

川芎嗪对肺动脉高压大鼠肺血管凋亡的影响

贾旭广¹, 石璐¹, 朱阿楠², 金可可¹, 汪洋¹, 唐兰兰¹, 张艳华¹, 王万铁¹

(1. 温州医学院, 浙江 温州 325035; 2. 余姚市中医医院, 浙江 余姚 315400)

【摘要】 目的 观察川芎嗪对低 O₂ 高 CO₂ 肺动脉高压大鼠肺动脉平滑肌凋亡以及 Bcl-2、Bax 表达的影响。方法 将 30 只 SD 大鼠按随机数字表法分为正常对照组(N 组)、低 O₂ 高 CO₂ 组(H 组)、低 O₂ 高 CO₂ + 川芎嗪组(H+LTZ 组)3 组, 每组 10 只。监测各组大鼠血流动力学变化; 观察肺细动脉管壁面积与总面积比值(WA/TA); 用原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测肺细动脉凋亡情况, 并计算凋亡指数(AI); 用免疫组化法检测 Bcl-2、Bax 的含量。结果 H 组和 H+LTZ 组平均肺动脉压(mPAP)、右心室重量比、WA/TA 比值均明显高于 N 组, H+LTZ 组则均明显低于 H 组(P 均 < 0.01); 3 组间平均颈动脉压(mCAP)无明显差异(P 均 > 0.05)。H 组和 H+LTZ 组肺细动脉 AI 显著低于 N 组, H+LTZ 组则显著高于 H 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。H 组和 H+LTZ 组 Bcl-2 含量均显著高于 N 组, Bax 含量、Bax/Bcl-2 比值均显著低于 N 组; H+LTZ 组 Bcl-2 含量显著低于 H 组, Bax 含量、Bax/Bcl-2 比值显著高于 H 组(P 均 < 0.01)。结论 川芎嗪有抑制慢性低 O₂ 高 CO₂ 肺动脉高压和肺血管重建的作用, 抑制肺细动脉的增殖、促进肺细动脉凋亡是其可能机制。

【关键词】 川芎嗪; 低氧; 肺动脉高压; 凋亡; Bcl-2; Bax

中图分类号: R285.5; R256.1 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.05.005

Effect of ligustrazine (川芎嗪) on pulmonary arteria apoptosis in pulmonary hypertension JIA Xu-guang*, SHI Lu, ZHU A-nan, JIN Ke-ke, WANG Yang, TANG Lan-lan, ZHANG Yan-hua, WANG Wan-tie. * Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, Zhejiang, China

Corresponding author: WANG Wan-tie, Email: wzurwt@tom.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of ligustrazine (川芎嗪) on smooth muscle apoptosis of pulmonary arteriole and the expressions of Bcl-2 and Bax in rats with pulmonary arterial hypertension induced by hypoxic hypercapnia. Methods Thirty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: normal control group (N), hypoxic hypercapnic group (H), and hypoxic hypercapnic + ligustrazine group [(H+LTZ), each $n = 10$]. The changes of hemodynamics of rats were monitored; under light microscope, the ratio of vessel wall area and total area (WA/TA) of pulmonary arterioles in the three groups were measured. The apoptosis of pulmonary arterioles was tested with terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) and the apoptosis index (AI) was calculated. Immunohistochemistry was applied to determine the contents of Bcl-2 and Bax in cytoplasm. Results The level of mean pulmonary arterial pressure (mPAP), right ventricle/(left + interventricular septum) ratio and the ratio of vessel WA/TA were significantly higher in H group and H+LTZ group than those in N group, and values were obviously lower in H+LTZ group than those in H group (all $P < 0.01$). The mean carotid arterial pressure (mCAP) of the three groups had no significant differences (all $P > 0.05$). The apoptosis indexes (AI) of pulmonary arteriole in H and H+LTZ groups were markedly lower than that in N group, and the AI of pulmonary arteriole of H+LTZ group was obviously higher than that in H group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In H and H+LTZ groups, the content of Bcl-2 was significantly higher, the content of Bax and Bax/Bcl-2 ratio was obviously lower than that in N group. In H+LTZ group, the content of Bcl-2 was markedly lower and the content of Bax and Bax/Bcl-2 ratio was significantly higher than that in H group (all $P < 0.01$). Conclusion Ligustrazine can lower chronic pulmonary arterial hypertension induced by hypoxic hypercapnia and inhibit structural remodeling of pulmonary arteries. The inhibition of pulmonary arteriole proliferation and promotion of its apoptosis may play a role in the mechanism.

