DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.028
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
66 2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)01-0066-03

CO作用后大鼠肺血管细胞增殖和凋亡状况的研究

王关嵩[1,2],钱 颋[1],蔡文琴[2],周德山[2],钱桂生[1],关 崧[1] (第三军医大学:[1]附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆,400037;[2]基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 通过研究CO和低氧作用后大鼠肺血管细胞增殖和凋亡状况,探讨低氧肺动脉高压的发病机制及防治措施。方法 应用免疫组织化学、原位末端标记及Westem杂交等方法检测常压低氧大鼠肺血管壁细胞增殖、凋亡及c-myc基因的表达状况。结果 正常组、低氧和锡原卟啉组、低浓度CO和血晶素组大鼠肺动脉均存在增殖和凋亡的阳性细胞,两类细胞在肺内呈不均匀散在分布。低氧和锡原卟啉组大鼠肺血管增殖细胞数显著升高而凋亡细胞数显著减少,细胞增殖凋亡比值分别为对照组的5倍或4倍,而低浓度CO和血晶素组肺血管增殖细胞和凋亡细胞系数均显著增加,细胞增殖凋亡比值均为1.2。c-myc在低氧和锡原卟啉组大鼠肺内表达显著增加,在低浓度CO和血晶素组大鼠肺内表达减少。结论 增殖和凋亡现象共存在于正常和处理大鼠的肺血管细胞中,也许c-myc等基因的异常表达导致了细胞增殖和凋亡的失衡,进而调节了慢性低氧肺血管结构的改建。

关键词:CO;低氧;细胞增殖;细胞凋亡;c-myc;肺血管
中图法分类号:R322.12;R329.25;R329.28 文献标识码:A

Effect of carbon monoxide on cell proliferation and apoptosis in hypoxic pulmonary vessels in rats

WANG Guan-song, QIAN Pin, CAI Wen-qing, ZHOU De-shan, QIAN Gui-sheng, GUAN Song (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of CO on cell proliferation and apoptosis in pulmonary vessels of rats after hypoxia for the pathogenesis and treating measures of hypoxic pulmonary hypertension. **Methods** A total of 60 Wistar rats were randomly and equally devided into 5 groups, i.e. control, hypoxia, hemin, SnPP, and CO groups. Immunohistochemical method, in situ terminal transferase labeling, and Western blot were used to investigate the condition of proliferation and apoptosis, and the expression of c-myc in hypoxic pulmonary vascular tissues. **Results** The proliferative and apoptotic pulmonary arterial smooth muscle cells were seen sparsely in rat lungs of all groups. The proliferative cells were significantly increased but the apoptotic cells decreased in lungs of hypoxia and SnPP groups, by 5 and 4 folds respectively compared with those of control. But in the CO and hemin groups, the proliferation cells and the apoptotic cells were increased dramatically, both by folds of 1.2 in comparison with control. The expression of c-myc in lungs of hypoxia and SnPP groups was elevated obviously, but decreased significantly in CO and hemin groups. **Conclusion** The proliferation and apoptosis are co-existent in pulmonary vessels of normal and aberrant rats. It might be the abnormal expression of c-myc which leads to the unbalance of proliferation and apoptosis, and then contributes to pulmonary vascular structural remodeling.

Key words: carbon monoxide; hypoxia; proliferation; apoptosis; c-myc; pulmonary vascular vessel

细胞凋亡是机体维持组织器官中生长与死亡之间动态平衡的重要机制。低氧性肺动脉高压(Hypoxic pulmonary hypertension, HPH)发病的重要环节之一是肺血管结构改建,其病理特征主要为肺血管壁细胞包括平滑肌细胞和成纤维细胞的增殖、肥大、移行[1,2]。目前有关肺血管结构改建中细胞增殖研究已有报道,但细胞凋亡机制是否参入少见于文献。本研究利用常压低氧舱复制低氧肺动脉高压大鼠模型,并观察低浓度CO和血晶素对大鼠肺血管组织增殖和凋亡的影响。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970329);全军"九五"科研基金面上项目(98M077)

作者简介:王关嵩(1967—),男,河南省平顶山市人,博士,讲师,主要从事慢性阻塞性肺病低氧肺动脉高压发病机制,血管内皮细胞和平滑肌细胞信号转导的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68755320

收稿日期:2001-05-10;修回日期:2001-12-06

1 材料与方法

1.1 试剂

血晶素、锡原卟啉(Sigma),细胞凋亡原位检测试剂盒(Roche),c-myc、PCNA兔抗鼠单抗(Santa cruz),SABC试剂盒(武汉博士德公司),低浓度CO气体(重庆仪表九厂)。

