

• 论著 •

葛根素对缺血/再灌注损伤兔肺组织天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 变化的影响

许益笑, 王万铁, 徐正衿, 金晓凤, 郝卯林

(温州医学院病理生理学教研室, 浙江 温州 325035)

【摘要】 目的 探讨天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)在兔肺缺血/再灌注损伤(LIRI)中的变化及葛根素的保护作用机制。方法 健康日本大耳白兔 30 只,随机分为对照组、缺血/再灌注(I/R)组及葛根素组,每组 10 只。复制单侧 LIRI 模型。对比观察各组血清超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量、一氧化氮(NO)含量、肺湿/干重(W/D)比值及肺泡损伤指数(IQA);用原位末端缺刻标记法(TUNEL)测定肺组织细胞凋亡指数(AI);用免疫组化及原位杂交技术分别检测肺组织 caspase-3 蛋白和 mRNA 表达。结果 与对照组比较,I/R 组血清 SOD 活性和 NO 含量降低,MDA 含量、W/D 比值、IQA、AI 值及 caspase-3 表达均上调(P 均 <0.01)。与 I/R 组比较,葛根素组 SOD、NO 显著升高,MDA、W/D 比值、IQA、AI 值及 caspase-3 表达明显下降(P 均 <0.01)。相关分析显示:AI 值与 SOD、NO 呈明显负相关,与 MDA、caspase-3 mRNA 及 caspase-3 蛋白呈明显正相关(P 均 <0.01);caspase-3 mRNA 与 SOD、NO 呈明显负相关,与 MDA 含量呈明显正相关(P 均 <0.01)。结论 葛根素可通过提高体内 NO 水平、降低氧自由基水平、减轻脂质过氧化反应,下调 caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达,从而抑制肺再灌注后肺组织细胞的异常凋亡,减轻 LIRI。

【关键词】 缺血/再灌注损伤,肺; 凋亡; 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3; 葛根素

中图分类号:R285.5;R363 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2008)02-0104-05

Change of caspase-3 in rabbits after lung ischemia-reperfusion and the effect of puerarin (葛根素) XU Yi-xiao, WANG Wan-tie, XU Zheng-jie, JIN Xiao-feng, HAO Mao-lin. Department of Pathophysiology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, Zhejiang, China

Corresponding author: WANG Wan-tie

【Abstract】 Objective To investigate the change of caspase-3 in rabbits after lung ischemia-reperfusion injury (LIRI) and the effect of puerarin (葛根素). **Methods** Thirty healthy rabbits used for unilateral lung ischemia-reperfusion model were randomly divided into 3 groups (each $n=10$): control group (C group), lung ischemia-reperfusion group (I/R group) and puerarin group. The activity of serum superoxide dismutase (SOD), the contents of serum malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO), the wet to dry weight (W/D) ratio of lung tissue and the index of quantitative assessment of histological lung injury (IQA) were measured respectively in different groups; the pneumocyte apoptosis index (AI) was achieved by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL); caspase-3 protein and mRNA expression were studied by using in situ hybridization (ISH) and immunocytochemistry (IHC) techniques in the groups mentioned above. **Results** The activity of SOD and content of NO were significantly lower in I/R group than those in C group (both $P<0.01$); while the content of MDA, the value of W/D, IQA and AI, together with the expression of caspase-3 mRNA and protein were evidently higher ($P<0.01$, respectively). In the comparisons between puerarin group and I/R group, it was shown that the content of MDA, the value of W/D, IQA, AI and expression of caspase-3 were decreased ($P<0.01$, respectively), while the activity SOD and the content of NO were increased in the former group than those in the latter group ($P<0.01$, respectively). Result of correlation analysis: AI was significantly negatively correlated with the activity SOD and the content of NO, and significantly positively correlated with the content of MDA, caspase-3 mRNA and caspase-3 protein (all $P<0.01$). Caspase-3 mRNA was significantly negatively correlated with SOD activity and NO content, and markedly positively correlated with MDA content (all $P<0.01$). **Conclusion** Puerarin may elevate the level of NO in the body, lower the level of oxygen free radicals, alleviate the liperoxide reaction and down regulate the expressions of caspase-3 mRNA and protein, consequently, the abnormal apoptosis of the pulmonary tissue cells after lung I/R can be inhibited and LIRI injury can be ameliorated.

