

凋亡相关因子 TNF- α 、Bcl-2 及 Bax 在脓毒症大鼠肺组织的表达

马晓辉 王继东 梁显泉 徐玉荣 孙明霞

【摘要】 目的 观察脓毒症模型大鼠肺组织中凋亡相关因子的表达情况。方法 30只雌性SD大鼠随机分为脓毒症模型组($n=20$)及正常对照组($n=10$)。以经典盲肠结扎穿孔法(CLP)成功制作脓毒症大鼠模型。分别在造模后3h及12h处死大鼠,石蜡切片HE染色光镜观察各时间点肺组织的病理变化;取血清ELISA法检测肿瘤坏死因子(TNF- α)的表达水平;免疫组织化学染色法检测造模12h Bcl-2及Bax蛋白在大鼠肺组织的表达情况,并计算两种蛋白的累积吸光度值。结果 模型组大鼠在造模后3h开始出现脓毒症的相关表现;3h及12h肺组织石蜡切片HE染色可见肺组织炎症反应明显,肺血管充血,肺泡萎陷,炎细胞渗出,并随着观察时间延长有加重趋势。对照组与模型组血清(3h及12h)TNF- α 平均吸光度值分别为 0.2510 ± 0.0038 、 0.7392 ± 0.0526 及 0.4203 ± 0.0256 ;对照组与模型组2个观察时间点的TNF- α 的平均吸光度值差异均有统计学意义($P=0.000$; $P=0.000$),模型组在2个观察时间点的TNF- α 的平均吸光度值差异有统计学意义($P=0.000$)。免疫组化结果可见Bcl-2蛋白及Bax蛋白在对照组及模型组12h均有表达,但Bcl-2表达在对照组高于模型组($P=0.002$),而Bax表达在对照组低于模型组($P=0.012$)。结论 细胞凋亡可能在脓毒症肺组织损伤中发挥重要作用。

【关键词】 脓毒症; 大鼠; 肿瘤坏死因子 α ; 基因,bcl-2; bcl-2相关X蛋白质

The expression of apoptosis related factors in the lung tissues of septic rats MA Xiao-hui, WANG Ji-dong, LIANG Xian-quan, XU Yu-rong, SUN Ming-xia. Department of Respiratory, Shandong Province Chest Hospital, Jinan 250001, China

Corresponding author: LIANG Xian-quan, Email: liangxianquan9699@163.com

【Abstract】 Objective To observe the expression of apoptosis related factors TNF- α , Bcl-2 and Bax in the lung tissues of septic rats. **Methods** 30 SPF female SD rats were randomly assigned to septic model group ($n=20$) and control group ($n=10$). The septic model rats were produced by the method of classical cecal ligation and puncture (CLP). The model group rats were sacrificed after 3 hours ($n=10$) and 12 hours ($n=10$) of surgery. Lung tissue sections of the two groups were stained by HE method and observed in the light microscopy, serum TNF- α level was tested by ELISA and the expressions of Bcl-2 and Bax proteins in lung tissues were detected by immunohistochemical technique. **Results** The model rats had begun appeared the septic symptoms 3 hours after surgery, which sections of lung tissues at 3 hours and 12 hours showed obviously inflammatory responses and a deterioration trend along with the time. The mean optical density (OD) of TNF- α at control group and model group (3 hours and 12 hours) were differently: 0.2510 ± 0.0038 , 0.7392 ± 0.0526 and 0.4203 ± 0.0256 ; there were significant differences between the control group and the model group (3 hours and 12 hours). The immunohistochemical results for the Bcl-2 and Bax protein showed the two proteins expressed in two groups, and the expression of Bcl-2 was higher in control group than that in model group ($P=0.002$), but the expression of Bax was lower in control group than that in model group ($P=0.012$). **Conclusions** Apoptosis could play a key role in lung tissues injury at sepsis.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.19.026

作者单位: 250013 济南,山东省胸科医院呼吸内科(马晓辉、徐玉荣),结核科(孙明霞);重庆医科大学临床学院妇产科(王继东);贵阳医学院附属医院急诊内科(梁显泉)

通讯作者: 梁显泉, Email: liangxianquan9699@163.com

[Key words] Sepsis; Rats; Tumor necrosis factor- α ; Genes, bcl-2; Bcl-2-associated X protein

脓毒症是临床上常见的急危重症并发症,是主要致死性疾病之一。脓毒症时机体产生各种细胞因子和内生性介质引起全身炎症反应综合征(severe inflammatory reaction syndrome, SIRS),造成组织、细胞的坏死和功能障碍,甚至会出现多器官功能障碍综合征(multiple organs dysfunction syndrome, MODS)。严重脓毒症与心血管、肺及肾功能不全密切相关^[1-2]。而其中的肺损伤往往是脓毒症最早的临床表现。有研究表明细胞凋亡在脓毒症组织损伤的机制中可能发挥重要作用,但具体作用机制不清。本实验通过脓毒症大鼠模型制作,初步探讨凋亡相关因子在脓毒症大鼠肺组织内的表达情况及凋亡在脓毒症发病中的可能作用。

