文章编号:1000-5404(2009)24-2425-04

论著

bcl-2/bax表达在左向右分流型肺动脉高压肺血管重构中的作用

汪健春,钟前进,肖颖彬 (第三军医大学新桥医院全军心血管外科中心,重庆 400037)

摘 要:目的 研究bcl-2、bax蛋白表达与左向右分流型肺动脉高压肺血管重构的关系。**方法** 建立左向右分流肺动脉高压大鼠模型。比较肺血管重构指标,原位杂交和Western blot检测bcl-2和bax分布及表达,TUNEL法检测肺血管细胞的凋亡。**结果** 分流12周和16周组大鼠的平均肺动脉压力(mPAP)、右室肥大指数(RVHI)、肺小动脉中膜厚度百分比(MT%)明显高于正常大鼠($P<0.05$),肺小动脉新生内膜比率显著增加($P<0.01$)。bcl-2蛋白表达在分流12周后明显增强,分流至16周时表达最高峰($P<0.01$),而bax蛋白表达显著降低($P<0.01$)。bcl-2/bax呈上升趋势。**结论** bcl-2和bax在肺动脉上均有表达,随着bcl-2和bax比值的上调,肺血管发生重构,bcl-2/bax比值失衡可能是大鼠左向右分流PAH形成的机制之一。

关键词: 肺动脉高压;肺血管重构;bcl-2;bax
中图法分类号: R322.121;R341;R543.202 **文献标识码:** A

Role of bcl-2 and bax expressions in pulmonary vascular remodeling of PAH rats secondary to left-right shunt CHD

WANG Jian-chun, ZHONG Qian-jin, XIAO Ying-bin (Cardiovascular Surgery Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the roles of the expressions of B cell lymphoma-2 (bcl-2) and Bcl-assosiated X (bax) in the pulmonary vascular remodeling (PVR) of pulmonary arterial hypertension (PAH) secondary to left-right shunt congenital heart disease (CHD). **Methods** A total of 80 SPF SD rats were randomly divided into 8 groups, shunt groups (SⅠ, SⅡ, SⅢ and SⅣ) and control groups (CⅠ, CⅡ, CⅢ and CⅣ). PAH rat model was established in the shunt groups by left-to-right shutting, and the control groups received sham operation. The rats from Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ and Ⅳ groups were sacrificed in 4, 8, 12 and 16 weeks after operation. Mean pulmonary arterial pressure (mPAP) was recorded. Pathologic observations were made to assess pulmonary vascular remodeling. Their lung tissues were detected by *in situ* hybridization histochemistry (ISHH) technique and Western blotting for bcl-2 and bax. And apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells (PSMCs) and endothelial cells (ECs) were also detected by TUNEL. **Results** After 12 weeks or 16 weeks shunt, following indexes of the shunt groups were significantly higher than the control groups ($P<0.05$, 0.01), such as mPAP, right ventricular hypertrophy index (RVHI), percentage of small pulmonary arteries media thickness (MT%), and ratio of neointimal formation in pulmonary arterioles. The expression of bcl-2 protein were significantly increased after 16 weeks' shutting ($P<0.01$), but bax was significantly decreased ($P<0.01$), bcl-2/bax was significantly increased with the tendency of bcl-2. **Conclusion** bcl-2 and bax are expressed in pulmonary artery. The ratio of bcl-2/bax plays an important role in proceeding of PVR in PAH induced by left-right shunting, and its elevation seems related to the development of pulmonary vascular remodeling during PAH, and possibly is involved in PVR.

Key words: pulmonary arterial hypertension; pulmonary vascular remodeling; B cell lymphoma-2; Bcl-assosiated X

基金项目: 全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MA187)
Supported by the General Program of the "Eleventh Five-year Plan" of Medical Scientific Research of PLA (06MA187)
作者简介: 汪健春,男,湖南省常德市人,硕士,主治医师,主要从事先天性心脏病肺动脉高压形成机制及防治方面的研究。E-mail:raman1@163.com
通信作者: 钟前进,电话:(023)68774607,E-mail: zhongqj@online.cq.cn
收稿日期: 2009-06-17;**修回日期:** 2009-08-10

