

PH-LHD大鼠模型中肥大细胞聚集与脱颗粒的规律和时间相关性研究

张 蕙 陈良万*

(福建医科大学附属协和医院心脏外科, 福州 350001)

摘要 该文探讨左心疾病所致的肺动脉高压(pulmonary hypertension in left heart disease, PH-LHD)大鼠模型中肥大细胞(mast cell, MC)聚集与脱颗粒的规律和时间相关性。实验选取66只雄性未成年Sprague-Dawley(SD)大鼠, 随机分对照组(6只)、假手术组(6只)和模型组(54只), 对照组大鼠未做任何处理, 当天即进入实验程序; 假手术组大鼠行假手术后64 d进入实验程序; 模型组大鼠通过实施升主动脉缩窄手术来制备左心疾病所致的肺动脉高压模型, 模型组造模成功后分别在术后第1、3、5、8、15、22、36、50、64 d进入实验程序。该实验行肺组织的固定和切取并制作成病理切片, 观察肺血管周边肥大细胞的聚集与脱颗粒。结果显示, 20~50 μm 和50~100 μm 的肺血管周边, 在第36 d时均发生明显的肥大细胞聚集现象, 且以脱颗粒状态为主, 并引起了整个肺组织肥大细胞密度的明显增加。>100 μm 的肺血管周边肥大细胞的聚集发生比较迟(第50 d), 且以成颗粒状态的肥大细胞为主。在PH-LHD大鼠模型的形成过程中, 肥大细胞起到了至关重要的作用。其中直径>100 μm 的肺肌性动脉周边的肥大细胞对肺高压形成的影响较小, 而20~50 μm 和50~100 μm 的肺细血管周边的肥大细胞明显参与了肺高压的形成。

关键词 左心疾病所致的肺动脉高压; 大鼠模型; 肥大细胞; 聚集; 脱颗粒

Study on the Regularity and Temporal Correlation of Mast Cell Aggregation and Degranulation in Rat Model of Pulmonary Hypertension in Left Heart Disease

Zhang Hui, Chen Liangwan*

(Cardiac Surgery, Union Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

Abstract The article is to investigate the regularity and temporal correlation of mast cell aggregation and degranulation in rat model of pulmonary hypertension in left heart disease (PH-LHD). 66 male minor Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control group ($n=6$), sham operation group ($n=6$) and model group ($n=54$). The rats in the control group entered the experimental procedure immediately without any treatment, and the rats in the sham operation group entered the experimental procedure after 64 days of sham operation, and the rats in model group entered the experimental procedure (6 rats each) on 1, 3, 5, 8, 15, 22, 36, 50 and 64 d, respectively, after the successful of banding of the ascending aorta. The lung tissue was fixed, cut and made into pathological

收稿日期: 2017-05-03 接受日期: 2017-10-13

福建省自然科学基金(批准号: 2014J01420)和福建省卫生系统中青年骨干人才培养重点项目(批准号: 2015-ZQN-ZD-16)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18102661693, E-mail: wszhanghui7511@163.com

Received: May 3, 2017 Accepted: October 13, 2017

This work was supported by Natural Science Foundation of Fujian Province (Grant No.2014J01420) and Training Project of Young Talents in Health System of Fujian Province (Grant No.2015-ZQN-ZD-16)

*Corresponding author. Tel: +86-18102661693, E-mail: wszhanghui7511@163.com

网络出版时间: 2017-12-04 16:45:01 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171204.1644.030.html>

sections to observe the aggregation and degranulation of mast cells peripheral pulmonary vessels. Obvious mast cell aggregation was observed since 36 d in perivascular area of pulmonary arterioles with diameter 20-50 μm and 50-100 μm , and most cells were degranulated. The increased density of mast cells in whole lung tissue were observed. Mast cell aggregation was observed since 50 d in perivascular area of pulmonary arterioles with diameter >100 μm , and most cells were granulated. Mast cells played a crucial role in PH-LHD rat model. The mast cells around the pulmonary arteries with diameter >100 μm had little effect on the formation of pulmonary hypertension, but the mast cells around 20-50 μm and 50-100 μm significantly involved.

Keywords pulmonary hypertension in left heart disease; rat model; mast cells; aggregation; degranulation

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是指静息状态下肺动脉平均压 ≥ 25 mmHg^[1]。有资料显示^[2],有三分之二的慢性严重左心疾病的患者最终都会发展为肺动脉高压。这种左心疾病所致的肺动脉高压(pulmonary hypertension in left heart disease, PH-LHD)在2009年8月欧洲心脏病学会最新发布的肺动脉高压临床分类中,被列为第二类肺动脉高压^[3],在临床上比单纯的动脉型肺动脉高压还要多见,患病率与死亡率与日俱增^[4]。有研究表明,肺血管重构在PH-LHD的病理生理过程中起着重要作用^[5],且肥大细胞(mast cell, MC)是肺血管重构的重要促进者^[6]。近年来的研究表明^[7],作用于肥大细胞和肥大细胞源性介质的一些手段可能会对肺高压的治疗提供一些全新的治疗思路。本研究通过制作PH-LHD大鼠模型,希望能够发现PH-LHD中肥大细胞聚集与脱颗粒的规律性和时间相关性,为肺动脉高压患者实施针对肥大细胞的一系列干预措施提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性未成年Sprague-Dawley(SD)大鼠66只,体重80~100 g,来自查理斯河实验室(Sulmefeld, 德国),饲养在恒温(22 $^{\circ}\text{C}$)的环境下,喂标准颗粒饲料,自由饮水。所有的动物遵循实验室动物使用和保护指南(Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy Press, Washington DC, 1996)。该研究取得当地政府动物保护和使用委员会的批准(LACeSo Berlin Germany)。

