

[文章编号] 1007-3949(2007)15-06-0415-05

• 实验研究 •

红花注射液对肺缺血再灌注损伤时细胞 凋亡及 Bcl-2 和 Bax 基因的影响

戴雍月¹, 徐正衿¹, 王万铁¹, 邱晓晓¹, 方周溪²

(温州医学院 1. 病理生理学教研室, 2. 电镜室, 浙江省温州市 325035)

[关键词] 病理学与病理生理学; 红花注射液; 肺; 再灌注损伤; 凋亡; Bcl-2; Bax

[摘要] 目的 探讨细胞凋亡与肺缺血再灌注损伤的关系以及红花注射液的干预及机制。方法 健康日本大耳白兔 84 只, 随机分为对照组、缺血再灌注 1、3、5 h 组和红花干预 1、3、5 h 组。复制在体肺缺血再灌注损伤模型。采用电镜和原位缺口末端标记法观测肺组织细胞凋亡情况, 并计算凋亡指数; 免疫组织化学和原位杂交技术检测各组肺组织 Bcl-2 和 Bax 基因表达的变化。结果 缺血再灌注组肺组织细胞凋亡指数和 Bcl-2、Bax 蛋白及 mRNA 均显著高于对照组 ($P < 0.01$)。红花干预组肺组织凋亡指数、Bax 蛋白及 Bax mRNA 低于缺血再灌注组, 而 Bcl-2 蛋白、Bcl-2 mRNA 以及 Bcl-2 与 Bax 的比值较缺血再灌注组上调 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。电镜观察发现, 缺血再灌注组肺毛细血管内皮细胞和 II 型肺泡上皮细胞超微结构损伤明显, 红花干预组损伤明显减轻。肺组织凋亡指数与 Bax 蛋白、Bax mRNA 呈显著正相关 (r 分别 = 0.926, 0.913; 均 $P < 0.01$), 与 Bcl-2/Bax 蛋白、Bcl-2/Bax mRNA 的比值呈负相关 (r 分别 = -0.367, -0.375; 均 $P < 0.01$)。结论 肺组织细胞凋亡参与了肺缺血再灌注损伤的发生, 红花注射液可能通过下调 Bax 基因的表达, 提高 Bcl-2/Bax 的比值抑制肺组织细胞凋亡, 从而减轻肺缺血再灌注损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Safflower Injection on Pneumocyte Apoptosis and Bcl-2 and Bax Expression in Rabbits with Lung Ischemia-Reperfusion Injury

DAI Yong-Yue¹, XU Zheng-Xie¹, WANG Wan-Tie¹, QIU Xiao-Xiao¹, and FANG Zhou-Xi²

(1. Department of Pathophysiology, 2. Department of electron microscope, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

[KEY WORDS] Safflower Injection; Lung; Reperfusion Injury; Apoptosis; Bcl-2; Bax

[ABSTRACT] **Aim** To explore the relationship between apoptosis in lung tissues and lung ischemia reperfusion injury, and observe effects of safflower injection on pneumocyte apoptosis in lung ischemia reperfusion injury. **Methods** Single lung in situ ischemia reperfusion animal model was used. 84 rabbits were randomly divided into control group (C), ischemia/reperfusion 1 h group (IR1h), IR3h, IR5h, safflower injection 1 h group (SI1h), SI3h and SI5h. TdT mediated dUTP nick end labeling (TUNEL), electron microscope, immunocytochemistry and in situ hybridization (ISH) techniques were used to observe apoptosis, pulmonary ultrastructure and Bcl-2, Bax expression respectively in lung tissues of different group rabbits. **Results** Compared with control group, cell apoptosis, Bcl-2, Bax expression were up-regulated in lung tissues of IR groups (all of $P < 0.01$). The safflower injection suppressed apoptosis as well as expression of Bax, but which improved the expression of Bcl-2 gene and the ratio of Bcl-2/Bax at the same time ($P < 0.01$ or $P < 0.05$, respectively). Electron microscope showed serious pulmonary ultrastructure damage in IR group, but no significant injury was found in SI group. There was a significant positive correlation between AI and Bax protein, Bax mRNA ($r = 0.926, 0.913; P < 0.01$, respectively), and there was a significant negative correlation between AI and the ratio of Bcl-2 protein/Bax protein, Bcl-2 mRNA/Bax mRNA ($r = -0.367, -0.375; P < 0.01$, respectively). **Conclusion** Apoptosis participates in lung ischemia reperfusion injury. The protective effects of safflower injection include suppressing the expression of Bax, blocking pneumocyte apoptosis and promoting Bcl-2 expression and the ratio of Bcl-2/Bax in lung ischemia reperfusion injury.

