

肥大细胞聚集和脱颗粒促进冠状动脉微血管栓塞后 心肌内胶原纤维的沉积

张庆勇¹, 王志华¹, 李晓波², 殷莲华², 李京波¹, 魏盟¹

(1. 上海交通大学附属第六人民医院心内科, 上海 200233;

2. 上海复旦大学上海医学院病理与病理生理教研室, 上海 200032)

[摘要] **目的:**探讨心肌肥大细胞聚集和脱颗粒,在小型猪冠状动脉微血管栓塞后心肌胶原纤维沉积中的作用。**方法:**32头小型猪分成4组。分别为冠状动脉微血管栓塞组($n=8$),假手术组($n=8$),肥大细胞膜稳定剂曲尼司特预处理并冠脉微血管栓塞组($n=8$),以及曲尼司特预处理但无冠脉微血管栓塞组($n=8$)。冠脉微血管栓塞30 d后,用组织化学方法和透射电镜,研究肥大细胞总量以及脱颗粒肥大细胞的数量和胶原纤维的沉积。**结果:**微血管栓塞30 d后,肥大细胞总量和脱颗粒的肥大细胞数量以及胶原容积分数,同对照组相比均有显著性差异($P<0.01$)。而肥大细胞膜稳定剂曲尼司特能,有效减少微血管栓塞组中肥大细胞总量和脱颗粒的数量以及胶原容积分数。胶原容积分数分别同总的肥大细胞数量($r=0.91, P<0.001$)和脱颗粒的肥大细胞数量($r=0.92, P<0.001$)呈正比。**结论:**肥大细胞的聚集和脱颗粒促使心肌胶原纤维的沉积。

[关键词] 肥大细胞; 胶原纤维类; 血栓栓塞; 心肌; 冠状血管; 毛细血管; 疾病模型, 动物; 微血管栓塞

[中图分类号] R 542.22 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2010)02-0187-06

Cardiac mast cells accumulation and degranulation contribute to collagen deposition after coronary microembolization

ZHANG Qing-yong, WANG Zhi-hua, LI Xiao-bo, YIN Lian-hua, LI Jing-bo, WEI Meng (Department of Cardiology, The No. 6 People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate potential pathophysiological role of cardiac mast cells accumulation and degranulation on the collagen deposition after coronary microembolization (CME). **Methods:** CME was induced in miniswine by selective infusion of 15×10^4 microspheres (diameter, $45 \mu\text{m}$) into the left anterior descending artery groups (CME group, $n=8$). Some CME-induced animals were pretreated with the MC stabilizer tranilast (50 mg/kg, twice daily), beginning 2 weeks before CME and thereafter throughout the experimental period (CME + tranilast group, $n=8$), while some animals received tranilast without CME (tranilast group, $n=8$). Eight sham-operated animals without CME served as controls. After 30 days, the total number of MC and degranulating MCs and collagen deposition was

收稿日期:2009-12-30 修回日期:2010-02-03

基金项目:上海市浦江人才计划基金(2008);国家自然科学基金(30871021).

作者简介:张庆勇(1971-),男,博士,主治医师,从事起搏与电生理临床治疗及冠状动脉微血管功能障碍的基础研究;E-mail:yeakcardio@yahoo.com.cn

assessed by histological and electronic microscopy studies. **Results:** The numbers of total and degranulating MCs and collagen volume fraction (CVF) at day 30 in CME group were significantly higher than those in controls ($P < 0.01$). Treatment with tranilast significantly reduced the numbers of total and degranulating MCs and CVF at day 30 (all $P < 0.01$). There was a significant positive correlation of the CVF with the number of total MCs ($r = 0.91, P < 0.001$) and degranulating MCs ($r = 0.92, P < 0.001$) over the CME myocardium. **Conclusion:** MCs accumulation and degranulating contribute to myocardial fibrosis collagen deposition.

[**Key words**] Mast cell; Fibrillar collagens; Thromboembolism; Myocardium; Coronary vessels; Capillaries; Disease models, animal; Microembolization

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2010, 39(2):187-192.]

