

· 论 著 ·

兔肺动脉栓塞/再灌注损伤中肺泡细胞凋亡及其 Fas/FasL 表达的变化

袁雅冬¹, 崔 炜^{2*}, 吕侯强¹, 陈 晔¹, 王 辉¹, 王素燕¹

(1. 河北医科大学第二医院呼吸内科, 石家庄 050000; 2. 心血管内科)

[摘要] **目的:**观察兔肺动脉栓塞/再灌注损伤中肺泡细胞凋亡及其 Fas 及 FasL 蛋白表达的变化,探讨肺损伤的可能机制。

方法:健康新西兰白兔 30 只,雌雄不拘,运用 5F Berman 球囊堵塞左下肺动脉,然后球囊放气,复制肺动脉栓塞缺血再灌注模型,随机分为 5 组($n=6$):假手术组,肺动脉栓塞 1 h 组、肺动脉栓塞 2 h 组,肺动脉栓塞 2 h 再灌注 1 h 组、肺动脉栓塞 2 h 再灌注 2 h 组;另设 6 只正常未手术白兔为对照组。实验结束取肺组织,测定肺组织湿/干重比,采用流式细胞分析法检测肺组织细胞凋亡率,免疫组织化学法检测肺上皮细胞 Fas 及 FasL 蛋白表达的变化。**结果:**与对照组、假手术组相比,肺动脉栓塞 1、2 h 组兔肺组织细胞凋亡率明显增加,再灌注后凋亡细胞进一步增多,并随着再灌注时间延长而逐渐增多($P<0.05$ 或 0.01);Fas 及 FasL 蛋白表达在肺动脉栓塞及再灌注后明显上调(P 均 <0.01)。肺泡上皮细胞凋亡指数与肺组织湿干比、Fas 及 FasL 蛋白表达呈显著正相关(r 分别为 0.769, 0.820, 0.820; $P<0.01$)。**结论:**肺动脉栓塞缺血/再灌注可能通过激活 Fas/FasL 系统,诱导肺组织细胞凋亡,从而导致肺损伤的发生。

[关键词] 肺栓塞;再灌注损伤;肺泡;细胞凋亡;Fas/FasL

[中图分类号] R 563.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)04-405-04

Alveolar cells apoptosis and Fas/FasL expression in rabbits after ischemia/reperfusion of pulmonary artery

YUAN Ya-dong¹, CUI Wei^{2*}, Lü Hou-qiang¹, CHEN Ye¹, WANG Hui¹, WANG Su-yan¹ (1. Department of Respiratory Diseases, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2. Department of Cardiology)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the changes of alveolar cells apoptosis and the expression of Fas/FasL protein in pulmonary injury induced by ischemia/reperfusion in rabbits, and to explore the related mechanism of pulmonary injury. **Methods:** The left pulmonary arteries of 30 healthy New Zealand rabbits (either sex) were obstructed and reperfused by inflating and discharging gas of 5F Berman sacculus catheter. The rabbits were then randomly divided into 5 groups: sham operation group, ischemia 1 h group, ischemia 2 h group, ischemia 2 h and reperfusion 1 h group, and ischemia 2 h and reperfusion 2 h group. Another 6 healthy rabbits were taken as control. The pulmonary tissues were harvested after experiment and the lung wet/dry ratio was determined. Alveolar cells apoptosis and Fas/FasL protein expression were determined using flow cytometry and immunocytochemistry techniques, respectively. **Results:** The lung cell apoptosis was obviously increased in ischemia groups compared with that in the control and sham group. The reperfusion after ischemia further increased the cell apoptosis compared with simple ischemia groups, and the apoptosis was positively related with the reperfusion time ($P<0.05$ or 0.01). Fas and FasL protein expression was significantly higher in ischemia and ischemia/reperfusion group than that in other groups (both $P<0.01$). Significant positive correlation was found between apoptosis index with lung wet/dry ratio and expression of Fas and FasL ($r=0.769, 0.820, 0.820$ respectively, $P<0.01$). **Conclusion:** Pulmonary artery ischemia/reperfusion may activate the Fas/FasL system and induce alveolar cells apoptosis, leading to pulmonary damages.