肺缺血再灌注 (ischemia reperfusion, IR) 损伤严重影响了肺栓塞溶栓、肺血栓内膜剥除术、肺移植、心肺联合移植等手术的预后, 其发生机制尚未完全

阐明。有报道, 细胞凋亡亦参与了肺缺血再灌注损伤^[1]。红花具有舒张血管、抗凝、提高耐缺氧能力等作用, 临床用于治疗缺血性心脏病、脑中风等获得良好疗效^[2]。近年来发现, 红花还能抑制细胞凋亡, 保护心、脑等脏器 IR 损伤^[3,4]。本实验拟观察红花注射液 (safflower injection, SI) 对兔肺 IR 时组织细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 及其基因的影响, 探讨其可能的作用机制。

[收稿日期] 2006-12-26 [修回日期] 2007-06-01

[基金项目] 浙江省卫生厅科研基金 (SW500021) 资助

[作者简介] 戴雍月, 女, 硕士, 助教, 联系电话 0577-86689817, E-mail 为 wzywzy@tom.com。通讯作者徐正衿, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为脏器缺血再灌注损伤, E-mail 为 xzj@wzmc.net。王万铁, 男, 教授, 中国病理生理学会常务理事, 硕士研究生导师, E-mail 为 wzwwt@tom.com。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级日本大耳白兔(温州医学院动物实验中心提供)。细胞凋亡检测试剂盒(POD)(in situ cell apoptosis detection kit I)、Bcl-2、Bax 免疫组织化学、原位杂交试剂盒均购于武汉博士德生物工程有限公司。SI 系湖北宜昌民康药业有限公司生产,批号 031104。1.20 mL/支。

1.2 动物模型制备与分组

实验兔 84 只,雌雄不拘,体重 2.0 ± 0.5 kg。参照 Sekido 等^[1]介绍的方法加以改良复制在体兔肺缺血再灌注模型。经耳缘静脉注射 25% 乌拉坦(4 mL/kg)麻醉后,气管切开插管,接动物呼吸机辅助呼吸,吸纯氧。开胸后游离左肺门置阻断带,在呼气末阻断左肺门(包括血管、支气管)1 h 为缺血期,随后开放阻断带恢复供血和通气形成再灌注期。动物随机分为对照组,左肺门只过阻断带而不阻断,观察 4 h;开胸后阻断左肺门 1 h,再灌注 1、3、5 h 留置标本,为 IR1h 组、IR3h 组和 IR5h 组;分别在缺血前 20 min 和再灌注即刻静脉注射 SI(2.0 mL/kg),其余步骤同 IR,为 SI1h 组、SI3h 组和 SI5h 组,每组 12 只。

1.3 电镜标本取材及处理

取左肺门旁 $0.1 \times 0.1 \times 0.1$ cm 大小的组织 2~3 块,2.5% 戊二醛前固定,1% 锇酸后固定,乙醇丙酮系列梯度脱水后 Epon812 包埋,超薄切片,醋酸铅双重染色,透射电镜下观察肺组织超微结构。