【Key words】 lung ischemia-reperfusion injury; apoptosis; caspase-3; puerarin

近来研究提示,凋亡参与肺缺血/再灌注损伤(LIRI)所致的肺组织细胞死亡^[1-2]。凋亡发生是一个复杂的、由蛋白酶介导的级联反应过程,天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)是参与调节和执行凋亡最重要的蛋白酶之一^[3]。本实验通过建立原位阻断肺门的单侧兔 LIRI 模型,研究葛根素对 LIRI 时肺细胞凋亡及 caspase-3 表达的影响,探讨其机制,为临床上 LIRI 的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 动物及实验材料:健康日本大耳白兔 30 只,体重(2.0±0.5)kg,由温州医学院实验动物中心提供。葛根素注射液由浙江康恩贝制药有限公司生产,20 ml/kg,批号:33020186。caspase-3 免疫组化链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)染色试剂盒、caspase-3 多克隆抗体、细胞凋亡检测试剂盒(POD)、caspase-3 mRNA 原位杂交检测试剂盒均购自于武汉博士德生物工程有限公司。Caspase-3 探针序列为:上游 5'-AAATC CATT AAAAT TTGGA ACCAA AGATC ATACA-3',下游 5'-AAACA GTATG CCGAC AAGCT TGAAT TTATG CACAT-3'。超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所,其余均为市售分析纯试剂。

1.2 动物模型制备和分组:经兔耳缘静脉注射质量分数为 20%的乌拉坦(5 ml/kg)麻醉,气管切开插管接动物呼吸机吸纯氧,通气频率 30~40 次/min,潮气量双侧肺通气 15~20 ml/kg,单侧肺通气 8~10 ml/kg,吸/呼比为 1:1.25,实验中颈静脉插管维持生理盐水输液(0.5~1.5 ml/min)。沿左胸骨切断第 3、4、5 肋,打开胸腔,游离左肺门后留置阻断带,静脉注射肝素(1 mg/kg)抗凝。复制在体兔 LIRI 模型,完全阻断左肺门血管和支气管 1 h 后,放开阻断带,恢复其血供和通气。

实验动物按照随机数字表法分为 3 组,每组 10 只。①对照组:仅在左肺门穿过阻断带,但不阻断肺门,观察 6 h,抽血后活体取肺;②缺血/再灌注(I/R)组:阻断左肺门 1 h,再灌注 5 h,活体取肺留取标本;③葛根素组:在阻断肺门前 5 min 经颈外静脉注射葛根素注射液(30 mg/kg)。对照组及 I/R 组

同时时间点注射等量生理盐水。各组动物实验结束时静脉注入氯化钾处死。

1.3 血清 SOD 活性、MDA 及 NO 含量的测定:取肺脏前自颈动脉抽血约 2 ml,于 4 ℃、3 000 r/min(离心半径 11 cm)离心 10 min 后取上清液。血清 SOD 活性测定采用黄嘌呤氧化酶法,以硝酸盐单位 NU 表示;血清 MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸法;血清 NO 含量测定采用硝酸还原酶法,以上操作均按试剂盒说明书进行。

1.4 肺组织损伤的定量评价

1.4.1 肺组织湿/干重(W/D)比值测定:实验末取约 2 g 左上肺组织称重湿重,于 70 ℃电热恒温干燥箱中烤 24 h 后称干重,计算 W/D 比值。

1.4.2 肺泡损伤指数(IQA)测定:取兔左肺组织,用多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色,每个标本 5 张切片,任取 1 张,光镜下观察 10 个视野(×200)的肺泡总数并计算肺泡损伤数,即每个肺泡中细胞总数(红细胞/白细胞)超过 2 个以上视为肺损伤,并计算 IQA。

$$IQA = \text{损伤肺泡数} / \text{计数的肺泡总数} \times 100\%$$

1.5 原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测肺组织细胞凋亡:操作按试剂盒说明书进行。阴性对照用磷酸盐缓冲液(PBS)替代末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)。3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染。在光学显微镜下观察,细胞核中有棕黄色着色者为凋亡细胞。随机测定 5 个高倍镜视野(×400)下细胞凋亡数,计算细胞凋亡指数(AI)。

$$AI = \text{凋亡细胞数} / \text{总细胞数} \times 100\%$$

1.6 Caspase-3 免疫组化及原位杂交检测:操作严格按照试剂盒说明书进行,DAB 显色,苏木素复染。免疫组化采用 SABC 法,原位杂交用已知阳性片作阳性对照,用预杂交液代替杂交液作空白对照。免疫组化与原位杂交均为光镜下细胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞。用吸光度(A)分析软件(华东理工大学研制)进行定量分析,每张切片随机选择 10 个视野(×400)测定 A 值,以平均 A 值反映其表达强弱。