1.2 主要仪器设备、药品及试剂

实验仪器设备包括:动物呼吸机(4601-1, TSE system GmbH, Bad Homburg, 德国)、多功能电生理记录仪(HSE Type 705/1, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, 德国)血流动力学分析软件

(DasyLah TM32, Moenchgladbach, 德国)、光学显微镜(BX50, Olympus, Ballerup, 德国)、光学显微镜拍照及分析系统(Cast version 2.1.6.1, Olympus)、离心机(centrifuge5418R, eppendorf, 德国)、米勒导管(Mikro-Tip[®] catheter transducers, Houston, 美国)、石蜡标本脱水机(英国Shadon Pathcentre公司)、石蜡包埋机(英国Shadon Pathcentre公司)、石蜡连续切片机[德国Mi-crom(HM340E)公司]、冰箱(中国海尔BCD-258A/C)、天平(E200, Sartorius, 德国)、电子天平(CP225D, Sartorius, 德国)、恒温水槽DKB-501A型(上海精宏设备有限公司)、超低温冰箱VXE380(法国Joudan公司)。

实验药品和试剂包括:氯胺酮(Pharmacia, Erlangen)、甲苯噻嗪(Bayer-Schering, Leverkusen)、卡洛芬(Rimadyl[™], Pfizer GmbH, Karlsruhe)、钛夹(Hemoclip[™], Weck closure system, Research Triangle Park)、10% poly-L-lysine(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Munich)、松节油、伊红染料、苏木素染料、苏木素染色液(南京建成生物科技有限公司)。

1.3 方法

实验随机分为3个大组:第1组($n=6$)为G0对照组,指大鼠未做任何处理,当天即进入实验程序;第2组($n=6$)为G64 sham组,即假手术组,指大鼠行假手术后64 d进入实验程序;第3组为模型组,指大鼠先通过实施升主动脉缩窄手术(banding of the ascending aorta)来制备左心疾病所致的肺动脉高压模型之后,再按照观察的时间点(术后第1、3、5、8、15、22、36、50、64 d)分为9个小组,即G1、G3、G5、G8、G15、G22、G36、G50、G64组,然后每个小组($n=6$)依据观察的时间顺序分别进入实验程序。

1.4 模型制备

雄性未成年SD大鼠(体重80~85 g)行冠状动脉

开口以上的升主动脉缩窄手术来获得左心疾病所致的肺动脉高压模型。大鼠先仔细称重,依体重经腹腔注射氯胺酮(87 mg/kg)和甲苯噻嗪(13 mg/kg)的混合液行麻醉后,胶布固定大鼠于仰卧位,宽胶带固定于腹部以限制大量气体进入胃部,涂上眼膏防止眼干燥,用镊子将舌头轻轻拉出口腔以防比舌后坠和气道堵塞,100%氧气经鼻导管行手动控制通气,备皮消毒,经胸骨左缘第三肋间隙进胸,用开胸器撑开切口,轻轻地拨开并切除部分胸腺组织,分离和暴露升主动脉,用自制的主动脉钩在远离冠状动脉开口处挑起升主动脉,并迅速环绕升主动脉植入一个事先依据大鼠体重设定好内径(0.8 mm)的钛夹(Hemoclip™)以缩窄升主动脉的口径。在此过程注意手动过度通气,以免大鼠因人工气胸和肺萎陷而导致低氧血症和呼吸心跳骤停。在确认没有明显出血后于吸气末闭合胸腔,无菌外科逐层缝合切口。手术结束后将大鼠按照实验需要观察的时间分别放回各自的笼子,等待麻醉后苏醒。术后均喂标准颗粒饲料,自由饮水。术后前3 d,每天给予皮下注射卡洛芬(4 mg/kg)行术后镇痛。假手术组大鼠虽然也开胸分离升主动脉,但是钛夹并没有植入在升主动脉上,而是固定在周围的纵隔组织上,其余术后处理同模型组。

1.5 肥大细胞聚集和脱颗粒的分析

肥大细胞的染色制作,既把石蜡包埋的肺组织进行脱蜡,再水化和0.05%的甲苯胺蓝孵化3 min。肺组织切片使用甲苯胺蓝染色,在40倍目镜的光学显微镜下观测肥大细胞的聚集和脱颗粒。肥大细胞的密度测定就是数出整个肺组织切片中甲苯胺蓝染色阳性的肥大细胞的数目,然后用每平方毫米的肺组织切片面积中含有的肥大细胞数目来表示。血管周边的肥大细胞按照不同的血管直径(20~50 μm、50~100 μm、>100 μm)来分别测定,用每个血管周边聚集的肥大细胞数目来表示。每个肥大细胞按照是否分泌性颗粒被挤压出来而区分为成颗粒和脱颗粒。计算脱颗粒百分比来了解脱颗粒的情况,用脱颗粒的肥大细胞数目与脱颗粒和成颗粒肥大细胞数之和的百分比值来表示[degranulate/(granulate+degranulate)]%。

