

黄芪甲苷对大鼠肺缺血再灌注损伤后细胞凋亡的影响

刘建平 何建峰

(邯郸市中医院,河北邯郸 056001)

摘要 目的:研究黄芪甲苷(Astragalosides)对大鼠肺缺血再灌注损伤后细胞凋亡的影响。方法:100只实验用大鼠随机分为假手术组、模型组和黄芪甲苷低、中、高剂量(20、40、80mg/kg)组,每组20只。各组大鼠分别于术前30min腹腔注射给药或生理盐水,除假手术组以外,其余各组大鼠采用夹闭左肺门45min后松夹的方法制备肺缺血再灌注损伤模型,假手术组行手术通路,不夹闭。再灌注2h后,测定各组大鼠肺组织湿/干重比(W/D),HE染色法观察肺组织病理学改变,末端标记法(TUNEL)观察肺细胞凋亡状况并计算凋亡指数(Apoptosis Index, AI),逆转录-PCR(RT-PCR)法检测肺组织中Bcl-2 mRNA、Bax mRNA表达并计算Bcl-2/Bax比值,测定肺组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量,采用Western blotting法测定肺组织中核转录因子- κ B(NF- κ B)蛋白表达并进行半定量分析。结果:与模型组比较,黄芪甲苷中、高剂量组大鼠肺组织W/D、肺细胞凋亡指数显著降低,肺组织形态结构变化和肺细胞病变显著减轻,肺组织中Bcl-2 mRNA表达显著升高,Bax mRNA表达显著降低,Bcl-2/Bax比值显著升高,肺组织中SOD、CAT活性显著升高,MDA含量显著降低,NF- κ B蛋白表达量显著降低,上述差异均具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),其中以黄芪甲苷高剂量效果最为显著。结论:黄芪甲苷对大鼠肺缺血再灌注损伤后肺细胞凋亡有一定的抑制作用,其作用机制可能与黄芪甲苷能够上调抑凋亡基因Bcl-2表达,下调促凋亡基因Bax表达,提高Bcl-2/Bax表达比值以及提高抗氧化酶活性,降低氧化应激反应,上调NF- κ B蛋白表达有关。

关键词 黄芪甲苷 肺组织 缺血再灌注 细胞凋亡 大鼠 实验研究

中图分类号 R285.5 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2016)06-0075-04

肺缺血再灌注损伤是肺部手术后常见的并发症之一,严重影响着患者愈后,其发病机制非常复杂,目前认为恢复血流供应后出现的继发性肺细胞凋亡是造成肺缺血再灌注损伤的关键因素^[1]。黄芪甲苷为我国传统中药黄芪的主要有效成分之一,具有抗炎、降血脂等多种药理学活性^[2-3]。近年来动物实验研究发现,黄芪甲苷通过抑制细胞凋亡表现出对肝组织缺血再灌注损伤大鼠和心肌缺血再灌注损伤大鼠的保护作用^[4-5],但黄芪甲苷是否对肺缺血再灌注损伤大鼠细胞凋亡具有抑制作用尚未见文献报道。本实验通过夹闭左肺门45min后松夹的方法制备肺缺血再灌注损伤大鼠模型,研究黄芪甲苷对大鼠肺缺血再灌注损伤后细胞凋亡的影响。

1 实验材料

1.1 实验动物 清洁级雄性SD大鼠(7周龄,220~260g),由河北省实验动物中心提供,许可证号:SCXK(冀)2013-1-003,动物合格证号:201506008。

1.2 药物与试剂 黄芪甲苷购自成都锦泰和医药

化学技术有限公司,批号:150114,纯度 $\geq 98\%$ 。溶液的配制:精确称量黄芪甲苷,加适量二甲基亚砜(DMSO)溶解后用生理盐水稀释,制备浓度为40mg/kg黄芪甲苷溶液,然后依次稀释,制备浓度为20mg/kg和10mg/kg的黄芪甲苷溶液。HE、TUNEL试剂盒购于北京博奥森生物工程有限公司;Bcl-2、Bax上下游引物购自上海博亚生物公司;超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;核转录因子- κ B(NF- κ B)单克隆抗体购自碧云天生物技术有限公司。

1.3 主要仪器 DW-2000动物人工呼吸机(上海恒勤仪器设备有限公司);UV762型紫外-可见分光光度计(上海楚定分析仪器有限公司);石蜡切片机(德国SLEE公司);AL104电子天平(Mettler-Toledo公司);DYY-11型多用电泳仪、JY-SCZ2电泳槽(北京六一仪器厂);光学显微镜(日本Olympus公司);RT-PCR仪(武汉新未来仪器技术有限公司)。

