

黄芪对兔肺缺血再灌注损伤保护作用的病理观察^{*}

姚华宁, 邹积俊[△], 张家衡

(武汉市中西医结合医院, 湖北武汉 430022)

〔摘 要〕目的: 探讨黄芪减轻肺缺血再灌注损伤的机制。方法: 将 24 只健康大白兔随机分两组, 肺缺血再灌注模型组 (12 只)、黄芪干预组 (12 只), 气管切开后利用人工呼吸机行单肺通气, 左肺门阻断 2h 后, 恢复双肺通气 4h 后左肺下叶组织取材, 应用光镜、电镜和免疫组织化学染色等病理检测方法观察肺缺血再灌注后肺组织病理形态学和免疫表型改变。计算受损肺泡百分率。结果: 模型组肺缺血再灌注后左肺出血加重, 肺间质及广泛肺泡腔内有水肿液, 肺泡上皮细胞肿胀, 线粒体广泛空泡化和嵴溶解。同例对照右肺大致正常。干预组因术前使用黄芪汤, 左肺组织结构完整, 少数肺泡上皮细胞线粒体轻度肿胀和空泡化。黄芪干预组受损肺泡百分率 ($P < 0.05$) 和半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3 表达量明显低于缺血再灌注模型组 ($P < 0.01$)。结论: 中药黄芪对兔肺缺血再灌注损伤有一定的保护作用。

〔关键词〕肺; 再灌注损伤; 病理学; 黄芪; 免疫组化

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000—2723(2012)03—0037—03

近年来, 单肺通气技术广泛应用于临床和治疗, 但单肺通气时非通气肺因缺氧致肺血管收缩导致血流灌注不足。双肺通气后再通气、再灌注导致大量氧自由基的释放^[1]是引起心血管术后急性肺损伤的主要原因之一。探寻抑制氧自由基的释放或调控其失衡的方法是当前需要解决的问题。

本实验应用兔 (lung ischemia reperfusion injury, LIRI) LIRI 模型, 给予黄芪汤进行干预后, 通过对肺组织病理、微观病理和免疫表型的改变, 探讨黄芪汤减轻 LIRI 的作用和机制。

1 材料和方法

1.1 材料

日本大耳白兔 24 只, 雌雄不拘, 体重 (2.5 ± 0.5) kg, 由武汉市生物制品研究所动物实验中心提供。黄芪汤为单味黄芪 15g, 浸泡 1h 后煎煮 30min, 滤出药液, 将药渣再加入适量水煎煮 30min, 滤出药液后, 合并 2 次药液, 继续煎煮浓缩成 100mL 的煎剂, 放入瓶中待用。所用药品均由本院药房提供并经鉴定。Caspase-3Ab-4 购自 Thermo Fisher Scientific 公司, SABC 试剂盒由武汉

博士德生物公司提供。

1.2 动物分组和处理

24 只日本大耳白兔随机分为 2 组 (每组 12 只)。A 组: 缺血再灌注模型组, B 组: 黄芪汤干预组。建立在体兔肺缺血再灌注损伤模型, 经耳缘静脉注射 25% 乌拉坦 (4mL/kg) 麻醉, 术中以 0.8mL/kg 间断给药维持。颈部正中切口, 逐层分离, 暴露气管, 行 Y 型气管插管, 接小动物呼吸机 (呼吸频率 30 次/分, 呼吸比 1:1, 氧浓度 100%, 潮气量 10mL/kg)。胸骨旁线纵行切开左胸, 暴露、游离左肺。

1.3 标本采集及检测

缺血再灌注模型组: 经第 5 肋间开胸, 横断胸骨, 剪开心包膜, 游离左肺动脉及左肺静脉, 开放 Y 型气管插管侧管使左肺萎陷后, 用无损伤微血管夹闭阻断左肺门 (左主支气管, 左肺动、静脉), 2h 后, 松开血管夹, 封闭气管插管侧管, 恢复左肺灌注和双肺通气。黄芪汤干预组: 于术前连续 7d 灌服黄芪汤, 2mL/kg·d, 每日量稀释为 30mL 后分 3 次服用。其他处理同 A 组。各组分别于再

* 基金项目: 湖北省卫生厅科研项目 (NO: 2007 (56) 号)

收稿日期: 2011—09—28 修回日期: 2012—05—29

作者简介: 姚华宁 (1977~), 女, 湖北武汉人, 住院医师, 主要从事病理诊断工作。△ 通讯作者: 邹积俊, E-mail: siber7314@yahoo.com.cn.

