

# 西地那非治疗新生儿肺动脉高压及其对循环内皮祖细胞及肿瘤坏死因子- $\alpha$ 的影响<sup>\*</sup>

樊青曼, 刘俊峰<sup>\*\*</sup>, 陈玉芝, 王连芳, 刘伟娟, 刘士霞

(华北石油总医院 儿科, 河北 任丘 062552)

**[摘要]** 目的: 观察西地那非治疗新生儿肺动脉高压(PH)疗效及其对循环内皮祖细胞(EPC)和肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 的影响。方法: 24例PH新生儿均分为常规治疗组和西地那非治疗组,并选取同期入院的12例无PH的新生儿黄疸患儿为正常对照组;常规治疗组予对症支持治疗,治疗组在此基础上应用西地那非治疗,比较西地那非治疗组和常规治疗组治疗前和治疗1周后患儿的肺动脉压(SPAP)、体循环收缩压(SBP)、动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)、二氧化碳分压(PaCO<sub>2</sub>)及氧合指数(PO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>),并检测西地那非治疗组、常规治疗组治疗前和治疗1周后,以及正常对照组患儿入院即刻的血清TNF- $\alpha$ 水平、循环EPC数量及增殖能力、黏附能力和迁移能力。结果: 治疗前,西地那非治疗组患儿SPAP、SBP、PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>及PO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>与常规治疗组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );西地那非治疗组与常规治疗组血清TNF- $\alpha$ 水平均高于正常对照组,循环EPC数量和增殖能力、黏附能力、迁移能力均低于正常对照组( $P<0.05$ ),且西地那非治疗组与常规治疗组之间的差异无统计学意义( $P>0.05$ );治疗1周后,西地那非治疗组的SPAP、SBP、PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>及PO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>改善情况明显优于常规治疗组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );西地那非治疗组血清TNF- $\alpha$ 水平下降程度高于常规治疗组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );西地那非治疗组循环EPC数量和增殖能力、黏附能力、迁移能力的上调较常规治疗组明显,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论: 西地那非能有效治疗PH,其机制可能与调节循环EPC数量及功能有关。

**[关键词]** 高血压,肺动脉;肿瘤坏死因子 $\alpha$ ;炎症;西地那非;内皮祖细胞;肺循环

**[中图分类号]** R722; R392 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)06-0686-04

**DOI:**10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.06.014

## The Effects of Sildenafil on Neonatal Pulmonary Hypertension and Its Influence on Circulating Endothelial Progenitor Cells and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

FAN Qingman, LIU Junfeng, CHEN Yuzhi, WANG Lianfang, LIU Weijuan, LIU Shixia

(Department of Pediatrics, the General Hospital of Huabei Oil field Company, Renqiu 062552, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the therapy effects of sildenafil in the treatment of neonatal pulmonary hypertension (PH), and its influence on circulating endothelial progenitor cells (EPC) and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ . **Methods:** 24 neonates with PH were divided into the routine treatment group and the sildenafil treatment group, and at the same time other 12 neonates with jaundice were selected as the normal control group, with in each group. The sildenafil treatment group was treated with sildenafil on the basis of routine symptomatic support therapy. Pulmonary arterial pressure (SPAP), systolic blood pressure (SBP), arterial oxygen partial pressure (PaO<sub>2</sub>), carbon dioxide partial pressure (PaCO<sub>2</sub>) and oxygenation index (PO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>) in the sildenafil treatment group and the routine treatment group, the serum TNF- $\alpha$  level, circulating EPC number and in vitro function in the sildenafil

<sup>\*</sup>[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题计划项目(20130594)

<sup>\*\*</sup> 通信作者 E-mail: lioneliu@126.com

网络出版时间: 2018-06-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180618.1502.009.html>

treatment group, the routine treatment group before and after treatment, and in the normal control group at hospitalization, were detected. **Results:** Before treatment, there were no differences in the SPAP, SBP,  $\text{PaO}_2$ ,  $\text{PaCO}_2$  and  $\text{PO}_2/\text{FiO}_2$  in the sildenafil treatment group and the routine treatment group ( $P > 0.05$ ). Levels of the serum TNF- $\alpha$  in the sildenafil treatment group and the routine treatment group increased more than that in the normal control group. The number and functions including proliferation, adhesion and migration in the sildenafil treatment group and the routine treatment group decreased more than those of the controls ( $P < 0.05$ ), and there were no differences between the sildenafil treatment group and the routine treatment group ( $P > 0.05$ ). One week after treatment, the SPAP, SBP,  $\text{PaO}_2$ ,  $\text{PaCO}_2$  and  $\text{PO}_2/\text{FiO}_2$  in the sildenafil treatment group were significantly improved than those in the routine treatment group; the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The serum TNF- $\alpha$  levels in the sildenafil treatment group decreased than those in the routine treatment group; the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The number of circulating EPC, proliferation, adhesion and migration ability of circulating EPC increased more significantly than the number in the routine treatment group; the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** The mechanism of sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension is related to its inhibition of the down regulation of EPC number and function mediated by inflammation and the impairment of repair mechanism of vascular injury.

