

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.20.003

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190626.1454.015.html(2019-06-27)

西地那非对先天性膈疝大鼠胎肺中 HIF-2 $\alpha$  和 VEGF-A 表达的影响及意义\*冯 威<sup>1</sup>, 侯 昉<sup>1</sup>, 刘文英<sup>1 $\Delta$</sup> , 张利兵<sup>2</sup>, 陈文科<sup>1</sup>, 蒋 琴<sup>1</sup>, 贾红慧<sup>1</sup>

(1. 电子科技大学医学院/四川省人民医院儿童医学中心小儿外科, 成都 610072;

2. 成都市妇女儿童中心医院小儿外科一病区 610074)

**[摘要]** **目的** 研究西地那非对先天性膈疝(CDH)大鼠动物模型胎肺中缺氧诱导因子-2 $\alpha$ (HIF-2 $\alpha$ )以及血管内皮细胞生长因子-A(VEGF-A)表达的影响和意义。**方法** 将配种 SD 大鼠分为:正常空白组(NC组,2只)、正常西地那非组(NS组,2只),模型空白组(MC组,3只),模型西地那非组(MS组,3只),MC组、MS组以除草醚诱导产生 CDH 模型,NS、MS组孕鼠给予 8 mg 西地那非进行干预。孕 21 d 剖宫产取出所有胎鼠,观察各组肺组织发育情况,免疫组织化学染色、Western blot 法检测胎肺中 HIF-2 $\alpha$ 、VEGF-A 蛋白的表达情况。**结果** MC、MS 两组膈疝发生率差异无统计学意义( $P>0.05$ )。MC 组胎肺质量与体质量之比(Lw/Bw)最低。MC 组肺泡、肺血管各项指标均不如 NC、MS 组发育成熟。免疫组织化学结果显示 HIF-2 $\alpha$ 、VEGF-A 蛋白在 NC、NS、MS 组中表达较强,在 MC 组表达较弱,Western blot 定量检测也显示出同样的表达趋势,且二者呈正相关,以上差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 产前应用西地那非能够促进 CDH 胎鼠肺发育和血管新生,改善血管结构并提高 HIF-2 $\alpha$  及 VEGF-A 蛋白在肺内的表达水平,推测西地那非上调 HIF-2 $\alpha$ 、VEGF-A 蛋白的表达可能是其改善肺发育不良的机制之一。

**[关键词]** 疝;横膈;西地那非;肺发育不良**[中图法分类号]** R726.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)20-3431-06Effects and significance of sildenafil on expression of HIF-2 $\alpha$  and VEGF-A in fetal lung of congenital diaphragmatic hernia rat model\*FENG Wei<sup>1</sup>, HOU Fang<sup>1</sup>, LIU Wenyong<sup>1 $\Delta$</sup> , ZHANG Libing<sup>2</sup>,CHEN Wenke<sup>1</sup>, JIANG Qin<sup>1</sup>, JIA Honghui<sup>1</sup>

(1. Department of Pediatric Surgery, Children Medicine Center of Sichuan Provincial People's Hospital/School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan 610072, China; 2. Department of Pediatric Surgery, Chengdu Municipal Women's and Children's Central Hospital, Chengdu, Sichuan 610074, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of sildenafil on the expression of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) and vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) in fetal lung of congenital diaphragmatic hernia rat model. **Methods** The hybridization SD rats were divided into the normal blank group (NC,  $n=2$ ), normal sildenafil group (NS,  $n=2$ ), model blank group (MC,  $n=3$ ) and model sildenafil group (MS,  $n=3$ ). The CDH model was induced by nitrofen. The pregnant rats in the group NS and MS were administered with sildenafil for conducting the intervention. All fetal rats were delivered by caesarian section on 21 d. The development situation of fetal lung tissue was observed and the expression levels of HIF-2 $\alpha$  and VEGF-A in fetal lung were detected by using the immunohistochemical staining and Western blot. **Results** The CDH incidence rate had no statistically significant difference between the MC and MS groups. The ratio of fetal lung weight-to-body mass in the MC group was the lowest. The various indexes of alveoli and vessels in the group MC were immature compared with the group NC and MS. The immunohistochemical staining results showed that the expression of HIF-2 $\alpha$  and VEGF-A was stronger in the group NC, NS and MS, but poor in the group

\* 基金项目:四川省成都市科技惠民项目(2015-HM01-00441-SF)。

作者简介:冯威(1990—),住院医师,硕士,主要从事先天性膈疝发

病机制的研究。  $\Delta$  通信作者, E-mail:664290923@qq.com。

MC. The Western blot quantitative detection showed the similar expression trend of HIF-2 $\alpha$  and VEGF-A protein, moreover the both demonstrated the positive correlation with each other, and the above differences were statistically significant ( $r = 0.463, P < 0.01$ ). **Conclusion** Prenatal application of sildenafil can promote the development and angiogenesis of CDH fetal lung, improve the blood vessel structure, increase the expression levels of HIF-2 $\alpha$  and VEGF-A protein in lung, it is speculated that sildenafil up-regulating HIF-2 $\alpha$  and VEGF-A expression may be one of mechanisms for improving the lung development.

