

## 线粒体 ATP 敏感性钾通道开放对大鼠肺缺血-再灌注损伤的保护作用\*

李涛<sup>1</sup>, 赖春风<sup>2\*\*</sup>, 曾茂森<sup>1</sup>, 陆德琴<sup>3</sup>

(1. 嘉应学院医学院 病理学与病理生理学教研室, 广东 梅州 514031; 2. 嘉应学院医学院 内科学教研室, 广东 梅州 514031; 3. 贵阳医学院 病理生理学教研室, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 探讨线粒体 ATP 敏感性钾通道(mitoKATP)开放对大鼠肺缺血-再灌注损伤(I/R)的保护作用。方法: 建立大鼠肺 I/R 模型, 设立假手术组、肺 I/R 组、mitoKATP 开放剂二氮嗪(DE) + I/R 组、mitoKATP 阻断剂 5-羟基萘酸(5-HD) + DE + I/R 组, 每组 10 只大鼠; 检测各组肺组织湿/干重比, HE 染色法观察各组肺组织形态学变化, 免疫组织化学染色法检测肺组织细胞色素 C 的表达, TUNEL 法检测肺细胞凋亡指数。结果: 与假手术组相比, I/R 组肺组织湿/干重比明显增加( $P < 0.05$ ), 肺组织出现出血、水肿等损伤性病理学变化, 细胞色素 C 表达明显增多( $P < 0.01$ )、肺细胞凋亡指数明显增大( $P < 0.01$ ); 与 I/R 组相比, DE + I/R 组肺组织湿/干重比明显降低( $P < 0.05$ )、肺组织损伤性病理变化明显减轻、肺细胞色素 C 表达明显减少( $P < 0.05$ )、细胞凋亡指数明显减小( $P < 0.05$ ), 而 5-HD + DE + I/R 组各项指标与 I/R 组比较无差异( $P > 0.05$ )。结论: mitoKATP 的开放可减轻肺水肿、抑制细胞凋亡, 对大鼠肺缺血-再灌注损伤具有保护作用。

**[关键词]** 肺; 缺血; 再灌注损伤; 线粒体 ATP 敏感性钾通道; 细胞凋亡; 大鼠, Sprague-Dawley

**[中图分类号]** R363.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)04-0356-04

## Protective Effects of Opening of Mitochondrial ATP Sensitive Potassium Channel on Ischemia-reperfusion Injury in Rat Lung *in vivo*

LI Tao<sup>1</sup>, LAI Chunfeng<sup>2</sup>, ZENG Maosen<sup>1</sup>, LU Deqin<sup>3</sup>

(1. Department of Pathology and Pathophysiology, Medical College of Jiaying College, Meizhou 514031, Guangdong, China;

2. Department of Internal medicine, Medical College of Jiaying College, Meizhou 514031, Guangdong, China;

3. Department of Pathophysiology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the protective effect of opening of mitochondrial ATP sensitive potassium channel on lung ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods:** Pulmonary ischemia-reperfusion injury rat model was established by left hilar ligation and reperfusion. Preconditioning was conducted by using the mitochondrial ATP sensitive potassium channel opener (diazoxide, DE). Forty rats were randomly divided into four groups ( $n = 10$ , respectively), i. e. sham-operation group, I/R group, DE + I/R group and 5-HD + DE + I/R group. The ratio of wet/dry weight of lung tissue and morphological change were observed. Cytochrome C expression and apoptosis index in lung tissue were assessed by immunohistochemical staining and TUNEL methods, respectively. **Results:** Compared with sham-operation group, the wet/dry weight ratio of lung tissue in I/R group was significantly increased ( $P < 0.05$ ), the pathological changes such as hemorrhage and edema in lung tissue, the expression of cytochrome C increased significantly ( $P < 0.01$ ) and the lung cell apoptosis index increased significantly. Compared with I/R group, the wet/dry weight ratio of lung tissue in DE + I/R group was signifi-