临床上,急性冠脉综合征和冠状动脉介入治疗过程中,冠状动脉粥样斑块破裂后释出的血栓栓子和致栓物质进入微血管,造成冠状动脉微血管栓塞的现象普遍存在^[1,2]。反复多次的微血管栓塞,可以导致心肌细胞的丢失和细胞外基质的破坏,从而引发心室重塑,对冠心病患者心血管事件的发生和预后产生重要影响。

目前研究表明,点片状分布的心肌微梗死灶是冠状动脉微血管栓塞的主要病理特点。Sabbah 等^[3]已证实,微小梗死灶中死亡的心肌细胞将逐渐被胶原纤维取代,其机制主要同炎症因子如 TNF- α 的表达,巨噬细胞的浸润等有关。然而,作为炎症细胞的肥大细胞在此过程中所起到的作用,却经常被研究者忽视。因此,我们探讨肥大细胞的聚集和脱颗粒是否对心肌胶原纤维的沉积产生影响。

1 材料和方法

1.1 动物和分组 巴马系小型猪 32 只,雌雄不拘,体重 20 ~ 25 Kg, 40 ~ 50 周龄。由交通大学附属第六人民医院动物实验中心提供。动物分为假手术组($n = 8$),微栓塞组($n = 8$),曲尼司特组($n = 8$),曲尼司特预处理微栓塞组($n = 8$)。

1.2 研究方案 假手术组动物冠脉内注射生理盐水。肥大细胞膜稳定剂曲尼司特预处理微栓塞组中,曲尼司特在微血管栓塞前 2 周以 50 mg/kg 一日两次服用,维持剂量同其它组动物一样至术后 30 d 处死^[4]。组织标本用来分析肥大细胞的总量和脱颗粒的肥大细胞数量,及

胶原纤维沉积的变化。

1.3 试剂和材料 酸性品红、苦味酸、俾士麦棕(Bismarck brown)、碘绿(Iodine green)、马汀黄 S (Martinus yellow S), 购买于中国医药上海化学试剂公司。曲尼司特由中国药科大学赠送。保存于 0.05 % (vol/vol) Tween 80 中的非放射性微栓塞球, 购买于美国 E-Z Trac 公司: 白色, 直径(45.6 ± 7) μm , 浓度 1×10^6 个/ml; 微导管 (3.0/2.8 Fr, Cordis Inc.); 指引导管 (7Fr JR5.0, Cordis Inc.)。

1.4 仪器 DSA 血管造影仪 (INNOVA 2000, GE, USA); Leica DFC 320 数码成像工作站 (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd; Cambridge, UK); 透射电镜 (Philips CM120, Philips; Netherlands)。

1.5 动物冠状动脉微血管栓塞 按本实验室以往的模型制作方法^[5], 先经安定 (10 mg/kg)、盐酸氯胺酮注射液 (5 mg/kg) 肌肉基础麻醉后气管插管, 然后以 0.12 mg/kg/min (盐酸利多卡因和氯化琥珀胆碱) 静脉维持麻醉, 呼吸机 18 ~ 20 次/min 辅助呼吸。 1×10^4 个/ml 微栓塞球 (直径 $45.6 \pm 7 \mu\text{m}$) 经介入法微导管技术, 选择性的注射入冠状动脉前降支内。术中心电图及血压监测, 出现 ST 段抬高后停止注射。

1.6 心肌肥大细胞的特殊染色及计数

1.6.1 染色 5 μm 石蜡切片, 常规脱腊至水。70% 乙醇洗后, 直接浸入俾士麦棕染色液 20 ~ 30 min。蒸馏水浸洗 2 次, 浸入碘绿染色液中 1 min。蒸馏水浸洗 2 次, 用马汀黄 S 染色液滴染