灌注后 4h 于左肺下叶取直径 1cm 肺组织，用 10% 中性福尔马林固定，予以常规石蜡包埋、切片，苏木素 - 伊红（HE）染色，光镜下观察形态学改变，并以单肺通气未缺血的右肺做为对照。

1.4 病理检查

①光镜观察：光镜下观察肺组织形态学改变并摄影。连续计数 10 个低倍视野（×200）下的损伤肺泡数（肺泡内含有 2 个以上的红细胞或（和）中性粒细胞）和肺泡总数，计算损伤肺泡数占肺泡总数的比值（IQA）， $IQA = \text{损伤肺泡数} / \text{总肺泡数} \times 100\%$ 。②透射电镜观察：取新鲜肺组织切成 1mm × 1mm × 2mm 小块，先以 4℃ 2.5% 的戊二醛单固定后，再加以 1% 锇酸双固定，丙酮脱水，超薄切片，醋酸铀和柠檬酸铅双染色，电镜下观察并摄影。③免疫组化检测：采用 SABC 法（一抗 + 生物素标记二抗 + 滴加试剂 SABC（链霉卵白素 + 辣根酶标记生物素） + 辣根酶底物显色），DAB 显色，按试剂盒说明操作。胞浆呈棕黄色着色判读为阳性细胞。用（由华东理工大学研制）吸光度分析软件进行定量分析。每张病理切片随机选择 10 个高倍视野（×400），测定每个视野的吸光度值（absorbance, A），计算平均值。

1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 正版软件进行数据处理及检验，计量资料以均数 ± 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，两组间比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 组织学变化

①大体观察：A 组缺血再灌注后，左侧肺叶颜色灰红，表面有多个出血灶。B 组缺血再灌注后，左肺呈均质淡粉色，无明显不张、出血和水肿。②光镜观察：模型组肺泡腔内大量炎性细胞渗出、出血及渗液积聚，肺组织毛细血管充血，组织结构破坏严重（图 1）。干预组（图 2）肺泡间质炎性细胞浸润及肺泡腔出血、渗出均较模型明显减轻。③电镜观察：模型组缺血再灌注后 4h，左肺部分 I 型、II 型肺泡上皮和肺血管内皮细胞胞质肿胀，线粒体空泡化，内质网扩张变形（图 3）；黄芪干预组少数肺泡上皮细胞和血管内皮细胞线粒体轻度肿胀和空泡化，细胞形态及胞浆内细胞器结构显示比较完整（图 4）。

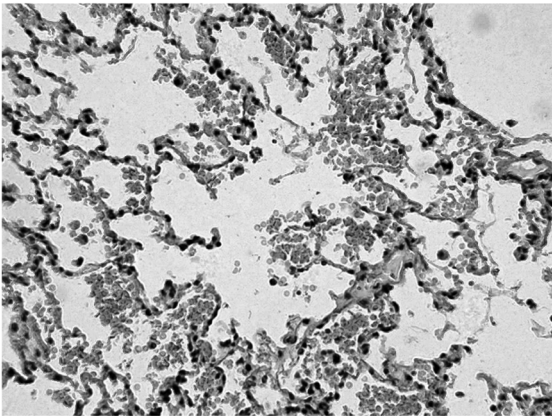


图 1 缺血再灌注模型组缺血再灌注 4h 后，左肺肺泡组织结构破坏伴大量出血（HE 染色 ×200 倍）

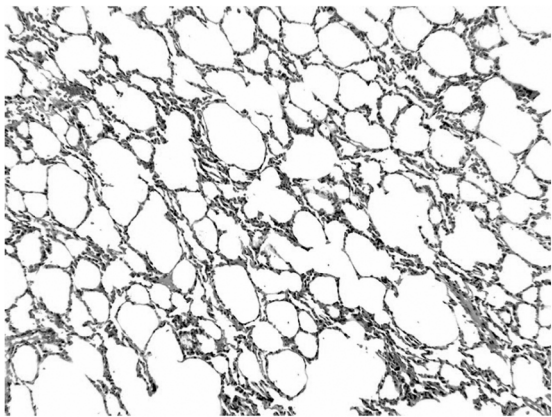


图 2 黄芪汤干预组缺血再灌注 4h，左肺肺泡组织结构基本正常（HE 染色 ×200 倍）

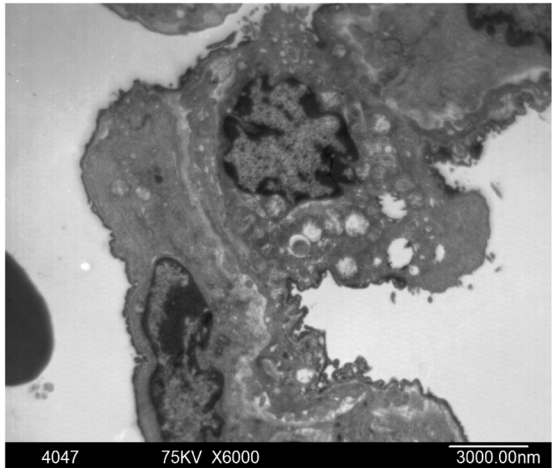


图 3 缺血再灌注模型组缺血再灌注 4h 后肺上皮细胞，线粒体明显肿胀空泡化，嵴减少或消失（75KV ×6 000倍）



图4 黄芪干预组缺血再灌注4h后肺上皮细胞, 线粒体轻度肿胀, 胞浆内细胞器结构显示比较完整 (75KV×6 000倍)