1.7 统计学处理:采用 SPSS 13.0 软件。计量资料均进行正态性检验,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;多组样本均数比较进行方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐性者两两比较用 LSD 法,方差不齐者进行 Dunnett's *t* 检验。采用 Pearson 分析 NO、SOD、MDA、caspase-3 与 AI 各参数间的相互关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

基金项目:浙江省温州市科技计划项目(Y2005A080)

通讯作者:王万铁,教授,硕士生导师

作者简介:许益笑(1978-),女(汉族),浙江省人,医学硕士,助教,主要从事脏器缺血/再灌注损伤发生机制及其防治的研究,Email: xu2000fly@126.com。

表 1 3 组兔血清 SOD 活性、MDA 含量、NO 含量以及肺组织 W/D 比值和 IQA 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	SOD(kNU/L)	MDA($\mu\text{mol/L}$)	NO($\mu\text{mol/L}$)	W/D 比值	IQA(%)
对照组	10	386.5 \pm 10.1	5.4 \pm 0.7	57.1 \pm 4.2	5.0 \pm 0.3	14.4 \pm 4.3
I/R 组	10	242.4 \pm 14.9 ^a	10.3 \pm 0.4 ^a	30.1 \pm 4.3 ^a	6.6 \pm 0.3 ^a	53.2 \pm 3.1 ^a
葛根素组	10	289.1 \pm 13.9 ^{ab}	9.4 \pm 0.5 ^{ab}	38.0 \pm 3.4 ^{ab}	6.1 \pm 0.3 ^{ab}	30.0 \pm 4.1 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与 I/R 组比较,^b $P < 0.01$

2 结果

2.1 血清 SOD 活性、MDA 及 NO 含量(表 1):与对照组比较,I/R 组和葛根素组血清 SOD 活性、NO 含量明显降低,MDA 含量明显升高(P 均 < 0.01);与 I/R 组比较,葛根素组 SOD 活性、NO 含量显著升高,MDA 含量显著降低(P 均 < 0.01)。

2.2 肺组织 W/D 比值及 IQA(表 1):与对照组比较,I/R 组和葛根素组肺组织 W/D 比值、IQA 值均显著升高(P 均 < 0.01);与 I/R 组比较,葛根素组 W/D 比值、IQA 值明显下降(P 均 < 0.01)。

2.3 肺组织 AI(表 2):对照组有少量细胞凋亡;I/R 组凋亡细胞明显增加,葛根素组有所下降,但仍高于对照组(P 均 < 0.01)。

表 2 3 组兔肺组织 AI 值及 caspase-3 的蛋白和 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	动物数	AI (%)	caspase-3 蛋白 ($\times 10^{-3}$ A 值)	caspase-3 mRNA ($\times 10^{-3}$ A 值)
对照组	10	1.31 \pm 1.51	0.072 \pm 0.008	0.048 \pm 0.007
I/R 组	10	19.97 \pm 1.34 ^a	0.206 \pm 0.007 ^a	0.205 \pm 0.007 ^a
葛根素组	10	10.25 \pm 2.29 ^{ab}	0.192 \pm 0.011 ^{ab}	0.179 \pm 0.006 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与 I/R 组比较,^b $P < 0.01$

2.4 Caspase-3 免疫组化及原位杂交表达(表 2;彩色插页图 1,图 2):对照组肺组织 caspase-3 免疫组化及原位杂交均呈阴性表达,I/R 组及葛根素组均呈阳性甚至强阳性表达,阳性细胞主要分布于血管内皮细胞、肺泡上皮细胞及支气管上皮细胞。与 I/R 组比较,葛根素组 caspase-3 的蛋白及 mRNA 表达均显著下降(P 均 < 0.01)。

