

• 论著 •

生脉注射液对兔肺缺血/再灌注损伤时细胞凋亡的影响

林丽娜¹, 张圣恭¹, 王万铁², 邱晓晓², 戴雍月², 王 青²

(1. 温州医学院附属第一医院麻醉科, 浙江 温州 325000; 2. 温州医学院病理生理学教研室, 浙江 温州 325035)

【摘要】 目的: 观察生脉注射液(SMI)对兔肺缺血/再灌注(I/R)损伤中细胞凋亡的影响。方法: 将 30 只日本大耳白兔按随机数字表法分为 3 组, 每组 10 只。用开胸后阻断左肺门 60 min、再灌注 180 min 制备兔单侧肺 I/R 损伤模型。对照组仅行开胸, 于左肺门过阻断带并观察 240 min。SMI 组于缺血前 20 min 经耳缘静脉注射 SMI 15 ml/kg, 其余操作同 I/R 组。于再灌注 180 min 时静脉注入氯化钾处死动物, 取各组肺组织, 观察肺湿/干重(W/D)比值、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)浓度、一氧化氮(NO)含量、肺损伤定量评价指标(IQA)及肺组织细胞凋亡指数(AI)。结果: 与对照组比较, I/R 组肺组织 SOD 活性、NO 含量均明显降低(P 均 <0.01), MDA、W/D 比值、IQA、AI 均明显升高(P 均 <0.01)。与 I/R 组比较, SMI 组 SOD 活性、NO 含量均明显升高($P<0.01$ 和 $P<0.05$), MDA、W/D 比值、IQA、AI 均不同程度降低(P 均 <0.01)。AI 与 MDA、W/D 比值、IQA 均呈显著正相关($r_1=0.835, r_2=0.751, r_3=0.656, P$ 均 <0.01), 与 SOD、NO 呈显著负相关($r_4=-0.769, r_5=-0.488, P<0.01$ 和 $P<0.05$)。结论: SMI 可通过提高体内 NO 水平、降低氧自由基水平、减轻脂质过氧化反应、抑制肺组织细胞凋亡, 从而达到减轻肺损伤的作用。

【关键词】 缺血/再灌注损伤; 肺; 氧自由基; 一氧化氮; 凋亡; 生脉注射液

中图分类号: R285.5; R256.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2007)06-0361-04

Effect of Shengmai injection (生脉注射液) on pneumocyte apoptosis during pulmonary ischemia/reperfusion injury in rabbits LIN Li-na¹, ZHANG Sheng-gong¹, WANG Wan-tie², QIU Xiao-xiao², DAI Yong-yue², WANG Qing². 1. Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China; 2. Department of Pathophysiology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, Zhejiang, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of Shengmai injection (SMI, 生脉注射液) on pneumocyte apoptosis during pulmonary ischemia/reperfusion (I/R) injury in rabbits. **Methods:** Thirty rabbits used for unilateral lung I/R model were randomly divided into three groups (each $n=10$): control group or the sham operation group (C group with observation for 240 minutes), I/R group and SMI group (15 ml/kg SMI intravenously injected 20 minutes before ischemia). The model of rabbit lung I/R injury was replicated by ischemia for 60 minutes and reperfusion for 180 minutes. Rabbits were sacrificed after injected KCl at 180 minutes after reperfusion and lung tissues were harvested. The activity of superoxide dismutase (SOD), the content of plasma nitric oxide (NO), the concentration of malondialdehyde (MDA), the wet to dry weight ratio of lung tissue (W/D), the index of quantitative assessment of histologic lung injury (IQA) and apoptosis index (AI) at 180 minutes after reperfusion in the lung tissues were measured respectively in different groups. **Results:** The activity of SOD and the content of NO were significantly lower in I/R group than in C group (both $P<0.01$); while the content of MDA, the value of W/D, IQA, AI were evidently higher in I/R group than in C group (all $P<0.01$). SMI group in contrast with I/R group showed that the levels of SOD and NO were higher ($P<0.01$ and $P<0.05$), however, the value of MDA, W/D, IQA, and AI were lower in different degrees (all $P<0.01$). AI was positive correlated with MDA, W/D, IQA ($r_1=0.835, r_2=0.751, r_3=0.656$, all $P<0.01$), while was negative correlated with SOD, NO ($r_4=-0.769, r_5=-0.488, P<0.01$ and $P<0.05$). **Conclusion:** SMI can suppress apoptosis of lung tissue cell during pulmonary I/R injury, which results in the obvious attenuation of the injury of pneumocyte by raising NO level, dropping oxygen free radicals level and decreasing lipid peroxidation.

