

大鼠左全肺切除促进肺血管重塑

许果¹, 赵兴吉^{2*}, 向小勇³, 王继相¹, 余凯¹

(1. 四川绵阳四〇四医院胸心外科, 四川绵阳 621000; 2. 重庆市急救医疗中心胸心外科, 重庆 400014;
3. 重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆 400016)

【摘要】 目的 探讨大鼠左全肺切除后是否导致肺血管重塑, 以及低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 和血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 在肺血管重塑中的作用。方法 切除大鼠左全肺建立动物模型, 12 周后检测平均肺动脉压 (mPAP) 和动脉血氧分压 (PaO₂), 在电镜、光镜下观察大鼠肺小血管结构改变, 计算其肌型动脉 (MA)、部分肌型动脉 (PMA)、非肌型动脉 (NMA)、中膜厚度 (MTV)、中膜面积 (MAV) 及其百分比作为肺血管重塑指标。通过免疫组化检测 HIF-1 α 和 VEGF 在肺动脉管壁的表达。结果 实验组 mPAP、MA%、PMA%、MTV、MAV、MTV% 和 MAV% 明显高于对照组 ($P < 0.01$), PaO₂、NMA% 明显低于对照组 ($P < 0.01$)。实验组肺动脉壁 HIF-1 α 及 VEGF 的 IOD 值 (26.47 \pm 4.16, 42.04 \pm 3.79) 明显高于对照组 (6.12 \pm 2.14, 11.53 \pm 2.29) ($P < 0.01$)。相关分析表明, HIF-1 α 及 VEGF 的表达强度与 PaO₂ 呈负相关, 与 MTV% 及 MAV% 呈正相关, HIF-1 α 与 VEGF 的表达强度呈正相关。结论 通过大鼠左全肺切除可以建立肺血管重塑动物模型。低氧血症是大鼠左全肺切除后肺血管重塑的重要因素, HIF-1 α 与 VEGF 在低氧导致的肺血管重塑过程中起着重要作用。

【关键词】 肺血管重塑; 动物模型; 低氧诱导因子-1 α ; 血管内皮细胞生长因子

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)04-0415-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.04.016

Pulmonary vascular remodeling after left lung pneumectomy in rats

XU Guo¹, ZHAO Xing-ji^{2*}, XIANG Xiao-yong³, WANG Ji-xiang¹, SHE Kai¹

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, 404 Hospital, Mianyang, Sichuan 621000, China;
2. Department of Cardiothoracic Surgery, Chongqing Emergency Medical Center, Chongqing 400014;
3. Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016)

【Abstract】 Objective To investigate the existence of pulmonary vascular remodeling after left pneumectomy in rats and the role of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in pulmonary vascular remodeling. **Methods** Twenty-four healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into experimental and control groups, 12 in each group. The rat models of pulmonary vascular remodeling were created by open-chest left pneumectomy. After 12 weeks of feeding, the mean pulmonary artery pressure (mPAP) and partial pressure of arterial oxygen (PaO₂) of each rat were measured. The ultrastructure of small arteries in the lung specimens were examined by electron microscopy. Muscularized degree of three kinds of small pulmonary vessels (muscularized artery MA, partially muscularized artery PMA, and non-muscularized artery NMA) were observed by light microscopy, and the percentage of each kind of pulmonary arteries (MA%, PMA%, NMA%) were calculated. Arterial external diameter, media thickness of vessel (MTV), total vascular area, media area of vessel (MAV), MTV% and MAV% were calculated as indicators of pulmonary vascular remodeling. The expressions of HIF-1 α and VEGF in artery were detected by immunohistochemistry. **Results** The values of mPAP, MA%, PMA%, MTV, MAV, MTV% and MAV% in the experimental group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$), but the value of PaO₂ and NMA% were significantly lower than those in the control group ($P < 0.01$). The IOD value of HIF-1 α and VEGF expressed in the pulmonary arterial wall of the

[作者简介] 许果 (1975 -), 男, 主治医师, 硕士, 主要从事肺动脉高压方面研究。

[通讯作者] 赵兴吉, Tel: 13908316551; Email: zxj60918@sina.com.

experimental group were 26.47 ± 4.16 and 42.04 ± 3.79 , respectively, significantly higher than those in the control group (6.12 ± 2.14 and 11.53 ± 2.29 , $P < 0.01$). Linear correlation analysis showed that the expression of HIF-1 α and VEGF was positively correlated with MTV% and MAV%, negatively correlated with PaO₂, and the HIF-1 α expression was positively correlated with VEGF expression. **Conclusions** A rat model of pulmonary vascular remodeling can be successfully established by left pneumonectomy. Hypoxia is a key factor in the development of pulmonary vascular remodeling, HIF-1 α and VEGF may play an important role in its pathogenesis.

