

肢体缺血-再灌注损伤时细胞凋亡的变化及阿魏酸钠保护作用

李彬¹, 李靖年², 温昱³

(1. 温州医学院附属二院骨科, 浙江 温州 325000; 2. 大连医科大学附属二院骨科; 3. 温州医学院解剖教研室)

摘要 目的: 阐明氧自由基与细胞凋亡、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达在大鼠肢体缺血及再灌注不同时相中的变化规律和相互关系, 探讨阿魏酸钠对肢体缺血-再灌注损伤的影响。方法: 采用大鼠股动脉夹闭模型, 设立缺血组、对照组及阿魏酸钠组, 测定肌肉组织中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性, 检测肌肉组织中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的变化, 观察细胞凋亡现象。结果: 随着再灌注时间的延长(24 h 内), 氧自由基水平、凋亡指数(AI)及 Bax 蛋白表达水平进行性升高, 阿魏酸钠组三者水平低于对照组; Bcl-2 蛋白在短时间内升高, 而后逐渐下降, 阿魏酸钠组 Bcl-2 蛋白表达水平的峰值低于对照组, 下降也较对照组平缓, 至再灌注 24 h 时, 阿魏酸钠组 Bcl-2 蛋白表达水平已高于对照组; 氧自由基、AI 之间呈显著正相关, 氧自由基、AI 与 Bcl-2/Bax 比值呈显著负相关。结论: 氧自由基及细胞凋亡同时参与肢体缺血-再灌注损伤, 氧自由基可能通过调节 Bcl-2/Bax 两蛋白的比例关系而发挥其促进细胞凋亡的作用, 阿魏酸钠可以有效清除自由基, 抑制细胞凋亡, 减轻肢体再灌注损伤。

关键词 自由基; 再灌注损伤; 细胞凋亡; 阿魏酸钠

Protection of sodium ferulate for apoptosis of ischemia-reperfusion injury and expression of Bcl-2, Bax protein in rat hind limb LI Bin^{*}, LI Jing-nian, WEN Yu.^{*} *The Department of Orthopaedics, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang Wenzhou, 325000, China*

Abstract Objective: To interpret the dynamic changes of oxygen derived free radicals, apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax protein in rat limb ischemia-reperfusion model, analyse their interrelations and the protective effects of sodium ferulate (SF). **Methods:** Using femoral artery clamped model, the blood stream were occluded for five hours before reperfusion. The changes of ischemia group (ischemia five hours), control group (given salvia miltiorrhiza before reperfusion) and SF group (given SF before reperfusion) were observed by measuring the content of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), the expression of Bcl-2 and Bax protein in muscle tissue, and apoptosis. **Results:** Along with the prolonged time of reperfusion, increasing of oxygen-derived free radicals, the expression of Bax protein and apoptosis index (AI) were observed, and the expression of Bcl-2 protein increasing at the beginning, then declining. All parameters except Bcl-2 in SF group were significantly lower than those in control group, and the dynamic change of Bcl-2 was just on the contrary with those parameters. There was a significantly positive correlation between oxygen-derived free radicals and AI, and a significantly negative correlation among oxygen-derived free radicals, AI and the ratio of Bcl-2/Bax. **Conclusion:** Oxygen free radicals and apoptosis both participate in limb reperfusion injury. Oxygen free radicals may accelerate the occurrence of apoptosis through regulating the ratio of Bcl-2/Bax. SF may play an important role on alleviating reperfusion injury by a mechanism which correlates to the effect of cleaning free radical, inhibiting the occurrence of apoptosis.

Key words Oxygen-derived free radicals; Reperfusion injury; Apoptosis; Sodium ferulate

本研究采用大鼠股动脉夹闭模型, 动态观察了

大鼠肢体缺血再灌注后氧自由基与细胞凋亡、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的变化规律, 并探讨阿魏酸钠(sodium ferulate, SF)对肢体缺血-再灌注损伤的影响。

基金项目: 温州市科技发展计划项目(No. S2002A157)