1.4 肺组织细胞凋亡原位检测

采用原位缺口末端标记(TdT mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)法,肺组织石蜡切片常规脱蜡至水;3% H_2O_2 处理 10 min,蒸馏水冲洗 3 次;新鲜稀释 Proteinase K 37℃消化 10 min;加标记缓冲液稀释的 TdT 和地高辛标记的 dUTP,湿盒中 37℃标记 2 h;加封闭液,室温 30 min;加生物素化抗地高辛抗体,湿盒中 37℃反应 30 min, TBS 洗 3 次;加 SABC, 37℃反应 60 min, TBS 洗 4 次;DAB 显色,苏木素轻度复染,常规脱水、透明、封片;镜检凋亡的细胞核呈棕黄色。计算 5 个高倍视野($\times 400$)下的凋亡细胞数。凋亡指数(apoptosis index, AI) = 检测到的凋亡细胞数 \div 5 个高倍视野检测到的细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.5 免疫组织化学检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白

免疫组织化学实验步骤参照试剂盒推荐方法进行(常规 SABC 法和 DAB 染色)。肺组织石蜡切片常规脱蜡,3% H_2O_2 处理 10 min 灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水冲洗;枸橼酸钠抗原修复液微波修复;滴

加山羊血清封闭液 30 min;依次滴加稀释的一抗、生物素化山羊抗兔 IgG, PBS 冲洗;滴加 SABC, 37℃反应 20 min, PBS 洗涤 4 次;DAB 显色;细胞浆染色呈棕黄色为蛋白阳性表达。应用华东理工大学研制的吸光度分析软件读取每张片子的吸光度值。以血管外周组织非特异性染色为阴性背景,所测血管经减去非特异性染色背景后,读取所测血管的吸光度值。每张片子各分析 5~10 条内径 15~200 μm 的薄壁小血管,重复 3 次,取平均吸光度值(mean absorbance, MA)作为 Bcl-2 和 Bax 蛋白的相对含量。

1.6 原位杂交检测肺组织细胞 Bcl-2 和 Bax mRNA

Bcl-2 寡核苷酸探针序列为 5'-GAT GAA GTA CAT CCA TTA TAA GCT GTC ACA-3'、5'-GCG CTC AGC CCT GTG CCA CCT GTG GTC CAG-3' 和 5'-GGG AGA TGT CAC CCC TGG TGG ACA ACA TCG-3'。Bax 寡核苷酸探针序列为 5'-CCA CCA GCT CTG AGC ATG AAG ACA G-3'、5'-AGG ATG CGT CCA CCA AGA AGT GAG CGA GT-3' 和 5'-AGC AAA CTG GTG CTC AAG GCC CTG TGC AC-3'。参照试剂盒提供的方法检测,细胞浆染色呈棕黄色为阳性表达,定量分析同免疫组织化学。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本均数比较进行方差齐性检验,组间两两比较采用单因素方差分析,方差齐性者采用 LSD 法,方差不齐者进行 Dunnett's T3 法。双变量相关分析采用 Bivariate 过程的 Pearson 等级相关法。

2 结果

2.1 电镜观察

对照组毛细血管内皮细胞、IV 型、I 型肺泡上皮细胞结构完整,细胞器无明显损伤。IR 各组随再灌注时间延长肺组织损伤逐渐加重,血管内皮细胞水肿变性、线粒体空泡化、核染色质边集、核膜皱缩、胞浆浓缩,基底部与弹力板分离呈“拱桥”样变,炎症细胞附壁增多;肺泡 I 型上皮细胞微绒毛脱落明显,核固缩,胞浆浓缩,胞浆内板层小体数量疏松、排空增多;肺泡腔内水肿液、红细胞也逐渐增多,巨噬细胞浸润且吞噬小体丰富。SI1h 组细胞结构异常改变不明显。SI3h 组和 SI5h 组较 IR3h 组和 IR5h 组损伤明显减轻(图 1)。

2.2 肺组织细胞凋亡检测

对照组少量细胞凋亡;IR 各组细胞凋亡较对照组明显增加(均 $P < 0.01$),且随再灌注时间延长呈

动态变化: IR3h 组高于 IR1h 组, IR5h 组较 IR3h 组有增高趋势, 但无统计学意义; 凋亡细胞主要为肺泡上皮细胞及血管内皮细胞。SI 组细胞凋亡与 IR 组同一时间点比较明显下降($P < 0.01$, 表 1 和图 2)。

