维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0532-05

红花注射液对大鼠肾缺血再灌注损伤 Caspase-3 和 bcl-2 表达的影响

高 飞[1],吴小侯[1],罗春丽[2],杨 美[3]

(1.重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016;2.重庆医科大学检验系,重庆 400016;
3.重庆医科大学基础医学院解剖教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨红花注射液对大鼠肾缺血再灌注损伤凋亡相关基因 Caspase-3 和 bcl-2 表达的影响。方法:将 75 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、缺血再灌注组和治疗组。建立肾缺血再灌注损伤模型,检测肌酐和血尿渗透压值评价肾功能变化,TUNEL 法检测凋亡率,免疫组化检测 Caspase-3 和 bcl-2 蛋白表达。结果:与正常对照组相比,缺血再灌注组肾功能明显减退,凋亡率显著增加、Caspase-3 和 bcl-2 表达明显增强($P<0.01$);运用红花注射液治疗后,与缺血再灌注组相比,治疗组肾功能明显改善,凋亡率显著减少、Caspase-3 的表达明显减弱而 bcl-2 表达明显增强($P<0.01$)。结论:在肾缺血再灌注损伤过程中,红花注射液具有抑制 Caspase-3 表达和促进 bcl-2 表达的作用。

【关键词】红花注射液;缺血再灌注;凋亡;Caspase-3;bcl-2
【中国图书分类法分类号】R446.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-01-13

Effect of carthamus tinctorius L. injection on caspase-3,bcl-2 expression related to renal ischemia/reperfusion injury in rats

GAO Fei, et al

(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of carthamus tinctorius injection on expression of caspase-3 and bcl-2 after renal ischemia/reperfusion injury. *Methods*: Seventy-five SD rats were randomly divided into three groups (n=25, in each):normal control group, ischemia/reperfusion group and treatment group. After the renal ischemia/reperfusion injury model was estahlished, the serum creatinine, the urine osmotic pressure and the blood osmotic pressure were measured to evaluate the change of renal function; the apoptosis rate in ischemia/reperfusion renal tissure were measured by TUNEL method; the caspase-3 and bcl-2 concentration were measured by immunohistochemistry. *Results*: The renal function got worse,and the apoptosis rate, bcl-2 and caspase-3 concentration were significantly higher in ischemia/reperfusion group than those in normal control group. As compared with ischemia/reperfusion group, the renal function was improved, the apoptosis rate decreased, bcl-2 expression increased and caspase-3 expression decreased significantly in treatment group. *Conclusion*: Carthamus tinctorius injection has significant effect on the up-regulation of bcl-2 and down-regulation of caspase-3 expression in renal ischemia/reperfusion injury.

【Key words】Carthamus tinctorius injection;Ischemia/reperfusion;Apoptosis;Caspase-3;Bcl-2

肾缺血再灌注损伤是导致急性肾小管坏死和肾移植失败的重要因素。越来越多的研究表明,肾缺血再灌注损伤引起的细胞凋亡是缺血再灌注致肾损害的重要环节之一[1]。因此,抑制细胞凋亡的发生,对肾缺血再灌注损伤的防治具有重要的临床意义。Caspase-3 和 bcl-2 是重要的凋亡相关基因;有资料表明,在脑缺血过程研究中,红花注射液能够抑制 Caspase-3 和促进 bcl-2 表达,具有抗细胞凋亡的作用[2]。但是,红花注射液对肾缺血再灌注损伤是否有影响尚未见报道。本研究采用 TUNEL、免疫组化等方法观察红花注射液对细胞凋亡、Caspase-3 和 bcl-2 表达的影响,为红花注射液在临床上用于肾缺血再灌注损伤的防治提供实验依据。

作者介绍:高 飞(1978-),男,住院医师,硕士,
主要研究方向:肾缺血再灌注损伤。

1 材料和方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 药品与主要试剂

红花注射液，浓度 50mg/ml，规格 5ml/ 支，由山西康意制药有限公司生产，批号：200021226。肌酐检测试剂盒（北京北化），TUNEL 试剂盒（Roche 公司），兔抗大鼠 Caspase-3（Santa Cruz 公司）、兔二步法免疫组化试剂盒（北京中杉），二氨基联苯胺(DAB)显色液（北京中三）。

