

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.13.002

含 HOE642 的新型器官保存液对离体兔肺移植供肺细胞凋亡的影响*

余得水^{1,2}, 龚添庆², 周文琴², 郑剑桥², 刘斌^{2△}
(1. 四川省宜宾市第二人民医院麻醉科 644000; 2. 四川大学华西医院麻醉科, 成都 610068)

[摘要] **目的** 探索含 I 型钠氢通道拮抗剂 HOE642 的新型器官保存液对离体兔肺移植供肺细胞凋亡的影响。**方法** 24 只雄性成年新西兰大白兔分 2 组[低钾葡聚糖(LPD)组和 HOE 组], 分别用 LPD 液及新型器官保存液灌洗供肺, 建立兔改良离体单肺移植模型并再灌注 2 h。测定供肺细胞凋亡指数、caspase-3、Fas/Fas-L 及 Bax/Bcl-2 表达水平。**结果** 与 LPD 组比较, HOE 组供肺细胞凋亡指数和 caspase-3 的阳性细胞计数明显下降($P<0.05$), Fas、Fas-L、Bax 表达水平明显降低, Bcl-2 表达升高($P<0.05$)。**结论** 含 HOE642 的新型器官保存液可通过抑制细胞内外源性凋亡途径抑制细胞凋亡。

[关键词] 器官保存液; 肺移植; 细胞凋亡; HOE642

[中图分类号] R655.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)13-1709-03

Effect of a new organ preservation solution with HOE642 on the apoptosis of the donor lung from a modified lung transplantation model of rabbits*
YU Deshui^{1,2}, GONG Tianqing², ZHOU Wenqin², ZHENG Jianqiao², LIU Bin^{2△}
(1. Department of Anesthesiology, the Second People's Hospital of Yibin, Yibin, Sichuan 644000, China; 2. Department of Anesthesiology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610068, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of a new organ preservation solution with HOE642 on the apoptosis of the donor lung from a modified lung transplantation model of rabbits. **Methods** 24 male rabbits were divided into two groups [low potassium dextran (LPD) group and HOE group], established rabbit models for next 2-h reperfusion using LPD solution or new organ preservation solution. Detected the levles of apoptosis index and caspase-3, the expression of Fas/Fas-L and Bcl-2/Bax. **Results** Compared with LPD group, HOE group revealed significant lower level of apoptosis index and caspase-3 ($P<0.05$), lower expression of Fas/Fas-L and Bax, and higher expression of Bcl-2 ($P<0.05$). **Conclusion** The potential donor lung protective mechanism offered by the new organ preservation solution with HOE642 might be the inhibition of apoptosis via both intrinsic and extrinsic pathways.

[Key words] organ preservation solutions; lung transplantation; apoptosis; HOE642

如何减轻缺血再灌注肺损伤是目前肺移植研究中迫切需要解决的临床问题^[1]。以低钾葡聚糖(low potassium dextran, LPD)液为代表的细胞外液型供肺保存液在肺移植后早期肺功能保护方面已表现出极大优势^[2]。在现有 LPD 液基础上, 有针对性地加入某些具有保护作用的活性物质, 以提高供肺保存效果是目前肺保护研究热点^[3]。本课题组前期研究证实 1 型钠氢通道(Na⁺-H⁺ Exchangers 1, NHE1)特异性抑制剂 HOE642 能够减轻兔离体心肌的缺血再灌注损伤^[4]。因此, 本实验拟比较含 HOE642 的新型器官保存液与 LPD 液对肺移植供肺细胞凋亡的影响, 以深入探讨新型器官保存液减轻供肺缺血再灌注损伤的具体机制, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性新西兰大白兔 24 只, 体质量 2.0~2.5 kg, 购自四川大学实验动物中心[SCXK(川)2009-09]。

