

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.11.022 [http://www.crter.org]

曹晨, 邓应忠, 郑明安, 刘芳, 孟庆涛. 川芎嗪干预钝性肺挫伤急性期大鼠肺组织细胞的凋亡[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(11):2048-2053.

川芎嗪干预钝性肺挫伤急性期大鼠肺组织细胞的凋亡*

曹晨¹, 邓应忠¹, 郑明安¹, 刘芳¹, 孟庆涛²

1 武汉市第三医院光谷关山院区, 湖北省武汉市 430074

2 武汉大学人民医院麻醉科, 湖北省武汉市 430060

文章亮点:

实验结果证实, 川芎嗪可以减轻胸部撞击所致肺挫伤的程度和细胞异常凋亡的发生, 其机制可能通过抑制肿瘤坏死因子 α 表达, 继而下调 Caspase-3 的表达并增加 Bcl-2/Bax 的比值, 达到降低胸部撞击所致肺组织急性期的异常凋亡, 最终减轻胸部撞击所致急性期肺挫伤。

关键词:

组织构建; 组织构建基础实验; 川芎嗪; 凋亡; 肺损伤; 胸部撞击伤; 细胞凋亡指数; 肺水肿; 肺组织损伤程度; Caspase-3; Bcl-2/Bax; 肿瘤坏死因子 α ; 国家自然科学基金; 组织构建图片文章

摘要

背景: 急性胸部撞击后所致的肺挫伤(钝性肺挫伤)常引起呼吸功能异常和继发性炎症反应, 并参与全身炎症反应综合征和多器官功能障碍综合征, 其发病原因及致病机制亟待明确。

目的: 观察胸部撞击所致钝性肺挫伤急性期细胞凋亡的变化及其川芎嗪对其的影响。

方法: 健康雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、川芎嗪治疗组, 后两组制备胸部撞击伤模型, 川芎嗪治疗组建模后立即腹腔注射川芎嗪 80 mg/kg 1 次。在创伤发生后 1, 2, 3 h 观察肺组织病理形态学及细胞凋亡的改变、检测肺水肿程度和肺血管通透性改变, 免疫组织化学检测肺组织 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的表达及血液中肿瘤坏死因子 α 水平变化。

结果与结论: 模型组肿瘤坏死因子 α 水平在创伤后 1 h 即显著增加, 创伤后 2 h 及 3 h 间急剧增加($P < 0.05$); 创伤后 2 h 及 3 h 肺组织细胞凋亡指数及肺组织损伤程度显著增高(均 $P < 0.05$); 肺血管通透性及肺水肿程度增加($P < 0.05$); Caspase-3 表达显著增高($P < 0.05$), Bcl-2/Bax 比值显著降低($P < 0.05$)。川芎嗪治疗组在相应时间点相对于模型组肿瘤坏死因子 α 水平显著降低($P < 0.05$), 肺组织内细胞凋亡指数及肺组织损伤程度降低($P < 0.05$), 肺血管通透性及肺水肿程度减轻($P < 0.05$); Caspase-3 表达下降($P < 0.05$), Bcl-2/Bax 比值增加($P < 0.01$)。结果提示, 川芎嗪可通过抑制肿瘤坏死因子 α 表达, 下调 Caspase-3 的表达并提高 Bcl-2/Bax 的比值, 以降低胸部撞击所致肺组织急性期的异常凋亡并减轻胸部撞击所致急性期肺挫伤。

Ligustrazine prevents lung cell apoptosis in the acute stage of pulmonary contusion induced by blunt chest trauma

Cao Chen¹, Deng Ying-zhong¹, Zheng Ming-an¹, Liu Fang¹, Meng Qing-tao²

1 Guanggu Guanshan Branch, Third Hospital of Wuhan City, Wuhan 430074, Hubei Province, China

2 Department of Anesthesia, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Abstract

BACKGROUND: Pulmonary contusion induced by blunt chest trauma can result in respiratory dysfunction and secondary inflammatory reaction, which can take part in the occurrence of systemic inflammatory response syndrome and multiple-organ dysfunction syndrome. However, the reason and mechanism of