1.6 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行数据处理。计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,两组间数据比较采用 t 检验,多组间数据比较采用 F 检验。取 $P<0.05$ 为差异具有统计

学意义。

2 结果

2.1 升主动脉缩窄术后肥大细胞在整个肺组织的密度变化

实验结果显示,肥大细胞在整个肺组织的密度从第1 d到第64 d先升高后下降。统计后发现,各组间存在差异($F=6.793, P<0.05$),但是模型组中只有G22组和G36组与G0对照组比较存在统计学差异($t=4.512, 5.671, P<0.05$),也既在升主动脉缩窄术后只有第22 d和第36 d,肺组织中肥大细胞的密度是增加的。G64组和G64 sham组比较没有统计学意义($t=0.642, P>0.05$)(表1)。

2.2 升主动脉缩窄术后不同直径血管周边肥大细胞的聚集状况

本实验对3种不同直径的肺小血管(20~50 μm、50~100 μm、>100 μm)周边的肥大细胞进行计数,用每个血管周边聚集的肥大细胞的数目来表示肥大细胞在肺血管周边聚集的情况。结果如下所示。(1)20~50 μm肺血管:各组间存在差异($F=3.702, P<0.05$),但是模型组中只有G36组和G0对照组存在统计学差异($t=4.525, P<0.05$);G64组和G64 sham组比较没有统计学意义($t=0.862, P>0.05$);(2)50~100 μm肺血管:各组间存在差异($F=3.224, P<0.05$),但是模型组中只有G36组和G0对照组存在统计学差异($t=5.265, P<0.05$),G64组和G64 sham组比较无统计学意义($t=0.703, P>0.05$);(3)>100 μm肺血管:各组间存在差异($F=3.502, P<0.05$),但是模型组中只有G50组和G0对照组存在统计学差异($t=3.462, P<0.05$),G64组和G64 sham组比较无统计学意义($t=0.524, P>0.05$,表2和图1~图3)。

2.3 升主动脉缩窄术后不同直径血管周边肥大细胞的脱颗粒状况

表3和图4~图6结果显示如下。(1)20~50 μm肺血管:各组间存在差异($F=3.813, P<0.05$),但是模型组中只有G36组和G0对照组存在统计学差异($t=4.513, P<0.05$),G64组和G64 sham组比较无统计学意义($t=0.11, P>0.05$);(2)50~100 μm肺血管:各组间存在差异($F=2.034, P<0.05$),但是模型组中只有G36组和G0对照组存在统计学差异($t=4.157, P<0.05$),G64组和G64 sham组比较无统计学意义($t=2.04, P>0.05$);(3)>100 μm肺血管:各组间不存在

表1 升主动脉缩窄术后肥大细胞在整个肺组织的密度变化($\bar{x}\pm s$)Table 1 The density changes of mast cells in the whole lung tissue after banding surgery ($\bar{x}\pm s$)

组别 Group	数量(<i>n</i>) Quantity (<i>n</i>)	肥大细胞密度(个/mm ²) Mast cell density (a/mm ²)
G0	6	0.613±0.052
G1	6	0.618±0.053
G3	6	0.621±0.055
G5	6	0.631±0.057
G8	6	0.637±0.059
G15	6	0.642±0.061
G22	6	1.133±0.097
G36	6	1.243±0.102
G50	6	0.671±0.062
G64	6	0.682±0.063
G64 sham	6	0.678±0.064
<i>F</i>		6.793
<i>P</i>		0.019

分别从G1组~G64组与G0对照组进行两两比较, 仅有G22组和G36组与G0对照组的差异具有统计学意义($t=4.512$ 、 $t=5.671$, $P<0.05$); G64组和G64 sham组比较, 差异不大($t=0.642$, $P<0.05$), 不具有统计学意义。

The G0 group was compared with each other from G1 group to G64 group respectively, only G22 group and G36 group had significant difference with G0 group ($t=4.512$, $t=5.671$, $P<0.05$). Compared with G64 sham group, the difference was not significant ($t=0.642$, $P<0.05$).

表2 升主动脉缩窄术后肥大细胞在血管周边的聚集状况($\bar{x}\pm s$)Table 2 The aggregation status of mast cells around the blood vessels after banding surgery ($\bar{x}\pm s$)