1.1.2 试剂与仪器 HOE642 由德国 Aventis Pham 公司惠赠; 原位末端凋亡(TUNEL)检测试剂盒(Roche 公司, 美国); 单克隆 Fas/Fas-L 一抗, 兔多克隆 Bcl-2/Bax 一抗, 二氨基联苯胺(DAB)显色剂(Sigma 公司, 美国); 单克隆抗体 β -actin(Santa Cruz 公司, 美国); 多功能真彩色细胞图像分析管理系统(Image-Pro Plus, Media Cybernetics, 美国)。

1.2 方法

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30972862)。 作者简介: 余得水(1983—), 主治医师, 博士, 主要从事围术期脏器功能保护研究。
△ 通信作者, E-mail: benbinliu@sina.com。

1.2.1 新型器官保存液的制备 将固体粉末型 NHE1 特异性抑制剂 HOE642 溶于含有已配制好的 LPD 液的容量瓶中,调整 HOE642 的浓度为 $50\ \mu\text{mol/L}$,玻璃棒充分搅拌 30 min,使固体溶剂充分溶解。用氢氧化钠(NaOH)调整 pH 值至 $7.2\sim 7.6$,并用 $50\ \mu\text{m}$ 微孔过滤器滤去不溶残渣,便得到无菌的新型器官保存灌洗液,密封后放于 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱内保存备用。

1.2.2 动物分组 24 只成年雄性新西兰大白兔分 2 组,LPD 液组(LP D 组)和新型器官保存液组(HOE 组),每组 12 只,每次实验需要 2 只,分别作为肺移植的供体兔和受体兔。LPD 组和 HOE 组供体兔心跳停止后,取出心肺联合体,结扎右侧肺门,分别用常规的 LPD 液和含有 HOE642 的新型器官灌洗保存液对左肺进行顺行灌洗。

1.2.3 动物模型制备及处理 受体兔麻醉开胸,全身肝素化,右侧颈内静脉置入 5Fr 中心静脉导管至右心房,左侧颈总动脉置入 5Fr 中心静脉导管至主动脉弓。游离心肺组织后结扎左侧肺门,分别将右颈内静脉导管和左颈总动脉导管与已用胶体液预充的体外循环机相连。取出供肺,将其妥善固定于灌注装置内,于再灌注开始前通过呼吸机进行机械通气,吸入 40% 氧气,潮气量为 $8\ \text{mL/kg}$,呼吸频率 40 次/分。在体外循环泵的作用下从受体兔右颈内静脉引流出的静脉血以 $40\ \text{mL/min}$ 的速度经供体的肺动脉导管进入供体左肺进行氧合。氧合后的血液通过肺静脉经心尖部的引流管流出,在体外循环泵的推动下进入受体兔左颈总动脉导管,泵入受体兔体内,这样形成了一个离体肺移植模型。在整个再灌注过程中,通过调节左颈内静脉的引流速度,使受体兔动脉血压维持于 $80\sim 100/50\sim 70\ \text{mm Hg}$,以稳定受体兔的整个血容量。通过恒温水浴系统,将体外循环管路内血液温度维持在 $37\ ^\circ\text{C}$ 左右。待体外循环(再灌注)建立成功且循环稳定再灌注 2 h 后,用 $5\ \text{mL}\ 10\%$ 氯化钾(KCl)将受体兔处死,并留取供体肺组织标本。

1.2.4 供体肺细胞凋亡指数(apoptosis index, AI)检测 剪取供肺中下叶背侧面约 $0.5\ \text{cm}^3$ 的肺组织,迅速将其放入 10% 甲醛液中固定 24 h 后进行病理切片制作。石蜡标本的制作:无水乙醇对本标本进行梯度脱水处理后,二甲苯、二甲苯-石蜡及石蜡依次浸泡标本。将标本置入熔融的石蜡中浸透,包埋。对包埋好的石蜡标本进行切片,厚度为 $5\ \mu\text{m}$ 。乙醇对本标本进行梯度水化,用蛋白酶 K 室温孵育 $15\sim 30\ \text{min}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 15 min,磷酸盐缓冲溶液(PBS)冲洗 2 次。标本滴加 $50\ \mu\text{L}$ 的 TUNEL 反应混合溶液,在湿盒中 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 60 min, PBS 冲洗 3 次,荧光镜下分析结果。TUNEL 染色后的阳性细胞表现为细胞核呈黄棕色着染,而部分也可因 DNA 碎片逸出细胞核而呈现较浅的阳性着色。每张切片在 400 倍光镜下随机选择 10 个视野进行观察和计数,将整个视野中的阳性细胞(凋亡细胞)

