

远程缺血预处理对大鼠体外循环后肺泡上皮细胞凋亡与 相关蛋白 Bax、Bcl-2 表达的影响^①

涂杰, 梁东科, 刘国锋, 梁蓓薇, 韦秋英, 刘菊梅, 张炳东^②

(广西医科大学第一附属医院心血管病研究所手术麻醉室, 广西 南宁 530021)

E-mail: tuxiaoxiaokexin@163.com)

摘要: **目的** 评价远程缺血预处理(RIPC)对大鼠体外循环(CPB)后肺泡上皮细胞凋亡与相关蛋白 Bax、Bcl-2 表达的影响。**方法** 成年雄性 SD 大鼠 60 只, 随机分为 3 组(每组 $n=20$): 假手术组(S 组)、CPB 组和 RIPC+CPB 组。S 组行麻醉和穿刺但不行 CPB; CPB 组采用尾动脉插管灌注, 右颈静脉插管引流建立 CPB 模型; RIPC+CPB 组实施 CPB 前对后肢进行 RIPC(通过驱血带阻断后肢血流 10 min, 复灌 10 min, 两侧后肢交替进行, 每侧进行 3 次)。麻醉复苏后 2 h 处死大鼠并取肺组织, 光镜下苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织的病理学改变, TUNEL 法检测肺泡上皮细胞凋亡情况, Western blot 法检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平。**结果** 与 S 组比较, CPB 组和 RIPC+CPB 组肺泡上皮细胞凋亡指数升高, Bax 和 Bcl-2 蛋白表达上调, Bax/Bcl-2 比值上升 ($P < 0.05$); 与 CPB 组比较, RIPC+CPB 组肺泡上皮细胞凋亡指数下降, Bax 蛋白表达下调, Bcl-2 蛋白表达上调, Bax/Bcl-2 比值下降 ($P < 0.05$)。HE 染色显示 RIPC+CPB 组肺组织细胞的形态学损伤轻于 CPB 组。**结论** RIPC 对大鼠 CPB 后的肺泡上皮细胞有明显的保护作用, 其机制可能与调节凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达从而抑制细胞凋亡有关。

关键词: 远程缺血预处理; 心肺转流术; 肺泡上皮细胞; 凋亡

中图分类号: R329.2+6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2015)02-0180-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2015.02.004

The effects of remote ischemic preconditioning on apoptosis of pulmonary alveolar epithelial cell and expression of apoptosis-related proteins Bax and Bcl-2 in rats undergoing cardiopulmonary bypass

Tu Jie, Liang Dongke, Liu Guofeng, Liang Beiwei, Wei Qiuying, Liu Jumei, Zhang Bingdong

(Operation & Anesthesia Room, Institute of Cardiovascular Disease, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China E-mail: tuxiaoxiaokexin@163.com)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of remote ischemic preconditioning (RIPC) on apoptosis of pulmonary alveolar epithelial cell and expression of apoptosis-related proteins Bax and Bcl-2 in rats undergoing cardiopulmonary bypass (CPB). **Methods** Sixty adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups ($n=20$ for each group): a sham operation group (group S), a group CPB and a group RIPC+CPB. Rats in group S were anaesthetized and punctured but did not undergo CPB; rats in group CPB were intubated drainage in tail arteries and right jugular vein for CPB; rats in group RIPC+CPB were subjected to RIPC before CPB. RIPC was done by compressing the two hindlimbs alternately with a tourniquet for three cycles of 10 min ischaemia followed by 10 min reperfusion. Those animals were sacrificed at 2h after anesthesia resuscitation, then pulmonary tissues were obtained for observing histopathological changes by hematoxylin-eosin (HE) under microscope, the apoptosis of lung alveolar epithelial cell was determined by TUNEL method, and the protein expression of Bax and Bal-2 were calculated by Western blot. **Results** Compared with group S, the apoptosis index of lung alveolar epithelial cell and ratio of Bax/Bcl-2 were significantly increased, and the expression of Bax and Bcl-2 protein were up-regulated in group CPB and group RIPC+CPB ($P < 0.05$). Compared with group CPB, the apoptosis index of pulmonary alveolar epithelial cell and ratio of

