

[文章编号] 1007-3949(2007)15-11-0823-04

•实验研究•

肺缺血再灌注损伤中氧化应激与 Fas/FasL 系统的关系

郝卯林, 王万铁, 徐正祚, 王方岩, 张晓隆

(温州医学院基础医学院病理生理学教研室, 浙江省温州市 325035)

[关键词] 病理学与病理生理学; 肺; 缺血再灌注; 凋亡; Fas/FasL; 活性氧; 一氧化氮

[摘要] 目的 探讨肺缺血再灌注损伤中氧化应激与 Fas/FasL 系统的关系。方法 采用在体兔单侧肺缺血再灌注损伤模型, 日本大耳白兔 40 只, 随机分为对照组, 缺血再灌注 1 h、3 h 和 5 h 组, 每组 10 只。对比观察各组血浆超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量和一氧化氮水平, 以及肺组织细胞凋亡指数及 Fas/FasL mRNA 定位表达。结果 缺血再灌注组肺组织凋亡指数明显高于对照组 ($P < 0.01$); 再灌注后 Fas、FasL mRNA 在肺血管内皮细胞、肺泡上皮细胞及支气管上皮细胞等呈阳性表达, 明显强于对照组 ($P < 0.01$); 丙二醛含量随再灌注时间延长逐渐增加 ($P < 0.01$), 而超氧化物歧化酶活性与一氧化氮则随再灌注时间延长有所降低 ($P < 0.01$)。结论 肺缺血再灌注损伤期间, 氧化应激参与 Fas/FasL 系统的激活。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Relationship Between Oxidative Stress and Fas/FasL System During Ischemia Reperfusion of Lung in Rabbits

HAO Mao-Lin, WANG Warr-Tie, XU Zheng-Jie, WANG Fang-Yan, and ZHANG Xiao-Long

(Department of Pathophysiology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

[KEY WORDS] Lung; Ischemia Reperfusion; Apoptosis; Fas/FasL; Reactive Oxygen Species; Nitric Oxide

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between oxidative stress and Fas/FasL system during lung ischemia reperfusion in rabbits. **Methods** Rabbit lung model of ischemia reperfusion injury was established in vivo. Forty rabbits were randomly divided into control group and ischemia reperfusion 1 h, 3 h, and 5 h group, 10 rabbits in each group. The activity of plasma superoxide dismutase, the content of plasma nitric oxide and the concentration of malondialdehyde, pneumocyte apoptosis index and express of Fas/FasL mRNA were measured respectively in different groups. **Results** Compared with control group, apoptosis index was significantly high ($P < 0.01$), Fas/FasL mRNA heavily expressed in lung vascular endothelial cells, alveolar and bronchial epithelial cells in ischemia reperfusion groups ($P < 0.01$). The activity of superoxide dismutase and the content of nitric oxide showed a time dependent decrease in ischemia reperfusion groups ($P < 0.01$), while the content of malondialdehyde was gradually increased with the time of reperfusion prolonging ($P < 0.01$). **Conclusion** Oxidative stress was associated with activation of Fas/FasL during lung ischemia reperfusion.

Fas/FasL 系统属于细胞凋亡的死亡受体通路, 生理情况下, 肺泡上皮细胞、支气管上皮细胞、基底细胞、血管内皮细胞以及肺淋巴细胞等均有 Fas 和 FasL 的表达, Fas 依赖的细胞凋亡参与了肺组织细胞更新、损伤修复及机体炎症反应的调控。近年来, Fas/FasL 系统与肺部疾病的研究备受关注, Albertine 等^[1] 研究发现, 急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 和急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 患者 Fas/FasL 表达明显增加, 并提出 Fas/FasL 系统是反映肺组织细胞凋亡水平与 ALI 和

ARDS 患者预后的可靠指标。王万铁等^[2] 证明, Fas/FasL 系统诱导的细胞凋亡参与肺缺血再灌注损伤 (lung ischemia reperfusion injury, LIRI)。徐少东等^[3] 认为心肌缺血再灌注损伤时 Fas/FasL 系统活化可能与氧化应激有关。但 LIRI 时, Fas/FasL 系统受哪些因素影响, 各损伤因素与其的关系鲜见报道。本实验通过建立单侧肺缺血再灌注损伤模型, 观察 LIRI 期间 Fas/FasL mRNA 与氧化应激各指标的变化, 并探讨 Fas/FasL 系统活化的氧化应激机制。

1 材料与方

1.1 材料

超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和一氧化氮 (nitric oxide, NO) 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;