占总的细胞数的百分比作为凋亡指数(AI), $\text{AI} = \text{凋亡细胞数} / \text{总细胞数} \times 100\%$ 。

1.2.5 肺组织中凋亡蛋白含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(caspase-3)的测定 取肺组织块,用 4% 多聚甲醛进行固定,乙醇梯度脱水后石蜡包埋、切片;将厚度 $3\sim 5\ \mu\text{m}$ 的组织切片附于经多聚赖氨酸附膜的载玻片上,脱蜡、入水冲洗。切片上滴加正常山羊血清封闭液,室温孵育 20 min。切片上滴加一抗, $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜,切片上滴加生物素化二抗(IgG), $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 20 min,切片上滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液。使用 DAB 显色试剂盒 $1\ \text{mL}$ 蒸馏水加显色剂 A、B、C 各 1 滴,混匀,加至标本上,显色 6 min,充分水洗后脱水、中性树脂封片。显微镜观察:两组进行 100 倍和 400 倍的显微照相。染色后的阳性细胞表现为细胞质和细胞核呈黄褐色着染。每张切片在 400 倍光镜下随机选择 5 个视野进行观察,对整个视野中的阳性细胞进行计数。

1.2.6 肺组织中 Fas/FasL 和 Bcl-2/Bax 蛋白水平的检测 剪取供肺中下叶背侧面约 $0.5\ \text{cm}^3$ 的肺组织,清理干净表面血迹及附着物,用电子天平称量后按质量体积比加生理盐水制备成 10% 的组织匀浆。将该组织匀浆进行离心,离心速度 $3\ 000\ \text{r/min}$, 10 min。离心后取组织匀浆上清液再用生理盐水按 $1:9$ 稀释成 1% 组织匀浆待测。由 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱取出提取的总蛋白标本,冰中融化;制备分离胶,浓缩胶,上样,电泳。凝胶电泳结束后,将凝胶上分离到的蛋白条带通过转移电泳方式转印至固相支持物上,然后分别用非标记一抗及辣根过氧化物酶标记的二抗对其进行孵育、检测,用 Image J 软件分析灰度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 供体肺细胞 AI 及凋亡蛋白 caspase-3 的表达 HOE 组只有少量细胞的细胞核出现了黄棕色着染,而 LPD 组供肺组织中细胞核呈现黄棕色的细胞数量明显增加,并且 LPD 组中呈 TUNEL 阳性反应的细胞主要是 II 型肺泡上皮细胞和血管内皮细胞,见图 1。HOE 组的 AI 明显小于 LPD 组($P < 0.05$)。HOE 组中 caspase-3 阳性细胞数明显低于 LPD 组($P < 0.05$),见图 2、表 1。

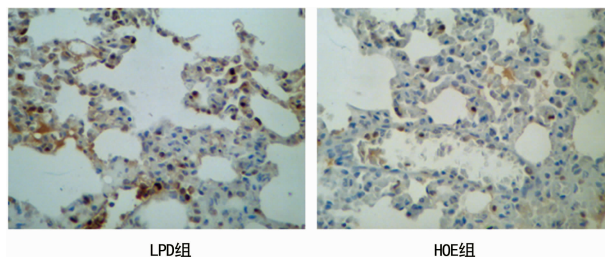


图 1 TUNEL 染色后两组细胞凋亡检测结果($\times 400$)

