

5-羟色胺在动情周期大鼠子宫中的分布

郝建军¹,徐永平¹,赵慧英¹,逢国梁²,郭翠香¹,王 震¹,
李君锦¹,陈 尧¹,牛贵群¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100;2 陕西省畜牧兽医总站,陕西 西安 710016)

[摘 要] **【目的】**研究 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT)在不同动情周期 SD 大鼠子宫中的分布情况和变化规律,探讨 5-HT 在雌性生殖系统中的作用。**【方法】**采用阴道涂片法鉴定动情周期,选取均为正常动情周期的 20 只雌性 SD 大鼠,将其分为动情前期、动情期、动情后期和动情间期 4 组,处死各组大鼠,取子宫制作石蜡切片,经免疫组织化学超敏 SP 法染色后,观察 5-HT 在不同动情周期大鼠子宫中的分布及变化规律。**【结果】**5-HT 免疫阳性产物在子宫各层中均有不同程度的分布,其中主要存在于子宫内膜上皮细胞、子宫腺上皮细胞、血管内皮细胞、基质细胞以及子宫内膜固有层中的胚性结缔组织细胞中。子宫内膜固有层以椭圆形状和圆形的 5-HT 阳性细胞为主。此外,还有一些呈细丝状、串珠状的 5-HT 阳性神经纤维分布于子宫内膜固有层。环形肌层多为细丝状和串珠状且粗细不等的 5-HT 阳性神经纤维。纵行肌层 5-HT 阳性产物呈点状、细丝状、椭圆形状和串珠状分布。子宫内膜和肌层 5-HT 阳性产物在动情期和动情间期均呈强阳性表达,而在动情前期和动情后期均呈弱阳性表达。**【结论】**5-HT 在不同生理时期大鼠子宫中的表达分布存在一定规律性,可能与其生理调节功能有关。

[关键词] 5-羟色胺;免疫组织化学 SP 法;动情周期;子宫;SD 大鼠

[中图分类号] S865.1⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)11-0025-06

Distribution of 5-HT in uterus of rats during estrus cycle

HAO Jian-jun¹,XU Yong-ping¹,ZHAO Hui-ying¹,PANG Guo-liang²,
GUO Cui-xiang¹,WANG Zhen¹,LI Jun-jin¹,CHEN Yao¹,NIU Gui-qun¹

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Animal Husbandry and Veterinary Station of Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi 710016, China)

Abstract: **【Objective】** Using Streptavidin-Peroxidase (SP), the expression and variation of 5-hydroxytryptamine in uterus of the Sprague Dawley during estrus cycle were studied. **【Method】** Twenty mature female SD rats of normal estrus cycle were randomly divided into 4 groups: preoestrus group, estrum group, metoestrus and diestrus group. Estrous cycle was judged by vaginal smear, the expression of 5-HT in uterus of the rats during estrus cycle was studied by immunohistochemical SP method. **【Result】** The expression and variation of 5-HT in all parts of rat uterus varied and the immunoreactive products were mainly located in endometrial epithelial cells, adenomyos was epithelial cells, stromal cells, vascular endothelial cells, endometrial embryonic connective tissue cells. The majority part was elliptical and round 5-HT immunoreactive cells in endometrial tunicae propria. In addition, some filamentous and beaded 5-HT immunoreactive nerve fibers were distributed in the endometrial tunicae propria. In circular muscle layer, most of 5-HT immunoreactive products were filamentous and beaded thickness of 5-HT immunoreactive nerve fibers. In longitudinal muscle layer, 5-HT immunoreacted products assumed punctate, filamentous,

* [收稿日期] 2009-03-19

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(SJ08C105);西北农林科技大学科研专项(06ZR003)

[作者简介] 郝建军(1983—),男,内蒙古准格尔旗人,在读硕士,主要从事发育生物学研究。

[通信作者] 徐永平(1971—),男,陕西长安人,副教授,主要从事神经生物学研究。

beaded and oval distribution. The 5-HT positive immunoreactive products of endometrium and mesometrium were strongly positive expressions in estrus and diestrus, but weaker in proestrus and metestrus. 【Conclusion】 The results showed that the expression of 5-HT in the uterus in different periods was found of certain rules and might be related to its physiological function.

