

· 论著 ·

肠系膜淋巴管结扎对二次打击大鼠 肾小管上皮细胞凋亡的影响

赵自刚 牛春雨 张静 薄爱华

【摘要】 **目的** 探讨结扎肠系膜淋巴管对失血/脂多糖(LPS)二次打击致大鼠肾小管上皮细胞凋亡的拮抗作用。**方法** 雄性 Wistar 大鼠 45 只,随机均分为结扎组、未结扎组和假手术组。用右侧颈动脉放血及致伤后 6 h 腹腔注射 LPS 4 mg/kg 复制失血/LPS 二次打击动物模型,结扎组行肠系膜淋巴管结扎术致肠淋巴液断流。在手术创伤后 24 h,选取同一部位肾组织制备病理切片,用原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测肾小管上皮细胞凋亡率,免疫组化链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶法(SABC)检测凋亡调控基因 bcl-2 和促凋亡基因 bax 的蛋白表达。**结果** 二次打击后,与假手术组比较,未结扎组肾小管上皮细胞凋亡率和 bax 蛋白表达明显增高,bcl-2 蛋白表达显著降低(P 均 <0.01);结扎组大鼠肾小管上皮细胞凋亡率、bax 蛋白表达显著低于未结扎组,bcl-2 蛋白表达显著高于未结扎组(P 均 <0.01)。**结论** 肠系膜淋巴管结扎可减轻失血/LPS 导致的大鼠肾小管上皮细胞凋亡,其机制可能与肠系膜淋巴管结扎降低促凋亡基因 bax 表达、提高 bcl-2 表达有关。

【关键词】 肠系膜淋巴管结扎; 肾小管上皮细胞; 凋亡; 二次打击

Effects of mesenteric lymph duct ligation on apoptosis of renal tubule epithelial cells in rats after two - hits
ZHAO Zi-gang, NIU Chun-yu, ZHANG Jing, BO Ai-hua. Department of Pathophysiology, Hebei North University, Zhangjiakou 075029, Hebei, China
Corresponding author: NIU Chun-yu (Email: ncylxf@sohu.com)

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of mesenteric lymph duct ligation in preventing apoptosis of renal tubule epithelial cells in rats by two - hits including hemorrhage and lipopolysaccharide (LPS) challenge. **Methods** Forty - five Wistar rats were randomly divided into three groups: the ligation group, the non - ligation group and sham operation group. The two - hits model was established by withdrawing the blood via the right side carotid artery of rats and intragastric administration 4 mg/kg LPS 6 hours after hemorrhage, and mesenteric lymph flow was blocked by ligating mesenteric lymph duct in ligation group. Twenty - four hours after operation, kidney was harvested for pathological examination, and the apoptosis cells rate of renal tubule epithelial cells were determined by method of terminal - deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL), the expression of apoptosis - correlating gene bcl - 2 and bax protein were determined by streptavidin - biotin complex (SABC) immunohistochemical method. **Results** After two - hits, the apoptosis rate and expression of bax protein of renal tubule epithelial cells in non - ligation group were significantly increased, and expression of bcl - 2 protein was significantly lower as compared with those of sham operation group (all $P < 0.01$). But the apoptosis rate and expression of bax protein of renal tubule epithelial cells in ligation group were significantly lower, and expression of bcl - 2 protein was significantly increased as compared with non - ligation group (all $P < 0.01$). **Conclusion** The results demonstrate that the ligation of mesenteric lymph duct could ameliorate the apoptosis of renal tubule epithelial cells in rats as produced by hemorrhage and LPS, and its mechanism might relate to the reduction of the down regulation of gene expression of bax protein and enhancement of the expression of bcl - 2 protein after ligation of mesenteric lymph duct.

【Key words】 mesenteric lymph duct ligation; renal tubule epithelial cells; apoptosis; two - hit

肾功能不全是休克、感染、创伤等严重因素诱导

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370561);河北省自然科学基金资助项目(C2004000649);河北省科技厅基金资助项目(03276196D-64);河北省教育科技计划项目(2000122)

作者单位:075029 河北张家口,河北北方学院病理生理教研室
通讯作者:牛春雨,教授,硕士生导师(Email:ncylxf@sohu.com)

作者简介:赵自刚(1974-),男(汉族),河北省人,副教授,主要从事危重病的病理生理学研究,发表学术论文 80 余篇,获河北省科技进步一等奖 1 项、三等奖 2 项(Email:zzghyl@sohu.com)。