材料与方 法

1. 实验动物、药物材料及主要试剂:SPF级雌性SD大鼠30只,体重(200±20)g,由重庆医科大学动物实验中心提供[实验动物生产许可证号:SCXK(渝)2007-0001]。TNF- α 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒及免疫组化(Bcl-2、Bax)试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。

2. 大鼠脓毒症模型的制作^[3]:雌性SD大鼠实验前禁食12h、自由饮水,10%水合氯醛(100 mg/kg)腹腔注射麻醉,称体重后固定,沿中下腹正中中线切口2 cm,暴露腹腔脏器,探查并将盲肠提出,7号丝线距盲肠根部1.5 cm、血管弓内结扎盲肠,避免肠梗阻和肠坏死。用18号无菌针头贯穿盲肠3次,使肠内容物流出,避免伤及肠壁系膜血管;然后将盲肠放回腹腔,逐层缝合腹壁切口。术毕动物皮下注射生理盐水(40 ml/kg)体液支持。详细操作步骤见参考文献^[3]。

3. 实验分组:30只雌性SD大鼠随机分为对照组(正常大鼠)和模型组;其中对照组10只,模型组20只。模型组大鼠按照上述的脓毒症模型造模方法处理。

4. 标本采集及处理:模型组大鼠分别于造模后3 h及12 h各取10只,以10%水合氯醛(100 mg/kg)腹腔注射麻醉致死,心脏取血约5 ml装入已标记好的相应抗凝管内,室温放置2 h,离心(1000 g)10 min,收集血清,1.5 ml的EP管分装后-20℃冷冻保存待用。开胸剪取大鼠部分肺组织做好标记置入4%多聚甲醛液中固定待用。于模型组大鼠造模3 h取材时,同时处死10只对照组大鼠,处理方法同上。

5. 检测指标及方法:ELISA检测血清TNF- α 浓度,操作方法严格按照试剂盒所附说明书的操作步骤执行。常规制作肺组织石蜡切片。HE染色光镜观察,随机选取5个视野拍照保存;免疫组织化学法(SABC法)检测对照组及模型组12 h肺组织的Bcl-2、Bax蛋白表达,光镜观察每个标本切片随机选取5个视野拍照保存。免疫组织化学操作方法严格按照试剂盒所附说明书的操作步骤执行。Image-Pro Plus (IPP) 6.0图片分析软件检测两组免疫组织化学图片累积光密度值(IOD)。

6. 统计学分析:采用SPSS 16.0对数据进行统计分析,所有数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。完全随机设计资料的两个样本均数的比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般情况观察:模型组大鼠约于术后2 h麻醉作用消失,并于术后3 h开始出现竖毛反应、身体蜷缩、寒战、呼吸急促、口唇发绀及反应迟钝等症状。

2. HE染色光镜观察结果(图1):脓毒症模型组大鼠在造模后3 h(图1B)肺组织炎症反应明显,肺泡壁水肿,肺泡腔萎陷;可见肺血管充血,大量炎细胞渗出。造模后12 h(图1C)的肺组织也可见上述的炎症反应,并且有加重趋势。

3. ELISA检测大鼠血清TNF- α 结果:对照组血清TNF- α 平均吸光度值(MOD)结果为 0.2510 ± 0.0038 ;模型组大鼠血清TNF- α 3 h MOD结果为 0.7392 ± 0.0526 ;12 h结果为 0.4203 ± 0.0256 ;对照组与模型组2个观察时间点的TNF- α 的MOD差异均有统计学意义($P = 0.000$; $P = 0.000$),模型组在2个观察时间点的TNF- α 的MOD差异有统计学意义($P = 0.000$)。如图2A。

4. 大鼠肺组织Bcl-2及Bax蛋白免疫组化检测结果:Bcl-2及Bax蛋白主要表达于各级支气管的上皮细胞胞质内。造模后12 h,Bcl-2蛋白在对照组(图3A)与模型组(图3B,3C)肺组织均有表达,但模型组表

达量低于正常对照组;而对于 Bax 蛋白,模型组(图 3E,3F)表达高于对照组(图 3D)。IPP 半定量分析结果: Bcl-2 平均 IOD 分别为:对照组 0.2750 ± 0.0295 ,模型组 0.1889 ± 0.0328 ;二者间差异有统计学意义($P = 0.002$);Bax 平均 IOD 分别为:对照组 0.2691 ± 0.0345 ,模型组 0.3416 ± 0.0370 ;二者间差异有统计学意义($P = 0.012$)。统计结果如图 2B。

