

益气活血通络解毒方对肺缺血 / 再灌注损伤小鼠 细胞凋亡及 c-Jun 氨基末端激酶通路的影响

石璐 宋冬 贾旭广 罗梓垠 项冰倩 戴雍月 罗岷 王万铁

644000 四川宜宾, 四川省宜宾卫生学校生理教研室(石璐、罗岷), 内科教研室(贾旭广); 325035 浙江温州, 温州医科大学缺血 / 再灌注损伤研究所(宋冬、罗梓垠、项冰倩、戴雍月、王万铁)

通讯作者: 王万铁, Email: wwt@wmu.edu.cn

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.01.020

【摘要】目的 观察益气活血通络解毒方(YHTJF)对小鼠肺缺血 / 再灌注(I/R)损伤(LIRI)的影响, 并探讨 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)是否参与其凋亡机制。**方法** 选择雄性 C57BL/6J 小鼠 70 只, 按随机数字表法分为正常对照组(C 组)、羧甲基纤维素钠(CMC-Na) + 正常对照组(CMC-Na+C 组)、CMC-Na + 假手术组(CMC-Na+S 组)、CMC-Na+I/R 模型组和 CMC-Na+YHTJF 低、中、高浓度干预组(CMC-Na+YL 组、CMC-Na+YM 组、CMC-Na+YH 组)。C 组不进行任何处理; CMC-Na+S 组只开胸, 不夹闭肺门; 其余各组均开胸夹闭肺门 30 min, 再松开动脉夹使左肺再灌注 3 h。术毕处死小鼠留取肺组织, 光镜和电镜下观察肺组织形态学及超微结构改变, 并观察肺泡损伤定量评估指标(IQA)的变化; 用原位末端缺刻标记试验(TUNEL)检测肺组织细胞凋亡指数(AI); 用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)和反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 JNK、葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)的 mRNA 和蛋白表达; 并分析肺组织 AI 与 JNK、GRP78 的 mRNA 和蛋白表达及 IQA 的相关性。**结果** CMC-Na+I/R 组 IQA、AI 及 JNK 和 GRP78 mRNA 和蛋白表达均较 CMC-Na+S 组明显升高 [IQA: (74.00±7.31)% 比 (7.00±1.23)%, AI: (64.40±11.97)% 比 (5.60±1.14)%, JNK mRNA (灰度值): 1.143±0.284 比 0.152±0.128, GRP78 mRNA (灰度值): 0.897±0.129 比 0.284±0.044, JNK 蛋白(A 值): 0.428±0.074 比 0.073±0.052, GRP78 蛋白(A 值): 1.075±0.145 比 0.589±0.060], CMC-Na+YL 组、CMC-Na+YM 组、CMC-Na+YH 组 IQA、AI、JNK mRNA 和蛋白、GRP 78 mRNA 表达均较 CMC-Na+I/R 组明显下降, 以 CMC-Na+YM 组较 CMC-Na+YL 和 CMC-Na+YH 组下降程度更显著 [IQA: (26.20±3.35)% 比 (34.00±5.34)%、(41.20±9.18)%, AI: (29.40±3.05)% 比 (48.20±3.83)%、(39.20±6.14)%, JNK mRNA (灰度值): 0.681±0.130 比 0.804±0.153、0.938±0.111, GRP78 mRNA (灰度值): 0.450±0.105 比 0.747±0.231、0.566±0.115, JNK 蛋白(A 值): 0.188±0.049 比 0.261±0.065、0.209±0.063, 均 $P < 0.01$], CMC-Na+YH 组、CMC-Na+YL 组和 CMC-Na+YM 组 GRP78 蛋白表达较 CMC-Na+I/R 组明显升高, 以 CMC-Na+YH 组升高程度较 CMC-Na+YL 组和 CMC-Na+YM 组更显著 (A 值: 1.429±0.226 比 1.130±0.169、1.128±0.177, 均 $P < 0.01$)。光镜下可见各组细胞凋亡以肺血管内皮细胞、肺泡上皮细胞为主, 棕色颗粒为阳性细胞。电镜下可见: CMC-Na+I/R 组细胞核固缩并边集在核膜下, 胞质浓缩, 板层体减少、排空增多, 细胞膜上微绒毛减少或消失, 线粒体肿胀, 肺泡隔及毛细血管内炎性细胞附壁增多。与 CMC-Na+I/R 组比较, CMC-Na+YL 组、CMC-Na+YM 组、CMC-Na+YH 组肺组织超微结构损伤减轻, 肺泡结构超微结构清晰可辨, 核染色质较均匀, 胞质增多, II 型肺泡上皮细胞表面微绒毛较多, 板层小体数量增多, 线粒体肿胀减轻, 以 CMC-Na+YM 组减轻最明显。肺组织 AI 与 JNK、GRP78 的 mRNA 和蛋白表达、IQA 均呈显著正相关性 (r 值分别为 0.907、0.928、0.880、0.712、0.911, 均 $P < 0.01$)。**结论** YHTJF 可有效减轻小鼠 LIRI 肺组织细胞的凋亡, 其机制可能与抑制 JNK 通路有关。