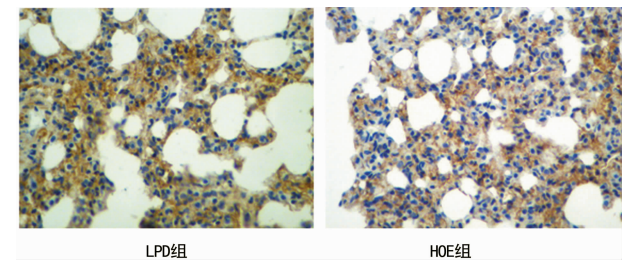


图 2 两组 caspase-3 表达检测结果(×400)

表 1 两组 AI 及 caspase-3 阳性细胞数比较(̄x±s,n=6)

组别	AI(%)	caspase-3 阳性细胞数(个)
LPD 组	13.06±0.71	31.75±8.33
HOE 组	4.57±0.93 ^a	16.83±7.98 ^a

^a:P<0.05,与 LPD 组比较

2.2 肺组织中 Fas/FasL 和 Bcl-2/Bax 蛋白水平的表达变化 与 LPD 组比较,HOE 组 Fas 和 FasL 的表达均明显降低(P<0.05);HOE 组 Bcl-2 蛋白表达增加而 Bax 蛋白的表达降低,两者的比值(Bcl-2/Bax)较 LPD 组明显升高(P<0.05),见图 3、表 2。

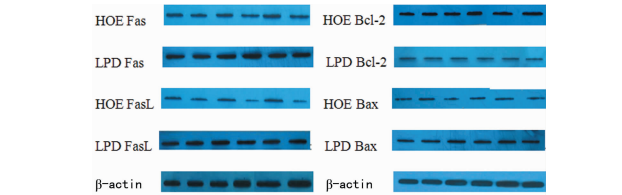


图 3 两组 Fas/Fas-L、Bcl-2/Bax 蛋白表达检测

表 2 两组 Fas/Fas-L、Bcl-2/Bax 蛋白相对表达水平比较(̄x±s,n=6)

组别	Fas	Fas-L	Bax	Bcl-2
LPD 组	1.45±0.21	1.27±0.33	1.32±0.33	0.76±0.21
HOE 组	1.14±0.28 ^a	0.88±0.26 ^a	0.96±0.26 ^a	1.33±0.23 ^a

^a:P<0.05,与 LPD 组比较

3 讨 论

目前衡量肺移植后肺缺血再灌注损伤程度的指标主要是肺功能的本身和肺的组织病理学改变,而对肺组织细胞凋亡的研究相对较少^[5]。研究表明缺血再灌注损伤所引发的凋亡细胞与供肺的分流指数及细胞的氧化损伤程度呈正相关^[6]。特别是在再灌注的早期,细胞凋亡与动脉血氧分压、肺组织病理学改变及肺组织的含水量变化趋势一致^[7]。

本研究显示,HOE 组供肺离体灌注 2 h 后其 AI 明显低于 LPD 组,凋亡蛋白 caspase-3 的表达也显著降低。再灌注带来的大量细胞凋亡使得存活的、有功能的肺泡上皮细胞的细胞总数下降。这导致呼吸膜的结构完整性受到破坏,肺表面活性物质的分泌减少,最终发生肺不张及肺水肿影响肺的换气功能^[8]。因此,细胞凋亡直接参与了肺移植过程中的缺血再灌注肺损伤,是移植后肺功能损伤程度的一个重要指标。