1.2 主要仪器

冰点渗透压测定仪（NIKKISOOS,日本），石蜡切片机（Leica,Germany），离心机，生物照相显微镜（Olypums-45,日本），北京航天航空大学 CM-2000B 型生物医学图像分析系统。

1.3 动物分组

清洁级健康 SD 大鼠 75 只，雌雄不限，同批龄 6~8 周，体重 180~200g，由重庆医科大学动物实验中心提供。随机分成正常对照组、缺血再灌注组、治疗组共 3 组，每组 25 只。

1.4 动物模型的建立及用药

参照以往方法建立肾缺血再灌注损伤模型[4]，方法如下，采用 3.5%水合氯醛 1ml/100g 腹腔麻醉后，腹横切口入腹腔，切除右肾，显露左肾蒂，用无创伤血管夹夹闭左肾蒂 45min 血管夹。各组处理方法，缺血再灌注组：采用上述方法建模，于术前 3 天每天 1 次及术后每 8h 次共 3 次，经尾静脉分别注射生理盐水 3ml/kg。治疗组：采用上述方法建模，同缺血再灌注组方法，用红花注射液 2.5ml/kg 替换生理盐水注射。正常对照组：开腹后不作处理 45min 后关腹，术前术后用药同缺血再灌注组。实验各组均于术后 12h 始禁水至 24h 处死动物。

1.5 血清肌酐测定

术后 24h 经下腔静脉取血 2ml，离心后取血清，每次各组采 1 只共 5 只，同批次碱性苦味酸法检测血清肌酐值。

1.6 血尿渗透压测定

术后 24h 经下腔静脉取血 0.5ml，膀胱穿刺取尿 0.5ml。每次各组采 1 只共 5 只，同批次采用冰点渗透压测定仪测定血、尿渗透压值，并算出尿渗透压 / 血渗透压值。

1.7 末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT) 介导的原位末端标记法 (TUNEL)测定凋亡率

按检测试剂盒说明书进行。同一部位 HE 染色组织切片在同一放大倍数下随机选取 8 个视野计算出细胞总数，计算出细胞平均凋亡率(肾凋亡细胞总数和肾细胞总数的比)。

1.8 免疫组化检测 Caspase-3 和 bcl-2 的表达

术后 24h 取左肾制作石蜡切片，常规脱蜡至水。严格按兔二步法免疫组化试剂盒操作，每张切片随机采集 5 个高倍视野，输入医学图像分析系统进行图像处理，检测 Caspase-3 和 bcl-2 表达的平均光密度值，并计数阳性细胞数及细胞总数，计算阳性表达率，所有视野均在同一光强度下检测。

1.9 统计学处理

计量资料用平均数和标准差表示，多组间均数比较采用单因素方差分析（spss 13.00 软件）。$P<0.01$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 红花注射液对肾功能的影响

与正常对照组相比较，缺血再灌注组肌酐明显升高（$P<0.01$），尿渗透压和尿渗透压 / 血渗透压值明显降低（$P<0.01$）；应用红花注射液治疗后，与缺血再灌注组相比较，治疗组血清肌酐值显著下降（$P<0.01$）尿渗透压和尿渗透压 / 血渗透压值显著升高（$P<0.01$）。见表 1，经单因素方差分析各组两两比较均有统计学差异（$P<0.01$）。

表 1 实验各组肌酐(μmol/L)、尿渗透压及尿渗透压/血渗透压值(mOsm/kg·H_2O)($\bar{x}\pm s$,n=25)

分组	正常对照组	缺血再灌注组	治疗组
血清肌酐	42.15 ± 2.55	63.51 ± 9.67	53.41 ± 7.12*
尿渗透压	2 047.32 ± 127.46	689.32 ± 47.35	1287.32 ± 129.58*
尿 / 血渗透压值	6.72 ± 0.58	2.17 ± 0.26	4.25 ± 0.36*