【Key words】 Pulmonary vascular remodeling; Animal model; Hypoxia inducible factor-1 α ; Vascular endothelial growth factor; Surgery; Pneumonectomy, left lung; Rat

肺切除是临床上治疗肺部疾病的一种重要手段,随着肺癌和肺结核发病率的增加,以及治疗手段的进步,全肺切除的比例有所增加^[1,2]。现有关全肺切除的研究主要是围手术期处理,对术后远期疗效的评价缺乏病理学依据。本实验通过切除大鼠左全肺建立动物模型,以模拟临床全肺切除术后的病理生理改变,了解远期是否发生肺血管重塑和肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH),探讨肺血管重塑可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只,2~3 月龄,体重(248 ± 26)g,购自重庆医科大学实验动物中心[SCXK(渝)2007-0001]。实验场地由重庆医科大学实验动物中心提供[SYXK(渝)2007-0001]。随机分为 2 组:实验组 12 只,行左全肺切除;对照组 12 只,行假手术。术后饲养 12 周。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立

3.5% 水合氯醛腹腔注射麻醉,行气管切开,置入自制气管导管,接小动物呼吸机。沿左胸第五肋间进入胸腔,切除左全肺。对照组麻醉同前,切口至壁层胸膜后,保持其完整,不入胸腔,缝合切口。

1.2.2 肺动脉压力测定

采用右心导管法测定平均肺动脉压(mPAP)。

1.2.3 动脉血氧分压(PaO₂)测定

从左心室抽血,用于测定 PaO₂。

1.2.4 电镜标本制备及观察

切除右肺,从外周部位及肺门水平切取 2~3 块 1~2 mm 组织块,处理后在电镜下观察肺腺泡内动脉内皮细胞和平滑肌细胞的大小、形态、排列形式、细胞内部结构的变化、表型的转化等。

1.2.5 光镜标本制备及观察

肺组织标本用 4% 中性甲醛固定,用石蜡包埋,

沿右肺门横断取材,分别作 HE 及免疫组化染色。

(1) 三型肺小血管不同肌化程度百分比的测定:在 400 倍光镜下,观察并计数肺小血管($15 \mu\text{m} < \text{直径} \leq 200 \mu\text{m}$) 中肌型动脉(muscularized artery, MA)、部分肌型动脉(partially muscularized artery, PMA)及非肌型动脉(non-muscularized artery, NMA)的数目,分别计算它们各占肺小血管总数的百分比,反映肺小血管的肌化程度。每例标本观测 10 个血管。

(2) 肺中、小型动脉相对中膜厚度及面积的测定:应用 Mias 图像分析系统测取动脉外径、中膜厚度(media thickness of vessel, MTV)、血管总面积及中膜面积(media area of vessel, MAV),分别计算中膜厚度与动脉外径的比值(MTV%),中膜面积与血管总面积的比值(MAV%),作为肺血管重塑的指标。每只大鼠各测量 10 个肺中型动脉($100 \mu\text{m} < \text{直径} \leq 200 \mu\text{m}$)和肺小型动脉($15 \mu\text{m} < \text{直径} \leq 100 \mu\text{m}$)上述各值,并求其均值。

1.2.6 肺组织免疫组织化学染色 SABC 法

操作按试剂盒说明进行。

1.2.7 图像分析

对免疫组织化学染色强度进行测量,每张切片均测量其背景灰度,以消除切片间的误差。用 Image-Pro Plus 图像分析系统心肺血管分析软件测取所选血管管壁阳性染色积分光密度(integrated optical density, IOD)作为肺动脉管壁 VEGF 和 HIF-1 α 的相对含量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理。实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计方法采用独立样本 *t* 检验进行显著性检验, Pearson 检验进行直线相关分析。检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 平均肺动脉压与动脉血氧分压的比较

