

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.15.003

文章编号: 1005-8982(2016)15-0011-11

论著

芥子气经腹腔和气管致大鼠急性肺损伤细胞凋亡的变化*

祝筱姬¹, 朱双双², 韩玮¹, 贝媛媛², 钟玉绪³, 刘菲¹, 王涛⁴, 赵超⁵, 赵建³

(1.解放军第 89 医院 呼吸科, 山东 潍坊 261021; 2.潍坊医学院 研究生处, 山东 潍坊 261042; 3.军事医学科学院 毒物药物研究所, 北京 100850; 4.解放军第 89 医院 病理科, 山东 潍坊 261021; 5.解放军第 89 医院 检验科, 山东 潍坊 261021)

摘要:目的 经腹腔和气管建立大鼠芥子气(SM)急性肺损伤动物模型,比较两种大鼠急性肺损伤模型细胞凋亡的差异。**方法** 选取 Sprague Dawley 大鼠 136 只,随机分为 5 组,正常对照组 8 只,其他 4 个组为腹腔 SM 组、腹腔丙二醇对照组、气管 SM 组、气管丙二醇对照组,每组 32 只。腹腔 SM 组腹腔内注入稀释的 SM 0.1 ml(0.96 LD₅₀=8 mg/kg),气管 SM 组气管内注入稀释的 SM 0.1 ml(0.98 LD₅₀=2 mg/kg),正常对照组未做任何处理。采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记测定法(TUNEL)染色和免疫组织化学法及电镜观察,判断细胞凋亡情况。**结果** ①腹腔 SM 组各时间段肺泡间隔 TUNEL 染色阳性细胞表达率较气管 SM 组增多($P<0.05$)。②腹腔 SM 组各时间段肺泡间隔凋亡蛋白 Bax 阳性表达率较气管 SM 组升高($P<0.05$);腹腔 SM 组各时间段肺泡间隔凋亡蛋白 Bcl-2 阳性表达率较气管 SM 组降低($P<0.05$)。③腹腔 SM 组各时间段肺泡间隔凋亡蛋白酶 Caspase-3、Caspase-9 阳性表达率较气管 SM 组增多($P<0.05$)。④电镜显示,染毒 72 h,腹腔 SM 组和气管 SM 组 I 型和 II 型肺泡上皮凋亡细胞形态特征为上皮细胞膜附着的微绒毛断裂缺失,排列紊乱;线粒体嵴模糊,粗面内质网表面附着的核糖体脱离,并游离于细胞质中。**结论** SM 经腹腔和气管染毒致大鼠急性肺损伤,通过内源性通道引发细胞凋亡调节异常,SM 经腹腔染毒大鼠各项细胞凋亡指标比经气管明显升高,推测可能与 SM 经腹腔的快速吸收有关。

关键词: 芥子气;肺损伤;细胞凋亡

中图分类号: R114;R563.8

文献标识码: A

Changes of apoptosis in acute pulmonary injury of rats induced by intraperitoneal and tracheal injection of sulfur mustard*

Xiao-ji Zhu¹, Shuang-shuang Zhu², Wei Han¹, Yuan-yuan Bei², Yu-xu Zhong³,
Fei Liu¹, Tao Wang⁴, Chao Zhao⁵, Jian Zhao³

(1. Department of Respiratory Diseases, the 89th Hospital of PLA, Weifang, Shandong 261021, China; 2. Graduate Department, Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261042, China; 3. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 4. Department of Pathology; 5. Clinical Laboratory, the 89th Hospital of PLA, Weifang, Shandong 261021, China)

Abstract: Objective To establish rat models of sulfur mustard (SM)-induced acute lung injury via intra-

收稿日期: 2015-01-19

* 基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项 (No: 2013ZX09J13103-01B)

[通信作者] 赵建, E-mail: jian_zhao@126.com; Tel: 010-66931646, 18910216751

peritoneal and tracheal injection, and compare the difference in apoptosis of the two models. **Methods** A total of 136 male Sprague Dawley rats were selected and randomly divided into control group with 8 cases and other four groups (i.e. intraperitoneal SM group, intraperitoneal glycol propylene group, tracheal SM group and tracheal glycol propylene group with 32 cases in each group). The intraperitoneal SM group was intraperitoneally injected with 0.1 ml diluted SM ($0.96 LD_{50} = 8 \text{ mg/kg}$), the tracheal SM group had intratracheal injection of 0.1 ml diluted SM ($0.98 LD_{50} = 2 \text{ mg/kg}$), meanwhile the status quo was kept with the control group. SM-induced apoptosis was observed by TUNEL staining and immunohistochemical staining as well as electron microscopy. **Results** In the alveolar septum, the expression rate of positive cells by TUNEL staining in the intraperitoneal SM group was increased compared with that in the tracheal SM group at the same period of time ($P < 0.05$). In the alveolar septum, a significantly higher positive expression rate of Bax protein was detected by immunohistochemical staining in the intraperitoneal SM group at different periods of time compared with that in the tracheal SM group at the corresponding period ($P < 0.05$); while a significantly lower positive expression rate of Bcl-2 protein was detected by immunohistochemical staining in the intraperitoneal SM group at different periods of time compared with that in the tracheal SM group at the corresponding period ($P < 0.05$). In the alveolar septum, the expression rates of caspase-3 and caspase-9 by immunohistochemical staining in the intraperitoneal SM group at different periods of time were increased compared those with the tracheal SM group at the corresponding period ($P < 0.05$). Electron microscopic observation confirmed that both type I and type II alveolar epithelial cells in the lungs exhibited apoptotic morphologic features, such as break, loss and disarrangement of the microvilli on cell membrane, blurred mitochondrial cristae, and detachment and dissociation of the ribosomes from the surface of the rough endoplasmic reticula. **Conclusions** Our results showed that dysregulation of apoptosis via intrinsic pathways in the intraperitoneal SM group and the tracheal SM group leads to up-regulation of apoptosis. In SM-induced acute lung injury in rats via intraperitoneal route, the index of apoptosis is significantly higher than that via tracheal route, which may be related to fast absorption of SM in the peritoneal cavity.

Keywords: sulfur mustard; lung injury; apoptosis

芥子气(sulfur mustard, SM)是一种最常用的化学武器,据统计其致伤率占有所有化学武器的 80%^[1]。SM 的主要靶器官是皮肤、肺、眼睛,其死亡率主要来自肺损伤和呼吸道病变^[2]。SM 中毒的病理生理机制相当复杂,涉及 DNA 和蛋白质烷化、酶功能失调、基因表达改变、氧自由基产生过剩和能量耗竭,导致细胞周期受阻,细胞凋亡或死亡,且所有阶段均伴随炎症反应^[3]。SM 诱导肺损伤与细胞凋亡密切相关,且细胞凋亡是 SM 诱导肺损伤的重要机制之一^[4]。动物实验表明,SM 经口服、皮肤、皮下、静脉、腹腔、气管途径均可致急性肺损伤,并且具有时间和剂量依赖性^[5]。本实验通过建立高剂量 SM 经腹腔和气管途径致大鼠急性肺损伤模型,探讨其细胞凋亡的细胞和分子机制,为将来的干预性治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与仪器

1,2-丙二醇溶液由天津致远化学有限公司提供,羊血清由北京中杉金桥生物技术有限公司提供,

微波缓冲液自配,试剂由北京化工厂提供,Roche 细胞凋亡试剂由瑞士罗氏生物科技公司提供,Bax、Bcl-2、活化的胱天蛋白酶(Caspase)-3、Caspase-9试剂盒由北京博奥森生物技术有限公司提供,H-7500 型透射电镜由日本日立公司提供。

1.2 实验动物与分组

健康雄性 Sprague Dawley 大鼠(SPF 级,中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号:0015902)136 只,体质量 280 ~ 300 g,年龄 15 周。

将大鼠分为腹腔 SM 组(32 只)、腹腔丙二醇组(32 只)、气管 SM 组(32 只)、气管丙二醇组(32 只)、正常对照组(8 只)。SM 液(纯度 >90%)临用前用丙二醇稀释至所需浓度。①气管途径染毒动物模型建立:实验前气管 SM 组和气管丙二醇组皮下注射阿托品(0.05 mg/kg),30 min 后腹腔内注射盐酸氯胺酮(100 mg/kg)实施麻醉,气管内注入稀释的 SM 0.1 ml ($0.98 LD_{50} = 2 \text{ mg/kg}$),气管丙二醇组注入丙二醇 0.1 ml。②腹腔途径染毒动物模型建立:同上方法实施麻醉。