【Key words】 lung ischemic/reperfusion injury; oxygen free radicals; nitric oxide; apoptosis; Shengmai injection

基金项目: 浙江省中医药管理局科研基金(2005C088); 浙江省温州市科技计划重点项(Y2005A080)

作者简介: 林丽娜(1963-), 女(汉族), 浙江省人, 硕士生导师, 教授, 主任医师, 主要从事脏器缺血/再灌注损伤的发生机制及其防治的研究 (Email: wzlinlina@tom.com)。

肺组织对缺血/再灌注(I/R)很敏感,主要表现为微血管通透性增加、肺毛细血管阻力增加伴微血栓及组织细胞水肿的形成、气体交换障碍^[1]。国内外研究表明,凋亡与生肺缺血/再灌注损伤(LIRI)的病理生理机制^[2-3],干预细胞凋亡对肺损伤有明显的调节作用^[4]。研究发现,生脉注射液(SMI)可明显减轻再灌注损伤^[5-7]。本实验通过建立兔单侧 LIRI 模型,观察 SMI 对 LIRI 中细胞凋亡的影响,并探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料:清洁级日本大耳白兔 30 只,雌雄不拘,体重 2.0~2.5 kg,由温州医学院动物实验中心提供(温医动字:220002)。SMI 由雅安三九药业有限公司生产,每支 20 ml;超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;细胞凋亡检测试剂盒(POD)购于武汉博士德生物工程有限公司;其余均为市售分析纯试剂。

1.2 动物模型制备及分组:参照 Sekido 等^[8]介绍的方法复制在体兔 LIRI 模型。将动物按随机数字表法分为 3 组,每组 10 只。对照组(C 组)行开胸、左肺门过阻断带后未做其他处理,观察 240 min;I/R 组开胸后左肺门阻断 60 min,再灌注 180 min;SMI 组于缺血前 20 min 耳缘静脉注射 SMI 15 ml/kg,其余操作同 I/R 组。实验结束时,由静脉注入氯化钾处死各组动物。

1.3 一般指标检测:各组处死动物后立即取肺组织,用于检测下列指标。①NO 含量:用硝酸还原酶法测定血清 NO₂⁻/NO₃⁻ 代表 NO 水平;②SOD 活性:采用黄嘌呤氧化酶法,用 752 型分光光度计在波长 550 nm 处比色测定;③MDA 含量:采用硫代巴比妥酸法,在波长 532 nm 处比色测定。

1.4 肺湿/干重(W/D)比值测定:取 2 g 左右左上肺组织称湿重;70℃电热恒温干燥箱中烤 24 h 后称干重,二者之比即为 W/D 比值。

1.5 肺光镜检查及损伤组织学定量评价:取左肺下叶约 0.1 cm×0.1 cm×0.1 cm 大小组织块,用体积分数为 4%的多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色,在 200 倍视野的光镜下连续观察 10 个视野,计算肺泡损伤数比值[肺泡内含 2 个以上红细胞(RBC)和(或)中性粒细胞(PMN)损伤的肺泡数占总计肺泡数百分比]作为肺损伤定量评价指标(IQA)。

1.6 肺组织细胞凋亡检测:采用原位末端缺刻标记

法(TUNEL),按试剂盒说明书检测。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(×400)下细胞凋亡数,以凋亡细胞/100 个细胞来表示凋亡指数(AI)。

1.7 统计学处理:检测数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析;AI 与 MDA、SOD、NO、W/D 比值、IQA 各参数间的相互关系采用 Pearson 法分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LIRI 时肺组织 MDA、SOD 和 NO 的变化(表 1):I/R 组 MDA 明显高于 C 组($P < 0.01$),SOD、NO 均显著低于 C 组(P 均 < 0.01);SMI 组 MDA 明显低于 I/R 组($P < 0.01$),SOD、NO 均显著高于 I/R 组($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),且与 C 组比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)

表 1 各组大鼠肺组织 SOD、MDA 和 NO 水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Comparison of SOD, MDA and NO level in lung tissue in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)	NO(nmol/mg)
C 组	5.04±0.28	382.64±16.33	26.50±3.42
I/R 组	8.29±0.39 [▲]	289.86±20.11 [▲]	20.81±3.65 [▲]
SMI 组	7.26±0.28 [*]	328.07±15.09 [*]	24.10±4.12 [#]