[收稿日期] 2007-07-12 [修回日期] 2007-11-02

[基金项目] 浙江省教育厅科研基金项目 (20000670); 温州市科技计划重点项目 (Y2005A081)

[作者简介] 郝卯林, 硕士, 研究方向为肺缺血再灌注损伤, E-mail 为 haohml@yahoo.com.cn。通讯作者王万铁, 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 wzwt@tom.com。徐正祚, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为脏器缺血再灌注损伤。

细胞凋亡检测试剂盒及 Fas mRNA 和 FasL mRNA 原位杂交检测试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司;其余为国产分析纯试剂。

1.2 肺缺血再灌注损伤模型的建立及实验分组

健康日本大耳白兔 40 只,体重 1.7~2.7 kg,雌雄不拘,由温州医学院实验动物中心提供(温医动物字:220002)。按 Sekido 法制备在体兔 LIRI 模型,氨基甲酸乙酯 1.0 g/kg 静脉麻醉,颈外静脉插管,生理盐水 0.5~1.5 mL/min 静滴维持;颈总动脉插管,以备采血;气管插管接动物呼吸机辅助呼吸,吸纯氧,呼吸频率 30 次/min,潮气量为双侧肺通气 15 mL/kg,单侧肺通气 10 mL/kg;沿胸骨左缘切断第 3、4 和 5 肋骨开胸,游离左肺门后穿过阻断带,阻断左肺门终止血供及通气造成左肺缺血,缺血 1 h 后松开阻断带恢复血供及通气形成再灌注。实验动物随机分为 4 组:对照组($n=10$)左肺门过阻断带,但不阻断肺门,观察 4 h 抽血、活体取肺;④缺血再灌注 1 h($n=10$)、3 h($n=10$)和 5 h($n=10$)组,分别于再灌注 1、3、5 h 抽血后活体取肺。

1.3 超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量和一氧化氮水平检测

黄嘌呤氧化酶法检测血浆 SOD 活性,硫代巴比妥酸法检测血浆丙二醛含量,硝酸还原酶法测定血浆 NO 水平(用 $\text{NO}^{3-} + \text{NO}^{2-}$ 代表),按试剂盒说明书操作。

1.4 原位缺口末端标记法检测肺组织细胞凋亡

肺组织用 4% 多聚甲醛和 0.1 mol/L PBS 固定 5 h,石蜡包埋。切片常规脱蜡入水,3% H_2O_2 灭活过氧化物酶,蛋白酶 K 消化,采用末端脱氧核糖核酸转移酶和地高辛标记的 dUTP(DIG-dUTP)进行标记,SABC 染色,DAB 显色,苏木素复染,返蓝。显微镜下细胞核有棕黄色颗粒者为阳性细胞,随机测定 5 个高倍镜视野($\times 400$)下细胞凋亡数。以 100 个细胞中所含凋亡细胞数来表示凋亡指数(apoptosis index, AI)。

1.5 原位杂交法检测肺组织 Fas mRNA 和 FasL mRNA 的表达

地高辛标记的 Fas 寡核苷酸探针序列为: 5'-AGA AGG GAA GGA GTA CAT GGA CAA AGC CCA-3'; ④5'-TCA TGA ATC TAC AAC CTC CAG TCG TGA AAC-3'; ④5'-CCA AGA CAC AGC AGA ACA GAA AGT CCA GCT-3'。地高辛标记的 FasL 寡核苷酸探针序列为: 5'-CCC ATA TCT ACT GGG TGG ACA GCA GTG CCA-3'; ④5'-TAT TCC AAA GTA TAC TTC CCG GGT CAA TCT-3'; ④5'-CTC TCT GGT CAA TTT

TGA GGA ATC TCA GAC-3'。杂交过程如下:取出兔肺组织,迅速以 4% 多聚甲醛(含 1% DEPC)固定,切片常规脱水,透明石蜡包埋,连续切片,厚度 5 μm 。切片脱蜡至水,3% H_2O_2 室温处理去除内源性过氧化物酶,3% 柠檬酸稀释的胃蛋白酶消化,预杂交,加地高辛标记的寡核苷酸探针,封闭,滴加鼠抗地高辛,滴加 SABC-POD 液,滴加生物素化过氧化物酶,DAB 显色,苏木素复染。细胞胞质着色呈棕黄色者为阳性表达,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。

1.6 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.0 软件进行处理。组间比较采用方差分析;双变量相关性检验,采用 Bivariate 过程的 Pearson 相关分析法。