【关键词】 益气活血通络解毒方; c-Jun 氨基末端激酶; 缺血 / 再灌注损伤, 肺; 细胞凋亡; 小鼠
基金项目: 浙江省中医药重点研究计划(2013ZZ011); 四川省宜宾市重点科技计划项目(2015SF035)

Effects of traditional Chinese medicine Yiqi Huoxue Tongluo Jiedu prescription on pneumocyte apoptosis and c-Jun N-terminal protein kinase pathway in mice after lung ischemia/reperfusion injury Shi Lu, Song Dong, Jia Xuguang, Luo Ziyin, Xiang Bingqian, Dai Yongyue, Luo Min, Wang Wantie

Department of Physiology, Yibin Health School, Yibin 644000, Sichuan, China (Shi L, Luo M); Department of Internal Medicine, Yibin Health School, Yibin 644000, Sichuan, China (Jia XG); Ischemia/Reperfusion Injury Research Institute, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, Zhejiang, China (Song D, Luo ZY, Xiang BQ, Dai YY, Wang WT)

Corresponding author: Wang Wantie, Email: wwt@wmu.edu.cn

【Abstract】Objective To observe the effects of Yiqi Huoxue Tongluo Jiedu fang (YHTJF) on pneumocyte apoptosis after lung ischemia/reperfusion (I/R) injury (LIRI) in mice and to investigate whether c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) is involved in the mechanism of apoptosis. **Methods** Seventy C57BL/6J male mice were randomly divided into seven groups: normal control group (C group), carboxyl methyl cellulose-Na+normal control group (CMC-Na+C group), CMC-Na+sham group (CMC-Na+S group), CMC-Na+I/R group (CMC-Na+I/R group) and CMC-Na+YHTJF-low, -middle, -high dose groups (CMC-Na+YL, CMC-Na+YM, CMC-Na+YH groups). C group did not undergo any processing; in CMC-Na+S group, only was chest opened without clipping the lung hilum; in the rest of the four groups, they all underwent opening of the chest and clipping the lung hilum for 30 minutes, then the clipping of artery was relieved and left lung reperfusion was carried out for 3 hours. After operation, the mice

