基础研究 文章编号:0253-3626(2009)08-0996-04

高压氧与甘露醇联合作用对不同时相肢体缺血再灌注损伤细胞凋亡与组织超微结构的影响

高 博[1],任 为[1],张 彦[2],宋 红[3],赵 渝[1]
(1.重庆医科大学附属第一医院血管外科;2.重庆医科大学医学检验系;
3.重庆医科大学公共卫生学院,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究肢体缺血-再灌注损伤的发生和病理改变,探讨高压氧与甘露醇联合作用对不同时相肢体缺血再灌注大鼠的凋亡及组织超微结构的影响。方法:将 204 只 SD 大鼠随机分组,各组均持续缺血 8 h,分别行再灌注 0、4、24、72 h,连续 5 d 经甘露醇和/或高压氧干预,制备石蜡切片检测大鼠肌肉组织中细胞凋亡相关基因 Bax、Bcl-2 的表达;以大鼠腓肠肌制备电镜标本,观察骨骼肌超微结构变化。结果:所有干预组较 Control 组在再灌注后 4、24、72 h 3 个时点 Bax 含量均显著降低;HBO 组、甘露醇-HBO 组较 Control 组在再灌注后 4、24 h 2 个时点 Bcl-2 均显著升高。甘露醇组较 Control 组在再灌注后 4 h Bcl-2 均显著升高。高压氧治疗后,骨骼肌细胞肿胀及炎性细胞浸润均较轻,微血管内几乎无微血栓形成,肌小节极少断裂,质膜较少破坏,少数线粒体肿胀,髓样结构形成。高压氧与甘露醇联合作用显著优于单用高压氧或甘露醇($P<0.05$)。高压氧作用显著优于甘露醇作用($P<0.05$)。结论:本实验应用甘露醇联合高压氧作用于不同时相缺血再灌注肢体,产生了较显著的保护作用。

【关键词】缺血再灌注损伤;细胞凋亡;高压氧
【中国图书分类法分类号】R605;R332 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-11

Combined effects of hyperbaric oxygen and mannitol on the apoptosis and ultramicrostructure changes of cells of limb ischemia and reperfusion injury of different phases in rats

GAO Bo, et al
(*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical Uniwersity*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the occurrence and pathological changes of the limb ischemia- reperfusion injury of different phases and the combined effects of hyperbaric oxygen and mannitol on the apoptosis and ultramicrostructure changes of rats. *Methods*: 204 SD rats were randomly divided into various groups, underwent different phases of reperfusion after 8 hours of sustained ischemia, and treated with hyperbaric oxygen and/or mannitol for five days. The expression of cell poptosis-related gene Bax, and Bcl-2 was detected through the paraffin sections of rat skeletal muscle. Electron microscope was used to observe the ultramicrostructure changes of the gastrocnemius muscle under the effects of different interventions. *Results*: In all the intervention groups the Bax levels at 4 h, 24 h, 72 h after reperfusion were significantly less than in the control groups. In HBO and mannitol-HBO groups the Bcl-2 levels at 4 h, 24 h were significantly higher than in the control groups. And in mannitol groups the Bcl-2 levels at 4h were significantly higher. In hyperbaric oxygen groups, the cellular swelling of skeletal muscle and the local cytokine response were significantly lower, almost without microvascular thrombosis in capillary vessel. The sarcomere was rarely collapsed, little plasma membrane was shattered, little mitochondrial swelled or changed into the myelinfigure. The combined effects of hyperbaric oxygen and mannitol were significantly better than single-use of hyperbaric oxygen or mannitol ($P<0.01$). The role of hyperbaric oxygen was significantly better than mannitol ($P<0.05$). *Conclusion*: The combined effects of hyperbaric oxygen and mannitol has a more significant role in the protection against the limb ischemia and reperfusion of different phases.