曹晨, 女, 1975 年生, 浙江省温岭市人, 汉族, 1999 年武汉大学医学院毕业, 主治医师, 主要从事危重病脏器保护研究。
mengqt2003@yahoo.com.cn

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344
(2013)11-02048-06

收稿日期: 2012-07-19

修回日期: 2012-08-06

(20120519006/W · W)

Cao Chen, Attending physician,
Guanggu Guanshan Branch,
Third Hospital of Wuhan City,
Wuhan 430074, Hubei
Province, China
mengqt2003@yahoo.com.cn

Supported by: the National
Natural Science Foundation of
China, No. 81000027*

Received: 2012-07-19
Accepted: 2012-08-06

pulmonary contusion is urgently for clarity.

OBJECTIVE: To investigate the protective effect and mechanism of ligustrazine on cell apoptosis in the acute stage of pulmonary contusion induced by blunt chest trauma in rats.

METHODS: Healthy male Sprague-Dawley rats were divided equally and randomly into three groups: control group, model group and ligustrazine group. Blunt chest trauma models were prepared in the latter two groups. Rats in the ligustrazine group were intraperitoneally injected with 80 mg/kg ligustrazine immediately after blunt chest trauma. Lung tissues were collected at 1, 2 and 3 hours after blunt chest trauma to observe pathomorphological changes. The apoptotic index, pulmonary microvascular permeability and severity of pulmonary edema were detected to assess the lung function. Expressions of Caspase-3, Bax and Bcl-2 were detected by immunohistochemical staining, and blood tumor necrosis factor alpha was also detected.

RESULTS AND CONCLUSION: In the model group, tumor necrosis factor alpha increased at 1 hour and increased sharply in 2 and 3 hours after blunt chest trauma ($P < 0.05$); the apoptotic index and the degree of lung injury increased significantly at 2 and 3 hours after blunt chest trauma ($P < 0.05$); pulmonary microvascular permeability and degree of pulmonary edema were increased ($P < 0.05$); the expression of Caspase-3 increase significantly ($P < 0.05$) with the decrease of the ratio of Bcl-2 to Bax ($P < 0.05$). In the ligustrazine group, tumor necrosis factor alpha decreased notably ($P < 0.05$); the apoptotic index and the degree of lung injury decreased significantly after blunt chest trauma ($P < 0.05$); pulmonary microvascular permeability and the degree of pulmonary edema were relieved ($P < 0.05$); the expression of Caspase-3 decreased significantly ($P < 0.05$) with the increase of the ratio of Bcl-2 to Bax after treated with ligustrazine ($P < 0.01$). These findings indicate that ligustrazine can alleviate cell apoptosis in the acute stage of pulmonary contusion induced by blunt chest trauma by inhibiting the tumor necrosis factor alpha, down-regulating the expression of Caspase-3 and enhancing the ratio of Bcl-2/Bax.

Key Words: tissue construction; basic experiment in tissue construction; ligustrazine; apoptosis; lung injury; blunt chest trauma; apoptotic index; pulmonary edema; degree of lung injury; Caspase-3; Bcl-2/Bax; tumor necrosis factor alpha; the National Natural Science Foundation of China; tissue construction photographs-containing paper

Cao C, Deng YZ, Zheng MA, Liu F, Meng QT. Ligustrazine prevents lung cell apoptosis in the acute stage of pulmonary contusion induced by blunt chest trauma. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(11): 2048-2053.

0 引言

作为交通事故最常见的创伤,急性胸部撞击后所致的肺挫伤(钝性肺挫伤)常引起呼吸功能异常和继发性炎症反应,并参与全身炎症反应综合征和多器官功能障碍综合征病理生理过程的发生发展^[1-2]。目前,虽在钝性肺挫伤的损伤机制发生发展过程以及炎症反应的作用方面取得了进展,但由于其发病原因的多样化及致病机制的复杂性,其致损伤的首要因素及此因素的作用亟待明确。近期研究表明川芎嗪可通过抑制抑制炎症递质及自由基产生、清除氧自由基、提高内源性超氧化物歧化酶活性而发挥脏器保护作用^[3-4],而其对于钝性肺挫伤的作用尤其是其对于急性期变化的变化尚待阐明。实验通过急性胸部撞击伤模型,探索大鼠钝性肺挫伤急性期细胞凋亡的动态变化及其肿瘤坏死因子 α 、Caspase-3、Bcl-2、Bax表达的差异,并探讨川芎嗪的防治效果,为临床治疗提供理论依据。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2009年9月至2010年9月在武汉大学人民医院动物实验中心完成,本实验室为SPF级动物实验室。