were sacrificed, the lung tissues were harvested. Under light and electron microscopes, the lung morphological and ultra-structural changes were observed, and the changes of index of quantitative evaluation for alveolar damage (IQA) were determined. The terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) was applied to evaluate the apoptosis index (AI) of the lung tissues. The protein and mRNA expressions of JNK and glucose regulating protein 78 (GRP78) in lung tissues were detected by Western Blot and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR); the correlations between lung AI and the expressions of mRNA and protein of JNK and GRP78, IQA were analyzed. **Results** Compared with CMC-Na+S group, IQA, AI and mRNA and the protein expressions of JNK and GRP78 in CMC-Na+I/R group were obviously higher [IQA: $(74.00 \pm 7.31)\%$ vs. $(7.00 \pm 1.23)\%$, AI: $(64.40 \pm 11.97)\%$ vs. $(5.60 \pm 1.14)\%$, JNK mRNA (gray value): 1.143 ± 0.284 vs. 0.152 ± 0.128 , GRP78 mRNA (gray value): 0.897 ± 0.129 vs. 0.284 ± 0.044 , JNK protein (A value): 0.428 ± 0.074 vs. 0.073 ± 0.052 , GRP78 protein (A value): 1.075 ± 0.145 vs. 0.589 ± 0.060]. Compared with CMC-Na+I/R group, the IQA, AI, protein and mRNA expressions of JNK and GRP78 in CMC-Na+YL, CMC-Na+YM, CMC-Na+YH groups were all lower, and the degree of reduction in group CMC-Na+YM was the most remarkable, greater than that in CMC-Na+YL or CMC-Na+YH group [IQA: $(26.20 \pm 3.35)\%$ vs. $(34.00 \pm 5.34)\%$, $(41.20 \pm 9.18)\%$, AI: $(29.40 \pm 3.05)\%$ vs. $(48.20 \pm 3.83)\%$, $(39.20 \pm 6.14)\%$, JNK mRNA (gray value): 0.681 ± 0.130 vs. 0.804 ± 0.153 , 0.938 ± 0.11 , GRP78 mRNA (gray value): 0.450 ± 0.105 vs. 0.747 ± 0.231 , 0.566 ± 0.115 , JNK protein (A value): 0.188 ± 0.049 vs. 0.261 ± 0.065 , 0.209 ± 0.063 , all $P < 0.01$], compared with the CMC-Na+I/R group, the expression of GRP78 protein was obviously higher in CMC-Na+YH, CMC-Na+YL, CMC-Na+YM groups and the most remarkably high was in CMC-Na+YH group (A value: 1.429 ± 0.226 vs. 1.130 ± 0.169 , 1.128 ± 0.177 , all $P < 0.01$). The apoptosis of each group was mainly in the pulmonary vascular endothelial cells and alveolar epithelial cells, and brown particles were positive cells under light microscope. Under transmission electron microscope: nuclear pyknosis and margination under the nuclear membrane, cytoplasm condensed, lamellar bodies decreased and emptying increased, cell membrane microvilli decreased or disappeared, mitochondria swelling, inflammatory cells increased in alveolar septum and adhering onto the capillary walls could be seen in CMC-Na+I/R group. Compared with CMC-Na+I/R group, the lung tissue ultrastructural damage alleviated, ultrastructure of alveoli clearly seen, nuclear chromatin relatively uniform, cytoplasm increased, type II alveolar epithelial cell surface microvilli relatively plenty, lamellar corpuscle number increased, mitochondria swelling ameliorated in CMC-Na+YH, CMC-Na+YL, CMC-Na+YM groups and the most remarkable one was CMC-Na+YM group. AI was significantly positive correlated with the mRNA and protein expressions of JNK, GRP78 and IQA ($r = 0.907, 0.928, 0.880, 0.712, 0.911$, all $P < 0.01$). **Conclusions** YHTJF may effectively alleviate the cell apoptosis in mice LIRI, and its mechanism may be related to the inhibition of JNK pathway.

【Key words】 Yiqi Huoxue Tongluo Jiedu fang; c-Jun N-terminal protein kinase; Lung ischemia/reperfusion injury; Apoptosis; Mice

肺缺血/再灌注(I/R)损伤(LIRI)是严重影响肺脏预后的关键因素^[1]。有研究证实,细胞凋亡亦参与了LIRI的发生发展^[2-3]。c-Jun 氨基末端激酶(JNK)信号转导通路是公认的与细胞增殖、分化或凋亡密切相关的酶类^[4]。对JNK介导的细胞凋亡进行更深入的研究有重要意义。中医理论认为,LIRI主要表现为气虚血瘀,缺血使肺组织局部气血供应不足、血流不畅,肺主气功能受到损伤,再灌注时气血由于推动无力而流通不畅,不断在患处聚积,积而成瘀,瘀久蓄毒,导致肺泡上皮和血管内皮细胞凋亡,甚至坏死。在病理上表现为瘀毒,治疗上可采用具有益气、活血、通络等功效的中药,本研究在前期研究基础上,用北京中医药大学制备的益气活血通络解毒方(YHTJF,主要由黄芪、三七、虎杖等组成)对小鼠LIRI模型进行干预,以明确其疗效及作用机制,为临床防治LIRI提供实验依据。

1 材料与方

1.1 动物分组及处理:选择SPF级C57BL/6J雄性小鼠70只,体质量21~25g,购于温州医科大学实验动物中心,动物许可证号:SYXK(浙)2012-075。