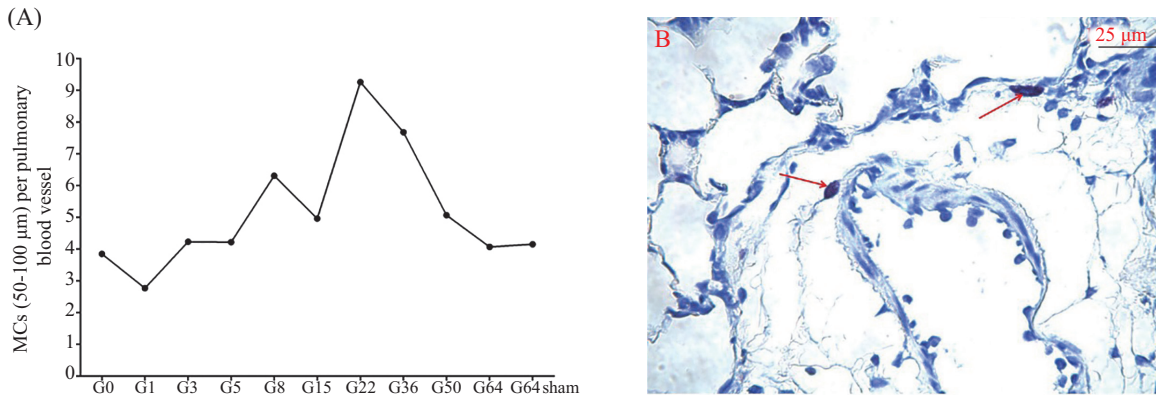
组别 Group	数量(<i>n</i>) Quantity (<i>n</i>)	20~50 μm肺小血管周边 (个/每根肺血管)	50~100 μm肺小血管周边 (个/每根肺血管)	>100 μm肺小血管周边 (个/每根肺血管)
		20-50 μm peripheral pulmonary artery (one per pulmonary artery)	50-100 μm peripheral pulmonary artery (one per pulmonary artery)	>100 μm around the pulmonary vessels (one per pulmonary artery)
G0	6	5.85±0.48	3.85±0.30	7.88±0.27
G1	6	4.75±0.46	2.77±0.29	2.27±0.29
G3	6	4.85±0.42	4.23±0.32	4.11±0.20
G5	6	6.89±0.50	4.22±0.33	7.93±0.25
G8	6	6.68±0.51	6.31±0.34	12.04±0.26
G15	6	6.79±0.53	4.96±0.36	11.67±0.32
G22	6	7.18±0.47	9.26±0.35	8.02±0.31
G36	6	9.25±0.82	7.68±0.75	13.56±0.35
G50	6	5.35±0.49	5.07±0.40	8.73±0.68
G64	6	5.07±0.52	4.07±0.42	5.85±0.37
G64 sham	6	4.85±0.56	4.15±0.48	4.55±0.34
<i>F</i>		3.702	3.224	3.502
<i>P</i>		0.027	0.038	0.034

差异($F=1.670$, $P>0.05$), G64组和G64 sham组比较无统计学意义($t=0.322$, $P>0.05$)。

3 讨论

肥大细胞是一种具有强嗜碱性颗粒的组织细胞, 分为结缔组织肥大细胞和黏膜肥大细胞。它存

在于组织内, 分布在呼吸道、消化道黏膜及皮肤、浆膜、血管、淋巴管、末梢神经周围的结缔组织中。在生理情况下, 它们通过其释放的介质——组胺、肝素以及分泌的细胞因子——白细胞介素-3、4、5、6和GM-CSF等参与免疫调节、抗凝、组织修复等生理活动。其中, 组胺是一种肺静脉血管收缩剂,

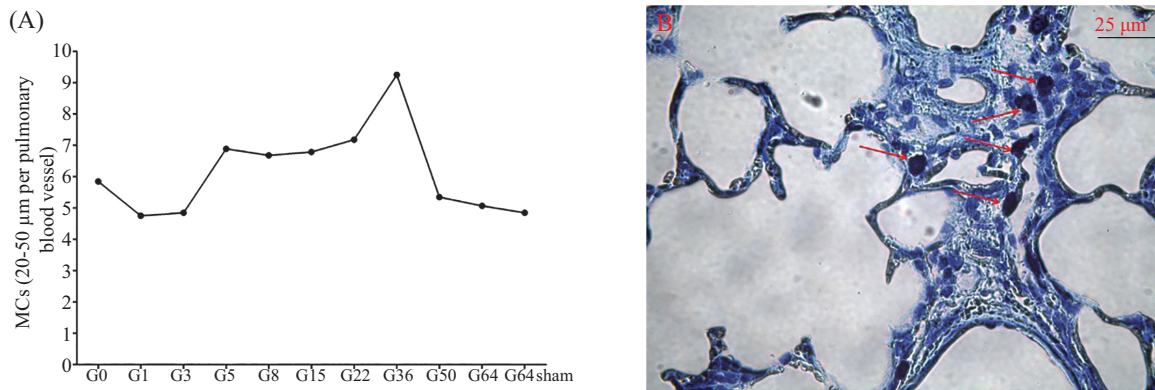


A: 肺小血管(20~50 μm)周边的肥大细胞进行计数升主动脉缩窄术后肥大细胞在血管周边的聚集分布情况; B: 肥大细胞在血管周边的聚集状况, 红色箭头表示肥大细胞。

A: mast cells around the small pulmonary arteries (20-50 μm) were counted for the distribution of mast cells around the perivascular ascending aorta. B: the mast cells gathered around the perivascular area. The red arrows indicate the mast cells .