\*[基金项目] 广东省梅州市科技局计划项目(2007B17)

\*\*通信作者 E-mail: mzlcf2008@126.com

网络出版时间: 2015-04-20 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150420.1829.003.html>

cantly decreased ( $P < 0.05$ ), the pathological changes in lung tissue were obviously alleviated, the expression of cytochrome C decreased significantly ( $P < 0.01$ ) and the lung cell apoptosis index decreased significantly ( $P < 0.01$ ). There was no difference in above-mentioned indexes between I/R group and 5-HD + I/R group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** The opening of mitochondrial ATP sensitive potassium channel can effectively alleviate pulmonary edema, inhibit apoptosis and play a protective role in the injury of lung ischemia-reperfusion *in vivo*.

[ **Key words** ] lung; ischemia; reperfusion injury; mitochondrial ATP sensitive potassium channel; apoptosis; rats, Sprague-Dawley

近年来,随着体外循环技术的广泛应用,肺缺血-再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, I/R)所导致的肺功能障碍受到重视。低氧或缺血预处理(hypoxic/ischemic preconditioning, HPC/IPC)是抗脏器 I/R 有效防治手段之一,而线粒体 ATP 敏感性钾通道(mitochondrial ATP-sensitive potassium channel, mitoKATP)被认为是 IPC 的触发因子和后期保护作用的终末效应因子<sup>[1]</sup>。mitoKATP 开放对低氧性肺损伤具有保护作用<sup>[2]</sup>。本实验观察 mitoKATP 开放预处理对大鼠肺 I/R 的保护作用及其机制,为 I/R 的机制及其防治提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 成年 SD 大鼠 40 只,体质量 180~210 g,雌雄不拘,由汕头大学动物实验中心提供。常规饮食,自由饮水。

**1.1.2 主要试剂及仪器** mitoKATP 开放剂二氮嗪(DE, sigma 公司)、阻断剂 5-羟癸酸(5-HD, sigma 公司);细胞凋亡检测试剂盒(TUNEL 法)、链酶亲和素-生物素-过氧化物酶法(SABC 法)试剂盒、DAB 显色试剂盒、细胞色素 C 抗体(武汉博士德生物工程有限公司),动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司),CMS 显微镜(日本 Leica),BX41 图像采集系统(日本 OLYMPUS)。

### 1.2 方法

**1.2.1 大鼠肺 I/R 模型复制** 10% 水合氯醛 0.2 mL/100 g 腹腔麻醉,气管插管,接动物呼吸机。经左前胸第 5 肋间开胸,解剖左侧肺门,用盐水稀释肝素 50 U 至 500  $\mu$ L 经尾静脉注入,5 min 后于肺充盈末用手术丝线通过肺门双活结套扎左肺门,45 min 后开放,再灌注 120 min。假手术组左肺门穿线不结扎。实验结束后切取左肺备用。

**1.2.2 实验分组** (1)假手术组:开胸后游离左

肺门,穿线不结扎,不进行其他处理。(2)I/R 组:用手术丝线通过肺门双活结套扎左肺门,45 min 后开放,再灌注 120 min。(3)DE + I/R 组:在缺血前 30 min 腹腔注入 DE 10 mg/kg 后,按(2)进行处理。(4)5-HD + DE + I/R 组:先给予 5-HD 10 mg/kg 静脉注射,15 min 后给予 DE 10 mg/kg 腹腔注入,30 min 后再按(2)处理。以上 4 组每组 10 只。