**[Key words]** hernia; diaphragmatic; sildenafil; pulmonary hypoplasia

先天性膈疝 (congenital diaphragmatic hernia, CDH) 是由于膈肌缺损, 导致腹腔脏器、器官疝入胸腔, 从而引起一系列病理生理变化的一种先天性疾病, 在新生儿中的发病率为 1:2 500~1:3 000<sup>[1]</sup>。尽管产前诊断及临床手术治疗的水平不断提高, 但根据全球多个医疗中心数据显示, CDH 病死率仍高达 20%~60%<sup>[2]</sup>。迄今仍无有效治疗手段从根本上改变 CDH 合并的肺发育不良和肺动脉高压, 这是其存活率不能改善的重要原因<sup>[3]</sup>。

国外学者研究发现西地那非可以改善 CDH 患儿肺发育不良<sup>[4]</sup>, 有利于 CDH 动物模型胎肺毛细血管新生及肺泡的发育<sup>[5]</sup>。实验表明缺氧诱导因子-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) 和血管内皮生长因子-A (VEGF-A) 在胎肺发育过程中起着重要作用。因此本实验拟通过对除草醚诱导的大鼠膈疝模型进行产前西地那非干预, 研究胎肺中 HIF-2 $\alpha$ 、VEGF-A 蛋白表达的变化情况, 探讨其改善肺发育不良可能的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 成年 Sprague-Dawley 大鼠 (电子科技大学医学院/四川省人民医院实验动物研究所提供): 雌鼠 20 只, 雄鼠 10 只, 体质量 220~300 g, 平均 (269.7 $\pm$ 24.8)g, 实验前均未交配。

**1.2 仪器与试剂** 除草醚 (浙江化工二厂)、枸橼酸西地那非片 (美国辉瑞制药有限公司); VEGF-A 蛋白兔多克隆抗体 (英国 Abcam 公司)、HIF-2 $\alpha$  蛋白兔多克隆抗体 (英国 Abcam 公司)、GAPDH 蛋白鼠单克隆抗体 (美国 Gene Tex 公司)、ECL 发光试剂盒 (美国 Thermo 公司)、二抗生物素化山羊抗兔、抗鼠 IgG (英国 Abcam 公司)、Image Lab 凝胶分析系统 (美国 Bio-Rad 公司)、ChemiDoc XRS+ Systems 凝胶扫描成像仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 动物模型建立及分组** 雌雄鼠按 2:1 分笼, 晚间定时配种, 次日上午取雌鼠阴道分泌物涂片于显微镜下观察, 以发现精子为配种成功依据, 确定为怀孕 0.5 d。10 只孕鼠按随机数字表法分为正常空白组 (NC 组) 2 只; 正常西地那非组 (NS 组) 2 只; 模型空白组 (MC 组) 3 只; 模型西地那非组 (MS 组) 3 只。孕

9.5 d 时, 模型组 6 只孕鼠灌胃给予除草醚 125 mg/只 (溶于 1 mL 橄榄油), 正常组 4 只给予等量橄榄油。孕 11.5~20.5 d, 西地那非干预组 5 只孕鼠每天灌胃西地那非 8 mg/只 (溶于 2 mL 生理盐水中), 空白组 5 只大鼠每天给予等量生理盐水。

**1.3.2 肺组织标本采集** 孕 21 d, 所有孕鼠行戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后剖宫取出胎鼠, 称量胎鼠体质量 (Bw) 后断头处死, 经胸骨正中切口剖开胸腔, 完整取出两侧肺组织并称质量 (Lw), 将胎肺组织从支气管分叉处分成左右两肺, 各取部分肺组织即刻放入 10% 中性甲醛和 -70 $^{\circ}$ C 低温环境保存备用。将去除肺组织的胎鼠置于 (4 倍) 放大镜下, 经头侧仔细观察有无膈肌缺损, 逐一记录有无膈疝、膈疝的位置、膈肌缺损的大小及疝内容物, 分析比较各组胎鼠肺发育情况。