2.2 各组肺组织的Caspase-3吸光度A值和受损肺泡百分率IQA比较

Caspase-3在模型组呈强表达, 干预组呈弱表达。干预组的A值较模型组明显减低 ($P<0.01$)。干预组的肺泡受损病变IQA较模型组明显减轻 ($P<0.05$)。见表1。

表1 各组Caspase-3的A和IQA的比较/ ($\bar{x} \pm s$)		
组别	Caspase-3吸光度值 /A, mA	肺泡损伤数比值 /IQA, %
A组	0.256 ± 0.09	57.2 ± 4.3
B组	0.239 ± 0.07*	44.4 ± 3.7**

注: 同A组比较, * $P<0.01$, ** $P<0.05$

3 讨论

临床上开胸手术需长时间单肺通气以维持开胸侧肺萎缩, 为手术提供条件。单肺通气方便外科操作以及对于肺通气分布不正常的患者如肺大泡、支气管破裂等可以控制通气分布。但单肺通气时非通气肺肺泡萎陷, 肺组织血管收缩痉挛, 肺泡及间质组织出现急性期缺血缺氧性损伤; 而双肺恢复通气和灌注后引起肺组织内大量氧自由基及活性物质的释放^[2-6], 降解细胞间质的透明质酸酶及胶原而引起组织损伤, 加重了急性期肺损伤。本实验显示, 模型组血再灌注4h后, 光镜下表现为肺泡出血、

渗出, 肺泡间隔水肿, 部分肺泡结构遭到破坏。电镜下表现为肺泡上皮细胞明显肿胀, 线粒体空泡化及嵴广泛溶解, 部分细胞器溶解。模型组病理形态学改变显示肺缺血再灌注后, 大量氧化物直接损伤肺泡壁的实质细胞和结缔组织分子, 使蛋白酶更容易与肺泡壁的弹力蛋白起作用, 同时使 $\alpha-12$ 抗胰蛋白酶的活性大大降低, 加重肺气肿的发展, 使肺血管压力增高, 肺血流量减少, 肺微血管通透性增加, 继而引起肺水肿和出血。应用黄芪汤后, 光镜下干预组肺泡出血、间质水肿较模型组减轻, IQA较模型组显著减少, 电镜下仅见少量肺泡上皮细胞线粒体轻度肿胀和空泡化, 细胞结构基本完整, 细胞连接紧密正常。这表明提前给予黄芪汤, 可抑制缺血再灌注时的脂质过氧化, 从而可减轻肺缺血再灌注损伤。

Fisher等^[6]研究表明, LIRI能导致肺组织细胞过度凋亡, 引起肺损伤。半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3是诱导细胞凋亡的关键酶^[7]。肺组织经过缺血再灌注后, 氧自由基的产生急剧增加, 导致细胞凋亡相关蛋白(Caspase-3)的过度表达诱导细胞大量凋亡, 引起肺缺血再灌注损伤。本实验结果显示再灌注后应用黄芪汤的干预组, 肺组织细胞凋亡相关蛋白表达率明显低于模型组, 说明黄芪汤在肺缺血再灌注过程中可以通过明显抑制Caspase-3的表达, 减轻肺微血管内皮细胞损伤, 使血管壁通透性下降, 提高组织抗炎、抗氧化、稳定细胞膜、抑制肺泡细胞凋亡的多靶点作用, 减轻肺缺血再灌注损伤。综上所述, 黄芪对兔肺缺血再灌注损伤具有一定的保护作用, 其机制可能与其降低氧自由基水平, 抑制细胞凋亡有关。

[参考文献]

[1] Ya - Jung Cheng, Kuang - Cheng Chan, Chiang - Ting Chien et al. Oxidative stress during 1 - lung ventilation [J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2006, 132: 513 - 518.
[2] 王晓杨. 肺缺血 - 再灌注损伤中细胞因子的作用 [J]. 医学理论与实践, 2005, 18 (3): 251 - 253.
[3] Permpikul C, Wang H Y, Kriett J, et al. Reperfusion Lung injury after unilateral pulmonary artery occlusion [J]. Respirology, 2000, 5: 133 - 140.
[4] Krishnadasan B, Naidu B V, Byrne K, et al. Therole of Proinflammatory cytokines in ischemia - reperfusion injury [J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 125: 261 - 272.

(下转第42页)