多器官功能障碍综合征(MODS)中常出现的一种器官组织损伤,在伴随急性肾功能衰竭(ARF)时的病死率可高达 88%^[1-3]。淋巴系已从组织液回流辅助系统的传统认识发展到具有独立的功能和意义,淋巴微循环与休克的发生发展及转归关系密切^[4]。前期研究工作表明,结扎肠系膜淋巴管可减轻 MODS 大鼠肾的功能障碍和组织损伤^[5],其机制与肠系膜淋巴管结扎降低一氧化氮(NO)合成、减少自由基

放与超氧化物歧化酶(SOD)消耗等因素有关^[6]。细胞凋亡已被证实许多生物过程中起重要的调节作用,本研究观察了肠系膜淋巴管结扎对失血/脂多糖(LPS)二次打击致大鼠肾小管上皮细胞凋亡的拮抗作用,探讨肠淋巴途径在二次打击致大鼠肾组织损伤中的拮抗作用。

1 材料与方 法

1.1 动物和分组:健康 Wistar 雄性大鼠 45 只,体重 280~350 g(河北医科大学实验动物中心提供)。按随机数字表法分为结扎组、未结扎组和假手术组 3 组,每组 15 只。实验前 12 h 禁食,自由饮水。

1.2 二次打击动物模型复制及标本制备:大鼠肌肉注射质量分数为 2%的戊巴比妥钠(50 mg/kg)全身麻醉,右侧颈总动脉和左侧颈静脉插管,备放血及输液用。自颈总动脉缓慢放血至全血量的 1/6 失血量(全血量以体重的 1/13 计算),速度最初 5 min 为 0.4 ml/min,其后以 0.1 ml/min 匀速放血,维持低血压 40 min。未结扎组、结扎组自左侧颈静脉缓慢推注林格液(容量为失血量的 3 倍),时间 \geq 30 min;假手术组仅行麻醉、小量失血,但不输液。腹部手术,暴露肠系膜根部,结扎组行肠系膜淋巴管结扎术;未结扎组及假手术组仅在肠系膜淋巴管下穿线,但不结扎。手术创伤后 6 h,向未结扎组、结扎组大鼠腹腔注射 LPS(E. coli O111:B4, 美国 Sigma 公司, 4 mg/kg),此后每隔 2 h 腹腔注射质量分数为 5%的葡萄糖盐水(20 ml/kg)作为支持治疗,复制二次打击模型。记录大鼠 24 h 存活率。手术创伤 24 h 后,所有存活大鼠再次用戊巴比妥钠(25 mg/kg)全身麻醉,选择同一部位的肾组织,以体积分数为 10%的甲醛溶液进行固定、脱水、透明、浸蜡等常规包埋处理。

1.3 肾小管上皮细胞凋亡率检测:将包埋后的肾脏组织常规冠状切片,置于多聚赖氨酸处理的玻片上,脱蜡至水。原位末端缺刻标记法(TUNEL)测定肾组织细胞凋亡(试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司),3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,细胞核呈棕色的细胞为凋亡细胞。每张切片在高倍镜下观察 10 个视野(50~100 个/HP),计数凋亡细胞,并计算凋亡率。

1.4 肾小管上皮细胞原癌基因 bcl-2 及促凋亡基因 bax 的蛋白表达及图像分析:将包埋后的肾组织经肾门纵向常规切片,置于多聚赖氨酸处理的玻片上,脱蜡至水。免疫组化链酶素-亲合素-生物素-过氧化物酶法(SABC)测定 bax 和 bcl-2 的蛋白表

达,阳性表达多集中肾小管上皮细胞的胞浆内,胞质呈棕色颗粒的细胞为阳性表达细胞(试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司)。显微镜放大倍数为 400 倍,显微镜下观察免疫组化染色切片,每张切片各取 10 个高倍视野,每视野细胞数为 50~100 个。应用北航医学图像分析管理系统进行图像分析,计算每张切片棕色颗粒的灰度(灰度由透光度来表示,其值越大,表示蛋白表达量越低),取平均值,计算 bcl-2 和 bax 蛋白表达的灰度值。

1.5 统计学处理:应用 SPSS11.0 统计软件包。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较进行单因素方差分析,率的比较应用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 动物存活率:制模后观察 24 h,假手术组动物全部存活(15/15 只),未结扎组存活率为 53.3%(8/15 只),结扎组为 73.3%(11/15 只),经 χ^2 检验,3 组动物 24 h 存活率比较差异有统计学意义($\chi^2=8.904, P<0.05$)。