图1 肥大细胞在肺血管(20~50 μm)周边聚集情况

Fig.1 The aggregate situation of mast cells around the pulmonary vessels (20-50 μm)

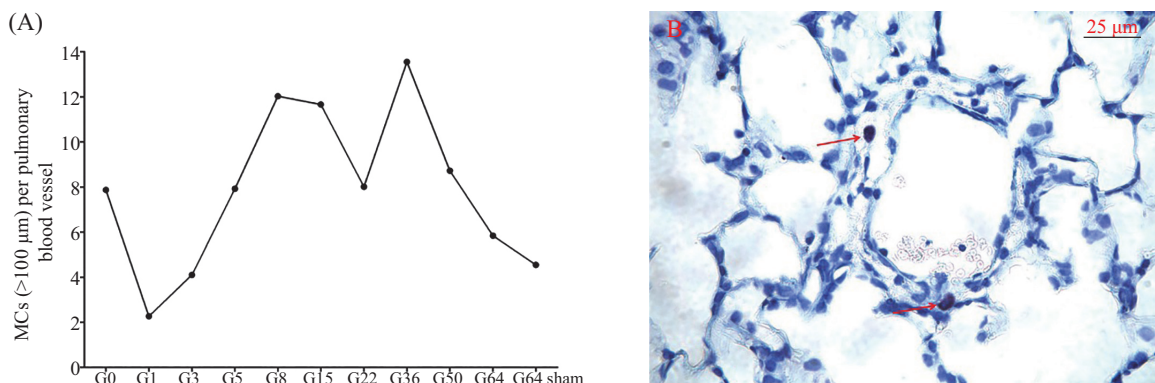


A: 肺小血管(50~100 μm)周边的肥大细胞进行计数升主动脉缩窄术后肥大细胞在血管周边的聚集分布情况; B: 肥大细胞在血管周边的聚集状况, 红色箭头表示肥大细胞。

A: mast cells around the small pulmonary blood vessels (50-100 μm) were counted for the distribution of mast cells around the perivascular ascending aorta; B: the mast cells gathered around the perivascular area. The red arrows indicate the mast cells .

图2 肥大细胞在肺血管(50~100 μm)周边聚集情况

Fig.2 The aggregate situation of mast cells around the pulmonary vessels (50-100 μm)



A: 肺小血管(>100 μm)周边的肥大细胞进行计数升主动脉缩窄术后肥大细胞在血管周边的聚集分布情况; B: 肥大细胞在血管周边的聚集状况, 红色箭头表示肥大细胞。

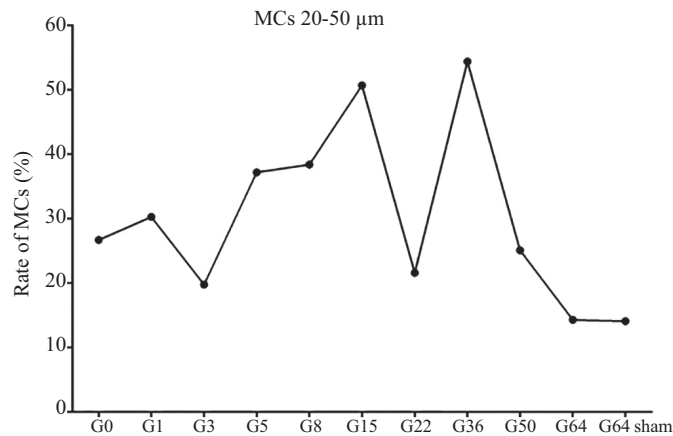
A: mast cells around the small pulmonary blood vessels (>10 μm) were counted for the distribution of mast cells around the perivascular ascending aorta; B: the mast cells gathered around the perivascular area. The red arrows indicate the mast cells .

图3 肥大细胞在肺血管(>100 μm)周边聚集情况

Fig.3 The aggregate situation of mast cells around the pulmonary vessels (>100 μm)

表3 升主动脉缩窄术后不同直径血管周边肥大细胞的脱颗粒状况($\bar{x}\pm s$)

组别 Group	数量(<i>n</i>) Quantity (<i>n</i>)	20~50 μm 肺小血管周 边脱颗粒百分比(%)	50~100 μm 肺小血管周 边脱颗粒百分比(%)	>100 μm 肺小血管周 边脱颗粒百分比(%)
		The percentage of degranulation around 20-50 μm pulmonary blood vessels (%)	The percentage of degranulation around 50-100 μm pulmonary blood vessels (%)	The percentage of degranulation around >100 μm pulmonary blood vessels (%)
G0	6	26.76 \pm 0.13	22.36 \pm 0.17	9.87 \pm 0.15
G1	6	30.37 \pm 0.14	19.64 \pm 0.15	24.32 \pm 0.21
G3	6	19.82 \pm 0.12	33.46 \pm 0.13	34.21 \pm 0.17
G5	6	37.28 \pm 0.16	29.55 \pm 0.14	34.06 \pm 0.14
G8	6	38.44 \pm 0.10	29.26 \pm 0.16	20.14 \pm 0.18
G15	6	50.74 \pm 0.22	50.34 \pm 0.20	42.73 \pm 0.19
G22	6	21.60 \pm 0.17	37.63 \pm 0.21	33.25 \pm 0.22
G36	6	54.42 \pm 0.18	59.72 \pm 0.25	38.31 \pm 0.25
G50	6	25.17 \pm 0.20	36.12 \pm 0.27	24.20 \pm 0.27
G64	6	14.32 \pm 0.19	29.71 \pm 0.19	13.98 \pm 0.18
G64 sham	6	13.15 \pm 0.23	18.50 \pm 0.18	16.19 \pm 0.20
<i>F</i>		3.813	2.034	1.670
<i>P</i>		0.017	0.024	0.214