通讯作者: 李彬 Tel: 13064563085 E-mail: Liwy956@hotmail.com

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组 SD 大鼠 91 只,雌雄不限, 体质量 250 ~ 300 g。采用股动脉夹闭模型^[1]:25 % 乌拉坦(1 g/kg)腹腔麻醉,右腹股沟处解剖出股动脉,无创动脉夹夹闭,保持下肢缺血 5 h 后去除动脉夹,开始再灌注。根据保护液不同,将大鼠随机分为对照组(缺血 5 h 后予生理盐水保护,20 ml/kg)及阿魏酸钠组(缺血 5 h 后予阿魏酸钠保护,25 ml/kg),将两组各分为对照组 1、3、6、12、18、24 h 及阿魏酸钠组 1、3、6、12、18、24 h 各 6 个亚组,每组 7 只动物。另取 7 只大鼠作为缺血组,夹闭股动脉 5 h 后,立即做各项指标测定。

1.2 脂质过氧化产物丙二醛 (malondialdehyde, MDA)测定 取肌肉组织 0.1 g,制成组织匀浆后,取上清 0.2 ml,按照购自南京建成生物试剂有限公司的试剂盒操作说明测定。

1.3 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)测定 取肌肉组织匀浆上清 40 μl,按照购自南京建成生物试剂有限公司的试剂盒操作说明测定。

1.4 Bcl-2/Bax 蛋白免疫组化检测和图像分析 每亚组各取 14 张石蜡切片,常规脱蜡至水后,按购自武汉博士德生物试剂有限公司的试剂盒操作说明进行 Bcl-2/Bax 蛋白免疫组化反应。以 PBS 代替一抗进行反应作阴性对照。Bcl-2/Bax 蛋白免疫组化产物的标记强度用灰度值来表示,应用 HPIAS-1000 高

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,同时测定同一切片上非阳性部位灰度值,Bcl-2/Bax 的灰度值减去背景灰度值得到校正灰度值,即 Bcl-2/Bax 蛋白免疫组化反应产物的实际灰度值,从而避免染色过程中非特异性染色造成的误差。每张切片取 5 个视野,每例标本结果为 5 个视野校正灰度值的均值。

1.5 细胞凋亡检测 应用 DNA 缺口原位末端标记法(TUNEL 法)检测细胞凋亡,试剂盒购自武汉博士德生物制剂有限公司,按说明书操作。以 PBS 缓冲液代替管 1(TDT),进行反应作阴性对照。凋亡指数的计算(apoptosis index, AI),高倍镜下,随机计数 1 000 个肌细胞核,平均 100 个细胞核中呈现阳性反应的数目为 AI。同时,切取腓肠肌组织制成超薄切片,TEM-2000EX 型透射电镜观察细胞凋亡。

1.6 统计学处理 实验观察结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,缺血组与对照组比较用方差分析法,对照组与阿魏酸钠组比较用 *t* 检验,相关分析用积差法,以 *P* < 0.05 为差异性具有显著性意义。

2 结果

2.1 肌肉组织中 SOD 活性与 MDA 含量变化(见表 1) 从表中可见,随着再灌注时间的延长,对照组及阿魏酸钠组 SOD 含量明显降低,MDA 含量明显升高,相同再灌注时相,阿魏酸钠组 SOD 含量明显高于对照组,MDA 含量明显低于对照组。

表 1 各组肌肉组织中 SOD 与 MDA 含量($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Content of superoxide dismutase and malondialdehyde in muscular tissue($\bar{x} \pm s$)

项目 Item	缺血组 Ischemia group	对照组 Control group					
		1 h	3 h	6 h	12 h	18 h	24 h
SOD(Nu/ml)	249.04 ± 7.73	195.27 ± 1.49	170.48 ± 0.00	150.43 ± 9.07	141.01 ± 2.73	124.42 ± 1.53	111.73 ± 6.89
MDA(nmol/ml)	0.96 ± 0.08	1.53 ± 0.30	2.11 ± 0.21	2.23 ± 0.31	2.37 ± 0.14	2.97 ± 0.13	3.09 ± 0.31
项目 Item	阿魏酸钠组 RF group						
	1 h	3 h	6 h	12 h	18 h	24 h	
SOD(Nu/ml)	225.33 ± 31.52	209.87 ± 26.92	207.78 ± 28.47	190.19 ± 36.47	173.88 ± 27.73	175.49 ± 20.96	
MDA(nmol/ml)	1.12 ± 0.11	1.30 ± 0.09	1.43 ± 0.13	1.62 ± 0.37	1.73 ± 0.34	1.86 ± 0.11	