Key words: 5-HT; immunohistochemical SP method; estrus cycle; uterus; sprague-Dawley rat

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT), 又名血清素(Serotonin), 人体内的 5-HT 90% 存在于消化道黏膜, 8%~10% 存在于血小板, 1%~2% 存在于中枢神经系统, 另有一小部分存在于各种组织的肥大细胞中。因 5-HT 不能透过血脑屏障, 故中枢和外周 5-HT 分属于两个功能不同的独立系统。5-HT 在黏膜中十分丰富, 在黏膜免疫调节中发挥着非常重要的作用。外周 5-HT 主要来源于肠黏膜的嗜铬组织, 在血液中主要储存于血小板中, 且其游离型的量很少, 主要存在于血清中, 具有生物学活性。5-HT 与组胺、前列腺素、白三烯等均为体内活跃的自体活性物质, 其不仅与炎症、免疫有关, 而且还广泛参与体内的多种生理和病理过程^[1]。同时, 5-HT 也是一种重要的神经递质, 在神经免疫内分泌网络中作为一种信息物质而发挥着重要作用^[2]。子宫是孕育生命的场所, 但其组织结构随动情周期的变化而不同, 是雌性动物重要的生殖生理变化之一, 受到神经、免疫、内分泌系统三者的相互调节和制约。目前, 关于 5-HT 在雌性动物子宫动情周期中表达变化及分布规律的报道还较少。为此, 本研究运用免疫组织化学超敏 SP 法研究 5-HT 在动情周期 SD 大鼠子宫中的表达变化和分布规律, 进而探讨 5-HT 在雌性生殖系统中的作用, 以期为探明 5-HT 在动情周期雌性动物子宫中发挥的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

健康 SD 大鼠 20 只, 体质量 220~250 g, 购自第四军医大学试验动物中心, 清洁级饲养, 自由采食和饮水。适应性饲养 1~2 周, 并采用阴道涂片法观察记录其动情周期, 选择连续 2 个周期正常者用于试验。

1.2 主要试剂

兔抗大鼠 5-HT 多克隆抗体, 武汉博士德生物工程有限公司产品; 抗兔链霉素菌抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组织化学超敏 SP 试剂盒, 福州迈新生物技术开发有限公司产品; 四盐酸 3,3'-二氨基联苯

胺(DAB), 华美生物工程公司分装; 葡萄糖过氧化物酶, 美国 SIGMA 公司进口。

1.3 SD 大鼠子宫样本采集与组织切片的制备

采用阴道涂片法鉴定受试大鼠所处的动情时期, 并分为: 动情前期、动情期、动情后期和动情间期 4 组, 每组 5 只。处死大鼠, 解剖观察卵巢及子宫进一步确认生理周期, 弃异常者。取出子宫, 迅速置于 4℃、40 g/L 的多聚甲醛中固定 48 h, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 制成 5 μm 厚切片。

1.4 SD 大鼠子宫石蜡切片的免疫组织化学超敏 SP 法染色

一抗为兔抗大鼠 5-HT 多克隆抗体(工作浓度为 1:150), 空白对照采用 PBS 缓冲液替代一抗, 其余步骤按免疫组织化学超敏 SP 试剂盒说明书操作。

1.5 SD 大鼠子宫石蜡切片染色结果的判断

切片中 5-HT 阳性产物为蓝紫色颗粒, 阴性不显色。根据染色深浅分为弱阳性(着色浅)、中等阳性(中等着色)和强阳性(深染)3 级。每个样本随机选取 5 张切片, 每张切片相同部位取 2 个高倍镜视野(×400), 应用江苏捷达高清晰图像分析系统进行分析, 首先计算每个视野的阳性强度均值(用平均光密度表示)和阳性面积, 然后计算相对表达量 μ^2 : $\mu^2 = (\text{光镜倍数} \times \text{阳性强度均值} \times \text{阳性面积}) / x$, 其中 x 表示像素, 本试验取值为 2.6×10^5 , 最后对计算的相对表达量均值进行数据统计。

1.6 数据统计与分析

数据用“平均数±标准差($\bar{x} \pm SD$)”表示, 应用 SPSS 10.0 统计软件进行分析, 采用 t 检验法比较各组大鼠子宫 5-HT 表达的差异。