腹腔 SM 组大鼠腹腔内注入稀释的 SM 0.1 ml (0.96 LD₅₀=8 mg/kg), 腹腔丙二醇组注入丙二醇 0.1 ml。正常对照组未做任何处理。

1.3 观察指标

1.3.1 制备石蜡切片与电镜观察 收集大鼠肺组织标本共 136 份, 10% 中性福尔马林溶液固定标本 24 h, 常规脱水、石蜡包埋、切片、苏木精 - 伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色, 光镜观察。制备超薄切片: 取新鲜标本 1 mm³, 用 3% 戊二醛液固定标本, 别在 70%、80%、90% 和 100% 丙酮梯度脱水 15 min, 环氧树脂包埋, 超薄切片, 铀铅染色, 透射电镜观察。

1.3.2 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记测定 (terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL) 法标记凋亡细胞 4 μm 石蜡切片, 常规二甲苯脱蜡, 0.3% 双氧水 H₂O₂ 处理 10 min; 1:200 的 Proteinase K 稀释液消化 10 min; 标记缓冲液末端转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) 和异羟基金地黄毒苷配基标记的脱氧尿嘧啶核苷三磷酸 (digoxigenin-deoxyuridine triphosphate, DIG-dUTP) 各 1 μl, 加入 18 μl 标记缓冲液, 每片 20 μl, 37℃ 标记 2 h。封闭液每片 50 μl, 室温处理 30 min。抗体稀释液 1:100 稀释生物素化抗地高辛抗体, 每片 50 μl, 37℃ 孵育 30 min。抗体稀释液 1:100 稀释链霉亲和素 - 生物素复合物, 每片 50 μl, 37℃ 孵育 30 min。新鲜配制二氨基联苯胺显色液显色 20 min, 苏木素复染, 0.01 mol 三羟甲基胺 - 盐酸缓冲盐溶液 (Tris-HCl buffer saline, TBS) 终止反应, 甘油明胶封片。以不加 TdT 酶作阴性对照, 已知阳性切片作阳性对照组。

1.3.3 凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-2 检测 免疫组织化学法检测凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达。石蜡切片, 常规二甲苯脱蜡, 抗原修复, 滴加兔抗大鼠 Bax 和 Bcl-2 单克隆抗体 20 μl/片, 再滴加二抗, 三乙烯二胺 (triethylene diamine, DABC) 显色, 苏木精衬染, 常规树脂封片。磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 代替一抗作阴性对照, 用已知阳性切片作阳性对照组。

1.3.4 Caspase-3 和 Caspase-9 检测 免疫组织化学法检测 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达。石蜡切片, 常规二甲苯脱蜡, 抗原修复, 滴加兔抗大鼠 Caspase-3 和 Caspase-9 单克隆抗体 20 μl/片, 再滴加二抗, DABC 显色, 苏木精衬染, 常规树脂封片。PBS 代

替一抗作阴性对照, 用已知阳性切片作阳性对照组。

1.3.5 显微图像分析 采用 Image-Pro Plus 6.0 病理细胞图像分析系统, 将各组 TUNEL 标记及 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 免疫组织化学法染色切片行图像分析, 选取测量参数, 测定阳性率和强阳性率, 每间隔 1 个高倍视野 (400 倍) 选取 1 个视野进行观察, 每张切片观察 ≥ 5 个高倍视野, 计算其肺泡间隔阳性细胞比率, 肺泡间隔阳性细胞比率 = 5 个高倍视野的阳性细胞数 / 细胞总数 × 100%, 并计算其平均值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 ± 平均差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用重复测量的多因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肺泡间隔细胞凋亡情况

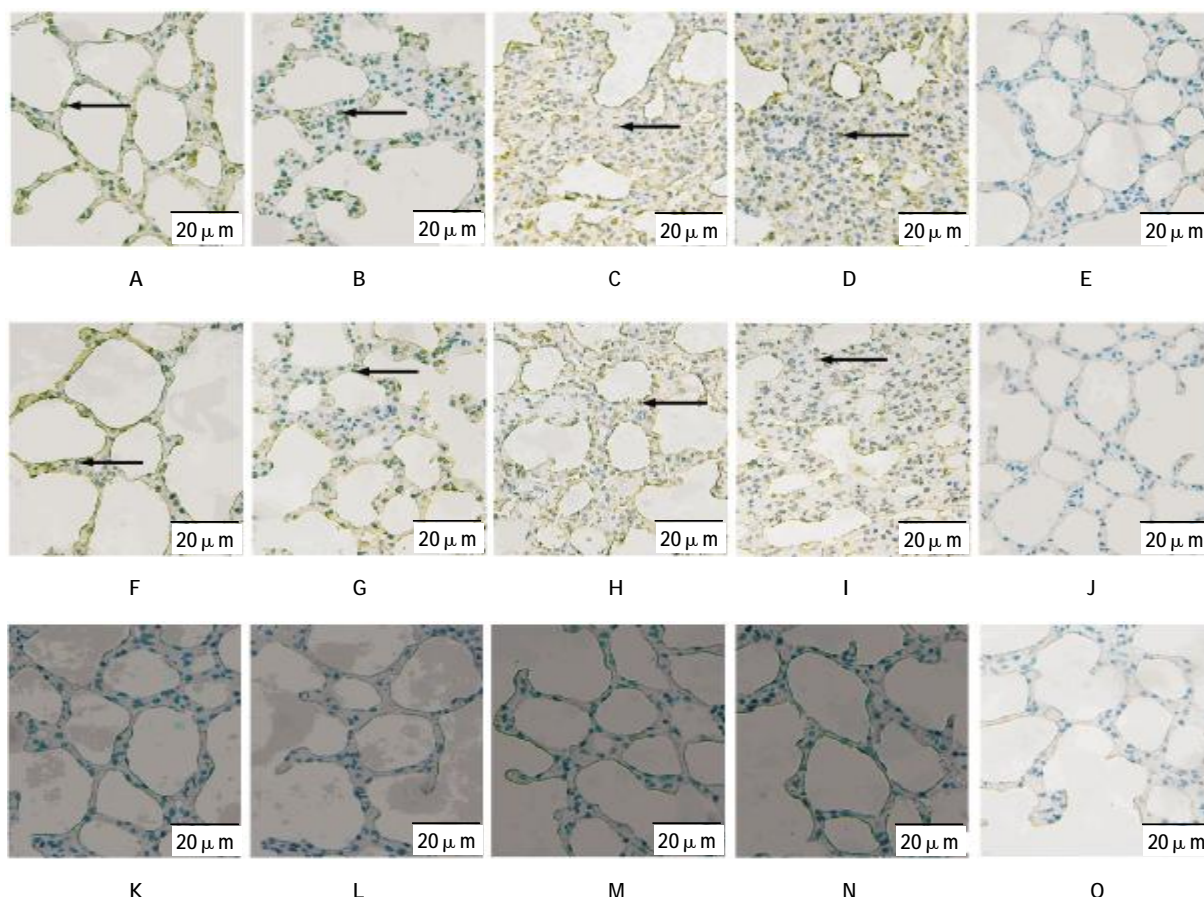
2.1.1 TUNEL 染色 腹腔 SM 组 6 和 24 h 肺泡间隔凋亡细胞呈带状分布, 48 h 肺泡间隔凋亡细胞聚集成簇, 72 h 肺泡间隔凋亡细胞呈团簇状; 气管 SM 组 6、24、48 和 72 h 肺泡间隔细胞凋亡聚集成簇; 丙二醇和正常对照组凋亡细胞呈零星分布 (见图 1)。5 组不同时间的细胞凋亡阳性表达率比较, 采用重复测量数据的方差分析结果: ①腹腔和气管 SM 组不同时间的细胞凋亡阳性表达率比较, 差异有统计学意义 ($F=18.479, P=0.000$)。②腹腔 SM 组与其他 4 组的细胞凋亡阳性表达率比较, 差异有统计学意义 ($F=1318.654, P=0.000$)。③腹腔 SM 组与气管 SM 组的细胞凋亡阳性表达率变化趋势比较, 差异有统计学意义 ($F=4.623, P=0.000$), 呈递增趋势 (见图 2、3)。

