

缺血后处理对供体犬肺组织细胞凋亡基因表达的影响

鲁建军, 翁慧雯, 马俊, 顾勇, 罗红鹤

(中山大学附属第一医院胸外科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】观察供体犬肺再灌注后早期供体肺组织脂质过氧化反应的变化,了解缺血后处理对供体犬肺植入后细胞凋亡基因表达的变化情况。【方法】随机选取12对比格犬,组成供受体,进行异体左侧单肺移植术。随机分成两组,对照组:6对犬,进行供受体左侧异体单肺移植,不予缺血后处理的干预,按常规方式进行。缺血后处理组:6对犬,进行供受体左侧异体单肺移植,常规方式获取的供体犬肺植入后,再灌注早期实施3个周期的10s再灌~10s再阻断,总时程1min的缺血后处理。于供体犬肺再灌注后1、2h时间点采集供肺标本检测超氧化物歧化酶(SOD)的活性、丙二醛(MDA)的含量;采用RT-PCR技术检测供体肺脏再灌注后1、2h时间点细胞凋亡基因Bcl-2、Bax的表达;光镜下观察供体犬肺植入后1、2h时间点肺组织的病理变化,应用SPSS 13.0统计软件处理,以 $P < 0.05$ 为统计学上有显著差别。【结果】供体肺脏植入时间平均 (35.9 ± 1.7) min。缺血后处理组在1、2h时间点的供体肺组织SOD活性水平较对照组升高、MDA含量较对照组减低,有统计学差异($P < 0.05$);对照组与实验组相比较,肺组织再灌注后1、2h时间点,Bcl-2蛋白表达上调($P < 0.05$),而Bax蛋白表达下调($P < 0.05$);缺血后处理组肺组织光镜下观察在各时间点的炎症反应均较对照组的变化轻微。【结论】缺血后处理可以抑制再灌注时氧化自由基的堆积,从而减少供体肺的缺血再灌注损伤;缺血后处理能够通过抑制促凋亡Bax蛋白的表达,及促进抗凋亡Bcl-2蛋白表达,从而影响内源性细胞凋亡途径。

关键词:肺移植;缺血后处理;缺血再灌注损伤;细胞凋亡基因

中图分类号:R563

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2013)01-0053-06

Ischemic Postconditioning Ameliorates Cellular Apoptosis of Transplanted Canine Lung

LU Jian-jun¹, WENG Hui-wen, MA Jun, GU Yong, LUO Hong-he

(Department of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】Ischemia reperfusion (I/R) injury is still inevitable for lung transplantation and ischemic postconditioning (I-postC) may benefit the function of a grafted lung. We investigated the influence of I-postC on expression of the apoptosis gene of canine donor lungs and observed the histomorphological changes under optical microscope. 【Methods】Single left-lung orthotopic transplantation (LTx) was performed on 12 pairs of donor-and-recipient matched Beagle dogs. They were randomly subjected into an ischemic postconditioning (I-postC) group ($n = 6$) or a control group ($n = 6$). The transplantation procedure in control group was performed routinely, while I-postC protocol was added in the early stage of reperfusion for the experimental group: 10 seconds of reperfusion followed by 10 seconds of blockade, repeated three times. Expression of apoptosis gene Bcl-2 and Bax were measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Pathological changes of the donor lung were observed under an optical microscope. 【Results】Compared with the experimental group, expression of Bcl-2 protein was up-regulated while expression of Bax protein was down-regulated. Observed under optical microscope, pulmonary inflammatory reaction was more moderate in I-postC group. 【Conclusions】I-postC can attenuate the damage of ischemia-reperfusion injury. I-postC may affect the endogenous pathway of apoptosis by inhibiting expression of Bax and enhancing expression of Bcl-2.