材料:

实验动物: 健康雄性SD大鼠108只,鼠龄7-9周,体质量(250±25) g,购于华中科技大学同济医学院实验动物中心,许可证号:SYXK(鄂)2004-0027。

川芎嗪对钝性肺挫伤急性期大鼠肺组织细胞凋亡的影响
实验试剂及仪器:

Main reagents and instruments used in the experiment of studying the effect of ligustrazine on the cell apoptosis of lung tissues in the acute stage of pulmonary contusion induced by blunt chest trauma:

试剂及仪器	来源
肿瘤坏死因子 α 试剂盒	R & D 公司
Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 免疫组化 学试剂盒	武汉博士德生物公司
细胞凋亡原位检测(TUNEL)试剂盒	Roche 公司
川芎嗪注射液(规格 40 mg/支)	北京市永康药业有限公司
HPIAS-1000 医学彩色图像分析系统	武汉大学病理学教研室提供

实验方法:

模型制备: 健康成年雄性SD大鼠随机均分为以下3组, 每组36只。①正常对照组, 无特殊处理。②急性胸部撞击伤模型组, 以250 kPa驱动压力撞击大鼠胸部复制急性胸部撞击伤钝性肺挫伤模型。③川芎嗪治疗组在复制钝性肺挫伤模型后立即腹腔注射川芎嗪80 mg/kg 1次。实验前禁食12 h, 自由饮水。用异氟醚麻醉大鼠后, 根据Raghavendran等^[5]研制的胸部撞击器原理自制胸部撞击器, 按照撞击后1, 2, 3 h观察每组动物各取6只, 用于检测肺血管通透性, 另18只用于检测其他指标。

TUNEL法标记: 用TUNEL法标记凋亡细胞, 按照原位细胞凋亡检测试剂盒在武汉大学人民医院病理教研室完成大鼠肺组织凋亡细胞检测。每片高倍镜视野下(400倍)随机取5个视野, 计数凋亡细胞数及总细胞数目。

$$\text{凋亡指数(AI)} = \frac{\text{凋亡细胞数目}}{\text{总细胞数目}} \times 100\%$$

肺组织病理观察: 左肺上叶固定包埋并经苏木精-伊红染色后, 每个标本取10个视野取均数(400倍)光镜下观察肺组织病理形态学改变, 肺组织损伤程度根据肺泡充血、出血、血管壁的渗出、肺泡壁厚度的损害程度采用4分法综合评定: 0分(正常)、1分(轻度损伤)、2分(中度损伤)、3分(重度损伤)、4分(极重度损伤)。

肺水肿程度及肺血管通透性检测: 肺水肿程度根据肺干/湿质量比评估, 即所取全部左肺组织, 夹闭气管后用生理盐水漂洗掉表面血液, 滤纸吸干, 称湿质量; 后置70 °C烤箱内烘干24 h后称干质量, 两者之间的比值为肺干/湿质量比。每组大鼠的半数在取标本前尾静脉注射Evans blue染料, 再灌注结束时, 消除血液及其Evans blue染料残留, 右肺组织干燥后通过分光光度法测量标本的染料的浓度以检测肺血管通透性。

肺组织Bcl-2、Bax和Caspase-3蛋白表达: 采用Bcl-2、

Bax和Caspase-3试剂盒通过SABC免疫组化法在武汉大学人民医院病理学教研室完成。采用HPIAS-1000医学彩色图像分析系统进行图像分析, 测试每张切片Bcl-2、Bax和Caspase-3阳性细胞的平均吸光度值, 计算其均数作为该切片的代表值。