2 实验方法

2.1 分组与造模 取 100 只实验用大鼠按照随机数字表法随机分为假手术组、模型组和黄芪甲苷低、中、高剂量(20、40、80mg/kg)组,每组 20 只。黄芪甲苷各剂量组分别于术前 30min 由腹腔注射给药(2mL/kg),假手术组和模型组分别给予等体积(2mL/kg)的生理盐水。除假手术组外,其余各组大鼠均参照 Xia ZY 等^[9]报道的方法制备肺缺血再灌注损伤大鼠模型:经腹腔注射乌拉坦实施麻醉后,行气管插管,连接动物呼吸机(设置频率为 50 次/min,呼吸比例为 1:1,潮气量为 10mL/kg),于左胸第 4 肋和第 5 肋间开胸,游离左肺门后,用无创血管夹闭左肺门,45min 后松夹以恢复血流,整个过程辅助机械通气。假手术组行手术通路,除不夹闭左肺门外,其余操作同手术组。

2.2 指标检测 再灌注 2h 后,各组随机选择 5 只大鼠,取肺组织测定湿/干重比(W/D);各组另外随机选取 5 只大鼠,取肺组织经石蜡切片后行 HE 染色和 TUNEL 染色;取各组剩余 10 只大鼠,取肺组织行研磨匀浆后,测定 Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 表达,测定 SOD、CAT 活性和 MDA 含量,测定 NF- κ B 蛋白表达。

2.2.1 肺组织 W/D 的测定 肺组织经生理盐水冲洗干净并用滤纸吸干后,称重为湿重(W),置于 60℃烘干箱 24h 后称重为干重(D),平行计算各组大鼠两者之比为肺组织 W/D。

2.2.2 肺组织形态结构的观察 肺组织经 4%多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片(厚度为 5 μ m)和展片处理后,行常规 HE 染色,然后通过光学显微镜观察形态结构。

2.2.3 肺细胞凋亡状况的观察及凋亡指数(AI)的计算 取肺组织石蜡切片,按试剂盒操作步骤依次进行处理后行 TUNEL 染色,然后通过光学显微镜平行观察肺组织细胞凋亡状况(细胞核黄褐色为阳性着色)。AI 的计算:每张切片随机选取 6 个视野,计数每个视野中肺细胞总数和阳性凋亡细胞数,然后计算各组大鼠肺组织细胞 AI:

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

2.2.4 肺组织中 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA 表达的检测及 bcl-2/Bax 表达比值的计算 查阅大鼠 Bax、Bcl-2、 β -actin 基因 cDNA 序列并通过 Oligo 软件设计上、下游引物。Bcl-2 上游:5'-GGGATGCCTTTGTG-GAACTA-3',下游:5'-TGATTTGACCATTTGCCTGA-3',扩增片段长度 317bp;Bax 上游:5'-ATCCAGGATCGAGCAGGGAGGATGG-3',下游:5'-

AGATGGTCACTGTCTG CCATGTGGG-3',扩增片段长度 282 bp; β -actin 上游:5'-CCTGTATGCCTCTG-GTCGTA-3',下游:5'-CCATCTCTTGCTCGAAGTCT-3',扩增片段长度 432bp。取肺组织,剪碎后加入适量冷裂解液行肺组织匀浆,加入适量 Trizol 试剂提取总 RNA 并测定总 RNA 浓度,取 1 μ g RNA 反转录为 cDNA,然后进行 PCR 反应,扩增完毕后,取 PCR 产物于琼脂糖凝胶电泳,通过凝胶成像仪观察并照相。以 β -actin 为内参,由灰度值进行半定量分析 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA 表达并计算 Bcl-2/Bax 比值。

2.2.5 肺组织中 SOD、CAT 活性和 MDA 含量的检测 肺组织用冷生理盐水冲洗干净后,加入适量冷裂解液行研磨匀浆,按照各试剂盒操作方法步骤,通过紫外-可见分光光度计平行测定各组大鼠肺组织中 SOD、CAT 活性和 MDA 含量。

2.2.6 肺组织 NF- κ B 蛋白表达的检测 取 2.2.5 项下制备的肺组织匀浆液,经 12000r/min 低温(4℃)离心 10min 后取上清液,经 BCA 法蛋白定量后,进行变性、上样,经电泳、转膜、春红溶液染色后,室温下 5%脱脂奶粉封闭 2h,一抗(NF- κ B, β -actin)4℃过夜,洗膜,二抗室温摇床上孵育 1h 后经 ECL 显色,实验结果应用 Quantity One 软件进行分析。