[ **Key words** ] hypertension, pulmonary; tumor necrosis factor  $\alpha$ ; inflammation; sildenafil; endothelial progenitor cell; lung circulation

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是一类以肺动脉压力持续性增高和血管重构为主要特征的疾病,内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)数量和功能的下调在许多 PH 患者和动物模型中可以见到<sup>[1-2]</sup>,并被广泛认为是 PH 进程中的关键因素,同时认为炎症在 PH 中亦发挥了重要的作用<sup>[3-4]</sup>。西地那非作为磷酸二酯酶 5 抑制剂,能够通过血管舒张作用有效降低肺动脉压、肺动脉楔压和心排出量,对 PH 具有明确的疗效,但对西地那非治疗 PH 时,对炎症介导的 EPC 数量和功能下调产生的影响,目前尚未见相关报道。本研究应用西地那非治疗 PH 患儿,同时检测患儿血清血清肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  和循环 EPC 数量及功能探讨西地那非治疗 PH 的机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 9 月~2017 年 8 月新生儿病房住院治疗的 PH 患儿 24 例,按照随机数字表法均分为西地那非治疗组和常规治疗组。常规治疗组中男 7 例、女 5 例,出生体质量( $2.61 \pm 0.53$ )kg、平均日龄( $6.84 \pm 2.33$ )h,肺动脉压( $54.33 \pm 3.71$ )mmHg;西地那非治疗组中男 6 例、女 6 例,出生体

质量( $2.53 \pm 0.42$ )kg,平均日龄( $7.32 \pm 3.14$ )h,肺动脉压( $55.20 \pm 4.32$ )mmHg。所有患儿符合中华医学会儿科学分会新生儿学组制定的诊断标准<sup>[5]</sup>。排除标准:(1)不能耐受药物治疗,(2)患有先天性心脏病、气胸、感染等,(3)存在酸碱平衡失调等其他影响研究结果的因素。选取同期入院的 12 例新生儿黄疸患儿作为正常对照组,各组的年龄、胎龄及出生体重等一般资料比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。本研究取得监护人知情同意、并获得医院伦理委员会通过。

1.2 治疗方法

常规治疗组患儿给予机械通气、多巴酚丁胺降低循环阻力、纠正酸中毒及维持水电解质平衡等常规对症支持治疗,西地那非治疗组在常规治疗的基础上给予西地那非治疗,1 mg/(kg/次),6 h/1 次,经鼻饲管注入,治疗 1 周后,行相关指标检测。

1.3 观察指标

1.3.1 临床观察 西地那非治疗组和常规治疗组患儿治疗前及治疗 1 周后,检测患儿的肺动脉压(SPAP)、体循环收缩压(SBP)、动脉血氧分压( $\text{PaO}_2$ )、二氧化碳分压( $\text{PaCO}_2$ )及氧合指数( $\text{PO}_2/\text{FiO}_2$ )。

1.3.2 外周血 TNF- $\alpha$  水平及 EPC 含量测定 正常对照组患者入院时、西地那非治疗组和常规治疗

组患儿入院时及治疗 1 周后分别采集外周血 1 mL,离心后分离血清,采用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA),应用美国 Peprotech 公司的 TNF- $\alpha$  检测试剂盒检测血清 TNF- $\alpha$  水平;同期采集抗凝血 0.2 mL,经 FITC 标记的 KDR、PE 标记的 CD34 标记后,应用流式细胞仪计数每 100 000 个单个核细胞中 EPC (CD34<sup>+</sup> VEGFR-2<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup>) 所占的比例。

**1.3.3 循环 EPC 功能检测** (1)循环 EPC 的体外培养:正常对照组患者入院时、西地那非治疗组和常规治疗组患儿入院时及治疗 1 周后分别采集抗凝血 2 mL,密度梯度离心分离单个核细胞,以内皮细胞生长培养基-2 (EGM-2,瑞士 Lonza 公司,含 5% 胎牛血清)调整细胞密度为  $2 \times 10^9$  个/L,置 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 7 d,以 DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白、FITC 标记的血凝素标记后,荧光显微镜下观察,双荧光阳性细胞即 EPC。(2)增殖能力检测:用 EGM-2 调整 EPC 密度为  $1 \times 10^8$  个/L,取 0.2 mL 接种于 96 孔板中培养 4 d,每孔加入 20  $\mu\text{L}$  四甲基偶氮唑蓝 (5 g/L) 培养 4 h,加入二甲基亚砷 100  $\mu\text{L}$ ,酶标仪检测 570 nm 时的吸光度。(3)黏附能力检测:用 EGM-2 调整 EPC 密度