实验组 mPAP (31.91 ± 1.98 mmHg) 明显高于对照组 (17.82 ± 1.94 mmHg), PaO₂ (77.46 ± 5.36 mmHg) 明显低于对照组 (90.39 ± 6.02 mmHg), ($P < 0.01$)。

2.2 三型肺小血管不同肌化程度百分比的比较

实验组肺小血管中 MA% 和 PMA% (22.50 ± 4.52, 23.33 ± 4.92) 明显高于对照组 (13.33 ± 4.92, 14.17 ± 5.15) ($P < 0.01$), NMA% (54.17 ± 5.15) 明显低于对照组 (72.50 ± 7.54) ($P < 0.01$)。

2.3 肺小血管结构改变

HE 染色显示对照组的肺小血管管壁较薄, 内膜光滑, 管腔较大, 平滑肌细胞走行一致 (图 1)。而实验组肺小血管收缩, 管壁增厚, 管腔狭窄, 肺血管平滑肌细胞异常增殖 (图 2)。图像分析表明, 实验组大鼠肺中、小型动脉 MTV、MAV、MTV% 和 MAV% 明显高于对照组 ($P < 0.01$) (表 1、2)。

2.4 肺腺泡内动脉超微结构的变化

电镜观察到对照组肺动脉内皮细胞胞体扁平,

细胞器结构正常。实验组肺动脉内皮细胞体积增大, 基底变窄, 呈柱状突入管腔, 细胞器丰富, 甚至见内皮细胞肿胀, 胞质内大量空泡形成。对照组中膜平滑肌细胞胞体小, 平滑肌细胞呈收缩表型。实验组中膜平滑肌细胞数量增多, 胞体肥大, 细胞器增多, 不同程度向合成表型转化。平滑肌细胞间及肺间质见胶原纤维密集, 细胞外基质增多 (图 3~5)。

2.5 肺小血管壁 VEGF 与 HIF-1 α 的表达

经灰度扫描, 实验组肺动脉壁 VEGF 及 HIF-1 α 的 IOD 值 (42.04 ± 3.79, 26.47 ± 4.16) 明显高于对照组 (11.53 ± 2.29, 6.12 ± 2.14) ($P < 0.01$)。相关分析表明, VEGF 及 HIF-1 α 阳性染色强度与 PaO₂ 呈负相关 ($r = -0.734, r = -0.712$) ($P < 0.01$), 与肺小动脉 MTV% ($r = 0.672, r = 0.657$) ($P < 0.05$) 及 MAV% ($r = 0.718, r = 0.684$) ($P < 0.01, P < 0.05$) 呈正相关, HIF-1 α 与 VEGF 的阳性染色强度呈正相关 ($r = 0.627$) ($P < 0.05$)。

表 1 实验组和对照组大鼠肺中动脉外径、中膜厚度、MTV%、血管总面积、中膜面积及 MAV% 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Changes of the external diameter, media thickness of vessel, MTV%, total vascular area, media area of vessel, and MAV% of the median pulmonary arteries in rats of the two groups

组别 Groups	外径 / μm Ext. diameter	中膜厚度 / μm Media thickness	MTV/%	血管总面积 / μm^2 Total vas. area	中膜面积 / μm^2 Media area of vessel	MAV/%
对照组 Control	164.97 ± 19.10	9.82 ± 1.10	5.99 ± 0.76	1 808.88 ± 172.68	471.46 ± 71.52	25.83 ± 1.87
实验组 Experimental	171.97 ± 29.90	12.10 ± 1.72*	7.09 ± 0.57*	1 872.23 ± 125.29	770.36 ± 57.20*	41.16 ± 1.70*

注: * $P < 0.01$, 同对照组比较。

Note. * $P < 0.01$, compared with the control group.