2 结果

2.1 血浆超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量及一氧化氮水平

与对照组相比,缺血再灌注组丙二醛含量明显升高($P < 0.01$),SOD 活性与 NO 水平显著下降($P < 0.01$);缺血再灌注组随再灌注时间延长,SOD 活性逐渐降低($P < 0.01$),NO 水平减少($P < 0.01$),丙二醛含量逐渐升高($P < 0.01$,表 1)。

表 1. 各组兔血浆超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量及一氧化氮水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

分 组	SOD (U/L)	丙二醛 ($\mu\text{mol/L}$)	NO ($\mu\text{mol/L}$)
对照组	387.09 \pm 13.97	5.23 \pm 0.68	59.59 \pm 3.93
缺血再灌注 1 h	316.14 \pm 12.56 ^a	7.56 \pm 0.39 ^a	46.70 \pm 4.68 ^a
缺血再灌注 3 h	270.41 \pm 15.35 ^{ab}	9.11 \pm 0.61 ^{ab}	37.56 \pm 5.34 ^{ab}
缺血再灌注 5 h	250.71 \pm 10.95 ^{abc}	10.42 \pm 0.37 ^{abc}	28.65 \pm 2.79 ^{abc}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与缺血再灌注 1 h 比较; c 为 $P < 0.01$, 与缺血再灌注 3 h 比较。

2.2 肺组织细胞凋亡指数的变化

对照组少量细胞凋亡;缺血再灌注组凋亡细胞明显增加($P < 0.01$),且随再灌注时间延长呈动态变化,即缺血再灌注 3 h 组高于缺血再灌注 1 h 组($P < 0.01$),缺血再灌注 5 h 组与缺血再灌注 3 h 组虽无统计学差异但有下降趋势(表 2)。凋亡细胞主要为肺泡上皮细胞及血管内皮细胞(图 1)。

2.3 肺组织 Fas mRNA 和 FasL mRNA 的表达

缺血再灌注组 Fas mRNA 和 FasL mRNA 表达较对照组明显增强($P < 0.01$),且随再灌注时间的延长 Fas mRNA 和 FasL mRNA 表达有逐渐增强趋势

