

论著 · 实验研究

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

刘坤珍 王乐 李明霞

(新疆医科大学第一附属医院新生儿科, 新疆 乌鲁木齐 830054)

[摘要] **目的** 探讨热休克蛋白 70 (HSP70) 对缺氧性肺动脉高压 (HPH) 新生大鼠肺动脉压力及肺血管重塑的作用。**方法** 将 128 只 Wistar 新生大鼠按随机数字表法分为 HPH 模型组和空白对照组, 根据转染液不同将 HPH 组再分为盐水组、空病毒组(标有绿色荧光信号但未携带目的基因的病毒载体)和病毒+HSP70 组(标有绿色荧光信号同时携带目的基因的病毒载体)。以吸入 8% 氧浓度的氮氧混合气 (1.5 L/min) 建立 HPH 模型, 并分别于缺氧 3、7、10、14 d 检测各组新生大鼠的肺动脉压力 (mPAP) 及肺血管重塑指标 (MT%、MA%)。**结果** 缺氧 3、7、10 d 时, 盐水组和空病毒组 HSP70 表达较空白对照组增强 ($P<0.01$), 病毒+HSP70 组 HSP70 表达均高于空白对照组、盐水组和空病毒组 ($P<0.01$), 缺氧 14 d 时各组间 HSP70 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。缺氧 3、7、10 d 时, 盐水组和空病毒组新生大鼠 mPAP 持续增高, 且均高于空白对照组 ($P<0.05$), 病毒+HSP70 组新生大鼠 mPAP 与空白对照组比较未见明显增高 ($P>0.05$); 缺氧 14 d 时, 盐水组、空病毒组、病毒+HSP70 组新生大鼠 mPAP 比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 但均明显高于对照组 ($P<0.05$)。缺氧 7 d 后盐水组和空病毒组 MT%、MA% 明显高于空白对照组 ($P<0.05$), 病毒+HSP70 组较对照组差异无统计学意义 ($P>0.05$); 缺氧 14 d 时, 盐水组、空病毒组、病毒+HSP70 组 MT%、MA% 比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 但均明显高于对照组 ($P<0.05$)。**结论** HSP70 可能可以降低 HPH 新生大鼠肺动脉压力, 减轻其肺血管重塑。

[中国当代儿科杂志, 2016, 18 (2): 152-158]

[关键词] 肺动脉高压; 血管重塑; 热休克蛋白 70; 新生大鼠

Effect of heat shock protein 70 on pulmonary vascular remodeling in neonatal rats with hypoxic pulmonary hypertension

LIU Kun-Zhen, WANG Le, 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 investigate the effect of heat shock protein 70 (HSP70) on pulmonary arterial pressure and pulmonary vascular remodeling in neonatal rats with hypoxic pulmonary hypertension (HPH). **Methods** A total of 128 Wistar neonatal rats were randomly divided into HPH model and blank control groups. According to the transfection solution, the HPH model group was further divided into normal saline group, empty virus group (viral vectors marked with a green fluorescent signal and not carrying the target gene), and virus+HSP70 group (viral vectors marked with a green fluorescent signal and carrying the target gene). The HPH model was established by inhalation of nitrogen-oxygen mixture (1.5 L/minutes and 8% oxygen). Pulmonary arterial pressure (mPAP) and the indicators of pulmonary vascular remodeling (MT% and MA%) were measured on days 3, 7, 10, and 14 of hypoxia. **Results** On days 3, 7, and 10 of hypoxia, the normal saline and empty virus groups had significantly enhanced expression of HSP70 compared with the blank control group ($P<0.01$), and the virus+HSP70 group had significantly higher expression of HSP70 than the blank control, normal saline, and empty virus groups ($P<0.01$). On day 14 of hypoxia, the expression of HSP70 showed no significant difference between these groups ($P>0.05$). On days 3, 7, and 10 of hypoxia, the normal saline and empty virus groups showed continuous increases in mPAP compared with the blank control group ($P<0.05$). There was no significant

[收稿日期] 2015-10-18; [接受日期] 2015-12-25

[基金项目] 国家自然科学基金 (81360104)。

[作者简介] 刘坤珍, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 李明霞, 女, 教授。

difference in mPAP between the virus+HSP70 and blank control groups ($P>0.05$). On day 14 of hypoxia, there was no significant difference in mPAP among three subgroups of the HPH model group ($P>0.05$), but the mPAP in the three subgroups was significantly higher than in the blank control group ($P<0.05$). After 7 days of hypoxia, the normal saline and empty virus groups showed significantly higher MT% and MA% than the blank control group ($P<0.05$), but the two indicators showed no significant differences between the virus+HSP70 and the blank control groups ($P>0.05$). On day 14 of hypoxia, there were no significant differences in MT% and MA% among three subgroups of the HPH model group ($P>0.05$), but the MT% and MA% in the three subgroups were higher than in the blank control group ($P<0.05$).

