

· 论 著 ·

## 大鼠整体低氧预处理对在体肺缺血再灌注损伤的保护作用\*

陆德琴<sup>1</sup>, 陈莹<sup>2</sup>, 李涛<sup>3</sup>, 李保罗<sup>1</sup>

(1. 贵阳医学院病理生理学教研室, 贵州 550004; 2. 贵阳护理职业学院医学基础教研室, 贵州 550002; 3. 嘉应学院医学院病理学与病理生理学教研室, 广东梅州 514031)

**摘要:**目的 探讨大鼠整体低氧预处理(WHPC)对在体肺缺血再灌注(I/R)损伤的保护作用。方法 用重复低氧5次建立大鼠WHPC模型,用无创微血管夹夹闭左肺门缺血45 min后松开,再灌注180 min,复制肺I/R模型。设立假手术(Sham)组、I/R组和WHPC+I/R组,每组SD大鼠10只。光镜下观察各组肺组织形态学变化,用免疫组织化学染色法检测肺组织细胞色素C的表达,TUNEL法检测肺组织细胞凋亡,并用非放射性荧光底物法检测肺组织蛋白激酶C(PKC)活性。结果 与Sham组比较,I/R组肺组织出现明显损伤性形态学变化,肺组织细胞色素C表达及细胞凋亡指数显著增高( $P < 0.01$ );与I/R组比较,WHPC+I/R组形态学变化明显改善,肺组织细胞色素C表达及细胞凋亡指数均降低( $P < 0.05$ )。WHPC+I/R组肺组织PKC活性比Sham组和I/R组明显增高。结论 WHPC可减少肺组织细胞色素C表达,抑制细胞凋亡,对肺I/R损伤具有保护作用,该保护作用可能与WHPC上调PKC活性有关。

**关键词:**肺;缺血再灌注损伤;预处理;细胞凋亡;蛋白激酶C

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.15.009

中图分类号:R365.563;R459.6

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)15-1960-03

## Protective effect of whole-body hypoxic preconditioning on lung ischemic reperfusion injury in rats\*

LU De-qin<sup>1</sup>, CHEN Ying<sup>2</sup>, LI Tao<sup>3</sup>, et al.

(1. Department of Pathophysiology, Guiyang Medical College, Guizhou 550004, China;

2. Department of Basic Medicine, Nurse Vocational College, Guizhou 550002, China;

3. Department of Pathology and Pathophysiology, Medical School of Jiaying College, Meizhou, Guangdong 514031, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the protective effect of whole-body hypoxic preconditioning (WHPC) on lung ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** Thirty rats were randomly divided into three groups ( $n = 10$ , respectively): sham-operation group, I/R group and WHPC+I/R group. WHPC rat model was established with 5 times of repetitive sublethal hypoxia. Pulmonary ischemia-reperfusion injury model was established by 45 min of left hilar clamping followed by 180 min of reperfusion. Morphological changes of lung tissue were detected by HE staining. Cytochrome C expression in lung tissue was assessed by immunohistochemical staining. TUNEL was used to determine apoptosis. Protein Kinase C (PKC) activity in lung tissue was assessed by Pep-Tag non-radioactive assay. **Results** Compared with sham-operation group, expression of cytochrome C and apoptosis index of I/R group were dramatically increased. These parameters were obviously restored in WHPC+I/R group. Meanwhile, PKC activity in WHPC+I/R group lung tissue increased significantly. **Conclusion** Whole-body hypoxic preconditioning in rats can alleviate pulmonary ischemia-reperfusion injury by reducing release of cytochrome C and apoptosis. This protective effect may be associated with increasing in PKC activity.