注：与正常对照组、缺血再灌注组相比，*$P<0.01$

2.2 TUNEL 检测结果

TUNEL 阳性细胞表现为细胞核呈黄褐色，细胞质无染色，位于肾小管上皮细胞，肾小球无表达（见图 1~3）。图像分析后，结果见表 2，缺血再灌注损伤后，与正常对照组相比，缺血再灌注组凋亡率明显

表 2 实验各组凋亡率(%)、bcl-2 和 Caspase-3 的光密度值(OD)及表达阳性率(%)($\bar{x}\pm s$,n=25)

分组	n	凋亡率	bcl-2		Caspase-3	
			光密度值	阳性率	光密度值	阳性率
正常对照组	25	2.5 ± 0.9	0.017 ± 0.005	25.7 ± 3.2	0.014 ± 0.006	32.5 ± 2.7
缺血再灌注组	25	44.7 ± 6.3	0.137 ± 0.014	62.1 ± 4.7	0.213 ± 0.023	77.8 ± 6.2
治疗组	25	33.4 ± 4.6*	0.169 ± 0.007*	72.6 ± 5.4*	0.166 ± 0.011*	66.4 ± 6.5*

注：与正常对照组、缺血再灌注组相比，*$P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 1 示正常对照组肾组织细胞凋亡，“➘”示肾小球，“↗”示 TUNEL 阳性细胞。TUNEL 法 ×400

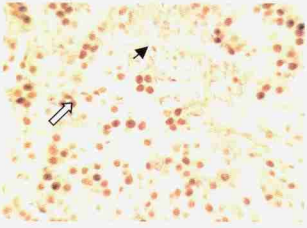


图 2 缺血再灌注组肾组织细胞凋亡，“➘”示肾小球，“↗”示 TUNEL 阳性细胞。TUNEL 法 ×400

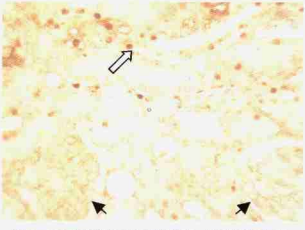


图 3 示治疗组组肾组织细胞凋亡，“➘”示肾小球，“↗”示 TUNEL 阳性细胞。TUNEL 法 ×400

升高（$P<0.01$）；运用红花注射液治疗后，与缺血再灌注组相比，治疗组凋亡率显著降低（$P<0.01$）。

2.3 红花注射液对 Caspase-3 蛋白表达的影响

Caspase-3 阳性细胞表现为细胞质呈棕黄色，

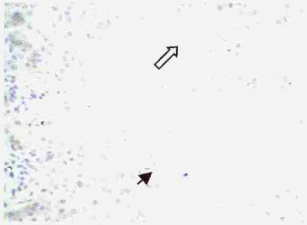


图 4 正常对照组肾组织 Caspase-3 蛋白表达，“➘”示肾小球，“↗”示 Caspase-3 阳性表达。免疫组织化学 DAB 染色苏木素复染 ×400



图 5 缺血再灌注组肾组织 Caspase-3 蛋白表达，“➘”示肾小球，“↗”示 Caspase-3 阳性表达。免疫组织化学 DAB 染色苏木素复染 ×400

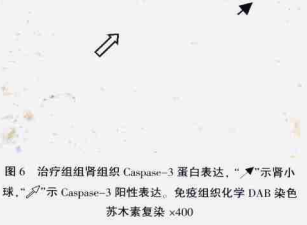


图 6 治疗组组肾组织 Caspase-3 蛋白表达，“➘”示肾小球，“↗”示 Caspase-3 阳性表达。免疫组织化学 DAB 染色苏木素复染 ×400

细胞核无着色，图中细胞核呈深蓝色系苏木素复染

维普资讯 http://www.cqvip.com

的结果。阳性表达位于肾小管上皮细胞以近曲小管上皮细胞明显,肾小球未见表达(见图 4~6)。图像分析后,结果见表 2,正常对照组只有少数细胞弱阳性表达;缺血再灌注损伤后,与正常对照组相比较,缺血再灌注组 Caspase-3 表达明显增强,阳性细胞数明显增加($P<0.01$);经红花注射液治疗后,与缺血再灌注组相比较,治疗组 Caspase-3 表达强度显著减弱,阳性细胞数也显著减少($P<0.01$)。