**1.3.3 肺组织形态学观察** 将固定于 10% 甲醛中的肺组织于 24 h 内石蜡包埋, 行常规切片及苏木素-伊红 (HE) 染色, 在 Olympus BX51 光学显微镜下观察, BA200 Digital 数码三目摄像显微摄像系统图像采集, Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件测量以下肺实质、血管的发育情况。(1) 平均终末支气管密度 (MTBD): 100 倍视野下计数 10 个互不重叠视野内终末支气管个数。终末支气管的数目与环绕每个终末支气管的腺泡数成反比, 因此肺组织结构越成熟, MTBD 越小<sup>[6]</sup>。(2) 肺泡间隔: 200 倍视野下测量互不重叠的 3 个视野下 10~15 个肺泡间隔的厚度。(3) 平均肺泡面积: 200 倍视野下测量互不重叠的 5 个视野内 10~15 个肺泡的平均面积。(4) 肺泡面积百分比 (PAA%): 200 倍视野下测量互不重叠的 5 个视野内的肺泡面积比。(5) 小血管个数: 200 倍视野下计数 5 个互不重叠视野内直径 30~70  $\mu$ m 的血管个数。(6) 血管中膜厚度 (medial wall thickness, MWT): 200 倍视野下每张切片测量至少 3 根含有平滑肌层、形态规则的直径小于 70  $\mu$ m 肺小动脉的如下指标, 血管外径 (external diameter, ED)、血管内径 (internal diameter, ID),  $MWT = (ED - ID) / 2$ , MWT 是评估肺血管重构情况的指标<sup>[7]</sup>。

**1.3.4 免疫组织化学染色** 每组随机选择 8 个样本

采用 SP 法分别检测 HIF-2 $\alpha$ 、VEGF-A 蛋白在胎肺组织中的表达,以 PBS(pH 7.2~7.4)替代一抗作为空白对照,以染色呈浅黄色或棕黄色为阳性,蓝色为阴性。BA200Digital 数码三目显微摄像系统采集肺组织图像,在 400 倍视野下选取 2 个互不重叠的视野,并使用 Image-Pro Plus6.0 软件分析测定阳性染色颗粒的平均光密度(AOD)。

**1.3.5 Western blot** 各组取等重量的冰冻组织解冻后用匀浆器研磨均匀,加入细胞裂解液,按照 BCA Protein Assay Kit 说明书提取各组肺组织蛋白并测定蛋白浓度,按每孔蛋白量 100  $\mu$ g 上样后行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)将蛋白转移至聚二偏氟乙烯(PVDF)膜上,将 PVDF 膜放入稀释的 TBST 封闭液中 2 h,洗膜后加入一抗(HIF-2 $\alpha$  蛋白抗体 1:500 稀释;VEGF-A 蛋白抗体 1:500 稀释,内参 GAPDH 蛋白抗体 1:5000 稀释)4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,再次洗膜后加入二抗(山羊抗兔、抗鼠 IgG 1:5000 稀释)孵育 2 h,洗膜后显影、定影、拍照,Image Lab 系统分析各组蛋白条带表达量并计算相对灰度值(目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值)。

**1.4 统计学处理** 所有数据均采用 SPSS21.0 软件进行统计学分析,计数资料比较采用  $\chi^2$  检验,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析并进行方差齐性检验,当离散程度较大时采用非参数秩和检验,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,HIF-2 $\alpha$ 、VEGF-A 蛋白阳性表达平均光密度之间做相关性分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 实验动物一般情况及胎肺的观察** 10 只孕鼠共收获胎鼠 113 只,其中 NC 组 27 只,NS 组 19 只,均无膈疝形成;MC 组收获胎鼠 38 只,膈疝致畸率为

60.53%(23/38),MS 组收获胎鼠 29 只,膈疝致畸率为 72.41%(21/29),疝内容物主要为肝、胃及小肠等,两组致畸率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。MC 组 Lw/Bw 较 NC 组显著降低( $P < 0.01$ ),MS 组与 MC 组比较差异无统计学意义( $P = 0.76$ ),NS 组与 NC 组比较差异无统计学意义( $P = 0.19$ ),见表 1。

表 1 模型诱导情况及肺组织观察

组别	孕鼠 (只)	胎仔 (只)	膈疝胎仔(只)			致畸率 (%)	Lw/Bw (mg/g)
			左侧	右侧	双侧		
NC 组	2	27	0	0	0	29.85 $\pm$ 6.16	
NS 组	2	19	0	0	0	27.49 $\pm$ 5.26	
MC 组	3	38	18	4	1	19.96 $\pm$ 4.52*	
MS 组	3	29	14	3	4	20.28 $\pm$ 3.89	