Key words: lung transplantation; ischemic postconditioning; ischemic reperfusion injury; cellular apoptosis gene

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(1):53-58]

收稿日期:2012-06-18

基金项目:广东省自然科学基金博士启动项目(9451008901002331)

作者简介:鲁建军,医学博士,副教授,研究方向:胸部疾病的外科治疗, E-mail: ljj508@21cn.com

肺脏移植是终末期肺病的标准治疗方法,肺脏移植不可避免的遇到不同程度的供体肺脏缺血再灌注损伤的问题^[1]。肺脏缺血只发生极小程度的细胞凋亡,移植肺脏细胞凋亡的发生主要在再灌注的早期^[2];缺血后处理是针对缺血再灌注损伤而引发的效应,是机体强有力的内源性保护现象,供体肺脏组织细胞的凋亡程度影响到植入脏器的存活率及早期功能的恢复,因此在再灌注的早期采取控制再灌注的措施抑制细胞凋亡的发生,可以改善移植肺脏的功能。本通过实验观察缺血后处理影响肺脏细胞凋亡基因的表达情况,了解缺血后处理对供体肺脏植入后早期功能的恢复的影响。

1 材料与方 法

1.1 肺移植模型的建立及干预措施

成年比咯犬 24 只(中山大学动物中心提供,普通喂养),体质量(13.2 ± 2.6)kg,雌雄不限,供受体一一配对,体质量匹配在 $\pm 20\%$ 之内。随机分成两组,即对照组和实验组(即缺血后处理组),行左侧异体单肺移植术^[3](供体左肺获取后按左主支气管、左肺动脉,左肺静脉左房袖(图 1)与左心耳的顺序进行吻合,植入受体左侧胸腔)。对照组:6 对犬,进行供受体左侧异体单肺移植,不予缺血后处理的干预,按常规方式进行。实验组:6 对犬,进行供受体左侧异体单肺移植,常规方式获取的供体犬肺植入后,再灌注早期实施 3 个周期的 10 s 再灌 ~ 10 s 再阻断,总时程 1 min 的缺血后处理。手术完成后关闭胸腔,继续机械通气 2 h 后,脱离呼吸机恢复受体犬自主呼吸。

1.2 供体犬肺组织标本的收集

取肺组织标本时缝扎肺创面避免漏气,每次取样后关闭胸腔。于供体犬肺植入后 1、2 h 时间点各取 2 份约 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 大小组织块,其中一份行组织切片常规行 HE 染色,另一份置入液氮罐内保存,实验完毕,转入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.3 供体肺超氧化物歧化酶和丙二醛含量测定

准确称取保存的部分肺组织质量,按质量体积比加入 19 倍的生理盐水制成 5% 的组织匀浆,2 500 r/min 离心 10 min(半径 $r = 6.5\text{ cm}$),取上清组织匀浆液。采用考马斯亮兰法,按试剂盒说明测定肺组织中超氧化物歧化酶(superoxide

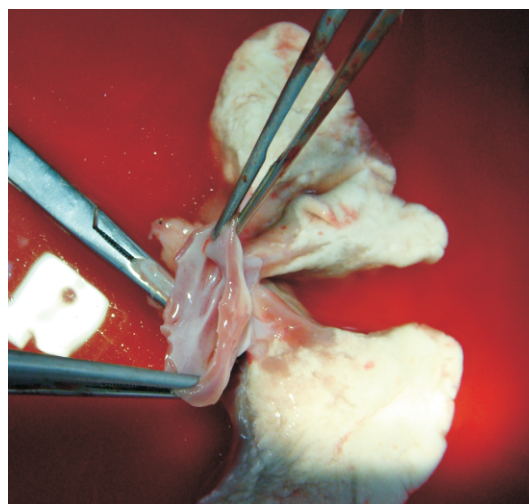


图 1 供体肺脏修剪后的左房袖示意图

Fig.1 The sleeve of left atrium after operation

dismutase, SOD) 的活性、丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量(试剂盒有南京建成生物工程研究所提供)。