(表 2)。阳性细胞主要分布于血管内皮细胞、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 2)。

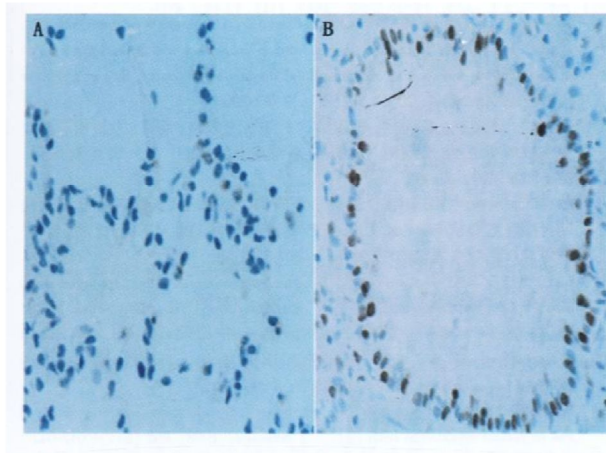


图 1. 肺组织细胞凋亡 ($\times 400$) A 为对照组, B 为缺血再灌注 5 h 组。

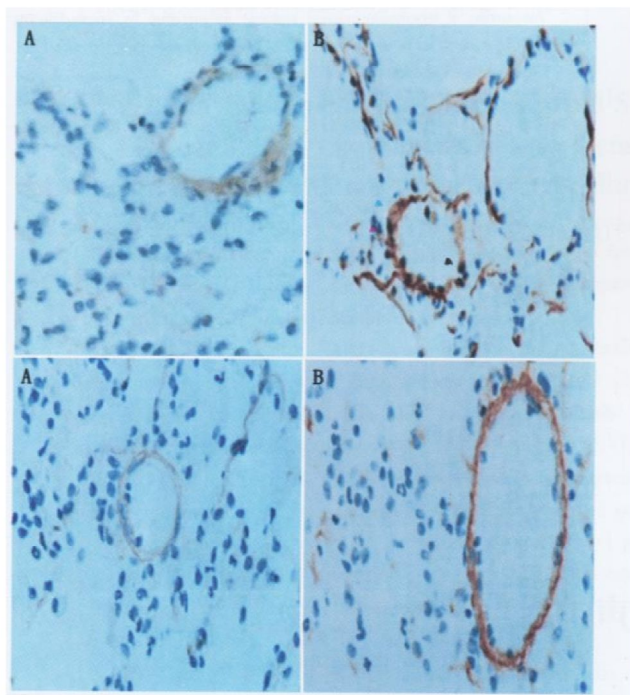


图 2. Fas mRNA(上)和 FasL mRNA(下)的表达 ($\times 400$) A 为对照组, B 为缺血再灌注 5 h 组。

2.4 相关性分析

相关分析表明, SOD 与 Fas mRNA、FasL mRNA 和 AI 之间呈明显负相关 (r 分别为 -0.782 、 -0.761 、 -0.930 , P 值均 < 0.05); 丙二醛与 Fas mRNA、FasL mRNA 和 AI 之间呈正相关 (r 分别为 0.851 、 0.796 、 0.945 , P 值均 < 0.05); NO 与 Fas mRNA、FasL mRNA 和 AI 之间呈负相关 (r 分别为 $-0.$

447 、 -0.407 、 -0.774 , P 值均 < 0.05)。

表 2. 各组肺组织细胞凋亡指数及肺组织 Fas mRNA 和 FasL mRNA 表达水平的比较 ($\pm s$, $n = 10$)

分 组	AI	Fas ($\times 10^{-2}$ mA)	FasL ($\times 10^{-2}$ mA)
对照组	1.31 \pm 1.51	1.49 \pm 0.46	1.16 \pm 0.40
缺血再灌注 1 h	9.07 \pm 1.97 ^a	2.77 \pm 0.66 ^a	2.03 \pm 0.43 ^a
缺血再灌注 3 h	20.59 \pm 3.61 ^{ac}	3.71 \pm 0.68 ^{ac}	2.83 \pm 0.42 ^{ab}
缺血再灌注 5 h	19.97 \pm 3.34 ^{ab}	4.14 \pm 0.50 ^{ac}	3.43 \pm 0.30 ^{ac}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与缺血再灌注 1 h 比。

3 讨 论

Fas 蛋白为 iv 型跨膜蛋白, 属于肿瘤坏死因子受体 (tumor necrotic factor receptor, TNFR) 或神经生长因子受体 (nerve growth factor receptor, NGFR) 家族成员, 广泛分布于心、肝、肺、肾等器官以及各种上皮细胞和激活的淋巴细胞上。FasL 是 Fas 的天然配体, 属于 I^{II} 型膜蛋白, 为肿瘤坏死因子 (tumor necrotic factor, TNF) 或神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 家族成员, 与 Fas 分子结合后激活胞内 Fas 死亡信号序列的活性, 诱导细胞凋亡。本研究在单侧 LIRI 模型的研究中发现, 与对照组相比, 缺血再灌注组 Fas mRNA 和 FasL mRNA 表达明显增加, 且随再灌注时间延长, Fas mRNA 和 FasL mRNA 表达有增强趋势; 进一步研究表明, 随着 Fas mRNA 和 FasL mRNA 表达增加, 肺组织细胞凋亡指数也相应增加, 提示 Fas/FasL 系统活化引起的细胞凋亡是缺血再灌注肺组织的损伤机制之一。

缺血再灌注损伤中, 氧化应激主要由一些化学性质相当活泼、具有强氧化作用的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和氮类自由基 (reactive nitrogen species, RNS) 等所介导。以往研究表明^[4], LIRI 时除活化的中性粒细胞外, 大多数肺组织细胞 (包括内皮细胞、肺泡上皮细胞、膈细胞、纤毛气道上皮细胞以及肺泡内巨噬细胞等) 均有产生 ROS 的能力。由于 SOD 能清除过氧化氢与羟自由基的前体超氧阴离子, 而丙二醛是氧自由基攻击生物膜引发脂质过氧化而生成的一种醛类产物, 所以 SOD 与丙二醛是反映肺组织氧化应激的重要指标。本研究表明, LIRI 时, 随再灌注时间延长, SOD 活性逐渐降低, 而丙二醛含量逐渐升高; 再灌注期 SOD 活性的下降及丙二醛含量的升高与细胞 Fas mRNA 和 FasL mRNA 的表达及肺组织凋亡指数均明显相关, 提示 ROS 是 Fas/FasL 系统中重要的信号传导分子。Matute-Bello 等^[5] 实验表明, 体外用纯化的可溶性 FasL 诱导细胞