【Key words】 ligustrazine; hypoxia; pulmonary hypertension; apoptosis; Bcl-2; Bax

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(2007CA078)

通信作者: 王万铁, Email: wzurwt@tom.com

作者简介: 贾旭广(1985-), 男(汉族), 山西省人, 硕士研究生。

肺动脉高压是慢性阻塞性肺疾病(COPD)发展为肺源性心脏病的关键环节, 早期肺血管收缩反应增强和晚期血管结构重组导致肺动脉高压, 其发生

机制迄今仍未完全阐明。低氧性肺血管重建中各种类型细胞凋亡减少而增殖增加^[1],其中肺细动脉平滑肌细胞增生是主要特征^[2]。Bcl-2、Bax 是 Bcl-2 蛋白家族中具有代表性的蛋白,分别起抑制和促进凋亡的作用^[3]。川芎嗪是中药川芎的有效成分之一,研究表明,川芎有抑制肺动脉高压的作用^[4-6]。本实验中通过观察川芎嗪对肺细动脉凋亡以及 Bcl-2、Bax 表达的影响,探讨其是否具有抑制肺动脉高压形成的作用,报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备:雄性 SD 大鼠 30 只,体重 180~210 g,由温州医学院实验动物中心提供。将大鼠按随机数字表法均分为正常对照组(N 组)、低 O₂ 高 CO₂ 组(H 组)、低 O₂ 高 CO₂+川芎嗪组(H+LTZ 组),每组 10 只。N 组大鼠正常氧浓度下饲养 4 周。H 组大鼠置于常压低 O₂ 高 CO₂ 舱内,充入 N₂ 使舱内 O₂ 浓度维持在 8.5%~11.0%、CO₂ 浓度维持在 5.0%~6.5%,每日 8 h,每周 6 d,连续 4 周。H+LTZ 组每次低 O₂ 高 CO₂ 前 0.5 h 腹腔注射川芎嗪 80 mg·kg⁻¹·d⁻¹。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 肺血管指标的测定:采用右心导管法测量并计算平均肺动脉压(mPAP),经颈总动脉插管检测平均颈动脉压(mCAP)。分离右心室(RV)和左心室(LV)+室间隔(S),滤纸吸干水分后分别称重,计算右心室重量比(RV/(LV+S)比值)。取大鼠肺组织切片,行苏木素-伊红(HE)染色,每张切片随机选直径 50~200 μm 肺细动脉 5 支,用美国 Image-Pro Plus 6.0(IPP 6.0)彩色图像分析系统测定肺细动脉管壁面积与总面积比值(WA/TA)。

1.2.2 原位末端缺刻标记法(TUNEL)测定肺细动脉凋亡:取大鼠肺组织石蜡切片,脱蜡水化后用蛋白酶 K(10 μg/mg)37℃消化 20 min;H₂O₂ 溶液灭活过氧化酶;每张切片加入 TUNEL 反应混合液 50 μl,37℃反应 60 min;加转化剂 POD 37℃反应 30 min;3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色;苏木素复染。每张切片选取不同直径肺动脉 2 支,用 IPP 6.0 计数细胞数,并计算凋亡指数(AI)。细胞凋亡检测

试剂盒由瑞士 Roche 公司提供。

AI=细动脉阳性细胞核数/细动脉总细胞核数

1.2.3 免疫组化检测肺动脉 Bcl-2、Bax 的表达:石蜡切片经脱蜡水化、高压修复、H₂O₂ 溶液灭活过氧化酶后,加牛血清室温封闭 20 min,加一抗稀释液(Bcl-2、Bax 兔抗大鼠多克隆抗体由美国 Santa Cruz 公司提供,均 1:200)37℃孵育 60 min,辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔多聚体(北京中杉金桥生物技术有限公司)室温孵育 30 min,DAB 显色,苏木素复染。IPP 6.0 软件测定肺动脉吸光度(A)值。

