al. The survivin molecule as a double-edged sword in cellular physiologic and pathologic conditions and its role as a potential biomarker and therapeutic target in cancer[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(2): 725-744.
- [9] Meng L, Zhu F, Zhou X, et al. Survivin is critically involved in VEGFR2 signaling-mediated esophageal cancer cell survival[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 107: 139-145.

- [10] Yu L, Tu Y, Jia X, et al. Resveratrol protects against pulmonary arterial hypertension in rats via activation of silent information regulator 1[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(1): 55-67.
- [11] Chen M, Ding Z, Zhang F, et al. A20 attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension by inhibiting NF-κB activation and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation[J]. Exp Cell Res, 2020, 390(2): 111982.
- [12] 刘坤珍,王乐,李明霞.热休克蛋白70对缺氧性肺动脉高 压新生大鼠肺血管重塑的作用研究[J].中国当代儿科杂志, 2016,18(2):152-158.
- [13] 王乐,吴海燕,李明霞.热休克蛋白70对新生大鼠缺氧性肺动脉高压的保护作用[J].中国当代儿科杂志,2017,19(1):88-94.
- [14] Cao YY, Ba HX, Li Y, et al. Regulatory effects of Prohibitin 1 on proliferation and apoptosis of pulmonary arterial smooth muscle cells in monocrotaline-induced PAH rats[J]. Life Sci, 2020, 250: 117548.
- [15] Ciuclan L, Bonneau O, Hussey M, et al. A novel murine model of severe pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 184(10): 1171-1182.
- [16] Samuel S, Fan F, Dang LH, et al. Intracrine vascular endothelial growth factor signaling in survival and chemoresistance of human colorectal cancer cells[J]. Oncogene, 2011, 30(10): 1205-1212.
- [17] Bender RJ, Mac Gabhann F. Dysregulation of the vascular endothelial growth factor and semaphorin ligand-receptor families in prostate cancer metastasis[J]. BMC Syst Biol, 2015, 9: 55.
- [18] Park SA, Jeong MS, Ha KT, et al. Structure and function of vascular endothelial growth factor and its receptor system[J]. BMB Rep, 2018, 51(2): 73-78.
- [19] Sakao S, Tatsumi K. The effects of antiangiogenic compound SU5416 in a rat model of pulmonary arterial hypertension[J]. Respiration, 2011, 81(3): 253-261.
- [20] Stobiecka M, Ratajczak K, Jakiela S. Toward early cancer detection: focus on biosensing systems and biosensors for an anti-apoptotic protein survivin and survivin mRNA[J]. Biosens Bioelectron, 2019, 137: 58-71.
- [21] Varughese RK, Torp SH. Survivin and gliomas: a literature review[J]. Oncol Lett, 2016, 12(3): 1679-1686.
- [22] Tran J, Master Z, Yu JL, et al. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(7): 4349-4354.

(本文编辑:万静)