**Key words:** lung; ischemia-reperfusion injury; hypoxic preconditioning; apoptosis; protein kinase C

预处理是防治脏器再灌注损伤的有效措施,包括缺血或低氧预处理(ischemic/hypoxic preconditioning, IPC/HPC)、药物预处理等。大量研究表明,IPC/HPC产生的内源性保护现象存在于心脏、脑、肝、肾等多种组织器官。预处理对肺的保护研究相对较少。有研究表明,药物山莨菪碱预处理可以显著减轻肺缺血再灌注损伤的程度<sup>[1]</sup>。近年来关于IPC/HPC对肺损伤的保护作用的报道逐渐增多<sup>[2]</sup>。离体实验研究表明,IPC对肺缺血再灌注(I/R)损伤有保护作用<sup>[3-4]</sup>;但也有研究认为,大鼠左肺门5 min的IPC并不能减轻肺I/R损伤<sup>[5]</sup>。已有研究表明,小鼠整体低氧预处理(whole-body hypoxic preconditioning, WHPC)能够提高肺功能、抗急性低氧性肺损伤<sup>[6]</sup>。本实验将观察大鼠WHPC对肺I/R损伤的保护作用及可能涉及的信号通路。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 成年SD大鼠,体质量180~250 g,雌雄不拘,由

贵州省动物实验中心提供。TUNEL凋亡检测试剂盒、SABC免疫组化试剂盒、抗细胞色素C抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司,非放射性蛋白激酶C(PKC)活性检测试剂盒购自Promega公司,动物呼吸机购自成都泰盟科技有限公司,核酸蛋白分析仪购自美国Amersham Biosciences, CMS显微镜购自日本Leica, BX41图像采集系统购自日本OLYMPUS。

## 1.2 研究方法

**1.2.1 建立大鼠WHPC模型** 按参考文献[7]的方法,并稍作改进。将大鼠放入一标定620 mL广口瓶内,用橡皮塞密闭,出现喘呼吸时,将大鼠取出并立即移入另一个相同容积的、含有新鲜空气和少量钠石灰的广口瓶内,密闭。如此重复5次。

**1.2.2 复制大鼠肺I/R模型及实验分组** 将大鼠随机分为3组,每组10只。(1)I/R组:3%戊巴比妥钠(1 mL/kg)腹腔注射麻醉,气管插管接动物呼吸机,于左前胸第5肋间开胸,游离

\* 基金项目:贵州省优秀科技教育人才省长专项基金资助项目(S2003-9)。

左肺门,盐水稀释 50 u 肝素至 500 μL 经尾静脉注射,10 min 后于肺充盈末用无创微血管夹夹闭左肺门,45 min 后松开,再灌注 180 min;(2)假手术(Sham)组:开胸后游离左侧肺门,不予其他处理;(3)WHPC+I/R 组:WHPC 后 1 h 开胸处理同 I/R 组。

**1.2.3 标本采集和处理** 实验结束后立即切取左肺中下段组织约 0.2 g,置于新鲜配制的 10%中性甲醛固定 24 h,常规石蜡包埋、切片,供 HE 染色观察形态学变化、免疫组织化学染色检测细胞色素 C 表达和 TUNEL 法检测细胞凋亡。

**1.2.4 肺组织细胞色素 C 表达检测** 采用链酶亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)法,严格按试剂盒说明书操作,抗细胞色素 C 抗体用 PBS 1:200 稀释,阴性对照滴加 PBS。DAB 显色后胞浆呈棕黄色者为阳性细胞。在显微镜(×400)下随机取 5 个视野(选择细胞总数在 200 个以上的视野)计数阳性细胞数及细胞总数,并计算阳性细胞率(阳性细胞数/细胞总数×100%)。

**1.2.5 肺组织细胞凋亡检测** 采用 TUNEL 法,严格按试剂盒说明书操作,每批实验均设空白对照,不加 TdT,以 PBS 代替。显色后细胞核呈棕黄色颗粒者为凋亡细胞。在显微镜(×400)下随机取 5 个视野(选择细胞总数在 200 个以上的视野),计数凋亡细胞数及细胞总数,并计算细胞凋亡指数(凋亡细胞数/细胞总数×100%)。

**1.2.6 肺组织 PKC 活性检测** 取约 0.5 g 肺组织在装有 5 mL PKC 抽提缓冲液的玻璃匀浆器中匀浆。4℃、14 000×g 离心 5 min,取上清液。通过预先用 PKC 抽提缓冲液浸润的 1 mL DEAE 纤维素圆柱后,用 5 mL PKC 抽提缓冲液洗脱。然后采用 Promega 公司设计的 PepTag®非放射性检测系统测定肺组织中 PKC 活性。荧光标记的人工合成 C1 肽本身带正电荷+1,经 PKC 磷酸化后电荷由+1 转变为-1,用 0.8%琼脂糖凝胶电泳分离磷酸化和非磷酸化的 C1 肽。根据磷酸化 C1 肽的多少判定待测样品中 PKC 活性。