2.3 统计学方法 运用 SPSS15.0 进行统计学分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用单因素方差分析,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 表示具有极显著性差异。

3 实验结果

3.1 各组大鼠肺组织 W/D 比较 与假手术组比较,模型组大鼠肺组织 W/D 显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,黄芪甲苷中、高剂量组 W/D 显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果见表 1。

3.2 各组大鼠肺组织形态结构 观察各组大鼠肺组织病理切片发现:假手术组大鼠肺组织结构和细胞形态均未见异常;模型组大鼠肺组织呈现肺泡结构紊乱,上皮细胞变性、坏死,肺泡内有大量的液体渗出,炎症细胞浸润等明显的病理性形态学改变;而与模型组比较,黄芪甲苷中、高剂量组大鼠肺组织病理性形态学变化明显改善,以黄芪甲苷高剂量效果最为显著。结果见图 1。

3.3 各组大鼠肺细胞凋亡状况及 AI 比较 经 TUNEL 染色后通过光学显微镜观察发现:假手术组

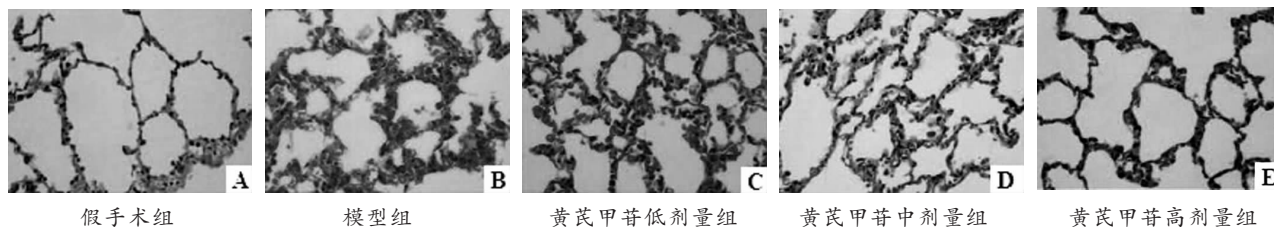


图1 各组大鼠肺组织形态结构(HE,×400)

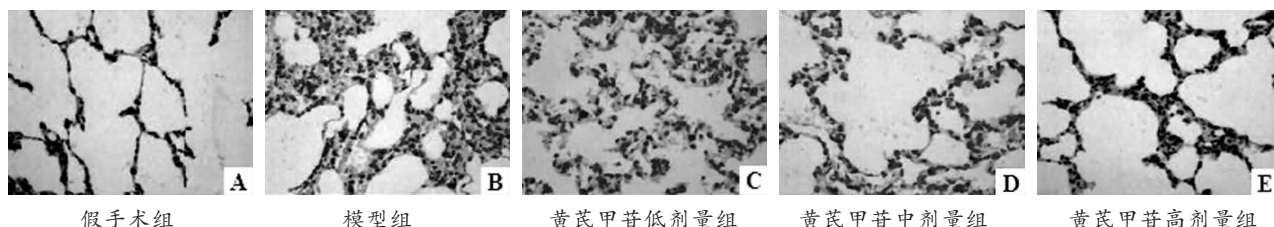


图2 各组大鼠肺组织细胞凋亡状况(TUNEL,×400)

大鼠肺组织可见极少量凋亡细胞;模型组大鼠肺组织细胞凋亡状况较假手术组明显加重;与模型组比较,黄芪甲苷各剂量组大鼠细胞凋亡状况呈不同程度改善,其中以黄芪甲苷高剂量组效果最为显著。见图2。计算AI发现:与假手术组比较,模型组大鼠肺组织细胞AI明显增高($P<0.01$);与模型组比较,黄芪甲苷中、高剂量组大鼠AI显著降低($P<0.01$)。见表1。

表1 各组大鼠肺组织 W/D 和细胞凋亡指数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	W/D	AI(%)
假手术组	5	4.9±0.3	2.2±0.7
模型组	5	6.3±0.5 $\Delta\Delta$	31.0±2.1 $\Delta\Delta$
黄芪甲苷低剂量组	5	6.0±0.6	26.9±2.4
黄芪甲苷中剂量组	5	5.7±0.3*	20.2±1.7**
黄芪甲苷高剂量组	5	5.3±0.5**	13.7±1.4**