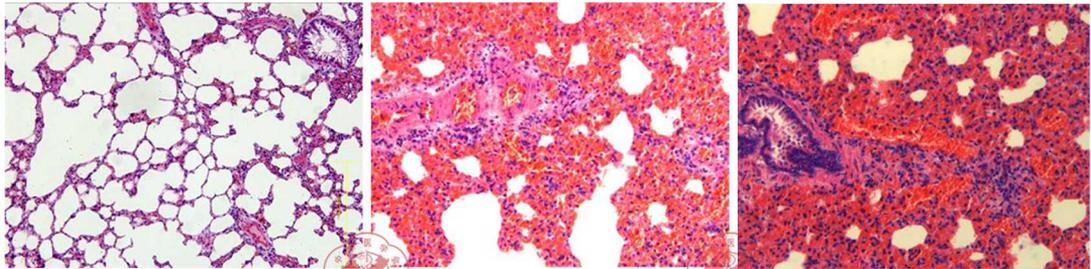


图1 HE染色结果($\times 200$)。1A: 正常大鼠肺组织;1B: 模型大鼠3 h肺组织切片;1C: 模型大鼠12 h肺组织切片

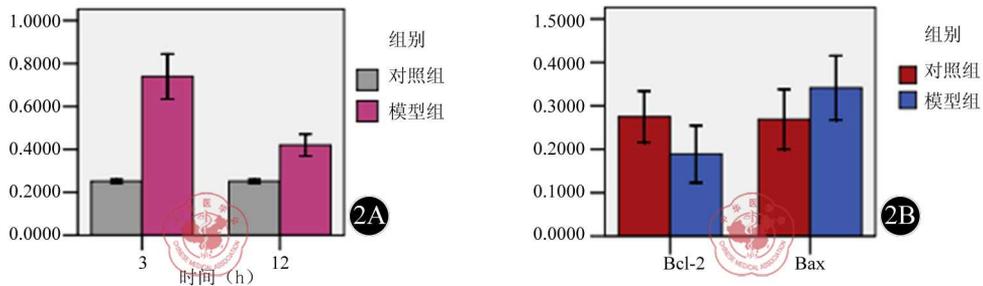


图2 2A: TNF- α 检测结果统计图; 2B: 大鼠肺组织Bcl-2及Bax蛋白表达情况统计结果

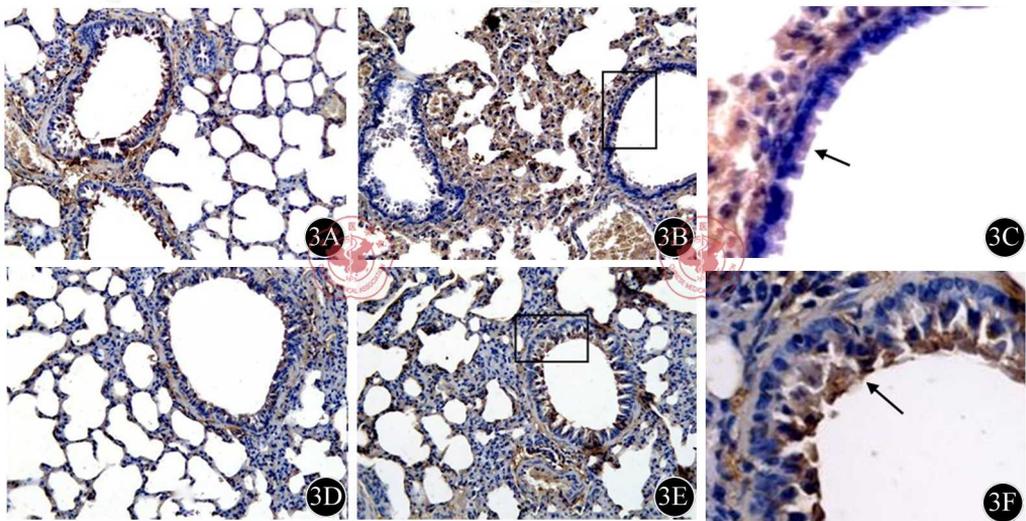


图3 免疫组化结果。3A: 正常(对照)大鼠肺组织Bcl-2表达情况($\times 200$); 3B, 3C: 模型大鼠12 h肺组织Bcl-2表达情况(B $\times 200$, C $\times 400$); 3D: 正常大鼠肺组织Bax表达情况($\times 200$); 3E, 3F: 模型大鼠12 h肺组织Bax表达情况(E $\times 200$, F $\times 400$)

讨 论

脓毒症的病理过程,主要包括组织损伤和器官功能不全(organ dysfunction)。这可能不仅是由组织器官灌注不充分的原因引起,还包括炎症和免疫反应的作用。大量细胞因子和非细胞因子的释放,引起组织损伤、多器官功能不全及细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)或凋亡^[4]。目前对脓毒症研究的一个