血液中肿瘤坏死因子 α 水平测定: 在取肺组织前, 左心室取血采用ELISA法测定血液中肿瘤坏死因子 α 水平。

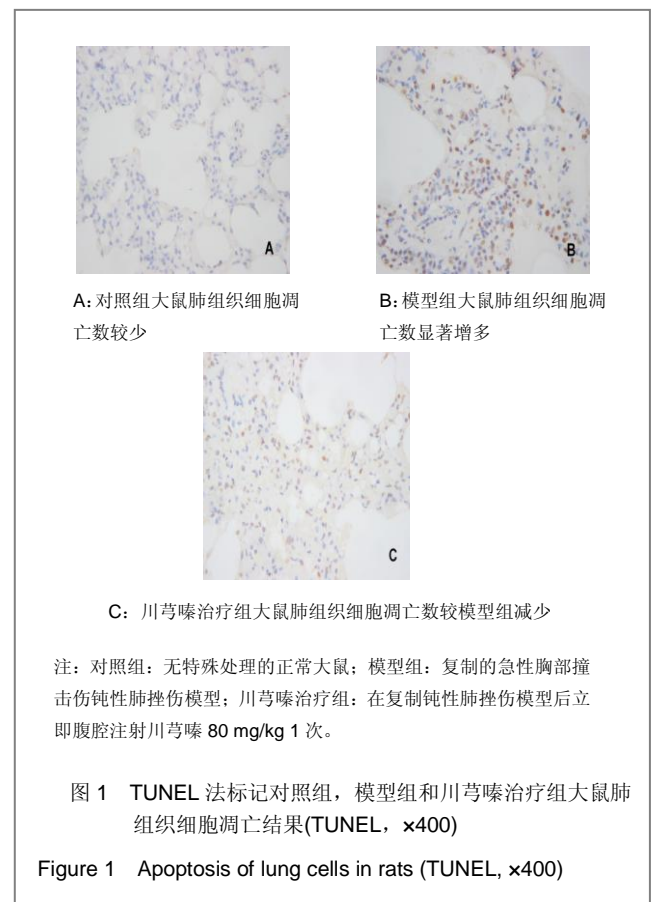
主要观察指标: ①TUNEL法标记细胞凋亡结果。②肺组织病理观察。③肺血管通透性及肺水肿程度变化。④肺组织Caspase-3、Bcl-2及Bax表达变化。⑤血液中肿瘤坏死因子 α 水平变化。

统计学分析: 所得数据采用SPSS 13.0软件包进行分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验选用大鼠108只, 分为3组, 无脱失, 进入结果分析108只。

2.2 TUNEL法标记大鼠肺组织细胞凋亡结果 TUNEL阳性细胞细胞核呈棕黄色颗粒状。见图1。



对照组仅见极少量细胞凋亡; 模型组2 h及3 h凋亡细胞数显著增多($P < 0.05$); 川芎嗪治疗组同时间点凋亡指数较模型组显著降低($P < 0.05$)。各组肺组织细胞凋亡指数比较见表1。

表1 对照组、模型组及川芎嗪治疗组不同时间大鼠肺组织细胞凋亡指数比较

Table 1 Comparison of apoptotic index in lung tissues ($\bar{x} \pm s, n=36, \%$)

组别	1 h	2 h	3 h
对照组	3.04±0.49	2.97±0.56	3.07±0.62
模型组	4.12±0.17	5.83±0.83 ^a	8.59±1.02 ^a
川芎嗪治疗组	3.48±0.15	3.47±0.62 ^b	4.21±0.79 ^b

与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$ 。

注: 对照组为无特殊处理的正常大鼠; 模型组复制急性胸部撞击伤钝性肺挫伤模型; 川芎嗪治疗组在复制钝性肺挫伤模型后立即腹腔注射川芎嗪80 mg/kg 1次。模型组大鼠创伤后2, 3 h肺组织细胞凋亡指数显著高于对照组($P < 0.05$), 川芎嗪治疗组创伤后2, 3 h肺组织细胞凋亡指数较模型组显著降低。

2.3 大鼠肺组织病理观察 对照组肺组织结构完整、清晰正常。胸部撞击2 h后模型组肺泡壁开始破坏, 肺间质及肺泡腔出现水肿、渗出、出血, 粒细胞浸润; 3 h后模型组肺泡壁破坏更严重, 肺间质及肺泡腔水肿、渗出、出血及粒细胞浸润程度更深。川芎嗪治疗组损伤程度较模型组轻, 肺泡壁破坏减轻, 间质肺泡腔内出血、渗出及细胞浸润显著减少。见表2。