本研究发现外源性凋亡途径的特征性蛋白 Fas 和 Fas-L 在 HOE 组肺组织中仅有少量表达,而在 LPD 组中表达明显上调。肺的缺血再灌注损伤可使得肺组织及肺动脉上皮细胞 Fas/Fas-L 的表达增加,而通过给予 Fas-L 抗体的方式消耗 Fas 则可以明显的减轻细胞凋亡^[9]。另一方面,HOE 组供肺组织的 Bcl-2 蛋白的表达明显高于 LPD 组,同时 Bax 蛋白的表达又明显低于 LPD 组。多个研究证实 Bcl-2 在供体移植物中的过度表达具有抗凋亡的细胞保护作用。而促凋亡基因 Bax 则是通过对抗 Bcl-2 蛋白的抗凋亡作用发挥效应的。Bcl-2 与 Bax 的比值越高,说明细胞中抗凋亡因子作用较强;反之,则说明细胞中正在或是即将发生凋亡^[10]。本研究显示 HOE 组供肺细胞仍然处于相对抗凋亡状态,而 LPD 组供肺细胞内源性凋亡途径正处于活跃状态,正在执行细胞凋亡的指令,诱发细胞凋亡。

NHE1 广泛分布于肺泡细胞,特别是Ⅱ型肺泡上皮细胞表面。在缺血缺氧细胞内氢离子水平增加出现酸中毒时,NHE1 通道被激活,通过 H⁺-Na⁺-Ca²⁺等电位交换的方式使得大量的细胞外 Ca²⁺ 进入细胞内形成了钙超载,而细胞内 Ca²⁺ 浓度升高可能是调控凋亡起始的主动因素之一^[11]。本研究的前期研究结果显示,与 LPD 液相比,该新型器官保存液能大幅降低细胞内钙离子浓度^[12]。因此,HOE642 通过特异性抑制 NHE1,使得细胞内 Ca²⁺ 水平升高没有超过线粒体的缓冲能力,无法大规模激活细胞内、外源性凋亡通路,导致细胞凋亡较少。

本研究选择再灌注 2 h 作为时间点检测细胞凋亡情况是因为在犬、大鼠及人类的同种单肺移植过程中,再灌注 2 h 后供肺细胞的 AI 达到一个顶峰。其机制可能是因为凋亡是程序性的细胞死亡,并且是一个主动的耗能过程,在短时间的冷冻保存过程中,细胞缺乏能量转换而无法执行凋亡指令,再灌注开始后能量供给正常细胞随即开始凋亡进程;如果冷保存时间过长,细胞在长时间的冷缺血过程中已经开始死亡,即使再灌注后细胞也只能发生坏死而不是凋亡^[13]。

综上所述,本研究证实含 HOE642 的新型器官保存液能通过抑制细胞内、外源性凋亡通路相关蛋白的表达,从而最终减少细胞凋亡,减轻供肺的缺血再灌注损伤。

参考文献

[1] HERTZ M I. The registry of the international society for heart and lung transplantation—introduction to the 2012 annual reports: new leadership, same vision[J]. J Heart Lung Transplant, 2012, 31(10):1045-1051.

[2] GOHRBANDT B, SIMON A R, WARNECKE G, et al. Lung preservation with Perfadex or Celsior(下转第 1715 页)