1.4 供体肺脏肺泡上皮细胞凋亡基因(Bcl-2, Bax)的检测

将冷冻新鲜组织在液氮中磨碎成粉末状(应无明显颗粒);提取肿瘤组织总 RNA,按反转录试剂盒说明书操作,将 RNA 反转录成 cDNA 后进行 PCR 反应,引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。BAX 上游引物 5'-TGCATCCACC AAGAAGCTGA-3',下游引物 5'-TGCTGAGTGA CGCAGTAAGCA-3',产物长度为 401 bp;BCL-2 上游引物 5'-TGGCCTTCTTTGAGTTCGGT-3',下游引物 5'-ATAGCTGATTCCGACGCTGAGC-3',产物长度为 439 bp;内参 β -actin 上游引物 5'-CACTGT CCACCTTCCAGCAAA-3',下游引物 5'-CATCTC GGTTCCTGCGCAA-3',产物长度为 154 bp。然后采用 RT-PCR 技术扩增提取物。待反应结束后,取 PCR 产物 $8\text{ }\mu\text{L}$,2% 琼脂糖凝胶电泳,结果用 BandScan5.0 软件进行相对表达量分析,EB 染色,凝胶成像系统观察,拍照,并分析其辉度。

1.5 供体犬肺组织标本的光镜观察

供体犬肺植入再灌注后 1、2 h 时间点各取 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 新鲜组织块,以多聚甲醛溶液含气浸泡固定 24 h,浸蜡制片,肺组织切片(厚度 $4\text{ }\mu\text{m}$)常规行 HE 染色,观察病理变化。

1.6 统计方法

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 统计

软件进行分析,根据数据的特点,选用方差分析和卡方检验进行时间点与两组有无差异的检验。一类错误水准 α 设为 0.05。

2 结 果

2.1 手术结果

进行犬同种异体左侧单肺移植实验 12 例,手术成功 12 例,无失败。吻合口通畅,无扭曲,移植肺膨胀良好。12 例术后 2 h 后脱离呼吸机,均存活。移植物冷缺血时间 4 h,肺灌注到摘取需时约 6 ~ 8 min,供受体动静脉和支气管套管吻合需时间平均(35.9 ± 1.7)min。

2.2 植入再灌注后供体犬肺组织 SOD 活性的变化

供体植入再灌注后 1、2 h 时间点两组 SOD 活性的检验结果 $P < 0.001$,显示实验组在 1、2 h 时间点的供体肺组织 SOD 活性水平较对照组升高(表 1)。

表 1 供体植入再灌注后供体肺组织 SOD 活性的变化
Table 1 The SOD activity after transplantation
($n = 6$, U/mg)

Group	1 h after	2 h after	<i>P</i>
Control	2.8 ± 0.4	3.8 ± 0.4	0.000
Treatment	4.7 ± 0.4	6.2 ± 1.1	0.000
<i>P</i>	0.000	0.225	

2.3 再灌注后供体犬肺组织 MDA 含量的变化

供体植入再灌注后 1、2 h 时间点,两组 MDA 含量的检验结果 $P < 0.001$,显示实验组在 1 h、2 h 时间点的供体肺组织 MDA 含量较对照组减低(表 2)。

表 2 供体植入再灌注后供体肺组织 MDA 含量的变化
Table 2 The MDA contents after transplantation
($n = 6$, nmol/mg)

Group	1 h after	2 h after	<i>P</i>
Control	2.1 ± 0.6	3.0 ± 0.5	0.001
Treatment	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.2	0.003
<i>P</i>	0.000	0.016	

2.4 再灌注后不同时间点 Bcl-2 的表达变化

供体肺脏再灌注后 1、2 h 时间点,随再灌注时

间的延长,实验组和对照组抑制细胞凋亡基因 Bcl-2 表达均减低,但实验组的表达在各时间点均高于对照组,两者有统计学差异 ($P < 0.05$,图 2、3)。

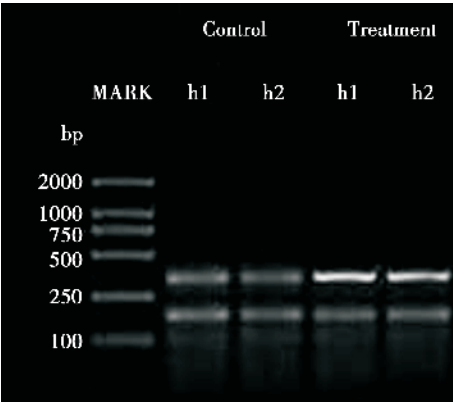


图 2 再灌注后对 Bcl-2 的表达影响
Fig.2 Effect of reperfusion on Bcl-2 mRNA expression
h1 : I-postC group 1 h after; h2: I-postC group 2 h after.