表2 对照组、模型组及川芎嗪治疗组不同时间大鼠肺组织损伤程度比较

Table 2 Comparison of injury degree in lung tissues ($\bar{x} \pm s, n=36$)

组别	1 h	2 h	3 h
对照组	1.26±0.06	1.28±0.10	1.27±0.08
模型组	2.53±0.16	3.06±0.11 ^a	3.46±0.12 ^a
川芎嗪治疗组	1.58±0.07	1.68±0.11 ^b	1.74±0.06 ^b

与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$ 。

注: 对照组为无特殊处理的正常大鼠; 模型组复制急性胸部撞击伤钝性肺挫伤模型; 川芎嗪治疗组在复制钝性肺挫伤模型后立即腹腔注射川芎嗪80 mg/kg 1次。模型组大鼠创伤后2, 3 h肺组织损伤程度显著高于对照组($P < 0.05$), 川芎嗪治疗组创伤后2, 3 h肺组织损伤程度较模型组显著降低。

2.4 大鼠肺血管通透性及肺水肿程度变化 较之于其他组, 模型组 Evans 蓝染料浓度胸部撞击2 h及3 h浓度较高($P < 0.05$), 此时肺水肿程度亦明显加重; 川芎嗪治疗组相对于同时间点模型组 Evans 蓝染料浓度及

肺水肿的程度均明显减轻($P < 0.05$), 肺微血管的渗透性通过 Evans 蓝染料溢出程度, 肺水肿程度通过计算肺组织的干湿比评价。见表3, 4。

表3 对照组、模型组及川芎嗪治疗组不同时间大鼠肺血管通透性比较

Table 3 Comparison of pulmonary microvascular permeability among control, model and ligustrazine groups ($\bar{x} \pm s, n=36, \mu\text{g/g}$)

组别	1 h	2 h	3 h
对照组	82.56±11.81	83.83±12.76	85.68±13.24
模型组	128.64±13.53 ^a	187.56±15.12 ^a	225.56±11.35 ^a
川芎嗪治疗组	101.26±9.36 ^b	112.32±10.54 ^b	114.32±11.87 ^b

与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$ 。

注: 对照组为无特殊处理的正常大鼠; 模型组复制急性胸部撞击伤钝性肺挫伤模型; 川芎嗪治疗组在复制钝性肺挫伤模型后立即腹腔注射川芎嗪80 mg/kg 1次。模型组大鼠创伤后1, 2, 3 h肺血管通透性显著高于对照组($P < 0.05$), 川芎嗪治疗组创伤后1, 2, 3 h肺血管通透性较模型组显著降低。

表4 对照组、模型组及川芎嗪治疗组不同时间大鼠肺组织水肿程度比较

Table 4 Comparison of severity of pulmonary edema among control, model and ligustrazine groups ($\bar{x} \pm s, n=36, \text{dry weight/wet weight}$)

组别	1 h	2 h	3 h
对照组	2.36±0.15	2.32±0.11	2.42±0.15
模型组	2.89±0.17	4.74±0.22 ^a	6.89±0.13 ^a
川芎嗪治疗组	2.52±0.21	3.12±0.19 ^b	3.38±0.17 ^b

与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$ 。

注: 对照组为无特殊处理的正常大鼠; 模型组复制急性胸部撞击伤钝性肺挫伤模型; 川芎嗪治疗组在复制钝性肺挫伤模型后立即腹腔注射川芎嗪80 mg/kg 1次。模型组大鼠创伤后2, 3 h肺组织水肿程度显著高于对照组($P < 0.05$), 川芎嗪治疗组创伤后2, 3 h肺组织水肿程度较模型组显著降低。

2.5 大鼠肺组织Caspase-3、Bcl-2及Bax表达变化 对照组Caspase-3、Bax和Bcl-2的表达均很弱; 模型组2h及3 h组三者的表达均明显增强($P < 0.05$), Bcl-2/Bax比值较之对照组显著下降($P < 0.05$); 川芎嗪治疗组组较之于模型组, Caspase-3显著降低($P < 0.05$), Bcl-2/Bax比值显著增高($P < 0.05$)。见表5, 6。