按随机数字表法分为正常对照组(C组)、CMC-Na+正常对照组(CMC-Na+C组),CMC-Na+假手术组(CMC-Na+S组),CMC-Na+缺血/再灌注(I/R)模型组(CMC-Na+I/R组)以及CMC-Na+YHTJF低、中、高浓度干预组(CMC-Na+YL组、CMC-Na+YM组、CMC-Na+YH组),每组10只。术前C组不进行处理;其余各组术前腹腔注射CMC-Na溶液,CMC-Na+YL组、CMC-Na+YM组、CMC-Na+YH组术前每日腹腔注射等量的低、中、高浓度YHTJF溶液[用蒸发散射检测仪及高效液相色谱仪将YHTJF中三七总皂苷、虎杖苷和黄芪甲苷以低(3g/L三七总皂苷+0.8g/L黄芪甲苷+0.8g/L虎杖苷)、中(6g/L三七总皂苷+1.6g/L黄芪甲苷+1.6g/L虎杖苷)、高(12g/L三七总皂苷+3.2g/L黄芪甲苷+3.2g/L虎杖苷)配比溶于含3%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)的磷酸盐缓冲液(PBS)无菌溶液中,制成YHTJF组方],剂量均为20mL/g,均连续7d。手术当日,C组、CMC-Na+C组直接处死动物取标本;CMC-Na+S组只开胸,不夹闭肺门,3.5h后处死动物取标本;其余各组均开胸夹闭肺门30min,再松

开动脉夹使左肺再灌注 3 h 后处死小鼠取肺组织。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 肺泡损伤定量指标 (IQA) 的测定: 取小鼠左肺下叶组织, 经包埋、切片、染色、封片后光镜下随机观察 50 个视野, 将肺泡内红细胞计数 (RBC) 或白细胞计数 (WBC) >2 或肺泡内有渗出液者视为损伤细胞; IQA 为每个视野内损伤肺泡数占总肺泡数的百分比。

1.2.2 用原位末端刻标记试验 (TUNEL) 检测肺组织细胞凋亡情况: 按试剂盒 (瑞士 Roche 公司) 说明书步骤操作, 高倍镜下观察切片细胞数, 细胞核棕褐色为凋亡细胞。每张切片观察约 500 个细胞, 细胞凋亡指数 (AI) 为每 100 个细胞内的阳性细胞数。

1.2.3 聚合酶链反应 (PCR) 检测肺组织 JNK 和 GRP78 的 mRNA 表达水平: 取肺组织用液氮研磨, TRIzol 法提取总 RNA, cDNA 合成及扩增均按说明书进行操作; 反应条件: 94 °C、预变性 3 min, 94 °C、变性 30 s; JNK 56 °C, GAPDH 58 °C, GRP78 49 °C 退火 30 s; 72 °C, 延伸 1 min; 72 °C、5 min 终止延伸; 循环 33 次, 引物由英潍捷基公司合成。用 Quantity One 凝胶软件分析系统检测灰度值, JNK 及 GRP78 的 mRNA 表达量用三磷甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 内参照灰度值进行校正。

1.2.4 用蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测肺组织 JNK 和葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 的蛋白表达水平: 将肺组织低温研磨并裂解, 离心取上清液, 二喹啉甲酸法 (BCA) 法测定蛋白浓度, 绘制标准曲线, 样品蛋白定量成 2 μg/L, 变性煮沸 10 min。经电泳、转膜、封闭、漂洗后, 加入一抗 4 °C 孵育过夜, 用含吐温的磷酸盐缓冲液 (TBST) 洗涤, 加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗室温孵育 1.5 h, 洗涤后加免疫印迹化学发光 (ECL) 反应, 曝光、显影、定影, 以 JNK 与 GRP78 和 GAPDH 吸光度 (A) 值比值表示 JNK 及 GRP78 的蛋白表达量。

1.2.5 肺组织超微结构观察: 取小鼠左肺尖肺组织, 固定、染色、脱水、包埋、聚合、切片后, 硝酸铅-醋酸铀双染, 透射电镜下观察肺组织超微结构改变。

1.2.6 相关性分析: 采用 Pearson 法分析 AI 与 JNK、GRP78 的 mRNA 和蛋白表达及 IQA 的相关性。

1.3 统计学处理: 使用 SPSS 13.0 统计软件处理数据, 符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 采用 *t* 检验, 两两比较采用 Bonferroni 校正的 *t* 检验, 采用 Pearson 法分析相关性, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