为  $5 \times 10^7$  个/L,取 1 mL 接种于 24 孔板中培养 30 min,PBS 洗去未贴壁细胞,于 200 倍相差显微镜下进行细胞计数。(4)迁移能力检测:用 EBM-2 (含 0.1% 胎牛血清,无细胞因子)调整 EPC 密度为  $5 \times 10^8$  个/L,取 0.1 mL 至插入式培养皿培养 24 h,对下层细胞以 0.1% 结晶紫染色,200 倍相差显微镜下进行细胞计数。

1.4 统计学处理

正态分布的计量数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计学分析。两组样本之间的比较采用  $t$  检验,3 组样本之间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 临床疗效

治疗前,西地那非治疗组和常规治疗组患儿的 SPAP、SBP、PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub> 及 PO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> 比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。治疗 1 周后,西地那非治疗组患儿 SPAP、PaCO<sub>2</sub> 明显低于常规治疗组,SBP、PaO<sub>2</sub>、PO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> 则均高于常规治疗组,两组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 西地那非治疗组和常规治疗组患儿临床疗效比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 The comparison of clinical efficacy in the two groups of children in the sildenafil treatment group and routine treatment group

指标 (mmHg)	常规治疗组		西地那非治疗组	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
SPAP	56.22 $\pm$ 5.31	34.48 $\pm$ 3.86	55.76 $\pm$ 6.23	29.35 $\pm$ 3.23 <sup>(1)</sup>
SBP	43.12 $\pm$ 4.68	59.72 $\pm$ 6.13	44.31 $\pm$ 4.24	66.32 $\pm$ 6.47 <sup>(1)</sup>
PaO <sub>2</sub>	58.36 $\pm$ 5.42	76.27 $\pm$ 6.75	56.48 $\pm$ 5.92	87.57 $\pm$ 7.42 <sup>(1)</sup>
PaCO <sub>2</sub>	65.66 $\pm$ 7.23	47.64 $\pm$ 6.28	67.23 $\pm$ 7.55	41.54 $\pm$ 4.75 <sup>(1)</sup>
PO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	123.19 $\pm$ 36.47	218.72 $\pm$ 46.17	120.67 $\pm$ 34.53	249.31 $\pm$ 48.55 <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>与常规治疗组治疗后比较, $P < 0.05$

2.2 TNF- $\alpha$  及 EPC

**2.2.1 血清 TNF- $\alpha$  水平** 西地那非治疗组和常规治疗组患儿治疗前,血清 TNF- $\alpha$  水平均明显高于正常对照组,且西地那非治疗组和常规治疗组之间的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );治疗后,西地那非治疗组和常规治疗组患儿血清 TNF- $\alpha$  水平均有所下降,且西地那非治疗组下降更为显著,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

**2.2.2 循环 EPC 含量** 西地那非治疗组和常规治疗组患儿治疗前,循环 EPC 含量均明显低于正常对照组,且西地那非治疗组和常规治疗组之间的

差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );治疗后,西地那非治疗组和常规治疗组患儿循环 EPC 含量均有所升高,且西地那非治疗组升高更为显著,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

**2.2.3 循环 EPC 功能** 西地那非治疗组和常规治疗组患儿治疗前,循环 EPC 增殖能力、黏附能力、迁移能力均明显低于正常对照组;治疗后,西地那非治疗组和常规治疗组患儿循环 EPC 增殖能力、黏附能力、迁移能力均有所增强,且西地那非治疗组升高更为显著,两组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表2 3组儿童血清TNF-α水平、循环EPC水平及功能指标( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.2 The comparison of detection index in the three groups