2 结果与分析

2.1 SD 大鼠子宫切片的染色

经免疫组织化学超敏 SP 法染色的切片, 背景无色或浅蓝色, 免疫阳性产物为蓝紫色; 而对照组切片染色为阴性, 说明本试验具有特异性。

2.2 5-HT 免疫物质在 SD 大鼠子宫组织中的分布

5-HT 免疫阳性反应产物呈蓝紫色, 在 SD 大鼠

动情周期子宫内膜层、肌层和外膜中广泛分布。在阳性细胞中,5-HT 免疫阳性产物呈颗粒状、点状、环状,细胞质和细胞核内均有分布。在肌层和内膜固有层发现呈点状、细丝状和串珠状且粗细不等的阳性神经纤维。

2.3 5-HT 免疫阳性产物在动情周期 SD 大鼠子宫组织中的分布

5-HT 在动情周期大鼠子宫中的免疫组织化学染色结果见图 1。

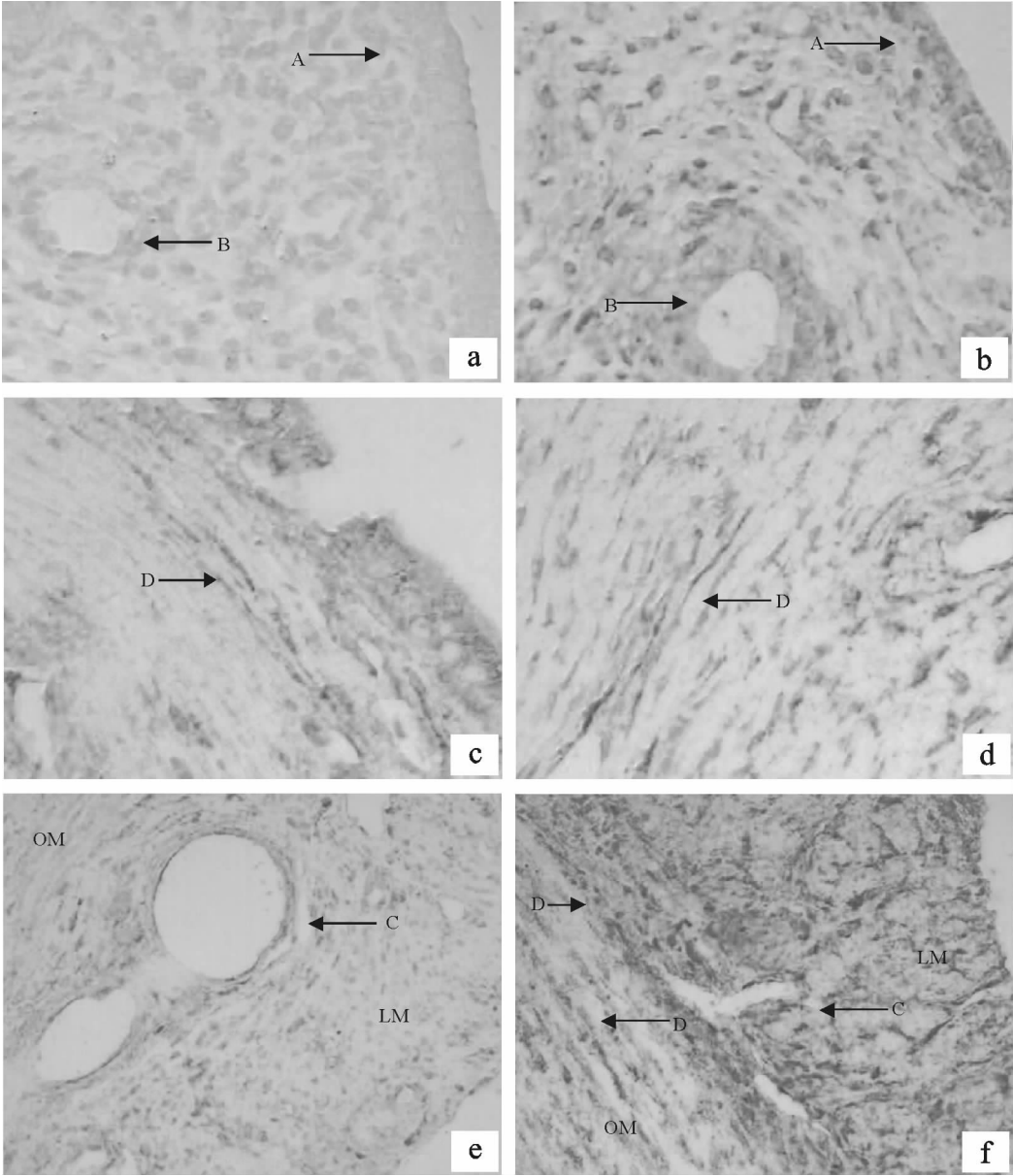


图 1 5-HT 在动情周期大鼠子宫中的免疫组织化学染色观察(400×)