凋亡,往往需要较高浓度,而在 ROS 的参与下,可溶性 FasL 只要较低浓度便可引起 Fas 阳性细胞凋亡。Suhara 等^[6]提出,脂质过氧化物和过氧化氢能在内皮细胞中激发或协同 Fas 介导凋亡。Fujita 等^[7]认为过氧化氢通过激活聚(二磷酸腺苷-核糖)多聚酶-P53 通路,促使气道上皮细胞 Fas 抗原表达,介导细胞凋亡。据此可以推断,LIRI 期间 ROS 是诱导 Fas/FasL 系统活化,导致再灌注肺组织细胞凋亡的重要因素之一。

一氧化氮(NO)是一种具有多种生物活性的气体分子,可通过激活腺苷酸环化酶产生环磷酸鸟苷,对机体发挥保护作用;同时 NO 还是自由基,所以 NO 具有双面效应。Waldow 等^[8]曾提出,血液中 NO 含量的提高可减轻再灌注所引起的肺损伤,是因为 NO 可抑制白细胞移行与血小板聚集,减轻外周微血管渗出,维持内皮细胞的完整性。梁贵友等^[9]认为,肺内源性 NO 的释放具有抗缺血再灌注肺损伤的作用。本研究结果表明,缺血再灌注组 NO 较对照组明显增加,且随再灌注时间延长 NO 含量逐渐降低,原因是 NO 被 ROS 迅速破坏所致^[10];NO 与肺组织凋亡指数及 Fas mRNA 和 FasL mRNA 呈负相关,提示 LIRI 期间 NO 含量的下降,是激活细胞凋亡的 Fas/FasL 通路的另一因素,机制可能与 NO 含量下降,其保护作用降低,以及 NO 与 ROS 反应生成氧化

性更强的过氧亚硝基阴离子(ONOO⁻)等作用有关。

[参考文献]

- [1] Albertine KH, Soulier MF, Wang Z, Ishizaka A, Hashimoto S, Zimmerman GA, et al. Fas and Fas ligand are up regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome [J]. *Am J Pathol*, 2002, **161** (5): 1 783-796.
- [2] 王万铁,陈瑞杰,郝卯林,倪世容,王青,王方岩,等.左旋精氨酸对兔肺缺血/再灌注损伤时 Fas/FasL 系统的影响[J]. *中国急救医学*, 2006, **26** (10): 674-677.
- [3] 徐少东,马礼坤,屈朝法,余华,贾雪梅,周青.犬急性心肌梗死晚期再灌注对心肌 Fas/FasL 系统的影响及其可能的氧化应激机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, **23** (2): 307-310.
- [4] Li C, Wright MM, Jackson RM. Relative species-mediated lung epithelial death after hypoxia and reoxygenation [J]. *Exp Lung Res*, 2002, **28** (5): 373-389.
- [5] Matute-Bello G, Liles WC, Steinberg KP, Kiener PA, Mongovin S, Chi EY, et al. Soluble Fas ligand induces epithelial cell apoptosis in human with acute lung injury [J]. *J Immunol*, 1999, **163** (3): 2 217-225.
- [6] Suhara T, Fukuo K, Sugimoto T. Hydrogen peroxide induces upregulation of Fas in human endothelial cells [J]. *J Immunol*, 1998, **160** (8): 4 042-047.
- [7] Fujita T, Maruyama M, Araya J, Sassa K, Kawagishi Y, Hayashi R, et al. Hydrogen peroxide induces upregulation of Fas in human airway epithelial cells via the activation of PARP-p53 pathway [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, **27** (5): 542-552.
- [8] Waldow T, Alexiou K, Witt W, Wagner FM, Guliemos V, Matschke K, et al. Attenuation of reperfusion-induced systemic inflammation by preconditioning with nitric oxide in an in situ porcine model of normothermic lung ischemia [J]. *Chest*, 2004, **125** (6): 2 253-259.
- [9] 梁贵友,牛义民,刘达兴,徐刚,蔡庆勇.内源性一氧化氮抗兔肺缺血再灌注损伤作用及其机制探讨[J]. *四川大学学报*, 2005, **36** (2): 246-248.
- [10] Karamsetty MR, Klinger JR. NO: more than just a vasodilator in lung transplantation [J]. *Am J Respir Cell Mol Physiol*, 2002, **282** (1): C227-241.

(此文编辑 许雪梅)

•读者•作者•编者•

作者声明

发表在 2007 年第 15 卷第 9 期《树鼩膜转运蛋白 ATP 结合盒转运体 A1 cDNA 和蛋白质结构分析及其组织表达》论文的通讯作者为曾武威助理研究员。