2.5 相关性分析:AI 与 SOD 和 NO 均呈显著负相关,相关系数(r)分别为 -0.915 和 -0.875,与 MDA、caspase-3 mRNA、caspase-3 蛋白均呈显著正相关, r 分别为 0.864、0.860 和 0.898;caspase-3 mRNA 与 SOD 和 NO 均呈显著负相关, r 分别为 -0.960 和 -0.940,与 MDA 呈显著正相关, r 为 0.969,差异均有统计学意义(P 均 < 0.01)。

3 讨论

Fischer 等^[4]及 Stammberger 等^[5]均报道细胞凋亡在 LIRI 早期即出现;Omaha 等^[6]的进一步研

究则表明,继发于 I/R 损伤的凋亡细胞数量与肺损伤呈显著相关;且抑制肺移植后的细胞凋亡有利于肺功能的保护^[7],均提示凋亡是 LIRI 的一个重要事件,并且是继发性肺功能障碍的重要原因之一。本实验显示,I/R 组肺组织细胞出现了明显的凋亡,且凋亡的发生与再灌注后肺损伤密切相关。

LIRI 诱导肺组织细胞凋亡的机制及其信号转导途径尚不清楚,但目前 caspase 蛋白酶家族最受关注。Quadri 等^[8]在肺冷缺血期发现有 caspase-3、8、9 的活化,移植后肺组织细胞凋亡明显增加,抑制 caspase 的活性则凋亡明显减少,移植后肺功能得以改善,其中 caspase-3 是参与凋亡的 caspase 级联反应最终效应子,在凋亡调节中起重要作用。本研究结果显示,对照组肺组织中仅有极少量 caspase-3 表达;而 I/R 组 caspase-3 mRNA 及蛋白表达水平均增高,且与 AI 呈正相关。可以推测,LIRI 后肺组织细胞凋亡途径可能涉及 caspase-3 通路。

近期研究表明,葛根素对继发于再灌注的细胞凋亡有抑制作用^[9]。在本研究中我们也观察到葛根素组 caspase-3 的 mRNA 及蛋白表达水平显著下调,细胞 AI 明显降低,且肺损伤性指标 W/D 比值、IQA 明显降低,表明葛根素可能通过抑制 caspase-3 的 mRNA 及蛋白表达从而抑制 I/R 期间肺组织细胞凋亡的发生。但其具体机制目前仍不十分清楚,结合以往及本实验研究结果推测,可能与其抗氧化能力有关。以往研究发现,I/R 后活性氧(ROS)增多是细胞凋亡的主要原因之一,其可能的机制与诱发细胞膜脂质过氧化,从而影响了信号转导系统,激活相关促凋亡基因,诱导细胞凋亡有关。本实验中,随着 caspase-3 表达的上调,体现机体受自由基攻击严重程度的血清 MDA 含量在 I/R 组明显上升,反映机体清除氧自由基能力的 SOD 活性则显著下降;而应用葛根素后,caspase-3 表达显著下调,同时 SOD 活性明显提高及 MDA 含量显著下降,肺组织 AI 明显下降,且 caspase-3 与 SOD 呈负相关,与 MDA 呈正相关。提示葛根素可能通过提高机体的抗氧化能力,从而抑制死亡蛋白酶 caspase-3 的表达,进而抑制 LIRI 后的细胞凋亡。

在 ROS 中, NO 为近年来人们关注的热点, 其在凋亡中的作用也逐步受到重视。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^[10]。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^[11]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 后 NO 含量显著下降, NO 与 AI 及 caspase-3 表达均呈负相关关系; 而葛根素组 NO 含量升高, 伴随着 caspase-3 表达下调, AI 下降, 似乎提示葛根素还可通过增加 NO 含量、下调 caspase-3 活性而发挥抗凋亡作用。由于 NO 是以 L-精氨酸(L-Arg)为底物在一氧化氮合酶(NOS)催化而生成, 葛根素促进 NO 生成是通过 L-Arg 转运功能增加或是 NOS 活性升高以及 NOS 的基因表达变构而改变 NOS 表现型的, 还是通过影响内皮细胞数量, 使 NO 释放增加, 而导致血清 NO 水平升高的, 还有待进一步验证。