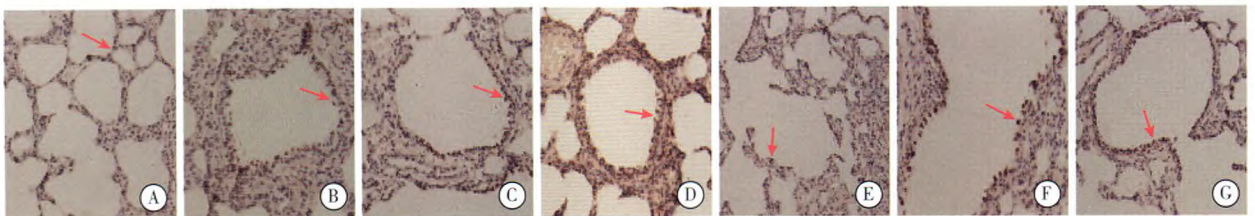
2.1 各组肺组织 IQA 比较 (表 1): CMC-Na+I/R 组 IQA 较 CMC-Na+S 组明显升高, CMC-Na+YL 组、CMC-Na+YM 组、CMC-Na+YH 组 IQA 较 CMC-Na+I/R 组明显下降, 以 CMC-Na+YM 组的下降程度更显著 (均 *P* < 0.01)。

表 1 各组肺组织 IQA 及 AI 的变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	IQA (%)	AI (%)
C 组	10	5.80 ± 1.30	4.60 ± 1.34
CMC-Na+C 组	10	6.00 ± 1.00	4.80 ± 0.83
CMC-Na+S 组	10	7.00 ± 1.23	5.60 ± 1.14
CMC-Na+I/R 组	10	74.00 ± 7.31 ^a	64.40 ± 11.97 ^a
CMC-Na+YL 组	10	34.00 ± 5.34 ^b	48.20 ± 3.83 ^b
CMC-Na+YM 组	10	26.20 ± 3.35 ^{bc}	29.40 ± 3.05 ^{bc}
CMC-Na+YH 组	10	41.20 ± 9.18 ^{bed}	39.20 ± 6.14 ^{bed}

注: 与 CMC-Na+S 组比较, ^a*P* < 0.01; 与 CMC-Na+I/R 组比较, ^b*P* < 0.01; 与 CMC-Na+YL 组比较, ^c*P* < 0.01; 与 CMC-Na+YM 组比较, ^d*P* < 0.01

2.2 各组肺组织细胞凋亡情况比较 (表 1; 图 1): C 组、CMC-Na+C 组和 CMC-Na+S 组细胞凋亡数量较少, 3 组 AI 比较差异均无统计学意义 (均 *P* > 0.05); CMC-Na+I/R 组 AI 较 CMC-Na+S 组升高; CMC-Na+YL 组、CMC-Na+YM 组、CMC-Na+YH 组细胞凋亡减少, AI 均较 CMC-Na+I/R 组明显降低, 以 CMC-Na+YM 组下降更明显 (均 *P* < 0.01)。且各组细胞凋亡以肺血管内皮细胞、肺泡上皮细胞为主。



注: A 为 C 组; B 为 CMC-Na+C 组; C 为 CMC-Na+S 组; D 为 CMC-Na+I/R 组; E 为 CMC-Na+YL 组; F 为 CMC-Na+YM 组; G 为 CMC-Na+YH 组; 箭头标注的棕色颗粒为阳性细胞

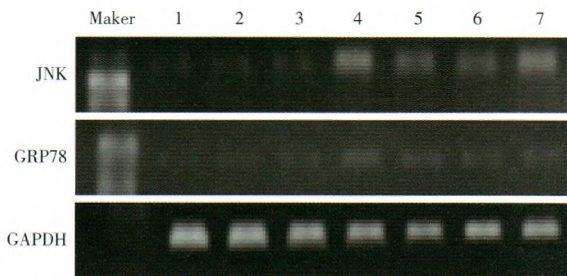
图 1 光镜下观察肺组织细胞凋亡情况 (TUNEL 高倍放大)

2.3 各组肺组织 JNK 和 GRP78 mRNA 表达比较 (表 2; 图 2): C 组、CMC-Na+C 组和 CMC-Na+S 组 JNK、GRP78 的 mRNA 表达偏低; CMC-Na+I/R 组 JNK、GRP78 的 mRNA 表达较 CMC-Na+S 组明显增加, CMC-Na+YL 组、CMC-Na+YM 组、CMC-Na+YH 组 JNK 和 GRP78 的 mRNA 表达量均较 CMC-Na+I/R 组下降 (均 $P < 0.01$), 且以 CMC-Na+YM 组下降最为显著 (均 $P < 0.01$)。

