

· 论著 ·

NVP-BEZ235 对低氧大鼠肺血管管周肥大细胞的影响

柴晓宇, 韩倩, 吴艳萍, 王翔, 刘新民 (北京大学第一医院老年科, 北京 100034)

[摘要] **目的** 评价 PI3K/mTOR 双重抑制剂 NVP-BEZ235 对低压、低氧诱导的大鼠肺血管管周肥大细胞的分布以及脱颗粒状态的影响。**方法** 低氧组 SD 雄性大鼠于低压低氧培养箱 (50.5 kPa) 内培养, 治疗组隔天给予 NVP-BEZ235 (35 mg/kg) 干预, 对照组匹配饲养条件并在当地气压常氧环境饲养, 21 d 后全部动物以 5% 戊巴比妥钠麻醉后取材。肺组织固定后进行石蜡包埋并行苏木素伊红染色和甲苯胺蓝染色。**结果** 低氧组大鼠肺血管管周肥大细胞数量较对照组增多, 聚集明显。低氧组不同管径的肺血管 (<50 μm , 50~100 μm , >100 μm) 管周的肥大细胞聚集情况及脱颗粒细胞比例较对照组增多, 具有统计学差异 ($P < 0.05$), 而 NVP-BEZ235 干预组较低氧组肺血管管周肥大细胞数量减少 ($P < 0.05$), 且能降低管径 50~100 μm 的肺血管周围低氧组脱颗粒的肥大细胞比例 ($P = 0.0003$)。**结论** NVP-BEZ235 可以抑制低压低氧诱导的大鼠肺血管管周肥大细胞的聚集及中等管径血管管周脱颗粒细胞比例。

[关键词] 磷脂酰肌醇-3-激酶; 肥大细胞; 低氧; 肺血管

[中图分类号] R543.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)05-0407-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.05.005

Effects of NVP-BEZ235 on pulmonary perivascular mast cells in hypoxia rats

CHAI Xiaoyu, HAN Qian, WU Yanping, WANG Xiang, LIU Xinmin (Department of Geriatrics, First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China)

[Abstract] **Objective** To assess the effects of PI3K/mTOR dual inhibitor NVP-BEZ235 on the distribution and degranulation of perivascular mast cells in the lung of hypobaric hypoxia rats. **Methods** SD male rats in the hypoxia group were raised in the specific hypoxic incubator (50.5 kPa). The intervene group received NVP-BEZ235 training (35 mg/kg) intervention once every two days. The control group was fed in the conditions comparable to the other groups at local pressure and normoxia environment. After 21 days, all rats were sacrificed with injection of 5% pentobarbital sodium. Lung tissues were fixed and embedded in paraffin for further hematoxylin-eosin staining and toluidine blue staining. **Results** Compared with the control group, the number of pulmonary perivascular mast cells in the hypoxia group increased significantly. Hypoxia group had more mast cell accumulation and larger degranulation ratio around different diameters of pulmonary vessels (less than 50 μm , 50-100 μm , larger than 100 μm) than the control group ($P < 0.05$). The mast cell numbers decreased in NVP-BEZ235 intervention group compared with hypoxia group ($P < 0.05$). The degranulation ratio of pulmonary vascular mast cells around 50-100 μm in the intervention group was smaller than the hypoxia group ($P = 0.0003$). **Conclusion** NVP-BEZ235 inhibits the aggregation of pulmonary perivascular mast cells and degranulation ratio of median diameter pulmonary perivascular mast cells in hypobaric hypoxia rats.

[Key words] phosphatidylinositol-3-kinases; mast cell; hypoxia; pulmonary vascular

肥大细胞(mast cell, MC)在多种炎症性疾病和血管重构中发挥重要作用,被认为是肺血管重构的重要促进者^[1]。在低氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPH)的模型研究提示,

组织的缺氧和肥大细胞的激活、组织的破坏和重构的生长因子等的释放有关^[1-4]。磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinases, PI3K)/哺乳动物雷帕霉素蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路在肺动脉高压的研究中提示其参与血管重塑^[5]。NVP-BEZ235 是一种较新的双重 PI3K/mTOR 抑制剂,药学特性较好,且给药途径便捷,在体外实验中发现其具有干预炎症反应的作用。应用 NVP-BEZ235 可能会影响低氧诱导的大鼠肺血管管周肥大细胞的活性^[6,7]。本研究旨在探究