[KEY WORDS] pulmonary embolism; reperfusion injury; pulmonary alveoli; apoptosis; Fas/FasL

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(4): 405-408]

近年来研究^[1,2]表明,多种脏器在发生缺血再灌注损伤时会出现细胞凋亡(apoptosis)。细胞凋亡是不同于细胞坏死的一种细胞死亡形式,通常发生于细胞损伤已无法修复但尚未达到严重坏死的程度,但目前关于肺动脉栓塞/再灌注损伤与细胞凋亡的关系知之甚少,本实验通过建立兔肺动脉栓塞缺血/再灌注模型,研究肺动脉栓塞缺血/再灌注损伤对肺泡细胞凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂 健康新西兰白兔 36 只(河北医科大学动物室提供),雌雄不拘,体质量 2.5~3.0

[作者简介] 袁雅冬,硕士,主任医师。

E-mail: yydzy62@sina.com

* Corresponding author. E-mail: cuiwei21c@hotmail.com

kg, 分为6组, 每组6只。各组动物实验前12 h禁食水。5F Berman 球囊导管(美国 ARROW 公司)、速眠新(军事医学科学院军事兽医研究所)。兔 Fas/FasL 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司), SP9000 试剂盒(北京中山生物工程有限公司)。

1.2 动物模型的建立 36只白兔随机分为6组($n=6$): 正常对照组(不进行手术处理), 假手术组(将 Berman 球囊导管经右侧颈外静脉送至左肺动脉而不充盈球囊, 置管4 h后放血处死动物), 肺动脉栓塞1 h组(I 1 h), 肺动脉栓塞2 h组(I 2 h), 肺动脉栓塞2 h再灌注1 h组(IR 1 h)、肺动脉栓塞2 h再灌注2 h组(IR 2 h)。按0.2 mg/kg 肌肉注射速眠新麻醉动物, 右侧颈外静脉经鞘管置入5F Berman 球囊漂浮导管, 在X线影像下, 将球囊导管置于左下肺动脉开口处, 充盈球囊, 同时行肺动脉造影证实左下肺动脉完全堵塞, 建立肺动脉栓塞动物模型。IR 2 h组白兔在栓塞2 h后抽出 Berman 球囊中的气体, 建立肺动脉栓塞缺血再灌注动物模型。同时监测呼吸、心率、血氧饱和度、肺动脉压(PAP), 包括肺动脉收缩压(PASP)、肺动脉舒张压(PADP)、肺动脉平均压(MPAP)等指标。

1.3 肺组织湿/干重比(W/D)的测定 各组动物于实验结束后放血处死, 开胸后立即剪取左肺心叶肺组织, 用滤纸吸干肺表面血液称湿重(W)并记录, 而后置于80℃烘箱烘干72 h至恒重称干重(D), 计算湿/干重比值(W/D)。

1.4 细胞增殖的计算方法 应用DNA 细胞周期分析软件, 计算出DNA 组方图各时相分布的百分比, 以增殖指数(PI)表示细胞的增殖活性, 公式为 $PI = (S + G_2M) / (G_{0/1} + S + G_2M) \times 100\%$ 。

1.5 流式细胞分析法测定肺组织细胞凋亡率 用

机械法分散肺组织, 收集单细胞悬液, 经300目铜网过滤, 500~800 r/min 离心沉淀2 min。取 1×10^6 细胞, 加入10% 鸡红细胞作为内参标准, 与样本同步染色。用碘化丙啶(PI)法进行DNA 染色, 由Epic-XL II 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)测定。检测前以 Flow-check™ Fluorpheres(10 μm) 荧光微球(REF 6605359, Beckmen Coulter, Inc. Fullerton, CA 92835.) 作为标准样品调整仪器 CV 值在5%以下。将所得数据输入计算机, 用 Muticycle AV 分析软件对DNA 细胞周期拟合分析。

1.6 免疫组化检测肺泡上皮 Fas、FasL 蛋白的表达 具体方法按试剂盒说明操作。胞质中或核膜棕色颗粒为阳性, 不加一抗为阴性对照。结果判断: 在10×40 高倍镜下, 每张肺组织切片随机选取5个视野, 计数200个肺泡上皮细胞数及阳性细胞数, 计算阳性细胞率, 每张切片计数后取平均值。

1.7 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 凋亡程度以百分率表示, 利用 SPSS 10.0 软件进行统计分析。组间比较采用单因素方差分析(One way ANOVA) LSD法, 双变量相关分析采用 Bivariate 过程的 Pearson 等级相关法。

2 结果

2.1 兔肺动脉栓塞缺血再灌注动物模型的建立 各组动物在栓塞和再灌注前后平均肺动脉压(MPAP)的变化: 与栓塞前相比 I 1 h、2 h组, IR 1 h、2 h组在栓塞即刻急剧升高($P < 0.05$), 在栓塞2 h降至栓塞前水平($P > 0.05$); 再灌注即刻平均肺动脉压再次升高($P < 0.01$), 随后逐渐下降并且保持平稳($P > 0.05$)。假手术组的平均肺动脉压在各时间点无变化。具体详见表1。