10~20 s。直接用无水乙醇脱水,过滤纸吸干,二甲苯透明盒中性树脂胶封固。

1.6.2 计数 按每高倍视野(HPF×400)为单位计数,表示为 total mast cell number/HPF(×400)。

1.6.3 脱颗粒肥大细胞的计数 油镜(×1 000)下观察超过 50% 胞浆成分的外泄认为是肥大细胞脱颗粒状态,表示为 degranulated mast cells number/HPF(×1 000)。见图 1。



图1 油镜下(×1 000)肥大细胞(黑色箭头)及脱颗粒的肥大细胞(红色箭头)

Fig.1 Mast cells (black arrow) and degranulated mast cells (red arrow) under high oil lens (×1 000)

1.7 心肌胶原纤维的染色及含量测定 Van Gieson 染液 A 液:1% 酸性品红水溶液;B 液:苦味酸饱和水溶液。临用前分别按 A:B=1:9 的比例混合使用。胶原容积分数(collagen volume fraction,CVF)用来定量胶原纤维含量,定义为每个视野中胶原的百分比。

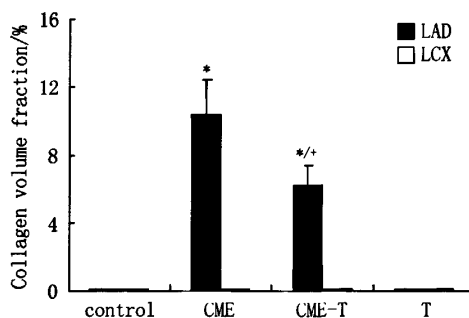
1.8 微栓塞区心肌超微结构的观察 固定于 2.5% 戊二醛中的心肌组织,脱水后包埋于 618 #树脂中,做成半厚片,放置于 Philips CM120 透射电镜下 60 kV 电压扫描。

1.9 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。One-way ANOVA 分析不同组间各观察指标的变化,如有统计学差异则进一步应用 S-N-K 和 LSD 方法进行组间比较,肥大细胞、脱颗粒肥大细胞与胶原纤维之间作 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 表示具有统计学差异, $P < 0.01$ 表示差异高度显著。

2 结果

2.1 肥大细胞的聚集和脱颗粒 术后 30 d 前降支配区域肥大细胞的数量(13.7 ± 2.1)较对照组($2.6 \pm 0.8, P < 0.001$)、曲尼司特组($2.7 \pm 0.8, P < 0.001$)均有显著性增加。并且,相比回旋支配区域的肥大细胞的数量显著增加($3.1 \pm 0.6, P < 0.001$)。而脱颗粒的肥大细胞数量在术后 30 d 也有类似的结果(图 1)。前降支配区域脱颗粒的肥大细胞数量(6.59 ± 1.59)较对照组($0.07 \pm 0.03, P < 0.001$)、曲尼司特组($0.06 \pm 0.03, P < 0.001$)均有显著性增加。并且,相比回旋支配区域的脱颗粒肥大细胞数量也呈显著性增加($0.07 \pm 0.03, P < 0.001$)。

2.2 胶原纤维的沉积 如图 2 所示。术后 30 d 前降支配区域的胶原容积分数(10.37 ± 2.03)较对照组($0.05 \pm 0.01, P < 0.001$)、曲尼



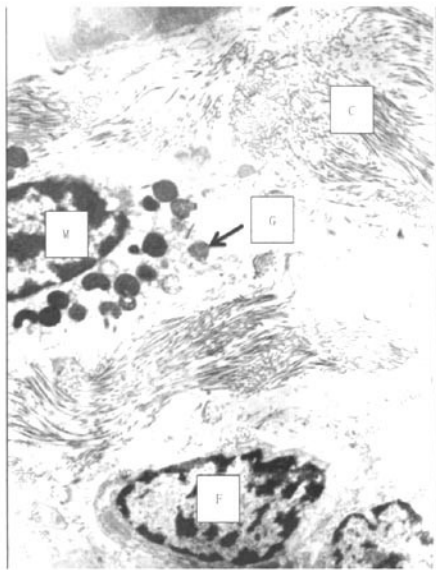
* $P < 0.001$ vs Control and Lcx; * $P < 0.001$ vs CME。