Conclusions HSP70 may reduce pulmonary arterial pressure and pulmonary vascular remodeling in neonatal rats with HPH. [Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(2): 152-158]

Key words: Pulmonary hypertension; Vascular remodeling; HSP70; Neonatal rats

新生儿缺氧性肺动脉高压 (hypoxia induced pulmonary hypertension, HPH) 是临床常见的急危重症, 早期肺血管痉挛, 及时治疗可逆; 晚期肺血管重塑, 临床治疗受限, 救治困难, 病死率高。本课题组以往的研究表明缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 是新生大鼠 HPH 发病机制中的重要因子^[1], 近年有研究表明热休克蛋白 70 (heat shock protein, HSP70) 能够在长期缺氧状态下降低 HIF-1 α 的稳定性, 促进 HIF-1 α 的降解^[2]。然而, 目前国内外关于 HSP70 对 HIF-1 α 降解作用的研究集中在肿瘤等领域^[3-4], 而关于 HSP70 能否在新生儿 HPH 中延缓 HPH 的发生发展, 未见相关报道。本研究在前期研究的基础上, 以 HSP70 基因为目的基因, 借助基因转染技术对 HPH 新生大鼠肺组织进行外源性基因修饰, 以提高肺组织 HSP70 的表达, 观察 HSP70 基因转染后 HPH 新生大鼠肺动脉压力、肺血管结构及重塑指标改变的情况, 以了解 HSP70 是否可降低 HPH 新生大鼠肺动脉压力、减轻其肺血管重塑, 为进一步研究新生儿 HPH 新的治疗方法提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

选取 7~10 日龄健康、清洁 Wistar 新生大鼠 [实验动物许可证号: SCXK (新) 2011-0004] 128 只, 体重 27 ± 3 g, 均由新疆医科大学第一附属医院医学研究中心实验动物研究部提供。氧浓度仪 (CY-100B 型) 由杭州利华科技有限公司提供; 小动物呼吸机 (HX-200 型) 由成都泰盟科技有限公司提供; 光学显微镜 (BX41TF) 由日本奥林巴斯公司提供。Ad-HSP70 (纯化) 及 Ad-GFP (纯化) 由上海汉恒生物科技有限公司提供, 兔抗鼠 HSP70 多克隆抗体由武汉博士德生物工程有限公司提供, 二抗为

山羊抗兔 IgG 抗体 -HRP 多聚体由中杉金桥生物工程有限公司提供。

1.2 病毒转染及分组

将 128 只 Wistar 新生大鼠按随机数字表法分为 HPH 模型组 (简称 HPH 组, $n=96$) 和空白对照组 ($n=32$), 其中, HPH 组根据转染液不同再分为盐水组、空病毒组 (标有绿色荧光信号但未携带目的基因的病毒载体) 和病毒 +HSP70 组 (标有绿色荧光信号同时携带目的基因的病毒载体), 每组 32 只大鼠。病毒 +HSP70 组经大鼠尾静脉注入 $5 \mu\text{L } 5 \times 10^{10}$ PFU/mL AD-HSP70, 空病毒组经大鼠尾静脉注入 $5 \mu\text{L } 5 \times 10^{10}$ PFU/mL AD-GFP, 盐水组经大鼠尾静脉注入 $5 \mu\text{L}$ 生理盐水。

1.3 新生大鼠 HPH 模型的建立

按照本课题组前期建立新生大鼠 HPH 模型的方法^[5], 将 HPH 组新生大鼠转染后连同母鼠置于常压低氧舱内, 以 1.5 L/min 的速度将 8% 氧浓度的氮氧混合气输入低氧舱, 用氧浓度测定仪监测舱内氧浓度, 使其维持在 $10\% \pm 0.5\%$, 舱内放置小风扇, 以保证舱内氧浓度均匀。低氧舱内放置钠石灰和无水氯化钙以吸收二氧化碳与水蒸气。温度传感器检测舱内温度使其恒定在 $22 \sim 24^\circ\text{C}$ 。昼/夜比为 12 h/12 h, 每天缺氧 8 h。空白对照组常规饲养。分别于缺氧 3、7、10、14 d 检测各组新生大鼠的肺动脉压力及肺血管重塑指标, 每个时间点每组处死 8 只新生大鼠。