2.1.2 Bax 免疫组织化学法 腹腔和气管 SM 组 6 h 肺泡间隔凋亡蛋白 Bax 阳性表达呈带状分布, 24 h 肺泡间隔凋亡蛋白 Bax 阳性表达聚集成簇, 48 和 72 h 肺泡间隔凋亡蛋白 Bax 阳性表达呈团簇状; 丙二醇和正常对照组肺泡间隔凋亡蛋白 Bax 阳性表达呈零星分布 (见图 4)。5 组不同时间的细胞凋亡阳性表达率比较, 采用重复测量数据的方差分析结果: ①腹腔和气管 SM 组不同时间的细胞凋亡阳性表达率比较, 差异有统计学意义 ($F=23.202, P=0.000$)。②腹腔 SM 组与其他 4 组的细胞凋亡阳性表达率比较, 差异有统计学意义 ($F=490.828, P=0.000$)。③腹腔 SM 组与气管 SM 组的细胞凋亡阳性表达率变化趋

势比较,差异有统计学意义($F=8.031, P=0.000$),呈递增趋势(见图 5、6)。

2.1.3 Bcl-2 免疫组织化学法 腹腔和气管 SM 组 6 h 肺泡间隔凋亡蛋白 Bcl-2 阳性表达呈团簇状,24 h 肺泡间隔凋亡蛋白 Bcl-2 阳性表达聚集成簇,48 和 72 h 肺泡间隔凋亡蛋白 Bax 阳性表达呈带状分布。

丙二醇和正常对照组肺泡间隔凋亡蛋白 Bcl-2 阳性表达呈零星分布(见图 7)。5 组不同时间的细胞凋亡阳性表达率比较,采用重复测量数据的方差分析结果:①腹腔和气管 SM 组不同时间的细胞凋亡阳性表达率比较,差异有统计学意义($F=211.833, P=0.000$)。②腹腔 SM 组与其他 4 组的细胞凋亡阳性表达率比



A ~ D: 6、24、48 和 72 h 腹腔 SM 组肺泡间隔 TUNEL 染色呈阳性表达;E: 正常对照组肺泡间隔 TUNEL 染色(箭头示阳性表达, Bars, 20 μm);F ~ I: 6、24、48 和 72h 气管 SM 组肺泡间隔 TUNEL 染色呈阳性表达;J: 正常对照组肺泡间隔 TUNEL 染色(箭头示阳性表达, Bars, 20 μm);K ~ N: 6、24、48 和 72h 气管丙二醇对照组肺泡间隔 TUNEL 染色;O: 正常对照组肺泡间隔 TUNEL 染色(箭头示阳性表达, Bars, 20 μm)

图 1 大鼠肺泡间隔 TUNEL 染色 (× 400)

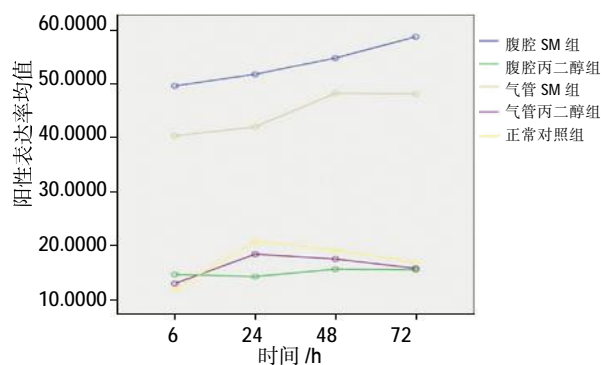
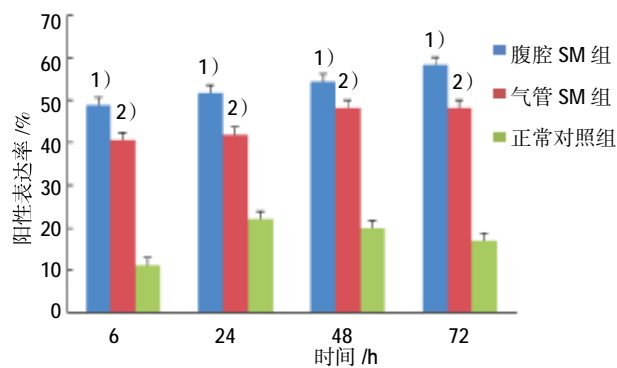


图 2 5 组大鼠肺泡间隔 TUNEL 染色细胞凋亡阳性表达率不同时间的变化趋势



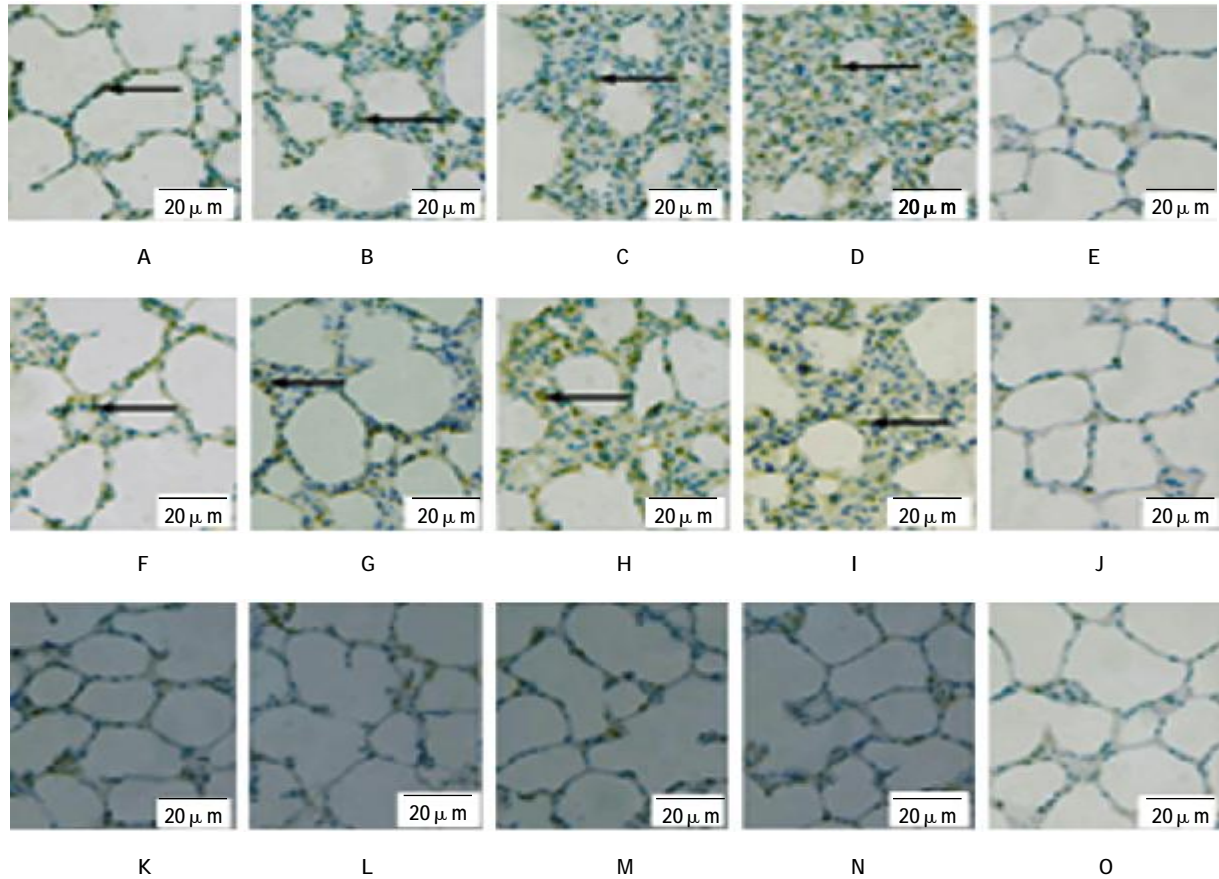
1)与气管 SM 组比较, $P<0.05$; 2)与正常对照组比较, $P<0.05$

图 3 大鼠肺泡间隔 TUNEL 染色阳性细胞表达率

较,差异有统计学意义($F=617.955, P=0.000$)。③腹腔 SM 组与气管 SM 组的细胞凋亡阳性表达率变化趋势比较,差异有统计学意义($F=134.574, P=0.000$),呈递减趋势(见图 8、9)。

2.1.4 Caspase-3 免疫组织化学法 腹腔和气管 SM

组 6 h 肺泡间隔凋亡细胞 Caspase-3 阳性表达呈带状分布,24 h 肺泡间隔凋亡细胞 Caspase-3 阳性表达聚集成簇,48 和 72 h 肺泡间隔凋亡细胞 Caspase-3 阳性表达呈团簇状。丙二醇和正常对照组肺泡间隔凋亡细胞 Caspase-3 阳性表达呈零星分布(见