左向右分流型先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)继发肺循环高灌注性肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH),严重地影响着患者的预后。左向右分流型 PAH 的重要病理特征是肺血管重构(pulmonary vascular remodeling, PVR)形成[1-3]。肺血管内皮细胞(endothelial cells,ECs)和平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PSMCs)是 PVR 的主要作用细胞。ECs 和 PSMCs 的凋亡状态异常是 PVR 形成的关键。B-细胞淋巴瘤/白血病-2 原癌基因(bcl-2)是调控细胞增殖与凋亡状态的基因家族,其成员 bcl-2、bax 共同调节细胞的凋亡,bcl-2 和 bax 在左向右分流型 PAH 的 PVR 过程中的表达变化特点尚不明确。本研究观察 bcl-2 和 bax 在左向右分流型 PAH 动物模型肺血管中的表达情况,旨在探讨 bcl-2 和 bcx 在左向右分流型 PAH 中的作用。

1 材料与方法

1.1 左向右分流动物模型的建立

健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 80 只(4 周龄,体质量 95 ~ 110 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),适应性饲养 1 周后,随机区组设计分为 8 组(分流组 SⅠ、SⅡ、SⅢ、SⅣ,对照组 CⅠ、CⅡ、CⅢ、CⅣ,$n=10$;Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ组分别为饲养 4、8、12、16 周)。参照宋光民等[4]的血管连接方法自制改良聚乙烯血管连接套管(近心端、远心端内/外径分别为 0.6 mm/0.8 mm、0.8 mm/1.0 mm,长 1.6 mm),术前经高压灭菌消毒,备用。采用颈动静脉分流法建立 PAH 模型[5]。实验结束时,所有大鼠按5 mg/kg 腹腔追加麻药。分流组手术用时(32.2 ± 7.4)min,术后大鼠苏醒时间(2.3 ± 0.4)h,苏醒后即恢复饮水,苏醒后 4 h 恢复进食,予肝素[2 mg/(kg · d)]腹部皮下注射抗凝 1 周。

1.2 肺动脉压力及右室肥厚评价

1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔内注射麻醉,经左颈外静脉置管至肺动脉检测平均肺动脉压(mean pulmonary arterial pressure, mPAP)[6]。测压后,颈动脉放血法处死大鼠,开胸取出大鼠心脏,分离出右心室(RV) 和左心室 + 室间隔(LV + SP),滤纸吸干后分别称量,计算 RVHI[RVHI = RV/(LV + SP)]。

1.3 肺组织的准备

本实验每只大鼠均取右下肺置于液氮中保存。取右中肺叶用 4% 多聚甲醛固定, 常规脱水、透明、石蜡包埋,切成 5 μm 切片,行 HE 染色和 Masson 染色。

1.4 肺血管形态学观察及评分标准

1.4.1 肺小动脉病理改变 光镜下,着重观察管径不等的肺小动脉壁内、中、外膜 3 层结构的变化。按 Heath 与 Edwards[1]的方法将肺血管病理改变分级。

1.4.2 血管中膜厚度百分比 血管外径(ED)的测量为任意横断面上外弹力膜之间的平均距离,直径在 50 ~ 200 μm 者定义为中等动脉。血管中膜厚度为外弹力膜到内弹力膜之间的距离,至少测量 10 条中等肺动脉以计算血管中膜厚度占管径百分比[MT% = 2 × MT/ED × 100%][7]。

1.4.3 新生内膜增殖度 Masson 染色(×400)下,每张切片随机观察 20 条中等动脉有无新生内膜形成。

新生内膜增殖度 = 有新生内膜的血管数/20 × 100%。

1.5 肺组织 bcl-2 和 bax 检测及细胞凋亡检测

1.5.1 原位杂交检测 bcl-2 和 bax 在肺小动脉的分布 石蜡切片原位杂交检测 bcl-2 和 bax 分布,方法参照说明书(bcl-2、bax 原位杂交试剂盒购于武汉博士德生物有限公司)。

1.5.2 Western blot 检测 bcl-2 和 bax 蛋白表达[8] 抗体及其工作浓度:兔抗 bcl-2、兔抗 bax(Santa Cruz,USA,中山金桥进口分装),工作浓度分别为 1∶1 500 及 1∶1 000,山羊抗 GAPDH(Santa Cruz,USA,中山金桥进口分装),工作浓度为 1∶8 000。二抗为鼠抗兔 IgG,工作浓度为 1∶2 000;GAPDH 的二抗为抗羊 IgG,工作浓度为 1∶2 000。