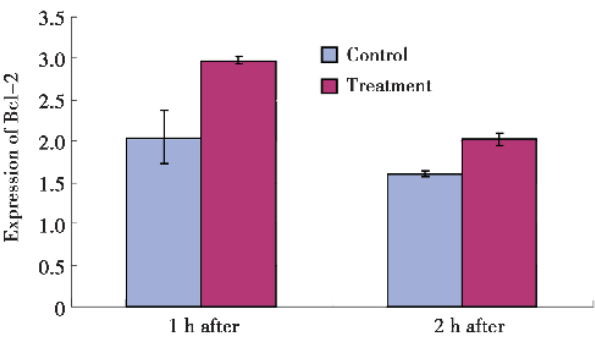


图 3 再灌注后不同时间点 Bcl-2 的表达变化
Fig.3 The Bcl-2 at 1,2 h after transplantation

2.5 再灌注后不同时间点 Bax 的表达变化

供体肺脏再灌注后 1、2 h 时间点,随再灌注时间的延长,实验组和对照组促细胞凋亡基因 Bax 表达均增加,但实验组的表达在各时间点均低于对照组,两者有统计学差异 ($P < 0.05$,图 4、5)。

2.6 供体植入再灌注后肺组织光镜观察结果

再灌注后 1、2 h 时间点,对照组的肺组织标本的 HE 染色光镜下观察肺间质有轻度的渗出,部分肺泡腔可见少量纤维素性渗出,脏层胸膜轻度水肿渗出,肺间质无明显炎性细胞浸润;这些改变较实验组明显(图 6)。

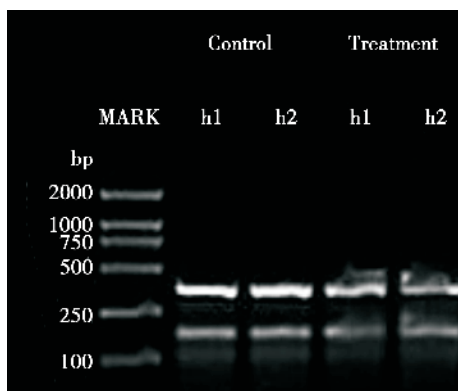


图 4 再灌注后对 Bax 表达的影响

Fig.4 Effect of reperfusion on Bax mRNA expression

h1 : I-postC group 1 h after; h2: I-postC group 2 h after.

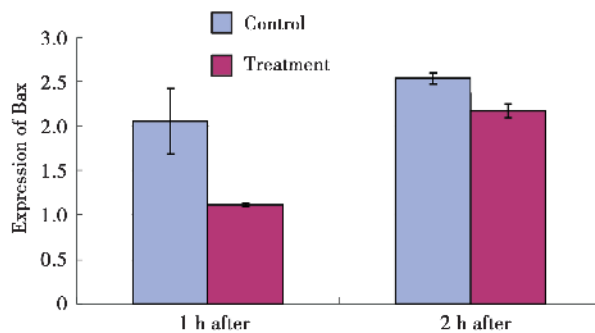


图 5 再灌注后不同时间点 Bax 的表达变化

Fig.5 The Bax at 1, 2 h after transplantation

3 讨 论

缺血器官恢复再灌注时, 不可避免的出现脂质过氧化反应, 引起再灌注损伤。MDA 是氧自由

基与细胞膜脂类成分发生氧化反应产生的代谢产物, MDA 的增加表明细胞膜结构受到破坏, MDA 的测定可间接反映体内受氧自由基攻击的严重程度。超氧化物歧化酶是体内清除自由基的一种特异酶, 其活性变化可反映体内抗氧化功能情况。自由基有着很高的化学活性, 难以测定, 而自由基清