**1.3 统计学方法** 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS13.0 统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 肺组织病理形态学改变** 光镜下 Sham 组肺泡腔内和肺间质未见水肿、出血、炎性细胞浸润,组织结构清晰。I/R 组肺泡腔内和肺间质可见明显水肿、出血、血管扩张、炎性细胞浸润等,可见局灶性肺气肿,偶见局灶性坏死,组织结构紊乱。WHPC+I/R 组肺组织损伤程度较 I/R 组明显减轻,可见少量炎性细胞浸润,无明显出血、水肿。

**表 1 各组肺组织细胞色素 C 表达及凋亡指数变化( $\bar{x} \pm s$ )**

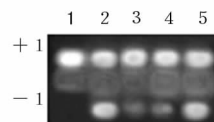
组别	n	细胞色素 C 阳性 细胞率(%, $\bar{x} \pm s$ )	细胞凋亡指数 (%, $\bar{x} \pm s$ )
Sham 组	10	0.85±0.03	0.24±0.04
I/R 组	10	16.07±1.32 $\Delta\Delta$	9.37±1.13 $\Delta\Delta$
WHPC+I/R 组	10	5.08±0.92 $\Delta^*$	1.35±0.38 $\Delta^*$

与 Sham 组比较, $\Delta: P < 0.05, \Delta\Delta: P < 0.01$ ;与 I/R 组比较, $^*: P < 0.05$ 。

**2.2 肺组织细胞色素 C 表达及细胞凋亡指数变化** Sham 组肺组织胞浆内细胞色素 C 表达少(封 2 图 1A),I/R 组细胞色素 C 表达明显增加(封 2 图 1B),而 WHPC+I/R 组细胞色素 C 表达明显比 I/R 组减少(封 2 图 1C)。Sham 组肺组织凋亡细胞数量极少(封 2 图 2A),I/R 组细胞凋亡数目明显增多(封 2 图 2B),WHPC+I/R 组肺组织细胞凋亡数较 I/R 组明显减

少(封 2 图 2C,表 1)。

**2.3 肺组织 PKC 活性改变** Sham 组和 I/R 组肺组织 PKC 活性较低,WHPC+I/R 组肺组织 PKC 活性明显上调(图 3)。



1:阴性对照;2:阳性对照;3:Sham 组;4:I/R 组;5:WHPC+I/R 组。

**图 3 PKC 磷酸化荧光底物 C1 肽电泳结果**

**3 讨 论**

近年来,随着心肺复苏、肺栓塞治疗特别是肺移植术的开展,肺 I/R 损伤日益受到人们的关注。肺 I/R 损伤后的病理变化主要有肺泡-毛细血管通透性增高、中性粒细胞渗出、蛋白漏出、间质与肺泡水肿、组织发生炎症反应以及细胞坏死与凋亡等,从而使肺功能降低<sup>[8-10]</sup>。向明章等<sup>[11]</sup>研究也表明,大鼠肺 I/R 早期就有肺组织单核/巨噬细胞相继释放炎症细胞因子 TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-8 增加,从而介导肺组织发生炎症反应而引起损伤。此外还有实验表明,大鼠肺 I/R 过程中肺泡细胞凋亡指数于再灌注 0.5 h 起即显著增加,再灌注 2 h 达高峰<sup>[12]</sup>,细胞凋亡是肺 I/R 损伤的特征之一。