图4 20~50 μm 肺血管周脱颗粒以及肥大细胞百分比Fig.4 The percentage of degranulation and mast cells around 20-50 μm pulmonary blood vessels

5-羟色胺对肺动脉血管收缩和平滑肌细胞增殖起到关键作用。肥大细胞还激活肾素-血管紧张素系统,释放肾素和肥大细胞类糜蛋白酶,将血管紧张素I转换为血管紧张素II。肥大细胞类糜蛋白酶也将前基质金属蛋白酶9(pro-MMP-9)转化为活化型基质金属蛋白酶9(MMP-9),这是一种肺动脉高压相关的生物标志物。肥大细胞进一步产生基质金属蛋白酶13(MMP-13)、血小板衍生生长因子、转化生长因子- β (TGF- β),可刺激平滑肌细胞增殖。肥大细胞分泌的激活素A,是TGF- β 超家族的一个成员,它在发

生肺高压时增高并再次促进平滑肌细胞增殖。肥大细胞的这些生理特性均牵涉到肺高压的发病机制,因此肥大细胞不仅在过敏性和非过敏性免疫反应中起关键作用,还在心血管疾病和肺动脉高压中起作用。

Heath等^[8]发现,在原发性丛状肺动脉病、肺动脉高压、先天性心脏病相关的早期的肺血管性疾病中均存在肺肥大细胞聚集现象。Miyata等^[9]发现,在野百合碱诱导的肺高压大鼠模型中同样也观察到肥大细胞在肺组织中聚集,包括支气管周边、肺血管

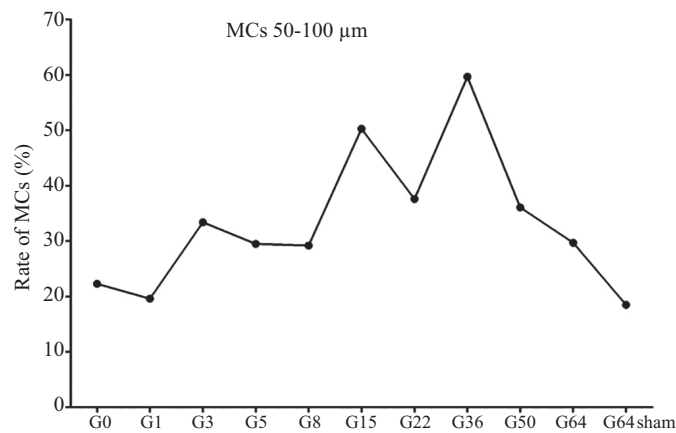


图5 50~100 μm肺血管周脱颗粒以及肥大细胞百分比

Fig.5 The percentage of degranulation and mast cells around 50-100 μm pulmonary blood vessels

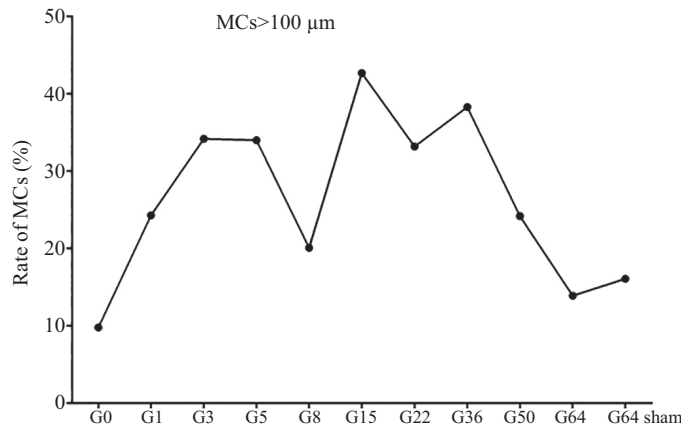


图6 >100 μm肺血管周脱颗粒以及肥大细胞百分比

Fig.6 The percentage of degranulation and mast cells around >100 μm pulmonary blood vessels

周边以及肺泡隔区域等,尤其是在肺血管周边肥大细胞明显的聚集并且多以脱颗粒的形式存在。研究表明,肥大细胞的增殖对肺动脉高压的发展起到一个非常关键的作用。Bhola等^[10]在实验中又证实了肥大细胞的脱颗粒现象归因于野百合碱对肺血管的强有力的毒副作用,从而导致激进的组织损伤和炎症过程以及肺血管压力及阻力的增加。实验中还发现,预防性使用肥大细胞稳定剂色甘酸钠对模型进行干预治疗可以明显缓解肺高压的程度和肺血管重构,这是因为肥大细胞激活和脱颗粒时会释放多种介质,包括5-羟色胺、细胞因子(如IL-6、IL-13)、丝氨酸蛋白酶(如糜蛋白酶)和基质金属蛋白酶(如MMP-13)等^[11-12]。值得注意的是,这些介质在肺动脉高压的发病机制和肺血管重构中发挥重要的作用^[13-15]。