2.4 红花注射液对 Bcl-2 蛋白表达的影响

bcl-2 阳性细胞表现为细胞质呈棕黄色,细胞核无着色,图中细胞核呈深蓝色系苏木素复染的结果。阳性表达位于肾小管上皮细胞以近曲小管上皮细胞明显,肾小球未见表达(见图 7~9)。图像分析后,结果见表 2,正常对照组表达与 Caspase-3 类似,缺血再灌注损伤后,与正常对照组相比较,缺血再灌注组 bcl-2 表达增强,阳性细胞数增加($P<0.01$);经红花注射液治疗后,与缺血再灌注组相比,治疗组 bcl-2 表达显著增强,阳性细胞数显著增加($P<0.01$)。



图 7 正常对照组肾组织 Bcl-2 蛋白表达,"↗"示肾小球,"↗"示 Bcl-2 阳性表达。免疫组织化学 DAB 染色苏木素复染 ×400



图 8 缺血再灌注组肾组织 Bcl-2 蛋白表达,"↗"示肾小球,"↗"示 Bcl-2 阳性表达。免疫组织化学 DAB 染色苏木素复染 ×400

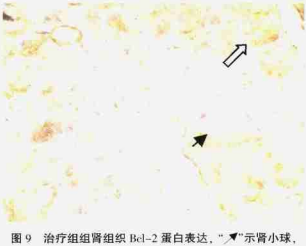


图 9 治疗组组肾组织 Bcl-2 蛋白表达,"↗"示肾小球,"↗"示 Bcl-2 阳性表达。免疫组织化学 DAB 染色苏木素复染 ×400

3 讨 论

红花系一年生菊科草本植物,性辛温,归心肝经,具有活血通经,祛瘀止痛的功效。红花注射液由红花提取精制而成,其主要含有查耳酮类、漆树黄酮、桑色素、槲皮素、杨梅素等成分[4]。研究表明,红花具有抗凋亡、抗凝、防止血栓形成和扩张血管等功效[5]。本研究以血清肌酐、尿渗透压和尿渗透压/血渗透压值作为肾功能的评价指标。结果显示,治疗组肾功能明显优于缺血再灌注组($P<0.01$)。这一结果表明,红花注射液对缺血再灌注损伤所致的肾功能损害具有显著的保护作用。TUNEL 检测结果显示,与正常对照组相比,缺血再灌注组细胞凋亡率明显升高;经红花注射液治疗后,与缺血再灌注组相比,治疗组细胞凋亡率显著下降($P<0.01$),提示红花注射液对肾功能的保护作用可能与其抗细胞凋亡有关。

研究表明[6,7],在 Fas/FasL 系统介导的细胞凋亡过程中,当 FasL 与 Fas 受体结合后,Fas 受体的细胞膜内部分通过调节分子与启动性 Caspase(如 Caspase-8)前体构成信号复合物。Caspase-8 前体经过自身裂解,激活成为具有水解酶活性的 Caspase-8。活化型 Caspase-8 进而裂解效应性 Caspase-3 前体,导致效应性 Caspase-3 活化。另一方

维普资讯 http://www.cqvip.com

面，粒酶 B 可以直接裂解效应性 Caspase-3 前体，使之活化。活化的效应性 Caspase-3 可以直接或间接地酶解与细胞存活所必需的中间丝蛋白、DNA 断裂因子(DFF)和核酸内切酶等一系列蛋白，从而引起靶细胞染色质 DNA 片段化，胞质浓缩，细胞骨架解体等一系列病理改变，导致细胞凋亡[8]。本研究结果显示，Caspase-3 于实验各组肾小管上皮细胞均有表达，以肾小管中的近曲小管表达较明显，而肾小球未见表达，这与 TUNEL 法显示的凋亡细胞分布一致。进一步观察，与正常对照组相比，Caspase-3 在缺血再灌注损伤后肾小管上皮细胞表达明显增强，阳性细胞数显著增加；经红花注射液治疗后，与缺血再灌注组相比较，治疗组肾小管上皮细胞 Caspase-3 不仅表达强度显著减弱，而且阳性细胞数也明显减少。上述结果提示，红花注射液具有抑制 Caspase-3 表达的作用，该作用可能通过以上机制阻止 Fas / FasL 系统、粒酶 B / 穿孔素系统的激活，从而抑制细胞凋亡的发生。