表1 各组肺动脉栓塞/再灌注前后平均肺动脉压变化

Tab 1 Changes of mean pulmonary arterial pressure before and after acute pulmonary ischemia/ reperfusion

($n=6, \bar{x} \pm s, p/\text{mmHg}$)

	Sham	I 1 h	I 2 h	IR 1 h	IR 2 h	F
Before ischemia	18.33±0.58	19.25±0.50	19.67±1.63	20.25±2.22	19.60±2.70	0.492
At ischemia	19.00±1.00	27.00±1.83**△△	29.67±4.93**△△	31.25±6.85**△△	29.00±4.74**△△	3.939
0.5 h after ischemia	18.67±0.58	25.00±0.82**△△	26.00±3.69**△△	26.25±2.06**△△	25.00±1.87**△△	5.657
1 h after ischemia	19.33±0.58	25.25±0.96**△△	28.17±4.96**△△	27.25±2.22**△△	25.00±1.41**△△	4.566
2 h after ischemia	18.33±0.58	-	21.83±1.17	22.00±1.63	21.60±2.61	3.324
At reperfusion	18.67±0.58	-	-	29.75±3.30**△△	26.40±1.52**△△	14.576
1 h after reperfusion	19.33±1.53	-	-	20.25±2.50	18.80±3.11	0.051
2 h after reperfusion	18.67±1.53	-	-	-	18.25±1.72	0.140

I 1 h: Ischemia 1 h; I 2 h: Ischemia 2 h; IR 1 h: Ischemia 2 h and reperfusion 1 h; IR 2 h: Ischemia 2 h and reperfusion 2 h. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the time before ischemia in each group; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ vs Sham group. 1 mmHg=0.133 kPa

2.2 肺组织湿/干重比(W/D) 对照组与假手术组 W/D 之间无显著差异($P>0.05$);与对照组和假手术组相比,I 1 h、2 h 组,IR 1 h、2 h 组肺组织 W/

D 明显升高($P<0.05$ 或 0.01)。IR 2 h 组高于 IR 1 h 组($P<0.05$),并且明显高于 I 1 h、2 h 组($P<0.01$)。详见表 2。

表 2 各组间肺组织湿/干重比、细胞增殖指数、细胞凋亡率、肺泡上皮细胞 Fas/FasL 蛋白表达比较

Tab 2 Comparison of cell apoptosis and expression of Fas/FasL protein in alveolar epithelial cells between 6 groups

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Index	Control	Sham	I 1 h	I 2 h	IR 1 h	IR 2 h	F
W/D	4.10±0.11	4.30±0.06	4.87±0.13**△△	5.00±0.16**△△	5.31±0.53**△△▲	6.23±0.38**△△▲▲□□■	43.825
PI	42.42±8.36	46.70±2.65	60.77±5.79**△△	61.29±8.72**△△	59.96±9.39**△△	66.65±3.03**△△	7.674
AI(%)	2.22±0.51	2.51±0.14	7.56±1.60**△△	6.96±1.41**△△	8.63±1.57**△	10.57±2.55**△△▲▲□□■	19.917
Fas(%)	4.50±1.46	6.30±0.91	16.20±1.15**△△	31.60±2.33**△△▲▲	47.10±5.05**△△▲▲□□	78.70±4.15**△△▲▲□□■	465.107
FasL(%)	3.80±1.20	4.50±1.37	14.80±1.15**△△	31.00±2.15**△△▲▲	49.90±3.05**△△▲▲□□	85.90±2.19**△△▲▲□□■	1302.216

I 1 h : Ischemia 1 h; I 2 h : Ischemia 2 h; IR 1 h : Ischemia 2 h and reperfusion 1 h; IR 2 h : Ischemia 2 h and reperfusion 2 h. ** $P<0.01$ vs control group; △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$ vs sham group; ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$ vs I 1 h group; □ $P<0.05$, □□ $P<0.01$ vs I 2 h group; ■ $P<0.05$, ■■ $P<0.01$ vs IR 1 h group

2.3 肺组织细胞增殖指数(PI) 对照组肺组织 PI 与假手术组之间无显著差异($P>0.05$);与对照组与假手术组相比,I 1 h、2 h 组,IR 1 h、2 h 组肺组织 PI 明显升高($P<0.01$)。详见表 2。

2.4 肺组织细胞凋亡率(AI%) 对照组肺组织细胞凋亡率与假手术组之间无显著差异,说明手术不是造成细胞凋亡率升高的原因。与对照组和假手术组肺组织细胞凋亡率相比,I 1 h、2 h 组,IR 1 h、2 h 组明显升高($P<0.01$ 或 0.05);IR 2 h 组高于 IR 1 h 组($P<0.05$),并且明显高于 I 1 h、2 h 组($P<$