① 基金项目: 广西壮族自治区教育厅科学技术研究项目(LX033)

② 通讯作者, E-mail: zbdong2007@163.com

Bax/Bcl-2 were significantly decreased, the expression of Bax protein was down-regulated and the expression of Bcl-2 protein was up-regulated for group RIPC+CPB ($P < 0.05$). Compared with group CPB, the morphological injury of pulmonary tissue was alleviated in group RIPC+CPB under HE staining. **Conclusion**

RIPC has protective effects on lung alveolar epithelial cell in rats undergoing CPB, the mechanism is closely related to inhibiting apoptosis by adjusting the expression of apoptosis-related proteins Bax and Bcl-2.

Key words: remote ischemic preconditioning; cardiopulmonary bypass; pulmonary alveolar epithelial cell; apoptosis

肺缺血再灌注损伤是体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)中常见的并发症,轻者仅表现为亚临床症状的功能改变,重者则表现为急性呼吸窘迫综合征,严重影响术后肺功能的恢复^[1]。Lomivorotov 等^[2]认为,干预肺泡上皮细胞凋亡对防治 CPB 所致肺缺血再灌注损伤有重要意义。远端缺血预处理(Remote ischemic preconditioning, RIPC)指通过对一个组织或器官进行短暂的非致死性缺血再灌注后,可加强远隔脏器对随后较长时间缺血的耐受能力^[3]。Cai 等^[4]证实,RIPC 实施方便,对机体几乎无损伤,可明显减轻远隔脏器缺血再灌注损伤,但具体机制尚不清楚。因此,本研究拟采用大鼠 CPB 模型,观察 RIPC 对大鼠 CPB 后肺上皮细胞凋亡与相关蛋白 Bax、Bcl-2 表达的影响,为临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 S5 型多功能监测仪(美国 Datex-ohmeda 公司),Stockert III 型双头滚压泵(德国 Stockert 公司),大鼠膜式氧合器(东莞科威医疗器械有限公司),TUNEL 试剂盒(美国罗氏公司),兔抗大鼠 Bax 和 Bcl-2 多克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司),羊抗兔二抗(武汉博士德公司)。

1.2 动物选择及分组 本动物实验经广西医科大学动物委员会批准,并符合国家科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定。成年雄性 SD 大鼠 60 只,清洁级,6~8 月龄,体重 400~450 g,由广西医科大学实验动物中心提供。采用随机数字表法分为 3 组:假手术组(S 组)、CPB 组和 RIPC+CPB 组,每组 20 只。S 组仅于麻醉诱导后行机械通气和各部位插管,不行 CPB;CPB 组建立 CPB 模型;RIPC+CPB 组实施 CPB 前,对后肢行 RIPC。

1.3 RIPC 预处理方法 通过驱血带阻断后肢血流 10 min,复灌 10 min,两侧后肢交替进行,每侧进行 3 次,阻断压力以多普勒血流探测仪监测后肢动脉搏动正好消失为宜,方法同文献^[3]。

1.4 CPB 模型制备 参照文献^[5]制作大鼠 CPB 模型。腹腔注射 10%乌拉坦 10 ml/kg 麻醉,16G 静脉导管行气管插管后机械通气。采用尾动脉插管灌注,右颈静脉插管引流建立循环通路。无血预充,灌注流量约为 100 ml/kg,氧流量与灌注流量之比为 0.8,通过变温装置保持肛温 37 °C,α 稳态管理血气,术中加入新鲜大鼠肝素血,维持血细胞比容在 0.20~0.25。CPB 转流 1 h 后停机,管道剩余血液经离心浓缩后缓

慢回输。待自主呼吸恢复平稳后停止机械通气,拔除气管导管,并密切观察大鼠麻醉复苏后生命体征。

1.5 标本采集及检测

1.5.1 苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色观察肺组织病理学情况 麻醉复苏后 2 h,将大鼠颈椎脱臼处死,剖胸取肺组织,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,HE 染色,光镜下观察病理学情况。

1.5.2 TUNEL 法检测肺上皮细胞凋亡 取部分肺组织,用 10%福尔马林液固定 24 h 后梯度脱水,常规石蜡包埋、切片,采用原位缺口末端标记法标记凋亡细胞核 DNA-OH 末端。每张切片随机选 10 个视野,计数凋亡细胞和细胞总数。肺上皮细胞凋亡指数=(凋亡细胞数/细胞总数)×100%。