\* : $P < 0.01$ ,与 NC 组比较

**2.2 组织形态学检查** 各组肺组织发育情况见图 1,对各项测得的观察指标进行统计分析发现,与 NC 组相比较,MC 组胎肺中 MTBD、肺泡间隔及 MWT 均显著升高( $P < 0.01$ ),平均肺泡面积、PAA%、小血管个数、血管内径均减小( $P < 0.01$ );与 NC 组比较,MS 组 MTBD、肺泡间隔及 MWT 均降低( $P < 0.01$ ),平均肺泡面积增大( $P < 0.05$ ),小血管个数显著增多、血管管腔增大( $P < 0.01$ );NS 组相比于 NC 组除小血管个数有所减少( $P < 0.05$ ),其余指标间差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。具体统计数据见表 2、表 3。

**2.3 免疫组织化学染色图像分析** HIF-2 $\alpha$  阳性染色主要位于肺泡上皮细胞的细胞核及支气管上皮细胞胞质和细胞膜,而在血管组织细胞中表达较少(图 2);VEGF-A 则广泛表达于血管内皮细胞、支气管上皮细胞及肺间质细胞的细胞质中,少量表达于血管平滑肌细胞,见图 3。HIF-2 $\alpha$  蛋白与 VEGF-A 蛋白阳性表达平均光密度呈正相关( $r = 0.463, P < 0.01$ )。

表 2 各组肺泡及支气管发育指标检测( $\bar{x} \pm s$ )

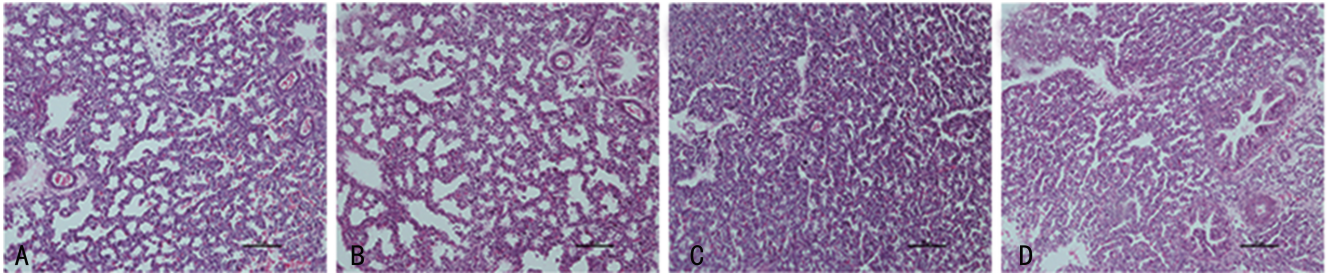
组别	<i>n</i>	MTBD(个/HP)	肺泡间隔( $\mu$ m)	肺泡面积( $\mu$ m <sup>2</sup> )	PAA%(%)
NC 组	22	2.78 $\pm$ 0.54	13.04 $\pm$ 1.01	809.93 $\pm$ 79.67	52.52 $\pm$ 2.85
NS 组	14	2.60 $\pm$ 0.62	12.48 $\pm$ 0.98	838.33 $\pm$ 91.63	52.17 $\pm$ 2.54
MC 组	24	5.92 $\pm$ 0.93**	20.54 $\pm$ 1.24**	403.99 $\pm$ 66.08**	35.40 $\pm$ 3.59**
MS 组	24	3.88 $\pm$ 0.84##	17.11 $\pm$ 1.34##	458.03 $\pm$ 87.86#	41.25 $\pm$ 4.52##

\* : $P < 0.05$ 、\*\* : $P < 0.01$ ,与 NC 组比较;# : $P < 0.05$ 、## : $P < 0.01$ ,与 MC 组比较

表 3 各组肺小血管发育指标检测( $\bar{x} \pm s$ )