1.2 动物模型复制和细胞培养

选择健康成年雄性Wistar大鼠60只,体重(200±25)g(第三军医大学实验动物中心),随机分为5组,每组12只。正常对照组:放在室温下依常规方法饲养。低氧肺动脉高压组:依我所方法建立常压低氧舱,保持O_2浓度为(10±0.5)%,每天7 h,每周6 d,周日休息,持续3周。血晶素组:每日低氧前0.5 h时腹腔注入血晶素100 μmol/kg。锡原卟啉组:每日低氧前0.5 h时腹腔注入锡原卟啉100 μmol/kg;低浓度CO组:每日低氧2 h后通入调制好的50 ppm的CO 15 min。复合胶原酶法消化培养肺动脉平滑肌细胞(Pulmonary arterial smooth muscle cell,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PASMC)[3]。依常规方法制片, 称取右心室(R)、左心室(L)及室间隔(S)重量, 以 R/(L+S)表示右心室厚度。

1.3　细胞增殖及凋亡率分析

1.3.1　增殖及凋亡细胞的检测　细胞增殖检测的一抗为 PCNA, 组织化学染色采用常规 SABC 法。凋亡检测依试剂盒方法, 即 37 ℃蛋白酶 K 消化 15 min、0.3% H_2O_2 甲醛灭活内原酶, PBS 洗, 加末端转移酶与荧光标记的核苷酸反应混合液(37 ℃, 0.5 h)、PBS 洗、DAB 显色、脱水透明、封片。凋亡阴性对照为凋亡染色加反应混合液不含末端转移酶, 并用 PBS 代替一抗。

1.3.2　细胞增殖及凋亡率计算　每例标本取 5 张切片, 每张切片任取 6 个视野进行细胞记数, 每张切片至少记数 1 000 个细胞。增殖或凋亡细胞率是以明显的增殖或凋亡阳性染色细胞占同一视野细胞总数的百分比表示, 统计依同一标准进行。

1.4　Western blot[4]

洗细胞两次后收集, 非离子去污剂 saponon(0.05%, 溶于 PBS 中)处理细胞 10 min, 1 000× g 离心收集沉淀。沉淀溶于 SDS 中, 用 7.5% 的 SDS-PAGE 电泳分离后, 电转移至硝酸纤维素膜上, 再用 5% BSA 在 37 ℃下封闭 20 min 后, 加入一抗与 37 ℃温育 1.5~2 h, 充分洗涤后用 BSA 封闭 30 min, 再加入 AP 耦联的羊抗鼠 IgG 二抗, 37 ℃温育 1~1.5 h, 充分洗涤后, 加入底物 BCIP/NBT 显色。

2　结果

2.1　肺血管壁厚度和右心室重量情况

HE 染色发现, 缺氧和锡原卟啉组肺血管壁厚度增加显著, 但血晶素和低浓度 CO 组肺小血管壁无明显增厚, 见图 1、2。缺氧和锡原卟啉组大鼠 R/(L+S)值为 0.38±0.06、0.40±0.08, 比对照组 0.27±0.14 显著增高($P<0.05$), 血晶素和低浓度 CO 组为 0.30±0.09、0.29±0.04, 与对照组比无显著性差异。

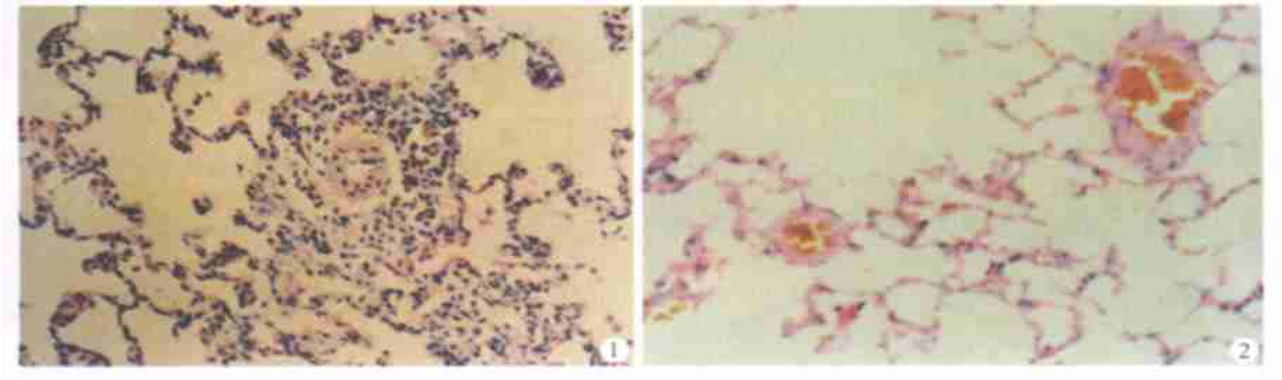


图 1　低氧组肺小血管壁增厚, 管腔狭窄　(HE× 200)