注: 对照组与阿魏酸钠组相比, *P* < 0.01; 阿魏酸钠组与对照组相比, *P* < 0.01

Note: compared control group with ischemia group, *P* < 0.01; compared RF group with control group, *P* < 0.01

2.2 Bcl-2 蛋白表达变化(见表 2) 高倍镜下,胞浆呈棕色着色者为阳性反应部位,测其灰度值。从表 2 中可见,随着观察时间的延长,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。其中,阿魏酸钠组 Bcl-2 蛋白表达水平的峰值低于对照组,下降也较为平缓,至再灌注

24 h 时,阿魏酸钠组 Bcl-2 蛋白表达水平已高于对照组。

2.3 Bax 蛋白表达变化(见表 2) 同样,以高倍镜下胞浆呈棕色着色者为阳性反应部位,测其灰度值。从表 2 中可见,随着观察时间的延长,Bax 蛋白表达水平逐渐升高,相同再灌注时相,阿魏酸钠组 Bax 蛋

白表达水平低于对照组。

2.4 Bcl-2/Bax 比值变化(见表 2) 测量相同亚组得到的 Bcl-2 蛋白灰度值除以 Bax 蛋白灰度值,即得到表 2 中结果。从表 2 中可以看出,随着再灌注时间的延长,Bcl-2/Bax 比值逐渐降低,相同再灌注时相,阿魏酸钠组 Bcl-2/Bax 比值高于对照组。

2.5 细胞凋亡检测 TUNEL 法检测细胞凋亡:高倍镜下,胞核内有棕色着色者为凋亡细胞核,计算凋亡指数。由表 2 中数据可见,随着再灌注时间延长,AI 呈进行性升高,相同再灌注时相,阿魏酸钠组 AI 低于对照组。电镜观察:各组均未见凋亡小体,但可见细胞核凋亡样改变:核膜皱缩,染色质凝固、趋边,在核膜下积聚呈斑块状,核仁消失,偶见胞核

固缩。这些变化以对照组最为显著。

2.6 相关分析 再灌注 24 h 内,氧自由基、Bax 蛋白表达灰度值和 AI 之间呈显著正相关(SOD 与 Bax 之间相关系数 $r = -0.801$,SOD 与 AI 之间 $r = -0.728$,MDA 与 Bax 之间 $r = 0.848$,MDA 与 AI 之间 $r = 0.768$,Bax 与 AI 之间 $r = 0.869$),再灌注 3 ~ 24 h 内,氧自由基、AI 与 Bcl-2 蛋白灰度值呈显著负相关(SOD 与 Bcl-2 之间 $r = 0.707$,MDA 与 Bcl-2 之间 $r = -0.742$,Bcl-2 与 AI 之间 $r = -0.609$),再灌注 24 h 内,氧自由基、AI 与 Bcl-2/Bax 比值呈显著负相关(SOD 与 Bcl-2/Bax 之间相关系数 $r = 0.885$,MDA 与 Bcl-2/Bax 之间 $r = -0.864$,Bcl-2/Bax 与 AI 之间 $r = 0.668$) ($P < 0.01$)。

表 2 各组 Bcl-2 蛋白灰度值、Bax 蛋白灰度值、Bcl-2/Bax 比值及 AI($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Changes of Bcl-2 value, Bax value, the ratio of Bcl-2/Bax value and AI value($\bar{x} \pm s$)

项目 Item	缺血组 Ischemia group	对照组 Control group					
		1 h	3 h	6 h	12 h	18 h	24 h
Bcl-2	5.00 ± 2.00	17.00 ± 4.12	28.00 ± 7.31	21.00 ± 6.04	14.00 ± 3.74	9.00 ± 2.55	4.00 ± 1.00
Bax	4.00 ± 1.58	8.00 ± 2.00	15.00 ± 4.47	17.00 ± 3.74	23.00 ± 4.85	26.20 ± 5.17	28.00 ± 5.57
Bcl-2/Bax	1.27 ± 0.19	2.18 ± 0.28	1.93 ± 0.29	1.22 ± 0.16	0.60 ± 0.10	0.33 ± 0.13	0.14 ± 0.03
AI	2.00 ± 0.81	8.73 ± 4.15	12.45 ± 4.34	20.36 ± 0.06	29.37 ± 0.80	34.01 ± 6.90	35.45 ± 6.40