1.5.3 Western blot 法检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平 取大鼠肺组织,均浆后提取总蛋白,定量变性后行 SDS-PAGE,转膜,封闭,加入 Bax 和 Bcl-2 单克隆抗体(1:1000),4 °C 孵育过夜,用 PBST 洗膜,加入二抗,37 °C 孵育 2 h,再用 TBST 洗膜,ECL 发光液孵育,观察,照相,用图像分析系统进行蛋白条带灰度值分析。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 15.0 统计学软件进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 S 组大鼠全部顺利完成实验;CPB 组有 1 只大鼠因 CPB 后心律失常死亡;RIPC+CPB 组有 1 只大鼠因 CPB 后心功能衰竭死亡。

2.2 肺组织病理学观察结果 S 组大鼠肺血管、肺泡间质和肺泡上皮小叶间质均正常;CPB 组大鼠肺间质水肿、出血,肺泡间隔增宽,肺泡腔内可见大量炎性细胞浸润;RIPC+CPB 组大鼠肺间质略水肿,少量出血,肺泡间隔轻度增宽,肺泡腔内少量炎性细胞浸润,见图 1。

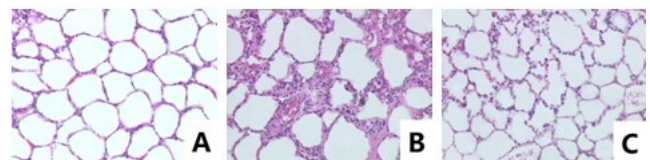


图 1 光镜下 3 组肺组织病理学检查(HE 染色,×100)
A: S 组; B: CPB 组; C: RIPC+CPB 组

2.3 肺上皮细胞凋亡情况 与 S 组比较, CPB 组和 RIPC+CPB 组肺泡上皮细胞凋亡指数升高 ($P < 0.05$); 与 CPB 组比较, RIPC+CPB 组肺泡上皮细胞凋亡指数下降 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.4 肺组织 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的比较 与 S 组比较, CPB 组和 RIPC+CPB 组 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达上调, Bax/Bcl-2 比值上升 ($P < 0.05$); 与 CPB 组比较, RIPC+CPB 组 Bax 蛋白表达下调, Bcl-2 蛋白表达上调, Bax/Bcl-2 比值下降 ($P < 0.05$), 见表 1、图 2。

表 1 3 组大鼠肺上皮细胞凋亡指数、Bax、Bcl-2 和 Bax/Bcl-2 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡指数(%)	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2
S 组	20	4.5±0.6	0.42±0.09	0.58±0.07	0.77±0.10
CPB 组	19	16.4±0.8 ^a	0.88±0.09 ^a	0.74±0.08 ^a	1.26±0.19 ^a
RIPC+CPB 组	19	10.7±0.9 ^{ab}	0.76±0.07 ^{ab}	0.95±0.09 ^{ab}	0.88±0.14 ^{ab}
F		1153.650	158.330	104.000	58.830
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与 S 组比较, a: $P < 0.05$; 与 CPB 组比较, b: $P < 0.05$

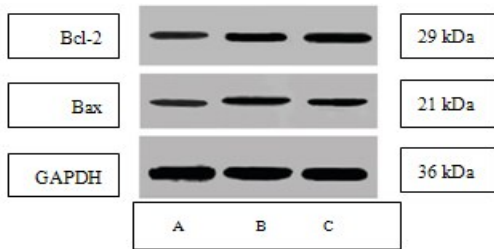


图 2 3 组大鼠肺上皮细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达 (Western blot 法)
A: S 组; B: CPB 组; C: RIPC+CPB 组

3 讨论

本研究采用尾动脉插管灌注, 右颈静脉插管引流的方法建立大鼠 CPB 模型, 实现了接近生理的全流量转流, 并使用微型动物膜式氧合器, 实现无血预充, 从而模拟了临床 CPB 的转流过程。Dong 等^[6]研究表明, 肺脏本身的缺血预处理可减轻肺组织的缺血再灌注损伤, 但阻断肺动脉可损伤血管内膜, 且短暂缺血亦可造成肺上皮细胞损伤, 因此限制了其临床应用, 而 RIPC 可较好地避免上述缺陷, 可在临床推广应用。