**1.2.3 标本的采集和处理** 实验结束时,取出大鼠左肺,切取中下段肺组织,置于新鲜 10% 中性缓冲福尔马林中固定 24 h,常规石蜡包埋切片,供 HE 染色、免疫组织化学染色及细胞凋亡检测。

**1.2.4 肺组织细胞色素 C 免疫组织化学(SABC 法)检测。** 切片置 3%  $H_2O_2$  去除内源性过氧化酶,柠檬酸盐缓冲液中中高火进行抗原修复,滴加 1:120 的一抗过夜后加入山羊抗兔 IgG, DBA 显色,细胞浆呈棕黄色判定为细胞色素 C 阳性表达。于 400 $\times$  显微镜下随机取 5 个细胞总数超过 200 的视野,计数阳性细胞数及细胞总数,计算阳性细胞率(阳性细胞数/细胞总数 $\times$ 100%)。

**1.2.5 肺细胞凋亡 TUNEL 法检测。** 在普通光学显微镜下调亡细胞的细胞核呈现棕黄色判定为阳性细胞,无细胞凋亡不显色则为阴性。在 400 $\times$  倍显微镜下任取 5 个细胞总数 200 个以上的视野,计数阳性细胞数及细胞总数,并计算细胞凋亡指数(阳性细胞数/细胞总数 $\times$ 100%)。

### 1.3 统计学方法

所有数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 形态学观察

光镜下,可见假手术组肺泡腔内无水肿、充血及坏死,间隔无增宽,无炎细胞浸润,结构清晰可见(图 1-A)。I/R 组肺泡腔内可见明显的充血、水肿,血管扩张及炎细胞浸润,并有局灶性肺气肿,肺泡间隔增宽,偶见局灶性的坏死灶,组织、细胞结构紊乱(图 1-B)。DE + I/R 组可见少量的炎性细胞浸润,无明显的充血、水肿,组织、细胞损伤程度较 I/R 组明显减轻,与对照组相似(图 1-C)。而 5-HD + DE + I/R 组亦可见明显的充血、水肿,肺气肿及炎性细胞浸润等,表现出近似 I/R 组的病理改变(图 1-D)。

### 2.2 肺组织湿/干重比

与假手术组相比,I/R 组及 5-HD + DE + I/R 组肺湿/干比显著增大,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),而 DE + I/R 组差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与 I/R 组相比,DE + I/R 组明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果表明 mitoKATP 开放剂能够减轻肺组织损伤,减轻肺水肿,而使用 mitoKATP 抑制剂后可阻断此保护作用。见表 1。

表 1 各组大鼠肺组织湿/干重比的变化( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of wet/dry weight ratios of lung tissue between different groups

组别	n	肺组织湿/干重比
假手术组	10	4.35 ± 0.20
I/R 组	10	5.76 ± 0.26 <sup>(1)</sup>
DE 组	10	4.65 ± 0.22 <sup>(2)</sup>
5-HD + DE 组	10	5.63 ± 0.39 <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>与假手术组比较, $P < 0.05$ ; <sup>(2)</sup>与 I/R 组比较, $P < 0.05$

### 2.3 肺组织细胞色素 C 和凋亡指数

I/R 组及 5-HD + DE + I/R 组肺组织细胞色素 C 的阳性细胞率均高于假手术组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与 I/R 组相比,DE + I/R 组阳性细胞率明显减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而 5-HD + DE + I/R 组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2、图 1。假手术组大鼠的肺组织仅偶见细胞凋亡的发生,I/R 组及 5-HD + DE + I/R 组肺细胞凋亡指数均显著高于假手术组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与 I/R 组相比,DE + I/R 组肺细胞凋亡指数明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2、图 2。

## 3 讨论

I/R 普遍发生于各个组织器官,大量实验证明

表 2 各组肺组织细胞色素 C 阳性细胞率和细胞凋亡指数比较

Tab. 2 Comparison of cytochrome C positive cell rates and apoptosis indexes in rat lungs of different groups