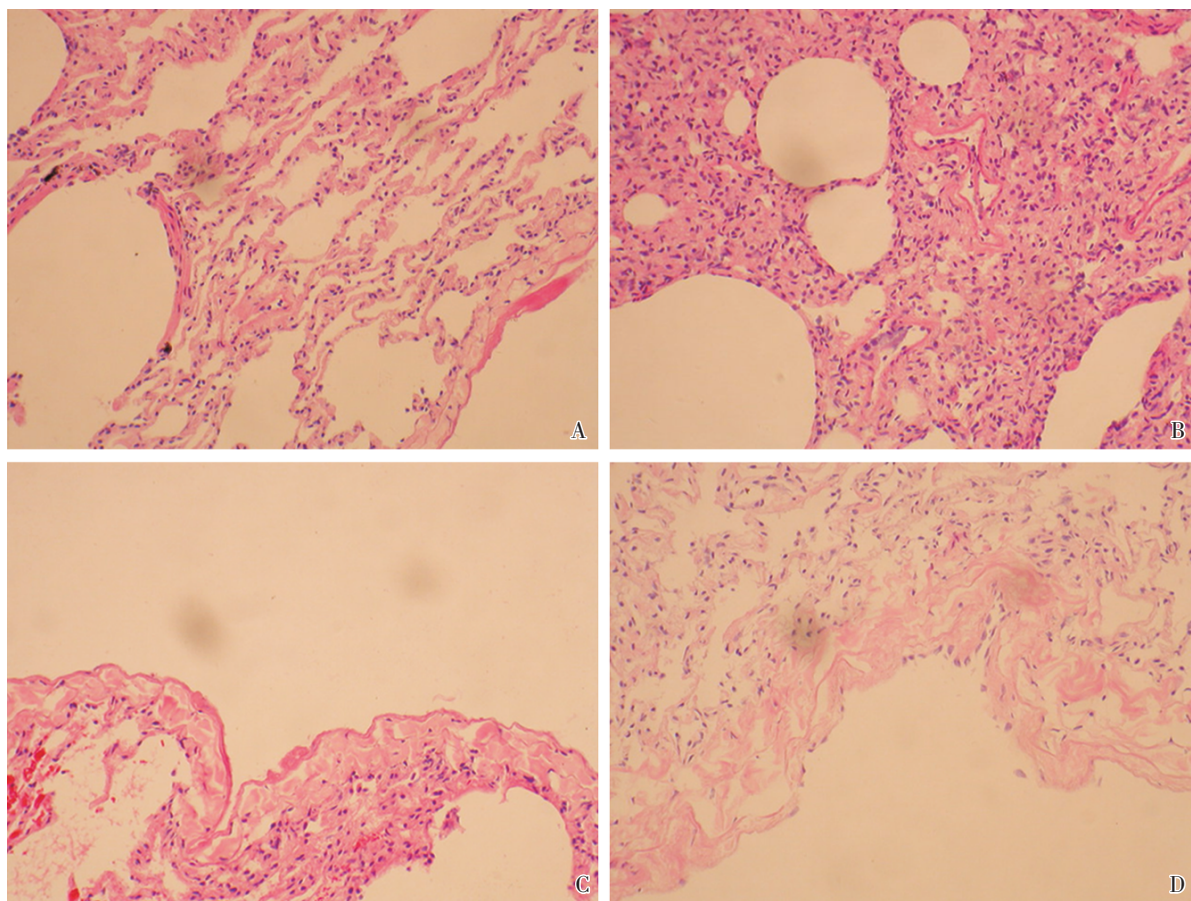


图 6 两组供肺在灌注后肺组织 HE 染色

Fig.6 HE staining of the donor specimens after reperfusion in two groups

A: I-postC group 1 h after; B: I-postC group 2 h after; C: Control group 1 h after; D: Control group 2 h after; $\times 200$