1.4 腺病毒定位在 HPH 新生大鼠肺组织中的判断

所有入组新生大鼠测定完肺动脉压力后立即处死取其右中叶肺组织 ($3 \sim 5 \text{ mm} \times 3 \sim 5 \text{ mm} \times 10 \sim 15 \text{ mm}$)。为避免破坏肺组织结构, 采集肺组织标本时应注意动作轻巧, 避免挤压、损伤肺组织; 将切取的右中叶肺组织标本投入生理盐水中洗净血液, 然后投入预先配制好的 4% 多聚甲醛液中固定 2 h, 再用 0.1 mmol/L 的 PBS 液体洗 3 次, 每次

5 min; 然后将标本置于 15% 的蔗糖中过夜; 最后至于固定液中放入 -20°C 冰箱备用。将预先准备好的标本做冰冻切片, 注意避光, 并在 20 min 内放于免疫荧光显微镜下观察, 并采集图片。

1.5 免疫组化检测肺组织 HSP70

取大鼠右下叶肺组织, 4% 甲醛溶液固定 24 h, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋后切片常规脱蜡, 抗原热修复。每只大鼠肺组织制作 8 张切片。采用兔抗鼠 HSP70 多克隆抗体及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG, 免疫组化法测定肺组织 HSP70 蛋白表达。每个步骤均严格按照试剂盒说明书操作。3,3'-二氨基联苯二胺盐酸盐 (0.01 mol/L) 显色, 磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照。阳性标记强度计分: 依照细胞阳性着色程度, 无着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分; 每张切片随机观察 5 个高倍镜视野, 依照阳性细胞数量阳性细胞总数为 1%~25% 计 1 分, 阳性细胞总数为 26%~50% 计 2 分, 阳性细胞总数为 51%~75% 计 3 分, 阳性细胞总数 >75% 计 4 分, 着色强度计分与阳性面积率计分之积为最后总分: 0 分 (-), 1~2 分 (+), 3~4 分 (2+), >4 分 (3+)。

1.6 平均肺动脉压力的测定

各组新生大鼠经氯胺酮 (75 mg/kg)、阿托品 (0.375 mg/kg) 和地西洋 (7.5 mg/kg) 混合液腹腔内注射麻醉后, 固定、备皮、消毒气管及胸部皮肤, 行气管插管, 给予机械通气, 小动物呼吸机参数设置为呼吸频率 100~110 次/min、吸呼比 1:1.5、潮气量 5~7 mL/min。监测实验新生大鼠尾部血氧饱和度, 使其维持在 85%~95%。从胸骨右缘行 U 型切口打开胸腔 (右至胸骨右缘约 0.3 cm, 左至胸骨左缘约 0.5 cm, 下至剑突下缘), 充分暴露肺动脉根部, 用 4.5 号针头逆血流方向小心刺入肺动脉根部, 针头的另一端连接记录仪压力传感器, 记录平均肺动脉压 (mean pulmonary arterial pressure, mPAP)。

1.7 肺血管重塑指标的检测

取 Wistar 新生大鼠右上叶肺组织, 4% 多聚甲醛固定 1 周。常规石蜡包埋, 连续切片, 制备好的石蜡切片常规脱蜡脱水, 每只大鼠随机选 3 张肺组织切片行苏木精-伊红 (HE) 染色, 每张切片随机选取与呼吸性细支气管及肺泡管伴行的横断面积较圆、直径为 5~10 μm 的肺小动脉 3 支, 在光镜下观察形态学变化。用病理图像分析软件测定肺小动脉中层壁厚 (MT)、肺小动脉外径 (ED)、管壁中层横截面积 (MA) 和血管总横截面积 (TAA), 根据公式 $\text{MT}\% = \text{MT}/\text{ED} \times 100\%$ 、 $\text{MA}\% = \text{MA}/\text{TAA} \times 100\%$ 计算, 将 MT%、MA% 作为肺血管重塑指标。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 20.0 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采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用 One-Way ANOVA 分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验; 不满足正态分布的计量资料采用中位数 (四分位间距) [P_{50} (P_{25} , P_{75})] 表示, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验, 组间两两比较采用 Nemenyi 检验; 等级资料采用例数表示, 多组间比较采用秩转换后的 Kruskal-Wallis *H* 检验, 组间两两比较采用 Nemenyi 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 腺病毒在 HPH 新生大鼠肺组织中的定位