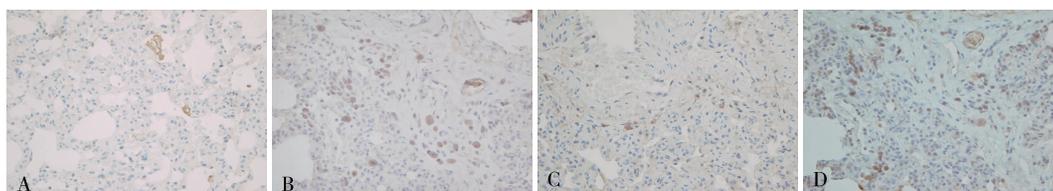
组别	n	细胞色素 C 阳性细胞率(%)	细胞凋亡指数 (%)
假手术组	10	1.00 ± 0.32	0.26 ± 0.03
I/R 组	10	14.00 ± 1.29 <sup>(1)</sup>	8.11 ± 1.15 <sup>(1)</sup>
DE 组	10	4.56 ± 0.74 <sup>(2)(3)</sup>	1.95 ± 0.68 <sup>(2)(3)</sup>
5-HD + DE 组	10	13.80 ± 1.31 <sup>(1)</sup>	7.83 ± 1.27 <sup>(1)</sup>

与假手术组比较,<sup>(1)</sup> $P < 0.01$ ,<sup>(2)</sup> $P < 0.05$ ;<sup>(3)</sup>与 I/R 组比较, $P < 0.05$

I/R 可加重心、脑、肾、肠、肺等器官损伤,是影响缺血治疗效果的一个重要因素。再灌注损伤发病机制复杂,氧自由基的作用、钙超载、中性粒细胞、细胞凋亡和补体激活等均可能参与了再灌注损伤的发病过程<sup>[3-4]</sup>。肺 I/R 常常发生于心肺复苏、体外循环、肺栓塞、肺切除、肺移植等情况下,是影响术后肺组织功能恢复的关键性因素<sup>[5]</sup>。肺 I/R 后病理改变主要是肺泡-毛细血管通透性增高,中性粒细胞渗出、蛋白漏出、肺间质与肺泡水肿,肺湿/干比增加,组织炎症与细胞损伤,以及肺细胞凋亡与坏死等,从而导致肺功能明显降低。本实验结果显示肺经 I/R 后,光镜下可见肺泡腔内可见明显的出血、水肿,炎性细胞浸润,组织、细胞结构紊乱,肺组织损伤明显;肺湿/干重比较假手术组明显增高。

实验和临床资料表明,HPC/IPC 是减轻脏器 I/R 的有力防治措施,研究大多涉及心脏和脑组织,在本课题组之前的研究中也表明 HPC 对大鼠肺缺血再灌注损伤有保护作用,认为是细胞线粒体释放了细胞色素 C,抑制细胞凋亡从而保护肺 I/R 损伤<sup>[6-8]</sup>。

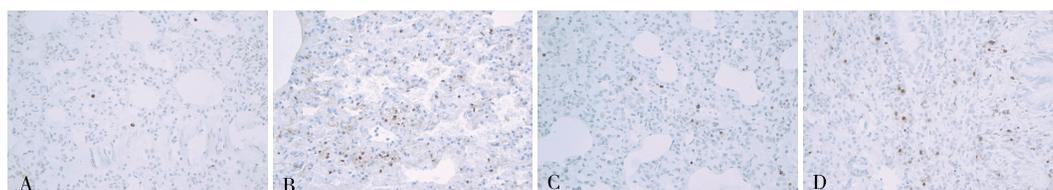
研究表明,在低氧 HPC 对抗低氧性肺损伤的保护作用机制中线粒体 ATP 敏感性钾通道起到了重要的作用,研究中发现 mitoKATP 的开放剂 DE 可以提高肺泡液体清除率,减轻肺水肿和肺损伤,而特异性抑制剂 5-HD 和格列苯脲可以阻断 DE 的保护作用<sup>[2]</sup>。提示 mitoKATP 的开放对肺 I/R 也具有保护作用。为了进一步验证这一观点,本研究应用 DE 进行 HPC/IPC,实验结果发现,DE 对肺 I/R 有明显的保护作用,与 I/R 组相比,光镜下可见肺损伤性病理形态学改变明显减轻,肺/干重比明显下降。当应用 5-HD 关闭 mitoKATP 后,与 DE 组相比,光镜下肺组织损伤加重,肺湿/干重比明显升