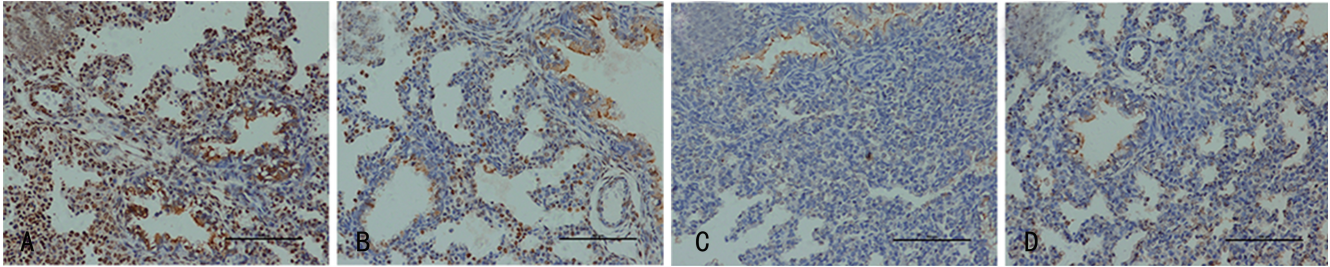
组别	<i>n</i>	小血管个数(个/HP)	ED( $\mu$ m)	ID( $\mu$ m)	MWT( $\mu$ m)
NC 组	22	4.37 $\pm$ 0.49	50.46 $\pm$ 4.85	35.87 $\pm$ 3.96	7.30 $\pm$ 1.09
NS 组	14	4.04 $\pm$ 0.41*	52.67 $\pm$ 3.00	38.74 $\pm$ 3.14*	6.97 $\pm$ 0.98
MC 组	24	2.41 $\pm$ 0.49**	49.68 $\pm$ 4.82	27.44 $\pm$ 3.90**	11.12 $\pm$ 1.53**
MS 组	24	3.38 $\pm$ 0.56##	49.12 $\pm$ 4.88	30.88 $\pm$ 3.29##	9.12 $\pm$ 1.14##

\* : $P < 0.05$ 、\*\* : $P < 0.01$ ,与 NC 组比较;# : $P < 0.05$ 、## : $P < 0.01$ ,与 MC 组比较



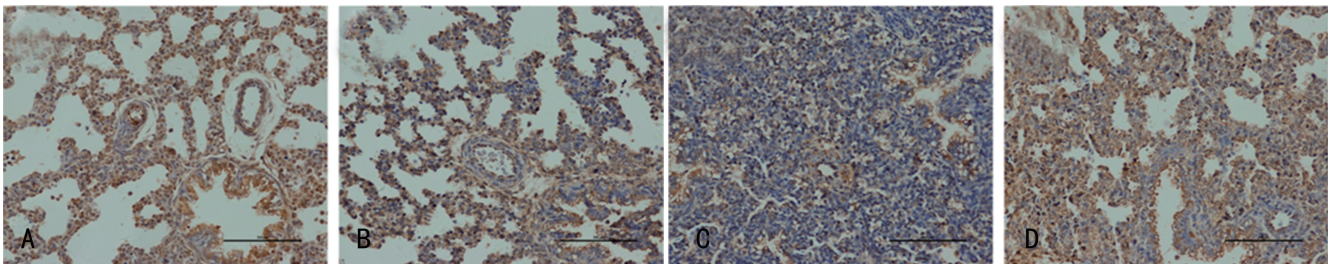
A: NC 组; B: NS 组; C: MC 组; D: MS 组

图 1 肺组织切片形态学观察(HE×100)



A: NC 组; B: NS 组; C: MC 组; D: MS 组

图 2 胎肺组织 HIF-2α 免疫组织化学染色光镜观察(×200)



A: NC 组; B: NS 组; C: MC 组; D: MS 组

图 3 胎肺组织 VEGF-A 免疫组织化学染色光镜观察(×200)

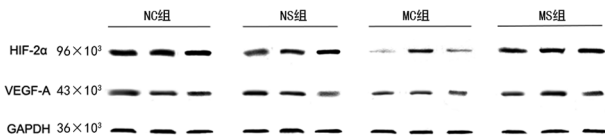
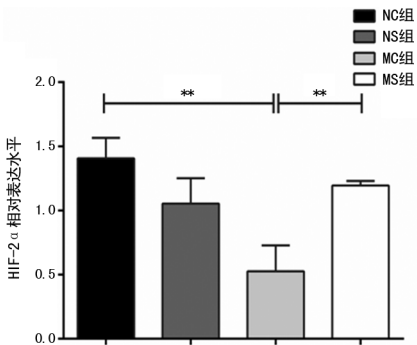