Fig 1　Pulmonary vessels show thickening and constricting in hypoxia group　(HE× 200)

图 2　低浓度 CO 组肺小血管壁稍微增厚, 管腔没有明显狭窄　(HE× 200)

Fig 2　Pulmonary vessels show slightly thickening but no constriction in CO group　(HE× 200)

2.2　肺血管细胞增殖与凋亡状况

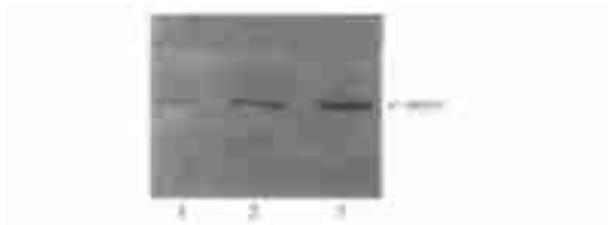
缺氧和锡原卟啉组增殖系数分别为 8.5%±1.2%、8.7%±1.8%, 均比对照组(2.8%±0.6%)显著增加($P<0.01$); 凋亡系数分别为 1.4%±0.4%、1.8%±0.5%, 均比对照组(2.3%±0.3%)显著减少($P<0.05$)。两组增殖凋亡比值分别为对照组的 5 倍与 4 倍。血晶素和低浓度 CO 组增殖系数分别为 7.7%±1.8%、8.2%±1.7%, 均比对照组增加($P<0.05$); 凋亡系数分别为 5.2%±3.2%、5.6%±4.3%, 均比对照组显著增加($P<0.01$)。两组增殖凋亡比值均为对照组 1.2 倍。5 组大鼠肺内均存在着一定比率的增殖及凋亡阳性细胞, 这两类细胞在肺动脉中呈散在分布, 有些区域相对集中。在低氧和锡原卟啉组大鼠, 增殖阳性细胞绝大部分集中在肺血管壁细胞, 凋亡阳性染色细胞在肺血管壁上较少见。血晶素和低浓度 CO 组, 增殖阳性细胞和凋亡阳性染色细胞在肺血管壁上均较多。

2.3　c-myc 蛋白免疫组化染色

c-myc 抗原阳性染色为胞核棕黄色, 对照组肺动脉和 PASMC 仅少许弱阳性表达。缺氧和锡原卟啉组大鼠肺动脉和 PASMC 可见大量阳性及强阳性表达, 阳性染色细胞主要位于肺血管壁。血晶素和低浓度 CO 组可见少量阳性及弱阳性表达。

2.4　Western 杂交结果

低氧 c-myc mRNA 表达量显著高于对照组, 为其 6.4 倍。低浓度 CO 组 c-myc mRNA 表达量也高于对照组, 为其 3.5 倍。见图 3。



1: Control; 2: Hypoxia group; 3: CO group

图 3　**Western blot** 分析 **PASMC** 的 **C-myc** 蛋白表达

Fig 3　Expression of c-myc in pulmonary arterial smooth muscle cells with Western blot

3　讨论

本研究结果表明, 缺氧和锡原卟啉组、血晶素和低浓度 CO 组及对照组大鼠肺血管壁上均检出一定量的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

增殖与凋亡细胞;缺氧和锡原卟啉组增殖/凋亡值比对照组显著增高,血晶素和低浓度 CO 组增殖/凋亡值比对照组显著降低。说明不仅细胞增殖异常,而且细胞凋亡异常也可参与调节肺动脉血管结构的改建。与其它组织中的情况相同[5]。在缺氧和锡原卟啉组大鼠肺血管壁细胞,绝大部分是增殖细胞,血晶素和低浓度 CO 组是凋亡细胞。因此可以认为,对照组肺血管壁细胞较低的增生可被同时发生的相应的凋亡趋势所抵消,以维持血管壁细胞的相对稳定;在慢性缺氧和锡原卟啉组大鼠,由于肺血管壁细胞增生增强而凋亡减弱,进而形成 HPH;而在血晶素和低浓度 CO 组大鼠,由于肺血管壁细胞增生和凋亡均增强,二者基本平衡,也没有形成 HPH。