表 2 实验组和对照组大鼠肺小动脉外径、中膜厚度、MTV%、血管总面积、中膜面积及 MAV% 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Changes of external diameter, media thickness of vessel, MTV%, total vascular area, media area of vessel, MAV% of small pulmonary arteries in rats of the two groups

组别 Groups	外径 / μm Ext. diameter	中膜厚度 / μm Media thickness	MTV/%	血管总面积 / μm^2 Total vas. area	中膜面积 / μm^2 Media area of vessel	MAV/%
对照组 Control	76.57 ± 14.36	5.49 ± 1.99	6.96 ± 1.30	768.13 ± 208.51	285.89 ± 70.03	37.58 ± 3.09
实验组 Experimental	74.79 ± 12.98	12.15 ± 3.58*	15.94 ± 1.97*	757.68 ± 166.66	538.12 ± 138.46*	71.68 ± 6.91*

注: * $P < 0.01$, 同对照组比较。

Note. * $P < 0.01$, compared with the control group.

3 讨论

3.1 PH 动物模型的建立及评价

导致 PH 的病因复杂多样, 既往许多学者用多种动物和不同的方法建立过 PH 动物模型, 以模拟不同的发病因素。如利用大动物建立体 - 肺分

流^[3-5], 经颈部动静脉血管吻合, 用探针冲破主动脉 - 下腔静脉^[6], 给大鼠注射野百合碱 (monocrotaline, MCT), 导致肺血管内皮损伤, 从而形成 PH^[7], 以及降低氧浓度来诱发 PH^[8] 等。这些模型都存在不同的局限性, 并且不能模拟外科全肺切除后病人的病理生理改变。

我们采取左全肺切除方法建立的动物模型, 术

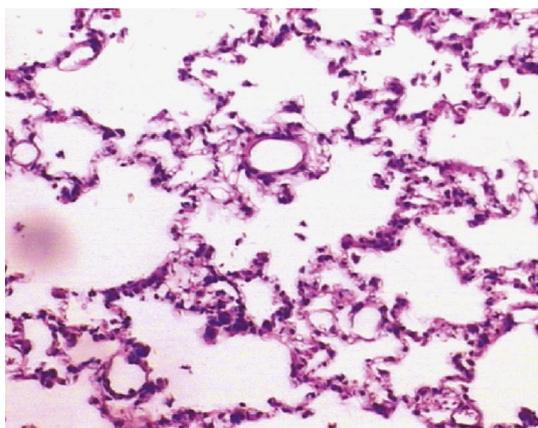


图 1 对照组大鼠肺小动脉(HE 染色 $\times 100$)

Fig. 1 A small pulmonary artery of a control rat. HE staining, $\times 100$

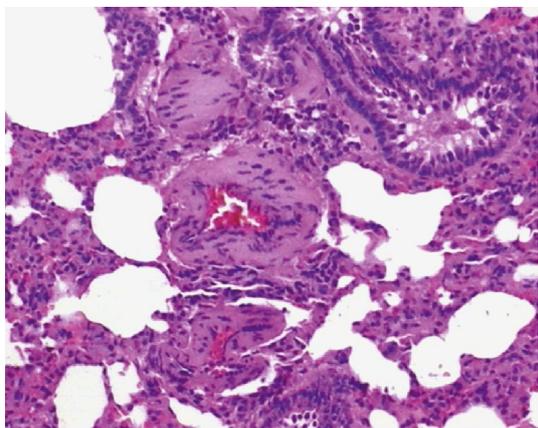


图 2 实验组大鼠肺小动脉(HE 染色 $\times 100$)

Fig. 2 A small pulmonary artery of an experimental rat. HE staining, $\times 100$

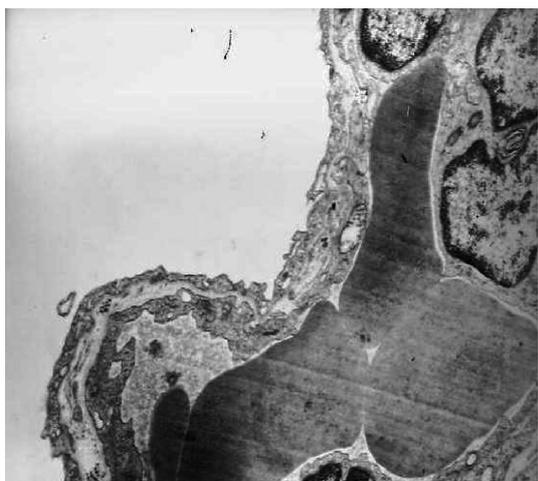


图 3 对照组:肺血管内皮细胞胞体扁平,结构正常($\times 8000$)