注:与假手术组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3.4 各组大鼠肺组织 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA 表达及 Bcl-2/Bax 比值比较 结果见表2。

表2 各组大鼠 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA 表达及 Bcl-2/Bax 比值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	Bcl-2($\times 10^{-3}$)	Bax($\times 10^{-3}$)	bcl-2/Bax
假手术组	10	30.8±6.2	63.1±15.8	0.49±0.21
模型组	10	41.2±7.8 Δ	109.4±23.7 $\Delta\Delta$	0.38±0.15 $\Delta\Delta$
黄芪甲苷低剂量组	10	45.6±7.5	98.6±25.0	0.46±0.19
黄芪甲苷中剂量组	10	55.1±10.3*	85.7±18.1*	0.64±0.22**
黄芪甲苷高剂量组	10	63.0±11.7**	72.4±16.3**	0.87±0.34**

注:与假手术组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3.5 各组大鼠肺组织中 SOD、CAT 活性和 MDA 含量比较 结果见表3。

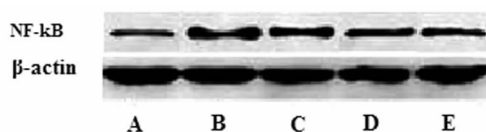
3.6 各组大鼠肺组织 NF- κ B 蛋白表达比较 与假手术组比较,模型组大鼠肺组织中 NF- κ B 蛋白表达

量显著上调($P<0.01$);而与模型组比较,黄芪甲苷中、高剂量组 NF- κ B 蛋白表达量显著下调($P<0.05$, $P<0.01$)。结果见图3和表4。

表3 各组大鼠肺组织中 SOD、CAT 活性和 MDA 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	SOD(U/mg prot)	CAT(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)
假手术组	10	17.4±1.6	2.1±0.5	5.8±0.7
模型组	10	12.0±1.3 $\Delta\Delta$	0.8±0.2 $\Delta\Delta$	11.9±1.2 $\Delta\Delta$
黄芪甲苷低剂量组	10	12.9±1.7	1.1±0.4	10.1±1.6
黄芪甲苷中剂量组	10	13.6±1.5*	1.3±0.5*	8.3±0.9**
黄芪甲苷高剂量组	10	15.1±1.8**	1.7±0.4**	6.4±0.7**

注:与假手术组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图3 各组大鼠肺组织 NF- κ B 蛋白表达(Western blotting)(A.假手术组;B.模型组;C.黄芪甲苷低剂量组;D.黄芪甲苷中剂量组;E.黄芪甲苷高剂量组)表4 各组大鼠肺组织 NF- κ B 表达($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	NF- κ B/ β -actin
假手术组	10	0.14±0.05
模型组	10	0.47±0.13 $\Delta\Delta$
黄芪甲苷低剂量组	10	0.42±0.14
黄芪甲苷中剂量组	10	0.35±0.09*
黄芪甲苷高剂量组	10	0.21±0.06**

注:与假手术组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

4 讨论

肺缺血再灌注损伤病理机制非常复杂,其中肺细胞凋亡在其发生发展过程中发挥着重要作用^[4-5]。细胞凋亡是一种由多种基因参与调控的程序化死

亡过程,其中 bcl-2 为抑凋亡基因,Bax 为促凋亡基因,它们都属于 Bcl-2 基因家族,二者间相互作用,共同调控细胞凋亡过程^[7]。Jayanthi S 等^[8]进一步研究发现,bcl-2 和 Bax 对细胞凋亡的调控更依赖于 bcl-2/Bax 表达比值,bcl-2/Bax 比值越低,往往凋亡状况越严重。

细胞凋亡是一种可由多种因素诱发的继发行爲,而氧化应激损伤是其最重要的诱发因素之一^[9]。正常生理状态下,体内生成的氧自由基在 SOD 和 CAT 的依次催化作用下最终还原生成对人无害的 H₂O 和 O₂^[10-11],因此 SOD、CAT 的活性能够直接反应机体抗氧化能力,而血清中脂质过氧化终产物 MDA 的含量也能够间接反映细胞损伤程度。NF-κB 为多效能核转录因子,被称为连接氧化应激损伤和细胞凋亡的“桥梁”^[12]。生理状态下,NF-κB 以无活性形式存在于胞质中,而当细胞受到 ROS 攻击时,NF-κB 将被活化并暴露出核定位信号而进入胞核内。Zhang Q 等^[13]研究发现,活化 NF-κB 能够促进巨噬细胞活化和浸润,诱导促凋亡信号释放而导致细胞凋亡,证实 NF-κB 激活与氧化应激诱导的心肌细胞凋亡密切相关。