脏器预处理是机体抗缺血/缺氧的一种内源性保护机制。脏器以往的预处理研究大多涉及心脏和脑组织,关于预处理对肺的保护作用研究则相对甚少。有研究表明,各种脏器预处理,包括 IPC、低通气预处理、高温预处理及 WHPC 均可以显著减轻肺损伤,促进肺功能的恢复。肺 IPC 的保护作用可能涉及以下机制:IPC 可改善肺毛细血管通透性、减少渗出,可抑制炎症细胞及炎症因子的激活,可减少肺组织细胞的坏死与凋亡,可降低肺动脉压,提高血氧饱和度,还可促肺表面活性物质分泌等。然而实施 IPC 进行肺保护,在实际应用中有一定的局限。因此本实验采用操作简便的 WHPC 模型,探讨 WHPC 对肺 I/R 损伤的保护作用及其是否与抑制细胞凋亡有关。本实验结果显示,I/R 组大鼠肺组织损伤显著,组织结构紊乱,可见明显水肿、出血、炎性细胞浸润、局灶性肺气肿等,偶见局灶性坏死,且肺组织细胞色素 C 表达和细胞凋亡明显增多;与 I/R 组比较,WHPC+I/R 组肺组织镜下结构清晰,炎性细胞浸润和肺间质与肺泡腔内水肿液、出血明显减少,同时 WHPC 还能抑制肺组织细胞色素 C 的表达,抑制肺组织细胞凋亡的发生。表明 WHPC 对肺 I/R 损伤有明确的保护作用。

WHPC 抗细胞凋亡的机制尚不清楚。有研究表明,WHPC 可通过影响 Fas 和 Fas-L 蛋白表达起到抑制细胞凋亡、保护脑 I/R 损伤的作用<sup>[13]</sup>。此外,HPC 可诱导培养的下丘脑细胞高表达 bcl-2,稳定线粒体膜电位,减少线粒体释放凋亡相关因子,从而抑制细胞凋亡<sup>[14]</sup>。细胞凋亡发生过程中线粒体释放细胞色素 C 是一个早期事件,细胞色素 C 自线粒体释放至胞质后可导致 Caspase 家族级联活化,最终引起细胞凋亡。本实验结果提示,WHPC 可通过抑制线粒体释放细胞色素 C 起到抑制细胞凋亡的作用,从而对 I/R 引起的肺损伤发挥保护作用。

目前认为脏器预处理的保护作用机制是级联反应,包括触发物质-中介物质-效应因子 3 个环节,其中触发物质主要是一些内源性保护物质,如缓激肽、腺苷、NO 等,中介物质主要是蛋白激酶,如 PKC 等,效应因子主要是 ATP 敏感通道等。WHPC 的保护作用是否也可由 PKC 信号途径介导呢?本实验采用非放射性 PKC 活性检测系统测定各组肺组织中 PKC

活性,结果发现 WHPC 可使肺组织 PKC 活性明显上调,提示 WHPC 的保护作用可能与激活 PKC 信号通路有关。生理情况下 80%~90% PKC 以非活性形式存在于肺组织细胞中。PKCs 家族的亚型种类繁多,功能复杂,许多刺激因素均可使各 PKC 亚型发生转位而激活,然后通过其蛋白磷酸化作用引起一系列生理与病理反应。究竟 WHPC 激活的是哪一亚型 PKC,而后具体的分子保护机制如何尚需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 贾智博,周刚,刘越,等. 山萘碱预处理对兔肺缺血再灌注损伤的实验研究[J]. 重庆医学,2009,38(19):2470.
- [2] Luh SP, Yang PC. Organ preconditioning: the past, current status, and related lung studies[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2006, 7(5): 331.
- [3] Featherstone RL, Chambers DJ, Kelly FJ. Ischemic-preconditioning enhances recovery of isolated rat lungs after hypothermic preservation [J]. Ann Thorac Surg, 2000, 69(1): 237.
- [4] 李建华, 司志萍, 卢佳怡, 等. 缺血预处理对大鼠肺缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2003, 19(2): 137.
- [5] Pilla ES, Vendrame GS, Sánchez PG, et al. Ischemic preconditioning by selective occlusion of the pulmonary artery in rats [J]. J Bras Pneumol, 2008, 34(8): 583.
- [6] Zhang SX, Miller JJ, Gozal D, et al. Whole-body hypoxic preconditioning protects mice against acute hypoxia by improving lung function [J]. J Appl Physiol, 2004, 96

(1): 392.