0.01)。详见表 2。

2.5 肺泡上皮细胞 Fas、FasL 蛋白表达 免疫组织化学染色 Fas、FasL 蛋白被染成棕黄色颗粒,阳性信号主要在肺泡上皮细胞胞膜或胞质(图 1)。Fas、FasL 蛋白表达在兔肺动脉栓塞 1 h 轻度增高,2 h 时明显增高($P<0.01$);再灌注后 1 h、2 h 时 Fas、FasL 蛋白表达进一步增加,随再灌注时间的延长逐渐增多($P<0.01$);对照组与假手术组已有轻度表达,但是两组之间无差别。详见表 2。

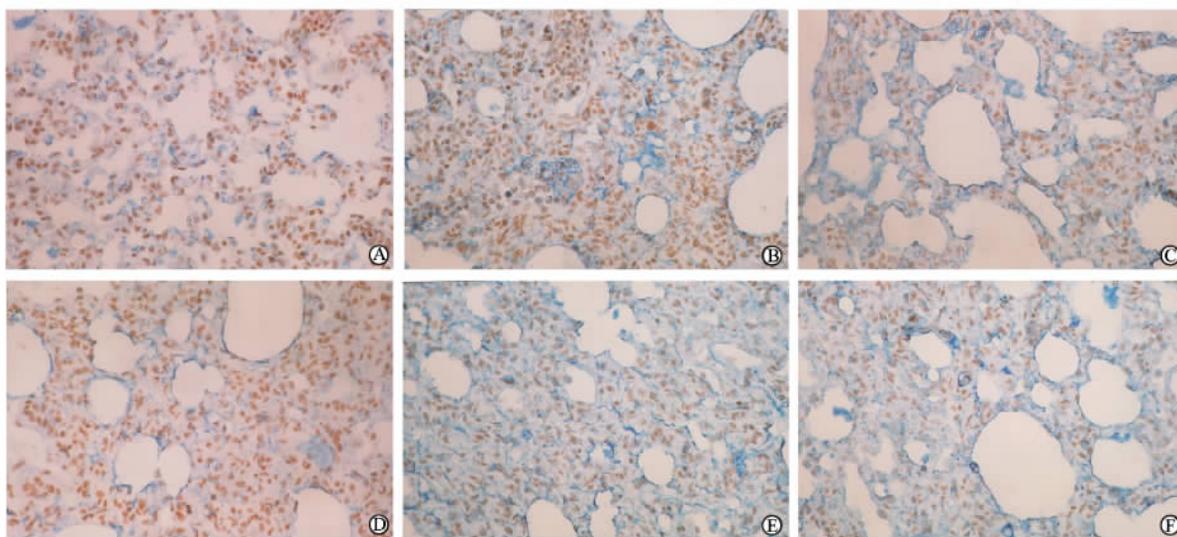


图 1 肺泡上皮细胞 Fas 和 FasL 蛋白表达

Fig 1 Fas and FasL protein expression in alveolar epithelial cells(×400)

A-C: Fas protein, D-F: FasL protein; A, D: Control group; B, E: Ischemia 2 h; C, F: Ischemia 2 h and reperfusion 2 h

2.6 相关性分析 将36只兔的肺组织细胞凋亡率与肺组织湿/干重比和肺泡上皮细胞 Fas/FasL 蛋白表达作相关分析表明,肺组织细胞凋亡率与肺组织湿干重比以及 Fas、FasL 蛋白表达之间存在非常显著的正相关关系 ($r=0.769, 0.820, 0.820$; $P<0.01$)。

3 讨论

肺动脉栓塞是常见的心肺血管系统疾病,病情危重、病死率较高。当肺动脉主干或广泛肺动脉栓塞时,其病理生理过程主要表现为血流动力学改变和呼吸生理改变。一旦临床确诊,治疗原则是尽早尽快地恢复缺血肺组织的血流。随着对肺动脉栓塞的深入研究,人们发现不仅在栓塞时存在肺脏损伤,而且经过治疗,肺动脉再通后亦有出现肺损伤的可能,如何保证恢复肺动脉血流畅通又要防止或最大限度的减轻缺血再灌注损伤的发生成为临床医师关注的问题。本研究运用 Berman 球囊首先堵塞新西兰白兔左下肺动脉,然后球囊放气恢复肺组织血流供应,建立急性兔肺栓塞及肺缺血再灌注损伤模型。通过造影显像可直接观察肺组织缺血范围、再灌注情况,而且不需要开胸手术,直观地了解肺栓塞及再灌注损伤。