2.2 肾小管上皮细胞凋亡率(表 1):假手术组肾小管上皮细胞凋亡数较少,未结扎组肾小管上皮细胞凋亡数目明显增多,凋亡率明显高于假手术组($P<0.01$);结扎组肾小管上皮细胞凋亡数减少,细胞凋亡率显著低于未结扎组($P<0.01$)。

2.3 肾小管上皮细胞 bcl-2 和 bax 的蛋白表达(表 1,彩色插页图 1 和图 2):假手术组 bcl-2、bax 蛋白均有一定的表达。与假手术组比较,未结扎组肾小管上皮细胞 bcl-2 表达显著降低,bax 表达明显增高;结扎组肾小管上皮细胞 bcl-2 表达增强,bax 表达降低(P 均 <0.01)。结扎组 bcl-2 表达显著高于未结扎组,而 bax 表达则显著低于未结扎组(P 均 <0.01)。

表 1 各组大鼠肾小管上皮细胞凋亡率及 bcl-2、bax 蛋白表达的变化($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Changes of apoptosis rate and the expression of bcl-2 and bax protein in renal tubule epithelial cells of rats in each group($\bar{x}\pm s$) 灰度值

组别	动物数(只)	细胞凋亡率(%)	bcl-2	bax
假手术组	15	2.1 \pm 0.6	154.6 \pm 12.5	162.5 \pm 11.5
未结扎组	8	23.8 \pm 3.8*	198.2 \pm 11.3*	125.1 \pm 9.4*
结扎组	11	5.3 \pm 1.6 Δ	145.9 \pm 10.2* Δ	175.8 \pm 10.3* Δ

注:与假手术组比较:* $P<0.01$;与未结扎组比较: $\Delta P<0.01$

3 讨 论

肾脏是 MODS 和脓毒症的靶器官^[1],而肠道屏障功能障碍和肠道内细菌/内毒素移位(BET)所致

的肠源性感染,是无明确感染灶重症患者发生脓毒症的重要因素^[7]。一般认为,BET 存在两条途径,即门静脉和肠淋巴途径,但在创伤性休克模型动物或患者的门静脉血中却没有发现细菌或毒素^[8],为此肠淋巴在肠源性毒性物质移位过程中的作用值得重视。我们前期的研究表明,肠淋巴途径在 MODS 的发病学中具有重要作用^[6],结扎肠系膜淋巴管阻断肠淋巴液回流可减轻肾脏的功能障碍及病理组织学损伤。本研究进一步观察了结扎肠系膜淋巴管对失血/LPS 二次打击致大鼠肾细胞凋亡的影响。细胞凋亡指由细胞内外因素触发细胞内预存的死亡程序而导致的细胞死亡,是一种由多因素引起、受基因控制、多分子参与、单一的细胞自灭过程,有别于细胞坏死的细胞死亡类型^[9]。研究显示,内毒素、烧伤、缺血等均可导致有关脏器的细胞凋亡,细胞凋亡在细胞、组织和器官的损伤中发挥了重要作用^[10]。本研究结果显示,未结扎组大鼠肾小管上皮细胞凋亡数目增多,凋亡率高,而结扎组肾小管上皮细胞凋亡数显著减少,凋亡率低,提示结扎肠系膜淋巴管阻断肠淋巴循环后,减轻了肾小管上皮细胞的凋亡。

在细胞凋亡的发生过程中,受诱导性因素以及抑制性因素的调控。bcl-2 为原癌基因,是一种重要的凋亡调控基因,可特异性地抑制细胞凋亡的存活基因,在细胞凋亡的调控过程中起着重要作用,它可通过抵抗多种形式的细胞死亡,延长细胞寿命而致细胞数目增加,bcl-2 高表达的细胞能耐受多种细胞毒性因子的杀伤作用,使细胞凋亡明显延迟、减少,而且在毒性因子去除后可使细胞迅速恢复增生。bax 基因是凋亡促进基因,与 bcl-2 基因同属一族,它不但可以拮抗 bcl-2 的凋亡抑制作用,而且还可直接促进细胞的凋亡。研究表明,提升抑凋亡基因 bcl-2 表达、下调促凋亡基因 bax 表达,可降低细胞凋亡^[11]。为了探讨肠淋巴途径在二次打击致大鼠肾小管上皮细胞凋亡的作用机制,本研究观察了凋亡相关基因 bcl-2、bax 的蛋白表达,研究结果显示,未结扎组大鼠肾小管上皮细胞 bcl-2 表达显著降低,bax 表达增强,提示二次打击大鼠肾小管上皮细胞凋亡过度,与促凋亡基因 bax 表达过强有关;而经肠系膜淋巴管结扎后,肾小管上皮细胞 bcl-2 表达仍较强,bax 表达较弱,从而使肾小管上皮细胞凋亡数不多。提示肠系膜淋巴管结扎可有效地减轻肾小管上皮细胞凋亡,其机制与提升抑凋亡基因 bcl-2 蛋白表达、下调促凋亡基因 bax 蛋白表达有关。