肥大细胞在许多炎症性疾病和组织重构中发

挥重要的角色和作用。Maxová等^[16]在缺氧性肺动脉高压(HPH)的模型研究中发现,组织的缺氧是和肥大细胞的激活以及蛋白水解酶类、血管源性和在多种生理和病理学条件下介导组织的破坏和重构的生长因子等的释放有关。2012年, Bartelds等^[17]利用野百合碱注射联合体腔分流手术来制作动脉型肺动脉高压的大鼠模型。他们使用肥大细胞稳定剂色甘酸钠和糜蛋白酶抑制剂(TY-51469)来进行干预和治疗,前者可以缓解肺血管的重构,后者不仅可以缓解肺血管的重构还能改善血流动力学。研究结果证实了使用肥大细胞稳定剂(目前在临床上已经获得批准)对动脉型肺动脉高压进行抗炎治疗可以缓解疾病的进展。

Hoffmann等^[18]在左心疾病相关肺动脉高压的大鼠模型中也观察到肥大细胞聚集和脱颗粒,同时

还证明了阻止肥大细胞脱颗粒可以减轻肺动脉高压和肺血管的重构。实验还发现,使用肥大细胞稳定剂酮替芬(具有阻止肥大细胞脱颗粒的作用)或使用肥大细胞缺失鼠(*W_s/W_s*)都能够缓解肺高压以及肺血管重构。在升主动脉缩窄术后的模型中肥大细胞局部化和偶然发生的血管栓塞和微血管出血没有直接的关系,这表明,这些病理并不是肥大细胞聚集的主要触发机制。

至此,“肥大细胞可能促进肺动脉高压的发展”的假想终于得到了证实。肥大细胞被誉为肺动脉高压中肺血管重构的催化剂。肥大细胞和肥大细胞源性的介质可能对肺高压的治疗提供了一个具有前景的治疗方法。但是,肥大细胞在肺动脉高压中的作用机制尚未完全明了。未来在体内和体外的研究对理解肥大细胞在何时、何地、如何促进血管重构和肺动脉高压是很重要的,这些研究自然包括和肥大细胞作用相关的细胞内和细胞间的信号转导等。虽然肺动脉高压的动物模型和/或人类的肺组织标本中血管周边肥大细胞亚群的详细的特征和分子表达方式有望为肥大细胞介导的肺血管重构根本的机制提供相关的深刻见解,但是目前我们仍然缺乏相关的数据和证据的支持。令人欣慰的是,已被公认是肺血管重构的重要促进者的肥大细胞已经引发一系列关于肺高压治疗的新策略,例如,临床批准的肥大细胞稳定剂、肥大细胞释放的特定成分的抑制剂、阻止骨髓衍生的肥大细胞或肥大细胞前体的动员的定向干预措施、阻止肥大细胞的黏附和在海部的聚集等^[19]。

2011年, Bhola等^[20]对肥大细胞在野百合碱诱发的肺动脉高压大鼠的发病机制中的作用进行病理生理学方面的展望和揭示。研究结果表明,肥大细胞的聚集和激活促进了肺动脉高压的发展,而且对野百合碱诱发的肺动脉高压大鼠实施肥大细胞稳定剂的干预治疗时,只有早期介入的干预治疗(即造模后第1 d到第21 d)有效,而后期的干预治疗(即造模后第21 d到第35 d)却是无效的。此外, Hassoun等^[21]也认为,当野百合碱成功诱发肺动脉高压形成之后,肥大细胞不再具有对肺动脉高压发病机制的调节作用,而此时发挥作用的可能是各种生长因子、酶类、炎症介质等。但是,当大鼠因刺激(包括缺氧和野百合碱)诱发了肺动脉高压时,肥大细胞脱颗粒的抑制剂终究只能改善肺动脉高压,而不能阻止肺动脉高压

的发生^[22]。

本实验旨在探索肥大细胞怎样、何时、何处促进肺动脉高压和肺血管重塑来选择肥大细胞对肺动脉高压进行干预和治疗的最佳时间点或时间段。实验结果表明,实验动物实施升主动脉缩窄术后,肺组织内肥大细胞的密度只有在第22 d和第36 d是增加的,而20~50 μm 和50~100 μm 这两种口径的肺血管周边仅在第36 d出现明显的肥大细胞聚集,而且均是以脱颗粒状态的肥大细胞为主(前者达54.52%±0.18%,后者达到57.22%±0.25%),而>100 μm 的肺血管周边仅到第50 d才出现明显的肥大细胞聚集,且脱颗粒状态的肥大细胞并没有占多数。

从本实验阅片的结果推测,在肺动脉高压模型渐渐形成的过程中,肥大细胞在肺组织中密度的增加只发生有第22 d和第36 d,其中第22 d主要是源于支气管旁、被膜下、肺泡隔等的肥大细胞数目的增多,而第36 d主要是源于20~50 μm 和50~100 μm 这两种肺血管周边肥大细胞的聚集,且这种聚集的同时已经同步完成了肥大细胞的脱颗粒行为,即肥大细胞主要是以脱颗粒的状态在肺血管周边聚集。然而,>100 μm 的肺血管(即肺肌性动脉)周边肥大细胞的聚集发生比较迟(第50 d),且并不以脱颗粒状态的肥大细胞为主。