除剂 SOD 比较稳定,且容易测定,两者是目前公认的能较好反映机体内氧自由基水平及脂质过氧化程度的间接指标^[4]。本实验所采用的缺血再灌注前、反复短暂的预再灌、停灌的处理方法,旨在通过启动组织细胞自身内源性保护机制,而使已缺血组织,最大程度的减轻再灌注损伤,是从建立一种更有效的再灌注方法出发,处理和挽救缺血组织。本文实验结果表明:对照组与实验组相比较,肺组织再灌注后 1、2 h 时间点,丙二醛含量明显升高($P < 0.005$),而抗自由基酶类超氧化物歧化酶活性显著下降($P < 0.005$),说明再灌注期肺组织脂质过氧化反应增强,抗氧化能力降低。缺血后处理组较对照组肺组织中脂质代谢产物丙二醛含量下降,抗自由基酶超氧化物歧化酶活性增加。表明缺血后处理可减轻在犬肺缺血再灌注损伤的脂质过氧化反应。缺血后处理是在恢复全面血液再灌注之前施予,方法简单^[5-6],其所涉及的机制值得进一步研究。

肺脏仅予缺血(无论冷或热缺血),或者仅予短时间冷缺血后再灌注,都只显示极小程度的细胞凋亡;而长时间冷缺血后再灌注,在灌注早期即可发现明显的细胞凋亡,当进一步延长缺血时间则表现为坏死。Fischer 等^[7]研究发现在各种形式的冷保存液中供肺保存 1~5 h 很难发现凋亡细胞,并且在缺血期凋亡细胞仍很少。后来他在鼠的肺移植研究中进一步发现将鼠肺在 4℃保存液中分别保存 20 min、6 h、12 h,少于 2%的细胞死亡。但将其时间延长至 18、24 h,却有 11%和 27%的细胞死亡,并且死亡的主要形式不是凋亡而是坏死^[8]。肺细胞凋亡可能是 I/R 后移植肺脏功能障碍甚或原发性无功能的重要原因之一。与缺血期相比,肺细胞凋亡主要发生在再灌注期。Kwon 等^[9]在犬的同种单肺移植实验中发现,供体缺血期在 10℃保存 20 h 行活检其肺细胞凋亡指数远低于再灌注后 2 h 的肺细胞凋亡指数。并且有研究发现移植肺细胞凋亡率与再灌注时成动态变化。Stammberger 等^[10]在原位同基因鼠的单肺移植研究中发现。将鼠肺保存 18 h 后。分别再灌注 2、4、8、12 h 后再用 TUNEL 法检测。其肺细胞凋亡率在再灌注 2 h 达高峰为(16.8 ± 2.2)%。后依次递减,因此,他们认为细胞凋亡发生在肺移植早期。Fischer 等^[7]在 20 例人体肺移植标本活检中研究发现,从再灌注 30 min 到 2 h,供肺细胞凋亡率从

16.6%升至 34.9%,并且大多数凋亡细胞是Ⅱ型肺泡细胞。因此再灌注后 2 h 肺细胞凋亡达高峰,随后即使延长再灌注时间,细胞凋亡也是减少的。

凋亡基因 Bcl 家族中 Bcl-2 被称为细胞凋亡抑制基因,对细胞凋亡具有直接调节作用。该基因并非刺激细胞增殖,而是促进非增殖细胞的存活。Bcl-2-x 编码的蛋白质有两型,Bcl-xl 与 Bcl-xs。前者与 Bcl-2 有协同作用,而后者对 Bcl-2 蛋白有抑制作用。家族的另一成员 Bax 被 6 个外显子编码,Bax 的表达或过表达,促使细胞凋亡。Bcl-2、Bax 基因的平衡性在细胞凋亡中起重要作用。氧化应激能诱导肺泡上皮细胞内促凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bax,通过内源性途径导致细胞凋亡。Bcl-xl 可通过对 caspase 抑制作用,从而抑制肺上皮细胞缺氧所致的细胞凋亡。Cooke 等^[11]在同基因肺移植老鼠的供肺中,通过气管内腺病毒给药转染人类 Bcl-2 抗凋亡基因,证明能减低激活 caspase 的活性及减少 IL-1β 的生成,抑制缺血再灌注损伤,保护移植后的肺功能。