- [7] 吕国蔚,史美棠,李凌,等. 急性重复缺氧对小鼠缺氧耐受性的影响及其机制的初步探讨[J]. 中国病理生理杂志, 1992, 8(4): 425.
- [8] Friedrich I, Spillner J, Lu EX, et al. Ischemic pre-conditioning of 5 minutes but not of 10 minutes improves lung function after warm ischemia in a canine model [J]. J Heart Lung Transplant, 2001, 20(9): 985.
- [9] 谢东甫,徐志飞. 肺缺血再灌注损伤与细胞凋亡[J]. 国外医学外科学分册, 2002, 29(1): 37.
- [10] 王婷,蒋豪,薛张纲,等. 异氟醚对大鼠缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2006, 26(2): 140.
- [11] 向明章,蒋耀光,王如文,等. 肺缺血再灌注损伤后 TNF、IL-6 和 IL-8 的变化及其意义[J]. 重庆医学, 1999, 28(1): 5.
- [12] 张赛,陈如坤,林敏,等. 大鼠肺缺血再灌注损伤中肺泡细胞凋亡的动态观察[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(19): 1597.
- [13] 卢娜,王宝英,魏林郁,等. 低氧预处理对大鼠缺血-再灌注性脑损伤中凋亡及 Fas 和 Fas-L 蛋白表达的影响[J]. 中国临床康复, 2006, 10(46): 120.
- [14] 吴丽颖,丁爱石,马强,等. 低氧预处理提高离体培养的下丘脑细胞缺氧耐受性及其与线粒体膜电位稳定性的关系[J]. 生理学报, 2001, 13(2): 93.

(收稿日期:2009-12-23 修回日期:2010-03-05)

(上接第 1959 页)

慢性低氧导致大鼠 PSMCs 的增殖。冬虫夏草是否能够降低慢性低氧性肺动脉高压尚有待进一步在动物体内进行研究。

#### 参考文献:

- [1] McLaughlin W, McGoon MD. Pulmonary arterial hypertension [J]. Circulation, 2006, 114(13): 1417.
- [2] Hida W, Tun Y, Kikuchi Y, et al. Pulmonary hypertension in patients with chronic obstructive pulmonary disease: recent advances in pathophysiology and management [J]. Respirology, 2002, 7(1): 3.
- [3] Esteve JM, Launay JM, Kellermann O, et al. Functions of serotonin in hypoxic pulmonary vascular remodeling [J]. Cell Biochem Biophys, 2007, 47(1): 33.
- [4] Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms [J]. Circ Res, 2006, 99(7): 675.
- [5] 易斌,钱桂生,白莉,等. Akt3 基因在低氧致大鼠肺动脉平滑肌细胞体外增殖中的作用[J]. 重庆医学, 2008, 37(22): 2553.
- [6] Yamaguchi Y, Kagota S, Nakamura K, et al. Antioxidant activity of the extracts from fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis* [J]. Phytother Res, 2000, 14(8): 647.
- [7] Kim CS, Lee SY, Cho SH, et al. *Cordyceps militaris* induces the IL-18 expression via its promoter activation for IFN-gamma production [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 120

(3): 366.

- [8] Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork [J]. Cell, 2007, 129(4): 665.
- [9] Genovese C, Trani D, Caputi M, et al. Cell cycle control and beyond: emerging roles for the retinoblastoma gene family [J]. Oncogene, 2006, 25(38): 5201.
- [10] Milde-Langosch K. The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis [J]. Eur J Cancer, 2005, 41(16): 2449.
- [11] Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival [J]. Oncogene, 2001, 20(19): 2413.
- [12] Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(11): 859.
- [13] Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, et al. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease [J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(1): 201.
- [14] Ji DB, Ye J, Li CL, et al. Antiaging effect of *Cordyceps sinensis* extract [J]. Phytother Res, 2009, 23(1): 116.
- [15] Jin CY, Kim GY, Choi YH. Induction of apoptosis by aqueous extract of *cordyceps militaris* through activation of caspases and inactivation of Akt in human breast cancer MDA-MB-231 cells [J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(12): 1997.

(收稿日期:2009-11-10 修回日期:2010-01-10)