注:与 C 组比较:▲ $P < 0.01$;与 I/R 组比较:° $P < 0.05$,
* $P < 0.01$

2.2 LIRI 时肺组织 W/D 比值和 IQA 的变化(表 2):I/R 组肺组织 W/D 比值和 IQA 均显著高于 C 组(P 均 < 0.01);SMI 组肺组织 W/D 比值和 IQA 均明显低于 I/R 组(P 均 < 0.01),但 IQA 高于 C 组($P < 0.05$)。

2.3 LIRI 时肺组织细胞 AI 的变化(表 2,彩色插页图 1):C 组肺细胞有少量细胞凋亡;I/R 组凋亡细胞明显增加,主要为肺泡上皮细胞及血管内皮细胞,AI 明显高于 C 组($P < 0.01$);SMI 组凋亡细胞较 I/R 组明显减少,但仍显著高于 C 组(P 均 < 0.01)。

表 2 各组大鼠肺组织 W/D 比值、IQA 及 AI 值比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Comparison of the ratios of W/D, IQA and AI values in lung tissue in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	W/D 比值	IQA(%)	AI(%)
C 组	5.17±0.91	16.09±5.28	1.31±0.07
I/R 组	6.33±0.71 [▲]	49.85±5.85 [▲]	20.59±3.61 [▲]
SMI 组	5.35±0.81 [*]	22.24±4.00 [△]	12.97±2.29 [△]

注:与 C 组比较:△ $P < 0.05$,▲ $P < 0.01$;与 I/R 组比较:° $P < 0.01$

2.4 肺组织 AI 与 MDA、SOD、NO、W/D 比值、IQA 各参数之间的关系(表 3):直线相关分析显示,

MDA、W/D 比值、IQA 与 AI 均呈现显著正相关 (P 均 <0.01); SOD、NO 与 AI 均呈现显著负相关 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。

表 3 AI 与 MDA、SOD、NO、W/D 比值、IQA 的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of AI with MDA, SOD, NO, the ratios of W/D and IQA

指标	检验值	MDA	W/D 比值	IQA	SOD	NO
AI	r 值	0.835	0.751	0.656	-0.769	-0.488
	P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05

3 讨论

凋亡是以 DNA 发生特异性的片段化断裂, 形态上表现为核固缩、胞膜内陷、皱缩、包裹胞质形成凋亡小体为特征, 受特定的基因调控。Fischer 及 Stammberger 等^[2-3]都曾提出凋亡为 LIRI 的早期事件。本实验证明, 再灌注后肺组织细胞凋亡明显增加, 参与了肺损伤。细胞凋亡发生主要通过两条途径, 一是由线粒体所介导的细胞内通路; 二是由死亡受体与配体结合而引起的膜受体通路, 如肿瘤坏死因子 (TNF) 与肿瘤坏死因子受体 (TNFR), Fas 与 Fas 配体 (Fas Ligand, FasL)^[9]。来源于活化的中性粒细胞及大多数肺组织细胞的氧自由基 (OFR) 可介导细胞凋亡^[9]; 主要机制是由于 OFR 使线粒体膜通透性增加, 在胞质内释放细胞色素 C, 可促进聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶 (PARP) 裂解, 激活天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (caspases) 家族; 此外, OFR 还可加强细胞膜蛋白 Fas 的表达^[4]。本研究结果显示, I/R 组 MDA 明显高于 C 组, SOD 显著低于 C 组, 且与 AI 呈显著正、负相关关系, 表明 OFR 及其引发的脂质过氧化反应是 LIRI 后细胞凋亡发生的主要因素之一; 而使用 SMI 治疗后, MDA 明显降低, SOD 显著增加, AI 明显减少, 表明 SMI 可减轻 LIRI 时的细胞凋亡, 与其增强 SOD 活性及降低 MDA 含量有关。

NO 是一种具有多种生物活性的气体分子, 可通过激活环磷酸鸟苷而对机体发挥保护作用, 同时

它还是自由基, 所以具有双面效应。NO 的变化及其与 LIRI 的关系仍有争议, 但更多研究结果倾向于 NO 增多对肺组织是有利的, Yamashita 等^[10]提出, 血液中 NO 含量的增高可抑制肺组织细胞的凋亡。本实验结果也显示, I/R 组肺组织 NO 水平明显降低, NO 与 AI 呈负相关关系; 使用 SMI 后, NO 水平明显升高, 伴随 AI 显著减少, 表明 SMI 可能通过提高体内 NO 水平而减轻 LIRI 时的细胞凋亡。