取空病毒组及空白对照组肺组织冰冻切片于免疫荧光显微镜下观察, 发现缺氧 3、7、10 d 时空病毒组肺组织均可见免疫荧光; 缺氧 14 d 时未见明显免疫荧光 (图 1)。表明经尾静脉途径注射的腺病毒成功定位于新生大鼠肺组织, 随着缺氧时间延长, 腺病毒在肺组织内逐渐衰减。

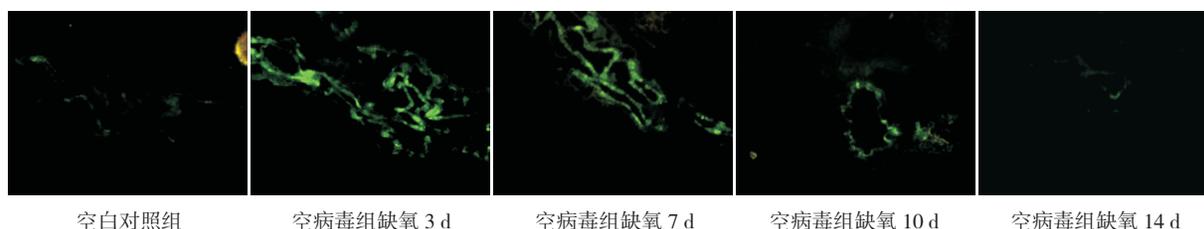


图 1 免疫荧光法观察空病毒组肺组织中腺病毒定位 (GFP, $\times 200$) 空病毒组肺组织在缺氧 3 d 时可明显见绿色荧光, 随着时间延长, 空病毒组绿色荧光逐渐减退, 至缺氧 14 d 时绿色荧光消失。

2.2 免疫组化检测肺组织 HSP70 的表达及反应强度

缺氧 3、7、10 d 盐水组、空病毒组、病毒 + HSP70 组肺组织 HSP70 表达均强于空白对照组 ($P < 0.01$)，其中病毒 + HSP70 组 HSP70 表达强

于与盐水组和空病毒组 ($P < 0.01$)，但在盐水组和空病毒组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；缺氧 14 d 时各组间 HSP70 表达强度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2，表 1。