a. 动情前期大鼠子宫内膜;b. 动情期大鼠子宫内膜;c. 动情期子宫内膜神经束;d. 动情期子宫肌层神经丛;
e. 动情后期大鼠子宫肌层和外膜;f. 动情间期大鼠子宫肌层和外膜;A. 子宫黏膜上皮;B. 子宫腺上皮;
C. 血管内皮;D. 神经纤维;OM. 环行肌;LM. 纵行肌

Fig.1 Immunohistochemical stains of 5-HT in rat during estrous cycle (400×)

a. 5-HT in endometrium uterus rat during proestrus;b. 5-HT in endometrium uterus rat during estrus;
c. 5-HT nerve fiber in endometrium uterus rat during estrus;d. 5-HT nerve fiber in endometrium uterus rat during estrus;
e. 5-HT in myometrium uterus rat during metestrus;f. 5-HT in uterus myometrium rat during diestrus;A. Endometrial epithelium;
B. Uterine glandular epithelium;C. Vascular epithelium;D. nerve fibers;OM. Circular muscle;LM. longitudinal muscle

2.3.1 子宫内膜 在子宫内膜固有层中有大量的 椭圆形和圆形的 5-HT 阳性基质细胞。此外,在子

宫内膜固有层分布有一些呈细丝状、串珠状的 5-HT 阳性神经纤维。动情前期(图 1-a),5-HT 免疫阳性产物广泛分布于子宫内膜上皮细胞,呈弱阳性表达。子宫腺上皮细胞 5-HT 免疫阳性产物位于整个细胞,呈弱阳性表达。内膜固有层中有许多呈椭圆形、长梭形的阳性细胞,呈弱阳性表达。其中一些较大的椭圆形阳性细胞,长径约 14 μm ,这些细胞可能是肥大细胞和一些参与免疫调节的细胞。

动情期(图 1-b),子宫内膜上皮细胞 5-HT 免疫阳性产物呈强阳性表达,与动情前期相比染色增强,定位于细胞膜和细胞质。部分子宫腺上皮细胞 5-HT 免疫阳性产物着色增强,呈强阳性表达,一些呈中等阳性表达。5-HT 神经纤维在子宫内膜呈细丝状和串珠状,沿着内膜固有层分布(图 1-c),这些神经纤维呈中等阳性表达。在子宫内膜固有层有少量椭圆形和圆形强阳性细胞,阳性产物主要位于细胞膜和细胞质,细胞呈空泡状。在内膜层还有一些线状、点状、不规则形状的强阳性产物。血管内皮细胞呈强阳性表达。发情后期,子宫内膜上皮细胞 5-HT 免疫阳性产物与动情期相比染色减弱,呈弱阳性表达。子宫腺上皮细胞膜和细胞质均着色,染色

减弱,呈弱阳性表达。内膜固有层中有许多椭圆形和圆形的阳性细胞,这些细胞呈弱阳性表达。发情间期,串珠状的 5-HT 神经纤维围绕子宫腺分布。子宫内膜上皮细胞 5-HT 免疫阳性产物与动情后期相比染色增强,分布于内膜上皮细胞的细胞膜和细胞质,呈强阳性表达。5-HT 免疫阳性产物位于腺细胞膜,腺细胞呈空泡状,染色增强,呈强阳性表达;并且还有大量呈点状、线状的强阳性颗粒存在,这些阳性产物位于细胞质。另外,还观察到一些圆形的空泡状阳性细胞。