血晶素和低浓度 CO 的作用与其减轻低氧对肺动脉的损伤有关。①在低氧时由于血液中氧自由基的存在,耗氧量大的器官或组织部位比耗氧量小的器官或组织部位更易于受到来自血液系统氧自由基及脂质过氧化物的损害;由于肺动脉管壁明显厚于主动脉,弹力纤维层也较厚,在低氧下肺动脉剧烈收缩,肺动脉处局部氧耗显著高于主动脉处,使肺动脉处更易于受到氧自由基的损伤。②文献也报道低氧可引起肺动脉血管内皮细胞 EDRF(NO)的减少,而 CO 可以促进 NO 的产生。③一方面,在急性低氧时,内皮细胞 NO 产生减弱,可增加肺动脉血管节律,促使血栓形成,引起细胞损伤。另一方面,NO 是内源性的氧自由基清除剂,能对氧自由基引起的损伤起到保护作用[6]。低浓度 CO 可以调节 NO 的产量使其保持在适当的剂量。

C-myc 原癌基因是细胞增殖、分化、凋亡的中心调节因子之一,即可促进细胞增殖又可促进细胞凋亡[7]。本研究结果表明,慢性缺氧和锡原卟啉组大鼠肺血管细胞 c-myc 基因表达增强,而血晶素和低浓度 CO 组变化不明显,因此我们认为该基因的异常表达可能与慢性缺氧和锡原卟啉组大鼠肺血管壁细胞增殖凋亡失衡有关。证实细胞增殖与凋亡异常与其相关基因的异常表达密切相关。

参考文献:

[1] Vender R L. Chronic hypoxic pulmonary hypertension: cell biology to patho-physiology[J]. Chest, 1994, 106: 236.
[2] 陶清国,张珍祥,徐永健. 慢性缺氧大鼠肺内(肺血管壁)细胞增殖、凋亡及 c-myc、p53 基因表达的研究[J]. 中国应用生理学杂志, 1999, 15(2): 169-172.
[3] 王关嵩,钱桂生,黄春基 等. 不同方法培养大鼠肺动脉平滑肌细胞的性状[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(3): 286-288.
[4] 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著(金冬雁,黎孟枫等译). 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社, 1996. 672-690.
[5] Wyllie A H. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissue: an overview[J]. Cancer Metastasis Rev, 1992, 11(): 95.
[6] van der Vliet A, Cross C E. Oxidants, nitrosants, and the lung[J]. Am J Med, 2000, 109(5): 398-421.
[7] Bhora F Y, Wise R M, Foster A H. Heat shock protects cardiomyocytes from hypoxia-mediated apoptosis by attenuation of nitric oxide[J]. In Vivo, 2000, 14(5): 597-602.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2002)01-0068-01

利复星和头孢曲松治疗肺部感染 70 例

Levofloxacin and Ceftriaxone in treatment of respiratory tract infection (70 cases)

董湘陵 (邮电总医院呼吸内科,北京 100032)

利复星为新一代氟喹诺酮类抗菌药,该药抗菌谱广,疗效好,不良反应少,本试验对利复星进行临床疗效验证、细菌学检查及不良反应观察,选用头孢曲松作为随机对照治疗肺部感染 70 例,结果报告如下。

1 材料与方法

病例选择:经临床、X 线胸片、细菌学证实的肺部感染住院患者 70 例,随机分为利复星治疗组和头孢曲松对照组,治疗组和对照组各 35 例,其中男性 37 例,女性 33 例,年龄 21~86 岁。

给药方法:治疗组:静滴利复星(北京双鹤药业)200 mg/次,1 次/d;对照组:静滴头孢曲松(哈尔滨制药)2.0 g/次,2 次/d,两组疗程均为 7~14 d。

观察项目:治疗前后详细观察并记录患者症状、体征变化及不良反应,治疗前后进行血、尿常规,肝肾功能,胸部 X 线检查,痰细菌培养。

疗效及不良反应评价标准:痊愈:症状、体征、实验室检查和病原学检查 4 项均恢复正常。显效:病情明显好转,上述 4 项中有一项未完全恢复正常。进步:用药后病情有所好转,但不明显。无效:用药后病情无明显好转或反而加重。前两者计有效,以此计算效率按有关、可能有关、可能无关、无关、无法评定 5 级标准进行不良反应评价,前两者计为不良反应。

统计学处理:数据处理采用 t 检验。

2 结果

临床疗效:治疗组与对照组临床痊愈率分别为 82.86%及

(下转 72 页)

作者简介:董湘陵(1952-),女,北京市人,副主任医师,主要从事支气管哮喘方面的研究,发表论文 7 篇。电话:(010)88068263

收稿日期:2001-10-15;修回日期:2001-12-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net