【Key words】Ischemia-reperfusion injury; Apoptosis; Hyperbaric oxygen

作者介绍:高 博(1981-),男,硕士,
研究方向:血管外科基础与临床研究。
通讯作者:任 为,男,副教授,E-mail:renwei9771@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(CSTC,2007BB5281)。

肢体缺血-再灌注损伤在目前临床工作中相当常见,其临床疗效仍不能让人满意,国内外有关学者在缺血预处理或药物预处理方面作了大量工作,

但因后期疗效较差或费用昂贵，均难广泛用于临床，因此，本实验着眼于高压氧(Hyperbaric oxygen，HBO)与甘露醇(Mannitol，MNT)这两个临床较常见的治疗手段，旨在研究肢体肢体缺血-再灌注损伤的发生和病理改变，探讨二者联合作用对不同时相缺血再灌注肢体的凋亡及组织形态学影响，以期为其临床防治工作提供部分理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型建立、分组与干预

1.1.1 动物模型建立 采用止血带建立大鼠右下肢缺血模型[1]。止血带结扎，持续缺血 8 h 后松解止血带行再灌注。预试验证实不完全缺血 8 h 以上方可产生再灌注损伤。经瑞典 PERIMED 公司的 Periflux 5001 型激光多普勒灌注监测仪证实各组对象再灌注后患肢血供良好。

1.1.2 动物及分组 重庆医科大学实验动物中心的健康 SD 大鼠 204 只，体重约 250~300 g，雌雄对等。将 SD 大鼠随机分为 5 大组，除空白对照组(12 只)外，其余每大组再分为 4 小组，每小组 12 只，雌雄对等，各小组再灌注时间不同。

1.1.3 各组对象的干预 空白对照组(Sham 组)：仅刮除结扎部位体毛，不做缺血再灌注，连续 5 d 经腹腔注射同体积生理盐水。对照组(Control 组)：持续缺血 8 h，4 个小组分别行再灌注 0、4、24、72 h，连续 5 d 经腹腔注射同体积生理盐水。甘露醇处理组(MNT 组)：缺血 8 h，各小组分别行再灌注 0、4、24、72 h，连续 5 d 经腹腔注射 20%甘露醇 2 ml。高压氧处理组(HBO 组)：缺血 8 h，各小组分别行再灌注 0、4、24、72 h，并连续 5 d 经腹腔注射同体积生理盐水，经过高压氧处理。甘露醇合并高压氧处理组(MNT-HBO 组)：缺血 8 h，各小组分别行再灌注 0、4、24、72 h，连续 5 d 经腹腔注射 20%甘露醇 2 ml，并经高压氧处理。甘露醇(20% 250 ml / 瓶 西南药业生产)按 10 ml/(kg·d)连续 5 d 经腹腔注射。

将试验动物置于 DWC150-300 型动物专用高压氧舱行高压氧疗，绝对压力为 0.2 MPa，治疗时间 120 min /d，持续 5 d；具体为：将大鼠置于实验舱内，纯氧洗舱 5 min，升压 15 min 至 0.1 MPa 后稳压，吸纯氧 60 min，减压 45 min。

1.2 细胞凋亡相关基因 Bax、Bcl-2 检测

切取缺血再灌注肢体骨骼肌标本制备石蜡切片检测样品中 Bax、Bcl-2 的表达水平。取缺血再灌注肢体骨骼肌标本于 4%多聚甲醛中固定，制备石蜡切片备用。以 SP 试剂盒(北京中杉生物公司生产)经免疫组化法检测样品中 Bax、Bcl-2 的表达水平。阴性对照用 PBS 代替一抗。高倍镜下，胞浆呈棕色着色者为阳性反应部位。标记强度用灰度值来表示，应用 HPIAS.1000 高清晰度彩色病理图文报告分析系统(9.0)测定 Bcl-2、Bax 蛋白的灰度值。

1.3 形态学检测

自缺血再灌注肢体腓肠肌切取电镜标本，于 0.5%戊二醛中固定，制备超薄切片于透射电镜下观察不同干预措施下骨骼肌超微结构变化。

1.4 统计学处理

统计分析采用 SAS 8.2 统计软件进行分析，资料满足正态性和方差齐性，检验造模是否成功采用单因素方差分析，实验组与对照组间的差异比较采用 Dunnett-t 检验；对三因素实验设计的统计分析采用三因素的析因设计方差分析，并对因素水平间的差异进行两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 各组大鼠组织中细胞凋亡相关基因 Bax、Bcl-2 的表达水平变化(见表 1、2)