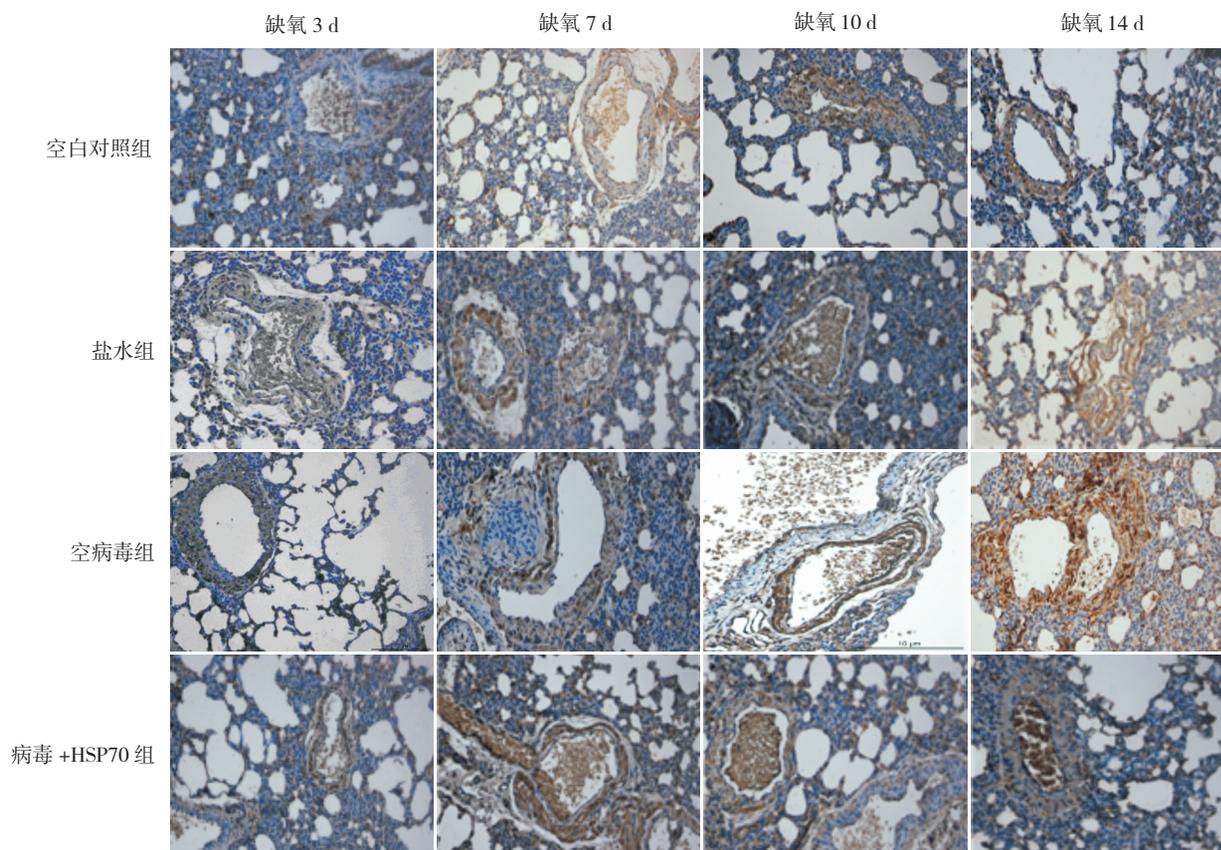


图 2 新生大鼠肺组织中 HSP70 表达 (DAB 显色, $\times 200$) 缺氧 3、7、10 d 病毒 + HSP70 组 HSP70 表达强于其余 3 组, 随着缺氧时间延长, HSP70 逐渐衰减, 至缺氧 14 d 时, 4 组间 HSP70 表达无明显差异。HSP70 阳性表达呈棕黄色。

表 1 4 组新生大鼠 HSP70 免疫组化反应强度比较 (鼠数)

分组	n	3 d				7 d				10 d				14 d			
		-	+	2+	3+	-	+	2+	3+	-	+	2+	3+	-	+	2+	3+
空白对照组	8	8	0	0	0	7	1	0	0	6	1	1	0	5	1	1	1
盐水组	8	1	2	3	2	0	2	2	4	0	1	2	5	4	1	2	1
空病毒组	8	2	1	2	3	0	1	3	4	0	0	4	4	4	2	2	0
病毒 + HSP70 组	8	0	0	1	7	0	0	1	7	0	0	2	6	4	2	1	1
H 值		15.242				8.664				3.318				0.674			
P 值		<0.01				<0.01				<0.05				>0.05			

2.3 各组新生大鼠 mPAP 变化

盐水组及空病毒组缺氧 3、7、10、14 d 时的 mPAP 水平比同日龄空白对照组均显著增高 ($P < 0.05$)。病毒 + HSP70 组缺氧 3、7、10 d 时的

mPAP 水平与同日龄空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；与同日龄盐水组及空病毒组比较显著降低 ($P < 0.05$)。病毒 + HSP70 组缺氧 14 d 时 mPAP 水平与同日龄盐水组及空病毒组比较差异无

统计学意义 ($P > 0.05$), 但高于空白对照组 ($P < 0.05$)。 见表 2。

表 2 4 组新生大鼠 mPAP 比较 [P_{50} (P_{25}, P_{75})]

分组	<i>n</i>	3 d	7 d	10 d	14 d
空白对照组	8	9.5(8.0,12.8)	10.5(10.0,11.0)	13.0(13.0,14.0)	15.5(14.3,17.5)
盐水组	8	12.0(11.3, 13.8) ^a	15.0(14.0, 16.0) ^a	18.0 (17.3, 19.0) ^a	20.0(18.3, 23.5) ^a
空病毒组	8	13.5(13.0,15.0) ^a	15.5(15.0,16.8) ^a	18.0(18.0,19.0) ^a	22.0(18.5,22.8) ^a
病毒 +HSP70 组	8	8.5(8.0,12.0) ^{b,c}	10.5(10.0,11.0) ^{b,c}	13.0(13.0,14.0) ^{b,c}	20.0(18.3,23.5) ^a
<i>H</i> 值		20.83	24.22	23.75	14.21
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	0.003

注: a 示与空白对照组比较, $P < 0.05$; b 示与盐水组比较, $P < 0.05$; c 示与空病毒组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 光学显微镜观察各组肺组织形态

空白对照组新生大鼠肺小动脉管壁薄; 盐水组和空病毒组新生大鼠缺氧 3 d 时肺小动脉管壁均明显增厚, 缺氧 7 d 时, 呼吸性细支气管水平肺小动脉平滑肌层增厚, 管壁增厚, 官腔缩小, 缺氧 10 d 及 14 d 时可见肺小动脉中层平滑肌增生, 管

壁增厚, 官腔更加狭小; 病毒 +HSP70 组在缺氧 3、7、10 d 时肺小动脉中层平滑肌未见明显增生, 管壁增厚不明显, 官腔狭小不显著, 在缺氧 14 d 时肺小动脉中层平滑肌增生, 管壁增厚, 官腔狭小, 提示病毒 +HSP70 组肺血管结构改变较盐水组和空病毒组延迟并且程度较轻。见图 3。