A ~ D: 6、24、48 和 72 h 腹腔 SM 组肺泡间隔凋亡蛋白 Bax 呈阳性表达;E: 正常对照组肺泡间隔凋亡蛋白 Bax 表达(箭头示阳性表达, Bars, 20 μm);F ~ I: 6、24、48 和 72 h 气管 SM 组肺泡间隔凋亡蛋白 Bax 呈阳性表达;J: 正常对照组肺泡间隔凋亡蛋白 Bax 表达(箭头示阳性表达, Bars, 20 μm);K ~ N: 6、24、48 和 72 h 气管丙二醇对照组肺泡间隔凋亡蛋白 Bax 表达;O: 正常对照组肺泡间隔凋亡蛋白 Bax 表达(箭头示阳性表达, Bars, 20 μm)

图 4 大鼠肺泡间隔凋亡蛋白 Bax 表达 (× 400)

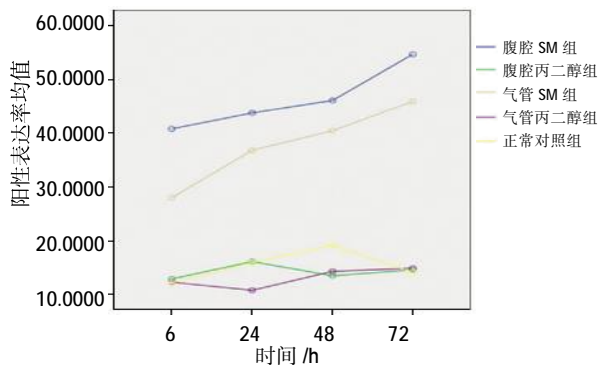
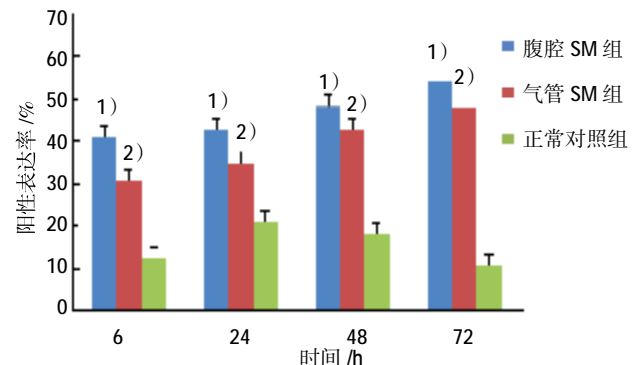


图 5 5 组大鼠肺泡间隔凋亡蛋白 Bax 阳性表达率不同时间的变化趋势



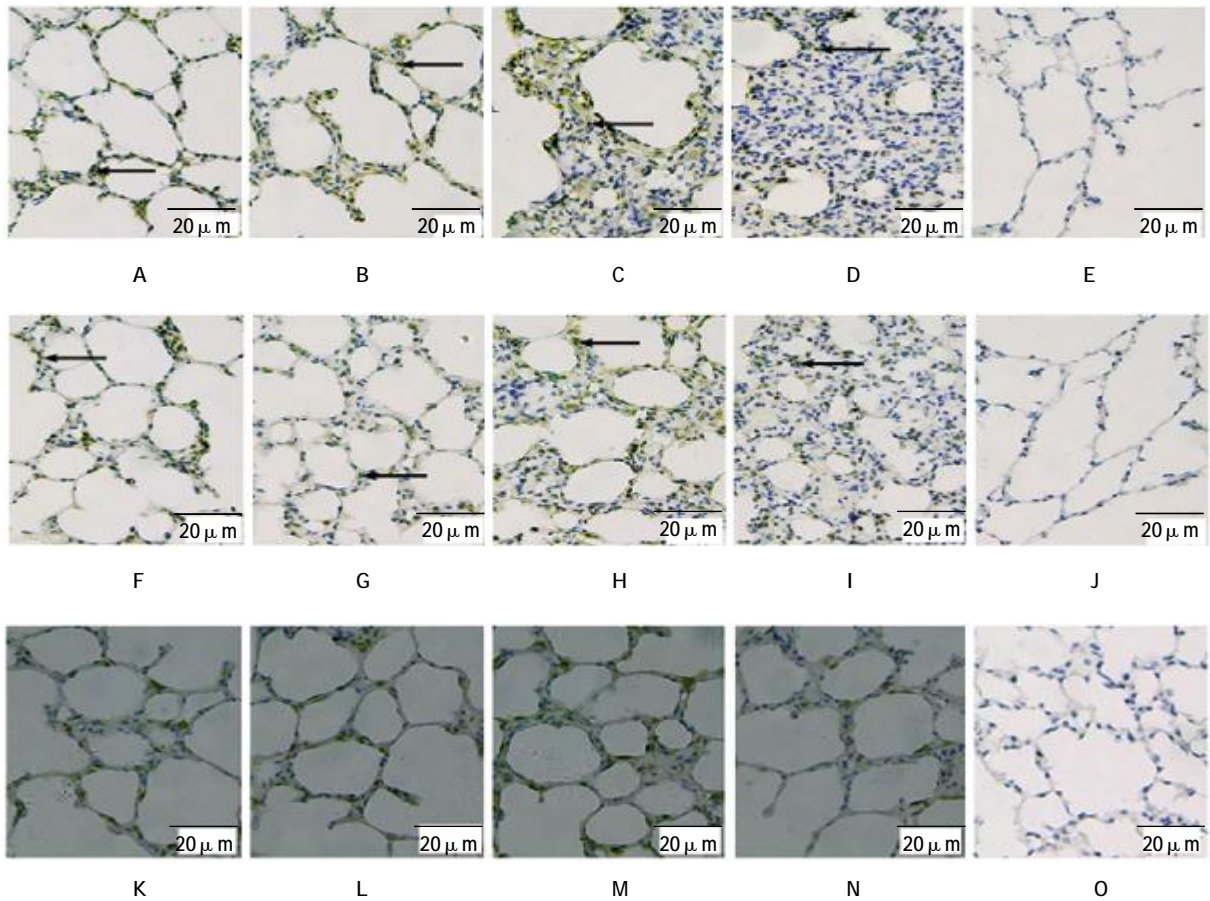
1)与气管 SM 组比较, $P < 0.05$; 2)与正常对照组比较, $P < 0.05$

图 6 大鼠肺泡间隔凋亡蛋白 Bax 阳性表达率

图 10)。5 组不同时间的细胞凋亡阳性表达率比较, 采用重复测量数据的方差分析结果: ①腹腔和气管 SM 组不同时间的细胞凋亡阳性表达率比较, 差异有统计学意义($F=34.201, P=0.000$)。②腹腔 SM 组与其他 4 组的细胞凋亡阳性表达率比较, 差异有统计

学意义($F=759.817, P=0.000$)。③腹腔 SM 组与气管 SM 组的细胞凋亡阳性表达率变化趋势比较, 差异有统计学意义($F=18.073, P=0.000$), 呈递增趋势(见图 11、12)。

2.1.5 Caspase-9 免疫组织化学法 腹腔和气管 SM



A ~ D: 6、24、48 和 72 h 腹腔 SM 组肺泡间隔凋亡蛋白 Bcl-2 呈阳性表达; E: 正常对照组肺泡间隔凋亡蛋白 Bcl-2 表达(箭头示阳性表达, Bars, 20 μm); F ~ I: 6、24、48 和 72 h 气管 SM 组肺泡间隔凋亡蛋白 Bcl-2 呈阳性表达; J: 正常对照组肺泡间隔凋亡蛋白 Bcl-2 表达(箭头示阳性表达, Bars, 20 μm); K ~ N: 6、24、48 和 72 h 气管丙二醇对照组肺泡间隔凋亡蛋白 Bcl-2 表达; O: 正常对照组肺泡间隔凋亡蛋白 Bcl-2 表达(箭头示阳性表达, Bars, 20 μm)

图 7 大鼠肺泡间隔凋亡蛋白 Bcl-2 表达 (× 400)