Fig. 3 Control group: endothelial cells of the pulmonary artery are flat, the structures are normal. $\times 8000$

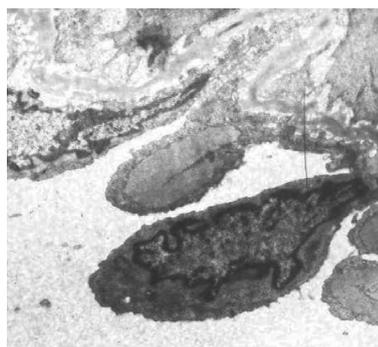


图 4 实验组:肺腺泡内动脉内皮细胞呈高柱状,突入管腔($\times 8000$)

Fig. 4 Experimental group: endothelial cells of an intra-alveolar pulmonary artery are cubic. $\times 8000$

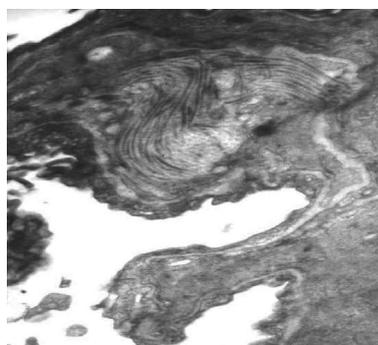


图 5 实验组:间质胶原纤维堆积($\times 5000$)

Fig. 5 Experimental group: increase of interstitial collagen fibers. $\times 5000$

后 12 周测得 mPAP 明显升高,表明 PH 动物模型建立成功。光镜和电镜检查下的病理改变导致肺血管横截面积显著增加,肺循环阻力持续升高,与文献报道的肺动脉高压组织学改变是一致的,表明实验动脉发生了肺血管重塑,导致 PH 行成。

在该模型中,除行肺切除外,未施加其他干预措施,观察时间较长,能较准确地模拟临床全肺切除术后的病理生理改变。由于大鼠体积小、价格低廉,该方法手术操作简单,不需吻合血管,单人肉眼即可完成,也不需要显微镜等特殊器械,避免了许多精细复杂的操作和吻合口出血、梗阻、狭窄等主要并发症,手术过程相对简单,动物存活率高,实验重复性好。因此,本模型在 PH 的研究中有应用价值,为进一步研究肺血管重塑和 PH 的发病机制进而探索干预途径提供了实验平台。

3.2 HIF-1 α 与 VEGF 在肺血管重建中的作用

HIF-1 是一种转录因子,由 α 和 β 两个蛋白亚基组成,HIF-1 α 多肽链是惟一的氧调节亚单位,它决定 HIF-1 的活性。HIF-1 α 是细胞最早感受缺氧

刺激的因子之一。常氧条件下 HIF-1 无 DNA 结合活性,而在低氧条件下其表达显著升高^[9,10]。本研究中检测到实验组大鼠存在慢性低氧血症,在其肺动脉内皮细胞,平滑肌细胞和支气管内皮细胞等处有明显的 HIF-1 α 免疫阳性表达。说明由于大鼠左肺切除导致的低氧血症刺激诱导了肺内 HIF-1 α 表达增加。HIF-1 α 可诱导大量与低氧应答有关的下流目的基因的表达,如 VEGF、EPO、iNOS 等^[11,12]。在这些细胞因子作用下,血管平滑肌细胞(PASMC)大量增殖,使血管中膜增厚和非肌性血管肌化,血管腔变窄,同时 PASMC 合成分泌的细胞外基质增多,使肺血管弹性回缩力和顺应性降低,血流阻力增加,促进 PH 形成^[13,14]。这与本研究中观察到的病理改变是一致的。