2.3 免疫组织化学

与 IR 组相同时间点比较 SI 组 Bax 蛋白的表达

显著下降(均 $P < 0.01$); Bcl-2 蛋白的表达则明显增加($P < 0.05$)。Bcl-2/Bax 比值在各组的变化趋势同 Bcl-2 蛋白(表 1)。阳性细胞主要分布于血管(包括小动脉和小静脉)内皮细胞及肺泡上皮细胞, 少量表达于支气管上皮细胞(图 3)。

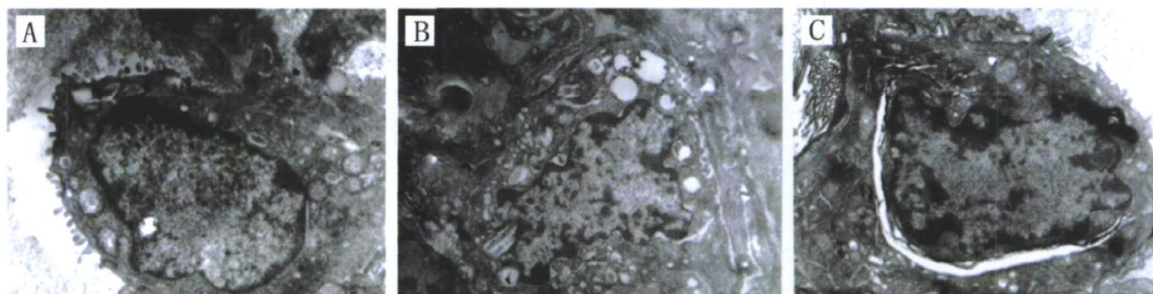


图 1. 肺组织超微结构 A 为对照组($\times 12\,000$), B 为 IR5h 组($\times 10\,000$), C 为 SI5h 组($\times 12\,000$)。