上述结果表明,子宫内膜上皮细胞、腺上皮细胞、基质细胞、血管内皮细胞的 5-HT 免疫阳性产物在动情周期的表达有一定变化。利用 t 检验法比较动情周期各组大鼠子宫内膜 5-HT 相对表达量的差异,结果(图 2)可以发现,动情前期与动情期、动情前期与动情间期、动情期与动情后期、动情后期与动情间期均存在极显著差异($P<0.01$),并且表现出如下变化趋势:动情前期着色较浅,动情期着色较深,动情后期着色又变浅,但动情间期着色明显升高,表明 5-HT 阳性产物的表达呈双峰变化趋势。

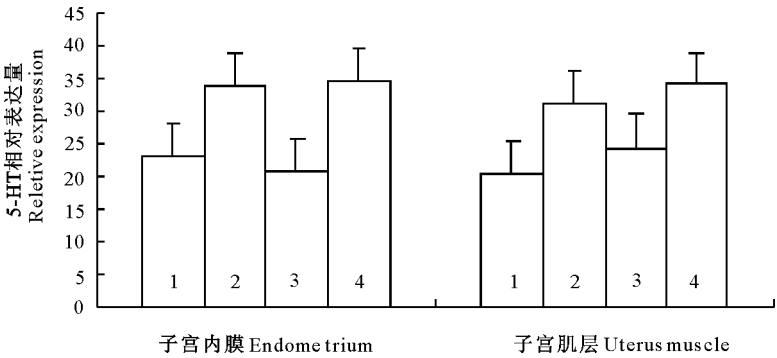


图 2 5-HT 在 SD 大鼠子宫内膜和肌层的相对表达量

1. 动情前期;2. 动情期;3. 动情后期;4. 动情间期

Fig. 2 Expression of 5-HT immunohistochemistry product in rat endometrium and uterus muscle

1. Proestrus;2. Estrus;3. Metestrus;4. Diestrus

2.3.2 子宫肌层 在动情期间子宫肌层中均有 5-HT 阳性产物的分布。纵行肌层较环形肌层着色深。在纵行肌层,5-HT 阳性产物主要呈点状、细丝状、圆形、椭圆形分布。在环形肌中,5-HT 阳性神经纤维呈细丝状和串珠状分布,沿着环形肌方向行走。5-HT 阳性神经纤维成束分布于血管周围,与血管伴行的 5-HT 阳性神经纤维终止于血管内皮。一些细丝状的 5-HT 神经纤维从各个方向穿越环形肌层。环形肌之间的血管内皮细胞也存在 5-HT 阳性产物。动情前期,子宫纵行肌间结缔组织着色浅,

其中有一些较大的圆形和椭圆形 5-HT 弱阳性细胞。纵行肌层 5-HT 阳性产物着色较弱,呈弱阳性表达。在环形肌中,5-HT 阳性神经纤维随肌纤维的走向呈细丝状。环形肌之间的血管内皮细胞,呈 5-HT 弱阳性表达。与动情前期相比,动情期子宫纵行肌间的结缔组织着色加深,在纵行肌间的结缔组织中分布有少量较大的圆形和椭圆形 5-HT 强阳性细胞。纵行肌层染色增强,呈中等阳性表达。环形肌 5-HT 阳性产物着色增强,5-HT 免疫阳性产物主要位于 5-HT 神经纤维,5-HT 阳性神经纤维随肌

纤维走向呈细丝状和串珠状分布。5-HT 阳性神经纤维伴行于血管,最终终止于血管内皮细胞(图 1-d)。环行肌之间的血管内皮细胞着色增强,呈 5-HT 强阳性表达。动情后期(图 1-e),与动情期相比,子宫纵行肌间结缔组织着色减弱,其中有一些呈点状的弱阳性 5-HT 阳性产物。纵行肌层中的 5-HT 阳性产物着色减弱,呈弱阳性表达。环行肌中细丝状的 5-HT 阳性神经纤维着色较弱。环行肌之间的血管内皮细胞着色减弱,呈 5-HT 中等阳性表达。动情间期(图 1-f),5-HT 阳性产物呈颗粒状、点状和丝状,大量分布于子宫纵行肌间的结缔组织。子宫纵行肌间结缔组织着色较动情后期明显增强,呈强阳性表达。纵行肌中有串珠状的 5-HT 阳性神经纤维分布。与动情后期相比,5-HT 阳性产物在环行肌中染色增强,可以明显地看到随环行肌走向的 5-HT 阳性神经纤维。环行肌之间的血管内皮细胞着色增强,呈 5-HT 强阳性表达。