2.6 大鼠肺血液中肿瘤坏死因子 α 水平变化 模型组血液中肿瘤坏死因子 α 水平在创伤后1 h即显著增加($P < 0.05$), 在创伤后2 h及3 h间急剧增加($P < 0.05$)。川芎嗪治疗组较之于模型组在各时间点肿瘤坏死因子 α 水平均显著降低($P < 0.05$)。见表7。

表 5 对照组、模型组及川芎嗪治疗组不同时间大鼠肺脏细胞 Caspase-3 表达

Table 5 Expression of Caspase-3 in lung cells of the control, model and ligustrazine groups ($\bar{x} \pm s$, $n=36$)

组别	1 h	2 h	3 h
对照组	0.075±0.016	0.071±0.013	0.075±0.016
模型组	0.080±0.014	0.101±0.012 ^a	0.106±0.004 ^a
川芎嗪治疗组	0.079±0.012	0.085±0.011 ^b	0.089±0.009 ^b

与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$ 。

注: 对照组为无特殊处理的正常大鼠; 模型组复制急性胸部撞击伤钝性肺挫伤模型; 川芎嗪治疗组在复制钝性肺挫伤模型后立即腹腔注射川芎嗪 80 mg/kg 1 次。模型组大鼠创伤后 2, 3 h 肺脏细胞 Caspase-3 表达显著高于对照组 ($P < 0.05$), 川芎嗪治疗组创伤后 2, 3 h 肺脏细胞 Caspase-3 表达较模型组显著降低。

表 6 对照组、模型组及川芎嗪治疗组不同时间大鼠肺脏细胞 Bcl-2/Bax 比值

Table 6 Ratio of Bcl-2 to Bax in lung cells of the control, model and ligustrazine groups ($\bar{x} \pm s$, $n=36$)

组别	1 h	2 h	3 h
对照组	1.148±0.041	1.135±0.052	1.368±0.023
模型组	1.043±0.019	0.667±0.026 ^a	0.716±0.018 ^a
川芎嗪治疗组	1.033±0.023	0.906±0.052 ^b	1.292±0.033 ^b

与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$ 。

注: 对照组为无特殊处理的正常大鼠; 模型组复制急性胸部撞击伤钝性肺挫伤模型; 川芎嗪治疗组在复制钝性肺挫伤模型后立即腹腔注射川芎嗪 80 mg/kg 1 次。模型组大鼠创伤后 2, 3 h 肺脏细胞 Bcl-2/Bax 比值显著低于对照组 ($P < 0.05$), 川芎嗪治疗组创伤后 2, 3 h 肺脏细胞 Bcl-2/Bax 比值较模型组显著增高。

表 7 对照组、模型组及川芎嗪治疗组不同时间大鼠血液中肿瘤坏死因子 α 水平变化

Table 7 Change of blood tumor necrosis factor- α levels in the control, model and ligustrazine groups ($\bar{x} \pm s$, $n=36$, ng/L)

组别	1 h	2 h	3 h
对照组	137.5±38.9	129.5±45.6	134.5±39.1
模型组	247.8±61.4 ^a	368.3±47.5 ^a	382.3±52.5 ^a
川芎嗪治疗组	165.0±57.9 ^b	276.7±43.8 ^b	265.0±57.9 ^b

与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$ 。

注: 对照组为无特殊处理的正常大鼠; 模型组复制急性胸部撞击伤钝性肺挫伤模型; 川芎嗪治疗组在复制钝性肺挫伤模型后立即腹腔注射川芎嗪 80 mg/kg 1 次。模型组大鼠创伤后, 1, 2, 3 h 血中肿瘤坏死因子 α 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), 川芎嗪治疗组创伤后, 1, 2, 3 h 血中肿瘤坏死因子 α 水平较模型组显著降低。