Control 组再灌注后各时点与对照组间的 Dunnett-t 检验。随着再灌注时间的延长，Bcl-2 蛋白表达水平在短时间内升高，而后逐渐下降，至再灌注 24 h，已与再灌注前相似；Bax 蛋白表达水平则逐渐升高。Control 组再灌注后各时点 Bax、Bcl-2 的表达水平与 Sham 组行两两比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

各组资料再灌注后同时点的两两比较 MNT 组、HBO 组、MNT-HBO 组较 Control 组在再灌注后 4、24、72 h 3 个时点 Bax 含量均显著降低。HBO 组、MNT-HBO 组较 Control 组在再灌注后 4、24 h 3 个时点 Bcl-2 均显著升高；MNT 组较 Control 组在再灌注后 4 h 2 个时点 Bcl-2 均显著升高。高压氧与甘露醇联合作用显著优于单用高压氧或甘露醇($P<0.05$)。高压氧作用显著优于甘露醇作用($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠骨骼肌中细胞凋亡相关基因 Bax 的蛋白灰度值($\bar{x}\pm s$)

分组	无 MNT				有 MNT			
	0 h	4 h	24 h	72 h	0 h	4 h	24 h	72 h
无 HBO	3.75 ± 1.14	14.58 ± 1.44	27.33 ± 1.72	31.67 ± 3.58	2.75 ± 0.97	9.58 ± 1.51*	18.33 ± 2.10*	24.75 ± 1.71*
有 HBO	3.17 ± 1.11	9.17 ± 1.90*	15.83 ± 2.17*	19.00 ± 2.13*	2.17 ± 0.94	4.83 ± 1.47#+	7.83 ± 1.59#+	10.00 ± 1.81#+
Sham 组		2.00 ± 1.21						

注：* 与同时点 Control 组比较 $P<0.05$；# 与同时点 MNT 组比较 $P<0.05$；+ 与同时点 HBO 组比较 $P<0.05$；下表同

表 2 各组大鼠骨骼肌中细胞凋亡相关基因 Bcl-2 的蛋白灰度值($\bar{x}\pm s$)

分组	无 MNT				有 MNT			
	0 h	4 h	24 h	72 h	0 h	4 h	24 h	72 h
无 HBO	4.83 ± 1.34	28.17 ± 1.99	4.00 ± 0.95	3.83 ± 1.11	3.33 ± 1.07*	29.58 ± 1.96*	3.42 ± 1.00	3.83 ± 1.27
有 HBO	3.83 ± 1.11	39.17 ± 1.53*	5.92 ± 1.38*	3.00 ± 1.04	1.83 ± 1.03#*	43.83 ± 3.71#*	7.58 ± 1.51#*	2.67 ± 1.44
Sham 组		2.08 ± 0.90						

2.2 组织超微结构变化

选取再灌注损伤 24 h 后的各组标本电镜下进行形态学检测。Control 组(24 h):肌小节大量断裂,质膜广泛破坏,绝大多数线粒体肿胀,髓样结构形成。MNT 组(24 h):肌小节少量断裂,肌丝溶解,质膜有破坏,少数线粒体肿胀,髓样结构形成。HBO 组(24 h):肌小节极少断裂,质膜较少破坏,少数线粒体肿胀,髓样结构形成。MNT-HBO 组:肌小节基本正常,质膜极少破坏,微血管周围线粒体增生,无髓样结构形成。

3 讨 论

缺血-再灌注损伤的发生机制有活性氧学说、钙超载学说、炎性介质学说以及细胞凋亡学说等。1994 年 Gottlieb 等研究发现,兔缺血再灌注后的心肌细胞出现核染色质浓缩,而单纯缺血心肌细胞无此现象,提示心肌细胞凋亡参与了缺血-再灌注损伤[2]。其后,越来越多的证据表明,细胞凋亡与缺血-再灌注损伤密切相关,并在缺血-再灌注损伤的病理过程中起着重要作用。

3.1 MNT 与 HBO 联合作用对缺血-再灌注损伤细胞凋亡的影响

细胞凋亡是众多基因参与的程序化过程,Bcl-2 基因家族与凋亡密切相关。Bcl-2 基因通过抑制自由基生成、保持线粒体膜的稳定性、阻止促凋亡基因信号传递等机制实现其促进细胞生存、延长细胞寿命的作用,被称为"抗凋亡基因"[3,4]。在治疗方面,Li 等[5]通过甘露醇上调 Bcl-2 的表达从而抑制凋亡。Vlodavsky E 等[6]亦提出 HBO 通过改善组织供氧增加可 Bcl-2 的表达。朱志安等[7]通过 HBO 治疗创伤性脑损伤显著上调了 Bcl-2 蛋白的表达,并改变 Bcl-2/Bax 的比例。