[基金项目] 国家自然科学基金(81270114)

[作者简介] 柴晓宇,博士研究生。研究方向:低氧性肺动脉高压。Email:klmytchristy@163.com

[通讯作者] 刘新民,教授,博士生导师。研究方向:间质性肺疾病、肺动脉高压、肺癌等。Email:lxm2128@163.com

NVP-BEZ235对低压低氧条件下大鼠肺血管管周肥大细胞聚集及脱颗粒的作用,从而为肺血管重塑的机制阐述及治疗干预提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 研究用SD雄性大鼠(8周龄)由北京大学第一医院动物实验中心提供;NVP-BEZ235(美国 Selleckchem 公司)。苏木素伊红染色试剂盒(雷根生物有限公司)。甲苯胺蓝染色试剂(宝瑞杰生物有限公司)。

1.2 动物伦理 动物伦理研究方案经北京大学第一医院伦理审查委员会批准(J201533),实验动物的使用及操作符合国际实验动物伦理准则和动物福利^[8]。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组 18只SD雄性大鼠随机分为3组:低氧组、干预组和对照组,每组6只。低氧组和干预组置于实验室特制的低压低氧仓内饲养,仓内实验气压等同于5 000 m海拔高度气体环境,吸入氧浓度约为10%。实验开始时,干预组即给予35 mg/kg的NVP-BEZ235[溶剂为N-甲基吡咯烷酮(NMP)/聚乙二醇(PEG300)=1:9, V/V]隔天灌胃干预,对照组给予生理盐水作为对照。对照组与其他两组置于同一饲养间[(25±2)℃;12 h照明/12 h黑暗循环,维持室内湿度为(40±10)%]。21 d实验周期结束后,所有动物以5%戊巴比妥钠腹部注射麻醉,测量相关指标后取材。右心室肥厚指数(RVHI)=右心室质量/(左心室质量+室间隔质量),右心室收缩压(RVSP)间接反应肺动脉压力。

1.3.2 标本处理 大鼠左侧肺叶的相似部位取材,迅速用4%多聚甲醛固定,后进行石蜡包埋。

1.3.3 病理染色 大鼠肺组织石蜡标本切片后进行苏木素伊红染色(HE染色)以及甲苯胺蓝染色。HE染色中,切片常规脱蜡,苏木素染色10 min,清洗后1%盐酸酒精迅速分化返蓝,流水及蒸馏水冲洗,行伊红染色1 min,冲洗后经二甲苯常规透明后中性树脂封片固定。甲苯胺蓝染色特异显示肥大细

胞,脱蜡后的切片在0.5%的甲苯胺蓝染液中染色30 min后,在95%的酒精中脱色,显微镜下观察至细胞结构清晰,二甲苯透明后中性树脂封片。显微镜下观察染色情况并采集图像分析。

1.3.4 病理统计 每组大鼠肺病理染色图片随机统计至少15张不同的染色切片,计数不同管径的肺动脉(<50 μm, 50~100 μm, >100 μm)数量以及其周围的肥大细胞数量及脱颗粒肥大细胞百分比。

1.4 统计学方法 采用SPSS 18.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用Student's *t*检验,取双侧 $\alpha=0.05$ 为检测水准,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物模型构建结果 右心室肥厚指数(RVHI)及右心室收缩压(RVSP)反映右心功能及肺动脉压力情况,低氧组大鼠RVHI及RVSP均较对照组大鼠显著增加,差异有统计学意义($P<0.001$);而NVP-BEZ235干预组较低氧组RVHI和RVSP指标均有所降低($P<0.001$,表1)。

表1 各组大鼠右心功能情况($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	RVSP(mm Hg)	RVHI(%)
对照组	27.85±0.42	27.23±1.23
低氧组	49.76±1.31 ***	48.31±3.10 ***
干预组	37.10±0.98 ###	30.91±0.09 ###