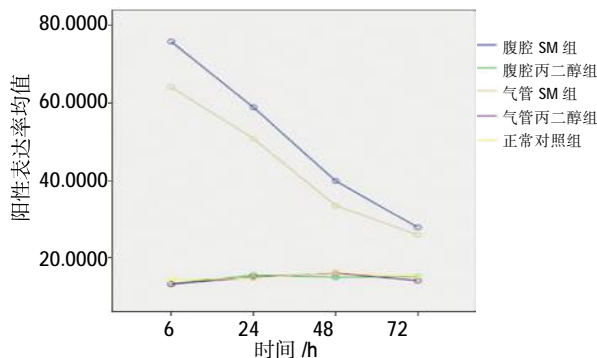
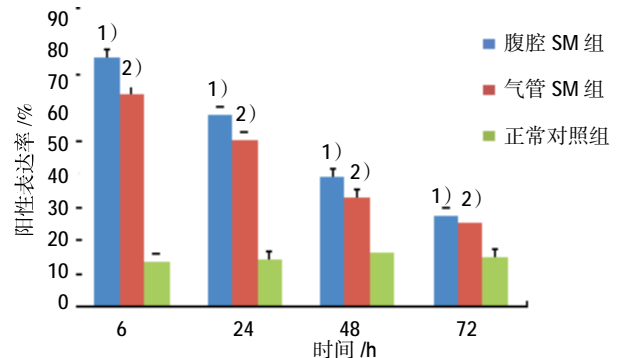


图 8 5 组大鼠肺泡间隔凋亡蛋白 Bcl-2 阳性表达率不同时间的变化趋势

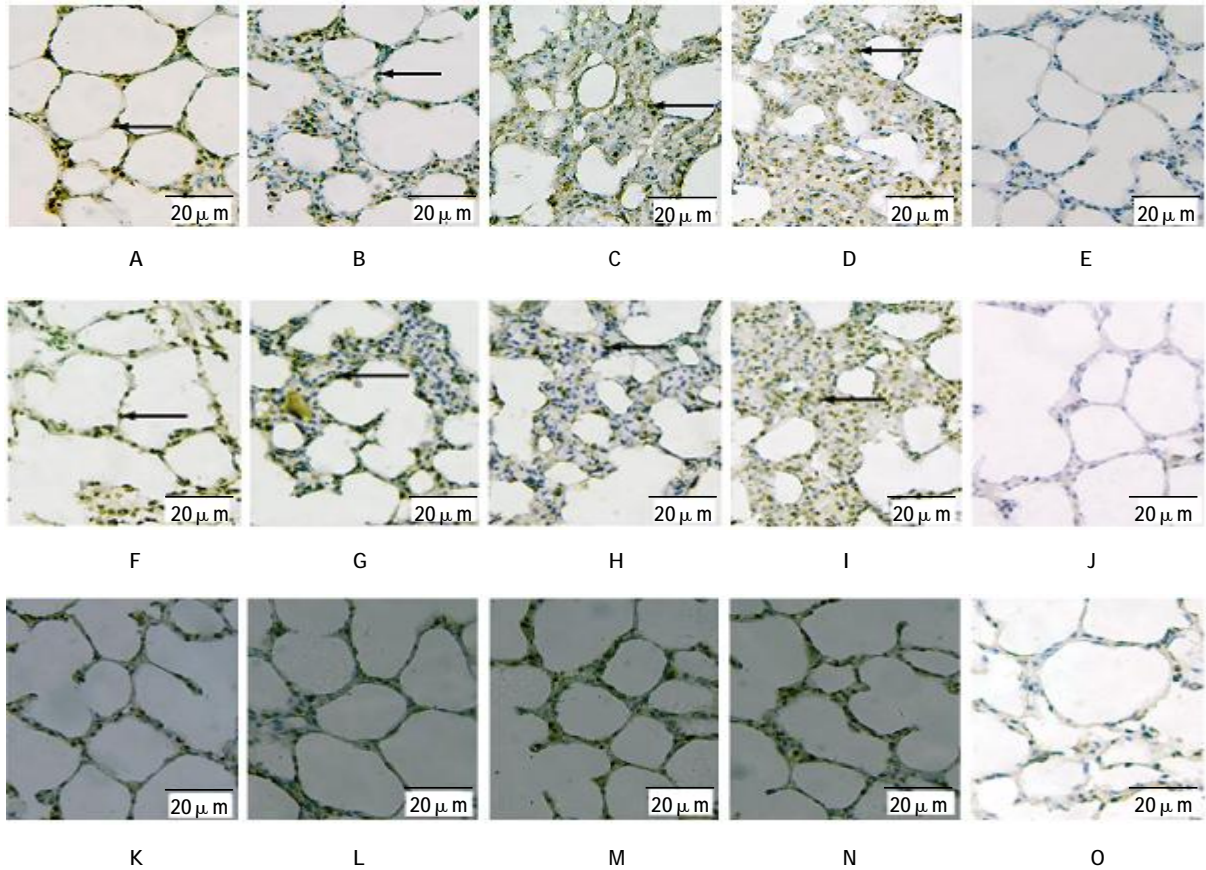


1) 与气管 SM 组比较, $P < 0.05$; 2) 与正常对照组比较, $P < 0.05$

图 9 大鼠肺泡间隔凋亡蛋白 Bcl-2 阳性表达率

组 6 h 肺泡间隔凋亡细胞 Caspase-9 阳性表达呈带状分布,24 h 肺泡间隔凋亡细胞 Caspase-9 阳性表达聚集成簇,48 和 72 h 肺泡间隔凋亡细胞 Caspase-9 阳性表达呈团簇状。丙二醇和正常对照组肺泡间隔凋亡细胞 Caspase-9 阳性表达呈零星分布(见图 13)。5 组不同时间的细胞凋亡阳性表达率比

较,采用重复测量数据的方差分析结果:①腹腔和气管 SM 组不同时间的细胞凋亡阳性表达率比较,差异有统计学意义($F=24.755, P=0.000$)。②腹腔 SM 组与其他 4 组的细胞凋亡阳性表达率比较,差异有统计学意义($F=2\ 087.109, P=0.000$)。③腹腔 SM 组与气管 SM 组的细胞凋亡阳性表达率变化趋势比



A ~ D:6、24、48 和 72 h 腹腔 SM 组肺泡间隔凋亡细胞 Caspase-3 呈阳性表达;E: 正常对照组肺泡间隔Caspase-3 表达(箭头示阳性表达, Bars,20 μ.m);F ~ I:6、24、48 和 72 h 气管 SM 组肺泡间隔凋亡细胞 Caspase-3 呈阳性表达;J:正常对照组肺泡间隔 Caspase-3 表达(箭头示阳性表达, Bars,20 μ.m);K ~ N:6、24、48 和 72 h 气管丙二醇对照组肺泡间隔 Caspase-3 表达;O:正常对照组肺泡间隔 Caspase-3 表达(箭头示阳性表达, Bars,20 μ.m)

图 10 大鼠肺泡间隔 Caspase-3 表达 (× 400)

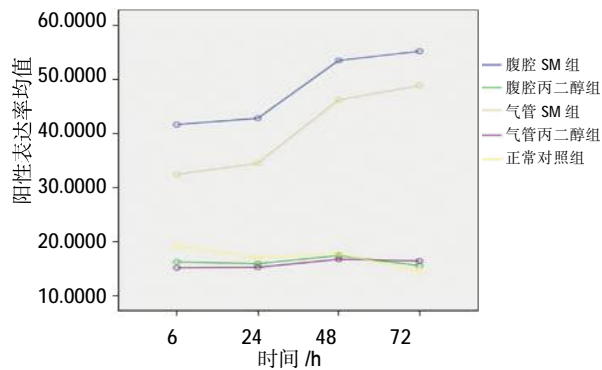
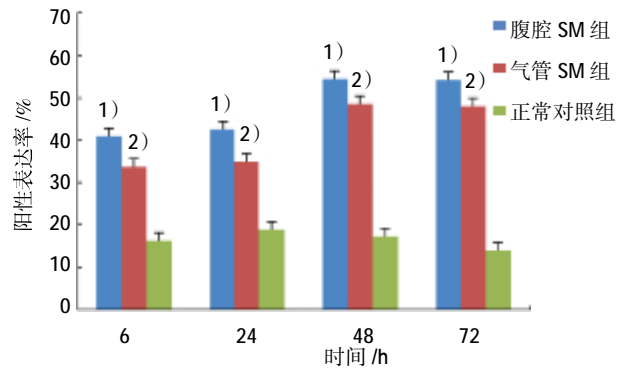