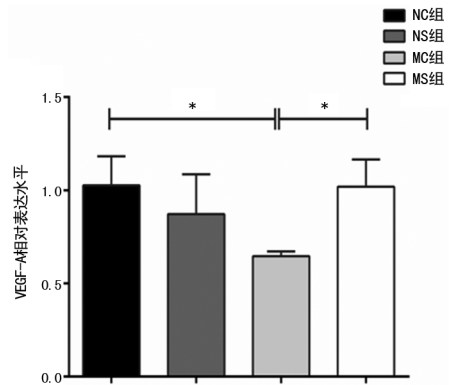
图 4 HIF-2α、VEGF-A 蛋白在各组胎肺组织中的表达情况



\*\* :  $P < 0.01$

图 5 HIF-2α 蛋白在各组胎肺中表达情况比较

( $0.557 \pm 0.383$ ) 与 NC 组( $1.474 \pm 0.305$ ) 和 MS 组( $1.195 \pm 0.035$ ) 相比均降低, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), NC 组与 NS 组( $0.970 \pm 0.288$ ) 比较, 差异无统计学意义( $P = 0.076$ ); VEGF-A 在 NC 组和 MS 组中相对表达水平分别为( $1.026 \pm 0.156$ ) 和( $1.019 \pm 0.157$ ), 与 MC 组( $0.646 \pm 0.026$ ) 相比均显著升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), NC 组和 NS 组( $0.885 \pm 0.294$ ) 差异无统计学意义( $P = 0.374$ ), 见图 5、6。



\* :  $P < 0.05$

图 6 VEGF-A 蛋白在各组胎肺中表达情况比较

**2.4 Western blot 定量检测 HIF-2α、VEGF-A 蛋白的表达情况** HIF-2α、VEGF-A 蛋白在各组胎鼠肺组织中表达情况见图 4。MC 组 HIF-2α 相对表达水平

### 3 讨 论

肺动脉高压合并肺发育不良是 CHD 最主要的病理特征,本研究通过在显微镜下对比 CDH 模型胎鼠与正常胎鼠肺组织发育情况证实了以上观点,即模型组胎鼠肺泡塌陷不均匀,有效通气面积大幅减小,肺泡间隔增厚,终末支气管增多,肺细小血管数量显著减少,血管病理性重构明显,管径减小,管壁增粗,存在明显肺发育不良及肺动脉高压的表现。

西地那非是磷酸二酯酶-5(PDE5)的选择性抑制剂,最早研究用于心绞痛的治疗,其后由于意外发现的血管舒张作用有治疗阴茎勃起不良(erection dysfunction, ED)的特效而被人们所熟知,其可在神经末梢和内皮细胞释放出的 NO 与平滑肌受体结合,激活细胞内鸟苷酸环化酶(GC),并在锰离子( $Mn^{2+}$ )参与下促进环磷酸鸟苷(cGMP)生成,cGMP 通过活化钙离子( $Ca^{2+}$ )泵使细胞内  $Ca^{2+}$  浓度降低,从而使血管舒张,血流增多。已经证实西地那非的作用机制正是通过选择性抑制 PDE5 对 cGMP 的降解作用,使细胞内 cGMP 水平升高,增强 NO 的舒张血管作用<sup>[8]</sup>。后来研究者发现西地那非同样能作用于肺血管舒张而有效地缓解肺动脉高压,并且合适的治疗剂量不会对其他系统造成明显的不良反应<sup>[9]</sup>,现已成为临床上治疗肺动脉高压的可选择药物<sup>[10]</sup>。近年来,国外研究者们将西地那非用于治疗 CHD 的研究中,发现产前西地那非干预能缓解肺动脉高压<sup>[3]</sup>,对 CDH 肺血管的发育有一定的促进作用<sup>[11]</sup>,但具体的作用机制尚不清楚。本研究发现西地那非产前干预并没有降低 CDH 的发生率,但通过产前西地那非干预的胎鼠肺泡平均面积增大,间隔变薄,终末支气管明显减少,肺泡间微小血管数量增多,血管腔增大,管壁明显变薄,较 CDH 模型小鼠胎肺发育明显改善,提示西地那非对胎肺成熟和缓解肺动脉高压有明显的促进作用,而对正常孕鼠进行西地那非干预后观察到,除对肺血管有一定的舒张作用外,对胎鼠胎肺的发育没有产生明显的影响。

目前研究发现多种细胞因子参与了胎肺的发育过程,其中 HIF-2 $\alpha$  和 VEGF-A 的表达可能在肺血管重构、新生血管形成及肺泡、细小支气管的发育过程中起着重要的作用<sup>[12-13]</sup>。HIF 是细胞对低氧环境反应的重要的异源二聚体转录因子,研究发现在 HIF-2 $\alpha$  基因缺失的小鼠中 VEGF-A 表达明显降低并且引发了严重的肺发育不良<sup>[14]</sup>,GIATROMANOLAKI 等<sup>[15]</sup>在对皮肤血管瘤的研究中发现 HIF-2 $\alpha$  异常升高可以上调 VEGF-A 的表达从而引起血管内皮细胞迅速增殖,促进了血管的快速生成。HUANG 等<sup>[16]</sup>研究发现 HIF-2 $\alpha$  在胎鼠胚胎发育末期表达显著增高