Bcl-2 (B-cell lymPhoma / leukemia-2)是研究最早的与细胞凋亡相关的基因之一，bcl-2 可通过直接调节线粒体膜的通透性，抑制促凋亡因子的释放对 Caspase-3 产生影响。线粒体内含有细胞色素 C、第 2 个线粒体源的 Caspase 激活物 (Smac / Diablo) 和核酸内切酶 G 等多种促凋亡因子。其中细胞色素 C 能促使 Apaf-1 （促凋亡蛋白酶激活因子 -1）及 Caspase-9 酶原信号复合体的形成，使 Caspase-9 活化并激活 Caspase-3 从而导致细胞凋亡，具有促凋亡作用[9]。本实验表明，与缺血再灌注组相比较，治疗组 bcl-2 表达强度明显增强，其阳性细胞数明显增加，提示红花注射液具有促进 bcl-2 表达的作用；bcl-2 的大量表达可降低线粒体膜的通透性，阻止促凋亡因子释放，引起 Caspase-3 表达减少，从而抑制细胞凋亡的发生。

综上所述，Caspase-3 和 bcl-2 是重要的凋亡相关基因，前者促进细胞凋亡而后者阻止细胞凋亡。本研究发现，在肾缺血再灌注损伤中，红花注射液能够抑制 Caspase-3 和促进 bcl-2 表达，具有抗细胞凋亡的作用，这可能是红花注射液抗凋亡的重要分子机制之一。

（致谢：重庆医科大学解剖教研室孙善全教授对本课题提供的无私帮助）

参 考 文 献

[1] Schumer M , Colomber MC , Sawczuk JS, et al. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia [J]. Am J Pathol, 1992; 140 (4) : 831-838.

[2] 罗 嘉，方治平，周黎明，等.红花注射液对大鼠局灶性脑缺血后梗死体积和神经元凋亡相关蛋白 bcl-2，Caspase-3 表达的影响[J].中国中药杂志，2004; 29 (10) :977-980.

[3] 刘秉乾，武玉东，马腾骧，等.血红素氧和酶 -1 对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中华实验外科杂志，2004; 21 (12) : 1531-1532.

[4] Tzeng SH , Ko WC , Ko FN, et al. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids[J].Thromb Res,1991; 64:91-100.

[5] Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V,et al. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease[J].Am-J-Med, 1999; 107(5): 489-506.

[6] Nagata S.Fas ligand-induced apoptosis [J].Annu Rev Genet,1999; 33:29-55.

[7] Ju ST , Cui H, Panka DJ, et al. Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by $CD4^+$ Th1 and $CD8^+$ cytotoxic T cell[J]. Proc Natl Acad Sci USA ,1994; 91:4185-4189.

[8] MacDonald G, Shi L, Velde CV, et al.Mitochondria-dependent and independant regulation of granzyme B-induced apoptosis [J].J Exp Med, 1999; 189:131-144.

[9] Meier P, Finch A, Evan G.Apoptosis in development [J].Nature, 2000; 407(6805):796-801.

（上接第 481 页）

cell growth on 2D and 3D alginate hydrogels [J]. J Mater Sci Mater Med, 2005;16(6):515-519.

[9] Auhin J E, Liu F, Malaval L, et al. Osteoblast and chondmblast differentiation[J]. Bone, 1995;17(2 s): 77S-83S.

[10] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999;284:143-147.

[11] Gori F, Thomas T, Hicok KC, et al. Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation[J]. J Bone Miner Res, 1999;14:1522-1535.

[12] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. Osf2/Chfa1:A transcriptional activator of osteoblast differentiation[J]. Cell, 1997;89:743-754.

[13] Stein GS, Lian JB. Molecular mechanism mediating proliferation/differentiation interrrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype[J]. Endocr Rev, 1993;14:424-442.

[14] Hauge EM, Quesel D, Eriksen EF, et al. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers[J]. J Bone Miner Res, 2001;16(9):1575-1582.