VEGF 是一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂素,肺是体内 VEGF 最大的来源。VEGF 的主要生物学功能是与血管内皮细胞表面的特异性受体结合而促进成纤维细胞、内皮细胞的生长,合成和分泌胶原等细胞外基质^[15]。近年还发现其增强血管尤其是微小血管的渗透性,使纤维蛋白原等大分子血浆蛋白外渗沉积在血管外的基质中。

VEGF 基因表达受多种细胞因子调控,其中低氧导致的 VEGF 表达主要是通过 HIF-1 实现的^[16]。在低氧情况下,HIF-1 增加了 VEGF 的转录、表达和 VEGF mRNA 的稳定性。低氧刺激还引起血管内皮细胞膜上与 VEGF 结合的受体表达明显增多,从而增加 VEGF 的生物效应^[17]。在本研究中可见到低氧条件下 VEGF 在实验组大鼠肺动脉壁、肺间质等处明显的免疫阳性表达。而重要的是,HIF-1 α 与 VEGF 的阳性表达呈正相关。

结合本研究我们发现,低氧血症是大鼠左全肺切除后肺血管重建的重要因素。当低氧刺激通过血流到达血管壁时,引起血管内皮细胞和平滑肌细胞的分泌功能和细胞骨架的改变,诱导合成和分泌 HIF-1 α 及 VEGF 增加,通过 HIF-1 α -VEGF 途径参与了低氧性肺血管重建过程。

参 考 文 献

- [1] 张德超,毛友生,黄国俊. 中国肺癌外科治疗概况与进展 [J]. 中国肺癌杂志, 2005, 8(6): 557-562.
- [2] Owen RM, Force SD, Pickens A, et al. Pneumonectomy for benign disease: analysis of the early and late outcomes [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2013, 43: 312-317.
- [3] Michel RP, Hakim TS, Hanson RE, et al. Distribution of lung vascular resistance after chronic systemic to pulmonary shunts [J]. Am J Physiol, 1985, 249: H1106-H1113.
- [4] Reddy VM, Meyrick B, Wong J, et al. In utero placement of aortopulmonary shunts; a model of postnatal pulmonary hypertension with increased pulmonary blood flow in lambs [J]. Circulation, 1995, 92(3): 606-613.
- [5] Miyamoto T, Takeishi Y, Shishido T, et al. Role of nitric oxide in progression of cardiovascular remodeling induced by carotid arterio-venous shunt in rabbits [J]. Jpn Heart J, 2003, 44(1): 127-137.
- [6] 刘斌,王献民,魏丽,等. 4 种肺动脉高压动物模型肺血管重构模式的差异研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(2): 289-293.
- [7] 陈瑞芬,周光德,曹文军,等. 野百合碱诱导实验性肺动脉高压病理形态观察 [J]. 电子显微学报, 2002, 21(1): 45-54.
- [8] 刘银花,杨汉文,王小同,等. 羟胺对慢性低氧高二氧化碳大鼠肺动脉高压的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(11): 2171-2174.
- [9] 王莘莘,孔繁平,陈学群,等. 低氧细胞应激的 HIF-1 信号通路 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2011, 40(5): 559-566.
- [10] Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, et al. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1 [J]. Am J Physiol, 1998, 274(2 Pt 1): L212-L219.
- [11] Hu R, Dai A, Tan S. Hypoxia-inducible factor 1 alpha upregulates the expression of inducible nitric oxide synthase gene in pulmonary arteries of hypoxic rat [J]. Chin Med J, 2002, 115(12): 1833-1837.
- [12] Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1 [J]. Blood, 2005, 105(2): 659-669.
- [13] 陈建波,王虹. 肺血管重塑与低氧性肺动脉高压 [J]. 国际呼吸杂志, 2008, 28(15): 936-939.
- [14] 王关嵩,钱桂生,陈维中. 缺氧对大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖的效应 [J]. 心肺血管病杂志, 2000, 19(2): 141.
- [15] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen [J]. Science, 1989, 246(4935): 1306-1309.
- [16] Liu Y, Cox SR, Morita T, et al. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells: identification of a 5' enhancer [J]. Circ Res, 1995, 77(3): 638-643.
- [17] Levy AP, Levy NS, Goldberg MA. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia [J]. J Biol Chem, 1996, 271(5): 2746-2753.

[收稿日期] 2015-03-15