表 2 各组肺组织 JNK 和 GRP78 的 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	JNK mRNA (灰度值)	GRP78 mRNA (灰度值)
C 组	10	0.097 ± 0.076	0.192 ± 0.478
CMC-Na+C 组	10	0.112 ± 0.050	0.178 ± 0.050
CMC-Na+S 组	10	0.152 ± 0.128	0.284 ± 0.044
CMC-Na+I/R 组	10	1.143 ± 0.284 ^a	0.897 ± 0.129 ^a
CMC-Na+YL 组	10	0.804 ± 0.153 ^b	0.747 ± 0.230 ^b
CMC-Na+YM 组	10	0.681 ± 0.130 ^{bc}	0.450 ± 0.105 ^{bc}
CMC-Na+YH 组	10	0.938 ± 0.115 ^{bed}	0.566 ± 0.115 ^{bed}

注: 与 CMC-Na+S 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 CMC-Na+I/R 组比较, ^b $P < 0.01$; 与 CMC-Na+YL 组比较, ^c $P < 0.01$; 与 CMC-Na+YM 组比较, ^d $P < 0.01$



注: 1 为 C 组; 2 为 CMC-Na 组; 3 为 CMC-Na+C 组; 4 为 CMC-Na+S 组; 5 为 CMC-Na+YL 组; 6 为 CMC-Na+YM 组; 7 为 CMC-Na+YH 组

图 2 各组 JNK 和 GRP78 的 mRNA 表达水平比较

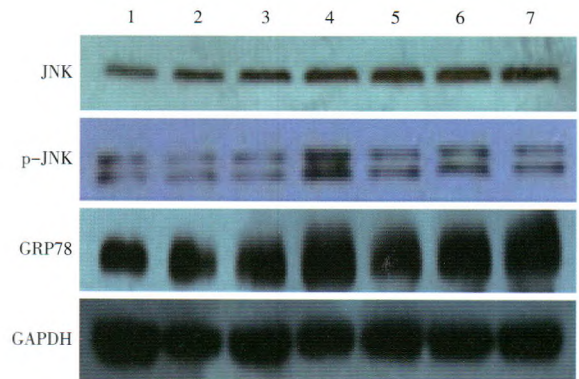
2.4 各组肺组织 JNK 和 GRP78 的蛋白水平表达比较 (表 3; 图 3): C 组、CMC-Na+C 组和 CMC-Na+S 组 JNK 和 GRP78 蛋白表达均较低, CMC-Na+I/R 组 JNK 和 GRP78 蛋白表达均较 CMC-Na+S 组增加, CMC-Na+YL 组、CMC-Na+YM 组、CMC-Na+YH

组 JNK 较 CMC-Na+I/R 组明显下降, GRP78 较 CMC-Na+I/R 组明显升高 (均 $P < 0.01$)。

表 3 各组肺组织 JNK 和 GRP78 的蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	JNK 蛋白 (A 值)	GRP78 蛋白 (A 值)
C 组	10	0.050 ± 0.031	0.625 ± 0.097
CMC-Na+C 组	10	0.047 ± 0.034	0.652 ± 0.101
CMC-Na+S 组	10	0.073 ± 0.052	0.589 ± 0.060
CMC-Na+I/R 组	10	0.428 ± 0.074 ^a	1.075 ± 0.145 ^a
CMC-Na+YL 组	10	0.261 ± 0.065 ^b	1.130 ± 0.169 ^b
CMC-Na+YM 组	10	0.188 ± 0.049 ^{bc}	1.128 ± 0.177 ^{bc}
CMC-Na+YH 组	10	0.209 ± 0.063 ^{bed}	1.429 ± 0.226 ^{bed}

注: 与 CMC-Na+S 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 CMC-Na+I/R 组比较, ^b $P < 0.01$; 与 CMC-Na+YL 组比较, ^c $P < 0.01$; 与 CMC-Na+YM 组比较, ^d $P < 0.01$



注: 1 为 C 组; 2 为 CMC-Na 组; 3 为 CMC-Na+C 组; 4 为 CMC-Na+S 组; 5 为 CMC-Na+YL 组; 6 为 CMC-Na+YM 组; 7 为 CMC-Na+YH 组