参考文献:

- [1] Okada K, Fujita T, Minamoto K, et al. Potentiation of endogenous fibrinolysis and rescue from lung ischemia/reperfusion injury in interleukin (IL)-10-reconstituted IL-10 null mice [J]. Biol Chem, 2000, 275(28): 21468-21476.
- [2] Fischer S, Maclean A A, Liu M, et al. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162(5): 1932-1939.
- [3] Stammberger U, Gaspert A, Hillinger S, et al. Apoptosis induced by ischemia and reperfusion in experimental lung transplantation [J]. Ann Thorac Surg, 2000, 69(5): 1532-1536.
- [4] Li C, Jackson R M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 282(2): C227-C241.
- [5] 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.
- [6] 李建生, 张卫红, 赵君玫, 等. 川芎嗪和参麦注射液对脑缺血/再灌注肺损伤老龄大鼠 ATP 酶和自由基代谢的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8(5): 210-212.
- [7] 魏育林, 李亚俊, 刘轩, 等. 参脉注射液对内毒素所致小鼠全身炎症反应综合征和多脏器功能失常综合征保护作用的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(1): 47-50.
- [8] Sekido N, Mukaida N, Harada A, et al. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by monoclonal antibody against interleukin-8 [J]. Nature, 1993, 365(6447): 654-657.
- [9] de Perrot M, Liu M, Waddell T K, et al. Ischemia reperfusion induced lung injury [J]. Am Respir Crit Care Med, 2003, 167(4): 490-511.
- [10] Yamashita H, Akamine S, Sumida Y, et al. Inhaled nitric oxide attenuates apoptosis in ischemia reperfusion injury of the rabbit lung [J]. Ann Thorac Surg, 2004, 78(1): 292-297.

(收稿日期: 2007-02-10 修回日期: 2007-09-10)

(本文编辑: 李银平)

欢迎订阅《中国中西医结合急救杂志》

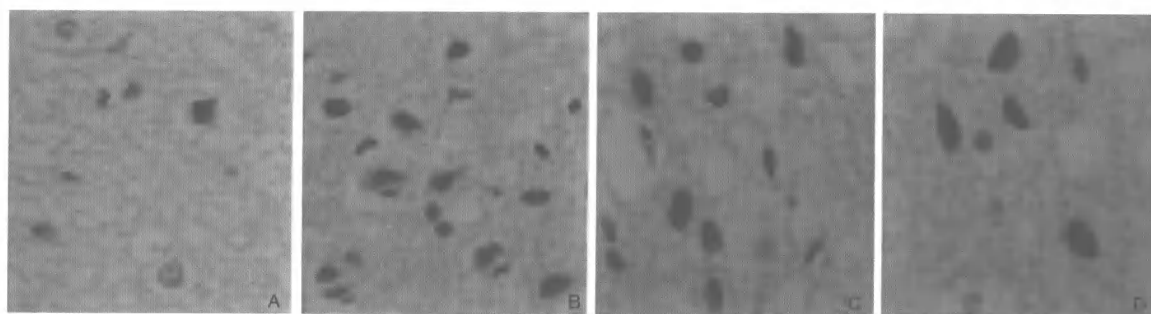
中国科协主管, 中国中西医结合学会主办, 天津市天和医院承办

全国各地邮局订阅, 邮发代号: 6-93, 定价: 每期 7.6 元, 全年 45.6 元

刊社地址: 天津市和平区睦南道 122 号 邮编: 300050

金纳多注射液对脑缺血/再灌注后caspase-3和caspase-9表达的影响

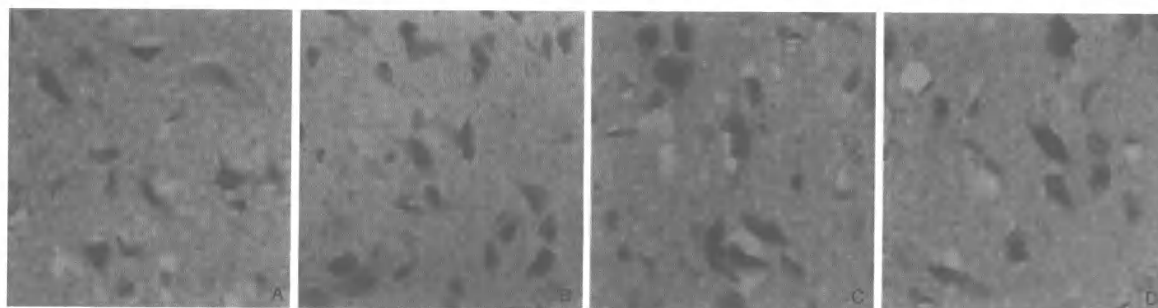
(正文见344页)