项目 Item	阿魏酸钠组 RF group					
	1 h	3 h	6 h	12 h	18 h	24 h
Bcl-2	12.00 ± 1.00	20.00 ± 2.35	18.00 ± 3.16	14.00 ± 4.53	12.00 ± 5.19	11.00 ± 5.10
Bax	5.00 ± 0.71	6.00 ± 1.58	9.00 ± 2.00	11.00 ± 1.58	15.00 ± 1.87	16.00 ± 1.50
Bcl-2/Bax	2.45 ± 0.39	3.38 ± 0.25	1.98 ± 0.17	1.40 ± 0.49	0.78 ± 0.16	0.66 ± 0.10
AI	3.36 ± 1.86	5.73 ± 1.96	8.26 ± 2.46	12.17 ± 3.21	15.88 ± 4.37	16.19 ± 1.86

注: 对照组与阿魏酸钠组相比, $P < 0.01$; 阿魏酸钠组与对照组相比, $P < 0.01$; 阿魏酸钠组与对照相比, $P < 0.05$

Note: compared control group with ischemia group, $P < 0.01$; compared RF group with control group, $P < 0.01$; compared RF group with control group, $P < 0.05$

3 讨论

肢体缺血-再灌注损伤发生机制错综复杂,其中,氧自由基损伤作用被认为是引起再灌注损伤的重要因素。最近研究表明,细胞凋亡机制参与组织缺血-再灌注损伤。SOD 为内源性氧自由基清除剂,MDA 为脂质过氧化反应的主要代谢产物,测量二者的含量间接反映了肌肉组织内氧自由基的生成量。

细胞凋亡是有许多基因参与的程序化过程,有着非常复杂的调控机制,其中,Bcl-2 基因家族是目前较为公认与凋亡密切相关的基因。Bcl-2 基因作为 Bcl-2 基因家族中的一员,具有促进细胞生存,延长细胞寿命的作用,被称为“抗凋亡基因”。相关分析显示,再灌注 3 ~ 24 d 内,氧自由基、AI 与 Bcl-2 蛋白灰度值呈显著负相关。分析这种变化出现的原因,是

由于再灌注早期,受到大量诱导凋亡因素的刺激,包括 Bcl-2 在内的抑制凋亡基因通过尚不清楚机制大量表达,以试图阻止细胞凋亡;随着再灌注时间的延长,自由基生成增多,其他诱导凋亡因素持续存在,细胞损伤不断加重,最终 Bcl-2 的表达被抑制。

Bax 基因是 Bcl-2 基因家族中的促凋亡基因。最新研究表明,Bax 蛋白通过与 Bcl-2 蛋白形成二聚体而发挥作用,当 Bax 高表达时,形成 Bax/Bax 同源二聚体促进细胞凋亡,当 Bcl-2 高表达时,形成异源二聚体 Bcl-2/Bax,Bax 促细胞凋亡作用减弱甚至消失,细胞凋亡受抑制。总之,Bcl-2 与 Bax 蛋白的比例是决定细胞凋亡作用强弱的关键因素^[2]。本研究提示氧自由基可能通过调节 Bcl-2/Bax 两蛋白的比例关系而发挥其促进细胞凋亡的作用,从而为抗氧自由

基、保护肢体免受再灌注损伤药物的开发,提供了新的理论依据。

阿魏酸钠是中药当归、川芎的提纯制剂,化学名为 3-甲氧基-4-羟基-苯丙烯酸钠。SF 上的酚羟基结构可使氧自由基发生还原反应,从而使其本身具有了抗氧化作用。国内陆怡等^[3]经体外细胞培养证实,SF 可以减轻氧化诱导的人淋巴细胞凋亡的作用。本研究证实,SF 可以清除氧自由基,调节 Bcl-2/Bax 两蛋白的比例,Bcl-2 蛋白表达增多,Bax 蛋白表达降

低,抑制细胞凋亡的发生,且 SF 作为中药提纯制剂,毒副作用小,不失为较为理想的再灌注损伤保护用药物。

参考文献

- 1 李靖年,李合,赵文志,等. 局部低温对肢体缺血-再灌注损伤保护作用的实验研究. 中国矫形外科杂志,2000,7(1):53-55.
- 2 Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: A discourse on the Bcl-2 family and cell death. Blood, 1996, 88(2):386-401.
- 3 陆怡,许彩民,杨洋,等. RF 对氧化诱导人淋巴细胞凋亡的抑制作用. 中国医学科学院学报, 1998, 20(1):44-48.