重要进展就是肯定了重要器官的PCD及免疫系统在其中发挥着关键作用^[5]。PCD主要包括细胞自体吞噬(autophagy)和凋亡两种类型。虽然有研究认为自体吞噬在脓毒症中独立于凋亡发挥作用^[6],但后者仍然是细胞程序性死亡的主要执行者。

我们在实验中发现,脓毒症大鼠血清的TNF- α 水平明显高于正常对照组,说明脓毒症时凋亡作用可能是增强的;但模型组3h的TNF- α 血清值最高,在12h反而有所下降,而并不是随着脓毒症发病时间的延长而增加。细胞凋亡分为胞内途径与胞外途径,TNF- α 是胞外途径的主要启动因子之一,通过刺激白细胞及血管内皮细胞释放其他细胞因子促进感染部位的中性粒细胞-内皮细胞黏附,进而激活半胱天冬酶(caspase)系统形成免疫炎症瀑布样连锁反应,介导内毒素相关的细胞凋亡过程^[7]。因此,我们推测在脓毒症的早期,细胞凋亡可能发挥着主要作用,而随着病情发展对组织损伤的进一步加重,可能逐渐表现为其他的如细胞坏死等作用为主要病理改变。这提示我们在脓毒症早期给予抑制凋亡的治疗可能是临床治疗脓毒症新的突破口。

我们在实验中观察到,模型组大鼠在造模后3h出现竖毛反应、寒战及发绀等一系列症状;结合相关文献^[3],即认为这些症状为脓毒症发生的表现。随着观察时间的延长,上述症状有加重趋势。

我们的研究也发现,凋亡相关蛋白Bcl-2/Bax的表达,脓毒症模型组与正常对照组间差异均有统计学意义。但二者的变化趋势却是不同的:抗凋亡蛋白Bcl-2的表达在对照组高于模型组,而促凋亡蛋白Bax的表达在对照组却低于模型组。Bcl-2及Bax蛋白均属于Bcl-2蛋白超家族,通过胞内途径调节细胞凋亡,是细胞凋亡的重要调节因子^[8-9]。二者间的平衡决定凋亡是否发生。Bcl-2蛋白表达于细胞内线粒体,能够阻止促凋亡蛋白(pro-apoptotic proteins),例如Bax的募集与活化^[10];其抗凋亡除了通过经典的调节线粒体外膜透化作用外,目前还认为与调节细胞氧化还原反应尤其是线粒体的代谢有关。实验结果提示在模型组大鼠观察时间段内,抗凋亡作用占主导地位。

综上所述,细胞凋亡在脓毒症的发病中可能发挥着重要的作用,但具体作用机制仍有待进一步探讨。如果能够在脓毒症的早期从细胞凋亡的角度给予一定的干预,很可能会影响脓毒症的病理过程及预后,这对临床脓毒症的治疗具有很好的指导意义。

参 考 文 献

- [1] Dare AJ, Phillips AR, Hickey AJ, et al. A systematic review of experimental treatments for mitochondrial dysfunction in sepsis and multiple organ dysfunction syndromes. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47:1517-1525.
- [2] 何志捷, 邹子俊. 脓毒症大鼠肺血管内皮细胞、细胞间粘附分子1和E2选择素的变化及其意义. *中国免疫学杂志*, 2009, 25:1029-1032.
- [3] Zanotti-Cavazzoni SL, Goldfarb RD. Animal models of sepsis. *Crit Care Clin*, 2009, 25:703-719.
- [4] Hamsa TP, Thejass P, Kuttan G. Induction of apoptosis by sulforaphane in highly metastatic B16F-10 melanoma cells. *Drug Chem Toxicol*, 2011, 34:332-340.
- [5] Hsieh YC, Athar M, Chaudry IH. When apoptosis meets autophagy: deciding cell fate after trauma and sepsis. *Trends Mol Med*, 2009, 15:129-138.
- [6] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 2008, 132:27-42.
- [7] Kouroumichakis I, Papanas N, Proikaki S, et al. Statins in prevention and treatment of severe sepsis and septic shock. *Eur J Intern Med*, 2011, 22:125-133.
- [8] Dewson G, Kluck RM. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J Cell Sci*, 2009, 122:2801-2808.
- [9] Low IC, Kang J, Pervaiz S. Bcl-2: a prime regulator of mitochondrial redox metabolism in cancer cells. *Antioxid Redox Signal*, 2011.
- [10] Postolow F, Fediuk J, Nolette N, et al. Hypoxia and nitric oxide exposure promote apoptotic signaling in contractile pulmonary arterial smooth muscle but not in pulmonary epithelium. *Pediatr Pulmonol*, 2011.

(收稿日期:2011-06-17)

(本文编辑:戚红丹)