Bax 基因为 Bcl-2 基因家族中的一员,但其作用和 Bcl-2 相反,属于促凋亡基因。当 Bax 表达增强时,可以拮抗 Bcl-2 的抑凋亡作用,加速凋亡发生[8]。Pastukh V 等[9]则通过甘露醇创造的高渗透压来抵抗细胞凋亡。Liu 等[10]应用 HBO 在创伤 24 h 内产生了抑制 Bax 表达,正调节 Bcl-2 表达的效果。吴伟等[11]亦提出 HBO 能抑制脑缺血细胞凋亡,其作用与上调 Bcl-2 蛋白、下调 Bax 蛋白表达有关。

本研究发现,随着再灌注时间的延长,Bcl-2 蛋白表达水平在短时间内升高,而后逐渐下降,至再灌注 24 h,已与再灌注前相似;Bax 蛋白表达水平则逐渐升高。Control 组再灌注后各时点 Bax、Bcl-2 的表达水平与 Sham 组行两两比较差异有显著性($P<0.05$),因而证实 Control 组动物产生了明显的缺血-再灌注损伤。

各干预措施在再灌注后 4、24、72 h 3 个时点可显著下调 Bax 的表达。HBO 与 MNT-HBO 联合治疗在再灌注后 4、24 h 2 个时点可显著上调 Bcl-2 的表达;MNT 在再灌注后 4 h 可显著上调 Bcl-2 的表达。说明三种干预方式在再灌注早期可有效增加 Bcl-2 的表达,抑制 Bax 的表达,抑制凋亡,减轻缺血-再灌注损伤。且分析数据发现,高压氧与甘露醇联合应用上调 Bcl-2 表达、下调 Bax 表达的效果显著优于单用高压氧或甘露醇。高压氧作用显著优于甘露醇作用($P<0.05$)。我们推断甘露醇通过高渗脱水,减轻组织水肿,清除羟自由基,减少脂质过氧化等机制调控 Bax、Bcl-2 的表达,抑制细胞凋亡;而高压氧则通过改善组织供氧,促进有氧代谢,保护质膜及离子泵功能;抑制中性粒细胞功能及血管内皮粘附分子的表达,减少血管活性物质的产生,减轻脂质过氧化,恢复细胞膜功能等机制调控 Bax、Bcl-2 的表达,减少细胞凋亡[12]。且数据分析表明二者有协同作用($P<0.05$)。

3.2 MNT 与 HBO 联合作用对缺血-再灌注损伤组织超微结构的影响

肢体缺血再灌注损伤后骨骼肌细胞结构严重破坏,肿胀明显,大量出血、坏死、炎性细胞浸润,微血管内大量血栓形成。肌小节大量断裂,质膜显著破坏,线粒体肿胀,髓样结构形成。

应用甘露醇治疗后，骨骼肌细胞结构较完整、清楚，肿胀较轻，间质无炎性细胞浸润及外渗，无出血、坏死，电镜下肌小节少量断裂，肌丝溶解，质膜有破坏，少数线粒体肿胀，髓样结构形成。可能是由于其高渗脱水作用，减少了流入细胞内的水，维持了细胞容积，防止了组织细胞和血管内皮细胞损伤，从而改善了微循环。

应用高压氧治疗后，骨骼肌细胞结构完整、清楚，个别有肿胀，有少量出血、坏死、炎性细胞浸润，微血管内几乎无血栓形成。肌小节极少断裂，质膜较少破坏，少数线粒体肿胀，髓样结构形成。应用高压氧联合甘露醇治疗后，微血管周围线粒体增生，无髓样结构形成。其机制可能为：高压氧可迅速改善组织供氧，增加能量生成，恢复细胞膜上的离子泵功能，改善细胞膜与细胞器膜通透性，保持其功能结构，避免缺血-再灌注损伤对各种器官的损害[13]。

本实验应用甘露醇联合高压氧作用于不同时相缺血再灌注肢体，有效抑制细胞凋亡，对缺血再灌注肢体的结构功能产生了较显著的保护作用。在临床对缺血-再灌注损伤的治疗中二者的应用仍有待我们深入探讨。

参 考 文 献

[1] Bonheur J A, Albadawi H, Patton G M, et al. A noninvasive murine model of hindlimb ischemia-reperfusion injury[J]. J Surg Res, 2004, 116: 55-63.