(收稿日期:2004-01-28 本文编辑:王宏)

短篇报道

持续软组织牵引治疗中远节指骨开放性骨折

党洪胜,王平年,常巍,陈少华

(十堰市太和医院骨关节科,湖北 十堰 442000)

我院自 1993 - 1999 年采用持续软组织牵引治疗中、远节指骨开放性骨折 75 例,效果满意,现报告如下。

1 临床资料

本组 75 例(83 指),男 61 例(68 指),女 14 例(15 指);年龄 4 ~ 63 岁。受伤原因多为车床挤压伤或砸伤。多数为粉碎性、开放性骨折。受伤至手术时间为 1 ~ 16 h,术前均经 X 线片确诊。

2 治疗方法

指神经根阻滞麻醉下进行急诊清创术。将骨折尽量复位,能缝合的皮肤尽量缝合,不能缝合的伤口采用游离植皮、皮瓣转位等方法闭合伤口;对创口污染严重,组织损伤广泛,伤后时间超过 12 h 者,行清创术后暂不闭合伤口,待创面新鲜后,再行一期闭合伤口。术后常规在手指远节指骨末端侧方中央用 7 ~ 8 号注射针头作平行指甲的软组织贯穿。然后在距皮肤 3 ~ 5 mm 处分别剪断针头和针尾,用软细钢丝从注射针孔中穿出并做成钢丝环圈,拴橡皮筋备作牵引用。在患肢前臂包管形石膏,待石膏稍干固后,用 6 号铁丝预制成外固定架固定到管形石膏背侧,将橡皮筋固定到外固定架上,并调整好牵引方向和牵引力的大小。本组所有病例术后均持续软组织牵引至初步愈合或骨痂形成。在牵引期间根据骨折端的移位方向仍需不断调整牵引方向和牵引力的大小。

3 治疗结果

75 例术后均获随访,随访时间 3 ~ 12 个月,平均 6.5 个月。疗效评定标准[中华骨科杂志,1990,10(4):248]:优,解剖对位,无功能限制;良,无成角畸形,侧方移位 < 1/10,功能良好;

差,有成角畸形,功能欠佳。本组优 59 指,良 21 指,差 3 指。优良率达 96.4%。

4 讨论

4.1 软组织牵引注意事项 在软组织上作牵引,进针点应在手指远节指骨末端侧方中央距指尖软组织 4 ~ 5 mm 处作平行指甲的软组织贯穿,最好紧贴远节指骨末端;牵引力量要适中,以掌指关节被动活动时指间关节保持稳定为宜,在牵引 2 ~ 3 周内根据摄 X 线片示骨折端的移位方向不断调整牵引方向和牵引力的大小;骨折初步愈合或骨痂形成、创面愈合后可拔除牵引,改用指夹板固定至骨性愈合。

4.2 软组织牵引优点 作软组织牵引时不会损伤手指的血管、神经,不会导致穿刺部位及远端皮肤坏死;持续牵引从生物力学的角度有利于软组织、骨以及关节软骨的修复,骨折愈合与功能恢复可以同步进行,较好的解决了骨折治疗过程中的“动”与“静”问题;可避免指骨缩短、成角和旋转畸形,最大限度保留了手指的长度,能随时调整骨折对位、对线;减少了传统方法固定骨折而导致创面皮肤压迫过紧,缓解了因损伤后出血、渗出、水肿对血管、神经的压迫,而且有利于静脉血液的回流,改善了局部的血液循环,促进创面愈合;在牵引固定状态下,便于观察创面,局部用药、换药时也不会导致骨折端的移位,减轻了患者换药时的痛苦,促使创面早日愈合;能早期进行手指的功能锻炼,且不妨碍邻近手指屈伸功能活动,避免了肌腱粘连和关节僵硬;此方法结构轻便,操作简单、不需复杂设备,创伤小,便于基层开展。

(收稿日期:2004-07-19 本文编辑:王宏)