参考文献

[1] 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.
 [2] 王万铁, 郝仰林, 都引飞, 等. 左旋精氨酸对兔肺缺血/再灌注损伤时细胞凋亡的影响[J]. 中国急救医学, 2006, 26(2): 126-128.
 [3] 胡森, 邹晓防, 吕艺, 等. 肠缺血/再灌注时卡巴胆碱对肠上皮细胞凋亡的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(8): 463-

466.
 [4] Fischer S, Cassivi S D, Xavier A M, 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.
 [5] 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.
 [6] Omasa M, Fukuse T, Toyokuni S, et al. Glycine ameliorates lung reperfusion injury after cold preservation in an ex vivo rat lung model[J]. Transplantation, 2003, 75(5): 591-598.
 [7] Cooke D T, Hoyt E G, Robbins R C. Overexpression of human Bcl-2 in syngeneic rat donor lungs preserves posttransplant function and reduces intragraft caspase activity and interleukin-1 beta production [J]. Transplantation, 2005, 79(7): 762-767.
 [8] Quadri S M, Segall L, de Perrot M, et al. Caspase inhibition improves ischemia-reperfusion injury after lung transplantation[J]. Am J Transplant, 2005, 5(2): 292-299.
 [9] 沈炳权, 蔡兆斌, 徐群红, 等. 葛根素对家兔心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(6): 361-363.
 [10] 廖维宏, 王国强, 沈岳, 等. 腺病毒介导源性神经营养因子基因转移对大鼠创伤性脑损伤后诱导型一氧化氮合酶表达及细胞凋亡的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(1): 3-8.
 [11] 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: 2007-10-08 修回日期: 2008-03-01)

(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

《中国中西医结合急救杂志》第三届编委会名单

名誉总编辑: 陈可冀(中国科学院院士) 吴咸中(中国工程院院士)

总编辑: 王今达

代理总编辑: 沈中阳

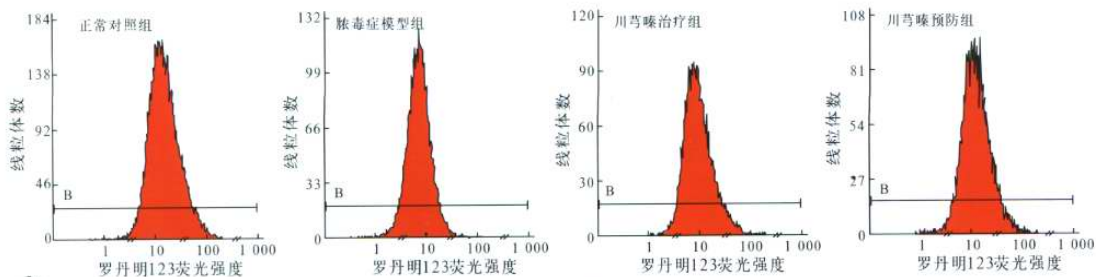
副总编辑: 张伯礼(中国工程院院士) 石学敏(中国工程院院士) 郝希山(中国工程院院士)
 沈自尹(中国科学院院士) 陈士奎 王宝恩 李鸣真 杨国栋 郭仓 沈中阳
 曹尔澄(常务) 沈洪 李银平 梅广源 任新生 雪琳