总之,肠系膜淋巴液回流在二次打击的发病学

中具有重要作用。有学者指出,肠道是 MODS 发生的“枢纽”器官^[12],说明肠道在 MODS 的发病中不仅是受损伤的靶器官,也是 MODS 发病的重要环节。结扎肠系膜淋巴管,可能正是通过阻断肠道枢纽器官的发病学环节,阻断了二次打击以及失血性休克后肠系膜淋巴液中毒素、细胞因子等有害物质的转运^[13],从而降低 LPS-细胞因子的级联反应,降低促凋亡介质及促凋亡基因的表达,提升抑凋亡基因表达,从而有效地降低肾小管上皮细胞凋亡,减轻大鼠 ARF。提示以肠淋巴循环为靶向可能为临床防治失血、感染导致的 ARF 开辟新途径。

参考文献:

- 1 张璩,任延波,蒋丽. 脓毒症早期大鼠肾脏细胞凋亡及炎症细胞因子的变化[J]. 中国危重病急救医学,2006,18(2):89-91.
- 2 马胜银,刘朝阳. 连续性肾脏替代疗法在治疗伴急性肾衰竭的多器官功能障碍综合征中的应用[J]. 中国危重病急救医学,2003,15(2):97-99.
- 3 杨永铭,刘冠贤,钟伟强,等. 连续性肾脏替代治疗在急性肾衰竭伴多器官功能障碍综合征中的应用[J]. 中国危重病急救医学,2003,15(12):764-765.
- 4 牛春雨,赵自刚,刘艳凯,等. 高渗盐水对低血容量性休克大鼠淋巴循环的影响[J]. 中国危重病急救医学,1999,11(10):596-598.
- 5 赵自刚,牛春雨,张静,等. 肠系膜淋巴管结扎对 MODS 大鼠的器官保护作用[J]. 中国病理生理杂志,2005,21(2):308-313.
- 6 牛春雨,赵自刚,张静,等. 肠淋巴途径在二次打击致大鼠 MODS 的发病学作用[J]. 中国病理生理杂志,2005,21(3):559-564.
- 7 Nieuwenhuijzen G A, Deitch E A, Gorski R J. The relationship between gut-derived bacteria and the development of the multiple organ dysfunction syndrome [J]. J Anat, 1996, 189 (Pt 3):537-548.
- 8 Gonzalez R J, Moore E E, Biffl W L, et al. The lipid fraction of post-hemorrhagic shock mesenteric lymph (PHSML) inhibits neutrophil apoptosis and enhances cytotoxic potential [J]. Shock, 2000, 14(3):404-408.
- 9 Papanthanasoglou E D, Moynihan J A, Ackerman M H. Does programmed cell death (apoptosis) play a role in the development of multiple organ dysfunction in critically ill patients? A review and a theoretical framework [J]. Crit Care Med, 2000, 28(2):537-549.
- 10 董月青,黄军华,姚咏明. 脓毒症中 T 淋巴细胞凋亡及其调控研究进展[J]. 中国危重病急救医学,2004,16(6):381-384.
- 11 冯建萍,卢奕,赵炳让,等. 黄芪抑制家兔心肌缺血/再灌注时细胞凋亡的实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志,2001,8(1):13-15.
- 12 王佩燕. 肠——多器官功能障碍综合征防治的靶器官[J]. 中国危重病急救医学,2001,13(11):647-648.
- 13 牛春雨,侯亚利,赵自刚,等. 肠淋巴途径在失血性休克大鼠肠源性细菌/内毒素移位发病学中的作用[J]. 中国危重病急救医学,2007,19(5):266-269.