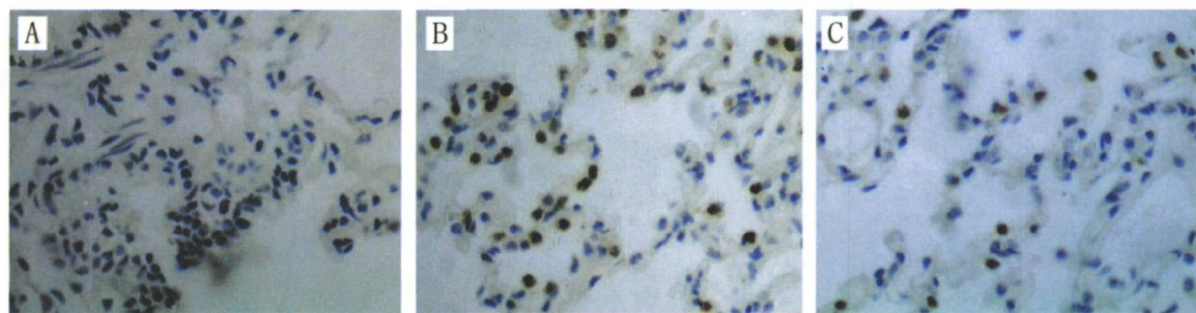


图 2. 肺组织细胞凋亡情况(POD $\times 400$) A 为对照组, B 为 IR5h 组, C 为 SI5h 组。

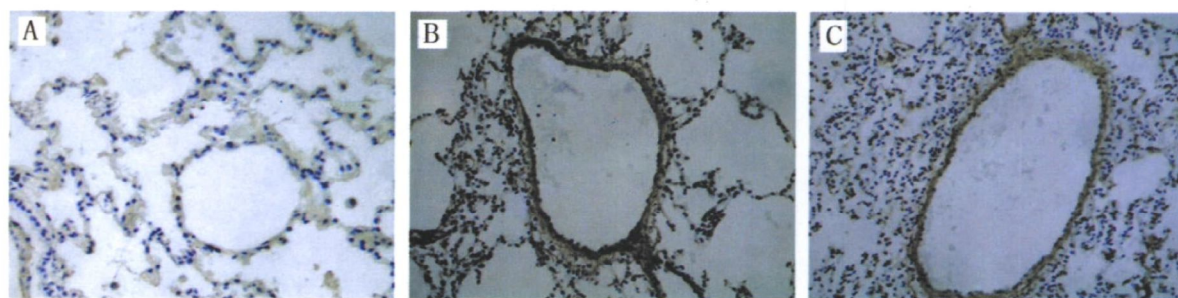


图 3. 免疫组织化学法检测各组肺小静脉 Bax 蛋白的表达(DAB $\times 200$) A 为对照组, B 为 IR5h 组, C 为 SI5h 组。

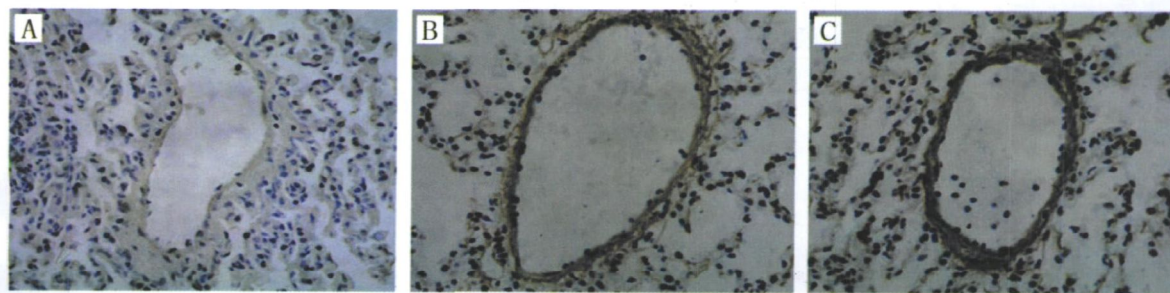


图 4. 原位杂交法检测各组肺小血管 Bcl-2 mRNA 的表达(DAB $\times 400$) A 为对照组, B 为 IR5h 组, C 为 SI5h 组。

表 1. 各组凋亡指数、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

分 组	AI	Bcl-2(MA)	Bax(MA)	Bcl-2/Bax
对照组	1.70% \pm 0.68%	0.163 \pm 0.023	0.128 \pm 0.019	1.28 \pm 0.04
IR1h 组	9.14% \pm 1.72% ^b	0.388 \pm 0.041 ^b	0.211 \pm 0.024 ^b	1.85 \pm 0.06 ^b
IR3h 组	18.45% \pm 2.54% ^{bd}	0.348 \pm 0.036 ^{bd}	0.230 \pm 0.019 ^{bc}	1.51 \pm 0.03 ^{bd}
IR5h 组	20.34% \pm 2.66% ^{bde}	0.306 \pm 0.023 ^{bdf}	0.251 \pm 0.019 ^{bde}	1.22 \pm 0.01 ^{df}
SI1h 组	5.60% \pm 1.95% ^{lk}	0.417 \pm 0.035 ^{bj}	0.168 \pm 0.019 ^{lk}	2.49 \pm 0.09 ^{lk}
SI3h 组	10.04% \pm 2.43% ^{lk}	0.376 \pm 0.037 ^{bj}	0.189 \pm 0.024 ^{lk}	2.00 \pm 0.07 ^{lk}
SI5h 组	11.05% \pm 2.30% ^{lk}	0.338 \pm 0.038 ^{bj}	0.211 \pm 0.020 ^{lk}	1.60 \pm 0.04 ^{lk}

b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 IR1h 组比较; e 为 $P < 0.05$, f 为 $P < 0.01$, 与 IR3h 组比较; j 为 $P < 0.05$, k 为 $P < 0.01$, 与 IR 组比较。

2.4 原位杂交

Bax mRNA 的表达 SI 三组明显低于 IR 三组, Bcl-2 mRNA 则较 IR 组有不同程度的增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Bcl-2 与 Bax mRNA 比值的变化趋势同 Bcl-2 mRNA(表 2)。阳性细胞同样主要分布于肺血管内皮细胞、肺泡上皮细胞及细支气管上皮细胞, 间质细胞也有少量表达(图 4)。