有利于肺泡 II 型细胞分泌表面活性物质,降低肺泡表面张力,促进肺泡成熟。众所周知,VEGF 在血管发育过程中起着重要的调节作用,许多研究发现,VEGF 作为多条细胞信号传导通路的下游调节靶向基因,直接参与了肺血管的增殖和分化。然而 VEGF 家族成员众多,且在不同疾病的组织中表达的特点各不相同,有研究发现在除草醚诱导的 CDH 动物模型胎肺中 VEGF-A mRNA 呈低表达<sup>[17]</sup>,陈中献等<sup>[18]</sup>也在研究汉防己甲素干预对 CDH 胎肺发育影响中发现 TET 通过上调 VEGF 蛋白表达促进肺泡周围毛细血管发育;然而 SHEHATA 等<sup>[19]</sup>在对死于严重的 CHD 肺动脉高压的新生儿肺的研究中发现 VEGF 表达却异常增高,OUÉ 等<sup>[20]</sup>也在除草醚诱导的 CHD 胎鼠模型中发现 VEGF 表达有升高。因此 VEGF 在 CHD 肺发育过程中表达尚待进一步研究。

本实验免疫组织化学结果显示,HIF-2 $\alpha$ 、VEGF-A 蛋白在肺泡、细支气管、微血管上均有不同程度的表达,且在膈疝 MC 组中表达明显弱于 NC 组,结合肺组织形态学观察可以说明,HIF-2 $\alpha$ 、VEGF-A 蛋白的表达异常降低与肺发育不良和肺动脉高压的形成有密切的关系,而通过西地那非干预后,其阳性表达均明显增强,并且两因子表达变化趋势呈正相关。随后应用 Western blot 技术对 HIF-2 $\alpha$ 、VEGF-A 蛋白在各组胎肺中的表达进行定量检测,其结果与免疫组织化学观察到的表达变化趋势基本一致,即与 NC 组相比,HIF-2 $\alpha$ 、VEGF-A 蛋白在 MC 组中表达明显降低;而在 MS 组中表达则高于 MC 组。因此本组实验研究提示,对除草醚诱导的大鼠 CDH 模型产前使用西地那非进行干预,可以促进肺泡发育和血管新生,改善肺组织结构,缓解肺动脉高压,推测可能是通过上调 HIF-2 $\alpha$ 、VEGF-A 蛋白的表达实现的。当然,由于在低氧条件下 HIF-2 $\alpha$  蛋白是 VEGF-A 的上游诱生因子,因此西地那非也可能在缺氧环境下发育不良的肺内通过增强 HIF-2 $\alpha$  蛋白表达来上调 VEGF-A 蛋白表达,VEGF-A 蛋白作用于肺血管促进了血管内皮细胞分裂增殖,诱发更多的血管新生,减小血管中膜厚度,维持血管正常的完整形态,增强了血管通透性,而肺内血流循环的改善促进了肺泡的发育<sup>[21]</sup>;另一方面 HIF-2 $\alpha$  蛋白也可直接作用于肺泡上皮细胞,促进肺泡 II 型上皮细胞分泌肺表面活性物质,减少肺表面张力,有利于肺泡发育成熟<sup>[16]</sup>。

综上所述,本实验证实了西地那非对改善 CHD 组织发育的具有促进作用,并推测西地那非可能通过直接或间接地上调 HIF-2 $\alpha$ 、VEGF-A 蛋白的表达来协同促进肺小血管及肺泡的成熟。然而西地那非具体是如何作用于其靶向调节基因还不明确,国外文献