图 11 5 组大鼠肺泡间隔凋亡细胞 Caspase-3 阳性表达率不同时间的变化趋势



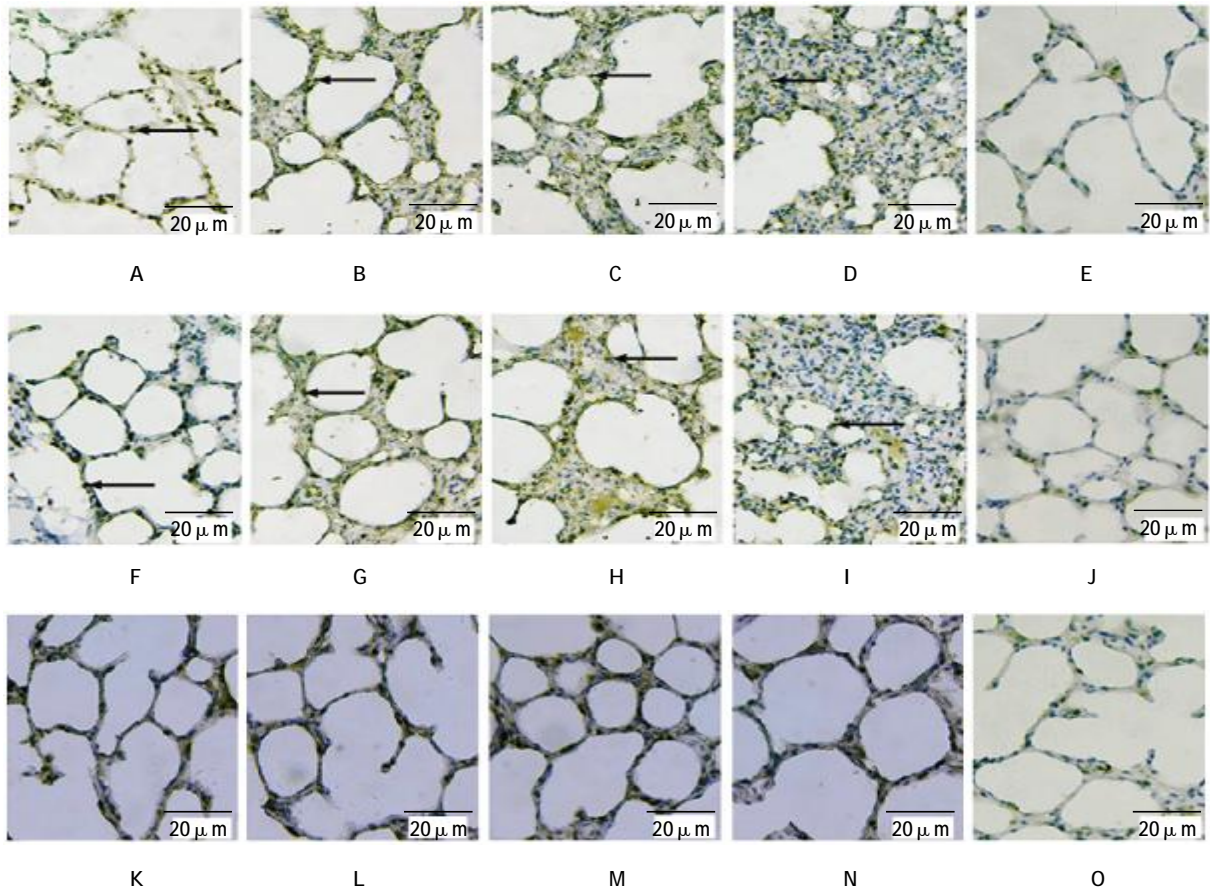
1)与气管 SM 组比较, $P<0.05$; 2)与正常对照组比较, $P<0.05$
图 12 大鼠肺泡间隔凋亡细胞 Caspase-3 阳性表达率

较, 差异有统计学意义 ($F=10.844, P=0.000$), 呈递增趋势 (见图 14、15)。

2.2 大鼠肺泡上皮细胞的超微结构变化

染毒 72 h, 腹腔和气管 SM 组大鼠 I 型和 II 型肺泡上皮凋亡细胞形态特征: 上皮细胞膜附着的微

绒毛断裂缺失, 排列紊乱; 线粒体嵴模糊, 粗面内质网表面附着的核糖体脱离, 并游离于细胞质中, 细胞核染色质正常。丙二醇和正常对照组肺泡上皮形态: 细胞膜、线粒体、粗面内质网、细胞核染色质正常。见图 16。



A~D: 6、24、48 和 72 h 腹腔 SM 组肺泡间隔凋亡细胞 Caspase-9 呈阳性表达; E: 正常对照组肺泡间隔 Caspase-9 表达 (箭头示阳性表达, Bars, 20 μm); F~I: 6、24、48 和 72 h 气管 SM 组肺泡间隔凋亡细胞 Caspase-9 呈阳性表达; J: 正常对照组肺泡间隔 Caspase-9 表达 (箭头示阳性表达, Bars, 20 μm); K~N: 6、24、48 和 72 h 气管丙二醇对照组肺泡间隔 Caspase-9 表达; O: 正常对照组肺泡间隔 Caspase-9 表达 (箭头示阳性表达, Bars, 20 μm)

图 13 大鼠肺泡间隔 Caspase-9 表达 (×400)

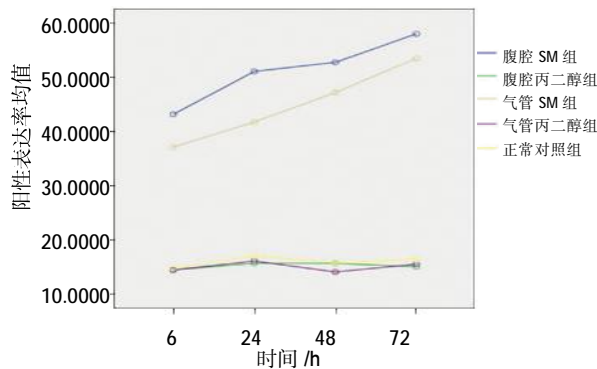
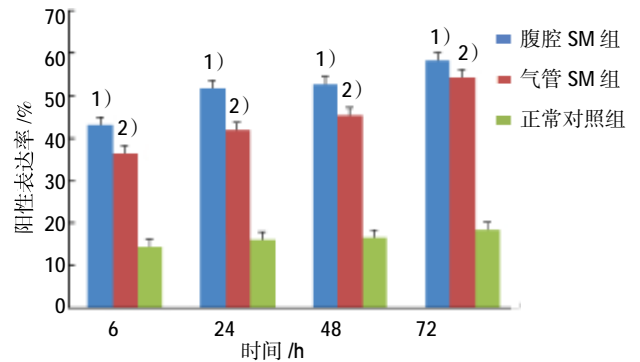
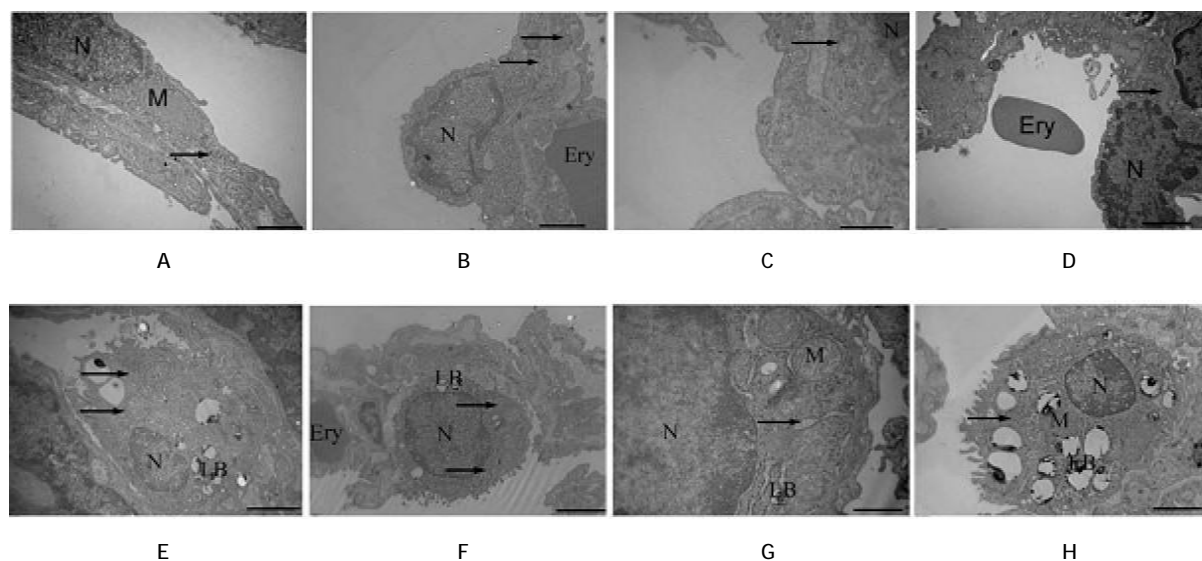