*** $P<0.001$,与对照组比较;### $P<0.001$,与低氧组比较

2.2 HE染色结果 对照组大鼠HE染色见肺泡壁结构完整,肺间质及肺泡腔均少见炎性细胞浸润;低氧组大鼠光镜下HE染色见肺泡间隔增宽或破坏,部分肺泡结构改变,局部有原位血栓或实变形成,肺泡及肺间质内有较多炎性细胞浸润,肺血管管腔变窄,血管管壁增厚;而NVP-BEZ235干预组较低氧组而言,血管周围炎症及基质沉积参与的肺血管重塑程度均有一定缓解(图1)。

2.3 甲苯胺蓝染色结果 甲苯胺蓝染色结果提示,

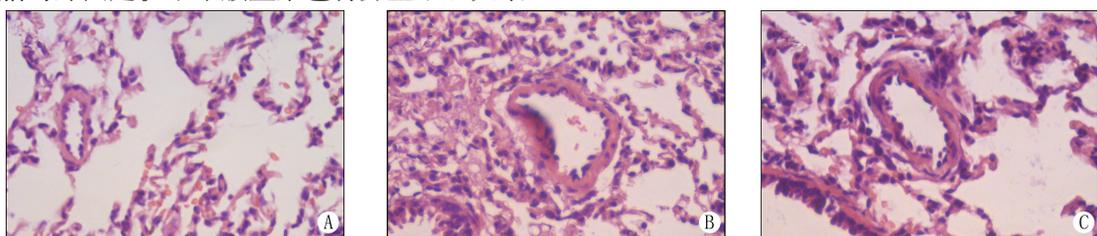


图1 各组大鼠肺组织HE染色结果(HE染色,×200)

A.对照组;B.低氧组;C.干预组

对照组大鼠肺血管管周肥大细胞数量较少,未见明显的聚集现象,且肥大细胞主要呈未脱颗粒状态。低氧组大鼠肺血管周围肥大细胞聚集明显,且形态

不一,部分呈脱颗粒状态。NVP-BEZ235 干预组大鼠肺血管周围可见散在肥大细胞,部分呈脱颗粒状态(图2)。

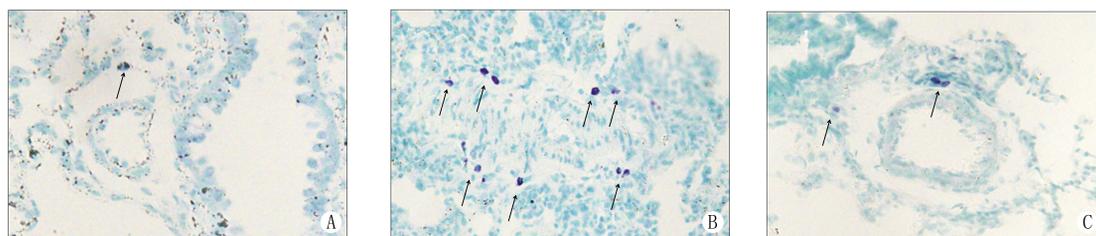


图2 各组大鼠肺组织肥大细胞染色结果(甲苯胺蓝染色,×200)

A.对照组;B.低氧组;C.干预组;注:箭头所指为肥大细胞

2.4 病理统计 分别对不同管径的肺血管管周肥大细胞的数量及脱颗粒状态比例进行统计分析,结果详见表2、表3。

表2 不同直径肺血管管周肥大细胞计数($\bar{x} \pm s$,个)

组别	血管直径($l/\mu\text{m}$)		
	<50	50~100	>100
对照组	0.75±0.86	3.08±1.56	5.45±2.50
低氧组	2.33±1.23**	5.92±2.43**	14.67±4.61***
干预组	0.87±0.64##	3.56±1.81#	8.00±4.12#

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$,与对照组比较;# $P < 0.05$,

$P < 0.01$,与低氧组比较

表3 不同直径肺血管管周肥大细胞脱颗粒比例($\bar{x} \pm s$,%)

组别	血管直径($l/\mu\text{m}$)		
	<50	50~100	>100
对照组	12.50±11.08	15.00±12.67	25.29±11.60
低氧组	37.50±33.62	51.57±11.01***	42.85±10.82**
干预组	27.78±11.01	18.52±12.74###	31.70±11.88

** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,与对照组比较;### $P < 0.001$,

与低氧组比较

2.4.1 管径<50 μm 低氧组较对照组肺血管周围肥大细胞数量增多,差异有统计学意义($P = 0.0014$);NVP-BEZ235 干预组较低氧组肺血管周围肥大细胞数量减少,差异有统计学意义($P = 0.0066$)。各组肥大细胞脱颗粒比例差异不显著。

2.4.2 管径50~100 μm 低氧组较对照组肺血管周围肥大细胞数量增多,差异有统计学意义($P = 0.0026$);NVP-BEZ235 干预组较低氧组肺血管周围肥大细胞数量减少,差异有统计学意义($P = 0.024$)。低氧组较对照组肺血管周围肥大细胞脱颗粒比例升高,差异有统计学意义($P < 0.0001$);NVP-BEZ235 干预组较低氧组肺血管周围肥大细

胞脱颗粒比例降低,差异有统计学意义($P = 0.0003$)。

2.4.3 管径>100 μm 低氧组较对照组肺血管周围肥大细胞数量增多,差异有统计学意义($P = 0.0001$);NVP-BEZ235 干预组较低氧组肺血管周围肥大细胞数量减少,差异有统计学意义($P = 0.0101$)。低氧组较对照组肺血管周围肥大细胞脱颗粒比例升高,差异有统计学意义($P = 0.0034$);NVP-BEZ235 干预组较低氧组肺血管周围肥大细胞脱颗粒比例无明显统计学差异。

3 讨论

低氧可以诱导低氧性肺动脉高压的形成^[3],且低氧性肺动脉高压以周围肺血管重塑为特征。肥大细胞是一种具有强嗜碱性颗粒的细胞,主要分布在呼吸道、消化道黏膜和结缔组织中^[9]。它们可以通过释放组胺、肝素以及分泌的细胞因子等介质参与免疫调节、抗凝、炎症性疾病以及组织重塑等病理生理过程^[1]。脱颗粒是肥大细胞的一种功能状态,在炎症、组织修复等刺激条件下,肥大细胞会处于一种被激活的状态。肥大细胞在许多炎症性疾病和组织重构中发挥重要作用。在原发性和继发性的肺动脉高压以及慢性低氧环境下的动物模型中,都已发现肺血管周围存在肥大细胞数量增多和分布的改变。肥大细胞可以产生多种作用于生长、蛋白水解以及促血管生成的调节因子,例如肺部肥大细胞暴露在低氧环境中,可以增加糜蛋白酶、金属蛋白酶和类胰蛋白酶的分泌,这些酶在 HPH 的肺血管重构相关研究中均有涉及^[1,4],提示肥大细胞在机体暴露于低氧环境的初期可能起重要作用^[10]。

PI3K 信号通路抑制剂的使用可以缓解急性肺损伤动物模型的促炎因子的释放,提示使用 PI3K 信号通路抑制剂对于 HPH 炎症细胞的聚集及炎症

介质的释放可能具有缓解作用^[6]。而 PI3K 的抑制剂也成为治疗 HPH 的潜在药物之一。NVP-BEZ235 含有 6-(3-喹啉基), 体内外的活性研究表明 NVP-BEZ235 能够同时抑制 mTOR 和 PI3K, 在多项肿瘤相关的研究中表现出良好的抗增殖活性和治疗异种移植瘤的活性^[11]。在治疗急性肺损伤模型中, 低剂量使用 NVP-BEZ235 也显示出良好的药物作用。

在本研究中, 笔者发现低氧诱导的大鼠肺血管周围炎症细胞和肥大细胞的数量显著增加, 且主要分布在肺间质和血管外膜, 这与已发表的研究^[12-14]结果相符。管径 > 50 μm 的肺血管管周的肥大细胞的脱颗粒比例也较对照组显著升高, 提示低氧可能激活并刺激肥大细胞释放炎性介质, 从而参与肺血管外膜的变化以及血管重塑。HPH 以阻力血管出现肌化改变为特征, 而本研究中肥大细胞在 50~100 μm 及 100 μm 以上管径的肺血管周围脱颗粒比例显著上升, 而管径 < 200 μm 的血管通常是 HPH 变化最剧烈的结构部分。使用 NVP-BEZ235 干预的大鼠的各组管径肺血管周围的肥大细胞数量与低氧组比较均有显著下降, 且 50~100 μm 管径的肺血管周围的肥大细胞脱颗粒比例与低氧组比较显著降低。NVP-BEZ235 可以抑制低氧诱导的肺动脉高压大鼠肺血管管周肥大细胞的聚集及小血管管周肥大细胞脱颗粒现象。以上结果均提示, NVP-BEZ235 可能参与 HPH 的炎症机制, 推测 PI3K/mTOR 信号通路参与 HPH 肺血管管周炎症机制的调控, 具体机制仍有待进一步的研究探讨。