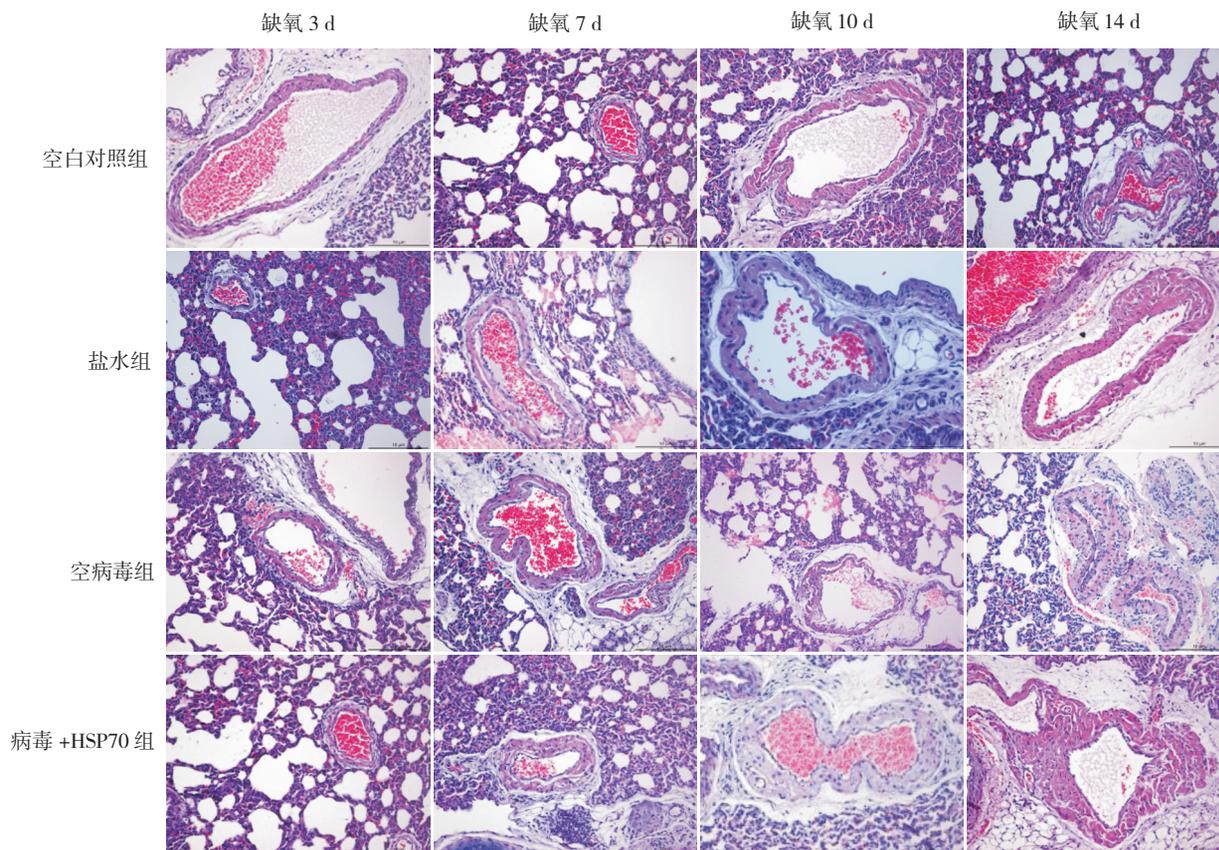


图 3 缺氧后新生大鼠肺组织形态学 (苏木素 - 伊红染色, $\times 200$) 空白对照组新生大鼠肺小动脉管壁薄。盐水组和空病毒组随着缺氧时间延长, 肺小动脉管腔逐渐缩小, 管壁增厚。病毒 +HSP70 组在缺氧 3、7、10 d 时肺小动脉管腔无明显缩小, 管壁增厚不显著; 在缺氧 14 d 时肺小动脉管壁增厚, 官腔狭小。

2.5 肺动脉血管重塑指标比较

盐水组和空病毒组在缺氧 3 d 时 MT% 和 MA% 与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)；缺氧 7、10、14 d 时 MT% 和 MA% 较空白对照组明显增高 ($P<0.05$)；但此两组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)，提示此盐水组和空病毒组缺氧 7 d 时开始出现肺血管重塑。病毒+HSP70 组在缺氧 3、7、10 d 时 MT% 和 MA% 与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)；在缺氧 7、10 d 时 MT% 和 MA% 低于盐水组和空病毒组 ($P<0.05$)；缺氧 14 d 时与盐水组和空病毒组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)，但高于空白对照组 ($P<0.05$)。提示病毒+HSP70 组肺血管重塑在缺氧 14 d 时出现，较盐水组和空病毒组晚。见表 3~4。