图 14 5 组大鼠肺泡间隔凋亡细胞 Caspase-9 阳性表达率不同时间的变化趋势



1) 与气管 SM 组比较, $P<0.05$; 2) 与正常对照组比较, $P<0.05$
图 15 大鼠肺泡间隔凋亡细胞 Caspase-9 阳性表达率



A:腹腔和气管 SM 组, I 型肺泡上皮细胞(铅铀双染, $\times 20\ 000$, Bars, $1.0\ \mu\text{m}$); B:腹腔和气管 SM 组, I 型肺泡上皮细胞(铅铀双染 $\times 10\ 000$, Bar, $20\ \mu\text{m}$); C:腹腔和气管丙二醇组, I 型肺泡上皮细胞(铅铀双染, $\times 15\ 000$, Bars, $1.5\ \mu\text{m}$); D:正常对照组, I 型肺泡上皮细胞(铅铀双染, $\times 15\ 000$, Bar, $1.5\ \mu\text{m}$); E:腹腔和气管 SM 组, II 型肺泡上皮细胞(铅铀双染, $\times 10\ 000$, Bar, $2.5\ \mu\text{m}$); F:腹腔和气管 SM 组, II 型肺泡上皮细胞(铅铀双染, $\times 10\ 000$, Bar, $2.5\ \mu\text{m}$); G:腹腔和气管丙二醇组, II 型肺泡上皮细胞(铅铀双染, $\times 30\ 000$, Bar, 901nm); H:正常对照组, II 型肺泡上皮细胞(铅铀双染, $\times 15\ 000$, Bar, $1.5\ \mu\text{m}$); N:细胞核(nucleus); M:线粒体(mitochondrion); Ery:红细胞(erythrocyte); LB:板状小体(lamellar body);箭头示粗面内质网

图 16 大鼠肺泡上皮细胞超微结构变化

3 讨论

细胞凋亡包括内源性(线粒体)和外源性(死亡受体)两种通路^[9]。内源性通路启动经促凋亡分子(细胞色素 C)从线粒体释放到胞浆内,导致 Caspase-9 激活,最后激活 Caspase-3;外源性通路经细胞表面死亡受体诱导,刺激死亡结构域相关蛋白(adaptor Fas-associated protein with death domain, FPDD)和死亡结构域相关肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor 1A-associated via death domain, TRADD),依次激活启动因子胱天蛋白酶原 -8、-10。FPDD/TRADD 和 Procaspase-8、Procaspase-10 组合成诱导死亡信号复合体(death-inducing signaling complex, DISC),DISC 能促进自身程序,启动 Procaspase 活化,激活胱天蛋白酶原 -8、-10 并从蛋白复合体中游离。Caspase-8、Caspase-10 可直接激活下游 Caspase-3、Caspase-7 导致细胞凋亡^[6-7]。Caspase 是一种关键的蛋白酶,在两种细胞凋亡通路中发挥重要作用^[9]。内源性通路和外源性通路均需激活 Caspase-3,其是细胞凋亡中的效应因子^[9]。在许多生物过程中,细胞的生存与死亡取决于线粒体表面的 Bcl-2 家族成员。Bcl-2 家族蛋白由促凋亡(Bax、Bak、Bok)和抗凋亡(Bcl-2、Bcl-xl)蛋白组成,

主要在线粒体水平调控 Caspase 活性^[10-11]。Bcl-2 和 Bcl-xl 可稳定线粒体的完整性,Bax 和 Bak 则可使小细胞器丧失稳定性。当 Bax 激活时,可嵌入线粒体外膜内,引发细胞色素 C 释放和细胞凋亡。反之,Bcl-2 表达过剩可抑制 Bax 激活,阻止 DNA 损伤和细胞色素 C 释放^[12]。细胞凋亡还包括细胞核形态改变、凋亡小体形成、胞质凝聚、线粒体膜电位降低、细胞内酸化、丝氨酸磷脂酰基裸露于细胞表面、细胞皱缩、膜出泡^[9]。SM 可触发多种分子通路致肺损伤,包括氧化应激、细胞凋亡、补给失调、蛋白水解酶与抗蛋白水解酶失调、炎症、气道重塑、基因失调,导致细胞的完整性和功能丧失^[13-17]。体内外实验研究表明,SM 主要通过线粒体通路和死亡受体通路诱导细胞凋亡^[2,4,8,18]。SM 诱导的细胞反应相当复杂,还涉及 3 种丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路和核因子- κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)通路、P53 和胱天蛋白酶-多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP, Caspase-PARP)通路、钙调蛋白通路^[19-22]。许多学者研究发现,SM 诱导细胞凋亡常与氧化应激、炎症反应、DNA 损伤伴随,并与其伴随的反应程度呈正相关^[23-26]。由此可见,在 SM 诱导肺损伤中,细胞

凋亡是重要的分子和细胞损伤机制之一。

本研究通过 TUNEL 染色检测发现,腹腔和气管 SM 组肺泡间隔凋亡细胞数随时间延长呈递增趋势。腹腔 SM 组各时间段肺泡间隔凋亡细胞阳性表达率较气管 SM 组明显增多($P < 0.05$)。免疫组织化学法显示,腹腔和气管 SM 组肺泡间隔凋亡蛋白 Bax 阳性表达随时间延长呈递增趋势,而凋亡蛋白 Bcl-2 则呈递减趋势。腹腔和气管 SM 组肺泡间隔凋亡蛋白酶 Caspase-3、Caspase-9 阳性表达随时间延长呈递增趋势。电镜显示,染毒 72h,腹腔 SM 组和气管 SM 组 I 型和 II 型肺泡上皮凋亡细胞形态特征为上皮细胞膜附着的微绒毛断裂缺失,排列紊乱;线粒体嵴模糊,粗面内质网表面附着的核糖体脱离,并游离于细胞质中。本研究结果提示,经两种途径致大鼠急性肺损伤中细胞凋亡是 SM 损伤机制之一,像炎症反应一样,与 SM 的暴露剂量和时间呈正相关^[27]。同时证实,导致细胞凋亡的分子机制是经线粒体通路。体外实验发现,SM 诱导细胞凋亡可通过线粒体通路和死亡受体通路,且两种通路之间存在着相互关联性^[28-29]。笔者检测的凋亡蛋白指标显示,促凋亡蛋白 Bax 表达增多,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达减少,Bax/Bcl-2 比值增加,该比值的变化与 TUNEL 染色凋亡细胞逐渐增加趋势相符合。检测的凋亡蛋白酶指标提示,启动因子 Caspase-9 和效应因子 Caspase-3 均呈阳性表达,表明线粒体通路中 Caspase 裂解和触发作用被激活^[30-31]。该凋亡蛋白酶的变化与 RAY^[9]和 SOURDEVAL 等^[32]报道结果相同。电镜显示,SM 诱导肺上皮细胞形态学变化主要在细胞膜、线粒体、粗面内质网。学者推测该损伤现象可能与线粒体膜通透性改变和线粒体膜电位降低及钙离子失衡有关^[33-34]。由此表明,线粒体是细胞易损伤的微小器官和生物程序的主要调控点^[11]。一旦线粒体损伤,则会激活多种促凋亡分子信号通路,有助于加速细胞的自我毁灭^[35-36]。笔者认为,SM 诱导细胞凋亡是多种因素作用的结果,其分子和细胞机制相当复杂,这种网络式调节通路尚未完全阐明。本研究结果显示,SM 经腹腔和气管致大鼠急性肺损伤通过内源性通道引发细胞凋亡调节异常,SM 经腹腔染毒大鼠各项细胞凋亡指标比气管明显升高,推测可能与 SM 腹腔的快速吸收有关。在经腹腔和气管造模剂量的选择方面,研究发现,SM 腹腔注射引起的肺损伤较经皮下注射或口服途径染毒更严重^[37]。当大鼠经腹腔注射 SM 剂量 $> 10 \text{ mg/kg}$ 时,就会出现大鼠死亡^[38]。