(收稿日期:2007-07-21 修回日期:2007-11-09)

(本文编辑:李银平)

C-反应蛋白致内皮炎症损伤的信号转导通路筛选

(正文见708页)

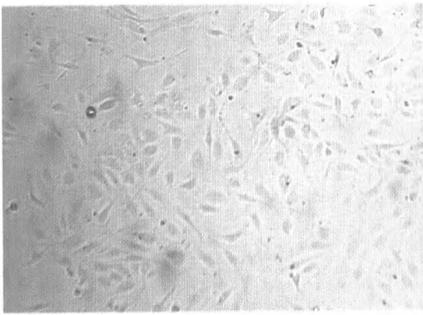


图1 光镜下内皮细胞呈铺路卵石样生长(x100)
Figure 1 Endothelial cells growing like pebble under light microscope(x100)

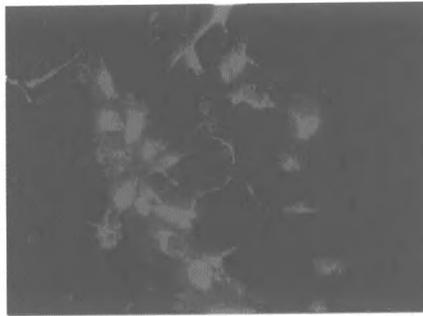


图2 内皮细胞第VII因子相关抗原表达阳性(x200)
Figure 2 Positive expression of endothelial cells characterized by anti-Factor VII-related antigen(x200)

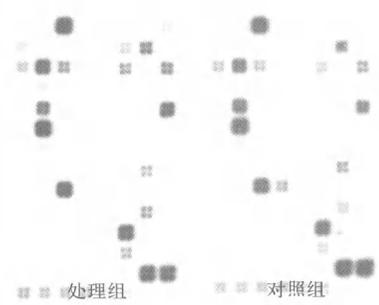


图3 人信号通路发现者基因芯片原始点阵图
Figure 3 Original image of human signal transduction pathwayfinder gene array

肠系膜淋巴管结扎对二次打击大鼠肾小管上皮细胞凋亡的影响

(正文见724页)



注: A: 假手术组; B: 未结扎组; C: 结扎组

图1 各组大鼠肾小管上皮细胞bcl-2表达(SABC, x400)
Figure 1 Expression of bcl-2 in renal tubule epithelial cells of rats(SABC, x400)

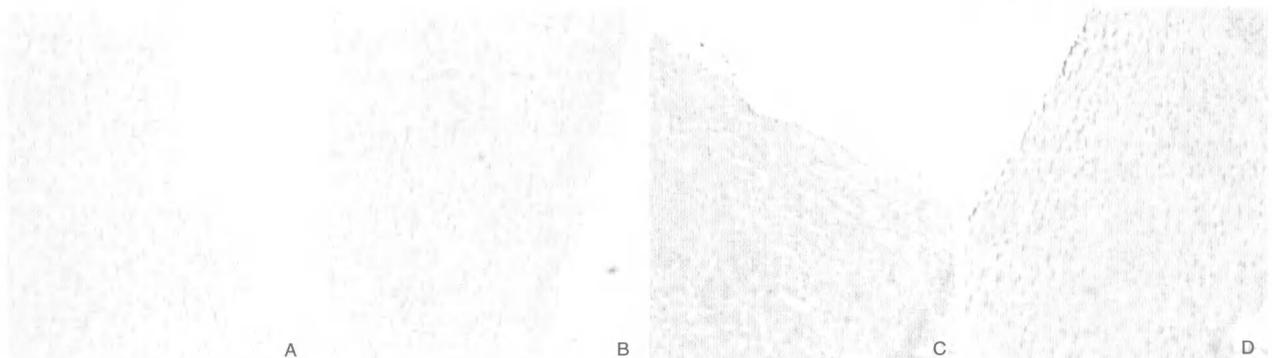


注: A: 假手术组; B: 未结扎组; C: 结扎组

图2 各组大鼠肾小管上皮细胞bax表达(SABC, x400)
Figure 2 Expression of bax in renal tubule epithelial cells of rats(SABC, x400)

实验性肺血栓栓塞症血红素氧化酶的变化

(正文见745页)



注: A: D组; B: A组; C: B组; D: C组

图1 各组肺动脉HO-1免疫组化结果(免疫组化, x40)
Figure 1 Immunohistochemical result of HO-1 of pulmanory artery in each group(immunohistochemistry, x40)

705-21