1.3 统计学处理:检测数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组样本均数比较进行方差齐性检验,组间两两比较采用单因素方差分析,方差齐者采用 LSD 法,方差不齐者进行 Dunnett's T3 法,双变量相关分析采用 Bivariate 过程的 Pearson 等级相关法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 mPAP、mCAP、右心室重量比、WA/TA 比值比较(表 1):H 组、H+LTZ 组 mPAP、右心室重量比、WA/TA 比值均显著高于 N 组,H+LTZ 组则均显著低于 H 组(P 均 < 0.01);3 组间 mCAP 比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。

2.2 各组肺细动脉 AI 的比较(表 1;图 1):H 组和 H+LTZ 组的肺细动脉 AI 均显著低于 N 组,H+LTZ 组显著高于 H 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

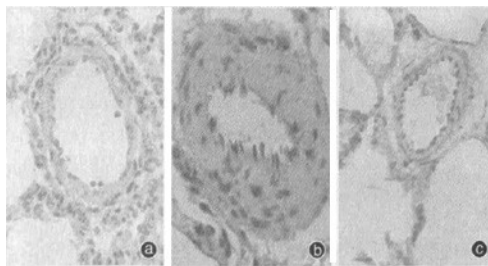


图 1 各组大鼠肺细动脉凋亡情况(TUNEL, ×400)

2.3 各组肺细动脉胞质中 Bcl-2、Bax 含量比较(表 1;图 2~3):H 组和 H+LTZ 组 Bcl-2 含量均显著高于 N 组,Bax 含量、Bax/Bcl-2 比值均显著低于

表 1 各组大鼠肺血管指标及 Bcl-2、Bax 含量、Bax/Bcl-2 比值的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	mPAP(mm Hg)	mCAP(mm Hg)	右心室重量比	WA/TA 比值	AI	Bcl-2(A 值)	Bax(A 值)	Bax/Bcl-2 比值
N 组	10	11.23±0.63	107.74±3.66	23.17±0.71	28.34±0.83	0.353±0.006	0.107±0.034	0.202±0.007	1.892±0.016
H 组	10	24.38±0.88*	117.92±6.80	36.65±0.47*	58.21±2.09*	0.247±0.005*	0.179±0.067*	0.101±0.004*	0.565±0.007*
H+LTZ 组	10	18.24±0.71 ^{ac}	116.92±5.03	31.78±0.59 ^{ac}	47.56±1.07 ^{ac}	0.252±0.004 ^{ab}	0.154±0.077 ^{ac}	0.129±0.006 ^{ac}	0.833±0.005 ^{ac}

注:与 N 组比较,* $P < 0.01$;与 H 组比较,^a $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;1 mm Hg=0.133 kPa

N 组; H+LTZ 组 Bcl-2 含量则显著低于 H 组, Bax 含量、Bax/Bcl-2 比值显著高于 H 组 (P 均 < 0.01)。

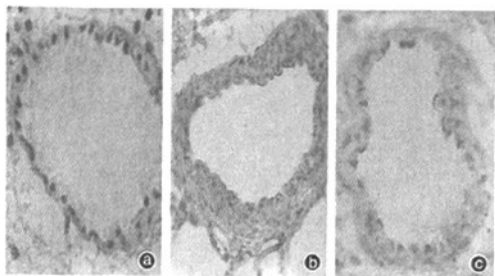


图 2 各组大鼠肺细动脉脉壁中 Bcl-2 蛋白表达(免疫组化, $\times 400$)

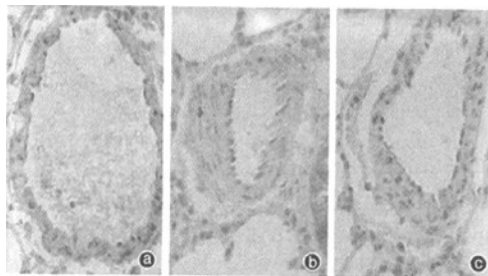


图 3 各组大鼠肺细动脉脉壁中 Bax 蛋白表达(免疫组化, $\times 400$)

2.4 AI 与 Bcl-2、Bax、Bax/Bcl-2 比值的关系: 直线相关分析显示, AI 与 Bcl-2 呈显著负相关 ($r_1 = -0.904, P < 0.01$), 与 Bax、Bax/Bcl-2 比值呈显著正相关 ($r_2 = 0.940, r_3 = 0.968, P$ 均 < 0.01)。