显然笔者选择经腹腔和气管 SM LD_{50} 相近的剂量建立急性肺损伤模型,SM 肺损伤细胞凋亡的反应程度出现差异性,说明血液对 SM 的吸收可能占主导作用。本研究提示,在 SM LD_{50} 相同剂量下,并非是经气管致肺损伤诱导细胞凋亡最重,为 SM 肺损伤的靶向干预提供有价值的参数。

参 考 文 献:

- [1] SHOHRATI M, KARIMZADEH I, SABURI A, et al. The role of N-acetylcysteine in the management of acute and chronic pulmonary complications of sulfur mustard: a literature review[J]. *Inhal Toxicol*, 2014, 26(9): 507-523.
- [2] KEYSER B M, ANDRES D K, NEALLEY E, et al. Postexposure application of Fas receptor small-interfering RNA to suppress sulfur mustard-induced apoptosis in human airway epithelial cells: implication for a therapeutic approach[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 344(1): 308-316.
- [3] KEHE K, BALSZUWEIT F, STEINRITZ D, et al. Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering[J]. *Toxicology*, 2009, 263(1): 12-19.
- [4] PIRZAD G, JAFARI M, TAVANA S, et al. The Role of Fas-FasL signaling pathway in induction of apoptosis in patients with sulfur mustard-induced chronic bronchiolitis[J]. *J Toxicol*, 2010, DOI: 10.1155/2010/373612.
- [5] KEYSER B M, ANDRES D K, HOLMES W W, et al. Mustard gas inhalation injury: therapeutic strategy[J]. *Int J Toxicol*, 2014, 33(4): 271-281.
- [6] GHANEI M, HARANDI A A. Molecular and cellular mechanism of lung injuries due to exposure to sulfur mustard: a review[J]. *Inhal Toxicol*, 2011, 23(7): 363-371.
- [7] JOSEPH L B, HECK D E, CERVELLI J A, et al. Structural changes in hair follicles and sebaceous glands of hairless mice following exposure to sulfur mustard[J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 96(3): 316-327.
- [8] RAY R, SIMBULAN-ROSENTHAL C M, KEYSER B M, et al. Sulfur mustard induces apoptosis in lung epithelial cells via a caspase amplification loop[J]. *Toxicology*, 2010, 271(3): 94-99.
- [9] GROSS A, MCDONNELL J M, KORSMEYER S J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(15): 1899-1911.
- [10] WONG W W, PUTHALAKATH H. Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway[J]. *IUBMB Life*, 2008, 60(6): 390-397.
- [11] RAY R, KEYSER B, BENTON B, et al. Sulfur mustard induces apoptosis in cultured normal human airway epithelial cells: evidence of a dominant caspase-8-mediated pathway and differential cellular responses[J]. *Drug Chem Toxicol*, 2008, 31(1): 137-148.
- [12] IMANI S, PANAHY Y, SALIMIYAN J, et al. Epigenetic: a miss-

- ing paradigm in cellular and molecular pathways of sulfur mustard lung: a prospective and comparative study[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2015, 18(8): 723-736.
- [13] VALIZADEH M, MIRZAEI B, TAVALLAEI M, et al. Down-regulation of TGF- β 1, TGF- β receptor 2, and TGF- β -associated microRNAs, miR-20a and miR-21, in skin lesions of sulfur mustard-exposed Iranian war veterans [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 634-639.
- [14] NOURANI M R, MAHMOODZADEH HOSSEINI H, IMANI FOOLADI A A, et al. Comparative transcriptional and translational analysis of heme oxygenase expression in response to sulfur mustard[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(5): 479-484.
- [15] YUE L, ZHANG Y, CHEN J, et al. Distribution of DNA adducts and corresponding tissue damage of Sprague-Dawley rats with percutaneous exposure to sulfur mustard[J]. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28(3): 532-540.
- [16] JOWSEY P A, BLAIN P G. Checkpoint kinase 1 is activated and promotes cell survival after exposure to sulphur mustard[J]. *Toxicol Lett*, 2015, 232(2): 413-421.
- [17] LULLA A, PINO M A, PIĘTKA-OTTLIK M, et al. Ebselen reduces the toxicity of mechlorethamine in A-431 cells via inhibition of apoptosis[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2013, 27(6): 313-322.
- [18] REBHOLZ B, KEHE K, RUZICKA T, et al. Role of NF- κ B/RelA and MAPK pathways in keratinocytes in response to sulfur mustard[J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(7): 1626-1632.
- [19] GOSWAMI D G, TEWARI-SINGH N, DHAR D, et al. Nitrogen mustard-induced corneal injury involves DNA damage and pathways related to inflammation, epithelial-stromal separation, and neovascularization[J]. *Cornea*, 2015, 35(2): 257-266.
- [20] BALSZUWEIT F, MENACHER G, BLOEMEKE B, et al. Development of a co-culture of keratinocytes and immune cells for in vitro investigation of cutaneous sulfur mustard toxicity [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 223: 117-124.
- [21] MINSAVAGE G D, DILLMAN J F. Bifunctional alkylating agent-induced p53 and nonclassical nuclear factor kappa B responses and cell death are altered by caffeic acid phenethyl ester: a potential role for antioxidant/electrophilic response-element signaling[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 321(1): 202-212.
- [22] JOWSEY P A, WILLIAMS F M, BLAIN P G. DNA damage responses in cells exposed to sulphur mustard [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 209(1): 1-10.
- [23] JOST P, SVOBODOVA H, STETINA R. Induction and repair of DNA cross-links induced by sulfur mustard in the A-549 cell line followed by a comet assay[J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 237: 31-37.
- [24] GERECKE D R, CHEN M, ISUKAPALLI S S, et al. Differential gene expression profiling of mouse skin after sulfur mustard exposure: Extended time response and inhibitor effect[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 234(2): 156-165.
- [25] MALAVIYA R, SUNIL V R, CERVELLI J, et al. Inflammatory effects of inhaled sulfur mustard in rat lung[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 248(2): 89-99.
- [26] INTURI S, TEWARI-SINGH N, JAIN A K, et al. Absence of a p53 allele delays nitrogen mustard-induced early apoptosis and inflammation of murine skin[J]. *Toxicology*, 2013, 311(3): 184-190.
- [27] 朱双双, 祝筱姬, 赵建, 等. 芥子气不同途径染毒致大鼠急性肺损伤的观察[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2015, 33(9): 685-688.
- [28] POHL C, PAPRITZ M, MOISCH M, et al. Acute morphological and toxicological effects in a human bronchial coculture model after sulfur mustard exposure[J]. *Toxicol Sci*, 2009, 112(2): 482-489.
- [29] STEINRITZ D, EMMER J, HINTZ M, et al. Apoptosis in sulfur mustard treated A549 cell cultures[J]. *Life Sci*, 2007, 80(24/25): 2199-2201.
- [30] DEBIAK M, KEHE K, BÜRKLE A. Role of poly(ADP-ribose) polymerase in sulfur mustard toxicity [J]. *Toxicology*, 2009, 263(1): 20-25.
- [31] CUSIMANO E M, KNIGHT A R, SLUSSER J G, et al. Mitochondria: the hemi of the cell[J]. *Adv Emerg Nurs J*, 2009, 31(1): 54-62.
- [32] SOURDEVAL M, LEMAIRE C, DENIAUD A, et al. Inhibition of caspase-dependent mitochondrial permeability transition protects airway epithelial cells against mustard-induced apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2006, 11(9): 1545-1559.
- [33] FUJITA E, EGASHIRA J, URASE K, et al. Caspase-9 processing by caspase-3 via a feedback amplification loop in vivo[J]. *Cell Death Differ*, 2001, 8(4): 335-344.
- [34] ROSENTHAL D S, SIMBULAN-ROSENTHAL C M, IYER S, et al. Calmodulin, poly(ADP-ribose) polymerase and p53 are targets for modulating the effects of sulfur mustard [J]. *J Appl Toxicol*, 2000, 20(Suppl 1): S43-S49.
- [35] KIM T H, ZHAO Y, BARBER M J, et al. Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and bax[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(50): 39474-39481.
- [36] PORTER A G, JÄNICKE R U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis[J]. *Cell Death Differ*, 1999, 6(2): 99-104.
- [37] WEINBERGER B, LASKIN J D, SUNIL V R, et al. Sulfur mustard-induced pulmonary injury: therapeutic approaches to mitigating toxicity[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2011, 24(1): 92-99.
- [38] JAFARI M. Dose and time dependent effects of sulfur mustard on antioxidant system in liver and brain of rat[J]. *Toxicology*, 2007, 231(1): 30-39.

(童颖丹 编辑)