编辑部主任: 李银平

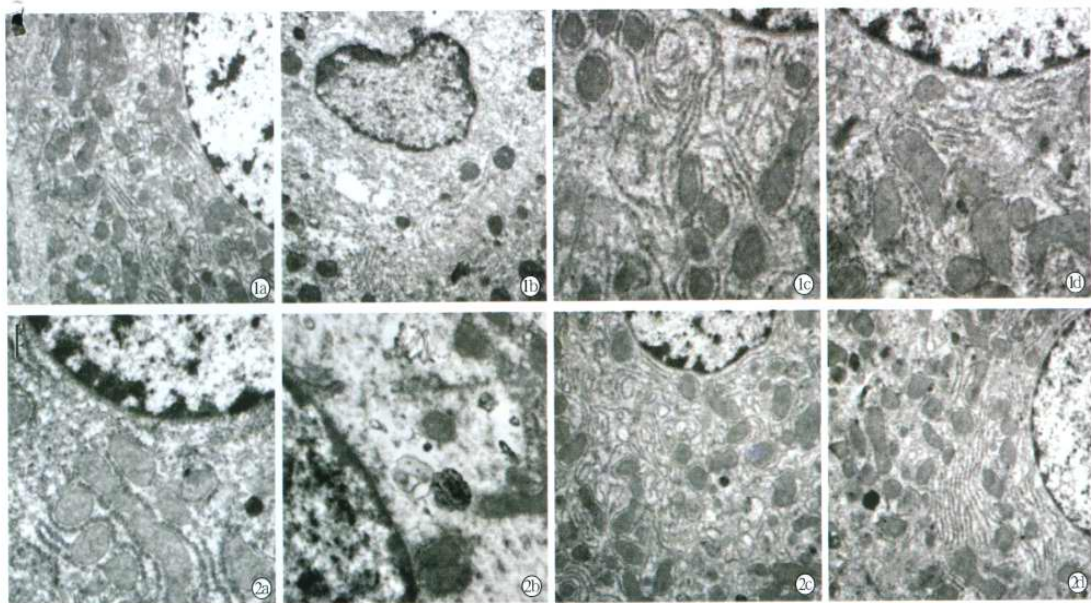
编委(按姓氏笔划为序): 马晓昌 牛建昭 王左 王阶 王兴勇 王学美 王晓璐 王静怡
 邓跃林 乔佑杰 刘健 刘淳 刘远新 刘清泉 刘懿禾 匡调元 危北海 吕传柱
 吕维柏 托马斯皮克(美国) 朱辟疆 许文兵 许树强 齐清会 吴汉平(美国) 吴和木
 宋继昌 张人华 张久山 张文高 张晔 张敏州 张淑文 李恩 李春盛 李忠诚
 李建生 李大金 李建国 李小勇 李志军 李牧 李俊海 杨明会 陆付耳 陈小野
 陈维养 麦时任(加拿大) 岳茂兴 金妙文 金鸿宾 侯灿 姚咏明 祝兆林 胡森
 赵祥文 唐由之 聂广 高金亮 崔树波 曹书华 梁晓春 黄小民 黄体钢 焦东海
 谢竹藩 廖家楨 熊旭东 蔡定芳 穆大伟 魏江磊

川芎嗪对脓毒症大鼠肝细胞线粒体保护作用的实验研究

(正文见85页)



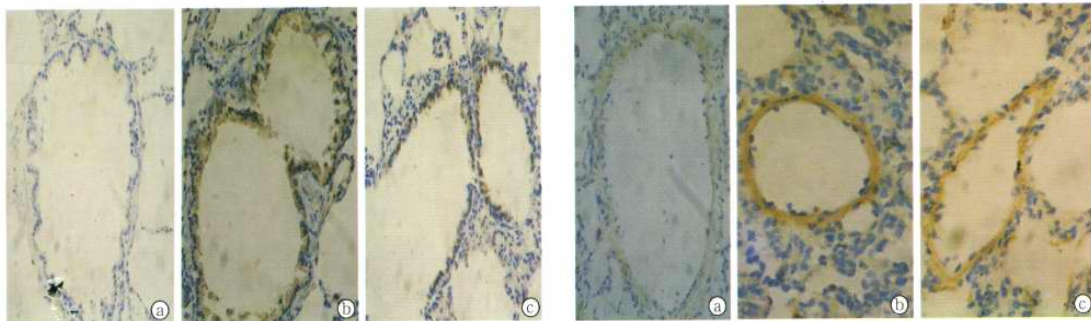
注: B为基础值
图1 线粒体内罗丹明123荧光强度流式检测图



①:正常对照组;②:模型组;③:治疗组;④:预防组;1:×10 000;2:×20 000
图2 观察各组不同电镜放大倍数下大鼠肝组织病理学改变(罗丹明123染色)

葛根素对缺血/再灌注损伤兔肺组织天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3变化的影响

(正文见104页)



①:对照组;②:I/R组;③:葛根素组

图1 3组兔肺组织caspase-3蛋白的表达(DAB, ×400)

①:对照组;②:I/R组;③:葛根素组

图2 3组兔肺组织caspase-3 mRNA的表达(DAB, ×400)