1.5.3 凋亡检测 采用 TUNEL 法检测肺血管平滑肌细胞凋亡情况,方法参照说明书(TUNEL 原位杂交试剂盒购于碧云天生物技术研究所)。

1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件行 t 检验。

2 结果

2.1 术后大鼠存活情况

左向右分流大鼠术后 72 h 大鼠均成活,分流 12 周组(SⅢ)于 8 周时非疾病意外死亡 1 只($n=9$),其余大鼠均无死亡,解剖显示分流通畅,肺脏充血。

2.2 mPAP 变化

分流后 mPAP 即呈现升高,分流 12 周和 16 周 mPAP 较对照组明显增高($P<0.05$,$P<0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 mPAP、RVHI、MT% 及新生内膜增殖度变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	mPAP(mmHg)	右室肥厚指数	MT%	新生内膜增殖度(%)
CⅠ	10	11.07 ± 1.14	0.30 ± 0.02	17.12 ± 1.77	0.00
SⅠ	10	14.02 ± 1.37	0.32 ± 0.01	18.32 ± 5.47	0.00
CⅡ	10	10.94 ± 1.83	0.31 ± 0.04	18.24 ± 1.48	0.00
SⅡ	10	16.10 ± 3.17	0.27 ± 0.03	25.95 ± 2.75[a]	2.37 ± 1.10
CⅢ	10	10.57 ± 1.82	0.28 ± 0.02	21.94 ± 1.27	0.00
SⅢ	9	17.23 ± 2.58[b]	0.39 ± 0.03[b]	35.07 ± 3.64[a]	20.07 ± 2.43[a]
CⅣ	10	11.74 ± 2.15	0.30 ± 0.04	28.95 ± 1.96	0.00
SⅣ	10	23.14 ± 3.61[a]	0.57 ± 0.02[a]	60.28 ± 5.25[a]	83.34 ± 3.94[a]

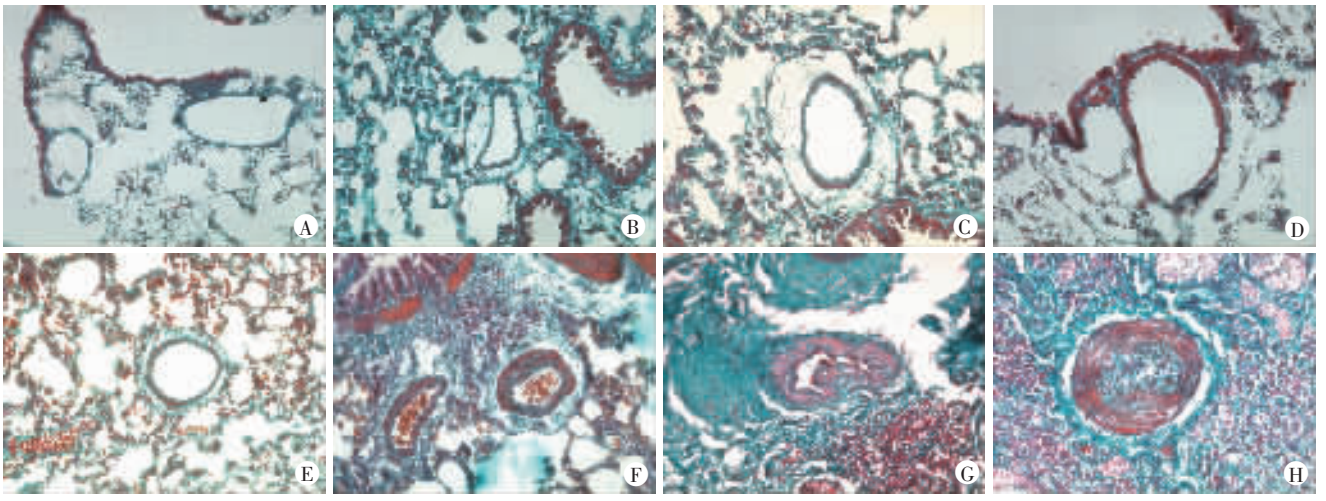
C:对照组;S:分流组;Ⅰ:4 周组;Ⅱ:8 周组;Ⅲ:12 周组;Ⅳ:16 周组;a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与同时间点对照组比较