3 讨论

本实验中通过间断给予低 O_2 高 CO_2 复制出低 O_2 高 CO_2 肺动脉高压大鼠模型, 类似临床 COPD 患者由于通气功能障碍导致的肺泡低 O_2 和 CO_2 潴留, 选用该模型可能更符合临床实际。肺血管重建被认为是慢性低 O_2 高 CO_2 所致肺动脉高压的主要病理变化^[7], 主要表现为肺细动脉平滑肌细胞肥大增生, 管壁增厚, 细胞间质增多, 中膜增厚, 外膜成纤维细胞增生, 合成和分泌细胞外基质增加。细胞凋亡信号通过各种调控蛋白的逐级传递将死亡信号传递给死亡受体, 最后导致细胞凋亡。Bcl-2 为抗凋亡基因, Bax 是促凋亡基因, Bax/Bcl-2 比值决定了是否容易发生凋亡。有研究提示, 在动物模型中血管重建与细胞凋亡密切相关^[8-9]; Bcl-2 表达减少、Bax 表达增加可导致缺氧后大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡^[10]; 而 Bcl-2 表达增加、Bax 表达减少可减轻缺血/再灌注后大鼠脑神经细胞凋亡^[11]。本实验发现, 低 O_2 高

CO_2 大鼠模型中肺细动脉平滑肌细胞凋亡减少, 说明凋亡减少是肺血管重构的重要原因; 同时还发现, 在低 O_2 高 CO_2 大鼠肺细动脉中 Bcl-2 含量增加, 而 Bax 含量及 Bax/Bcl-2 比值下降, 使得细动脉不容易凋亡。

川芎嗪可预防慢性低 O_2 高 CO_2 导致的肺动脉管壁胶原沉积^[4], 有抑制大鼠肺细动脉管壁增厚、中膜平滑肌增生、外膜胶原纤维增生等作用。杨茂农等^[5-6]研究证明, 逆转肺血管结构重建可恢复肺血管的正常结构与功能, 从而有效降低肺动脉高压。本研究中观察到, 在低 O_2 高 CO_2 情况下, 川芎嗪对肺细动脉细胞凋亡有显著影响, 表现为具有降低低 O_2 高 CO_2 大鼠 mPAP 和改善肺血管重构的作用; 使 Bcl-2 表达显著降低、Bax 表达及 Bax/Bcl-2 比值显著提高。表明川芎嗪可以降低低 O_2 高 CO_2 大鼠肺动脉高压, 其机制可能是通过上调 Bax 表达、下调 Bcl-2 表达, 从而增加 Bax/Bcl-2 比值来促进肺细动脉凋亡, 以改善肺血管重构。

参考文献

- [1] Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms[J]. Circ Res, 2006, 99(7): 675-691.
- [2] Manes A, Campana C. Pulmonary hypertension: classification and diagnostic algorithm[J]. Ital Heart J, 2005, 6(10): 834-839.
- [3] Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family[J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26(1): 61-66.
- [4] 高志杰, 王良兴, 王群姬, 等. 川芎嗪对慢性低氧高二氧化碳大鼠肺动脉压力及管壁胶原的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(5): 436-439.
- [5] 杨茂农, 王飞, 胥方元. 肺心合剂对肺动脉高压模型大鼠的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2003, 10(3): 164-166.
- [6] 杨茂农, 胥方元, 王毅, 等. 肺心合剂对肺动脉高压大鼠肺血管重建的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(4): 231-234.
- [7] McLaughlin VV, McGoon MD. Pulmonary arterial hypertension[J]. Circulation, 2006, 114(13): 1417-1431.
- [8] Cho A, Courtman DW, Langille BL. Apoptosis (programmed cell death) in arteries of the neonatal lamb[J]. Circ Res, 1995, 76(2): 168-175.
- [9] Bochaton-Piallat ML, Gabbiani F, Redard M, et al. Apoptosis participates in cellularly regulated during rat aortic intimal thickening[J]. Am J Pathol, 1995, 146(5): 1059-1064.
- [10] 谭永星, 王迪芬, 李雪梅, 等. 神经生长因子预处理对沙土鼠全脑缺血/再灌注损伤神经细胞凋亡及 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(6): 358-360.
- [11] 陆俊羽, 姚伟, 钱桂生, 等. bcl-2、bax 在 NHE-1 核酶基因转染所致缺氧大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡中的作用[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(7): 394-398.

(收稿日期: 2009-04-26 修回日期: 2009-08-17)

(本文编辑: 李银平)