- 巢颗粒细胞的影响[J]. 环境与健康杂志, 2014, 31(2): 124-127.
 - [6] 贾木天, 宋昕宸, 张怡明, 等. 尾悬吊模拟失重对雌性大鼠生殖功能的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(4): 769-774.
 - [7] 中华人民共和国卫生部. WS-T 氟斑牙诊断标准[S]. 北京: 国家标准出版社, 2011.
 - [8] WANG C, GAO Y H, WANG W, et al. A national cross-sectional study on effects of fluoride-safe water supply on the prevalence of fluorosis in China[J]. BMJ Open, 2012, 2(5): e001564.
 - [9] QIN X H, WANG S Y, YU M J, et al. Child skeletal fluorosis from indoor burning of coal in southwestern china [J]. J Environ Public Health, 2009, 19: 969764.
 - [10] 陈海燕, 王心如, 徐莉春, 等. 低浓度混苯对女工生殖激素分泌的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2001, 35(2): 83-86.
 - [11] LEE Y H, BAE Y S. Phospholipase D2 downregulation induces cellular senescence through a reactive Oxygen species-p53-p21(Cip1/WAF1) pathway[J]. FEBS Lett, 2014, 588(17): 3251-3258.
 - [12] HAWLEY S, BOUDEAU J, REID J L, et al. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade[J]. J Biol, 2003, 2(4): 28.
 - [13] JONES R G, PLAS D R, KUBEK S, et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint[J]. Mol Cell, 2005, 18(3): 283-293.
 - [14] 蔺昕燕, 贾玉红, 郭连英, 等. p53-p21 通路在动脉血管平滑肌细胞衰老中的作用研究[J]. 大连医科大学学报, 2015, 37(4): 339-344.
 - [15] 李艳菊, 丁元廷, 周媛, 等. 同种异体来源骨髓间充质干细胞移植可改善衰老心脏的功能[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(6): 814-819.
 - [16] WANG G H, LIU Y, WU X B, et al. Neuroprotective effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells combined with nimodipine against radiation induced brain injury through inhibition of apoptosis [J]. Cytotherapy, 2016, 18(1): 53-64.
 - [17] LIU T, ZHANG L A, WANG S W, et al. Tripterygium glycosides induce premature ovarian failure in rats by promoting p53 phosphorylation and activating the serine/threonine kinase 11-p53-p21 signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2015, 10(1): 12-18.
-
- (收稿日期: 2017-10-14 修回日期: 2017-12-25)
-
- (上接第 1711 页)
- in clinical transplantation; a retrospective single-center analysis of outcomes [J]. Transplantation, 2015, 99(9): 1933-1939.
- [3] SUGIMOTO R, TANAKA Y, NODA K, et al. Preservation solution supplemented with biliverdin prevents lung cold ischaemia/reperfusion injury[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2012, 42(6): 1035-1041.
- [4] ZHOU R H, LONG C, LIU J, et al. Inhibition of the Na^+/H^+ exchanger protects the immature rabbit myocardium from ischemia and reperfusion injury[J]. Pediatr Cardiol, 2008, 29(1): 113-120.
- [5] ZHANG X Y, CHEN C, ZHANG Y B, et al. Role of Toll-like receptor 3 in lung ischemia-reperfusion injury [J]. Shock, 2016, 46(4): 405-411.
- [6] OMASA M, FUKUSE T, TOYOKUNI S, et al. Glycine ameliorates lung reperfusion injury after cold preservation in an ex vivo rat lung model[J]. Transplantation, 2003, 75(5): 591-598.
- [7] 张骞, 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[J], 2004, 19(84): 1597-1600.
- [8] OHSUMI A, MARSEU K, SLINGER P, et al. Sevoflurane attenuates ischemia-reperfusion injury in a rat lung transplantation model [J]. Ann Thorac Surg, 2017, 103(5): 1578-1586.
- [9] DEL SORBO L, COSTAMAGNA A, MURACA G, et al. Intratracheal administration of small interfering RNA targeting Fas reduces lung ischemia-reperfusion injury[J]. Crit Care Med, 2016, 44(8): e604-e613.
- [10] ZHANG W, LI Y, GE Z. Cardioprotective effect of crocetin by attenuating apoptosis in isoproterenol induced myocardial infarction rat model [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 93(93): 376-382.
- [11] WU Y, ZHANG M, LIUY R, et al. Oxidative stress-activated NHE1 is involved in high glucose-induced apoptosis in renal tubular epithelial cells[J]. Yonsei Med J, 2016, 57(5): 1252-1259.
- [12] 刘馨烛, 李美亭, 周荣华, 等. 卡立泊来德预处理减轻离体大鼠肺热缺血再灌注损伤机理的研究[J]. 生物医学工程杂志, 2010, 27(1): 132-137.
- [13] KWON K Y, CHO C H, KIM S P, et al. Apoptosis induced by preservation and reperfusion in canine lung transplantation [J]. Transplant Proc, 2003, 35(1): 134-137.
- (收稿日期: 2017-10-10 修回日期: 2018-01-12)