2.3 右室肥厚指数变化

高血流状态引起右心室肥大:RVHI 在分流 12 周时出现明显增加,分流至 16 周时增加显著($P<0.01$)。见表 1。

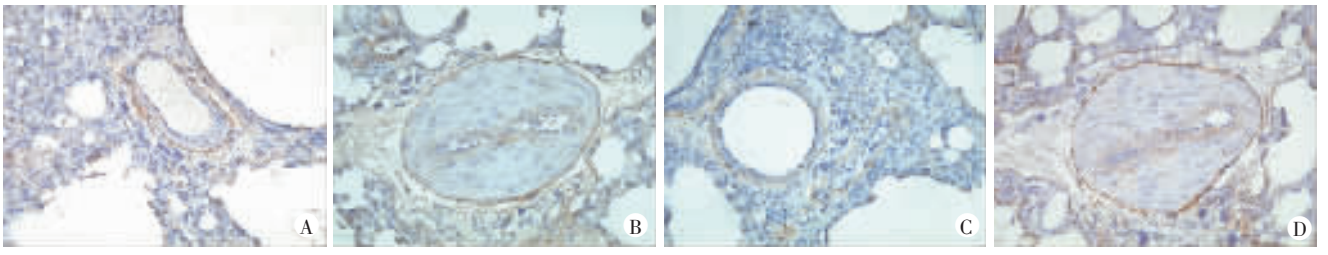
2.4 肺小动脉变化

见表 1、图 1。分流 4 周时,可见血管纤维排列整齐,血管中层纤维无增多,Heath 与 Edwards 法分级为Ⅰ ~ Ⅱ级(图 1E)。分流 8 周时,可见血管纤维排列整齐,血管中层纤维无明显增多,MT% 增加显著($P<0.01$),分级为Ⅱ ~ Ⅲ(图 1F)。分流 12 周时,血管各层均可见,血管中膜可见纤维增多,血管内膜板层样结构形成,MT% 增加显著($P<0.01$),分级为Ⅲ-Ⅳ级(图 1G)。分流至 16 周时,血管中膜明显增生,可见血管纤维排列不齐,大部分血管中层纤维增多,PSMCs 呈现空泡样变,MT% 增加显著($P<0.01$),病理分级≥ Ⅳ级(图 1H)。



A:对照 4 周组; B:对照 8 周组;C:对照 12 周组;D:对照 16 周组;E:分流 4 周组; F:分流 8 周组;G:分流 12 周组;H:分流 16 周组

图 1　各组大鼠肺血管形态学观察　(Masson ×400)



A:对照组 bcl-2 的表达; B:分流组 bcl-2 的表达; C:对照组 bax 的表达; D:分流组 bax 的表达

图 2　bcl-2 和 bax 在 2 组 16 周时大鼠肺小动脉的表达　(*In situ* ×400)

2.5　肺小动脉新生内膜观察

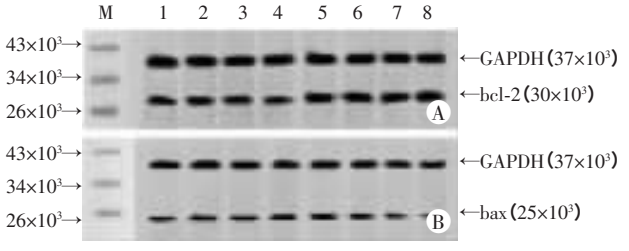
新生内膜的形成是严重 PAH 的特征性病理学改变。本研究发现，正常对照组大鼠的肺小动脉均未见新生内膜,分流 12 周、16 周组 15 ~ 150 μm 的肺小动脉出现新生内膜率显著增加($P<0.01$),见表 1。

2.6　肺血管 bcl-2 和 bax 定位

分流组大鼠与正常对照组大鼠的肺组织 bcl-2、bax 原位杂交显示,分流组大鼠与对照组大鼠的肺动脉内皮细胞和平滑肌细胞均有 bcl-2 和 bax 的表达(图 2)。

2.7　bcl-2 和 bax 蛋白的表达

bcl-2 和 bax 在分流 4 周时均呈现增强,PVR 形成时,bcl-2 持续增高,bax 表达低于正常并持续下降(图 3,表 2),分流 16 周时,bax 表达量降到最低($P<0.01$)。SⅡ、SⅢ、SⅣ组 bcl-2/bax 比值均较对照组有显著差异($P<0.05$、$P<0.01$,图 4)。