黄芪甲苷具有多种药理学活性。本实验采用夹闭左肺门 45min 后松夹的方法制备的肺缺血再灌注损伤大鼠模型进行研究发现,经黄芪甲苷中、高剂量预处理能够显著降低肺缺血再灌注损伤大鼠 W/D,改善肺组织形态结构和细胞形态病变,抑制肺细胞凋亡,上调抑凋亡基因 Bcl-2 表达,下调促凋亡基因 Bax 表达,提高 Bcl-2/Bax 表达比值,改善抗氧化酶(SOD、CAT)活性并降低 MDA 含量,下调 NF-κB 蛋白表达。提示黄芪甲苷对大鼠肺缺血再灌注后肺细胞凋亡具有抑制作用,表现出对肺缺血再灌注损伤的保护作用,其作用机制可能与其能够调节凋亡相关基因表达,改善机体抗氧化酶活性,抑制肺组织氧化应激损伤并下调 NF-κB 蛋白表达有关。该结果为黄芪甲苷的进一步研发及其对肺缺血再灌注损伤疾病的治疗作用提供了实验理论依据。除细胞凋亡外,氧化应激损伤和炎症反应也是肺缺血再灌注损伤重要的病理机制,接下来我们将进一步研究黄芪甲苷是否能够通过抑制氧化应激损伤和炎症反应起到对肺缺血再灌注损伤的保护作用。

参考文献

- [1] 戴雍月,朱仁武,倪世容,等.环孢素 A 对大鼠肺缺血/再灌注损伤中细胞凋亡的影响 [J]. 中国应用生理学杂志,

2010,26(4):493.

- [2] YANG J,LI J,LU J,et al. Synergistic protective effect of astragaloside IV-tetramethylpyrazine against cerebral ischemic-reperfusion injury induced by transient focal ischemia[J]. J Ethnopharmacol,2012,140(1):64.
- [3] 曲丽君,曲晓峰.大豆异黄酮对大鼠血脂和抗氧化作用的研究[J].中国医药导刊,2013,15(12):2090.
- [4] 李铁成,马宝丰,李德生,等.黄芪甲苷对大鼠肝缺血/再灌注损伤的保护作用 [J]. 天津中医药,2014,31(10):621.
- [5] 马小亮,王桂敏.黄芪甲苷灌胃预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国老年学杂志,2015,35(17):4795.
- [6] XIA Z Y,GAO J,ANCHARAZ A K.Protective effect of ischemic post conditioning on lung ischemia-reperfusion injury in rats and the role of heme oxygenase-1 [J]. Chin J Traum,2009,12(3):162.
- [7] 张彦清,刘保江,田首元.丙泊酚对大鼠离体缺血/再灌注心肌细胞凋亡和 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2011,9(1):55.
- [8] JAYANTHI S,DENG X,BORDELON M,et al.Methamphetamine causes differential regulation of pro-death and anti-death Bcl-2 genes in the mouse neocortex[J]. The FASEB Journal,2001,15(10):1745.
- [9] 陈良金,石孟琼,贺海波,等.珠子参总皂苷对 H₂O₂ 诱导新生大鼠心肌细胞凋亡的抑制作用[J].中国临床药理学与治疗学,2012,17(8):860.
- [10] LARTIGUE A,BURLAT B,COUTARD B,et al.The megavirus chilensis Cu,Zn-superoxide dismutase:the first viral structure of a typical CCS-independent hyperstable dimeric enzyme[J]. J Virol, 2014,2588(14):254.
- [11] JIN Y,LIU K,PENG J,et al.Rhizoma dioscoreae nipponicae polysaccharides protect HUVECs from H₂O₂-induced injury by regulating PPARγ factor and the NADPH oxidase/ROS-NF-κB signal pathway[J].Toxicol Lett,2014,232(1):149.
- [12] 杨帆,王永青,彭余江,等.NF-κB 在颅脑损伤后继发氧化应激及细胞凋亡之间的关系研究[J].浙江创伤外科,2014,19(6):899.
- [13] ZHANG Q,HUANG W D,LV X Y,et al.Ghrelin protects H9c2 cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis through NF-κB and mitochondria-mediated signaling[J]. Eur J Pharmacol,2011,654(2):142.

第一作者:刘建平(1977—),男,本科学历,主管药师,主要从事药学研究工作。hdzxyshp@163.com

收稿日期:2016-03-31

编辑:吴宁