上述结果表明,5-HT 免疫阳性产物在动情周期小鼠子宫肌层的表达有一定变化。采用 t 检验法比较动情周期各组大鼠子宫肌层 5-HT 相对表达量的差异,由图 2 可知,动情前期与动情期、动情前期与动情间期、动情后期与动情间期、动情期与动情后期均存在显著差异($P < 0.05$),并且表现出如下变化趋势:动情前期着色最弱;动情期着色加深,表达升高;动情后期降低;但到动情间期 5-HT 免疫阳性产物表达量重新升高,表明 5-HT 免疫阳性产物的表达呈双峰趋势。

2.3.3 子宫外膜 动情各期的子宫外膜都有 5-HT 免疫阳性产物的表达。动情前期和动情间期 5-HT 免疫阳性产物着色较深,呈强阳性表达;动情期和动情后期,5-HT 样免疫阳性产物的着色较浅,呈弱阳性表达。

3 讨论

5-HT 既是神经免疫内分泌网络中的一种重要的信息物质,也是一种重要的免疫因子,在子宫机能的维持中可能发挥着重要作用。许多学者认为,5-HT 能神经元在神经系统的靶区广泛存在,是调节内脏感觉、运动和植物神经系统功能的结构基础^[3-4]。Brenda^[5]、Owman 等^[6]、Kihara 等^[7]研究表明,家兔腹下神经是支配子宫交感神经的惟一来源。陈耀星等^[8]研究发现,支配家兔子宫的交感神经纤维分布于子宫壁各层,其中以内膜和环行肌层最多;对妊娠期与非妊娠期交感神经数量和直径进

行比较发现,妊娠期子宫的交感神经数量和直径均显著下降。本试验在动情期和动情间期观察发现,5-HT 阳性神经纤维分布于子宫内膜固有层和子宫腺周围,而在动情前期和动情后期未见其有分布。在整个动情周期的环行肌中,均有 5-HT 阳性神经纤维呈细丝状和串珠状分布,并沿着环行肌方向行走。一些 5-HT 阳性神经纤维成束分布于血管周围,最终终止于血管内皮细胞。还有一些 5-HT 神经纤维从各个方向穿越环行肌层。这表明神经系统以 5-HT 作为调节物,介入子宫内膜局部免疫,调节子宫肌层的活动,从而提高机体免疫力,为受精和妊娠做准备。

5-HT 的来源十分广泛,除了神经源性之外,非神经源性通常占大部分,且许多组织器官、腺体、免疫细胞也可以产生 5-HT。含有 5-HT 阳性产物的细胞既可能是产生 5-HT 的细胞,也可能是接受 5-HT 调节而将其摄入的细胞。5-HT 通过不同的作用方式对组织器官进行调节,也可通过其存在于免疫细胞表面的受体发挥免疫调节作用。在各种免疫细胞表面存在着各种类型的 5-HT 受体,如 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞和巨噬细胞及其他免疫细胞^[9-14]。哺乳动物子宫内膜局部免疫系统存在 Th1/Th2 型两种相互转换的免疫状态,并且在甾体类激素的调节下形成并维持子宫特殊的微环境。本试验结果表明,5-HT 阳性产物广泛存在于子宫内膜上皮细胞、腺上皮细胞、基质细胞、血管内皮细胞及一些参与免疫的细胞,这说明 5-HT 可能在子宫内膜局部免疫状态转换与维持中发挥着重要作用。

5-HT 对子宫平滑肌的活动也具有调节作用。5-HT 可通过与 5-HT₇ 受体的结合,增加子宫平滑肌的 cAMP 水平而放松子宫,也可通过与 5-HT₁ 受体结合,抑制子宫平滑肌的 cAMP 水平而收缩子宫,其机制是通过不同的 G 蛋白偶联体来实现的^[1]。目前,已知分布于血管平滑肌上的 5-HT 受体主要属于 5-HT_{2A} 和 5-HT_{1B} 亚型,其与 Ga/11 蛋白偶联^[15]。本试验证实,子宫肌层和血管内膜平滑肌层中均有 5-HT 免疫阳性产物存在;在动情前期和动情后期,5-HT 在肌层表达较弱,而在动情期和动情间期 5-HT 表达明显增强,且呈双峰状变化趋势。子宫肌层中的血管内皮细胞和血管平滑肌细胞得以着色,一方面可能是 5-HT 通过发挥舒血管作用来调节肌层在动情周期中的血液供应,从而间接参与了子宫周期性变化的维持;另一方面,机体通过调节不同时期神经递质的 5-HT 量,直接调节子宫