M:标准; 1: 对照 4 周组; 2: 对照 8 周组; 3: 对照 12 周组; 4: 对照 16 周组; 5: 分流 4 周组; 6: 分流 8 周组; 7: 分流 12 周组; 8: 分流 16 周组

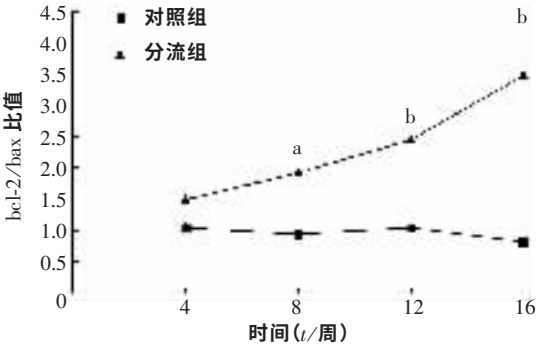
A:bcl-2 蛋白表达;B:bax 蛋白表达

图 3　各组大鼠肺组织 bcl-2 和 bax 蛋白表达变化

表 2　各组大鼠肺组织 bcl-2、bax 及 TUNEL 变化　($\bar{x}\pm s$)

组别	n	bcl-2	bax	TUNEL
CⅠ	10	0.54 ± 0.02	0.52 ± 0.07	0.71 ± 0.23
SⅠ	10	0.88 ± 0.03	0.59 ± 0.06	0.68 ± 0.26
CⅡ	10	0.54 ± 0.07	0.56 ± 0.06	0.75 ± 0.27
SⅡ	10	0.97 ± 0.05	0.51 ± 0.07	0.61 ± 0.21
CⅢ	10	0.58 ± 0.11	0.55 ± 0.06	0.74 ± 0.16
SⅢ	9	1.02 ± 0.14[a]	0.42 ± 0.08[a]	0.41 ± 0.20[a]
CⅣ	10	0.49 ± 0.09	0.58 ± 0.06	0.74 ± 0.22
SⅣ	10	1.00 ± 0.15[b]	0.30 ± 0.10[b]	0.21 ± 0.17[b]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与同时间点对照组比较



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与对照组同时间点比较

图 4　各组大鼠肺组织 bcl-2/bax 比值变化趋势

2.8　PSMCs 凋亡变化

TUNEL 法检测阳性细胞比率在第 8 周下降($P<0.05$), 到第 16 周时低至分流 4 周的 1/3 ($P<0.01$),见表 2。

3 讨论

肺血管重构是PAH形成的重要病理基础,肺血管重构特征性地表现为非肌性小动脉肌化、肌性动脉中膜肥厚、新生内膜形成、"丛样病变(plexiform lesions)"形成。而后两者是严重PAH的标志性改变[9-14]。本研究构建的PAH模型显示,左向右分流组大鼠的mPAP、RVHI、MT%明显高于正常大鼠,在分流16周时,新生内膜肺小动脉比率显著增多,新生内膜见于PAH的Heath - Edwards分级Ⅱ级以上病变,是进行性PAH区别于可逆轻症PAH的病理学标志。在我们的动物模型中,成功地模拟了PAH这一疾病变化过程。