A 为假手术组, B 为 I/R 组, C 为 DE + I/R 组, D 为 5-HD + DE + I/R 组

图 1 肺组织细胞色素 C 表达 (SABC,  $\times 400$ )

Fig. 1 Expression of cytochrome C in rat lung tissues of different groups (SABC,  $\times 400$ )



A 为假手术组, B 为 I/R 组, C 为 DE + I/R 组, D 为 5-HD + DE + I/R 组

图 2 肺组织细胞凋亡 (TUNEL,  $\times 400$ )

Fig. 2 Lung tissue sections of different groups showing different amount of apoptosis cells (TUNEL,  $\times 400$ )

高。实验表明 DE 能够减轻 I/R 所引起的肺损伤、肺水肿, 5-HD 有阻断 DE 的作用加重肺损伤。

实验还发现, 肺 I/R 后肺组织细胞色素 C 的阳性表达率明显增加, 肺细胞凋亡指数也明显增加, DE 预处理可显著降低肺组织细胞色素 C 的阳性表达率和细胞凋亡指数, 而预先应用 5-HD 后则肺组织细胞色素 C 阳性表达率增加, 肺组织细胞凋亡明显, 且与 I/R 组相比无显著性差异。这可能是由于 DE 引起 mitoKATP 开放和线粒体膜电位  $\Delta\psi_m$  部分去极化, 减少了细胞色素 C 从线粒体释放入胞浆, 从而减少肺动脉平滑肌细胞的凋亡发生。

综上所述, mitoKATP 的开放可以减轻肺 I/R 所致的肺损伤、肺水肿, 还可通过抑制线粒体细胞色素 C 释放至胞浆、抑制肺组织细胞凋亡对肺 I/R 损伤的发挥保护作用。

## 4 参考文献

- [1] Ambros JT, Herrero-Fresneda I, Borau OG, et al. Ischemic preconditioning in solid organ transplantation: from experimental to clinics [J]. *Transplant International*, 2007(20):219-229.
- [2] 胡焜琳, 万笑笑, 罗丹, 等. 线粒体 ATP 敏感钾通道在低氧预处理抗低氧性肺损伤中的作用[J]. *华中医学*

杂志, 2006(5):353-354,366.

- [3] Lopera YE, Fantinelli J, Gonzalez-Arbelaes LF, et al. Antioxidant activity and cardioprotective effect of a nonalcoholic extract of caccinium meridionale Swartz during ischemia-reperfusion in rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013(2013):1115-1165.
- [4] Ginsburg KS, Weber CR, Bers DM. Cardiac  $Na^+-Ca^{2+}$  exchanger: dynamics of  $Ca^{2+}$ -dependent activation and deactivation in intact myocytes [J]. *J Physiol*, 2013(Pt-8):2067-2086.
- [5] Den Hengst WA, Gielis JF, Lin JY, et al. Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process [J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2010(5):1283-1299.
- [6] 李涛, 陈莹, 陆德琴, 等. 大鼠整体低氧预处理减轻肺缺血再灌注损伤 [J]. *贵阳医学院学报*, 2008(6):632-634,639.
- [7] 陈莹, 陆德琴, 李涛, 等. 整体低氧预处理对大鼠肺组织细胞色素 C 表达和细胞凋亡的影响 [J]. *贵阳医学院学报*, 2009(5):504-507.
- [8] 陆德琴, 陈莹, 李涛, 等. 大鼠整体低氧预处理对在体肺缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *重庆医学*, 2010(15):1960-1962.

(2015-01-05 收稿, 2015-02-25 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘 华