表 2. 各组肺组织 Bcl-2、Bax 原位杂交吸光度值及 Bcl-2/Bax mRNA 的比值 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

分 组	Bcl-2 mRNA(MA)	Bax mRNA(MA)	Bcl-2/Bax mRNA
对照组	0.148 \pm 0.017	0.118 \pm 0.016	1.26 \pm 0.03
IR1 h 组	0.376 \pm 0.033 ^b	0.199 \pm 0.024 ^b	1.90 \pm 0.07 ^b
IR3 h 组	0.345 \pm 0.034 ^{bd}	0.221 \pm 0.022 ^{bc}	1.56 \pm 0.03 ^{bd}
IR5 h 组	0.289 \pm 0.018 ^{bdf}	0.241 \pm 0.028 ^{bde}	1.21 \pm 0.07 ^{df}
SI1 h 组	0.413 \pm 0.025 ^{lk}	0.169 \pm 0.017 ^{lk}	2.45 \pm 0.11 ^{lk}
SI3 h 组	0.372 \pm 0.028 ^{bj}	0.188 \pm 0.022 ^{lk}	1.98 \pm 0.09 ^{lk}
SI5 h 组	0.341 \pm 0.026 ^{lk}	0.210 \pm 0.025 ^{lk}	1.63 \pm 0.07 ^{lk}

b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 IR1h 组比较; e 为 $P < 0.05$, f 为 $P < 0.01$, 与 IR3h 组比较; j 为 $P < 0.05$, k 为 $P < 0.01$, 与 IR 组比较。

2.5 相关性分析

肺组织细胞凋亡指数与 Bax 蛋白和 Bax mRNA 呈显著正相关(r 分别为 0.926 和 0.913; 均 $P < 0.01$), 与 Bcl-2/Bax 蛋白、Bcl-2/Bax mRNA 的比值呈负相关关系(r 分别为 -0.367 和 -0.375; 均 $P < 0.01$)。

3 讨论

脏器缺血再灌注时有两种细胞死亡方式, 即细胞坏死和细胞凋亡。Fischer 等^[6]在连续 20 例肺移植实验中对移植肺进行穿刺活检发现, 冷、热缺血末几乎无细胞凋亡, 但再灌注 30、60、120 min 细胞凋亡

率逐渐上调。本实验 TUNEL 法结果发现, 对照组偶见细胞凋亡; IR 各组细胞凋亡较对照组明显增加, 凋亡细胞主要为肺泡上皮细胞及血管内皮细胞, 电镜显示, 肺组织超微结构破坏随再灌注时间延长逐渐加重, 并观察到血管内皮细胞水肿变性, 线粒体空泡化、核染色质边集、核膜皱缩、胞浆浓缩; 肺泡 Ⅱ型上皮细胞微绒毛脱落明显, 核固缩, 胞浆浓缩, 胞浆内板层小体数量疏松、排空增多。提示肺血管内皮细胞和肺泡 Ⅱ型上皮细胞凋亡参与了肺缺血再灌注损伤的发生。肺泡 Ⅱ型上皮细胞具有合成和分泌肺泡表面活性物质, 促进肺泡表面液体和电解质的跨上皮运输, 补充和分化肺泡 Ⅰ型上皮细胞的功能; 血管内皮细胞则在维持血管完整性、调节血管舒缩状态方面发挥重要作用; 因此, 肺血管内皮细胞和肺泡 Ⅱ型上皮细胞凋亡势必会加重肺水肿和肺微血管的无复流现象, 促成呼吸功能衰竭的发生。细胞凋亡可能是肺缺血再灌注损伤的机制之一。