平滑肌的功能活动,从而维持子宫正常的生殖生理功能。

本试验仅研究了 5-HT 在动情周期大鼠子宫中的表达分布和变化规律,关于其在子宫机能调节中如何发挥作用,还有待于进一步开展大量的研究工作来证实。

[参考文献]

[1] 陈宝生,刘声远. 5-羟色胺对平滑肌的作用 [J]. 河南科技大学学报:医学版,2004,22(4):312-314.
Chen B S,Liu S Y. Effects of 5-hydroxytryptamine on smooth muscles [J]. Journal of Henan University of Science and Technology: Medical Science Edition, 2004, 22 (4): 312-314. (in Chinese)

[2] 杨贵波. 5-羟色胺免疫调节作用研究进展 [J]. 生理科学进展, 1997,28(4):349-351.
Yang G B. The development of 5-hydroxytryptamine in regulation of immune [J]. Progress in Physiological Sciences, 1997, 28(4):349-351. (in Chinese)

[3] Raybould H. Primary afferent response to signals in the intestinal lumen [J]. J Physiol,2001,530(3):343.

[4] Wang Z Y,Keith I M ,Olson E B J R,et al. Expression of 5-HT3 receptors in p rimary sensory neurons of the petrosal ganglion of adult rats [J]. Auton Neurosci,2002,95(1):121-124.

[5] Brenda M. The innervation of the cervix and cornu uteri in the rabbit [J]. J Physiol,1952,117:317-328.

[6] Owman C,Sjoberg N. A renergetic nerves in the female genital tract of rabbit [J]. Z Zellforsch,1996,74:182-197.

[7] Kihara K,Croat W C. Sympathetic efferent pathways projecting to the bladder neck and proximal urethra in the rat [J]. J Autonomic Nervous System,1997,62:134-142.

[8] 陈耀星,胡 满,王子旭,等. 妊娠家兔子宫交感神经分布的变

化——HRP 法研究 [J]. 中国农业大学学报,2000,5(5):113-116.

Chen Y X,Hu M,Wang Z X,et al. studies on changes of the sympathetic innervation during pregnancy in the uteri of rabbits with HRP method [J]. Journal of China Agricultural University,2000,5(5):113-116. (in Chinese)

[9] Iken K,Cheng S,Fargin A,et al. Serotonin upregulates mitogen-stimulatedB lymphocyte proliferation though 5-HT1a receptors [J]. Cell Immunol,1995,163:1-9.

[10] Khan N A,Ferriere F,Deschaux P. Serotonin-induced calcium signaling via 5-HT 1a receptors in Human leukemia(K562) cells [J]. Cell Immunol,1995,165:148-156.

[11] 王家鑫,周占祥,邓泽沛. 子宫内免疫细胞的研究进展. I : 巨噬细胞与肥大细胞 [J]. 解剖科学进展,1996,2(1):43-47.
Wang J X,Zhou Z X,Deng Z P. The development of Intrauterine immune cells. I : The macrophages and mast cells [J]. Progress of Anatomical Sciences, 1996, 2(1): 43-47. (in Chinese)

[12] Kut J L,Yong M I,Crayton J W,et al. Regulation of murine T-lymphocyte function by spleencell-derived and exogenous serotonin [J]. Immunopharmacol and Immuno Toxicol,1992, 14:783-796.

[13] Laberge S,Cruik shank W W,Beer D J,et al. Secret ion of IL-16 (lymphocyte chemoat tractant factor) from serotoninst imulated CD8⁺ T cells *in vitro* [J]. Immunol, 1996, 156: 310-315.

[14] Young M R I, Kut J L, Coogan M P, et al. Stimulation of splenic T-lymphocyte function by endogenous serotonin and by low-dose exogenous serotonin [J]. Immunol, 1993, 80: 395-400.

[15] Eddahibi S,Morrell N,d’Ortho M P,et al. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension [J]. Eur Respir, 2002, 20 (6):1559-1572.