综上所述,在PH-LHD大鼠模型的形成过程中,肥大细胞起到了至关重要的作用。其中直径>100 μm 的肺肌性动脉周边的肥大细胞对肺动脉高压形成的影响较小,而20~50 μm 和50~100 μm 的肺细血管周边均发生了明显的肥大细胞聚集及脱颗粒现象,参与了肺动脉高压的形成。

参考文献 (References)

- 1 Ghio S, Gavazzi A, Campana C, Inseera C, Klersy C, Sebastiani R, *et al.* Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37(1): 183-8.
- 2 Tampakakis E, Leary PJ, Selby VN, De Marco T, Cappola TP, Felker GM, *et al.* The diastolic pulmonary gradient does not predict survival in patients with pulmonary hypertension due to left heart disease. *JACC Heart Fail* 2015; 3(1): 9-16.
- 3 Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, *et al.* Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54(1): 43-54.
- 4 Gerges C, Gerges M, Lang MB, Zhang Y, Jakowitsch J, Probst P, *et al.* Diastolic pulmonary vascular pressure gradient: a predictor of prognosis in “out-of-proportion” pulmonary hypertension. *Chest* 2013; 143(3): 758-66.

- 5 Kerem A, Yin J, Kaestle SM, Hoffmann J, Schoene AM, Singh B, *et al.* Lung endothelial dysfunction in congestive heart failure. Role of impaired Ca^{2+} signaling and cytoskeletal reorganization. *Circ Res* 2010; 106(6): 1103-16.
- 6 Savale L, Tu L, Rideau D, Izziki M, Maitre B, Adnot S, *et al.* Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respir Res* 2009; 10(1): 6-16.
- 7 Voelkel NF, Tamosiuniene R, Nicolls MR. Challenges and opportunities in treating inflammation associated with pulmonary hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2016; 14(8): 939-51.
- 8 Heath D. Mast cells in the human lung at high altitude. *Int J Biometeorol* 1992; 36(4): 210-3.
- 9 Miyata N, Gon Y, Nunomura S, Endo D, Yamashita K, Matsumoto K, *et al.* Inhibitory effects of parthenolide on antigen-induced microtubule formation and degranulation in mast cells. *Int Immunopharmacol* 2008; 8(6): 874-80.
- 10 Dahal BK, Heuchel R, Pullamsetti SS, Wilhelm J, Ghofrani HA, Weissmann N, *et al.* Hypoxic pulmonary hypertension in mice with constitutively active platelet-derived growth factor receptor- β . *Pulm Circ* 2011; 1(2): 259-68.
- 11 Gilfillan AM, Rivera J. The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunol Rev* 2009; 228(1): 149-69.
- 12 Vajner L, Vytásek R, Lachmanová V, Uhlík J, Konrádová V, Novotná J, *et al.* Acute and chronic hypoxia as well as 7-day recovery from chronic hypoxia affects the distribution of pulmonary mast cells and their MMP-13 expression in rats. *Int J Exp Pathol* 2006; 87(5): 383-91.
- 13 Hecker M, Zaslona Z, Kwapiszewska G, Niess G, Zakrzewicz A, Hergenreider E, *et al.* Dysregulation of the IL-13 receptor system: a novel pathomechanism in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182(6): 805-18.
- 14 Lepetit H, Eddahibi S, Fadel E, Frisdal E, Munaut C, Noel A, *et al.* Smooth muscle cell matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2005; 25(5): 834-42.
- 15 Mitani Y, Ueda M, Maruyama K, Shimpo H, Kojima A, Matsumura M, *et al.* Mast cell chymase in pulmonary hypertension. *Thorax* 1999; 54(1): 88-90.
- 16 Maxová H, Herget J, Vizek M. Lung mast cells and hypoxic pulmonary hypertension. *Physiol Res* 2012; 61(1): 1-11.
- 17 Bartelds B, van Loon RLE, Mohaupt S, Wijnberg H, Dickinson MG, Boersma B, *et al.* Mast cell inhibition improves pulmonary vascular remodeling in Pulmonary hypertension. *Chest* 2012; 141(3): 651-60.
- 18 Palaniyandi SS, Inagaki K, Mochly-Rosen D. Mast cells and epsilon PKC: a role in cardiac remodeling in hypertension-induced heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45(6): 779-86.
- 19 Savai R, Pullamsetti SS, Kolbe J, Bieniek E, Voswinckel R, Fink L, *et al.* Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186(9): 897-908.
- 20 Dahal BK, Kosanovic D, Kaulen C, Cornitescu T, Savai R, Hoffmann J, *et al.* Involvement of mast cells in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Respir Res* 2011; 2(12): 60-6.
- 21 Hassoun PM, Mouthon L, Barberà JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, *et al.* Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54(1): 10-9.
- 22 Klein M, Schermuly RT, Schafer S. Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling. *Circulation* 2008; 118(20): 2081-90.