图 3 各组肺组织 JNK 和 GRP78 的蛋白表达水平比较

2.5 各组肺组织超微结构改变 (图 4): C 组、CMC-Na+C 组和 CMC-Na+S 组中 II 型肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞结构完整, CMC-Na+I/R 组细胞核固缩并边集在核膜下, 胞质浓缩, 板层体减少、排空增多, 细胞膜上微绒毛减少或消失, 线粒体肿胀, 肺泡隔及毛细血管内炎症细胞附壁增多。CMC-Na+YL 组、CMC-Na+YM 组、CMC-Na+YH 组肺组织超微结构损伤较 CMC-Na+I/R 组轻, 以 CMC-Na+YM 组最明显。



注: A 为 C 组; B 为 CMC-Na+C 组; C 为 CMC-Na+S 组; D 为 CMC-Na+I/R 组; E 为 CMC-Na+YL 组; F 为 CMC-Na+YM 组; G 为 CMC-Na+YH 组; 箭头为板层小体

图 4 电镜下观察肺组织形态学改变 (硝酸铅-醋酸铀双染 高倍放大)

2.6 相关性分析(表 4):肺组织 AI 与 JNK、GRP78 的 mRNA 和蛋白及 IQA 均呈显著正相关(均 $P < 0.01$)。

表 4 AI 与 JNK、GRP78 mRNA 和蛋白表达的相关性分析

指标	AI	
	r 值	P 值
JNK mRNA	0.907	0.000
JNK 蛋白	0.880	0.000
GRP78 mRNA	0.928	0.000
GRP78 蛋白	0.712	0.000
IQA	0.911	0.000

3 讨论

目前认为 LIRI 的发生主要与 WBC 活化、氧自由基的产生、细胞凋亡等有关。本实验结果显示, C 组、CMC-Na+C 组和 CMC-Na+S 组 IQA 比较差异无统计学意义,而 CMC-Na+I/R 组 IQA 明显升高,说明 CMC-Na+I/R 组肺组织损伤明显。TUNEL 检测显示: C 组、CMC-Na+C 组、CMC-Na+S 组凋亡细胞较少, CMC-Na+I/R 组出现大量凋亡细胞。电镜下发现, C 组、CMC-Na+C 组、CMC-Na+S 组细胞结构基本完好,而 CMC-Na+I/R 组结构损伤明显。以上结果提示,本实验 I/R 模型复制成功。

内质网应激(ERS)介导的细胞凋亡是许多疾病的主要发病机制^[5-6],活性氧增多及钙稳态的破坏等因素均可损伤内质网蛋白折叠功能,未折叠及非正常折叠蛋白质在内质网腔内聚集,发生未折叠蛋白反应(UPR)^[7]。JNK 通路是 UPR 的关键凋亡信号转导通路之一,当其表达量急速上调时,相对应的通路处于被激活的状态。GRP78 作为分子伴侣,当其表达量增加时,能维持内质网稳态和促进细胞结构及功能的恢复^[8]。张志坚等^[9]研究证实, JNK 和 GRP78 参与 ERS 介导的肺损伤。研究证实, JNK 和 GRP78 参与了 ERS 介导的细胞凋亡通路^[10]。本研究表明, C 组、CMC-Na+C 组和 CMC-Na+S 组 JNK 和 GRP78 的 mRNA 和蛋白低表达, CMC-Na+I/R 组表达明显增加;将 JNK、GRP78 和 AI 进行相关性分析显示, AI 与 JNK、GRP78 mRNA 和蛋白表达呈显著相关。即本实验中,UPR 的 JNK 蛋白参与调控 I/R 引发的肺组织细胞凋亡。

目前研究已证实,生脉散^[11]、姜黄素^[12]、人参皂苷^[13]等对 LIRI 具有保护作用。黄芪甲苷是黄芪中主要活性成分,其具有改善器官缺血、抗炎等作用^[14-15];虎杖苷是虎杖的提取物,具有良好的抗氧化、清除自由基、改善组织微循环的作用^[16];三七的主要活性成分三七总皂苷,具有扩张血管等作用^[17]。本实验在前期研究基础上选用益气活血通络