【参考文献】

[1] Maxova H, Hergert J, Vizek M. Lung mast cells and hypoxic pulmonary hypertension[J]. *Physiol Res*, 2012, 61 (1):1-11.
 [2] Humbert M, Montani D, Evgenov OV, et al. Definition and classification of pulmonary hypertension [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2013, 218, 3-29.
 [3] Poor HD, Girgis R, Studer SM. World Health Organization Group III pulmonary hypertension [J]. *Prog Cardiovasc Dis*,

2012, 55 (2):119-127.
 [4] Hoffmann J, Yin J, Kukucka M, et al. Mast cells promote lung vascular remodelling in pulmonary hypertension [J]. *Eur Respir J*, 2011, 37 (6):1400-1410.
 [5] Karar J, Cerniglia GJ, Lindsten T, et al. Dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 suppresses hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha expression by blocking protein translation and increases cell death under hypoxia [J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13 (11):1102-1111.
 [6] Fang X, Li K, Tao X, et al. Effects of phosphoinositide 3-kinase on protease-induced acute and chronic lung inflammation, remodeling, and emphysema in rats [J]. *Chest*, 2013, 143 (4):1025-1035.
 [7] Blatt K, Herrmann H, Mirkina I, et al. The PI3-kinase/mTOR-targeting drug NVP-BEZ235 inhibits growth and IgE-dependent activation of human mast cells and basophils [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (1):e29925.
 [8] Council NR. Guide for the care and use of laboratory animals [M]. 8th Ed. Washington DC: National Academies Press, 2011:11-151.
 [9] Tucker A, Mcmurtry IF, Alexander AF, et al. Lung mast cell density and distribution in chronically hypoxic animals [J]. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 1977, 42 (2):174-178.
 [10] Bartelds B, Van Loon RL, Mohaupt S, et al. Mast cell inhibition improves pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension [J]. *Chest*, 2012, 141 (3):651-660.
 [11] Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, et al. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7 (7):1851-1863.
 [12] Nathan SD, Hassoun PM. Pulmonary hypertension due to lung disease and/or hypoxia [J]. *Clin Chest Med*, 2013, 34 (4):695-705.
 [13] Jin H, Wang Y, Zhou L, et al. Melatonin attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting the inflammation and the proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. *J Pineal Res*, 2014, 57 (4):442-450.
 [14] Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms [J]. *Circ Res*, 2006, 99 (7):675-691.

[收稿日期] 2016-11-01 [修回日期] 2017-03-21

[本文编辑] 顾文华

(上接第 401 页)

[9] 李杰明. 枳椇子和水飞蓟配伍对酒精性肝损伤大鼠肝细胞线粒体的保护作用 and 机理探讨 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2016.
 [10] 柳海艳, 王茜, 钟赣生, 等. 葛花枳椇子不同比例配伍对酒精性肝损伤大鼠肝组织病理形态影响的实验研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2011, 29(10): 2224-2227.

[11] Liu Y, Wang Z, Zhang J. Dietary Chinese Herbs [M]. Wien: Springer-Verlag GmbH Wien, 2015: 417-423.
 [12] 雷红伟, 杨伟峰. 葛花对酒精性肝损伤保护作用的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(2): 489-490.
 [13] 彭亚文, 夏欣欣, 杨苑艺, 等. 葛根枳椇子复合解酒饮料的研制 [J]. *中国林副特产*, 2012 (6): 3-6.

[收稿日期] 2017-06-19 [修回日期] 2017-08-24

[本文编辑] 李睿旻