指标	常规治疗组		西地那非治疗组		正常对照组
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	
TNF-α (μg/L)	2.74 ± 0.46 <sup>(1)</sup>	2.18 ± 0.32	2.78 ± 0.52 <sup>(1)</sup>	1.53 ± 0.21 <sup>(2)</sup>	1.26 ± 0.14
循环EPC含量(%)	0.15 ± 0.04 <sup>(1)</sup>	0.17 ± 0.04	0.14 ± 0.03 <sup>(1)</sup>	0.21 ± 0.05 <sup>(2)</sup>	0.23 ± 0.07
循环EPC增殖能力(吸光度)	0.50 ± 0.15 <sup>(1)</sup>	0.63 ± 0.14	0.53 ± 0.14 <sup>(1)</sup>	0.76 ± 0.15 <sup>(2)</sup>	0.78 ± 0.19
循环EPC黏附能力(个/高倍视野)	5.26 ± 1.43 <sup>(1)</sup>	8.32 ± 2.15	5.39 ± 1.65 <sup>(1)</sup>	10.58 ± 2.67 <sup>(2)</sup>	11.83 ± 2.97
循环EPC迁移能力(个/高倍视野)	6.18 ± 2.39 <sup>(1)</sup>	8.86 ± 2.43	6.27 ± 2.51 <sup>(1)</sup>	11.92 ± 2.85 <sup>(2)</sup>	12.79 ± 2.83

<sup>(1)</sup>与正常对照组比较, $P < 0.05$ ; <sup>(2)</sup>与常规治疗组治疗后比较, $P < 0.05$

3 讨论

PH是由于广泛性肺小动脉持续性收缩所导致的肺循环阻力进行性增高的恶性肺血管疾病<sup>[6-10]</sup>,随着病情进展,逐渐出现血管内膜肥厚、管腔狭窄甚至闭塞<sup>[11-13]</sup>,并最终造成右心室肥大及心力衰竭的发生。目前已初步证实,肺小动脉内皮损伤是PH发病机制中的关键环节之一<sup>[14]</sup>。循环EPC作为血管内皮损伤修复的主要因素,其数量和功能的下调在PH患者和实验动物模型中可以观察到<sup>[1-2]</sup>。此外,诱导循环EPC数量和功能的上调能够有效缓解PH血流动力学异常,并改善临床症状<sup>[15]</sup>,进一步证实循环EPC参与了PH的病理进程,并可能作为PH预后的重要预测因素。西地那非作为磷酸二酯酶5抑制剂,能够降低酯多糖诱导的肺损伤模型小鼠肺组织TNF-α水平<sup>[18]</sup>,并使PH患者的生存周期和生活质量均能够得到显著的改善,然而,经西地那非治疗后,PH新生儿血清TNF-α水平和循环EPC数量和功能的变化,目前研究甚少。本研究检测PH患儿及无PH患儿血清TNF-α水平和循环EPC数量及体外培养状态下的增殖、黏附和迁移能力等功能指标,并在常规对症支持治疗的基础上,应用西地那非对PH患儿进行治疗,观察血清TNF-α水平循环EPC数量及体外功能变化情况。结果显示,治疗前,西地那非治疗组和常规治疗组患儿血清TNF-α水平明显高于正常对照组,同时EPC数量和各项功能指标均存在不同程度的下调。尽管本研究未对PH患儿血清TNF-α和循环EPC数量功能的变化进行深入的机制研究,但仍可初步证明,炎症介导的循环EPC数量和功能的下调参与了PH的进程。经西地那非治疗1周后,与常规治疗组比较,西地那非治疗组患儿血清TNF-α水平明显降低,同时,循环

EPC数量和各项体外功能指标均显著上调,与之相对应的是,SPAP、SBP、PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>、PO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>等临床指标的恢复均明显优于常规治疗组。由此可见,西地那非在PH新生儿中的应用,能够更好的抑制体内炎症,上调循环EPC数量和功能,进而改善PH患儿的血流动力学异常,达到对PH的治疗作用。

综上所述,西地那非治疗PH的机制之一,与其具有抑制炎症介导的循环EPC数量和功能的下调及其所导致血管损伤修复机制障碍有关,进而能够有效加快受损血管内皮的修复过程,恢复肺小动脉的舒张性,改善PH患儿肺循环的血流动力学异常。然而,长期治疗过程中,循环EPC的动态变化仍需进一步研究。

4 参考文献

[1] ZHAO Y D, COURTMAN D W, DENG Y, et al. Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells; efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease [J]. Circ Res, 2005,96(4):442 - 450.

[2] DILLER G, S D, HOWARD L. Circulating endothelial progenitor cells in patients with eisenmenger syndrome and idiopathic pulmonary arterial hypertension [J]. Circulation, 2008,117(23):3020 - 3030.

[3] GAROLLA A, CHECCHIN D, et al. Reduced endothelial progenitor cell number and function in inflammatory bowel disease: a possible link to the pathogenesis [J]. Am J Gastroenterol, 2009,104(10):2500 - 2507.

[4] XU M G, MEN L N, ZHAO C Y, et al. The number and function of circulating endothelial progenitor cells in patients with Kawasaki disease [J]. Eur J Pediatr, 2010, 169(3):289 - 296.

(下转第725页)