3 讨论

撞击伤作为交通事故中最常见的创伤类型, 中国每年因道路交通事故所致急症及致死患者剧增。钝性肺挫伤是胸部撞击伤最常见的损伤, 肺挫伤所致的呼吸功能异常和继发性炎症反应过程在全身炎症反应综合征和多器官功能障碍综合征的发生发展中占据重要地位^[1-2]。以往研究虽对于胸部撞击伤所致肺挫伤的损伤机制发生发展过程以及炎症因子的作用方面取得了一定进展, 但由于其发病原因的多样化及致病机制的复杂性, 其致损伤的诸多因素以及之间的相互关系仍待诠释。

细胞凋亡作为继发于损伤之后肺水肿形成的关键机制。细胞凋亡是一种受包括基因在内的多因素调控的程序性细胞死亡过程。细胞凋亡作为维持机体自身稳定的一种重要机制广泛参与许多疾病的病理机制, 具有重要的生理、病理意义。作为凋亡调控的关键酶, Caspase 家族和 Bcl-2 家族蛋白在凋亡过程中具有至关重要的作用^[6-7], Caspase-3 作为下游的关键调控子, 可以通过凋亡触发诱导 Caspase 级联活化激活酶原, 介导凋亡级联反应。Bcl-2 可通过抗氧化效应和抑制氧自由基的产生阻断细胞凋亡, Bax 通过与 Bcl-2 结合生成异二聚体抵消 Bcl-2 抗凋亡的作用。Bcl-2/Bax 的比值在细胞存活还是凋亡的过程中, 起着调控其进程的关键作用^[8]。细胞因子尤其是创伤早期的肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1、白细胞介素 8 在创伤形成及全身炎症反应综合征的发生发展过程中的重要物质, 作为早期肺损伤的重要递质, 目前肿瘤坏死因子 α 更被公认为具有多种重要生物学活性的促炎症细胞因子^[9], 肿瘤坏死因子 α 的释放诱发产生白细胞介素和其他炎症细胞因子, 导致肺内中性粒细胞的扣押及脱颗粒, 促进肺血管内皮细胞、肺泡上皮细胞凋亡, 加重毛细血管-肺泡损伤导致血管壁和肺泡壁通透性增高, 渗出增加, 引起肺泡弥散功能下降而参与胸部撞击所致钝性肺损伤的发病过程^[10]。

实验发现胸部撞击伤后相对应肺组织的肺损伤程度及凋亡指数, Bcl-2 的显著减少和 Caspase-3 激活, 表明创伤诱导的细胞异常凋亡过程中, Caspase-3 表达及其 Bcl-2/Bax 的比值与胸部撞击伤后肺组织细胞凋亡的进展和严重程度呈正相关性关联, 二者作为调控凋亡进程的关键蛋白参与胸部撞击所致肺创伤凋亡过程的变化。胸部撞击伤后 1h, 肿瘤坏死因子 α 相对于对照

组剧增, 而肺损伤程度, 凋亡指数及其对应的 Caspase-3 表达及其 Bcl-2/Bax 的比值在胸部撞击伤后 2h 才发生显著改变, 暗示肿瘤坏死因子 α 可能通过是异常凋亡的始发因素。

川芎嗪作为一种从伞形科蒿本属植物川芎根茎中提取分离的生物碱单体。既往研究表明川芎嗪能抑制机体过度炎症反应^[3-4], 抑制自由基产生、提高内源性超氧化物歧化酶活性、清除氧自由基, 同时具有保护血管内皮细胞的稳定、维持细胞膜及线粒体膜结构和功能、改善微循环和抑制血小板聚集等作用等多种生物学作用。实验结果表明应用川芎嗪后, 撞击后 1 h 肿瘤坏死因子 α 表达水平显著降低, 撞击后 2 h 及 3 h 肿瘤坏死因子 α 表达水平显著降低, 肺损伤程度和肺组织异常凋亡均显著减轻, 伴随着 Caspase-3 的低表达和 Bcl-2/Bax 的比值显著增加。结合既往研究川芎嗪抑制钝性肺挫伤急性期细胞凋亡的可能机制包括^[3-4,11-12]: ①抑制氧自由基产生。使其直接损伤 DNA 或攻击蛋白质使许多具有酶活性的蛋白质功能丧失的作用减退而抑制细胞凋亡。②抑制大量的细胞因子和炎症递质的释放。创伤促使大量的细胞因子和炎症递质如肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6、白细胞介素 8、肿瘤生长因子等释放, 同时加重全身炎症反应和细胞凋亡。③抑制胞内钙超载。损伤期间诸多因素造成胞内钙离子超载, 其后激活钙离子依赖性的核酸内切酶, 从而使双链 DNA 在核小体 Linker 部位裂解, 形成 DNA 碎块。同时, 钙超载可激活蛋白酶 C, 令其转移到细胞膜使 G-蛋白磷酸化, G-蛋白减少, 胞内 CAMP 增加而导致细胞凋亡。④保护线粒体功能。防止由于线粒体功能改变而诱导凋亡的发生。