细胞凋亡又称程序化细胞死亡, 是多细胞有机体为调控机体发育和维持内环境稳定, 由基因调控的细胞主动死亡过程。细胞凋亡不仅发生于生理情况, 部分病理性刺激也可诱发凋亡。Qiu 等^[7]的研究表明, CPB 引起的肺缺血再灌注和全身炎症反应等, 可致肺泡上皮细胞发生凋亡和坏死, 是引起术后肺功能障碍的主要病理生理基础。本研究结果显示, CPB 组和 RIPC+CPB 组肺上皮细胞凋亡指数明显高于 S 组, 提示 CPB 可诱导肺上皮细胞发生凋亡, 进一步证实了 Qiu 等^[7]的研究结果。

细胞凋亡是级联式基因表达的结果, 其中 Bcl-2 蛋白家族在细胞凋亡过程中发挥关键作用。根据结构和功能的不同, Bcl-2 蛋白家族主要由促进细胞凋亡蛋白 (如 Bax、Bad) 和抑制细胞凋亡蛋白 (如 Bcl-2、Bcl-x) 组成, 两者作用相互拮抗, 共同决定细胞是否发生凋亡及其凋亡的严重程度^[8]。本研究结果表明, 大鼠 CPB 后肺组织病理学损伤明显, 肺上皮细胞凋亡指数升高, Bax 和 Bcl-2 蛋白表达上调, Bax/Bcl-2 比值上升, 提示 Bax 和 Bcl-2 蛋白的变化参与了 CPB 诱导肺上皮细胞凋亡的过程。本研究还发现, 经 RIPC 干预后, 大鼠肺组织病理学损伤减轻, 肺上皮细胞凋亡指数下降, Bax 蛋白表达下调, Bcl-2 蛋白表达上调, Bax/Bcl-2 比值下降, 说明 RIPC 对大鼠 CPB 后肺上皮细胞具有保护作用, 其机制可能与调节凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达有关。

综上所述, RIPC 对大鼠 CPB 后的肺泡上皮细胞有明显的保护作用, 其机制可能与调节凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达从而抑制细胞凋亡有关。

参考文献:

- [1] Chen S, Xu L, Tang J. Association of interleukin 18 gene polymorphism with susceptibility to the development of acute lung injury after cardiopulmonary bypass surgery [J]. Tissue Antigens, 2010, 76(3):245-249.
- [2] Lomivorotov W, Fominskiy EV, Efremov SM, et al. Hypertonic solution decreases extravascular lung water in cardiac patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery [J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2013, 27(2):273-282.
- [3] 赵德海, 韦启后, 蒙山, 等. 家兔肢体缺血预处理后血清中 IL-2 含量的变化 [J]. 右江民族医学院学报, 2002, 24(3):334-335.
- [4] Cai ZP, Parajuli N, Zheng X, et al. Remote ischemic preconditioning confers late protection against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice by upregulation interleukin-10 [J]. Basic Res Cardiol, 2012, 107(4):277.
- [5] Fujii Y, Shirai M, Tsuchimochi H, et al. Hyperoxic condition promotes an inflammatory response during cardiopulmonary bypass in a rat model [J]. Artif Organs, 2013, 37(12):1034-1040.
- [6] Dong LY, Zheng JH, Qiu XX, et al. Ischemic preconditioning reduces deep hypothermic circulatory arrest cardiopulmonary bypass induced lung injury [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013, 17(13):1789-1799.
- [7] Qiu W, zheng L, Gu H, et al. Comparison between adult and infant lung injury in a rabbit ischemia-reperfusion mode [J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2008, 136(2):352-359.
- [8] Li X, Wu D, Shen J, et al. Papamycin induces autophagy in the melanoma cell line M14 via regulation of the expression levels of Bcl-2 and Bax [J]. Oncol Lett, 2013, 5(1):167-172.

收稿日期: 2014-12-04; 修回日期: 2015-01-13