解毒方,将方中 3 种单体依低、中、高剂量配比干预肺 I/R 小鼠模型。本实验结果表明,与 CMC-Na+I/R 组比较,药物干预组 IQA 明显降低,细胞凋亡率明显降低, JNK 的 mRNA 及蛋白表达水平均降低,且以 CMC-Na+YM 组降低最为显著;电镜下可见药物干预组肺泡内核遭到破坏情况较 CMC-Na+I/R 组显著减轻,核染色质分布较 CMC-Na+I/R 组相对均匀,板层小体的数量接近正常且形态尚完好,线粒体轻微肿胀,且以 CMC-Na+YM 组最明显;且肺组织 AI 与 JNK、GRP78 的 mRNA 和蛋白表达、IQA 均呈显著正相关,表明 YHTJF 能通过阻断 JNK 凋亡信号通路的激活来减少肺脏受损。

综上所述,中药 YHTJF 能减轻 LIRI 引发的细胞凋亡,且中剂量组效果最明显;其保护机制可能与抑制过度 ERS 过程中 UPR 通路(主要是 JNK 蛋白)的活化有关。

参考文献

- [1] 黄剑伟,龙小毛.肺移植供肺保护研究进展[J/CD].实用器官移植电子杂志,2014,2(2):117-119.
- [2] 石璐,贾旭广,罗岷,等.缺血后处理对大鼠再灌注损伤肺细胞凋亡的影响[J].中国应用生理学杂志,2014,30(1):60-63.
- [3] 王颖,张淑文,王宝恩.细胞凋亡在大鼠急性肺损伤发生机制中的意义[J].中华危重病急救医学,2001,13(2):90-94.
- [4] 张倩,张东君,丛霞,等. JNK 介导的细胞凋亡[J].中国畜牧杂志,2015,51(23):87-92.
- [5] Urban P, Bilecova-Rabajdova M, Marekova M, et al. Progression of apoptotic signaling from mesenteric ischemia-reperfusion injury to lungs: correlation in the level of ER chaperones expression [J]. Mol Cell Biochem, 2012, 362(1-2): 133-140.
- [6] Wang Y, Tian J, Qiao X, et al. Intermedin protects against renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress [J]. BMC Nephrol, 2015, 16: 169.
- [7] Papadopoulos D, Siempis T, Theodorakou E, et al. Hepatic ischemia and reperfusion injury and trauma: current concepts [J]. Arch Trauma Res, 2013, 2(2): 63-70.
- [8] Xiong Z, Jiang R, Li X, et al. Different Roles of GRP78 on Cell Proliferation and Apoptosis in Cartilage Development [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(9): 21153-21176.
- [9] 张志坚,董瑶瑶,李晓萍,等.沙苑子总黄酮通过抑制内质网应激和 JNK 通路过度活化减轻百草枯中毒大鼠肺损伤[J].中华危重病急救医学,2014,26(6):383-387.
- [10] Gui D, Huang J, Liu W, et al. Astragaloside IV prevents acute kidney injury in two rodent models by inhibiting oxidative stress and apoptosis pathways [J]. Apoptosis, 2013, 18(4): 409-422.
- [11] 林丽娜,张圣恭,王万铁,等.生脉注射液对兔肺缺血/再灌注损伤时细胞凋亡的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2007,14(6):361-363,插 1.
- [12] 赵珊,马迎春,刘亚坤,等.姜黄素通过抑制内质网应激和 JNK 通路过度活化减轻小鼠肺缺血再灌注损伤[J].中国病理生理杂志,2013,29(2):308-313.
- [13] 耿庆,乌达,谢远财,等.人参皂甙 Rb1 对肺缺血/再灌注损伤细胞凋亡及其调控基因表达的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2005,12(3):159-161.
- [14] 璩竹玲,董河,王世端.黄芪对兔肺缺血/再灌注损伤的保护作用[J].中国中西医结合急救杂志,2010,17(1):13-16,封 3.
- [15] 熊平,蒋灵芝,廖秀清.黄芪甲苷保护大鼠肺缺血再灌注肺损伤的形态学研究[J].南方医科大学学报,2010,30(8):1864-1867.
- [16] 王方岩,徐正衿,张晓隆,等.虎杖甙抗肺缺血/再灌注损伤作用及其机制初探[J].中国应用生理学杂志,2008,24(1):62-65.
- [17] 邱晓晓,宋张娟,戴雍月,等.三七总皂苷对肺缺血/再灌注损伤时细胞凋亡及 c-Jun 氨基末端激酶的影响[J].生理学报,2012,64(2):135-141.

(收稿日期:2016-08-22)