图2 对照组、微血管栓塞组、曲尼司特+微栓塞组、曲尼司特组中 LAD 支配区域同 Lcx 支配区域中胶原容积分数的比较

Fig.2 Serial changes in the collagen volume fraction (CVF) over embolized anterior myocardium of LAD artery territory and the control posterior myocardial of the Lcx territory in the animals receiving CME with or without treatment of tranilast and in control animals (control)

司特组($0.05 \pm 0.01, P < 0.001$)均有显著性增加,并且也比回旋支支配区域的肥大细胞的数量显著增加($0.05 \pm 0.01, P < 0.001$)。

2.3 微栓塞区心肌组织超微结构的变化 如图 3 所示。心肌组织水肿、线粒体含量减少,肌丝断裂,胶原纤维明显增多,而肥大细胞及脱颗粒的肥大细胞多出现在胶原沉积的地方,并且伴有数量不等的成纤维细胞。



M:肥大细胞;G:肥大细胞的颗粒;F:成纤维母细胞;C:胶原纤维。

图 3 脱颗粒的肥大细胞同成纤维母细胞和胶原纤维的电镜图

Fig. 3 Electron microscopy of the embolized anterior myocardium shows the distribution of MCs [M] and granules [G] from the MCs at sites with fibroblast [F] and collagen [C] accumulation

2.4 曲尼司特的作用 曲尼司特预处理并微球栓塞组中,肥大细胞数量(13.7 ± 2.1 vs $10.0 \pm 2.4, P < 0.01$)和脱颗粒的肥大细胞数量(6.6 ± 1.6 vs $3.4 \pm 1.0, P < 0.01$)较微球栓塞组明显减少。而总胶原容积分数也较微球栓塞组明显减少(10.4 ± 2.0 vs $6.2 \pm 1.2, P <$

0.01)。

2.5 肥大细胞及脱颗粒肥大细胞同胶原纤维沉积的相关性 统计相关分析表明,肥大细胞($r = 0.91, P < 0.001$)及脱颗粒肥大细胞($r = 0.92, P < 0.001$)分别同总胶原容积分数显著相关。

3 讨论

本研究发现,肥大细胞的聚集和脱颗粒可以促进微血管栓塞后心肌胶原纤维的沉积。而且,本研究同以往 Panizo 等^[6]在自发性高血压大鼠中的发现相似,肥大细胞同胶原容积分数呈现很好的相关性。

以往对于冠脉微血管栓塞后是否存在细胞基质的重塑等研究较少。我们通过建立的微血管栓塞动物模型发现,微血管栓塞后心肌胶原纤维的含量较微栓塞前明显增多。因此推测,反复大量的微血管栓塞同急性心肌梗塞一样,可以导致心肌细胞的坏死和凋亡。大量坏死的心肌细胞可触发细胞因子和化学趋化物质的释放,诱导纤维细胞向梗死区聚集。继而大量胶原生成,局部沉积并交联成熟,形成以胶原为基础的瘢痕组织,从而导致心室重塑。

我们的实验还发现,肥大细胞不但常常存在于胶原纤维沉积的地方,而且周围多伴有成纤维细胞的出现。

众所周知,细胞基质对于维持心脏形态、维护有效的心脏收缩和舒张功能等起到关键性的作用。胶原蛋白作为细胞基质的主要成分,由成纤维细胞产生和分泌。研究表明,肥大细胞及肥大细胞分泌的活性物质对成纤维细胞有重要影响。许多研究发现,肥大细胞促成了各种纤维化的条件,肥大细胞合成和分泌的活性介质如细胞因子,如类胰蛋白酶、糜蛋白酶、组胺、肝素和肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)- α 等细胞因子,可以刺激成纤维细胞增多和细胞外基质过度积聚,进而在组织纤维化中起到关键性的作用^[7-8]。