报道可能有更多的细胞因子参与了西地那非的调节机制<sup>[22-23]</sup>,因此还需要更加深入的研究明确。

## 参考文献

- [1] MCHONEY M. Congenital diaphragmatic hernia[J]. *Early Hum Develop*, 2014, 90(12):941-946.
- [2] WILKINSON D J, LOSTY P D. Management of congenital diaphragmatic hernia[J]. *Paed Child Heal*, 2009, 19(12):555-558.
- [3] 何秋明,肖尚杰,刘芬,等.产前应用维生素 A 对先天性膈疝大鼠模型胎肺晚期发育及 Hoxa5 表达的影响[J]. *中华小儿外科杂志*, 2015, 36(9):666-670.
- [4] BIALKOWSKI A, MOENKEMEYER F, PATEL N. Intravenous sildenafil in the management of pulmonary hypertension associated with congenital diaphragmatic hernia[J]. *Europ J Ped Surg*, 2015, 25(2):171-176.
- [5] LEMUS-VARELA M D, SOLIZ A, GÓMEZ-MEDA B C, et al. Antenatal use of bosentan and/or sildenafil attenuates pulmonary features in rats with congenital diaphragmatic hernia[J]. *World J Pediatr*, 2014, 10(4):354-359.
- [6] BRATU I, FLAGEOLE H, LABERGE J M, et al. Surfactant levels after reversible tracheal occlusion and prenatal steroids in experimental diaphragmatic hernia[J]. *J Pediatr Surg*, 2001, 36(1):122-127.
- [7] ROUBLIOVA X, VERBEKEN E, WU J, et al. Pulmonary vascular morphology in a fetal rabbit model for congenital diaphragmatic hernia[J]. *J Pediatr Surg*, 2004, 39(7):1066-1072.
- [8] KUKREJA R C, SALLOUM F, DAS A, et al. Pharmacological preconditioning with sildenafil: Basic mechanisms and clinical implications[J]. *Vascul Pharmacol*, 2005, 42(5/6):219-232.
- [9] WANG R C, JIANG F M, ZHENG Q L, et al. Efficacy and safety of sildenafil treatment in pulmonary arterial hypertension: a systematic review[J]. *Respir Med*, 2014, 108(3):531-537.
- [10] GALIE N, GHOFRANI H A, TORBICKI A, et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(20):2148-2157.
- [11] DE LUCA D, DANIELE D L, ZECCA E, et al. Transient effect of epoprostenol and sildenafil combined with iNO for pulmonary hypertension in congenital diaphragmatic hernia[J]. *Paediatr Anaesth*, 2006, 16(5):597-598.
- [12] WU J B, STRAWN T L, LUO M, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 inhibits angiogenic signaling by uncoupling vascular endothelial growth factor receptor-2- $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin cross talk[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(1):111-120.
- [13] GEIS T, DÖRING C, POPP R, et al. HIF-2 $\alpha$ -dependent PAI-1 induction contributes to angiogenesis in hepatocellular carcinoma[J]. *Exp Cell Res*, 2015, 331(1):46-57.
- [14] COMPERNOLLE V, BRUSSELMANS K, ACKER T, et al. Loss of HIF-2 $\alpha$  and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice[J]. *Nat Med*, 2002, 8(7):702-710.
- [15] GIATROMANOLAKI A, ARVANITIDOU V, HATZIMICHAEL A, et al. The HIF-2 $\alpha$ /VEGF pathway activation in cutaneous capillary haemangiomas[J]. *Pathology*, 2005, 37(2):149-151.
- [16] HUANG Y, KEMPEN M B, MUNCK A B, et al. Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  plays a critical role in the formation of alveoli and surfactant[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 46(2):224-232.
- [17] CHANG R, ANDREOLI S, NG Y S, et al. VEGF expression is downregulated in nitrofen-induced congenital diaphragmatic[J]. *J Pediatr Surg*, 2004, 39(6):825-828.
- [18] 陈中献,徐畅,刘文英.汉防己甲素对于膈疝模型大鼠胎肺中血管内皮生长因子表达的影响[J]. *中华小儿外科杂志*, 2013, 34(12):933-937.
- [19] SHEHATA S M, MOOI W J, OKAZAKI T, et al. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in lungs of newborn infants with congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypertension[J]. *Thorax*, 1999, 54(5):427-431.
- [20] OUE T, SHIMA H, TAIRA Y, et al. Administration of antenatal glucocorticoids upregulates peptide growth factor gene expression in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats[J]. *J Pediatr Surg*, 2000, 35(1):109-112.
- [21] OLADIPUPO S, HU S, KOVALSKI J, et al. VEGF is essential for hypoxia-inducible factor-mediated neovascularization but dispensable for endothelial sprouting[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(32):13264-13269.
- [22] IRENE W M, BEVERLY M S, FARAH E S, et al. Expression and function of phosphodiesterases in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2010, 45(4):320-325.
- [23] KATTAN J, CESPEDES C, GONZALEZ A, et al. Sildenafil stimulates and dexamethasone inhibits pulmonary vascular development in congenital diaphragmatic hernia rat lungs[J]. *Neonatology*, 2014, 106(1):74-80.