A:假手术组; B:缺血组; C:金纳多小剂量治疗组; D:金纳多大剂量治疗组

图1 各组大鼠脑I/R后神经元凋亡结果(TUNEL, ×400)

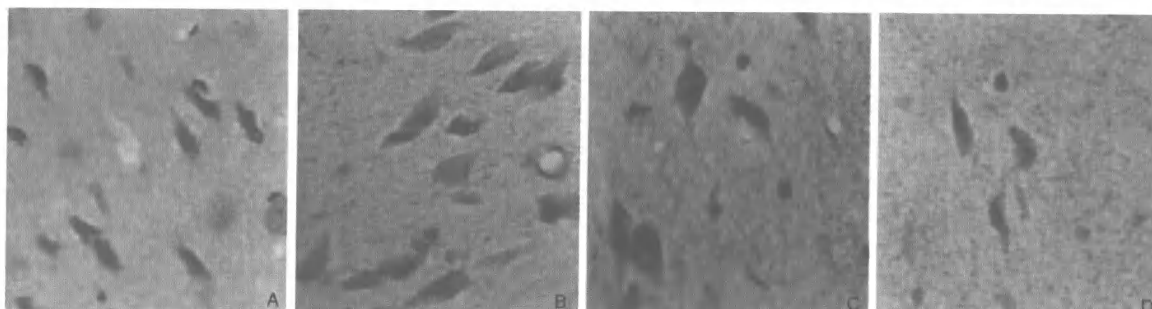
Figure 1 Comparison of neuronal apoptosis after cerebral I/R in each group(TUNEL, ×400)



A:假手术组; B:缺血组; C:金纳多小剂量治疗组; D:金纳多大剂量治疗组

图2 各组大鼠脑I/R后caspase-3蛋白表达(免疫组化, ×400)

Figure 2 Expression of caspase-3 protein after cerebral I/R in each group(immunohistochemical, ×400)



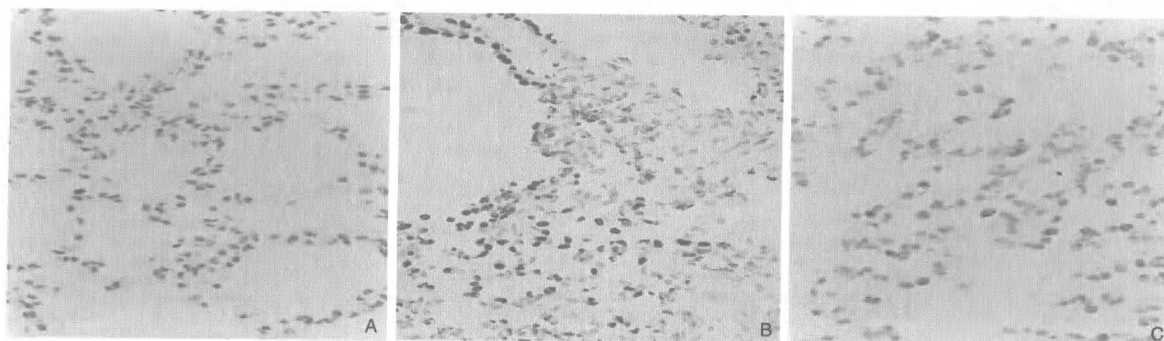
A:假手术组; B:缺血组; C:金纳多小剂量治疗组; D:金纳多大剂量治疗组

图3 各组大鼠脑I/R后caspase-9蛋白表达(免疫组化, ×400)

Figure 3 Expression of caspase-9 protein after cerebral I/R in each group(immunohistochemical, ×400)

生脉注射液对兔肺缺血/再灌注损伤时细胞凋亡的影响

(正文见361页)



A: C组; B: I/R组; C: SM组

图1 LIRI时各组大鼠肺组织细胞凋亡的表达(TUNEL, ×400)

Figure 1 Expression of cell apoptosis in lung tissue in LIRI(TUNEL, ×400)