研究表明,类胰蛋白酶不但可通过刺激成纤维细胞增生、胶原合成等,促使基质沉积和重建,而且也能通过活化基质中的金属蛋白酶和胶原酶,降解纤维蛋白原和数种基质成分,从而

促进结缔组织的溶解。糜蛋白酶对胶原纤维的合成及降解具有双重作用:一方面可通过金属蛋白酶,促进胶原和其他细胞外基质蛋白裂解;反过来,又可以直接促进原胶原形成胶原纤维,通过刺激转化生长因子(Transfer growth factor, TGF)- β 的释放而促进成纤维细胞的增生。此外,还可以促使血管紧张素 Ang I 转化成血管紧张素 Ang II,通过后者促使纤维组织重建。

而有趣的是,成纤维细胞对肥大细胞的生长、发育和增值也产生影响。成纤维细胞可以表达特定肥大细胞生长因子,如干细胞因子(Stem cell factor, SCF)和神经生长因子(Nerve growth factor, NGF)等,促进肥大细胞分化、生长、发育和增殖及抑制肥大细胞凋亡,从而增加组织中的肥大细胞数量^[9]。

此外,目前认为, TNF- α 不但在微血管堵塞导致的心肌细胞凋亡方面起到关键性作用,而且在促进心肌纤维化过程中的也起到十分关键的作用。研究表明, TNF- α 能上调血管紧张素 II 中受体 I 的表达,下调基质金属蛋白酶的活性,从而促使血管紧张素 II 合成增多,并刺激合成更多的胶原产生^[10-11]。尽管我们的研究没有直接证实肥大细胞来源的 TNF- α 促进微血管堵塞后的心肌纤维化,但近来的研究已证实,心肌局部 TNF- α 的来源主要是心肌内的肥大细胞^[12]。因此,有理由相信, TNF- α 在肥大细胞调节的心肌纤维过程中依然起到十分关键的作用。

本实验中,我们应用了肥大细胞膜稳定剂——曲尼司特在冠脉微栓塞前预处理动物,并且在微血管堵塞、持续给予曲尼司特口服干预后发现,曲尼司特预处理组中,心肌肥大细胞的总数和脱颗粒的肥大细胞数量较微血管堵塞组明显减少。实验还发现,曲尼司特预处理组中,胶原容积分数较冠脉微栓塞组也明显降低。相关性分析发现,心肌肥大细胞总数和脱颗粒心肌肥大细胞数量均同胶原容积分数呈显著的正相关。

当然,目前研究也表明,曲尼司特本身也可以通过抑制 TGF- β 、PGE2、IL-1 β 调节的胶原合成。其中以对 TGF- β 调节的胶原合成的影响最为重要。血小板、单核细胞、巨噬细胞、成

纤维细胞等均可产生 TGF- β ,它可显著提高成纤维细胞的再生和胶原合成。曲尼司特对 TGF- β 分泌及其受体表达的直接抑制是抑制纤维化的最主要机制^[13]。而研究曲尼司特如何通过抑制 TGF- β 的表达,从而抑制胶原纤维化的内容,并不在本实验范围中,因此,不在此展开讨论。另外,本实验并未具体研究微血管堵塞后肥大细胞聚集和脱颗粒对何种类型的胶原(I、II、III、IV)产生影响,尤其是占 75% 胶原含量的 I、III 型胶原含量的变化等。这将是今后我们课题组需要深入展开研究的方向。

总之,通过本实验研究,我们认为冠脉微血管堵塞后存在心肌胶原纤维化,并且肥大细胞的聚集和脱颗粒可以促进心肌胶原纤维的沉积。

References:

- [1] FALK E. Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi [J]. *Br Heart J*, 1983, 50(2): 127-134.
- [2] HEUSCH G, KLEINBONGARD P, BOSE D, et al. Coronary microembolization from bedside to bench and back to bedside [J]. *Circulation*, 2009, 120(18): 1822-1836.
- [3] SABBAH H N, STEIN P D, KONO T, et al. A canine model of chronic heart failure produced by multiple sequential coronary microembolization [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1991, 29(4): 1379-1384.
- [4] ZHANG Q Y, GE J B, CHEN J Z, et al. Mast cell contribute to cardiomyocyte apoptosis after coronary microembolization [J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54(5): 515-523.
- [5] ZHANG Qing-yong, GE Jun-bo, ZHU Jian-hua, et al (张庆勇, 葛均波, 朱建华, 等). Effect of acute coronary microembolization on microvascular injury and myocardial endothelin-1 levels [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Science* (浙江大学学报: 医学版), 2005, 34(6): 538-541.
- [6] PANIZO A, MINDAN F J, GALINDO M F, et al. Are mast cells involved in hypertensive heart disease? [J]. *J Hypertens*, 1995, 13(10): 1201-

- 1208.
- [7] GAILIT J, MARCHESE M J, KEW R R, et al. The differentiation and function of myofibroblasts is regulated by mast cell mediators [J]. *J invest Dermatol*, 2001, 117(5): 1113-1119.
- [8] LEVICK S P, MCLARTY J L, MURRAY D B, et al. Cardiac mast cells mediate left ventricular fibrosis in the hypertensive rat heart [J]. *Hypertension*, 2009, 53(6): 1041-1047.
- [9] MIERKE C T, BALLMAIER M, WERNER U, et al. Human endothelial cells regulate survival and proliferation of human mast cell [J]. *J Eep Med*, 2000, 192(6): 801-811.
- [10] GURANTZ D, COLING R T, VARKI N, et al. IL-10 and TNF- α upregulate angiotensin II type 1 (AT1) receptors on cardiac fibroblasts and are associated with increased AT1 density in the post MI heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 38(3): 505-515.
- [11] PENG J, GURANTZ D, TRAN V, et al. Tumor necrosis factor- α -induced at1 receptor upregulation enhances angiotensin II-mediated cardiac fibroblast responses that favor fibrosis [J]. *Circ Res*, 2002, 91(12): 1119-1126.
- [12] FRANGOGIANNIS N G, LINDSEY M L, MICHAEL L H, et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF- α , initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion [J]. *Circulation*, 1998, 98(7): 699-710.
- [13] MARTIN J, KELLY D J, MIFSUD S A, et al. Tranilast attenuates cardiac matrix deposition in experimental diabetes: role of transforming growth factor-beta [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 65(3): 694-701.

[责任编辑 张荣连]

诺贝尔奖得主莱格特教授在浙江大学演讲

我们的日常世界真的遵循量子力学规律吗? 今年 2 月 27 日下午, 尽管新学期还未正式开学, 诺贝尔物理学奖获得者安东尼·莱格特教授(Anthony J. Leggett)所作的一场演讲, 还是吸引了不少浙大师生, 紫金港校区的演讲会场人满为患。

莱格特教授是国际学术界公认的量子物理学领域的领袖。由于在超流体理论研究中做出的开创性工作, 他 2003 年被授予诺贝尔物理学奖。他的主要贡献, 体现在超导体、超流体和量子计算及量子力学中的基础问题的研究方面。莱格特教授是美国科学院院士, 美国知识学会院士, 美国艺术与科学学院院士, 俄罗斯科学院外籍院士, 英国皇家学会成员。他同时还是英国物理学会荣誉院士, 并获得过英国女王伊丽莎白二世授予的爵士称号。

浙大校长杨卫院士在演讲开始前与莱格特教授进行了会谈, 对他的到来表示热烈欢迎。杨校长说, 莱格特教授早年研究哲学, 继而转向物理学研究, 作出了重大贡献, 这足见莱格特教授的天分与智慧。

在题为《我们的日常世界真的遵循量子力学规律吗?》的演讲中, 莱格特教授说, 量子力学在从原子层面描述自然界方面取得了巨大成功, 但在某些情况下, 该理论的最自然的解释, 意味着一个实验在被最终进行“观测”之前是没有确定的结果的。几十年来, 这一问题被看作是一个“单纯哲学性的问题”, 但是, 近十多年来这种情形已经发生了根本性的变化。演讲会上, 他向浙大师生介绍了该领域目前在实验方面取得的进展, 以及对未来的展望。