表 3 4 组新生大鼠 MA% 变化 ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	n	缺氧 3 d	缺氧 7 d	缺氧 10 d	缺氧 14 d
空白对照组	8	56±5	56±5	59±4	61±7
盐水组	8	55±7	64±5 ^a	69±6 ^a	70±5 ^a
空病毒组	8	55±7	64±5 ^a	68±4 ^a	70±7 ^a
病毒+HSP70 组	8	55±6	56±8 ^{b,c}	58±7 ^{b,c}	62±5 ^a
F 值		0.30	5.241	9.783	4.764
P 值		>0.05	<0.05	<0.01	<0.01

注：a 示与空白对照组相比， $P<0.01$ ；b 示与盐水组相比， $P<0.05$ ；c 示与空病毒组相比， $P<0.05$ 。

表 4 4 组新生大鼠 MT% 变化 ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	n	缺氧 3 d	缺氧 7 d	缺氧 10 d	缺氧 14 d
空白对照组	8	44±6	48±5	49±7	51±8
盐水组	8	42±8	55±6 ^a	58±5 ^a	64±6 ^a
空病毒组	8	43±7	57±7 ^a	60±7 ^a	66±6 ^a
病毒+HSP70 组	8	44±4	47±5 ^{b,c}	49±8 ^{b,c}	62±7 ^a
F 值		0.30	5.241	9.783	4.764
P 值		>0.05	<0.05	<0.01	<0.01

注：a 示与空白对照组相比， $P<0.01$ ；b 示与盐水组相比， $P<0.05$ ；c 示与空病毒组相比， $P<0.05$ 。

3 讨论

新生儿 HPH，救治困难，病死率高，其发病机制有待进一步研究。本课题组前期研究发现，HIF-1 α 在新生儿 HPH 的发病机制中发挥了关键作用^[5]，通过促进下游靶基因的表达^[6]，使肺血管内

皮损伤，肺血管痉挛及重塑，参与肺动脉高压的形成^[7]。HSP 又称为应激蛋白或热应激蛋白，具有高度保守性，它普遍存在于整个生物界，几乎所有的细胞均能合成 HSP。HSP70 在正常情况下表达量很少，而在缺氧等应激刺激状态下表达明显升高，并且在细胞浆和细胞核内均有表达^[8-9]。主要参与细胞内蛋白质的合成、运输、折叠和蛋白质的降解调控过程，可提高细胞对应激原的耐受性，使细胞维持正常的生理功能^[10]。近年又有研究表明 HSP70 能够在长期缺氧状态下降低 HIF-1 α 的稳定性，促进 HIF-1 α 的降解^[2]，从而降低肺动脉压力，减轻肺血管重塑。相关研究局限于成人肿瘤等领域，在新生儿 HPH 是否有同样作用国内外未见相关报道。

本研究中，盐水组及空病毒组缺氧新生大鼠在缺氧 3、7、10、14 d 时 mPAP 均高于空白对照组，提示肺动脉高压形成，造模成功。另外，经大鼠尾静脉途径注射 Ad-HSP70 对 HPH 新生大鼠肺组织进行外源性基因修饰，病毒+HSP70 组 HSP70 表达较其余 3 组明显增多，表明可以利用重组腺病毒介导外源性 HSP70 基因转染至 HPH 新生大鼠肺组织中，转染成功，提高了肺组织中 HSP70 的表达，为本课题的研究提供了保证。

HPH 的形成主要与低氧性肺血管收缩和肺血管重塑有关。目前认为肺血管重塑是肺动脉高压持续发展的关键因素，决定着肺动脉高压的持续存在与发展。本课题组前期研究发现，Wistar 大鼠乳鼠在缺氧 3~5 d 时为肺血管痉挛阶段，此过程为可逆性改变，若缺氧及时纠正，可以避免肺血管重塑；而缺氧 7 d 以上，肺血管重塑难以避免，将发生不可逆改变，预后不良^[11]。本研究结果显示，盐水组及空病毒组在缺氧 3 d 时肺动脉处于收缩状态，出现 mPAP 增强；在缺氧 7 d 时肺动脉结构发生改变，主要包括肌型小动脉中膜增生肥厚、无肌型动脉肌化等，导致肺血管重塑的改变^[12]，mPAP 进一步增强。