[2] Gottlieb R A, Burleson K O, Kloner R A. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes[J]. J Clin Invest, 1994, 94(4): 1621-1628.

[3] Jacobson M D. Reactive oxygen species and programmed cell death [J]. Trends Biochem Sci, 1996, 21(3): 83-86.

[4] Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptasis by Bcl-2 release of cytochrome C from mitochoodria block[J]. Science, 1997, 275 (5303): 1129-1132.

[5] Li H, Telemaque S, Miller R E, et al. High glucose inhibits apoptosis induced by serum deprivation in vascular smooth muscle cells via upregulation of Bcl-2 and Bcl-xl[J]. Diabetes, 2005, 54(2): 540-545.

[6] Vlodavsky E, Palzur E, Feinsod M, et al. Evaluation of the apoptosis-related proteins of the BCL-2 family in the traumatic penumbra area of the rat model of cerebral contusion, treated by hyperbaric oxygen therapy: a quantitative immunohistochemical study[J]. Acta Neuropathol (Berl), 2005, 110(2): 120-126.

[7] 朱志安，张 红，邱建华等. 高压氧对脑挫裂伤后脑组织 Bcl-2 及 Bax 表达的影响[J]. 上海第二医科大学学报. 2002, 22(6): 492-494.

[8] Oltvai Z N, Milliman C L, Korsmyer S J. Bcl-2 heterodimerizes in *vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed* cell death[J]. Cell, 1993, 74(4): 609-619.

[9] Pastukh V, Ricci C, Solodushko V, et al. Contribution of the PI 3-kinase/Akt survival pathway toward osmotic preconditioning[J]. Mol Cell Biochem, 2005, 269(1-2): 59-67.

[10] Liu Z, Jiao Q F, You C, et al. Effect of hyperbaric oxygen on cytochrome C, Bcl-2 and Bax expression after experimental traumatic brain injury in rats[J]. Chin J Traumatol, 2006, 9(3): 168-174.

[11] 吴 伟，汪 洋，邱 阳. 高压氧对持续局灶性脑缺血细胞凋亡的影响及其作用机制[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25(8): 458-461.

[12] Kihara K, Ueno S, Sakoda M. Effects of hyperbaric oxygen exposure on experimental hepatic ischemia reperfusion injury: relationship between its timing and neutrophil sequestration[J]. Liver Transpl, 2005, 11(12): 1574-1580.

[13] Magdi M I Y, Denis W H, Aires A B, et al. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction[J]. World J Surg, 2002, 26: 115-121.

(责任编辑：冉明会)

读者·编者·作者

参考文献著录规则

按国家标准 GB7714-87《文后参考文献著录规则》采用顺序编码制著录。参考文献中的作者，1~3 名全部列出，3 名以上只列前 3 名，后加“，等”或“，et al”。

外文期刊名称为缩写，以《Index Medicus》的格式为准；中文期刊用全名。

[期刊格式]作者.文题[J].刊名，年份，卷(期)：起页-止页.

例：[1]吴孟超，张柏和.我国肝脏外科现状和发展前景[J].中华外科杂志，1993，34(1)：515-止页.

[2]Iizuka H, Obara K, Ishijima A, et al. Correlation beween anti-Hbc titers and HBV DNA in blood units withiut detecable HbsAg[J]. Vpx Aang, 1992, 63(1): 107-止页.

[书籍格式]主编者.书名[M].版次.出版地：出版者，年份.起页-止页.(或作者.文题.见：主编者.书名[M].版次.出版地：出版者，年份.起页-止页.

例：[1]王波贞.实用妇立科学[M].北京：人民卫生出版社，1987.953-959.

[2]裘法祖.脾脏疾病.见：黄家驷，吴阶平.外科学[M].上册.北京：人民卫生出版社，1979.880-883.

本刊编辑部