缺血再灌注肺损伤是临床上存在的一种脏器损伤现象,临床上的主要表现为肺水肿及急性呼吸衰竭。一般再灌注损伤主要发生在血流再通的最初几分钟内,主要表现为内皮功能紊乱、细胞坏死和凋亡。肺缺血再灌注时,氧自由基的快速大量产生、中性粒细胞大量浸润引起的过度炎症反应、细胞内的钙超载、体液因子的作用等,可诱导肺血管内皮细胞和肺泡上皮细胞凋亡的发生^[3],细胞凋亡的过程可以在很短的时间完成。Fischer 等^[4]发现缺血再灌注损伤可促进人肺组织细胞凋亡数目增多,肺组织细胞的过度凋亡可以导致肺功能不全。本研究表明,单独肺动脉栓塞 1 h 可引起兔肺组织细胞凋亡,2 h 时明显增高。再灌注后细胞凋亡进一步增加且与再灌注时间相关,这与在此期间肺组织湿/干重比的改变趋势是一致的。表明肺组织细胞凋亡可能参与了肺动脉栓塞/再灌注肺损伤的发生,而肺组织细胞凋亡是肺动脉栓塞/再灌注早期肺损伤的一个指标。

Fas/FasL 系统是介导细胞凋亡的重要信号转导通路之一^[5]。在正常情况下 Fas 和 FasL 并不介导细胞发生凋亡。Fas/FasL 系统过度表达时,可引起多种炎症细胞和实质细胞的过度凋亡而造成淋巴细胞减少及器官功能障碍^[6,7]。有报道肠缺血再灌

注损伤时,肺组织损伤程度与单个核细胞 Fas 表达变化相对应,肺组织损伤加重时 Fas 增加,肺组织逐渐恢复正常时 Fas 也逐渐减少,因此 Fas 可以衡量肺脏损伤程度。目前认为,Fas/FasL 系统参与肺组织细胞凋亡可能主要与以下因素有关:Fas 抗原在靶细胞的表达上调^[8];以及肺部浸润淋巴细胞 FasL 表达上调,并与靶细胞上的 Fas 抗原结合进而诱导细胞凋亡。由于表达 Fas 的细胞为多见,而表达 FasL 的细胞不多,因此组织细胞是否发生凋亡很大程度上取决于组织中是否有 FasL 的表达。本研究显示,Fas 和 FasL 在正常兔肺组织中仅有轻微表达,而在肺动脉栓塞缺血/再灌注时兔肺组织细胞表达明显上调($P<0.01$),并且 Fas/FasL 表达的增强与肺组织细胞凋亡增加呈正相关,提示 Fas/FasL 系统活化可能是肺动脉栓塞缺血/再灌注肺损伤的发生机制之一。掌握肺损伤发病过程中异常细胞凋亡的规律,根据不同阶段对细胞凋亡进行调控,将成为临床防治肺动脉栓塞缺血/再灌注肺损伤的新思路。

[参考文献]

- [1] Yang J, Jones SP, Sahara T, et al. Endothelial cell overexpression of Fas ligand attenuates ischemia-reperfusion injury in the heart[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 15185-15191.
- [2] Padosch SA, Popp E, Vogel P, et al. Altered protein expression levels of Fas/CD95 and Fas ligand in differentially vulnerable brain areas in rats after global cerebral ischemia[J]. *Neurosci Lett*, 2003, 338: 247-251.
- [3] Miyazawa S, Watanabe H, Miyaji C, et al. Leukocyte accumulation and changes in extra-renal organs during renal ischemia reperfusion in mice[J]. *J Lab Clin Med*, 2002, 139: 269-278.
- [4] 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: 424-431.
- [5] Jeremias I, Kupatt C, Martin-Villalba A, et al. Involvement of CD95/Apo1/Fas in cell death after myocardial ischemia [J]. *Circulation*, 2000, 102: 915-920.
- [6] 龚非力 主编. 医学免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 258-268.
- [7] Papanthanasoglou ED, Moynihan JA, McDermott MP, et al. Expression of Fas (CD95) and Fas ligand on peripheral blood mononuclear cells in critical illness and association with multiorgan dysfunction severity and survival[J]. *Crit Care Med*, 2001, 29: 709-718.
- [8] Nomoto Y, Kuwano K, Hagimoto N, et al. Apoptosis and Fas/FasL ligand mRNA expression in acute immune complex alveolitis in mice [J]. *Eur Respir J*, 1997, 10: 2351-2359.

[收稿日期] 2006-01-09

[修回日期] 2006-03-26

[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群