本研究结果显示，盐水组及空病毒组在缺氧 3、7、10 d 时 HSP70 阳性率高于空白对照组，考虑与缺氧后 HSP70 转录因子明显激活一致，此为内源性表达结果，而在缺氧 14 d，三组间 HSP70 阳性率表达差异无统计学意义，表明随肺组织缺氧时间延长，细胞结构和功能破坏，10 d 内肺组织的

应激和抗损伤能力较强,因而可产生 HSP70 以进行抗损伤和修复,随着缺氧时间延长,肺组织细胞受损加重,能够产生 HSP70 的能力下降。

本研究显示,在缺氧 3、7、10 d 时病毒 + HSP70 组 HSP70 在肺组织中充分表达,此组 mPAP 与盐水组、空病毒组比较明显降低,肺血管未见明显重塑;缺氧 14 d 时, HSP70 在新生大鼠肺组织内代谢完全,此时其 mPAP 较空白对照组明显增高,肺血管出现重塑;说明腺病毒介导的 HSP70 能减轻肺血管重塑,降低肺动脉压力。Gogate 等^[8]发现 HSP70 在低氧条件下能够促进 HIF-1 α 通过蛋白酶体途径降解,而利用 HSP 抑制剂 KNK437 抑制 HSP70 的功能后, HIF-1 α 的降解减少、活性增加。还有研究发现 HSP70 基因结构中含有缺氧诱导因子结合位点,很有可能是 HIF-1 α 的下游靶基因,缺氧激活 HIF-1 α 的转录活性,同时促进 HSP70 表达增加,表达增加的 HSP70 反过来激活 HIF-1 α 的泛素化降解,成为机体细胞对缺氧反应的负反馈通路^[4],进一步说明在缺氧状况下 HSP70 对 HIF-1 α 具有泛素化降解作用,从而降低肺动脉压力,具体作用机制还需进一步研究。

本研究发现 HSP70 可能可以降低肺动脉压力,减轻肺血管重塑,这可能与 HSP70 促进 HIF-1 α 的降解有关,本课题组正在做进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] 周英,王冬梅,朱艳萍,等.缺氧诱导因子-1 α 在新生大鼠缺

- 氧性肺动脉高压中的作用及其与肺血管重塑的关系[J].中华围产医学杂志,2014,17(4):260-266.
- [2] Luo W, Zhong J, Chong R, et al. Hsp70 and CHIP selectively mediate ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α but not HIF-2 α [J]. J Biol Chem, 2010, 285(6): 3651-3663.
- [3] van de Sluis B, Groot AJ, Vermeulen J, et al. COMMD1 promotes pVHL and O₂-independent proteolysis of HIF-1 α via HSP90/70[J]. PLoS One, 2009, 4(10): e7332.
- [4] 夏丽敏,田德安,张琼,等.缺氧诱导热休克蛋白 70-2 表达的分子机制[J].中华肝病杂志,2009,17(3):207-212.
- [5] 桑葵,周英,李明霞.缺氧诱导因子 1 α 及其调控因子在新生大鼠缺氧性肺动脉高压发病机制中作用的研究[J].中华儿科杂志,2012,50(12):919-924.
- [6] Wang L, Zhou Y, Li M, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α , endothelin-1 and adrenomedullin in newborn rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. Exp Ther Med, 2014, 8(1): 335-339.
- [7] 贺洪军,戴爱国.肺心汤对低氧性肺动脉高压模型大鼠低氧诱导因子-1 α 及血管内皮生长因子的影响[J].中国中西医结合杂志,2012,32(5):676-680.
- [8] Gogate SS, Fujita N, Skubutye R, et al. Tonicity enhancer binding protein (TonEBP) and hypoxia-inducible factor (HIF) coordinate heat shock protein 70 (Hsp70) expression in hypoxic nucleus pulposus cells: role of Hsp70 in HIF-1 α degradation[J]. J Bone Miner Res, 2012, 27(5): 1106-1117.
- [9] 王燕婷,梁建辉.精神活性物质对热休克蛋白 70 表达的影响[J].生理科学进展,2012,43(1):66-70.
- [10] Tian YM, Yeoh KK, Lee MK, et al. Differential sensitivity of hypoxia inducible factor hydroxylation sites to hypoxia and hydroxylase inhibitors[J]. J Biol Chem, 2011, 286(15): 13041-13051.
- [11] 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.
- [12] 杜军保,唐朝枢.肺动脉高压[M].北京:北京大学医学出版社,2010:24-90.

(本文编辑:万静)