综合模型组的结果, 可推断川芎嗪可以减轻胸部撞击所致肺挫伤的程度和细胞异常凋亡的发生, 其机制可能通过抑制肿瘤坏死因子 α 表达, 继而下调 Caspase-3 的表达并增加 Bcl-2/Bax 的比值, 达到降低胸部撞击所致肺组织急性期的异常凋亡, 最终减轻胸部撞击所致急性期肺挫伤。

基金资助: 国家自然科学基金资助项目(81000027)。

作者贡献: 设计及实施为第一作者及第五作者, 实施为第四作者, 评估为第二、三、五作者。实验操作及评估均采用双盲法。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Gebhard F, Kelbel MW, Strecker W, et al. Chest trauma and its impact on the release of vasoactive mediators. Shock. 1997; 7(5):313-317
- [2] Ziegler DW, Agarwal NN. The morbidity and mortality of rib fractures. J Trauma. 1994; 37(6):975-979.
- [3] Cheng XC, Liu XY, Xu WF, et al. Ligustrazine derivatives. Part 3: Design, synthesis and evaluation of novel acylpiperazinyl derivatives as potential cerebrocardiac vascular agents. Bioorg Med Chem. 2009; 17(8): 3 018-3 024.
- [4] Feng L, Ke N, Cheng F, et al. The Protective Mechanism of ligustrazine Against Renal Ischemia/Reperfusion Injury. J Surg Res. 2009; 166(2):298-305.
- [5] Raghavendran K, Davidson BA, Helinski JD, et al. A rat model for isolated bilateral lung contusion from blunt chest trauma. Anesth Analg. 2005; 101(5):1482-1489.
- [6] Jernigan TW, Croce MA, Fabian TC. Apoptosis and necrosis in the development of acute lung injury after hemorrhagic shock. Am Surg. 2004; 70(12):1094-1098.
- [7] Pan TL, Wang PW, Leu YL, et al. Inhibitory effects of Scutellaria baicalensis extract on hepatic stellate cells through inducing G2/M cell cycle arrest and activating ERK-dependent apoptosis via Bax and caspase pathway. Journal of Ethnopharmacology. 2012; 139(3): 829-837
- [8] Mir Snober Shabnam, Radhika Srinivasan, Anjilina Wali, et al. Expression of p53 protein and the apoptotic regulatory molecules Bcl-2, Bcl-2-XL, and Bax in locally advanced squamous cell carcinoma of the lung. Lung Cancer. 2004; 45(2):181-188.
- [9] Yu J, Eto M, Akishita M, et al. A selective estrogen receptor modulator inhibits TNF- α -induced apoptosis by activating ERK1/2 signaling pathway in vascular endothelial cells. Vascular Pharmacology. 2009; 51(1):21-28.
- [10] Morse D, Lin L, Choi AMK. Heme oxygenase-1, a critical arbitrator of cell death pathways in lung injury and disease. Free Radical Biology and Medicine. 2009; 47(1):1-12.
- [11] Zhang ZH, Yu SZ, Wang ZT, et al. Scavenging effects of tetramethylpyrazine on active oxygen free Radicals. Acta Pharmacologica Sinica. 1994; 15(3): 229-231.
- [12] Moon DO, Kim MO, Kang SH, et al. Sulforaphane suppresses TNF- α -mediated activation of NF- κ B and induces apoptosis through activation of reactive oxygen species-dependent caspase-3. Cancer Letters. 2009; 274(1): 132-142.