Bcl-2 蛋白主要位于线粒体外膜、内质网膜和核膜, 它可保护膜膜的稳定性, 减少细胞内、核内 Ca^{2+} 浓度的改变, 从而阻止凋亡信号的传导。Bcl-2 基因的表达及其蛋白增加可抑制细胞凋亡。Bax 基因与 Bcl-2 基因具有高度同源的序列, 但其作用与 Bcl-2 基因相反, 属于促凋亡基因。Bax 表达增加时, 一方面形成 Bax/Bax 同源二聚体, 促进细胞凋亡, 另一方面它抑制 Bcl-2 的表达; Bcl-2 高表达时, 可形成 Bcl-2/Bcl-2 同源二聚体, 也可形成 Bcl-2/Bax 异源二聚体, 均起抑制凋亡作用^[7]。肺缺血再灌注时氧自由基、钙超载、炎症因子等多种因素共同参与肺组织 Bax 的表达过程, 诱导细胞凋亡的发生。本研究采用免疫组织化学与原位杂交方法, 观察到缺血再灌注后肺组织 Bcl-2、Bax 表达明显上调。Bax 的表达随时间延长逐渐增加; Bcl-2 则先升高而后下降; Bcl-2/Bax 比值的变化规律同 Bcl-2。且肺组织细胞 AI

与 Bax 呈正相关,而与 Bcl-2/Bax 比值呈负相关,提示 Bcl-2、Bax 基因参与肺缺血再灌注损伤,而且再灌注后 Bcl-2/Bax 的比例下降是促进凋亡的重要因素。

红花注射液由红花提炼而成,其主要效应物质水溶性红花黄素 A(SY-A)具有扩张血管、降压、降脂、抗凝、抗炎和提高耐缺氧能力^[8]等作用。本研究中应用红花注射液的 SI 各组与 IR 各组相比 Bax 蛋白和 BaxmRNA 表达显著下调;Bcl-2 蛋白和 Bcl-2mRNA 表达上调;Bcl-2/Bax 的比值明显升高。而且 AI 与 Bax 呈正相关,与 Bcl-2/Bax 比值呈负相关,提示红花可能是通过下调促凋亡基因 Bax 的表达,提高 Bcl-2/Bax 比值来抑制细胞凋亡,从而保护缺血再灌注肺组织的。但红花注射液中作用于 Bcl-2、Bax 基因的主要效应物质是什么以及红花注射液对这些基因的调控是通过什么途径实现的还需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Stammberger U, Gaspert A, Hillinger S, Vogt P, Odematt B, Weder W, et al. Apoptosis induced by ischemia and reperfusion in experimental lung transplantation [J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, **69** (5): 1 532-536.
 - [2] 张立红. 红花注射液治疗冠心病 20 例疗效观察[J]. *现代中西医结合杂志*, 2004, **13** (3): 336.
 - [3] 明章银, 蒋建刚, 刘复兴, 吴基良. 红花注射液对大鼠缺血再灌注心肌组织 Bcl-2 和 Bax 基因表达的影响[J]. *咸宁医学院学报*, 2002, **16** (2): 81-84.
 - [4] 赵 晴, 杜建时, 韩雪梅, 徐凤梅, 杨 昕, 康治臣, 等. 大鼠急性全脑缺血再灌注损伤后细胞凋亡及红花保护作用的研究[J]. *中国实验诊断学*, 2004, **8** (1): 21-23.
 - [5] Sekido N, Mukaide N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8 [J]. *Nature*, 1993, **365** (6447): 654-657.
 - [6] Fischer S, Cassivi SD, Xavier AM, Cardella JA, Cutz E, Edwards V, et al. Cell death in human lung transplantation: apoptosis induction in human lungs during ischemia and after transplantation [J]. *Ann Surg*, 2000, **231** (3): 424-431.
 - [7] Chang TH, Liu XY, Zhang XH, Wang HL. Effects of d-phenylephrine on interleukin-6 level and Fas, bax, bcl-2 protein expression in ischemia-reperfusion myocardium [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, **23** (9): 769-774.
 - [8] 薛慧艳, 魏欣冰, 丁华. 羟基红花黄色素对缺氧心肌细胞的保护作用[J]. *中国老年学杂志*, 2007, **27** (2): 140-142.
- (此文编辑 胡必利)