bcl-2基因家族与线粒体调控细胞凋亡中的作用密切相关。抑制细胞凋亡bcl-2和促进细胞凋亡的bax是bcl-2家族的主要员,ECs和PSMCs中均有bcl-2和bax的表达(图4)。它们相互竞争形成同源或异源二聚体,通过调控线粒体变化间接调控蛋白酶和核酸酶活性,双相调节细胞凋亡。研究发现,bcl-2定位在线粒体外膜称为PT孔的线粒体通透性转运孔道,而bax则散布在基质中,呈可溶性。外源性或内源性的刺激因子作用于细胞线粒体时,促凋亡的bcl-2基因家族可促进PT孔开放,释放细胞色素C,激活Caspase级联反应,与凋亡蛋白酶激活因子1(Apaf-1)结合,启动Apaf-1-Caspase-9~Caspase-3细胞凋亡蛋白级联反应,诱导细胞凋亡。而抑凋亡的bcl-2基因家族可抑制PT孔的开放[13]。PAH大鼠肺组织中bcl-2和bax蛋白的表达趋势相反。bcl-2和bax可能通过以下途径影响细胞凋亡:①bax含有BH3结构域,bcl-2能与BH3结构域结合,bcl-2蛋白的过度表达,bax的相对可结合BH3结构域明显减少,转位到线粒体膜的bax减少,PT孔开放数减少,正常细胞增殖凋亡"开关"功能异常[14]。②bcl-2形成离子通道的三维空间结构,其中心是2个α螺旋(α5、α6)组成的发夹结构,周围围绕着5~8个疏水α螺旋,bax蛋白也能形成离子通道,但相对bcl-2形成的离子通道选择性偏低。过度表达的bcl-2蛋白,可能存在竞争性抑制bax蛋白参与离子通道的形成[15],使可能开放的离子通道关闭,抑制细胞凋亡。bcl-2和bax形成了细胞凋亡的正负调控,因此二者的比例可能在一定范围内决定了细胞凋亡的趋向性。实验结果显示,bcl-2/bax比值在(0.84~1.50)范围内,即使mPAP增高,血管壁仍未出现明显病理改变,而bcl-2/bax>1.8时,PVR形成,MT%显著高于正常对照组(SⅡ、SⅢ、SⅣ组,$P<0.01$),同时PVR程度与bcl-2/bax呈现明显正相关[SⅢ组:bcl-2/bax>2,MT%为(35.07±3.64)%,Heath与Edwards法分级为Ⅲ~Ⅳ级。SⅣ组:bcl-2/bax>3,MT%为(60.28±5.25)%;细胞凋亡显著减少;Heath与Edwards法分级≥Ⅳ级],说明bcl-2/bax比值越大,PVR程度越重,提示对bcl-2/bax比值的检测可能有助于对PAH严重程度进行评估。

因此,我们认为左向右分流型PAH形成过程中,bcl-2和bax蛋白共同参与了PVR的进程,bcl-2/bax比例失衡是左向右分流型PAH形成的机制之一。对凋亡调控蛋白bcl-2家族的干预,有可能成为治疗肺动脉高压的有效靶点。但这样的复杂过程所涉及的信号传导通路及其调控因素却有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] Heath D, Edwards J E. The pathology of hypertension pulmonary vascular disease[J]. Circulation, 1958, 18(4 Part 1): 533-547.

[2] Stenmark K R, Fagan K A, Frid M G. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms[J]. Circ Res, 2006, 99(7): 675-691.

[3] Jeffery T K, Morrell N W. Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2002, 45(3): 173-202.

[4] 宋光民, 宋惠民, 李德才, 等. 套管连接法建立大鼠颈部心脏移植模型[J]. 中华器官移植杂志, 2000, 21(4): 218-219.

[5] 汪健春, 钟前进. 应用左向右分流建立大鼠慢性肺动脉高压模型及其特征[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(41): 8183-8186.

[6] 孙 波, 刘文利. 右心导管测定大鼠肺动脉压的实验方法[J]. 中国医学科学院学报, 1984, 6(6): 465-468.

[7] Jouannic J M, Roussin R, Hislop A A, *et al*. Systemic arteriovenous fistula leads to pulmonary artery remodeling and abnormal vasoreactivity in the fetal lamb[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 285(3): L701-L709.

[8] Li X, Zhang Q, Cai L, *et al*. Inhibitor of growth 4 induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cell line A549 via Bcl-2 family proteins and mitochondria apoptosis pathway[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(6): 829-835.

[9] Diller G P, Gatzoulis M A. Pulmonary vascular disease in adults with congenital heart disease[J]. Circulation, 2007, 115(8): 1039-1050.

[10] Haworth S G. Role of the endothelium in pulmonary arterial hypertension[J]. Vascul Pharmacol, 2006, 45(5): 317-325.

[11] Jain S, Ventura, H, deBoisblanc B. Pathophysiology of pulmonary arterial hypertension[J]. Semin Cardiothorac Vasc Anesth, 2007, 11(2): 104-109.

[12] Uzunpinar A, Cilingiroglu M. Pulmonary arterial hypertension[J]. Curr Atheroscler Rep, 2009, 11(2): 139-145.

[13] Reed J C. Double identity for proteins of Bcl-2 family[J]. Nature, 1997, 387(6635): 773-776.

[14] Skommer J, Wlodkowic D, Deptala A. Larger than life: Mitochondria and the Bcl-2 family[J]. Leuk Res, 2007, 31(3): 277-286.

[15] Adams J M, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential[J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19(5): 488-496.

(编辑 汪勤俭)