缺血再灌注损伤中,癌基因 Bax、Bcl-2 表达上调,缺血再灌注炎症反应时细胞凋亡主要取决于组织中 Bax 与 Bcl-2 的表达水平,Bax 与 Bcl-2 在细胞接受凋亡信号后是否进入凋亡执行阶段起主要作用^[12]。Bax 诱导的细胞凋亡信号促使正常编程性死亡,Bcl-2 基因蛋白是与 Bax 基因蛋白产物结合形成异源二聚体,其作用与 Bax 相反,抑制细胞的凋亡。本实验结果表明:对照组与实验组相比较,肺组织再灌注后 1、2 h 时间点,Bcl-2 蛋白表达上调($P < 0.05$),而 Bax 蛋白表达下调($P < 0.05$),说明缺血后处理能够通过抑制促凋亡 Bax 蛋白的表达,及促进抗凋亡 Bcl-2 蛋白表达,从而影响内源性细胞凋亡途径。肺组织标本的 HE 染色光镜下观察也反应缺血后处理减轻供体肺脏再灌注损伤^[13]。

从 20 世纪 90 年代以来,肺缺血再灌注损伤中细胞凋亡的作用及它的调节才逐渐被了解。新近的研究表明,肺缺血再灌注中细胞凋亡的调节可能比原先想象更复杂,肺缺血再灌注损伤导致的细胞凋亡与肺机能障碍之间关系的证据不完全一致。外源性和内源性凋亡通路的全部情况以及它们相关联的调节因子,在肺缺血再灌注损伤细胞凋亡中的作用有待于进一步阐明。对肺细胞凋亡的进一步研究,将为肺缺血再灌注和肺移植后

降低肺功能障碍提供可能的治疗策略,从而减少心肺移植病人术后并发症和死亡率。

参考文献:

- [1] de Perrot M, Keshavjee S. Lung preservation[J]. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2004, 16(4): 300-308.
- [2] Ng SC, Wan S, Yim AP. Pulmonary ischemia reperfusion injury; role of apoptosis [J]. *Eur Respir J*, 2005, 25(2): 356-363.
- [3] 鲁建军, 姚达, 马毅, 等. 犬同种异体左侧单肺移植模型的建立[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 11, 24(11): 1436-1438.
- Lu JJ, Yao D, Ma Y, et al. The technique of anastomosis between the auricular sleeve and the atrial appendage applied in canine orthotopic left lung allograft transplantation model[J]. *Chin J Exp Surg*, 2007, 24(11): 1436-1438.
- [4] Kirk AJ, Colquhoun IW, Dark JH. Lung preservation: A review of current practice and future directions [J]. *Ann Thorac Surg*, 1993, 56(4): 990-1000.
- [5] 周棱, 杜磊, 刘斌. 心肌保护新策略: 缺血后处理[J]. *国外医学: 麻醉学与复苏分册*, 2005, 26(6): 341-343.
- Zhou L, Du L, Liu B. New strategy for myocardium protection: ischemic postconditioning [J]. *Foreign Med Sci: Anesth Resus*, 2005, 26(6): 341-343.
- [6] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(2): 579-588.
- [7] Fischer S, Cassivi SD, Xavier AM, 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.
- [8] Fischer S, Maelean AA, 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.
- [9] Kwon KY, Cho CH, Kim SP, et al. Apoptosis induced by preservation and reperfusion in canine lung transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2003, 35(1): 134-137.
- [10] Stammberger U, Gasper at, Hillinger S, et al. Apoptosis induced by ischemia and reperfusion in experimental lung transplantation [J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, 69(5): 1532-1536.
- [11] Cooke DT, Hoyt EG, Robbins RC. 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.
- [12] Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, et al. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction [J]. *Circulation*, 1996, 94: 1506-1515.
- [13] 鲁建军, 姚达, 秦存伟, 等. 缺血后处理对犬肺移植术后早期炎症反应的影响[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2009, 30(5): 547-550.
- Lu JJ, Yao D, Qin CW, et al. Influence of Ischemic Postconditioning on Inflammatory Reaction after Lung Transplantation in Canine [J]. *J Sun Yat-Sen Univ: Med Sci*, 2009, 30(5): 547-550.

(编辑 徐杰)